

**Tesis de Maestría**

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA)

Área Biología, subárea Bioquímica

**Impacto del balance energético negativo sobre la función  
mitocondrial en el hígado bovino**

Lic. María Mercedes García-Roche Saracco

**Directora:**

Dra. Adriana María Cassina Gómez

**Co-directoras:**

Dra. Celia Lía Quijano Herrera

Dra. Mariana Carriquiry Fossemale

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO)

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina, Universidad de la República

Departamento de Producción Animal y Pasturas

Facultad de Agronomía, Universidad de la República

**Tribunal**

Presidente: Dra. Florencia Irigoín

Vocales: Dres. Pablo Chilibroste y Carlos Escande

Montevideo, diciembre de 2017

## Agradecimientos

Agradezco a todo el equipo del Centro de Investigaciones Biomédicas - Departamento de Bioquímica, Estación Experimental Mario Cassinoni y Departamento de Producción Animal y Pasturas que me recibieron cálidamente e hicieron posible esta tesis. En particular, agradezco a mis compañeros que me ayudaron tanto en la operativa como a discutir resultados y hacer el trabajo más llevadero.

Agradezco especialmente a mis tres orientadoras que brindaron tres visiones muy distintas e inmensamente valiosas a este proyecto. Agradezco su compromiso, paciencia y disposición tanto en lo académico como en lo personal. No solo me transmitieron enseñanzas invaluableles sino que también su pasión por la ciencia que espero llevar conmigo e inspirar a otros de la misma forma.

A los miembros del tribunal por aceptar este desafío multidisciplinario.

A mi familia y amigos que me apoyaron en todo momento.

Y al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas y la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por su apoyo.

# Índice

Agradecimientos .....	2
Resumen.....	5
Balance energético negativo en la vaca lechera .....	7
Metabolismo hepático durante la lactancia .....	9
Rol de la mitocondria en el metabolismo hepático .....	10
<i>Estructura y función de la mitocondria</i> .....	10
<i>Metabolismo mitocondrial hepático</i> .....	11
Acilación .....	18
Acetilación .....	19
Estrategias alimenticias preventivas .....	20
Hipótesis.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
Materiales y métodos .....	23
Animales y diseño experimental .....	23
Recolección de tejido hepático y muestras de sangre.....	25
Fraccionamiento subcelular .....	31
Cuantificación de proteínas .....	32
Estudios de Western blot.....	33
Control de la pureza del fraccionamiento subcelular .....	33
Ensayos de actividad enzimática.....	34
Extracción de lípidos .....	36
Análisis semi-cuantitativos de los extractos lipídicos .....	36
Determinación de $\beta$ -hidroxibutirato .....	37
Análisis estadísticos.....	37
Resultados .....	38
DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CRIOPRESERVACIÓN DE BIOPSIA HEPÁTICA .....	38
Efecto de la concentración de criopreservante .....	42
IMPACTO DEL BALANCE ENERGÉTICO NEGATIVO EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL .....	44
Evidencias del balance energético negativo .....	44
Cuantificación relativa de triglicéridos en tejido hepático .....	44
Determinación de niveles de $\beta$ -hidroxibutirato .....	45

Estudio de la función mitocondrial en el hígado de vaca durante la curva de lactancia .....	46
Evaluación del contenido mitocondrial.....	53
Actividades enzimáticas Complejo I y II .....	55
Modificaciones post-traduccionales .....	55
Discusión .....	65
Disminución en la función mitocondrial hepática durante la lactancia temprana y recuperación en lactancia media .....	65
Formación de oxidantes durante la lactancia .....	67
Contenido de proteínas mitocondriales durante la lactancia.....	69
Acetilación y función mitocondrial en la lactancia.....	70
Conclusiones .....	73
Perspectivas: .....	75
1) Estudiar los factores de transcripción y co-reguladores que controlan la función mitocondrial .....	75
2) Evaluar del rol de la acetilación en la regulación del metabolismo energético hepático en la lactancia.....	75
3) Profundizar en el impacto del manejo nutricional sobre la función.....	75
Referencias.....	77

## Resumen

La lactancia es un periodo de alta demanda energética para la vaca lechera. Durante la lactancia temprana la vaca experimenta un balance energético negativo (BEN), que conduce a grandes cambios metabólicos en varios tejidos. El BEN es un período crítico que amenaza tanto a la salud del animal como su bienestar y en consecuencia la producción de leche.

En este trabajo de tesis estudiamos el impacto del BEN en la función mitocondrial hepática de vacas lecheras Holstein Friesian bajo dos estrategias alimentación. Vacas Holstein Friesian multíparas (n = 24) con parición en primavera fueron asignadas en un diseño de bloques completamente al azar a dos tratamientos: dieta totalmente mezclada (TMR) *ad libitum* (70:30 relación forraje concentrado) o una dieta mixta que incluyó pastoreo de *Festuca arundinacea* y/o *Mediticago sativa* y suplementación (Pas). Estas estrategias fueron administradas durante la lactancia temprana y media, desde el día 0 al 180 después del parto (DPP). En la lactancia tardía (después de los 180 DPP), todas las vacas recibieron la misma alimentación compuesta de *Festuca arundinacea* y TMR *ad libitum*. El experimento comenzó en agosto de 2015 y finalizó en abril de 2016 y se realizaron biopsias de hígado y sangrado en 6 fechas representativas dentro de la curva de lactancia -14, +35, +60, +110, +180 y +250 DPP.

Inicialmente desarrollamos un método de criopreservación de las biopsias hepáticas para poder transportarlas 379 kms desde el sitio del experimento en Paysandú hasta el laboratorio de análisis en Montevideo. Para estudiar la función mitocondrial en las biopsias hepáticas, realizamos estudios de consumo de oxígeno en presencia de sustratos e inhibidores de la fosforilación oxidativa. Éstos mostraron que durante la lactancia temprana, momento de balance energético negativo (35 DPP), las biopsias presentan una menor capacidad de reserva respiratoria y respiración en estado 3, indicativos de una disminución en la función mitocondrial, que en la lactancia tardía,

momento de balance energético positivo (250 DPP). Esta disminución se vio acentuada en el grupo Pas con respecto al grupo TMR.

Con el objetivo de comprender los eventos moleculares detrás de esta caída en la función mitocondrial medimos los niveles y actividad de proteínas mitocondriales y algunas modificaciones postraduccionales conocidas por su impacto sobre proteínas del metabolismo energético. No se observaron diferencias significativas en la actividad citrato sintasa, una enzima constitutiva de la matriz mitocondrial utilizada frecuentemente como marcador mitocondrial, entre las distintas fechas y dietas, sugiriendo que los cambios observados en la función no se deben a alteraciones en cantidad de mitocondrias. Sin embargo, el grupo Pas presentó un pequeño aumento (10%) en los niveles de algunas subunidades de complejos involucrados en la fosforilación oxidativa. Por otra parte, se encontraron altos niveles de acetilación de lisinas mitocondriales en el grupo Pas durante la lactancia temprana, mientras que los niveles de estas modificaciones postraduccionales se mantuvieron iguales en lactancia temprana y tardía en el grupo TMR. A su vez, los niveles de acetilación mencionados presentaron una alta correlación positiva con los niveles de cuerpos cetónicos en sangre y el contenido de triglicéridos del hígado y una alta correlación negativa con la máxima capacidad respiratoria. Estos resultados sugieren que la acetilación podría ser una de las causas de la disminución en la función mitocondrial observada durante el BEN y cumplir un rol en la adaptación metabólica ante un evento de baja disponibilidad de nutrientes. Por último observamos un aumento en la formación de aductos de hidroxinonanal con proteínas durante la lactancia temprana en el grupo Pas, el mismo correlacionó positivamente con el consumo de oxígeno no mitocondrial, sugiriendo un aumento en los niveles de oxidantes en este período. Sin embargo, la correlación con la máxima capacidad respiratoria fue baja, por tanto, probablemente no sea la principal causa en la caída en función mitocondrial.

En suma, este trabajo presenta un método de criopreservación de biopsias de hígado bovino e información inédita sobre la función mitocondrial hepática durante la curva de lactancia en vacas lecheras sometidas a distintas estrategias de alimentación.

También pudimos aproximarnos a los mecanismos moleculares que podrían estar en juego en los cambios observados en la función mitocondrial.

## Introducción

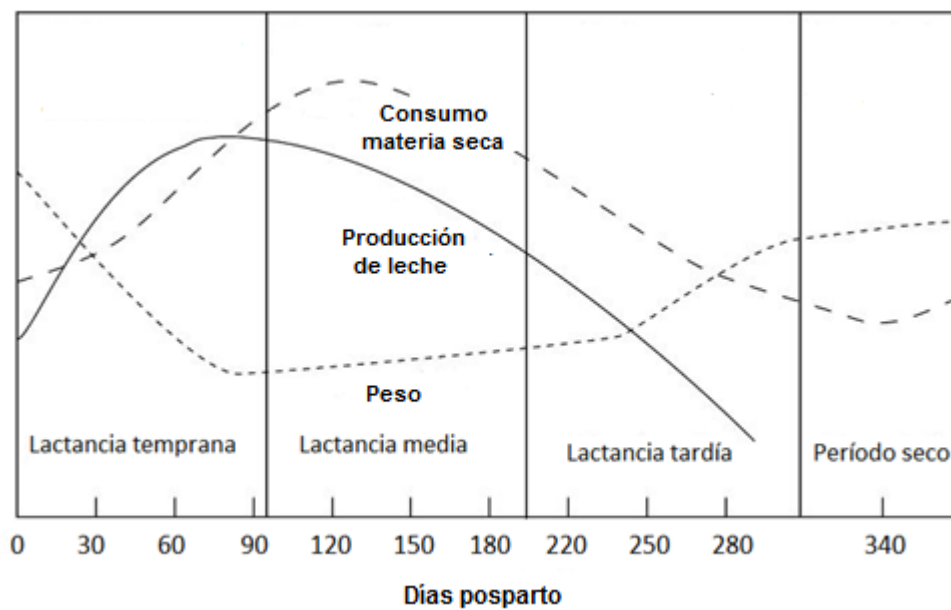
### Balance energético negativo en la vaca lechera

La lactancia es un periodo de alta demanda energética para la vaca lechera. Este periodo comienza el día del parto y transcurre hasta aproximadamente 305 días posparto (DPP), es seguido de un periodo seco donde no se produce leche. La lactancia puede dividirse en tres etapas: temprana, media y tardía (Figura 1.1)<sup>1</sup>.

Durante la lactancia temprana, la producción de leche aumenta de forma constante hasta alcanzar el pico de lactancia. En este periodo el consumo de materia seca<sup>a</sup> no logra satisfacer la demanda, y se produce un balance energético negativo (BEN). La vaca lechera recurre a sus reservas corporales priorizando la producción de leche en la glándula mamaria; aumenta la movilización lipídica, glucogénica, proteica y de minerales con el fin de aumentar la disponibilidad de precursores para la lactogénesis<sup>2,3</sup>. Esto se ve reflejado en una disminución en el peso vivo y condición corporal del animal (Figura 1.1) Luego, en la lactancia media (entre los días 100 y 200 DPP) los requerimientos de producción de leche comienzan a disminuir y el consumo de materia seca logra alcanzarlos, sin embargo, la vaca lechera aún no restablece las reservas corporales que movilizó durante la lactancia temprana. El peso corporal recién comienza a restablecerse durante la lactancia tardía. Es importante destacar que el período de lactancia temprana es el momento en que la vaca es inseminada nuevamente (o servida), por esta razón es importante que no movilice reservas corporales de forma exacerbada, sino su función reproductiva se verá comprometida. Además en caso de preñarse los nutrientes se direccionarán al feto por lo que será aún más difícil restablecer las reservas corporales<sup>4-6</sup>.

El BEN comienza durante la transición (un periodo comprendido entre tres semanas antes y tres semanas después del parto) y culmina luego del pico de lactancia<sup>7</sup>. Durante el BEN ocurren grandes cambios metabólicos en varios tejidos. Es un período

crítico que amenaza tanto a la salud del animal como su bienestar y en consecuencia la producción de leche<sup>2</sup>.



**Figura 1.1** – Curvas de consumo de materia seca, producción de leche y peso durante la lactancia. Extraído de Glen Hendry Schmidt, Lloyd Dale Van Vleck, M. F. Hutjens, 1988, *Principles of Dairy Science*, p. 2<sup>1</sup>.

Es importante destacar el rol esencial de la regulación hormonal durante este período. En particular de la insulina; el eje somatotrópico que está compuesto por la hormona de crecimiento (somatotropina) y el factor de crecimiento insulínico tipo 1(IGF-I), glucocorticoides, adiponectina y leptina, entre otros. La coordinación de estos actores durante la lactancia temprana direcciona nutrientes a la glándula mamaria, disminuyendo la sensibilidad a insulina de los órganos periféricos<sup>8</sup>.

Varios estudios han propuesto estrategias de intensificación de la producción que apuntan a minimizar el BEN, el cual con frecuencia se ve agravado en vacas de alta producción lechera<sup>9</sup>.



## Metabolismo hepático durante la lactancia

Durante el período de transición, el metabolismo de la vaca lechera se adapta a los requerimientos de la lactogénesis y el hígado es el principal responsable de las adaptaciones metabólicas<sup>7</sup>. El hígado juega un rol crítico en el metabolismo de los glúcidos, proteínas, ácidos grasos<sup>10</sup>. También es un órgano clave para el mantenimiento de la glicemia y la regulación del metabolismo lipídico, especialmente del colesterol y triglicéridos<sup>11</sup>.

Como ya mencionamos, en la lactancia temprana los requerimientos energéticos y de precursores para la lactogénesis aumentan de forma exacerbada. El hígado, por medio de la gluconeogénesis, produce la mayor parte de la glucosa que se utiliza para la síntesis de lactosa, el principal glúcido de la leche. Para satisfacer la demanda energética, se recurre a la movilización de triglicéridos y nuevamente es en el hígado donde se transforman los ácidos grasos en cuerpos cetónicos, una fuente de energía que puede ser utilizada por varios tejidos de la vaca. Sin embargo, un aumento desmedido en la síntesis de cuerpos cetónicos puede llevar a una cetosis en el animal<sup>7</sup>. Cuando la entrada de ácido grasos no esterificados (AGNE) al hígado es muy alta, aumenta la acumulación de triglicéridos y puede dar lugar a una esteatosis hepática (hígado graso) afectando el funcionamiento del hígado y prolongando el tiempo de recuperación del animal<sup>7</sup>. En vacas lecheras, el hígado graso se desarrolla en las cuatro semanas posteriores a la parición. Se ha demostrado que alrededor del 50% de las vacas lecheras acumulan triglicéridos en el hígado durante este período. Se considera una enfermedad de transición ya que en la mayoría de los casos el cuadro se revierte al término de este período<sup>12</sup>. El hígado graso está asociado a un empeoramiento del estado de salud, bienestar, productividad y desempeño reproductivo<sup>6,13</sup>.

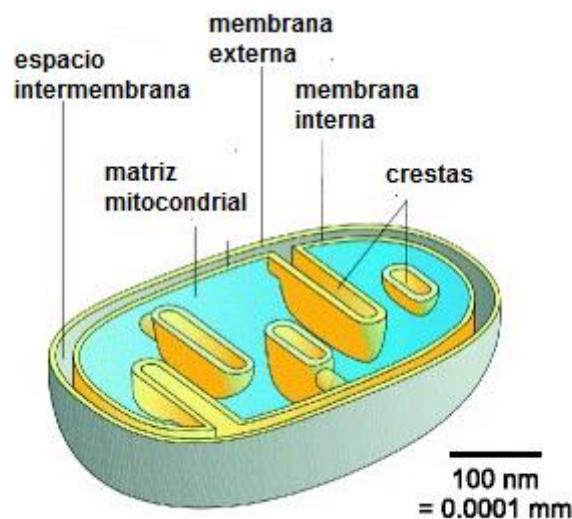
Existen varias hipótesis sobre el desarrollo del hígado graso, siendo la resistencia a la insulina un factor común en todas ellas. La más aceptada es la hipótesis de dos *golpes* donde se propone que la resistencia a la insulina —el primer *golpe*— aumenta la lipólisis en el tejido adiposo. Esto aumenta el flujo de ácidos grasos libres al hígado y la

acumulación de triglicéridos lleva al desarrollo de una esteatosis hepática. Posteriormente, dicha esteatosis predispone al hígado a un segundo *golpe* caracterizado por eventos como formación de oxidantes, disfunción mitocondrial<sup>14</sup> e inflamación mediada por citoquinas proinflamatorias<sup>15,16</sup>.

## Rol de la mitocondria en el metabolismo hepático

### *Estructura y función de la mitocondria*

Las mitocondrias son organelos que tienen un rol esencial en el metabolismo energético. La mitocondria está compuesta por una membrana externa y otra interna con invaginaciones que se denominan crestas (fig. 1.2). Por un lado, la membrana externa participa en el intercambio de pequeñas moléculas e información entre la mitocondria y el resto de la célula. Por otro lado, la membrana interna tiene numerosas crestas las cuales aumentan la superficie de esta estructura. La membrana interna está enriquecida de proteínas involucradas en la fosforilación oxidativa, fusión mitocondrial y síntesis y transporte de proteínas. Entre las dos membranas se encuentra el espacio intermembrana y en el interior de la membrana interna se encuentra la matriz mitocondrial<sup>17,18</sup>.



**Figura 1.2** – Estructura y compartimientos de la mitocondria. Extraído y modificado de Werner Kuhlbrandt, Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes, 2015 *BMC Biology*, p.2<sup>19</sup>.

En el hepatocito, la mitocondria tiene un rol esencial en la bioenergética ya que es responsable de la mayor parte del ATP generado. Además, sus funciones incluyen: síntesis y catabolismo de metabolitos; formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, reactive oxygen species), pueden ser responsables del 90% de ROS producidos<sup>15,20</sup>; y regulación del calcio citoplasmático y mitocondrial. La mitocondria también está involucrada en la vía de apoptosis intrínseca, donde la liberación de del citocromo *c* conduce a la formación del apoptosoma y la activación de caspasas<sup>21</sup>. La alteración en cualquiera de estos procesos puede considerarse una disfunción mitocondrial<sup>22</sup>.

### *Metabolismo mitocondrial hepático*

#### Oxidación de ácidos grasos

Durante el balance energético negativo, la vaca lechera moviliza reservas lipídicas para compensar el déficit energético. Los ácidos grasos, provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos del tejido adiposo llegan al hígado donde pueden tener distintos destinos. La vía predominante es la oxidación de ácidos grasos mitocondrial. La  $\beta$ -oxidación mitocondrial involucra cuatro reacciones donde se generan NADH, FADH<sub>2</sub> y acetil-coenzima A (acetil-CoA) como producto<sup>23</sup>

La  $\beta$ -oxidación está regulada en gran parte por la enzima carnitina palmitoil transferasa I (CPT-I) que regula la entrada de ácidos grasos a la mitocondria. Esta enzima cataliza la formación de acil-carnitina a partir del ácido graso activado (acil-CoA) y la carnitina. La CPT-I es inhibida por malonil-CoA un precursor de la síntesis de los ácidos grasos<sup>24</sup>. Una alta concentración de este metabolito inhibe la actividad de la enzima CPT-I y disminuye el catabolismo de los ácidos grasos. En contraste, cuando los niveles de malonil-CoA son bajos, en estados de ayuno o de alta exigencia energética, la CPT-I se activa y promueve la oxidación de ácidos grasos<sup>10</sup>.

La  $\beta$ -oxidación mitocondrial es eficiente pero poco flexible en situaciones de adaptación metabólica. Se ha demostrado que en los casos de alta lipidemia, cuando existe acumulación de ácidos grasos en el hígado, el peroxisoma tiene mayor actividad

$\beta$ -oxidativa. Esto está dado en gran parte por la permeabilidad de la membrana peroxisomal a los ácidos grasos y la ausencia de un regulador como CPT-I. Sin embargo, algunos estudios indican que a pesar de que el peroxisoma juega un rol compensatorio en la oxidación de ácidos grasos, también puede verse desbordado por el flujo de los mismos. En estas condiciones los ácidos grasos que no son degradados se reesterifican formando triglicéridos, dando lugar a la condición de hígado graso <sup>11,25</sup>.

La acetil-CoA formada en la  $\beta$ -oxidación a su vez tiene dos posibles destinos: 1) la oxidación completa a dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en el Ciclo de Krebs y 2) la producción de cuerpos cetónicos como  $\beta$ -hidroxibutirato y acetoacetato.

#### Cuerpos cetónicos

La síntesis de cuerpos cetónicos ocurre en el hígado en situaciones de ayuno, alta exigencia física o balance energético negativo<sup>26</sup>. Cuando los niveles de glucosa en sangre son bajos, aumenta la síntesis de cuerpos cetónicos como 3-hidroxibutirato y acetoacetato en el hígado. Éstos se utilizan como fuente de energía alternativa en tejidos extrahepáticos como el corazón y cerebro<sup>10</sup>.

Durante la lactancia temprana se observa un gran aumento en la producción de cuerpos cetónicos. Una posible razón para esto es que en este periodo escasean los intermediarios del ciclo de Krebs, ya que están volcados a la síntesis de glucosa en la gluconeogénesis para la lactogénesis. En estas condiciones el acetil-CoA es direccionado a la síntesis de cuerpos cetónicos y puede ocasionar una cetosis <sup>27</sup>.

En rumiantes, también se sintetizan cuerpos cetónicos en la fermentación ruminal. Éstos se utilizan, en gran parte, como fuente de energía en el rumen para las actividades de contracción ruminal durante la digestión <sup>28</sup>.

#### Cadena respiratoria y fosforilación oxidativa

Los electrones provenientes de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y de la oxidación de acetil-CoA en el Ciclo de Krebs, son transportados a la cadena respiratoria por las coenzimas reducidas NADH y  $\text{FADH}_2$ .

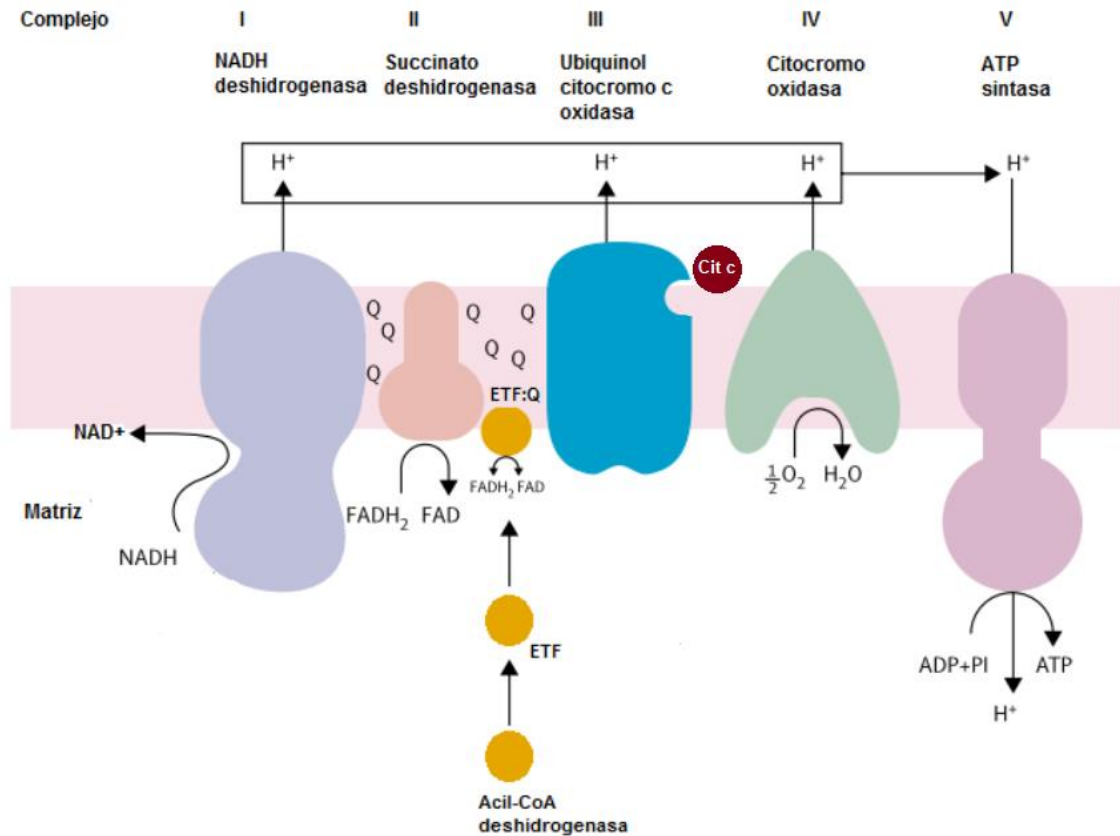
El NADH entrega sus electrones al complejo I (NADH deshidrogenasa) de la cadena respiratoria y la oxidación de succinato a fumarato en el complejo II (succinato deshidrogenasa) resulta en la formación de  $\text{FADH}_2$ . La ubiquinona (representada como Q en la fig. 1.3) transporta los electrones desde los complejos I y II hasta el complejo III (ubiquinol:citocromo c reductasa). El citocromo c (representado como C en la fig. 1.3) actúa como *punte* entre el complejo III y el complejo IV (citocromo oxidasa) donde el oxígeno ( $\text{O}_2$ ), último aceptor de electrones, se reduce a agua ( $\text{H}_2\text{O}$ )<sup>18</sup>(fig. 1.3). De modo similar, la flavoproteína transportadora de electrones (ETF por sus siglas de inglés) recibe electrones de la acil-CoA deshidrogenasa (primera enzima de la  $\beta$ -oxidación con una coenzima  $\text{FADH}_2$ ) y los pasa a ubiquinona por medio de la ETF: ubiquinona oxidoreductasa (ETF: Q)<sup>18</sup>(fig. 1.3).

El flujo de electrones por la cadena respiratoria aporta la energía necesaria para la salida de protones de la matriz hacia el espacio intermembrana en contra del gradiente de concentración y eléctrico. Los protones son bombeados a nivel de los complejos I, III y IV de la cadena de transporte hacia el espacio intermembrana (figura 1.3). De esta forma se genera un gradiente electroquímico. La membrana interna mitocondrial es impermeable a los protones y estos vuelven a la matriz mitocondrial mediante un canal específico de protones ( $\text{F}_0$ ) presente en la ATP sintasa, liberando la energía para la síntesis de ATP, catalizada por la subunidad  $\text{F}_1$  de la ATP sintasa<sup>18</sup>(fig. 1.3).

En la figura 1.3 se puede observar que el aceptor final de electrones es el  $\text{O}_2$ . Por tanto, el consumo de oxígeno o la “respiración mitocondrial” puede ser utilizado para la evaluación de la función mitocondrial<sup>29,30</sup>.

Varios autores plantean que la esteatosis hepática es una enfermedad mitocondrial y se han observado, por microscopía electrónica, mitocondrias agrandadas e hinchadas en estas condiciones<sup>10</sup>. Estudios anteriores también han demostrado que la actividad de complejos de la cadena respiratoria y enzimas de la  $\beta$ -oxidación disminuye en esta

patología<sup>14</sup> y se plantea que una disfunción en la cadena respiratoria mitocondrial o alguno de sus complejos también podría generar ROS<sup>15</sup>.



**Figura 1.3** – Representación de los principales puntos de entrada y transporte de electrones a la cadena respiratoria y la síntesis de ATP por la ATP sintasa. Extraído y modificado de Anthony H V Schapira, Mitochondrial disease, 2006 *Lancet*, p.71<sup>18</sup>.

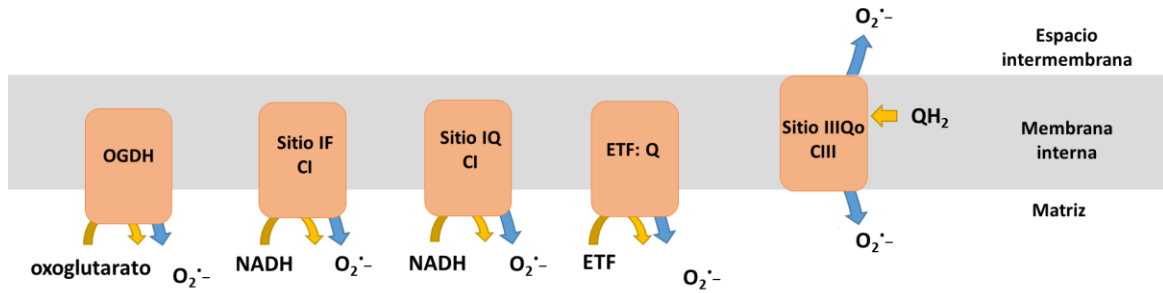
### Formación de especies reactivas del oxígeno

La cadena respiratoria mitocondrial es el sitio principal de formación de ROS, en la mayoría de las células, y en condiciones normales entre 1 y 2% del oxígeno consumido resulta en la producción de ROS<sup>15</sup>. La principal ROS formada en la cadena respiratoria es el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), que proviene de la reducción monoelectrónica del O<sub>2</sub>. Como muestra la figura 1.4, los sitios de producción de superóxido en la cadena respiratoria incluyen: la coenzima flavina mononucleótido reducido (FMNH<sub>2</sub>) en el

complejo I (Sitio IF Cl); el sitio de unión a la ubiquinona del complejo I (Sitio IQ Cl) y la semiquinona radical del centro *o* (Sitio IIIQo) del complejo III. En todos los casos se produce una fuga de electrones que reduce el oxígeno y resulta en la formación de superóxido. El superóxido puede dismutar formando peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y agua (H<sub>2</sub>O). Esta reacción es catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), y ocurre con una alta velocidad de reacción <sup>15,31,32</sup>. Asimismo, el peróxido de hidrógeno puede descomponerse a radical hidroxilo ( $\cdot$ OH), en presencia de metales de transición como Fe<sup>2+</sup> o Cu<sup>2+</sup>, mediante reacción de Fenton<sup>33</sup>. El radical hidroxilo, es una especie altamente oxidante que puede iniciar procesos de lipoperoxidación al oxidar por un electrón a ácidos grasos poliinsaturados<sup>34</sup>. Durante la lipoperoxidación se forman radicales alquilo (R $\cdot$ ) que por adición de O<sub>2</sub> generan los radicales peroxilo (ROO $\cdot$ )<sup>35</sup>. Por otro lado, cuando el superóxido reacciona con el óxido nítrico ( $\cdot$ NO) se forma el anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) una especie reactiva del nitrógeno altamente oxidante y nitrante<sup>35</sup>.

Estudios anteriores han demostrado que la cadena respiratoria no es el único sitio de formación de superóxido en la mitocondria. Otros sitios son las flavoenzimas acil-CoA deshidrogenasas y la ETF ubiquinona oxidorreductasa (ETF:Q), que durante la oxidación de ácidos grasos puede producir superóxido porque la fuga de electrones de la flavina reducida es capaz de reducir el oxígeno<sup>31,36</sup> (fig. 1.4). Finalmente, otros sitios adicionales son el complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa del ciclo de Krebs, también conocido como oxoglutarato deshidrogenasa (OGDH) (fig. 1.4)<sup>31,37</sup>.

Un estudio realizado en ratones mostró que las dietas altas en ácidos grasos estimulan la producción de ROS a nivel de la enzima acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (VLCAD)<sup>36</sup>, de hecho la enzima es capaz de reducir el oxígeno a peróxido de hidrógeno<sup>38</sup>.



**Figura 1.4** - Sitios de producción de superóxido mitocondrial. Extraído y modificado de Martin D. Brand: Sites and topology of mitochondrial superoxide production, 2010, *Exp. Gerontol*, p. 15<sup>18</sup>.

Las células cuentan con sistemas de defensa frente al aumento en los niveles de especies oxidantes. Estos pueden ser enzimáticos y no-enzimáticos. Por un lado, las enzimas antioxidantes incluyen, las superóxido dismutasas (MnSOD y CuZnSOD), catalasa, glutatión peroxidasa, hemo-oxigenasa-1, tiorredoxinas, peroxirredoxinas y glutarredoxinas. La MnSOD se ubica en la matriz mitocondrial y la CuZnSOD en el espacio intermembrana y en el citosol. Por otro lado, los antioxidantes no-enzimáticos incluyen el trans-retinol (vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) y glutatión<sup>34</sup>.

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno están involucradas tanto en procesos fisiológicos (señalización, proliferación celular y respuesta inmune) como en eventos patológicos donde predomina el daño a biomoléculas como proteínas (ej. nitración de tirosinas), lípidos (ej. lipoperoxidación) y ADN (ej. oxidación de las bases nitrogenadas) <sup>33,39,40</sup>. Cuando la formación de oxidantes excede la capacidad de detoxificación por los antioxidantes nos encontramos en una situación de estrés oxidativo<sup>41</sup>.

Durante el BEN, una alta tasa de oxidación de ácidos grasos puede generar un aumento en la formación de ROS por las flavoproteínas y complejos de la cadena respiratoria ROS<sup>42,43</sup>. Dicha producción excesiva de ROS podría exceder la capacidad antioxidante de la mitocondria y en segunda instancia la célula, dañando componentes de la célula como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos y finalmente afectando la función y viabilidad del hepatocito<sup>15</sup>



## Nitración

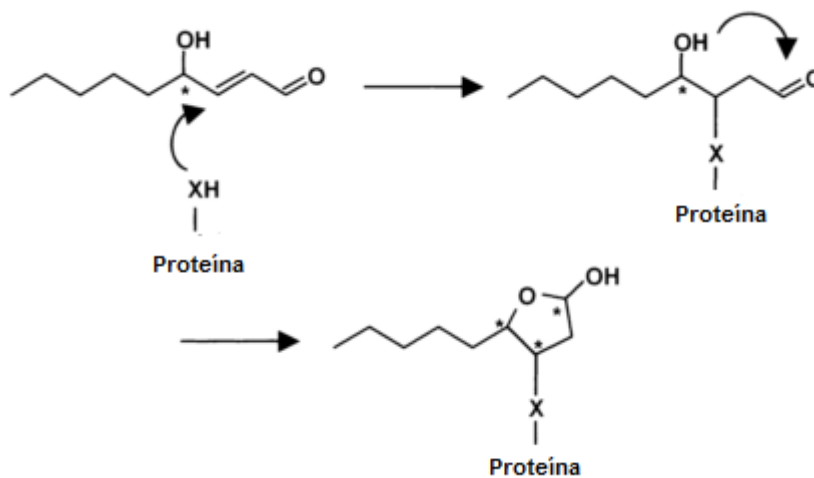
Una modificación postraducciona de proteínas, asociada al estrés oxidativo, ampliamente estudiada es la nitración de tirosinas. Este proceso está mediado por especies reactivas del nitrógeno tal como el peroxinitrito<sup>44</sup>. Este oxidante da origen al radical hidroxilo y al dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ) y son estos los radicales responsables de la nitración de la tirosina. La nitración de tirosinas ocurre en dos pasos, el primero es la formación del radical tirosilo por el radical hidroxilo. Luego, el radical tirosilo reacciona con dióxido de nitrógeno formando 3-nitrotirosina<sup>45</sup>. En presencia del  $\text{CO}_2$  o centros metálicos el peroxinitrito forma radical carbonato ( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) o complejos oxo-metalícos, respectivamente, además de dióxido de nitrógeno y son éstos los responsables de la oxidación de la tirosina a radical tirosilo<sup>44</sup>. Un mecanismo alternativo de nitración, es la reacción entre el radical tirosilo y óxido nítrico, formando 3-nitrosotirosina, éste producto se oxida por dos electrones y finalmente forma 3-nitrotirosina<sup>45</sup>. Este mecanismo puede operar en proteínas que contengan metales de transición que pueden oxidar 3-nitrosotirosina. Por último las peroxidasas también catalizan la nitración de proteínas en presencia de peróxido de hidrógeno y nitrito<sup>44</sup>. La nitración es capaz de inhibir la acción de enzimas (ej. MnSOD) o aumentar la actividad (ej. actividad peroxidática del citocromo c). Debido a que los radicales tienen vida media muy corta, la identificación de proteínas nitradas actúa como un “huella” del estrés oxidativo<sup>21</sup>.

## Lipoperoxidación

Las especies oxidantes también pueden oxidar ácidos grasos poliinsaturados dando lugar a productos de lipoperoxidación como malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-2,3-nonenal (HNE)<sup>46</sup>. La presencia de cualquiera de estos productos demuestra que hubo un proceso radicalar por esto se consideran biomarcadores del estrés oxidativo.

El HNE se genera a partir de la oxidación de los ácidos linoleico y araquidónico, y puede reaccionar con proteínas y péptidos, formando aductos HNE-cisteína, HNE-lisina y HNE-histidina (figura 1.5). En particular, como muestra la figura 1.5, el aducto de tipo Michael se forma a partir del ataque electrofílico del HNE sobre el nucleófilo (por ejemplo el sulfhidirilo de la cisteína).

En bajas concentraciones el HNE puede ejercer un rol de señalización o incluso protector al estimular la expresión de enzimas antioxidantes e inducir una respuesta adaptativa<sup>47-49</sup>. Sin embargo, en altas concentraciones puede tener efectos nocivos. Varias enzimas se inactivan con el agregado de HNE, como glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, glutatión S-transferasa, glutatión reductasa, aldosa reductasa<sup>33</sup>, acil-CoA deshidrogenasas ( $\beta$ -oxidación), la cadena respiratoria (cadena  $\alpha$  de ATP sintasa, citocromo c oxidasa, succinato deshidrogenasa), sistemas antioxidantes (glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, glutatión reductasa), la enzima superóxido dismutasa, la enzima aldosa reductasa que cumple una función importante en la sensibilidad a la insulina<sup>50,17</sup>, 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintetasa (cetogénesis), sirtuína 3<sup>35</sup> y colina deshidrogenasa, entre otras<sup>50</sup>. Es importante destacar que alrededor de 30% de los aductos HNE—proteína se encuentran en la mitocondria<sup>47</sup>. El HNE cumple un importante rol en la esteatosis hepática no alcohólica<sup>35,46</sup>.



**Figura 1.5** - Esquema de la formación de aductos de tipo Michael HNE-proteína. X representa un grupo sulfhidrilo de la cisteína, grupo imidazol de la histidina o un grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina. Extraído y modificado de Koji Uchida: 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress, 2003, *Progress in Lipid Research* p. 325.

## Acilación

La adición de un intermediario acil-CoA a un residuo lisina se denomina acilación. El mecanismo se ha reportado ampliamente como no enzimático, las condiciones que lo

favorecen son altas concentraciones de intermediario acil-CoA de cadena corta como grupos acetilo, malonilo, succinilo y propinilo y pH alcalino, por esta razón las enzimas que se ubican en la matriz mitocondrial son un blanco común de acilación<sup>51,52</sup>.

### Acetilación

Hallazgos anteriores demostraron que la acetilación es una modificación postraduccional reversible de proteínas. Está demostrado que regula enzimas metabólicas clave, incluyendo enzimas involucradas en la  $\beta$ -oxidación<sup>51,53,54</sup>, el ciclo de Krebs, el ciclo de la urea, la fosforilación oxidativa<sup>55,56,57,58</sup> y la enzima antioxidante MnSOD<sup>15</sup> tanto inhibiendo como activándolas.

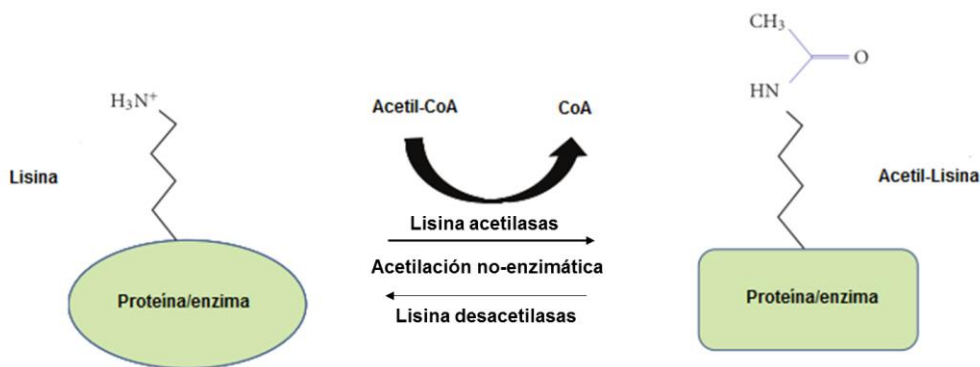
Tal como se ejemplifica en la figura 1.6, la acetilación de lisinas ocurre por la transferencia del grupo acetilo del acetil-CoA a una lisina de una cadena polipeptídica. La acetilación puede darse de forma no-enzimática, en particular a pH alcalino frente a un aumento en los niveles de acetil-CoA; o por acción de acetilasas. Hasta la fecha se han caracterizado dos acetilasas mitocondriales, ACAT1 y la GCN5L1. Se ha observado que un destino alternativo del acetil-CoA generado en la oxidación de ácidos grasos es la acetilación de proteínas<sup>59</sup>. Por otra parte la desacetilación de proteínas es catalizada desacetilasas. Entre éstas encontramos a las sirtuinas, desacetilasas dependientes de NAD<sup>+</sup><sup>27,55,56</sup>. En la mitocondria se ha reportado la presencia de las sirtuinas 3, 4 y 5<sup>51</sup>.

A pesar de ser una modificación postraduccional abundante, el estudio de la acetilación es reciente y la literatura es controversial. Por un lado, algunos autores mencionan que inhibe la actividad de las enzimas como acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCAD), que cataliza el primer paso de la  $\beta$ -oxidación, acetil-CoA sintetasas (participan de la activación de ácidos grasos para su entrada en la mitocondria), NADH:ubiquinona reductasa (Complejo I) y piruvato deshidrogenasa (PDHA1, cataliza la formación de acetil-CoA a partir de piruvato)<sup>53</sup>. Sin embargo, por otro lado, hay autores que mencionan que la acetilación activa la LCAD<sup>60</sup>, y a otras enzimas como la malato deshidrogenasa y aconitasa (ciclo de Krebs)<sup>61</sup> y enoil-CoA hidratasa ( $\beta$ -oxidación)<sup>53</sup>. Estas diferencias pueden deberse a diferencias en los tejidos de estudio.

No obstante, la bibliografía sugiere que el rol regulador que tiene la desacetilasa mitocondrial Sirtuina 3 (SIRT3) es clave en contextos de restricción calórica, exceso de

actividad o insuficiencia de nutrientes<sup>62</sup>. Se ha demostrado que SIRT3 también regula los niveles de acetilación del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial y de la succinato deshidrogenasa (SDH), una enzima que participa en el Ciclo de Krebs y la cadena respiratoria (complejo II) La desacetilación de los complejos I y II por SIRT3 conduce a un aumento en la actividad de los mismo sugiriendo un rol regulador de esta sirtuina en la actividad de la cadena respiratoria<sup>15,53</sup>.

Con respecto a las acetilasas mitocondriales, la Acetil-Coa acetiltransferasa (ACAT1) un enzima que participa en la formación de cuerpos cetónicos, también cataliza la acetilación la subunidad PDHA1 del complejo piruvato deshidrogenasa. La acetilación disminuye la actividad de esta enzima <sup>53,60</sup>.



**Figura 1.6** - Esquema representativo de las reacciones de acetilación y desacetilación. Extraído y modificado de Gregory R. Wagner y R. Mark Payne: Mitochondrial Acetylation and Diseases of Aging, 2011, *Journal of Aging Research* p. 4.

### Estrategias alimenticias preventivas

Actualmente se utilizan una gran variedad de dietas para prevenir los efectos del balance energético negativo en vacas lecheras. Dichas estrategias tiene como objetivo prevenir la lipólisis excesiva del tejido adiposo, aumentar la gluconeogénesis y aumentar la utilización de glucosa en tejidos extra-hepáticos<sup>2</sup>.

Una estrategia ampliamente utilizada es la suplementación con precursores gluconeogénicos, por ejemplo con propilenglicol<sup>63</sup> que en el rumen se transforma en propionato. Tratamientos preventivos exitosos incluyen la suplementación con propilenglicol en el período de transición. La misma es capaz de aumentar la concentración de insulina y glucosa y contribuye a bajar los niveles de ácidos grasos no volátiles y cuerpos cetónicos en sangre<sup>64</sup>, y de hecho constituye un tratamiento eficiente contra la cetosis. Una estrategia alternativa son las inyecciones con hormonas, que tienen el objetivo de aumentar la captación de glucosa por parte de los tejidos periféricos y de esta forma inhibir la movilización lipídica. Estas últimas fueron exitosas en el laboratorio pero no mostraron ser prácticas a campo<sup>13</sup>. Las dietas totalmente mezcladas (DTM) presentan una alternativa favorable ya que puede incluirse la suplementación dentro de la formulación y cumplir con los distintos requerimientos nutricionales durante la curva de lactancia. Por lo general tienen mayor proporción de almidón debido a que incluyen un porcentaje de carbohidratos no fibrosos. La suplementación debe hacerse en forma controlada ya que, un estudio realizado en vacas Holstein-Friesian sobre-alimentadas con DTM resultó en niveles de glucosa en sangre aún más alterados, aumentando el aporte de nutrientes hacia la glándula mamaria y no a los tejidos periféricos<sup>65</sup>. A su vez, la dieta totalmente mezclada también prevee la estabulación de los animales con el fin de disminuir los requerimientos de actividad física.

## Hipótesis

En el período de lactancia, la vaca sufre cambios metabólicos dramáticos estableciendo un balance energético negativo; debido a que los excesivos requerimientos energéticos de la lactogénesis no se pueden alcanzar con el consumo de materia seca. En este período se recurre a la movilización de reservas que son mayormente ácidos grasos aunque también se movilizan reservas proteicas y minerales. Al mismo tiempo, una oxidación de ácidos grasos exacerbada puede ser responsable de un aumento del estrés oxidativo e hígado graso. Nuestra hipótesis es que estos eventos, asociados al balance energético negativo, son capaces de generar una disfunción mitocondrial en el hígado que se puede modular con estrategias alimenticias que impacten sobre la movilización lipídica excesiva.

## Objetivo general

Estudiar el impacto del balance energético negativo sobre la función mitocondrial en el hígado de vacas lecheras.

## Objetivos específicos

1. Desarrollo de un método de criopreservación para el estudio de la función mitocondrial en biopsias de hígado.
2. Estudio de la función mitocondrial hepática durante la curva de lactancia en dos estrategias de alimentación.
3. Aproximación a los mecanismos moleculares involucrados en los cambios en la función mitocondrial.

## Materiales y métodos

### Animales y diseño experimental

El experimento fue realizado en la Estación Experimental "Dr. Mario A. Cassinoni" (EEMAC) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República en Paysandú, Uruguay, 32.38 ° S, 58.05 ° W, de agosto de 2015 a abril de 2016. Los procedimientos animales fueron aprobados por el Comité de Experimentación Animal (CEUA) de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay.

Veinticuatro vacas lecheras Holando multíparas con un peso vivo (PV) al parto de 664 ± 65 kg y condición corporal (CC) de 3,0 ± 0,4. Las vacas parieron en primavera (17/08/2015 ± 11 días) y fueron bloqueadas por paridad, fecha de parto, producción de leche anterior, PV y CC fueron utilizadas en un diseño de bloques al azar y dos tratamientos de estrategias de alimentación.

Las vacas fueron asignadas a dos estrategias de alimentación:

#### 1) *Grupo dieta totalmente mezclada* o (TMR por sus siglas en inglés) *ad libitum*:

En esta dieta, la proporción de forraje a concentrado fue 70:30. El forraje aportado fue mayormente ensilaje de maíz y el concentrado grano de sorgo, maíz, cebada y expeller de soja. También se incluyeron sales comerciales en la dieta. La dieta aportó 13,3% de proteína cruda y 1,41 Mcal energía neta de lactación por kg de materia seca.

#### 2) *Grupo Pas*:

Durante la lactancia temprana (entre 0 y 113 días posparto) las vacas pastorearon una pastura de *Festuca arundinacea* en franjas semanales (07:00 a 13:00 h y 17:00 a 04:00 h, la asignación estimada de pastura fue 30 kg materia de seca por vaca por día (19,5% de proteína cruda y 1,56 Mcal de energía neta de lactación por kg de materia seca) y recibieron 5,4 kg de materia seca de un concentrado comercial compuesto por grano de maíz, grano de cebada y expeller de soja. El concentrado aportó 16,8% de proteína cruda y 1,57 Mcal energía neta de lactación por kg de materia seca. El nivel de

suplementación que se dio al grupo Pas fue calculado para cumplir con las necesidades de mantenimiento. En lactancia media (113 a 180 días posparto) se realizó un cambio de dieta en el día 113 porque el ITH (índice de temperatura humedad) excedió el valor de 72 durante más de 5 horas consecutivas y durante 3 días consecutivos. A partir de un ITH de 72 se considera que la vaca está experimentando estrés térmico por calor<sup>66,67</sup>. Cabe recordar que como las vacas son de parición en primavera, la lactancia media transcurrió durante el verano, en particular diciembre, enero y febrero. Para compensar el efecto del estrés térmico se limitó el pastoreo para disminuir la exposición al calor y se cambiaron los horarios de pastoreo. Debido a que esto puede presentar una restricción energética, se aumentó la suplementación para compensarlo. En función a este cambio, el grupo pastoreó *Medicago sativa* en franjas semanales (18:00 a 04:00 h, la asignación estimada de la pastura fue 20 kg de materia seca por vaca por día (18% de proteína cruda y 1,45 Mcal de energía neta de lactación por kg de materia seca), y se suplementó con TMR (50% del consumo del tratamiento de TMR *ad libitum*).

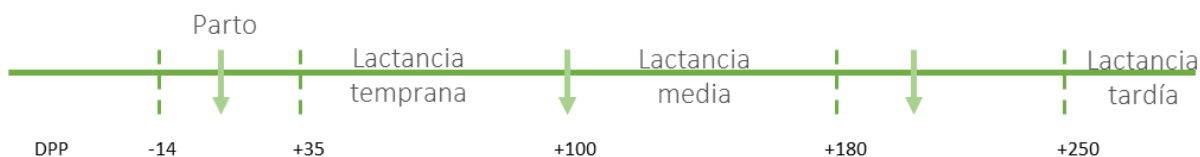
Finalmente, durante lactancia tardía (de 180 días posparto en adelante), todas las vacas (TMR y Pas) pastorearon *Festuca arundinacea* en franjas semanales (7 días por franja, 18:00 a 04:00 h, la asignación estimada de la pastura fue 20 kg de materia seca por vaca por día) y recibieron 50% TMR *ad libitum* durante el ordeño de la mañana. Las vacas fueron ordeñadas dos veces al día. Debido al cambio de dieta a partir del día 180, los cambios entre grupos en la variable respuesta serían consecuencia del efecto residual de las dietas.

Cabe resaltar que el grupo TMR no tuvo sesión de pastoreo, esto es que fueron mantenidas en un sistema de estabulación libre donde el gasto de energía destinado a mantenimiento fue menor que el grupo Pas debido a un menor costo por actividad por no tener que caminar, seleccionar y cosechar su alimento (*comunicación personal Lic. Jasinsky*).

A fin de evaluar lo que ocurre en distintos períodos se realizaron biopsias de hígado para el estudio de la función mitocondrial, expresión proteica, actividad enzimática y composición de tejido. Además, se colectaron muestras de sangre para determinación de  $\beta$ -hidroxibutirato.



Otros integrantes del equipo analizaron el contenido de AGNEs, glucosa, insulina, glucagón en sangre y midieron PV, CC y gasto energético por la técnica de O<sub>2</sub> pulso<sup>68</sup> (figura 2.1).



**Figura 2.1** – Calendario obtención de muestras, en distintos momentos de la curva de lactancia. Las flechas delimitan los distintos periodos (lactancia temprana, media y tardía). Las líneas discontinuas indican los momentos en que se tomaron muestras.

## Recolección de tejido hepático y muestras de sangre

Las biopsias hepáticas se recogieron a los 14 días pre-parto y 35, 100, 180 y 250 días después del parto (DPP). Para realizar las biopsias se anestesió la zona con lidocaína, se realizó un corte de bisturí y finalmente se obtuvieron las biopsias utilizando una aguja de biopsia de calibre 14 (Tru-Core®-II Automatic Biopsy Instrument, Angiotech, Lausana, Suiza), como se describió anteriormente<sup>69</sup>. Para las mediciones de respiración mitocondrial, las biopsias fueron criopreservadas en criotubos con 1 ml de una solución modificada de la Universidad de Winsconsin (UW)<sup>70</sup> que contenía histidina 20 mM, succinato 20 mM, glutatión 3 mM, leupeptina 1  $\mu$ M, glutamato 2 mM, malato 2 mM, ATP 2 mM, EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 3 mM, MOPS 60 mM, taurina 20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, HEPES 20 mM, sacarosa 110 mM, albúmina sérica bovina (BSA) 1g/l y dimetilsulfóxido (DMSO) 10%<sup>71</sup>. Para los *western blot* y los ensayos de actividad enzimática se colocaron biopsias en criotubos sin medio, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. La sangre se recogió en las mismas fechas mediante punción venosa de la vena coccígea utilizando tubos Vacutest®. Las muestras se centrifugaron a 2000 g durante 15 min a 4°C hasta 1 hora después de ser recolectadas y el suero se almacenó a -20°C hasta que se realizaron análisis de metabolitos.

## Método de criopreservación

El método de criopreservación de biopsias hepáticas se puso a punto en dos modelos experimentales:

1 – Modelo bovino: Se utilizaron seis vacas Holstein multíparas en la lactancia tardía con peso aproximado de 590 kg y 3.5 de índice de condición corporal. Las vacas fueron alimentadas en un régimen de pastoreo más suplemento. Se tomaron biopsias de hígado tal como se mencionó anteriormente. Las muestras frescas fueron transportadas en medio de respiración MIR05 (EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 3 mM, MOPS 60 mM, taurina 20 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, HEPES 20 mM, 1 g/l de BSA, pH 7,1 ) frío (4°C)<sup>72</sup> y analizadas 25 a 30 minutos después de la biopsia.

2 - Modelo murino: Se utilizaron cinco ratas hembra Wistar que pesaban aproximadamente entre 400 y 500 g. Las ratas tuvieron acceso *ad libitum* a comida y agua. Para la biopsia, las ratas se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico al 2% y se realizó una laparotomía transversal. Las ratas se sacrificaron por escisión de la válvula cardíaca inmediatamente después del procedimiento de biopsia.

Las muestras frescas fueron procesadas inmediatamente después de llegar al laboratorio y se permeabilizaron con una solución de saponina 50 µg/ml durante 20 minutos en hielo<sup>73</sup>.

Para la criopreservación, las biopsias hepáticas se sumergieron en 1 ml de una solución modificada (UW)<sup>70</sup> y 10% DMSO<sup>71</sup>. Las muestras fueron congeladas de dos maneras diferentes: a) Congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido (criopreservación con congelamiento rápido o CR); o b) congeladas gradualmente en vapor de nitrógeno durante 10 minutos (criopreservación con congelamiento lento o CL). Finalmente, todas las muestras se almacenaron a -80°C. También se variaron las concentraciones de criopreservante DMSO (5, 10, 20 y 40%) para estudiar el efecto del mismo. Para el traslado, las muestras se mantuvieron en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron durante un período de 1 a 3 meses.

Para estudiar las variables de la puesta a punto de la criopreservación se utilizaron biopsias tomadas de la misma vaca, la repetición del ensayo es la réplica biológica.

El día del ensayo se descongelaron las muestras bajo agua corriente. Una vez que el medio de criopreservación se descongeló completamente, las muestras se lavaron en medio de respiración MIR05 frío (4°C) y se procesaron inmediatamente. Estas muestras no fueron permeabilizadas con saponina ya que se comprobó que se encontraban permeabilizadas. Existen reportes de permeabilización mecánica asociada al congelamiento<sup>74-76</sup>.

#### Estudio de la respiración mitocondrial en biopsias de hígado

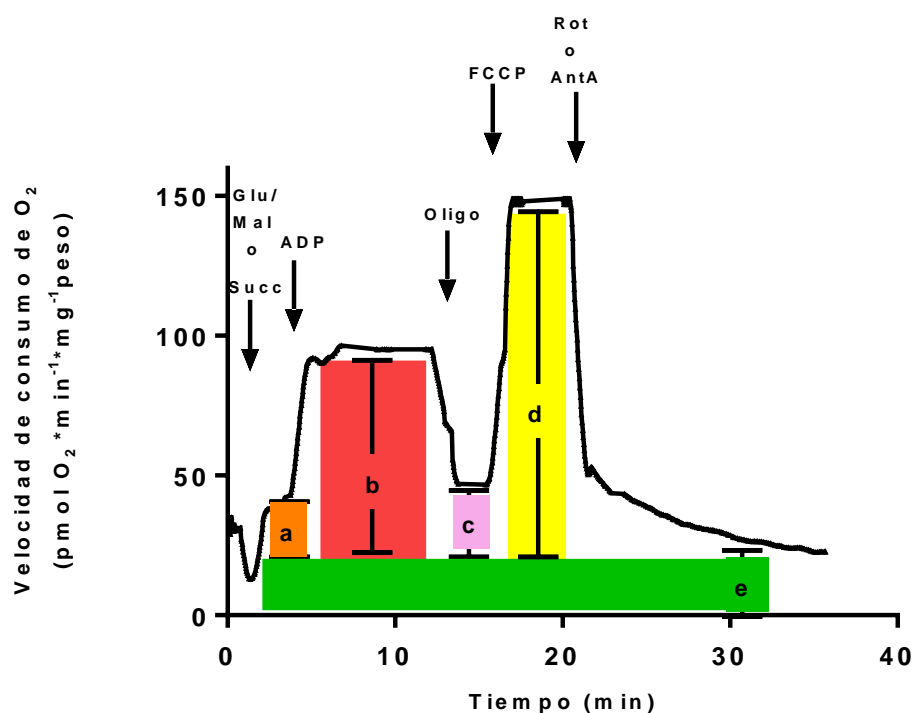
La función mitocondrial de las muestras frescas y criopreservadas se analizó estudiando el consumo de oxígeno mitocondrial por respirometría de alta resolución en un OROBOROS Oxygraph 2k a 37°C con cámaras de 2,2 ml. Las cámaras se calibraron previamente con medio de respiración mitocondrial MIR05 saturado con oxígeno (concentración calculada de oxígeno 190 nmol/ml de O<sub>2</sub> a una presión barométrica de 100 kPa). La velocidad de consumo de oxígeno se determinó usando el software de análisis DatLab 4<sup>29</sup>. El ensayo se realizó en MIR05 suplementado con citocromo c (9 µM)<sup>71,77</sup> para asegurarnos un correcto transporte de electrones ya que al tratarse de una proteína soluble si la membrana externa de la mitocondria estuviera dañada esta proteína podría haberse fugado. Se inició con la adición de sustratos específicos para complejo I (CI) (glutamato 10 mM y malato 5 mM) o complejo II (CII) (succinato 20 mM), seguido por adenosina difosfato (ADP, 1-4 mM). Luego se añadió oligomicina (2 µM) para inhibir la actividad ATP sintasa y posteriormente se añadió cianuro de carbonilo-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, 1-4 µM) para desacoplar la fosforilación oxidativa. La concentración de FCCP y de ADP a utilizar en los ensayos fue titulada paso a paso a fin de obtener el máximo consumo de oxígeno posible en cada caso. Finalmente, se añadió rotenona 1 mM y antimicina A 1 mM para inhibir los Complejos I y III respectivamente.

El tejido fue pesado húmedo antes de introducirlo en la cámara de O<sub>2</sub>k. La cantidad de muestra de tejido hepático que fue utilizado para los ensayos de consumo de oxígeno fue entre 2 y 10 mg. Al finalizar el ensayo se calculó la velocidad de consumo de oxígeno por mg de peso húmedo (pmol O<sub>2</sub>.s<sup>-1</sup>.mg de peso húmedo<sup>-1</sup>).

### Parámetros respiratorios

La figura 2.2 muestra un gráfico representativo de respirometría de alta resolución. Representa la derivada de  $O_2$  en el tiempo ( $dO_2/dt$ ), esto es la velocidad de consumo de oxígeno en función del tiempo. La mitocondria es responsable de la mayor cantidad de oxígeno consumido, sin embargo, también puede haber consumo de oxígeno no mitocondrial.

Para estudiar el consumo de oxígeno mitocondrial se utilizan inhibidores específicos como la antimicina A que inhibe el transporte de electrones por el complejo III de la cadena respiratoria o la rotenona que inhibe el transporte de electrones del complejo I, la pendiente resultante ((e), Figura 2.2) se resta al resto de los valores a fin de obtener la respiración únicamente mitocondrial <sup>20</sup>.



**Figura 2.2** – Análisis de un registro de respirometría de alta resolución: (a) representa la respiración en estado 4; (b) representa la pendiente de respiración en estado 3; (c) representa la respiración independiente de la síntesis de ATP; (d) representa la máxima capacidad respiratoria y (e) representa la respiración no mitocondrial.

A partir de registros de consumo de oxígeno como el que se muestra en la figura 2.2 se calcularon los siguientes parámetros respiratorios:

La respiración en estado 4 (a) se refiere a la respiración en presencia de sustratos específicos de Complejo I o II, según el protocolo utilizado, sin el agregado de ATP. Experimentalmente este estado simula un estado en el cual la entrada de protones por el canal específico de la ATP sintasa se detiene y en consecuencia la velocidad de consumo de oxígeno es baja. El estado 4 está controlado por la fuga de protones y, por la oxidación de sustrato en menor medida<sup>20</sup>. Se calcula mediante la ecuación:

$$\text{Respiración en estado 4} = \frac{a}{\text{peso (mg)}}$$

La respiración en estado 3 (b) se refiere al consumo de oxígeno en presencia de sustratos (de Complejo I o II, según el protocolo utilizado) y ADP. En biopsias permeabilizadas este estado simula la respiración basal ya que incluye el agregado de sustratos específicos y ADP. La respiración en estado 3 es más alta que en el estado 4, ya que en estas condiciones los sustratos oxidables aportan electrones, su transporte por la cadena se acompaña de un bombeo de protones hacia el espacio intermembrana, pero con el agregado de ADP se utiliza el gradiente generado para la síntesis de ATP<sup>23,78</sup>. Se calcula mediante la ecuación:

$$\text{Respiración en estado 3 o basal} = \frac{b}{\text{peso (mg)}}$$

La relación entre la respiración en estado 3 y la respiración en estado 4 da una idea de qué tan acoplado está el sistema. Esta relación se conoce como índice de control respiratorio<sup>22</sup>.

Luego, con el agregado de oligomicina, se inhibe la ATP sintasa por tanto, si sigue habiendo respiración ésta se debe a la fuga de protones, por tanto, la respiración resistente a oligomicina (c) se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Respiración resistente a oligomicina} = \frac{c}{\text{peso (mg)}}$$

Asimismo, la respiración sensible a oligomicina representa el consumo de oxígeno vinculado a la síntesis de ATP y se calcula:

$$\text{Respiración sensible a oligomicina o destinada a la síntesis de ATP} = \frac{b - c}{\text{peso (mg)}}$$

Por otro lado, la máxima capacidad respiratoria se induce experimentalmente mediante la titulación con desacoplantes químicos. Los protonóforos o translocadores de protones, como el carbonil cianuro *p*-trifluorometoxifenilhidrazina (FCCP) y el 2,4-dinitrofenol (DNP), actúan como desacoplantes disipando el gradiente de protones. Para este protocolo se utilizó FCCP. El control respiratorio mitocondrial dado por el sistema de fosforilación oxidativa se pierde frente al agregado de estos desacoplantes, ya que se remueve gradiente electroquímico. En estas condiciones se obtiene el valor máximo de consumo de oxígeno del sistema también conocido como la máxima capacidad respiratoria, una medida vinculada al número y actividad de los complejos de transporte de electrones<sup>29,79</sup>.

$$\text{Máxima capacidad respiratoria} = \frac{d}{\text{peso (mg)}}$$

Finalmente, por medio del agregado de rotenona o antimicina se inhiben los complejos I o III, respectivamente, de la cadena respiratoria. En estas condiciones se inhibe el transporte de electrones por la cadena respiratoria, por esto la respiración residual (e) representa la respiración no mitocondrial. Ésta podría estar dada por enzimas que tienen al oxígeno como sustrato como la NAD(P)H oxidasa o la óxido nítrico sintasa o por otros eventos redox, como la lipoperoxidación, asociados al estrés oxidativo<sup>79</sup>. Se calcula mediante la ecuación:

$$\text{Respiración no mitocondrial} = \frac{e}{\text{peso (mg)}}$$

## Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular (ver fig. 2.3) se realizó a partir de 5 mg de tejido hepático. Éste se homogeneizó en buffer STM compuesto de sacarosa 250 mM, Tris-HCl 50 mM y  $MgCl_2$  5 mM, pH 7,4, con inhibidores de proteasas (SigmaFast™ Protease Inhibitor Cocktaily fluoruro de fenilmetilsilfonilo (PMSF) 1 mM), e inhibidores de desacetilasas (triclostatina A 1  $\mu$ M y nicotinamida 5 mM) frío, usando un homogeneizador Potter-Elvehjem ajustado a 2000 rpm (figura 2.3). El homogeneizado se mantuvo 30 minutos en hielo y posteriormente se agitó en vórtex a velocidad máxima durante 15 segundos. Luego se centrifugó a 800 g durante 15 minutos, el sobrenadante se marcó  $S_0$  y el precipitado  $P_0$ . Por un lado, el  $P_0$  que contenía núcleo y debris fue resuspendido en 300  $\mu$ l de buffer STM, agitando a máxima velocidad por 15 segundos y centrifugado a 500 g durante 15 minutos. El precipitado resultante de esta centrifugación  $P_{1B}$  contiene la fracción nuclear. El sobrenadante se descartó y  $P_{1B}$  fue lavado tres veces en 300  $\mu$ l de buffer STM, agitando a máxima velocidad durante 15 segundos y centrifugando a 1000 g durante 15 minutos. Luego, el pellet resultante se resuspendió mediante el uso de pipeta hasta homogeneizar el precipitado en 200  $\mu$ l de buffer NET (HEPES 20 mM a pH 7.9,  $MgCl_2$  1,5 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 0,2 mM, glicerol 20% y Tritón-X-100 al 1% con inhibidores de proteasas y desacetilasas). Este precipitado se agitó a máxima velocidad durante 15 segundos e incubó en hielo por 30 minutos. Después de la incubación, el homogeneizado se sonicó (Vibra Cell vc600, Sonics & Materials) en hielo a máxima potencia durante 30 segundos y se centrifugó a 9000 g durante 30 minutos, el sobrenadante resultante se rotuló fracción nuclear.

Por otro lado, el  $S_0$  se centrifugó a 800 g durante 10 minutos a 4°C, se descartó el precipitado y se marcó el sobrenadante como  $S_{1A}$ . Este sobrenadante se centrifugó a 11000 g durante 10 minutos, el sobrenadante se rotuló como fracción citosólica y el precipitado se lavó por completo tres veces resuspendiéndolo en buffer STM, centrifugando a 11000 g durante 10 minutos y descartando el sobrenadante. Finalmente, el pellet resultante (que se encuentra enriquecido en mitocondrias) se resuspendió en 50  $\mu$ l de buffer SOL (Tris HCl 50 mM a pH 6,8, EDTA 1 mM, Triton-X-100

al 0,5%, inhibidores de proteasas y desacetilasas) y se congeló-descongeló usando nitrógeno líquido tres veces.

Las fracciones enriquecidas en mitocondrias, citosol o núcleo se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta los análisis. Todos los procedimientos se realizaron a  $4^{\circ}\text{C}$ , incluyendo la homogeneización de tejidos que se realizaron en la cámara fría <sup>80</sup>.

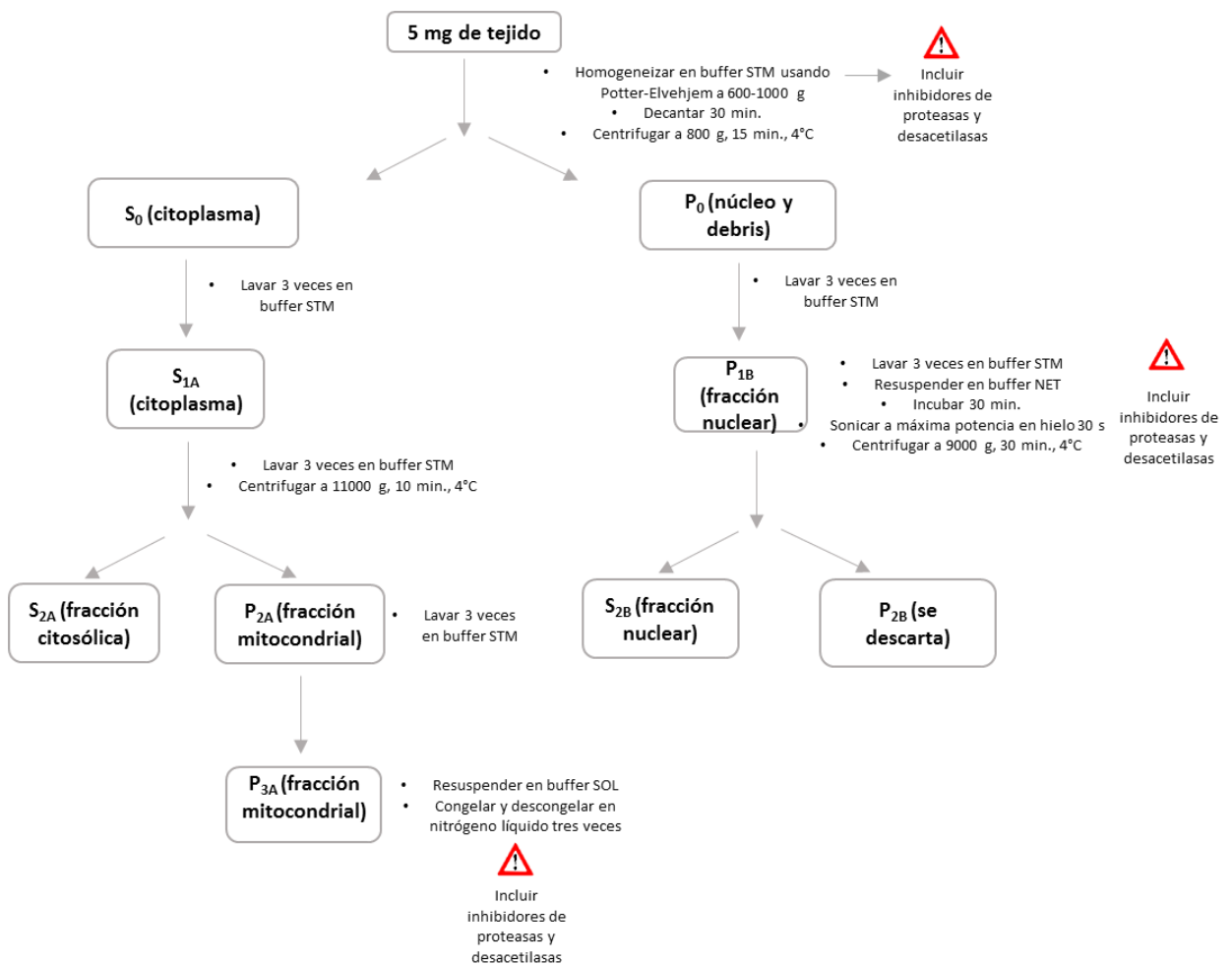


Figura 2.3 – Esquema representativo del protocolo de fraccionamiento. Adaptado de Dimauro et al., 2012, *BMC Research Notes*, p. 3<sup>80</sup>.

### Cuantificación de proteínas

El contenido de proteínas se determinó usando el método de Bradford en placa con un estándar de albúmina sérica bovina <sup>81</sup>.



## Estudios de Western blot

Se resolvieron los homogeneizados de hígado (30 a 40 µg) o las fracciones enriquecidas en mitocondrias (20 µg) en geles de poliacrilamida Tris-Glicina-SDS (SDS/PAGE) al 10 o 12%. Se utilizaron los pesos moleculares Chameleon™ Duo (LI-COR #928-60000) y Page™Ruler (Thermo Fisher #26616). Las proteínas se transfirieron durante la noche a membranas de nitrocelulosa en una cámara húmeda a 4°C a 20V. La transferencia de proteínas se confirmó con tinción de Ponceau y después se lavó tres veces con buffer de lavado (Tris, Tween 0,1%) para eliminar el colorante. Posteriormente, las membranas se bloquearon con buffer de bloqueo (Tris, Tween 0,1% y leche descremada al 0,5%) durante 1 hora. Después del bloqueo, se lavaron las membranas tres veces y se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios contra: GAPDH (1:1000, Abcam, #ab9484), β-actina (1:1000, Santa Cruz, #ACTBD11B7), α-tubulina (1:1000, Santa Cruz, #TU-02), succinato deshidrogenasa subunidad A (SDHA, 1:2000, Abcam, #ab14715), subunidad α de la ATP sintasa (1:1000, Abcam, #ab14748), lisina acetilada (1:1000, Cell Signaling, #9441), contra aductos entre proteínas y 4-hidroxinonenal (1:1000, Abcam, #ab46544), tirosina nitrada (1:1000, producido en el Centro de Investigaciones Biomédicas – Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República) e histona H3 (cedido gentilmente por el Dr. Escande, Institut Pasteur Montevideo).

Después de la incubación, las membranas se lavaron tres veces con buffer de lavado y se incubaron durante 1 hora con una dilución 1:10000 del anticuerpo contra ratón (IR680: #92668070 LI-COR) o 1:20000 del anticuerpo secundario contra conejo o cabra (IR800: #92632211 y #92632210 respectivamente, LI-COR).

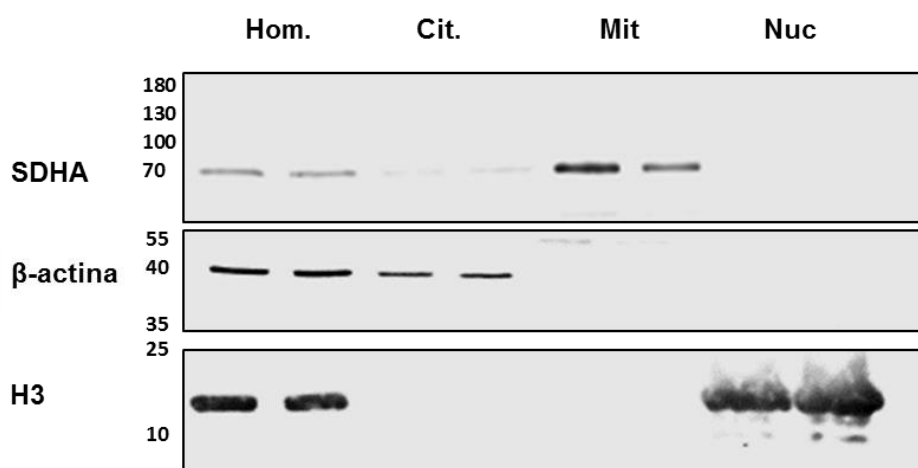
Finalmente, las imágenes fueron obtenidas con el LI-COR Odyssey Documentation System/Infrared Imager Modelo 9120 y las bandas de Western blot se cuantificaron por densitometría usando ImageStudio de LI-COR.

## Control de la pureza del fraccionamiento subcelular

Para determinar la pureza y el enriquecimiento de las fracciones, obtenidas en el fraccionamiento subcelular, se utilizaron anticuerpos contra una proteína mitocondrial

(SDHA), una citoplasmática ( $\beta$ -actina) y una nuclear (H3). La figura 2.4 muestra que la fracción mitocondrial no tiene contaminación de otras fracciones y que además está enriquecida con respecto al homogeneizado, lo mismo se puede observar con respecto a la fracción nuclear. Por otro lado, también se puede concluir que la fracción citosólica no está contaminada aunque no se ve enriquecida con respecto al homogeneizado.

De cualquier forma debemos mencionar que no se evaluó la contaminación por otros compartimentos subcelulares, como peroxisomas, lisosomas o retículo endoplásmico.



**Figura 2.4 – Fraccionamiento subcelular.** Western blot representativo realizado para corroborar la pureza de las fracciones subcelulares. Se sembró (en orden) homogeneizado de células enteras (Hom) y fracciones enriquecidas en citosol (Cit), mitocondria (Mit) y núcleo (Nuc). Se utilizaron anticuerpos contra: subunidad A de succinato deshidrogenasa parte del Complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial (SDHA) como marcador de la fracción mitocondrial,  $\beta$ -actina una proteína estructural del citoesqueleto, utilizada como marcador de la fracción citosólica y histona H3, utilizado como marcador de la fracción nuclear.

### Ensayos de actividad enzimática

Los ensayos de actividad enzimática se adaptaron de Spinazzi et al. 2012 y Janssen et al. 2007<sup>82,83</sup>.

El método utilizado para medir actividad NADH deshidrogenasa se basó en la medición de la reducción de 2,6-dicloroindofenol (DCPIP) por electrones donados por la decilubiquinona. La decilubiquinona es reducida por el complejo I después de la oxidación del NADH. En una cubeta de 1 mL se agregó buffer fosfato 0,5 M pH 7,5, albúmina 50 mg/ml, DCPIP 0,55 M, antimicina 5 mM, entre 40-50  $\mu$ g/ml de fracción

enriquecida en mitocondrias y agua nanopura y se incubó 10 min a 37°C. Posteriormente para iniciar la reacción se agregó decilubiquinona 12,5 mM y NADH 10 mM y se midió absorbancia a  $\lambda = 600$  nm por 4 minutos. Luego, se agregó rotenona (0,5 mM) y se volvió a medir absorbancia por 4 minutos. Para calcular la actividad se restó la pendiente obtenida en presencia de rotenona (debida a la reducción inespecífica de DCPIP) y se utilizó el coeficiente de extinción molar para el DCPIP ( $\epsilon_{600} = 19,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

La actividad succinato deshidrogenasa se determinó midiendo la reducción de DCPIP por electrones donados por la decilubiquinona luego de ser reducida por el complejo II succinato deshidrogenasa, en presencia de succinato. En una cubeta de 1 mL se agregó buffer fosfato 0,5 M pH 7,5, albúmina 50 mg/mL, cianuro 10 mM, rotenona 1 mM, DCPIP 0,55 M, entre 40-50  $\mu\text{g/ml}$  de fracción enriquecida en mitocondrias y agua nanopura y se incubó 10 min a 37°C. Posteriormente se agregó decilubiquinona (12,5 M) y se midió la línea de base a  $\lambda = 600$  nm por 4 minutos. Luego, para iniciar la reacción se agregó succinato (400 nM) y se volvió a medir a  $\lambda = 600$  nm por 4 minutos. Finalmente, para corroborar la especificidad del ensayo se agregó malonato (1 M), un inhibidor de la succinato deshidrogenasa y se volvió a medir a  $\lambda = 600$  nm por 4 minutos. Para calcular la actividad se restó la pendiente de la línea de base (debida a la reducción inespecífica de DCPIP) y se utilizó el coeficiente de extinción molar para el DCPIP ( $\epsilon_{600} = 19,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

La actividad citrato sintasa se midió en fracciones enriquecidas de proteínas solubles mitocondriales debido a que las biopsias se habían congelado para el transporte y por lo tanto eran vulnerables al daño de membrana. Para lograr esa fracción, el tejido hepático de las biopsias se disgregó utilizando un homogeneizador Potter-Elvehjem en 10 volúmenes de un buffer MRM ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 mM, EGTA 1 mM, MOPS 5 mM, sacarosa 0,3 M a pH 7.1). Además, se añadieron los inhibidores de proteasas y desacetilasas mencionados anteriormente.

Después de la homogeneización, las muestras se colocaron en un rotador durante 1 hora y se centrifugaron a 12000 durante 10 minutos, se mantuvo el sobrenadante y se descartó el precipitado. Todos los procedimientos se realizaron a 4°C.

El método utilizado para medir actividad específica se basa en la reacción catalizada por citrato sintasa que forma citrato y coenzima A a partir de acetil-CoA y oxaloacetato. Este protocolo utiliza acetil-CoA (12,5 mM) y oxalacetato (250  $\mu$ M) y el reactivo de Ellman o ácido 5,5'-Ditio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB, 100  $\mu$ M). El DTNB reacciona con el tiol de la Coenzima A, se escinde el enlace disulfuro y se forma 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB-), que posteriormente se ioniza a TNB<sup>2-</sup> dianión un compuesto de color amarillo con un coeficiente de extinción molar a  $\lambda = 412$  nm de  $13700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Se utilizó una concentración de 60  $\mu$ g/ml de proteína total para este ensayo.

Todos los ensayos se realizaron a 37°C en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-2401 PC<sup>41,72,84</sup>.

#### Extracción de lípidos

Los lípidos se obtuvieron a partir de los homogeneizados de hígado se añadió a la muestra 500  $\mu$ l de agua nanopura y el estándar interno (IS) 1-Dodecanol 10% o CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>OH (Sigma) antes de la extracción. A continuación, la fracción lipídica se extrajo con una mezcla de hexano, isopropanol y ácido acético 1M (30:20:2, v/v/v), en una relación muestra:disolvente de 1:2,5. La mezcla se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se añadieron 2,5 volúmenes de hexano, posteriormente la mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó a 1800 g durante 5 minutos a 4°C. La fase superior (hexano) se separó de la fase acuosa y la fase acuosa se lavó con 2,5 volúmenes de hexano, nuevamente se agitó vigorosamente y se centrifugó a 1800 g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, ambas fases de hexano se mezclaron y el disolvente se evaporó por evaporación rotatoria a 40°C bajo vacío.

#### Análisis semi-cuantitativos de los extractos lipídicos

La separación de los componentes de la fase lipídica se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de TLC. Los extractos de lípidos se resuspendieron en cloroformo y se sembraron manualmente usando una micro-jeringa (Hamilton) en duplicado en dos cantidades diferentes. También se sembraron el estándar interno y un estándar de triglicéridos en la placa de TLC. El estándar de triglicéridos utilizado fue un aceite de oliva Arlequina de cosecha 2014 de INIA Treinta y Tres (Ruta 8, Km 282) caracterizado y donado por el Dr. Andrés Trostchansky, (Departamento de Bioquímica,

Facultad de Medicina, UdelaR) que contenía 98% de triglicéridos. Las placas se desarrollaron con una fase móvil de hexano/dietiléter/ácido acético (80:20:1, v/v/v). Las bandas de lípidos se visualizaron con ácido fosfórico al 5% (v/v) en etanol. El área de las bandas se cuantificó usando el software ImageJ.

#### Determinación de $\beta$ -hidroxibutirato

Las concentraciones de  $\beta$ -hidroxibutirato se determinaron usando el kit Ranbut (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, UK) que detecta  $\beta$ -hidroxibutirato. La medida se basa en la reacción de oxidación del  $\beta$ -hidroxibutirato a acetoacetato catalizada por la enzima  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa. En esta reacción se reduce el cofactor  $\text{NAD}^+$  a NADH y este se mide por medio de una sonda colorimétrica que se une específicamente al NADH<sup>85</sup>. Se utilizaron los controles y soluciones de calibración provistos por el kit.

#### Análisis estadísticos

Los datos se analizaron en un diseño de bloques al azar utilizando el programa SAS System (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Se realizaron análisis univariado (procedimiento Univariate) con todas las variables para identificar valores atípicos e inconsistencias y verificar que la distribución del error es normal. Los datos se analizaron como medidas repetidas usando un análisis de varianza para modelos mixtos (procedimiento MIXED) incluyendo tratamiento, DPP y su interacción como efectos fijos, bloque y vaca como efectos aleatorios y fecha de parto, PV inicial y CC como covariables si corresponden. Se consideró que las medias difirieron en forma significativa cuando  $P < 0,05$  y las tendencias se identificaron con # cuando  $0,05 < P < 0,10$ . Los datos se presentan como medias  $\pm$  errores estándar agrupados. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  y \*\*\*\*  $P < 0,0001$ . Se consideró a la réplica biológica como la repetición, no se utilizaron réplicas técnicas al momento de analizar el resultado.

## Resultados

### DESARROLLO DE UN MÉTODO DE CRIOPRESERVACIÓN DE BIOPSIA HEPÁTICA

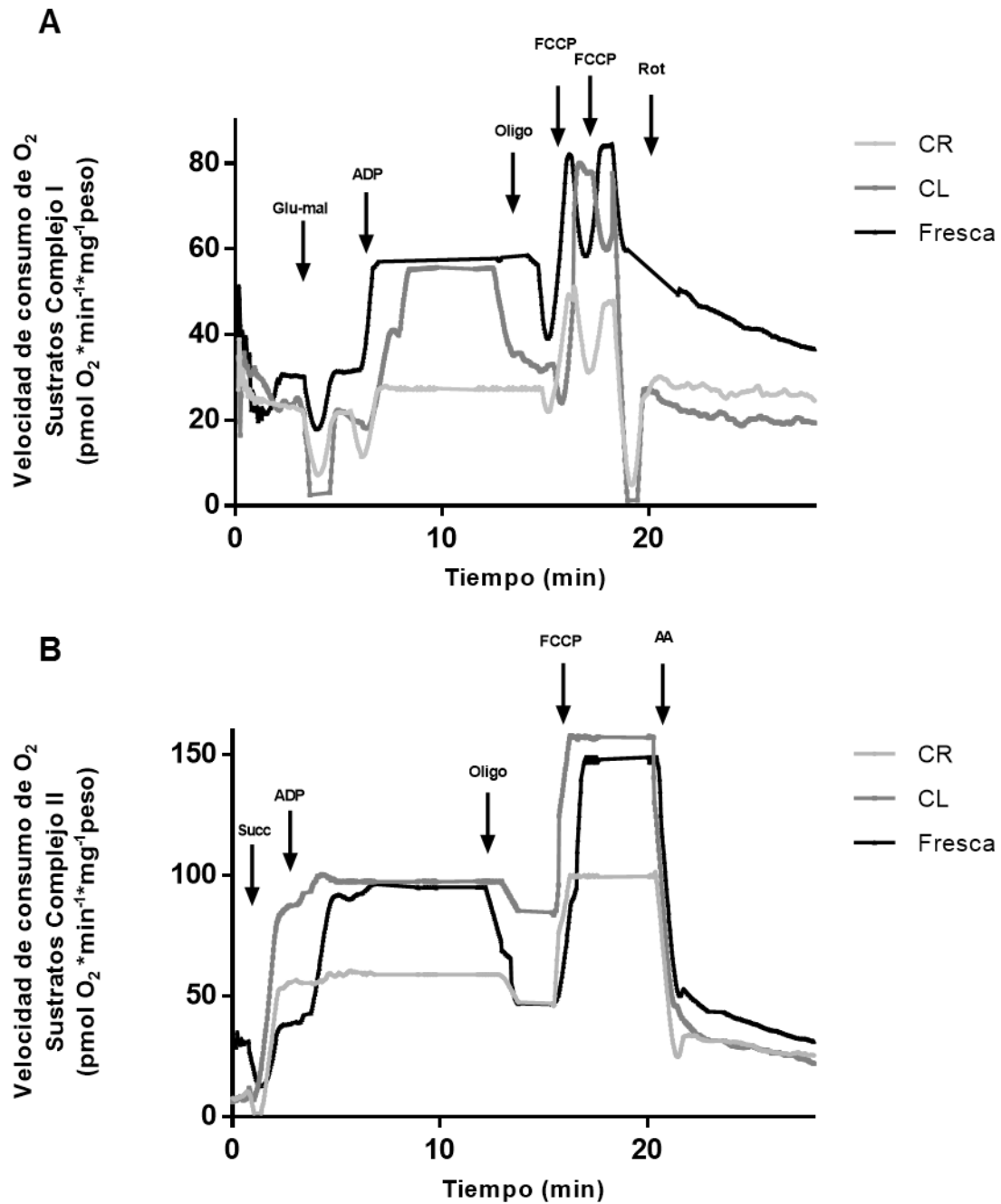
En este proyecto el experimento *in vivo* se desarrolló en la Estación Experimental localizada en Paysandú y las muestras fueron analizadas en el laboratorio en Montevideo. Por esta razón, para llevar adelante este proyecto fue necesario desarrollar un método de criopreservación de la biopsia hepática tal que, al descongelarla, mantuviera los parámetros de función mitocondrial lo más cercanos a los del tejido fresco. Además, la criopreservación permite almacenar las muestras para análisis posterior. Esto último es importante porque la capacidad de los equipos utilizados para medir el consumo de oxígeno mitocondrial es de dos muestras diarias. Como los cambios metabólicos durante el período de transición son muy dinámicos es de gran utilidad poder tomar las muestras en varias fechas y conservarlas.

Históricamente, la función mitocondrial se ha estudiado en mitocondrias aisladas, sin embargo, recientemente se desarrollaron nuevas metodologías para evaluar la función mitocondrial en biopsias de tejido de hasta 2 mg por ensayo <sup>29,30,78,86</sup>. Los estudios en mitocondrias aisladas nos proporcionan información importante con respecto a la función de la cadena respiratoria<sup>87</sup> y los distintos complejos que la componen <sup>82,83,88</sup>. No obstante, no arroja información sobre la función de la mitocondria en el contexto celular o del parénquima en estudio. Además las mitocondrias aisladas, pierden los contactos con otros componentes celulares, se altera la forma y la integridad del organelo puede verse comprometida<sup>89</sup>. Por lo tanto, el análisis de la función mitocondrial en biopsias de tejido se vuelve muy relevante para el estudio de los cambios metabólicos en un contexto fisiológico particular <sup>86, 90</sup>.

Llevamos a cabo la criopreservación de las biopsias de hígado de vaca tal como se describe en Materiales y Métodos, utilizando dos técnicas de congelamiento diferentes: Congelamiento rápido (CR) y congelamiento lento (CL). Las muestras se almacenaron a -80 °C, se descongelaron y se estudió la función mitocondrial midiendo

el consumo de oxígeno luego del agregado de sustratos de la cadena de transporte electrónico (glutamato y malato para el complejo I y succinato para el complejo II), de ADP y de inhibidores y desacoplantes de la fosforilación oxidativa (figura 3.1). También se midió el consumo de oxígeno en biopsias frescas obtenidas inmediatamente antes del ensayo y se compararon los resultados obtenidos (figura 3.1).

La figura 3.1 muestra registros representativos de velocidad de consumo de oxígeno en el tiempo en presencia de sustratos para el complejo I (fig 3.1A) y para el complejo II (figura 3.1B). Como se observa en las figuras A y B la respiración de las biopsias congeladas de forma lenta es prácticamente igual a la respiración de las muestras frescas. Sin embargo las muestras con congelamiento rápido muestran un franco deterioro de la respiración mitocondrial. A su vez, es importante destacar que no se calculó el índice de control respiratorio porque como se observa en la figura 3.1B, no parece haber diferencias entre la pendiente en estado 4 y la pendiente en estado 3.



**Figura 3.1 – Registro de la velocidad de consumo de oxígeno en función del tiempo de biopsias hepáticas frescas y criopreservadas. (A)** Para la evaluación de la respiración dependiente del Complejo I se midió la velocidad de consumo de oxígeno después de la adición secuencial de de 10 mM glutamato y 5 mM malato (Glu/Mal), 4  $\mu$ M ADP, 2  $\mu$ M oligomicina (Oligo), dos adiciones sucesivas de 2  $\mu$ M FCCP y rotenona 0,5  $\mu$ M (Rot). **(B)** Para la evaluación de la respiración dependiente del Complejo II la velocidad de consumo de oxígeno se midió después de la adición secuencial de de succinato 20 mM (Succ), 4  $\mu$ M ADP, 2  $\mu$ M oligomicina (Oligo), 4  $\mu$ M FCCP y antimicina 2,5  $\mu$ M (AntA). Las muestras frescas están representadas en negro, las sometidas a congelamiento lento (CL) en gris y rápido (CR) en gris claro.



A partir de los registros de respiración mitocondrial se calcularon los parámetros respiratorios. En la tabla 1.1 se pueden observar los parámetros obtenidos utilizando sustratos para el Complejo I y en la tabla 1.2 los correspondientes utilizando un sustrato del Complejo II, para las distintas condiciones de almacenamientos en las dos especies estudiadas. Con estos resultados se puede concluir que la criopreservación lenta de la biopsia fue muy efectiva ya que los parámetros respiratorios fueron muy similares a los de la biopsia fresca. En particular los parámetros respiratorios: estado 3 (o respiración basal en muestras de tejido permeabilizado), estado 4, la respiración sensible a oligomicina (respiración vinculada a la síntesis de ATP), la máxima capacidad respiratoria y la respiración no mitocondrial no presentaron diferencias significativas entre las muestras criopreservadas con congelamiento lento y frescas. En cambio, la criopreservación no fue efectiva cuando el congelamiento fue rápido y se observaron diferencias significativas en casi todos los parámetros respiratorios (Tablas 1.1. y 1.2).

**Tabla 1.1 – Parámetros respiratorios para la evaluación del Complejo I**

Especie	Condiciones de almacenamiento	Respiración					
		Estado 4	Estado 3	Resistente a oligomicina	Sensible a oligomicina	Máxima	No mitocondrial
Vaca	Fresca	1,3 ± 0,6	6,3 ± 0,7	4 ± 1	5,3 ± 0,6	7,4 ± 0,7	2,4 ± 0,8
	Criopreservación (CL)	1,1 ± 0,1	6,7 ± 0,4	3 ± 1	3,6 ± 0,5	6,7 ± 0,9	2,8 ± 0,9
	Criopreservación (CR)	2 ± 1*	1,8 ± 0,7*	12 ± 3**	1,5 ± 0,5*	4,0 ± 0,5*	5 ± 2*
Rata	Fresca	2,0 ± 0,8	3,5 ± 0,6	-	-	-	2,0 ± 0,6
	Criopreservación (CL)	2 ± 1*	3,7 ± 0,3	-	-	-	2,3 ± 0,7

Los parámetros fueron obtenidos a partir de registros obtenidos como se describe en las figura 3.1. Todos los resultados se expresaron como medias ± errores estándar. \* P < 0,05 y \*\* P < 0,01 respecto a la condición fresca. N= 4-6.

**Tabla 1.2 – Parámetros respiratorios para la evaluación del Complejo II**

Especie	Condiciones de almacenamiento	Respiración					
		Estado 4	Estado 3	Resistente a oligomicina	Sensible a oligomicina	Máxima	No mitocondrial
Vaca	Fresca	9,2 ± 4	23 ± 3	9 ± 2	3,2 ± 0,7	36 ± 4	2,1 ± 0,8
	Criopreservación (CL)	10 ± 4	24,0 ± 1,6	17 ± 7*	3,7 ± 0,5	31 ± 4	2,5 ± 0,8
	Criopreservación (CR)	7 ± 1	9,0 ± 1,5*	14 ± 4*	2,0 ± 0,3	17 ± 1,5*	3,5 ± 0,7*
Rata	Fresca	10 ± 1	21 ± 3	-	-	-	2,5 ± 1,0
	Criopreservación (CL)	7 ± 2*	16 ± 2	-	-	-	3,2 ± 0,8

Los parámetros fueron obtenidos a partir de registros obtenidos como se describe en las figura 3.1.

Todos los resultados se expresaron como medias ± errores estándar. \* P <0,05. N = 4-6.

### Efecto de la concentración de criopreservante

Asimismo, también se estudió el efecto de variar la concentración de DMSO en las muestras criopreservadas con congelamiento lento. Es importante hallar la concentración óptima de DMSO ya que a concentraciones muy altas puede ser citotóxico y a concentraciones muy bajas no tiene un efecto criopreservante<sup>91</sup>. Como se puede observar en la tabla, la mayoría de los parámetros respiratorios no muestran diferencias significativas entre las concentraciones observadas. Sin embargo, la concentración de 5% de DMSO muestra tener los valores más bajos en todos los casos. A su vez, la respiración en estado 3 dependiente de sustratos de complejo II sí muestra que hay una tendencia a que la criopreservación utilizando una concentración de DMSO al 5% comprometa la respiración. Por esta razón, se decidió utilizar una concentración de 10% de DMSO por ser la mínima concentración óptima.

**Tabla 2 – Efecto de la concentración de DMSO**

DMSO (%)	Respiración			
	Estado 3		Máxima	
	Complejo I	Complejo II	Complejo I	Complejo II
<b>5%</b>	3,3 ± 0,7	12 ± 3 <sup>#</sup>	4,8 ± 1,1	27 ± 4
<b>10%</b>	3,8 ± 0,7	18 ± 3	5,9 ± 1,1	35 ± 4
<b>20%</b>	3,7 ± 0,7	19 ± 3	6,2 ± 1,1	35 ± 4
<b>40%</b>	3,9 ± 0,7	18 ± 3	6,1 ± 1,1	34 ± 4

Los parámetros fueron obtenidos a partir de registros obtenidos como se describe en las figura 3.1. Todos los resultados se expresaron como medias ± error estándar agrupado. # cuando  $0,05 < P < 0,10$ , \*P < 0,05. N=6.

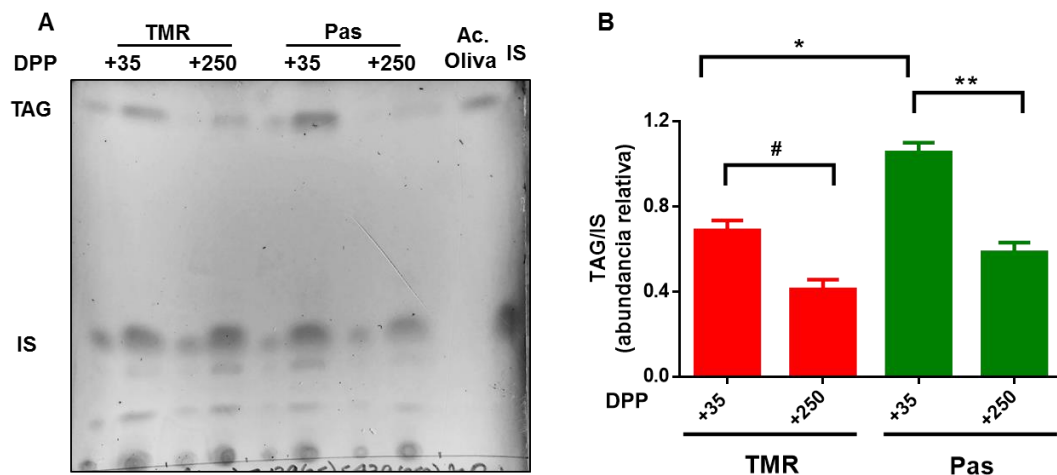
## IMPACTO DEL BALANCE ENERGÉTICO NEGATIVO EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL

### Evidencias del balance energético negativo

Para evaluar el efecto del balance energético negativo en la función mitocondrial se seleccionaron dos fechas contrastantes: 35 días posparto que se ubica dentro de la lactancia temprana y BEN y 250 días posparto que se ubica dentro de la lactancia tardía período de balance energético positivo (BEP). En estas dos fechas se estudiaron parámetros característicos del BEN como el contenido de triglicéridos en hígado y la concentración de cuerpos cetónicos en plasma, ambos vinculados a la movilización lipídica durante la lactancia temprana<sup>7</sup>.

### Cuantificación relativa de triglicéridos en tejido hepático

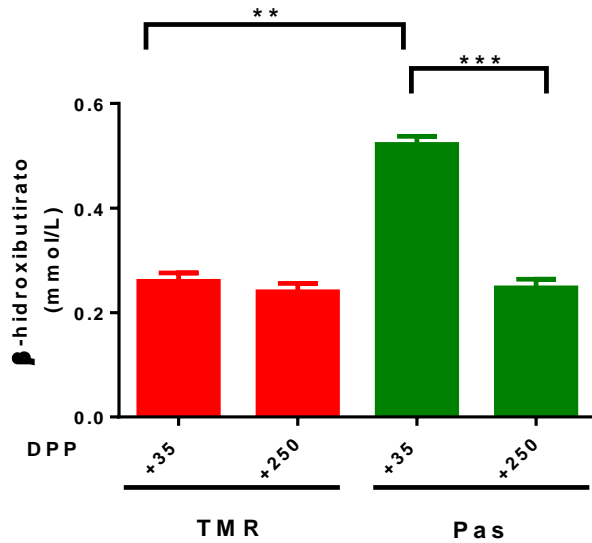
Se evaluó el contenido de triglicéridos (TAG) en tejido hepático mediante una extracción lipídica utilizando hexano y cromatografía en capa fina, además a la extracción lipídica se agregó el estándar interno (IS por sus siglas en inglés) para poder cuantificar las bandas (figura 3.2A). En la placa de TLC se sembraron dos concentraciones distintas de muestra para cada grupo en cada fecha. El gráfico de barras (figura 3.2B) compara ambos grupos TMR y Pas en los días 35 y 250 posparto (35 DPP y 250 DPP). Éste muestra que el grupo Pas en la fecha 35 DPP tuvo mayor contenido de triglicéridos en hígado (aproximadamente 80% más) que el mismo grupo en la fecha 250 DPP. A su vez, el grupo TMR en la fecha 35 posparto tuvo un 65% más de triglicéridos que en la fecha 250 posparto. Entre grupos se observa que durante la fecha 35 DPP hubo diferencias significativas y que el contenido de triglicéridos fue un 50% más bajo para las muestras del grupo TMR. Estos datos sugieren que hay mayor contenido de triglicéridos en hígado durante el BEN en comparación con el periodo de BEP y que a su vez, los animales sometidos a la estrategia de alimentación Pas tiene mayor contenido de triglicéridos en esta fecha que los TMR. También se observa que durante la fecha de BEP ambos grupos tiene un contenido de triglicéridos en hígado muy similar.



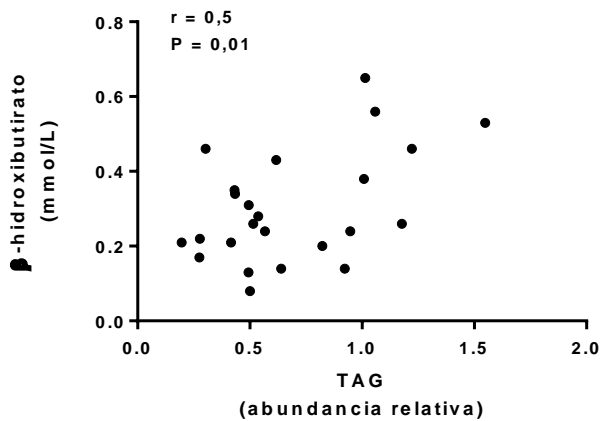
**Figura 3.2 - (A)** Placa de cromatografía en capa fina representativa donde se sembraron 5  $\mu$ L y 20  $\mu$ L de lípidos extraídos de tejido hepático en ambos grupos TMR y Pas y durante las fechas 35 DPP y 250 DPP posparto junto con el estándar interno y control positivo. **(B)** Cuantificación del contenido de triglicéridos en tejido hepático de ambos grupos en las fechas 35 DPP y 250 DPP. Los resultados son la medias  $\pm$  el error. Todos los resultados se expresaron como medias  $\pm$  error estándar agrupado. # cuando  $0,05 < P < 0,10$ , \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ . N=12.

### Determinación de niveles de $\beta$ -hidroxibutirato

Luego evaluamos la concentración del cuerpo cetónico más abundante en sangre, el  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) a los 35 y 250 días posparto. En la figura 3.3 se puede observar que el grupo Pas en la fecha 35 DPP presentó una concentración de BHB mayor a 0,3 mmol/L, valor por encima del cual los niveles se consideran patológicos. Este valor fue significativamente mayor al valor en la fecha 250 DPP. A su vez, en la fecha 35 DPP el grupo Pas tuvo niveles de BHB más altos que el TMR (aproximadamente 50%). Al igual que el contenido de triglicéridos se observa que en la fecha 250 DPP ambos grupos tienen niveles muy similares de BHB. La figura 3.4 muestra que hay una correlación positiva y significativa entre el contenido de triglicéridos en hígado y los niveles de BHB en sangre.



**Figura 3.3** - Niveles de  $\beta$ -hidroxibutirato en suero de ambos grupos en las fechas 35 y 250 DPP. El gráfico de barras presenta las medias  $\pm$  el error estándar. \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001. N=12.

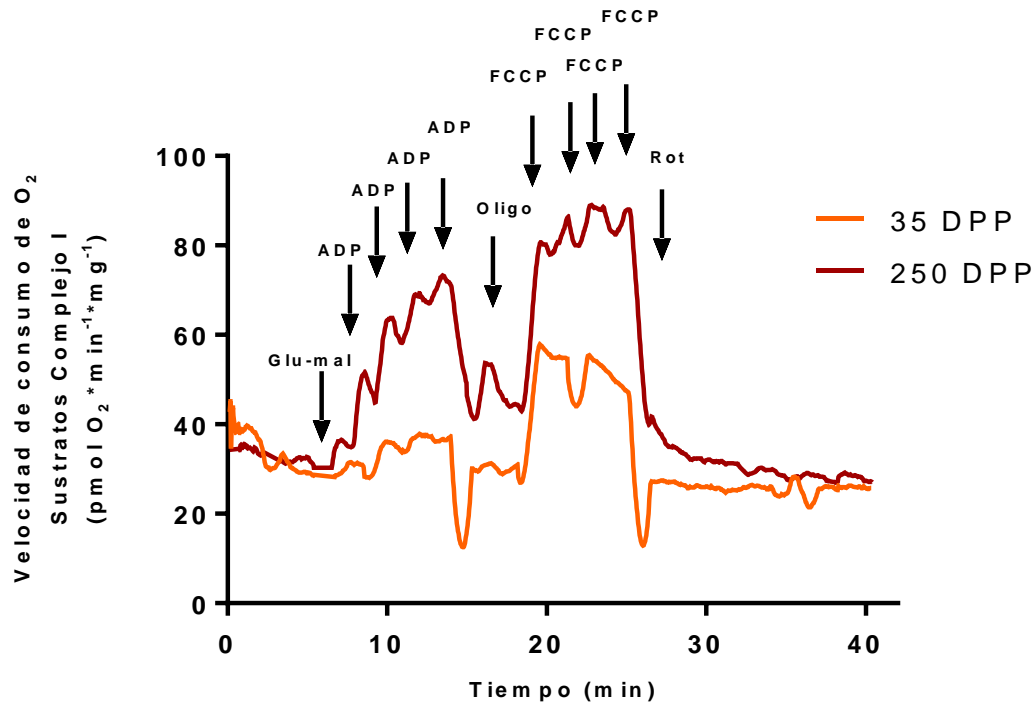


**Figura 3.4** – Correlación entre la concentración de  $\beta$ -hidroxibutirato en sangre y el contenido de triglicéridos, coeficiente de Pearson = 0,5 y valor P = 0,01. N = 6, se tomaron en cuenta los dos tratamientos y las dos fechas 35 y 250 DPP.

### Estudio de la función mitocondrial en el hígado de vaca durante la curva de lactancia

La evaluación de la función mitocondrial se realizó midiendo consumo de oxígeno por parte de la cadena respiratoria luego del agregado de sustratos e inhibidores específicos de los Complejos I y II y de un desacoplante (figura 3.5). En la figura 3.5 se muestra un registro primario de consumo de oxígeno con sustratos para el Complejo I

de la cadena respiratoria. Esta figura muestra que el consumo de oxígeno de una biopsia de hígado obtenida en la fecha 35 DPP (línea naranja) es menor que el consumo de oxígeno de una muestra en la fecha 250 DPP (línea bordeaux) y sugiere que la respiración mitocondrial en la fecha correspondiente a la lactancia temprana está comprometida. Este comportamiento se encontró tanto en los animales del grupo Pas como del grupo TMR.

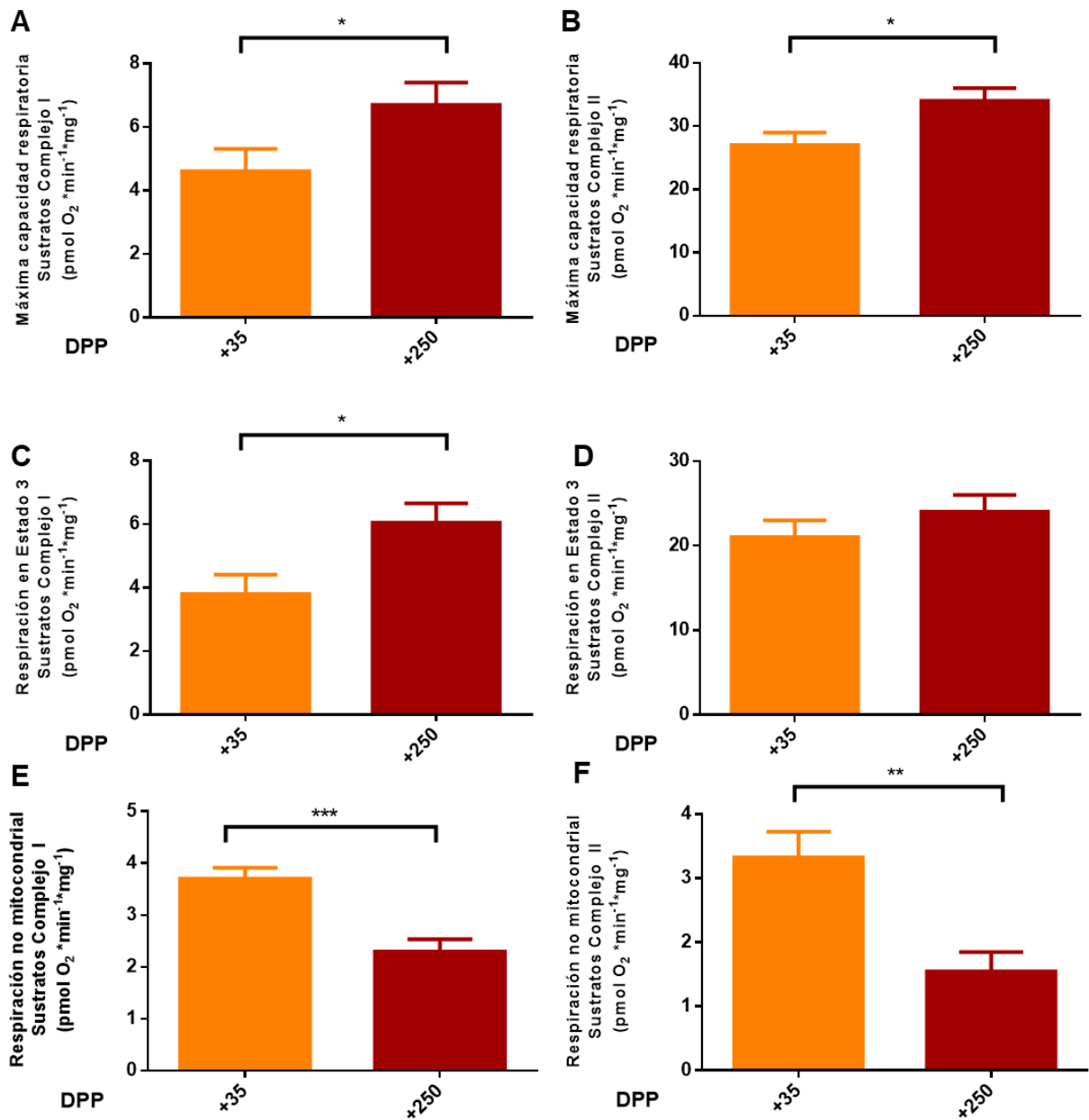


**Figura 3.5** – Registro de velocidad de consumo de oxígeno en el tiempo de una misma vaca en distintas fechas, la línea naranja representa los 35 DPP (lactancia temprana) y la línea bordeaux representa los 250 DPP (lactancia tardía). Para la evaluación del Complejo I las velocidades de respiración se midieron después de la adición de 10 mM glutamato y 5 mM malato (Glu/Mal), adiciones sucesivas de ADP 4  $\mu$ M, 2  $\mu$ M oligomicina (Oligo), adiciones sucesivas de 1  $\mu$ M FCCP y rotenona 0,5  $\mu$ M (Rot). La velocidad de respiración se midió a 37°C.

A partir del consumo de oxígeno se determinaron los parámetros respiratorios establecidos como confiables durante el desarrollo del método de criopreservación. Comenzamos evaluando lo que ocurría en todos los animales independientemente de la estrategia de alimentación (grupo Pas y TMR juntos) en la lactancia temprana y tardía. La figura 3.6 muestra que la máxima capacidad respiratoria es menor en la fecha 35 DPP que en 250 DPP (A y B), como también la respiración en estado 3 para

sustratos específicos del Complejo I (C), sin embargo no se ven cambios en la respiración en estado 3 con sustratos específicos del Complejo II (D). Asimismo, también se observa que existe una respiración no-mitocondrial mayor en la fecha 35 DPP con respecto a la 250 DPP, esto podría estar vinculada a eventos oxidativos<sup>30</sup>. No se encontraron diferencias entre fechas en la respiración sensible a oligomicina y la respiración en estado 4.



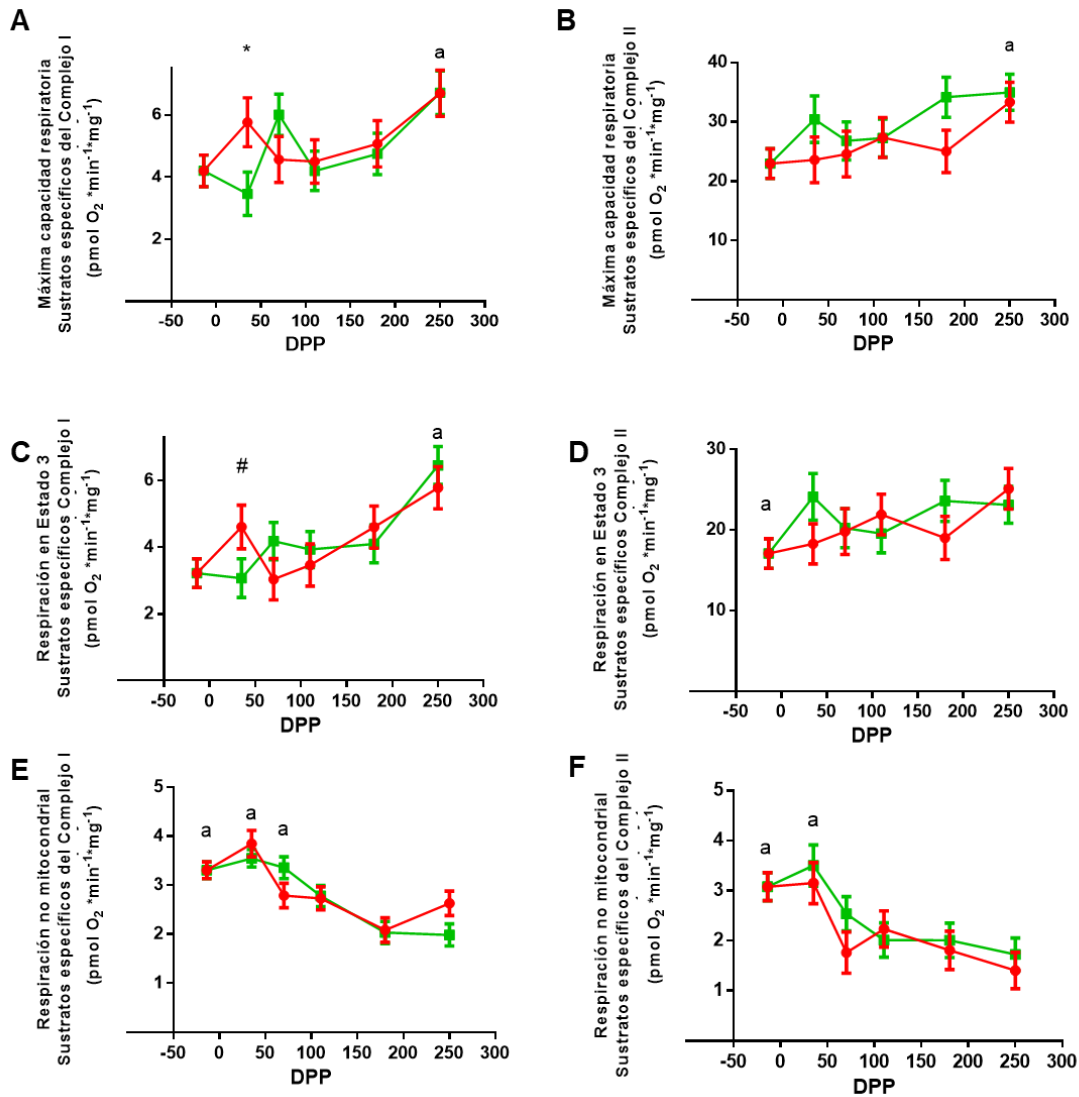


**Figura 3.6 – Parámetros respiratorios durante lactancia temprana y tardía.** Los parámetros fueron obtenidos a partir de registros obtenidos como se describe en las figura 3.1. Los resultados presentan las diferencias entre las fechas 35 y 250 DPP para todos los animales (de ambas estrategia alimenticias). Se utilizaron sustratos específicos para CI (A, C y E) y para CII (B, D y F). (A) máxima capacidad respiratoria con sustratos específicos del complejo I, (B) máxima capacidad respiratoria con sustratos específicos del complejo II, (C) estado 3 con sustratos específicos del complejo I, (D) – estado 3 con sustratos específicos del complejo II, (E) respiración no mitocondrial con sustratos específicos del complejo I y (F) respiración no mitocondrial con sustratos específicos del complejo II. Los resultados muestran las medias ± el error estándar. \* P <0,05, \*\* P <0,01 y \*\*\* P <0,001. N = 24.

Luego analizamos lo que ocurría en toda la curva de lactancia y evaluamos en forma separada a los animales sometidos a distintas estrategias de alimentación. En la figura 3.7 se grafican los parámetros respiratorios para ambos tratamientos a lo largo de la curva de lactancia a fin de poder apreciar las diferencias entre fechas y tratamientos. Para el Complejo I (fig. 3.7A) se observa que a los 35 días posparto, hay una diferencia significativa entre tratamientos, teniendo el grupo TMR mayor capacidad respiratoria que el grupo Pas. La misma puede apreciarse más claramente en la figura 3.8.

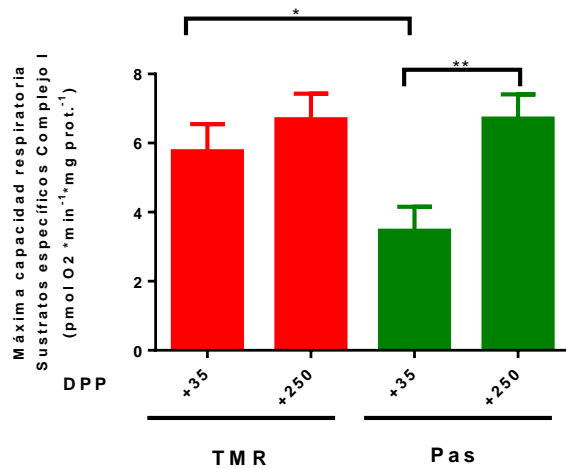
De la misma manera, las figuras 3.7C y D representan la respiración en Estado 3 de ambos tratamientos durante los seis momentos de toma de muestras a lo largo de la curva de lactancia. En la figura 3.7C se observa que la respiración en Estado 3, dependiente de sustratos específicos del Complejo I, aumenta significativamente (aproximadamente 50%) en los 250 días posparto con respecto a 35 días posparto. Asimismo, para el Complejo I (C) se observa que el tratamiento TMR tendió a tener una mayor respiración en Estado 3 comparado con el tratamiento Pas a los 35 días posparto. A su vez, cuando se estudió el Complejo II (D) también se observó un comportamiento similar al Complejo I, a medida que pasa el tiempo la función mitocondrial mejora. Sin embargo, no se observaron diferencias tan pronunciadas, además no hubo diferencia entre estrategias de alimentación.

En las figuras 3.7E y F se observa que la respiración no mitocondrial es mayor en la lactancia temprana que en la tardía, tampoco se observan diferencias entre tratamientos. No se encontraron diferencias entre fechas y tratamientos en la respiración en estado 4.



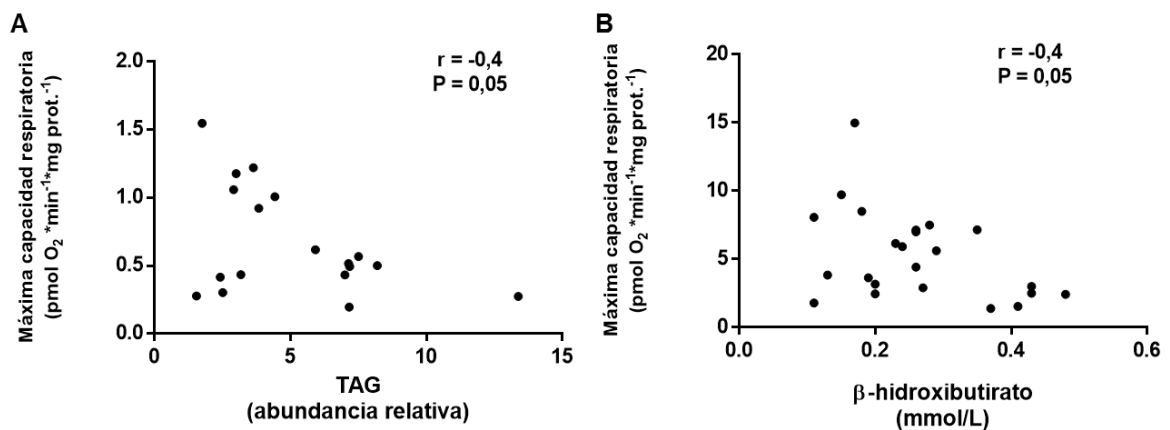
**Figura 3.7 – Parámetros respiratorios durante la curva de lactancia.** Se determinaron los parámetros respiratorios a partir de gráficos obtenidos como se describe en 3.1. La dieta TMR se representa con líneas rojas y círculos y la dieta Pas se representa con líneas verdes y cuadrados. **A, C y E:** Muestran los datos obtenidos utilizando sustratos para Complejo I. **B, D y F:** Muestran los datos obtenidos utilizando sustratos para Complejo II. Los resultados muestran las medias  $\pm$  el error estándar. #  $0,5 < P < 0,1$  \*  $P < 0,05$ .

La letra a representa la existencia de una diferencia significativa  $P < 0,05$  con todas las otras fechas analizadas. Las muestras con la misma letra no presentan diferencias significativas entre sí.  $N = 12$ .



**Figura 3.8** Máxima capacidad respiratoria dependiente de sustratos de Complejo I para ambos grupos en las fechas 35 y 250 DPP. El gráfico de barras presenta las medias  $\pm$  el error estándar. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01. N=12.

La figura 3.9 muestra que la máxima capacidad respiratoria, parámetro indicativo de la función mitocondrial correlacionó de forma negativa y significativa con el contenido de triglicéridos en hígado y niveles de BHB en sangre, dos características del balance energético negativo. En otras palabras, una disminución en la función mitocondrial puede relacionarse con un estado de balance energético negativo en la vaca lechera.



**Figura 3.9 – (A)** Correlación entre la máxima capacidad respiratoria dependiente de sustratos de Complejo I y el contenido de triglicéridos en hígado, coeficiente de Pearson = -0,4 y valor P = 0,05. **(B)** Correlación de la máxima capacidad respiratoria dependiente de sustratos de Complejo I en función de los niveles de BHB, coeficiente de Pearson = -0,4 y valor P = 0,05. N = 6, se tomaron en cuenta los dos tratamientos y las dos fechas 35 y 250 DPP.

## Evaluación del contenido mitocondrial

En busca del mecanismo molecular que pudiera ser responsable de los cambios en la función mitocondrial a lo largo de la curva de lactancia y del impacto de la estrategia de alimentación se evaluó el contenido de mitocondrias del tejido. Para esto, se midió la actividad específica (Ae) de la citrato sintasa, una enzima de expresión constitutiva que se localiza exclusivamente en la matriz mitocondrial y se utiliza como marcador para evaluar la cantidad de mitocondrias. En la tabla 3 se puede observar que no hubo diferencias en la actividad citrato sintasa entre grupos o fechas.

**Tabla 3 - Actividad específica citrato sintasa en homogeneizados totales de hígado bovino.**

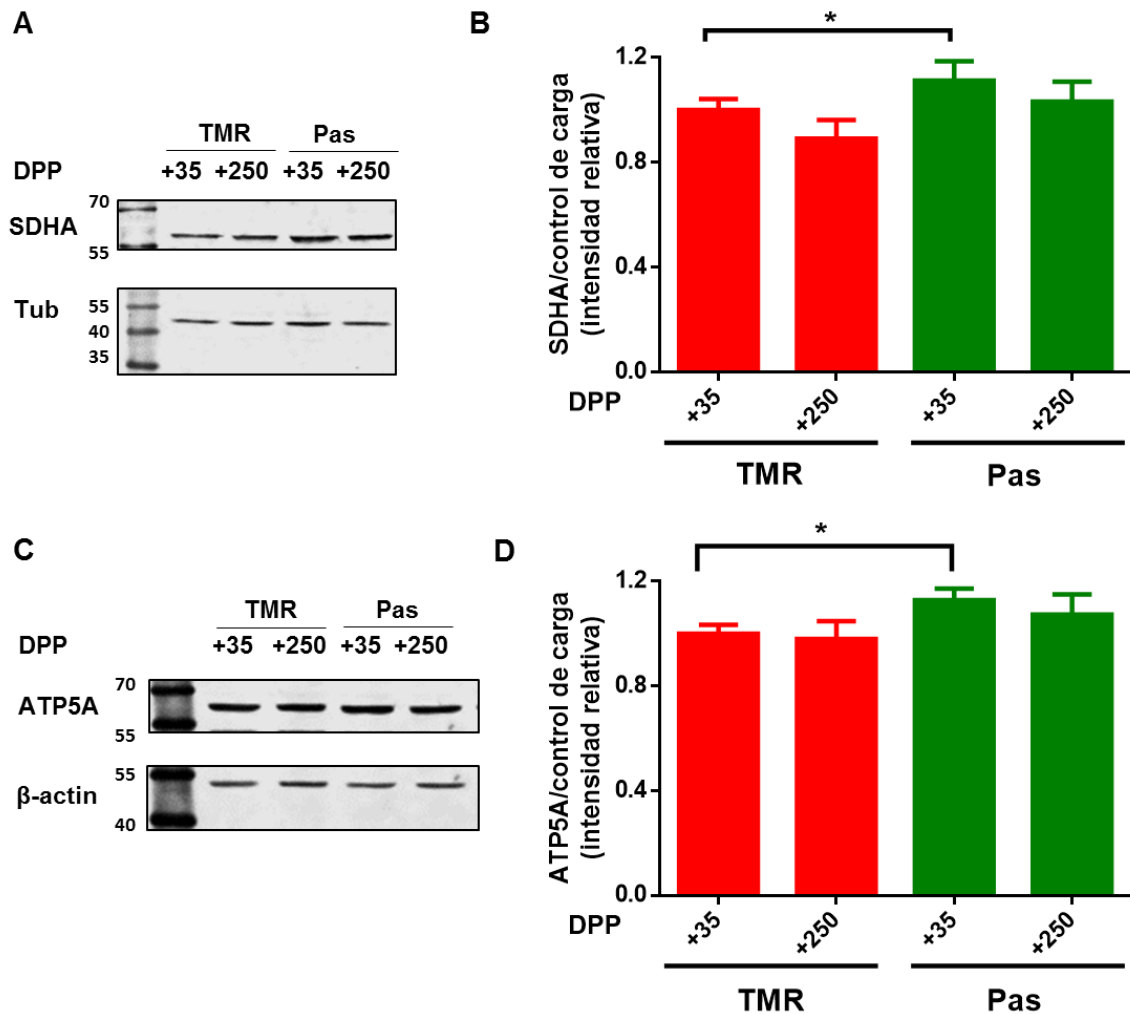
	Citrato sintasa	
	(mU/mg proteína)	
DPP	TMR	Pas
35	47 ± 4	43 ± 5
250	43 ± 3	48 ± 3

Todos los resultados se expresaron como medias ± errores estándar. N = 12.

Con el mismo fin, también se realizaron western blots contra proteínas de la cadena respiratoria subunidad A del Complejo II (SDHA) y cadena  $\alpha$  de la ATP sintasa (ATP5A) respectivamente para ambos grupos TMR y Pas y en las fechas 35 y 250 posparto, junto con su correspondiente control de carga tubulina (tub) y  $\beta$ -actina, respectivamente, ambos componentes del citoesqueleto.

En las figuras 3.10B y 3.10D se puede observar que no hay diferencias significativas en el contenido de SDHA y ATP5A en distintas fechas de la lactancia. Sin embargo, al comparar dietas en la fecha 35 DPP se puede observar que el grupo Pas tiene entre un 10 y 12% más expresión proteica que el grupo TMR tanto para SDHA como ATP5A.

En conjunto esos resultados indican que los cambios en la cantidad de mitocondrias o de componentes de la cadena de transporte electrónico probablemente no sean la causa de los cambios observados en la respiración mitocondrial.



**Figura 3.10 – Evaluación de proteínas de la cadena respiratoria en hígado de vaca. (A)** Western blot representativo de los niveles de subunidad A del Complejo II (SDHA) en muestras de homogeneizado de tejido hepático en ambos grupos, TMR y Pas, durante las fechas 35 DPP y 250 DPP y el correspondiente control de carga. **(B)** Cuantificación de los niveles de SDHA normalizados por los niveles de la proteína de control de carga. Los resultados son las medias  $\pm$  el error estándar. \* $P < 0,05$ .  $N = 12$ . **(C)** Western blot representativo de los niveles de cadena  $\alpha$  de la ATP sintasa (ATP5A) en muestras de homogeneizado de tejido hepático en ambos grupos TMR y Pas y en las fechas 35 DPP y 250 DPP posparto parto y el correspondiente control de carga. **(D)** Gráfico de barras comparando de los niveles cadena  $\alpha$  de la ATP sintasa normalizado por el control de carga. Los resultados son las medias  $\pm$  el error estándar \* $P < 0,05$ .  $N = 12$

## Actividades enzimáticas Complejo I y II

Se midió actividad específica NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa en mitocondrias aisladas para determinar si la disminución en la función mitocondrial durante lactancia temprana con respecto a lactancia tardía se debía puntualmente a una menor actividad del Complejo I o Complejo II. Estos resultados mostraron que no hubo diferencias entre grupos y fechas (tabla 4), indicando que los cambios en la función tampoco se debían puntualmente a una menor función de uno de Complejos estudiados.

**Tabla 4 - Actividad específica NADH deshidrogenasa y succinato deshidrogenasa en mitocondrias aisladas**

	NADH deshidrogenasa		Succinato deshidrogenasa	
	(mU/mg proteína)		(mU/mg proteína)	
DPP	TMR	Pas	TMR	Pas
35	71 ± 10	75 ± 11	166 ± 29	152 ± 25
250	74 ± 12	81 ± 12	126 ± 24	131 ± 15

Todos los resultados se expresaron como medias ± errores estándar. N = 12.

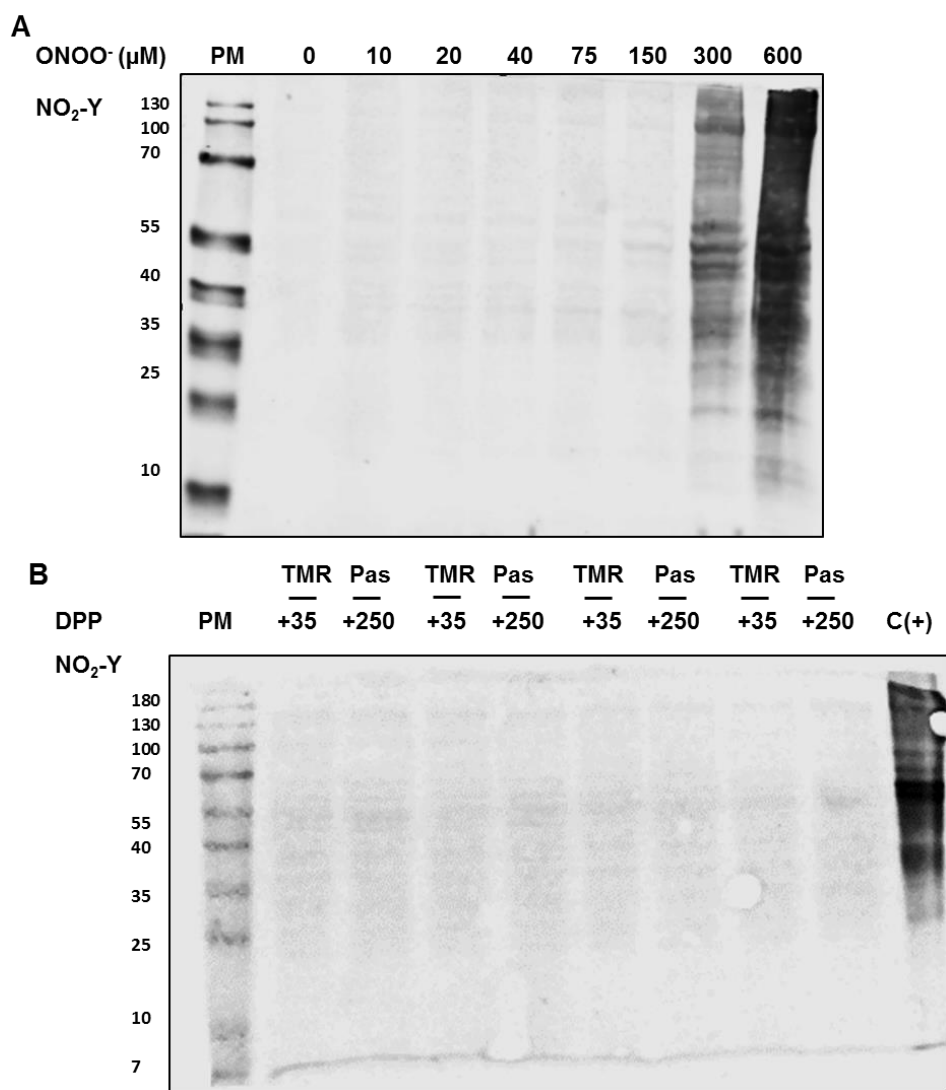
## Modificaciones post-traduccionales

En busca del mecanismo molecular que pudiera ser responsable de estos cambios en la funcional mitocondrial a lo largo de la curva de lactancia y el impacto de la dieta, se estudiaron modificaciones post-traduccionales de proteínas mediante la técnica de Western blot. Evaluamos la nitración de tirosinas, formación de aductos entre aminoácidos y el HNE, un producto de lipoperoxidación, y acetilación de lisinas ya la bibliografía indica que, estas modificaciones pueden afectar la función de proteínas mitocondriales<sup>21,33,35,55,92,93</sup>.

## Nitración

Antes de evaluar las muestras se comprobó la especificidad del anticuerpo contra tirosina nitrada, para esto, se generó un control positivo utilizando homogeneizado de tejido hepático nitrado con distintas concentraciones de peroxinitrito (10-600  $\mu\text{M}$ ). Como se observa en la figura 3.11A el anticuerpo reconoce únicamente proteínas nitradas ya que se observan bandas solamente en los homogeneizados expuestos a peroxinitrito. A su vez, el anticuerpo reconoce de forma diferencial las muestras que fueron nitradas con distintas concentraciones de peroxinitrito, siendo mayor la marca a concentraciones altas del agente nitrante. A partir de este resultado se incorporó un control positivo de nitración a los sucesivos Western blot que se realizaron con las muestras de estudio: albúmina bovina incubada con 300  $\mu\text{M}$  peroxinitrito). Sin embargo, no pudimos detectar nitración en los homogeneizados de hígado analizados (figura 3.11B). Quizás los niveles de nitración presentes en la muestra de estudio son demasiado bajos y no pueden ser detectados mediante la técnica de Western blot.





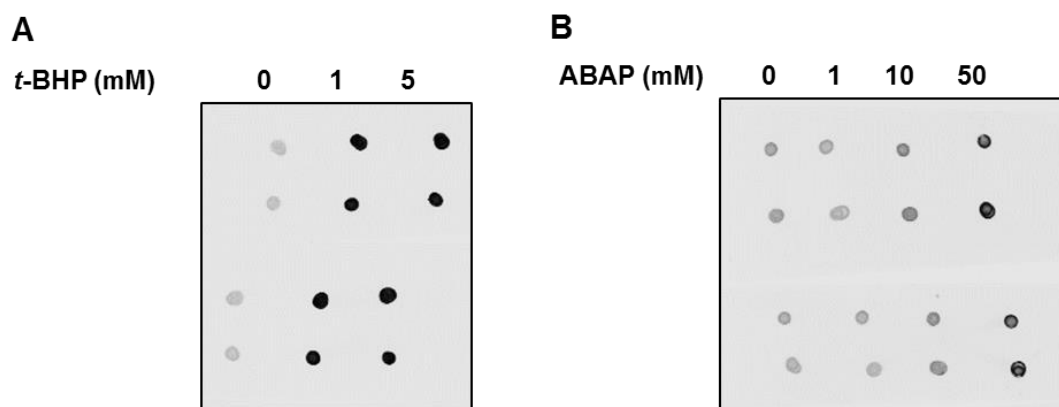
**Figura 3.11 – Evaluación del anticuerpo anti-nitrotirosina utilizando un control positivo de nitración.**

**(A)** Western blot representativo para comprobar la especificidad del anticuerpo, se sembró (en orden) homogeneizado de tejido hepático incubado con, peroxinitrito 0, 10, 20, 40, 75, 150, 300 y 600 μM. **(B)** Western blot representativo donde se sembraron las muestras y por último el control positivo de nitración: albúmina nitrada con 300 μM de peroxinitrito.

#### Lipoperoxidación en homogeneizados totales de hígado

La lipoperoxidación puede ser evidenciada mediante la detección de los productos malodialdehído (MDA) y 4-hidroxinonal (HNE)<sup>46</sup>. El HNE en particular puede formar aductos con residuos cisteína, lisina e histidina de proteínas y los niveles de los mismos pueden ser estudiados mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos contra estos aductos proteína-HNE.

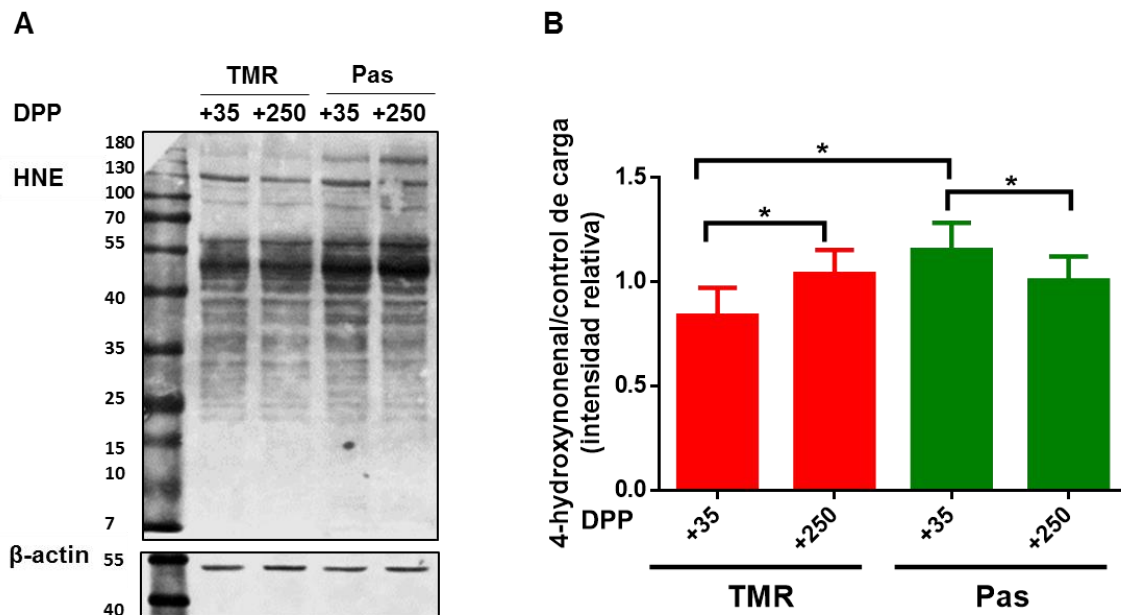
Al igual que con la nitración, también se corroboró la especificidad del anticuerpo contra aductos HNE–proteína antes de procesar las muestras. Para generar un control positivo se incubaron los oxidantes 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (ABAP) o *tert*-butilhidroperóxido con homogeneizados de tejido hepático. Ya que está reportado que estos compuestos son capaces de iniciar procesos de lipoperoxidación<sup>94,95</sup>. En las figuras 3.12A y B se puede observar que el anticuerpo reconoció únicamente los homogeneizados tratados con los agentes oxidantes. Además en la 3.12B se observa que el anticuerpo reconoce diferencialmente homogeneizados expuestos a distintas concentraciones de ABAP. Lamentablemente, no se pudo generar un control positivo que se pudiera sembrar en un Western blot junto a las muestras de estudio ya que los homogeneizados de hígado expuestos a ABAP o *t*-BHP formaron agregados proteicos de alto peso molecular que no pasaban el *stacking* del gel de SDS-PAGE (no se muestra).



**Figura 3.12 – Evaluación del anticuerpo anti-HNE-proteína utilizando un control positivo de lipoperoxidación. (A)** Dot blot donde se sembró 1 µg de homogeneizado de tejido hepático expuesto a 0, 1 y 5 mM de *t*-BHP. **(B)** Dot blot donde se sembró homogeneizado de tejido hepático sin expuesto a 0, 1, 10 y 50 mM de ABAP.

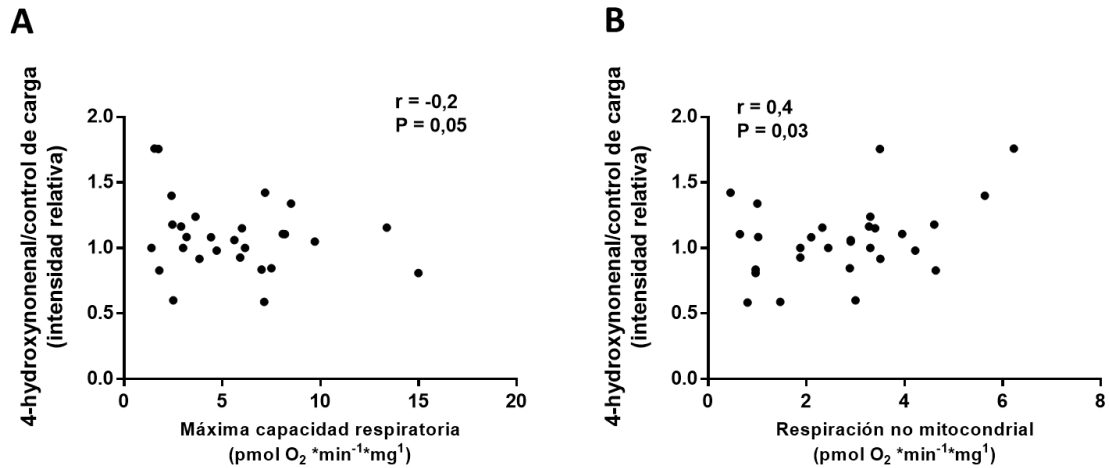
La figura 3.13 muestra un western blot representativo de los niveles de aductos HNE–proteína en homogeneizados de tejido hepático de los grupos TMR y Pas durante las fechas 35 DPP y 250 DPP posparto, con su control de carga β-actina. A su vez, la cuantificación de los niveles de aductos HNE–proteína (figura 3.13B) muestra que

existen variaciones pequeñas pero significativas entre las fechas 35 y 250 DPP. Para el grupo TMR hubo un pequeño aumento en los niveles de HNE del 23% y una disminución para el grupo Pas del 15% entre los 35 y 250 DPP. Sin embargo, al comparar los niveles de aductos en el hígado de las vacas sometidas a dietas diferentes notamos que en la fecha 35 DPP hay un diferencia del 40%, donde el grupo Pas presenta mayor cantidad de aductos HNE-proteína que el TMR.



**Figura 3.13 - (A)** Western blot representativo que muestra los niveles de aductos HNE-proteína (evidencia de lipoperoxidación) en muestras de homogeneizado de tejido hepático en ambos grupos TMR y Pas y durante las fechas 35 DPP y 250 DPP y el correspondiente control de carga. **(B)** Cuantificación de las bandas de western blot en ambos grupos y normalización utilizando el control de carga. Resultados representados como medias  $\pm$  el error estándar \*  $P < 0,05$ .  $N = 12$ .

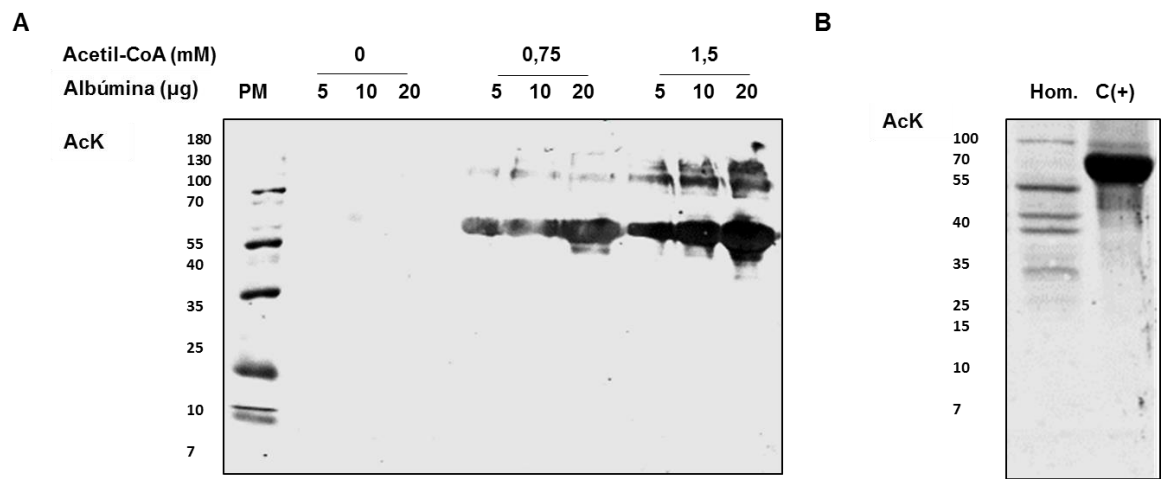
Por otro lado, en la figura 3.14 se puede observar que existe una correlación negativa y baja entre los niveles de aductos HNE-proteína y la máxima capacidad respiratoria, sugiriendo que este evento puede estar involucrado pero no constituye la principal causa de la disminución en la función mitocondrial durante el balance energético negativo. Sin embargo, sí presenta una correlación positiva con la respiración no mitocondrial, indicando que podría estar asociado a eventos de estrés oxidativo.



**Figura 3.14 – (A)** Correlación entre los niveles de lipoperoxidación y la máxima capacidad respiratoria dependiente de sustratos de Complejo I, coeficiente de Pearson = -0,2 y valor P = 0,05. **(B)** Correlación de los niveles de lipoperoxidación en función de la respiración no mitocondrial, coeficiente de Pearson = 0,4 y valor P = 0,03. N = 12, se utilizaron animales de ambos tratamientos y en las dos fechas estudiadas para realizar la correlación.

#### Acetilación

También se midieron los niveles de acetilación de lisinas proteicas, para esto primero se comprobó la especificidad del anticuerpo. Se utilizó el protocolo de Wagner y colaboradores<sup>52</sup> para generar albúmina acetilada de forma no-enzimática. Se incubó albúmina (1 mg/ml) en ausencia o presencia de acetil-CoA (0,75 mM y 1,5 mM) a pH 8 y 37°C durante 24 horas. Tal como se observa en la figura 3.15A, el anticuerpo reconoció únicamente proteínas acetiladas. A partir de este resultado se incorporó el control positivo de acetilación a los sucesivos Western blot que se realizaron con las muestras de estudio (figura 3.15B).

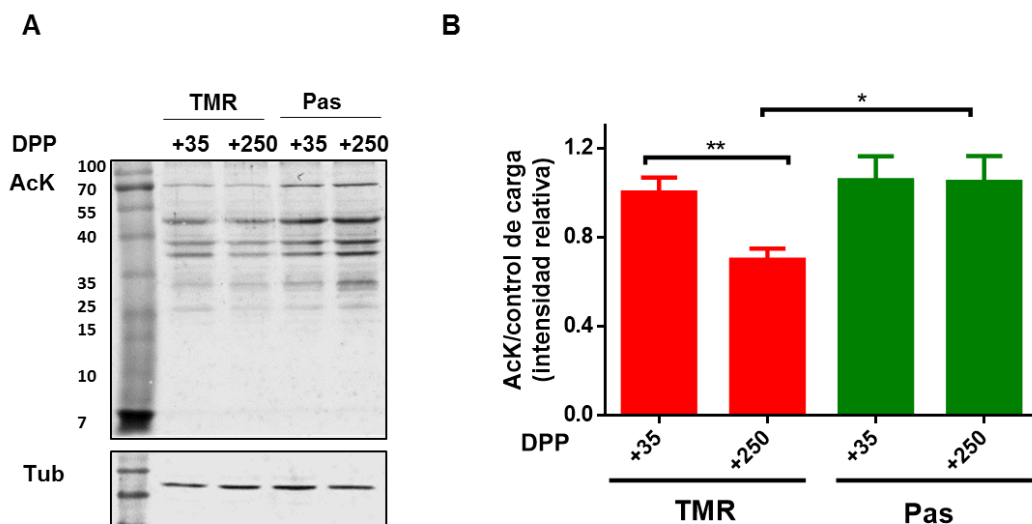


**Figura 3.15 – Evaluación del anticuerpo anti acetil-lisina con un control positivo de acetilación. (A)** Western blot representativo para corroborar la especificidad del anticuerpo, se sembró (en orden) albúmina sin acetilar, albúmina acetilada con 0,75 mM o 1,5 mM de acetil-CoA,. Además, se sembraron tres cantidades diferentes (5, 10 y 20 µg) de muestra. **(B)** Western blot representativo donde se sembró homogeneizado de hígado y el control positivo de acetilación: 5 µg de albúmina acetilada con 1,5 mM de acetil-CoA.

Se determinaron los niveles de acetilación en homogeneizados totales (figura 3.16) y en una fracción enriquecida en mitocondrias (figura 3.17). Las figuras 3.16A y 3.17A muestran western blots representativos de los perfiles y niveles de acetilación de proteínas en ambos grupos TMR y Pas en las fechas 35 y 250 posparto y su control de carga correspondiente. A partir de estas figuras se puede observar que los perfiles de acetilación son muy parecidos entre los distintos grupos y fechas, pero que los niveles de proteínas acetiladas varían.

A pesar de que anteriormente se haya observado una mínima diferencia en los niveles de SDHA (figura 3.17), se decidió utilizar como control de carga por no tener otros marcadores mitocondriales que reaccionaran con la especie en estudio.

En el gráfico de barras (figura 3.16B) se puede observar que en homogeneizados totales el grupo TMR en la fecha 250 DPP mostró menores niveles de acetilación (aproximadamente 30%) con respecto a la fecha 35 DPP del mismo. También se puede observar una diferencia entre grupos en la fecha 250 DPP el grupo TMR tiene menores niveles de acetilación que el grupo Pas.

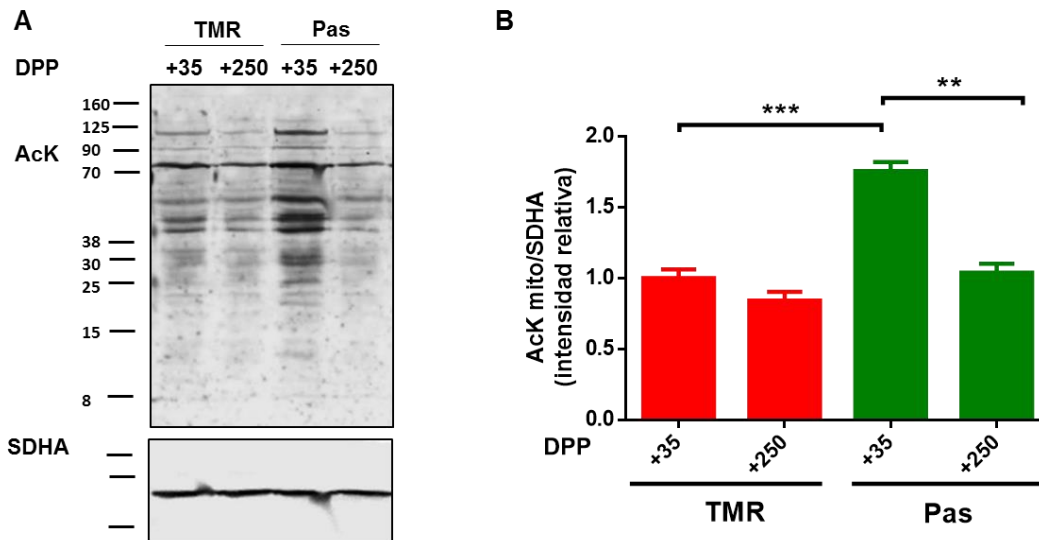


**Figura 3.16 - (A)** Western blot representativo que muestra los niveles de acetilación en muestras de homogeneizado de tejido hepático en ambos grupos TMR y Pas y durante las fechas 35 DPP y 250 DPP posparto y el correspondiente control de carga. **(B)** Cuantificación de las bandas de western blot para en ambos grupos en la fecha 35 DPP y en la fecha 250 DPP posparto. Resultados representados como medias  $\pm$  el error estándar \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .  $N = 12$ .

Por otro lado, cuando observamos los niveles de acetilación de la fracción enriquecida en mitocondrias (figura 3.17B), notamos que el grupo TMR no presenta grandes diferencias entre fechas. Sin embargo, los niveles de acetilación del grupo Pas cambian drásticamente: las mitocondrias hepáticas en la fecha 35 DPP presentan aproximadamente 76% más acetilación en que en la fecha 250 DPP.

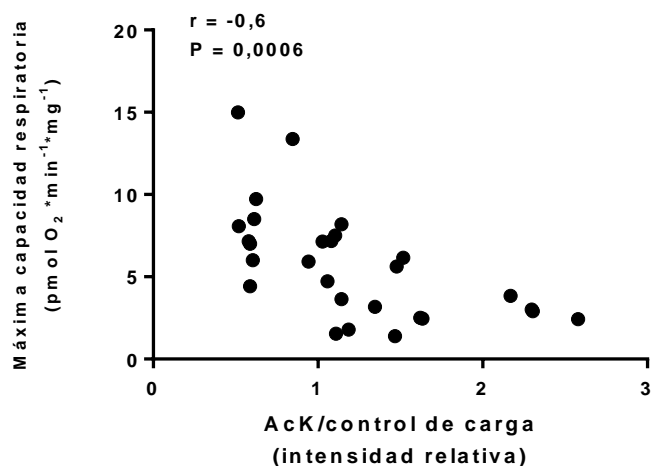
Al comparar grupos alimentados con distintas dietas observamos que en la fecha 35 DPP la diferencia también es significativa, los niveles de acetilación en el grupo Pas son aproximadamente un 70% mayores a los del grupo TMR. Es importante agregar que en la fecha 250 DPP los niveles de acetilación de ambos grupos son muy similares.

Las diferencias entre el homogeneizado y la fracción mitocondrial sugieren que hay proteínas no mitocondriales cuyos niveles de acetilación también varían con las distintas fechas y tratamientos.



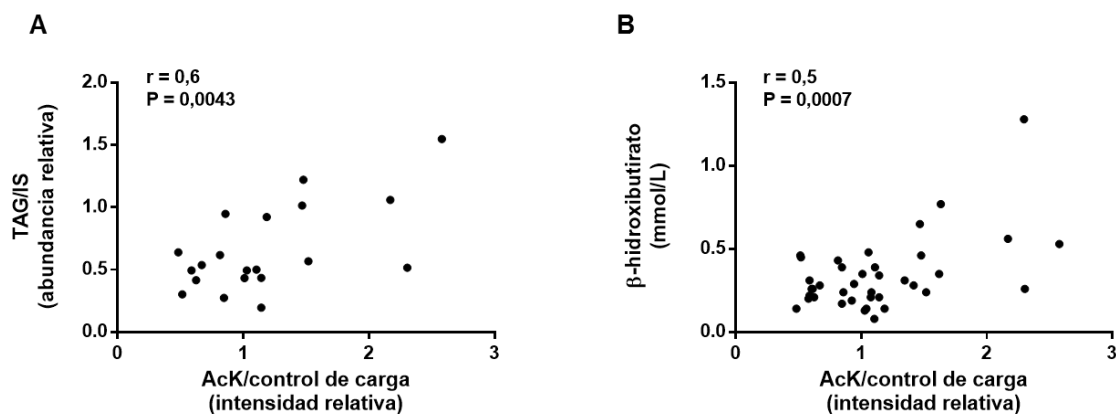
**Figura 3.17 - (A)** Western blot representativo de los niveles de acetilación en mitocondrias aisladas de tejido hepático en ambos grupos TMR y Pas y durante las fechas 35 DPP y 250 DPP posparto y el correspondiente control de carga. **(B)** Cuantificación de las bandas de western blot para en ambos grupos en la fecha 35 DPP y en la fecha 250 DPP posparto. Los resultados son la media  $\pm$  el error estándar \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .  $N = 12$ .

Al correlacionar la máxima capacidad respiratoria mitocondrial con los niveles de acetilación mitocondrial (figura 3.18) se puede observar que existe una significativa correlación negativa. A medida que aumentan los niveles de acetilación de proteínas mitocondriales disminuye la función mitocondrial, sugiriendo que esta modificación postraduccional podría ser responsable de la caída en la función mitocondrial observada durante la lactancia temprana en el grupo alimentado con la estrategia Pas.



**Figura 3.18** – Correlación de la máxima capacidad respiratoria dependiente de sustratos de Complejo I en función de los niveles de acetilación, coeficiente de Pearson = -0,6 y valor P = 0,0006. N = 12, se utilizaron animales de ambos tratamientos y en las dos fechas estudiadas para realizar la correlación.

También se observa que existe una alta y significativa correlación positiva entre los niveles de acetilación y el contenido de triglicéridos en hígado y los niveles de BHB en sangre (características de balance energético negativo) (figura 3.19). Estos resultados sugieren que el aumento en la acetilación de proteínas mitocondriales podría estar vinculado a alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos durante el BEN.



**Figura 3.19** – **(A)** Correlación entre la abundancia relativa de triglicéridos en tejido hepático y los niveles de acetilación, coeficiente de Pearson = 0,6 y valor P = 0,004. **(B)** Correlación entre la concentración de  $\beta$ -hidroxibutirato en suero y los niveles de acetilación, coeficiente de Pearson = 0,5 y valor P = 0,0007. N = 12, se utilizaron animales de ambos tratamientos y en las dos fechas estudiadas para realizar la correlación.



## Discusión

### Disminución en la función mitocondrial hepática durante la lactancia temprana y recuperación en lactancia media

La lactancia temprana es el momento de mayor demanda energética para la vaca, debido a la lactogénesis. En este período las vacas experimentan un balance energético negativo y ocurren alteraciones metabólicas dramáticas para satisfacer las necesidades de la glándula mamaria<sup>96</sup>. La mitocondria cumple un rol crucial en el hígado de la vaca lechera durante estos procesos de adaptación metabólica. En este escenario, de baja disponibilidad de glucosa, como estrategia de adaptación el metabolismo comienza a utilizar los ácidos grasos provenientes de la movilización de tejido adiposo para satisfacer sus requerimientos energéticos. Debido a que la mayor parte de los ácidos grasos se oxidan por medio de la  $\beta$ -oxidación en la mitocondria, este organelo es esencial para la adaptación metabólica. A su vez, la capacidad de utilizar ácidos grasos para generar ATP en la mitocondria requiere de una cadena respiratoria y fosforilación oxidativa eficientes<sup>97</sup>. Por esta razón, uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue estudiar la función mitocondrial durante los distintos momentos de la lactancia, comparando los periodos de balance energético negativo y positivo.

Para poder llevar a cabo este trabajo pusimos a punto un método de criopreservación de biopsias hepáticas, que nos permitió transportar y almacenar las biopsias, para su posterior análisis. Las muestras criopreservadas mantuvieron intactos varios parámetros respiratorios: la máxima capacidad respiratoria, la respiración en estado 3, la respiración sensible a oligomicina y la respiración no mitocondrial (fig.1.3 y tablas 1.1, 1.2 y 2). Éstos fueron determinados luego en todas las muestras en estudio, y los dos primeros fueron utilizados como índices de la función mitocondrial en el tejido.

Nuestros resultados muestran que en la lactancia temprana, cuando la vaca experimenta el balance energético negativo hay una disminución en la función mitocondrial hepática con respecto a la lactancia tardía (fig. 3.5 y 3.6). También

demostramos que existe una correlación alta y negativa entre la función mitocondrial y niveles de  $\beta$ -hidroxibutirato y triglicéridos en hígado (fig. 3.9). Nuestras observaciones coinciden con un estudio reciente realizado en vacas lecheras donde separaron a los animales en dos grupos, los que mostraban algún riesgo clínico al día 100 posparto y los que no mostraban ningún riesgo. En este estudio concluyeron que las vacas “sanas” tenían niveles más altos de acilcarnitina en sangre. Este metabolito es el producto de la enzima carnitina palmitoil transferasa (CPT-I), crucial para la oxidación de ácidos grasos, y puede considerarse indicativo de una buena función mitocondrial.<sup>97</sup> También se ha reportado que la disfunción mitocondrial puede dar lugar al desarrollo de hígado graso<sup>10,98</sup> y estrés oxidativo<sup>99</sup>, nuestras observaciones apoyan estos reportes.

Asimismo, observamos una marcada recuperación de la función mitocondrial y disminución en la respiración no mitocondrial, cuerpos cetónicos y triglicéridos en hígado en la fecha 250 después del parto (fig. 3.5 y 3.6), cuando la vaca se encuentra en lactancia tardía y experimenta un balance energético positivo. Este patrón ha sido descrito anteriormente para las “enfermedades de producción de la vaca lechera”. Éstas incluyen la cetosis, hígado graso y mastitis, entre otras, son consideradas enfermedades ocasionadas por el manejo intensivo o enfermedades metabólicas que se presentan durante el período de transición, y tienen un impacto en la salud de la vaca, la fertilidad y producción de leche<sup>100</sup>. A pesar de ser reversibles es importante destacar que a largo plazo estas enfermedades pueden tener un impacto en la fertilidad de la vaca y como consecuencia en la eficiencia del sistema, ya que si la vaca tiene dificultades para ser fecundada no tendrá una parición por año<sup>5,101</sup>. Se ha enfatizado mucho en las pérdidas en la producción lechera que se deben principalmente a que no se logra alcanzar el pico de lactancia y a problemas de salud comunes en vacas lecheras<sup>102</sup>. Por esta razón, se han probado distintas estrategias de manejo y nutrición durante el período de transición con el fin de aumentar el rendimiento de producción. Sin embargo, se ha observado que la incidencia de enfermedades metabólicas es alta tanto en sistemas de pastoreo extensivo como de confinamiento, indicando que la selección genética continua a favor de mayores rendimientos lecheros es una de las principales causas de enfermedad<sup>12,103</sup>.

De cualquier forma hay estudios que apoyan que la dieta puede ser un instrumento útil para influir sobre la salud del animal<sup>104</sup>. En un estudio se observó que niveles altos de cuerpos cetónicos y ácidos grasos no esterificados estaban asociados a un mayor riesgo de enfermedad (cetosis clínica y placenta retenida) y que el tratamiento con una solución de dextrosa (Energan de Virbac) que aporta precursores gluconeogénicos era capaz de mitigar los efectos del período de transición<sup>104</sup>. Resultados similares se han obtenido con el tratamiento de polietilenglicol, otro precursor gluconeogénico<sup>12,63,64</sup>. Asimismo, una revisión destaca que las infusiones intravenosas continuas de glucosa, glicerol, propionato, glucagón, glucocorticoides o insulina pueden ser utilizadas para aumentar los niveles de glucosa en sangre y prevenir la cetosis o el hígado graso. Sin embargo, es importante destacar que es preciso investigar formas de tratamiento más prácticas y menos trabajosas.<sup>13</sup>

En esta línea, nosotros observamos que la máxima capacidad respiratoria y respiración en estado 3 eran menores en las vacas del grupo Pas que para vacas del grupo TMR (fig. 3.7 y 3.8), confirmando que una fuente de precursores gluconeogénicos es una estrategia nutricional válida para mitigar los efectos del balance energético negativo. A diferencia del pastoreo, en una dieta totalmente mezclada o TMR, las vacas están confinadas y se las alimenta con una mezcla de forraje y concentrados que incluyen mayor proporción de carbohidratos no fibrosos además de melaza y sales. Las dietas TMR están caracterizadas por ser más almidonosas y menos requerimientos de la actividad física, de esta forma tener un mayor aporte glucogénico. Nuestro trabajo también confirmó que el grupo TMR fue menos vulnerable a las consecuencias que acarrea la movilización de tejido adiposo que el grupo Pas, ya que presentó menor cantidad de TG en el hígado y de cuerpos cetónicos en sangre (fig. 3.2 y 3.3)<sup>5,105</sup>.

### Formación de oxidantes durante la lactancia

Por otra parte observamos que la respiración no mitocondrial era mayor en las biopsias hepáticas obtenidas durante la lactancia temprana que las de la lactancia tardía (fig. 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8). Este parámetro se asocia con el consumo de oxígeno por

enzimas como las NADPH oxidasas de macrófagos<sup>22</sup> o por reacciones que consumen oxígeno como la lipoperoxidación<sup>33</sup>.

En esta línea, nosotros también hallamos que en el hígado del grupo Pas había niveles más altos de aductos HNE-proteína en la lactancia temprana (35 DPP) que en la lactancia tardía (fig. 3.13). Esto no se observó en el grupo TMR. Además, observamos una correlación positiva entre los niveles de aductos HNE-proteína (evidencia de lipoperoxidación) y respiración no mitocondrial, indicando que estos dos eventos podrían estar asociados (fig. 3.14B). Esto es que la lipoperoxidación podría estar aportando a la respiración no mitocondrial o que los eventos oxidativos asociados a la respiración no mitocondrial como células proinflamatorias (macrófagos) o generación de oxidantes podrían aportar especies reactivas capaces de iniciar la lipoperoxidación<sup>106</sup>.

Por otro lado, como mencionamos en la introducción el HNE es un  $\alpha,\beta$  aldehído insaturado altamente reactivo que reacciona con residuos cisteína, histidina y lisina de proteínas que pueden resultar en la inhibición de la síntesis de proteínas y ADN y la inactivación de enzimas. Entre las vías metabólicas afectadas por la inactivación de enzimas por HNE se encuentran la  $\beta$ -oxidación, cetogénesis, metabolismo de las colinas<sup>50</sup>, glucólisis, ruta pentosa fosfato, ciclo de Krebs, la cadena respiratoria, el sistema antioxidante glutatión peroxidasa -glutatión reductasa, la enzima superóxido dismutasa, la enzima aldosa reductasa que cumple una función importante en la sensibilidad a la insulina, entre otras<sup>50,17</sup>.

Con respecto al metabolismo de las colinas, varias publicaciones destacan el rol crucial de la colina para el mantenimiento de un hígado sano<sup>50,63,64,107-110</sup>. La colina es un componente esencial tanto en la membrana celular como la membrana mitocondrial<sup>110,111</sup> y también es precursor de la fosfatidilcolina, metabolito necesario en el empaquetamiento y exportación de triglicéridos en lipoproteínas, una falla en este proceso podría propiciar el acúmulo de triglicéridos y luego desencadenar en un hígado graso<sup>7,9,110</sup>. En un western blot, la banda correspondiente a la colina deshidrogenasa debería visualizarse alrededor del peso molecular de 65 kDa la cual efectivamente se observa en nuestras muestras (fig. 3.13.) sugiriendo que esta proteína podría estar formando un aducto con HNE. En vacas lecheras, la

suplementación con fosfatidilcolina o precursores de colinas ha sido extensamente estudiada, y se ha visto que es una medida preventiva exitosa para disminuir el hígado graso y la cetogénesis<sup>64,107-109</sup>.

Autores previos han mostrado que el HNE forma aductos e inactiva varias proteínas pertenecientes a la cadena respiratoria como citocromo c oxidasa, succinato deshidrogenasa y la cadena  $\alpha$  de ATP sintasa<sup>17,112</sup>. Por esto pensamos que la disminución en la función mitocondrial durante la lactancia temprana podría ser explicada por un aumento en los procesos de lipoperoxidación con la consecuente la formación de aductos-HNE proteína. Sin embargo nuestros resultados indican que existe una muy baja correlación entre los niveles de aductos-HNE proteína y la máxima capacidad respiratoria (fig.3.14A), indicando que esta no sería una vía relevante.

También consideramos que la disminución en la función mitocondrial podría dar lugar a la lipoperoxidación ya que la mitocondria es un sitio de producción de especies reactivas del oxígeno<sup>29,32,72</sup> y éstos son los iniciadores de la reacción de lipoperoxidación en especial el radical hidroxilo y el radical perhidroxilo<sup>84</sup>. Nuevamente la falta de una correlación negativa fuerte entre los niveles de HNE y la máxima capacidad respiratoria (parámetro indicativo de función mitocondrial) no apoya esta idea.

A pesar de que la ocurrencia de HNE ha sido ligada principalmente a efectos negativos, en los últimos años varios autores han demostrado que bajos niveles de HNE pueden tener efectos protectores. El HNE puede participar en el mantenimiento de la homeostasis redox induciendo la expresión de proteínas desacoplantes (UCP), que disminuyen la producción de ROS en la cadena respiratoria; promoviendo la supervivencia y proliferación de células<sup>47-49</sup>. Esto podría explicar los pequeños cambios en niveles de aductos HNE-proteína observados para el grupo TMR (fig. 3.13B).

## Contenido de proteínas mitocondriales durante la lactancia

También evaluamos si el contenido de mitocondrias variaba durante la lactancia y podía explicar los cambios observados en la función. En base a los datos de actividad citrato sintasa (tabla 3) pudimos concluir que no había diferencias en el número de mitocondrias en la lactancia temprana y tardía. Sin embargo, pudimos observar un pequeño aumento en los niveles de una subunidad del complejo II y otra de la ATP sintasa (fig. 3.10) durante el BEN en los animales del grupo Pas. Esto quizás se deba a un mecanismo de compensación debido a la disminución en la función. A su vez, a pesar de haber visto un pequeño aumento en la expresión proteica de una subunidad del complejo II, cuando estudiamos la actividad específica del complejo II no encontramos diferencias significativas (tabla 4). Tampoco, vimos diferencias significativas en la actividad específica del complejo I (tabla 4), por tanto, la disminución en función mitocondrial no se debe específicamente a una menor actividad de estos complejos.

### Acetilación y función mitocondrial en la lactancia

Finalmente decidimos evaluar los niveles de acetilación de proteínas durante la lactancia, ya que la acetilación de lisinas es una modificación post-traducciona reversible muy involucrada en la un regulación de la función mitocondrial. En particular, varios estudios han demostrado que la acetilación de lisinas actúa modulando enzimas clave de la  $\beta$ -oxidación, ciclo de Krebs, metabolismo de cuerpos cetónicos y fosforilación oxidativa, según la disponibilidad de nutrientes<sup>56</sup>.

Nuestros resultados indican que la acetilación de proteínas mitocondriales aumenta considerablemente en la lactancia temprana (35 DPP) con respecto a la lactancia tardía (250 DPP) en las vacas del grupo Pas, pero no en el grupo TMR (fig. 3.17). Los niveles de acetilación de proteínas a los 35 DPP, periodo de BEN, son sensiblemente mayores en el grupo Pas que en el grupo TMR. El estudio de la correlación entre la máxima capacidad respiratoria y la acetilación de proteínas mitocondriales arrojó valores altos y negativos, sugiriendo que existe una vinculación entre estos procesos (fig. 3.18).

Varios autores han demostrado que la acetilación de lisinas puede inactivar enzimas como acil-CoA sintetasa, del metabolismo de los ácidos grasos, el complejo I y II de la cadena de transporte de electrones<sup>55</sup>, acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga<sup>54</sup> y MnSOD<sup>27</sup>. En particular, la acetilación de proteínas regula la producción de ATP mitocondrial de forma directa por medio de la acetilación de una subunidad del complejo I y complejo II e indirectamente al reducir la actividad de la vía de  $\beta$ -oxidación<sup>55</sup>. Por tanto, es posible que la disminución en la función mitocondrial se explique por una inactivación de enzimas mitocondriales por acetilación de lisinas y que además se encuentre en mayores niveles en el grupo de animales con un peor estado energético. Asimismo, una menor actividad de la vía de  $\beta$ -oxidación podría dar lugar a un acúmulo de triglicéridos en hígado y desarrollo de hígado graso. Nuestros resultados no mostraron una inactivación de los complejos I y II (tabla 4), por tanto la identificación de las enzimas o complejos afectados en nuestro sistema requiere de más investigación.

En este sentido los niveles de proteínas mitocondriales acetiladas correlacionaron también con el contenido de TG del hígado y de cuerpos cetónicos en sangre (fig. 3.19). En la situación de balance energético negativo (35 DPP), las vacas del grupo Pas presentaron concentraciones más altas de cuerpos cetónicos en sangre, junto con mayor contenido de triglicéridos en hígado y acetilación de proteínas mitocondriales en hígado (fig. 3.2, 3.3 y 3.17). Estudios realizados por otros investigadores del grupo demostraron que el grupo Pas también presentó valores levemente menores de PV y CC <sup>113</sup>, indicativos de una mayor movilización de reservas lipídicas. Un gran flujo de ácidos grasos hacia el hígado puede conducir al acumulo de TG en el tejido hepático y a un aumento en los niveles de cuerpos cetónicos formados por oxidación de los ácidos grasos.

Coincidente con nuestros resultados, estudios previos en vacas lecheras demostraron que el pico de cuerpos cetónicos y triglicéridos en hígado ocurre durante la lactancia temprana<sup>114</sup> y es especialmente alto en vacas altamente productoras<sup>9,115</sup>. Además, trabajos del grupo también han demostrado que la concentración de cuerpos cetónicos aumenta en grupos de vacas con inclusión de pastoreo en las dietas<sup>116</sup>. Asimismo, otros autores también demostraron que altos niveles de cuerpos cetónicos

en plasma correlacionaban con altos niveles de acetilación hepática<sup>59</sup>, destacando la participación de la acetilación hepática en este escenario.

De cualquier forma debemos mencionar que existen reportes contradictorios sobre el rol de la acetilación en el metabolismo energético mitocondrial. Algunos autores demostraron que la acetilación de lisinas podía activar enzimas como malato deshidrogenasa<sup>27</sup>, aconitasa<sup>53</sup> y acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga y corta en tejido cardíaco<sup>60</sup>. Esta información sugiere que los efectos de la acetilación sobre una vía metabólica pueden depender del tejido. En un estudio de mapeo cuantitativo de la acetilación en corazón, hígado, músculo, cerebro y riñón, demostraron que este mecanismo regula la utilización de energía en distintos tejidos<sup>62</sup>.



## Conclusiones

En suma, este trabajo presenta información inédita sobre los cambios metabólicos que ocurren durante la curva de lactancia en vacas con distintas estrategias de alimentación. Logramos medir por primera vez la función mitocondrial en biopsias congeladas de hígado bovino y además, pudimos aproximarnos a los mecanismos moleculares que podrían estar en juego en los cambios observados en la función mitocondrial.

Nuestros resultados indican que:

- Hay una disminución en la función mitocondrial en lactancia temprana que además se ve agravada en la estrategia de alimentación con inclusión de pastoreo (grupo Pas).
- Durante la lactancia tardía la función mitocondrial se recupera en ambas estrategias de alimentación.
- El aumento de la acetilación de proteínas mitocondriales hepáticas está altamente correlacionado con disminución en la función mitocondrial, niveles de cuerpos cetónicos y contenido de triglicéridos en hígado.
- La acetilación de proteínas mitocondriales puede ser una de las principales causas que expliquen la caída en la función mitocondrial durante el balance energético negativo.
- Existen eventos de estrés oxidativo durante la lactancia temprana y la lipoperoxidación puede ser una de las posibles causas que explique el aumento en respiración no mitocondrial.
- El manejo nutricional, que es esencial para sostener altos niveles de producción y asegurar el mantenimiento de reservas corporales, también impacta en la función mitocondrial hepática durante la lactancia temprana.
- A pesar de que la inclusión de pastoreo se ha postulado como una estrategia que apunta a mejorar la competitividad del sistema, nuestro estudio demostró

que las vacas sometidas a esta estrategia presentan menor función mitocondrial y un aumento en la acetilación y lipoperoxidación. Estos eventos pueden traducirse en ineficiencias en el sistema, por esta razón es necesario seguir investigando y afinando estrategias de alimentación que sean capaces de mitigar los efectos observados.

## Perspectivas:

### 1) Estudiar los factores de transcripción y co-reguladores que controlan la función mitocondrial

En este trabajo se encontraron cambios en la función mitocondrial durante la curva de lactancia en la vaca lechera que podrían tener un impacto en el metabolismo intermediario. A partir de estos resultados, es de nuestro interés estudiar factores de transcripción y co-reguladores nucleares que están involucrados en la regulación del metabolismo celular y mitocondrial. En particular la familia de co-activadores de PPAR $\gamma$ , PGC-1 $\alpha$  y PGC-1 $\beta$ , están involucrados en vías de producción de energía y regulación del metabolismo de ácidos grasos<sup>15,69</sup>.

### 2) Evaluar el rol de la acetilación en la regulación del metabolismo energético hepático en la lactancia

La acetilación de proteínas mitocondriales participa en estados metabólicos alterados como la obesidad, malnutrición o sobre-nutrición<sup>27</sup>. Esta modificación postraducciona depende de los niveles y actividad de acetilasas y desacetilasas. Por tanto, el estudio de estas enzimas es esencial para la comprensión de la acetilación y su impacto en el metabolismo de la vaca lechera durante transición y la lactancia temprana, etapas en las que la vaca enfrenta una subnutrición fisiológica.

Por otra parte como se mencionó anteriormente, la bibliografía muestra información contradictoria sobre la regulación del metabolismo energético por acetilación. Sería de especial utilidad identificar las proteínas que se acetilan en el hígado durante la lactancia para comprender mejor el efecto de la acetilación en la función mitocondrial en el contexto del BEN.

### 3) Profundizar en el impacto del manejo nutricional sobre la función

En un futuro, aspiramos a realizar un tratamiento con los siguientes suplementos para disminuir los efectos de la movilización lipídica y evaluar los efectos sobre la mejorar la función mitocondrial:

Suplementación con niacina o NAD<sup>+</sup>: En ganado de leche, los efectos beneficiosos de la niacina o vitamina B3, precursor de NAD<sup>+</sup> son conocidos, tales como aumento en la producción de leche, menor movilización lipídica, menor incidencia de cetosis e hígado graso, mejora en síntesis de proteína microbiana y mayor producción de propionato<sup>117,118,119</sup> A su vez, como NAD<sup>+</sup> es un co-sustrato limitante para las sirtuinas, se ha utilizado como una herramienta para regular la función sirtuina y en consecuencia los niveles de acetilación. Estudios en ratones con una dieta alta en grasas y suplementados con ribósido de nicotinamida (NR) precursor de NAD<sup>+</sup> demostraron que fue posible aumentar los niveles de NAD<sup>+</sup> y activar tanto a SIRT1 como a SIRT3 mejorando el catabolismo y protegiendo contra el efecto que tiene una dieta alta en grasa en el metabolismo<sup>120,121</sup>.

Suplementación con aminoácidos: En esta misma línea se ha investigado la suplementación de aminoácidos en ratas. Un estudio demostró que la suplementación de arginina en ratas diabéticas Zucker disminuía la masa grasa en el animal. A su vez, un estudio de microarrays demostró que la suplementación con arginina aumentó los niveles de expresión de genes relacionados a la oxidación de ácidos grasos y glucosa en el tejido adiposo<sup>122</sup>. Es importante destacar que la arginina es un aminoácido glucogénico (al igual que aspartato, asparagina, alanina, glicina, serina, treonina, cisteína, glutamato, glutamina, prolina, histidina, valina y metionina) que podría mitigar el BEN durante la lactancia temprana.

Suplementación con sensibilizadores de insulina: La pioglitazona, es una tiazolidinediona que mejora la sensibilidad a la insulina al activar PPAR $\gamma$  que involucra la regulación de varios genes involucrados en el metabolismo de los glúcidos y de los lípidos<sup>123</sup>. El tratamiento con pioglitazona está asociado con mejoras en la histología hepática, resistencia a insulina y ganancia de peso. Por otro lado, la metformina es una biguanida utilizada en el tratamiento de la diabetes de tipo 2 porque mejora la sensibilidad a insulina y el contenido de triglicéridos en hígado y está asociado con pérdida de peso<sup>18</sup>. El tratamiento con resveratrol un polifenol con capacidad antioxidante también previno esteatosis hepática en dietas con alto contenido de ácidos grasos<sup>15</sup>. Sería interesante evaluar el impacto de estos tratamientos sobre la función mitocondrial hepática.

## Referencias

1. Schmidt, G. H., Van Vleck, L. D. & Hutjens, M. F. *Principles of Dairy Science*. (Prentice Hall, 1988).
2. Ingvarlsen, K. L. & Moyes, K. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. *Animal* **7**, 112–122 (2013).
3. Bauman, D. E. & Currie, W. B. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *J. Dairy Sci.* **63**, 1514–1529 (1980).
4. Astessiano, A. *et al.* Endometrial gene expression in primiparous dairy cows at the end of the voluntary waiting period is affected by nutrition: Total mixed ration vs increasing levels of herbage allowance. *Reprod. Domest. Anim.* 1–8 (2017). doi:10.1111/rda.12981
5. Astessiano, A. L. *et al.* Metabolic adaptations due to the inclusion of pasture in the diet of dairy cows fed total mixed ration during early lactation. *Open J. Anim. Sci.* **7**, 127–140 (2017).
6. Meikle, A. *et al.* Effects of parity and body condition at parturition on endocrine and reproductive parameters of the cow. *Reproduction* **127**, 727–737 (2004).
7. Drackley, J. K. Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *J. Dairy Sci.* **82**, 2259–2273 (1999).
8. Guangyong, Z. *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction. Animal Feed Science and Technology* **88**, (2000).
9. McCarthy, S. D. *et al.* Negative energy balance and hepatic gene expression patterns in high-yielding dairy cows during the early postpartum period: a global approach. *Physiol. Genomics* **42A**, 188–199 (2010).
10. Wei, Y., Rector, R. S., Thyfault, J. P. & Ibdah, J. A. Nonalcoholic fatty liver disease and mitochondrial dysfunction. **14**, 193–199 (2008).
11. Knebel, B. *et al.* Peroxisomes compensate hepatic lipid overflow in mice with fatty liver. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 965–976 (2015).
12. Roche, J. R., Bell, A. W., Overton, T. R. & Looor, J. J. Nutritional management of the transition cow in the 21st century—a paradigm shift in thinking. *Anim. Prod. Sci.* **53**, 1000–1023 (2013).
13. Bobe, G., Young, J. W. & Beitz, D. C. Invited Review : Pathology , Etiology , Prevention , and Treatment of Fatty Liver in Dairy Cows \*. *J. Dairy Sci.* **87**, 3105–3124 (2004).
14. Kendrick, A. A. *et al.* Fatty liver is associated with reduced SIRT3 activity and mitochondrial protein hyperacetylation. *Biochem. J.* **433**, 505–14 (2011).
15. Nassir, F. & Ibdah, J. Role of Mitochondria in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 8713–8742 (2014).
16. Bandyopadhyay, S. K. & Dutta, A. Mitochondrial hepatopathies. *J. Assoc.*

- Physicians India* **53**, 973–978 (2005).
17. Kudryavtseva, A. V *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget* **7**, 44879–44905 (2016).
  18. Schapira, A. H. V. Mitochondrial disease. *Lancet* **368**, 70–82 (2006).
  19. Kühlbrandt, W. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol.* **13**, 89 (2015).
  20. Brand, M. D. & Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem. J.* **437**, 575.1-575 (2011).
  21. Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4003–8 (2004).
  22. Brand, M. D. & Nicholls, D. G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **312**, 297–312 (2011).
  23. Nelson, D. and C. M. *Principles of Biochemistry, Lehninger.*
  24. Drackley, J. K., Overton, T. R. & Douglas, G. N. Adaptations of Glucose and Long-Chain Fatty Acid Metabolism in Liver of Dairy Cows during the Periparturient Period. *J. Dairy Sci.* **84**, E100–E112 (2001).
  25. Poirier, Y., Antonenkov, V. D., Glumoff, T. & Hiltunen, J. K. Peroxisomal ??-oxidation-A metabolic pathway with multiple functions. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1763**, 1413–1426 (2006).
  26. Youssef, M. & El-Ashker, M. Significance of insulin resistance and oxidative stress in dairy cattle with subclinical ketosis during the transition period. *Trop. Anim. Health Prod.* **49**, 239–244 (2017).
  27. Ghanta, S., Grossmann, R. E. & Brenner, C. Mitochondrial protein acetylation as a cell-intrinsic, evolutionary driver of fat storage: Chemical and metabolic logic of acetyl-lysine modifications. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **48**, 561–574 (2013).
  28. Kong, R. S. G., Liang, G., Chen, Y., Stothard, P. & Guan, L. L. Transcriptome profiling of the rumen epithelium of beef cattle differing in residual feed intake. *BMC Genomics* **17**, 592 (2016).
  29. Pesta, D. & Gnaiger, E. *Chapter 3 High-Resolution Respirometry : OXPHOS Protocols for Human Cells and Permeabilized Fibers from Small Biopsies of Human Muscle.* **810**, (2012).
  30. Velasco, C. D., Draxl, A., Wiethüchter, A., Eigentler, A. & Gnaiger, E. O2k-Protocols Mitochondrial Respiration in Permeabilized Fibres versus Homogenate from Trout Heart and Liver . **12**, 1–11 (2013).
  31. Brand, M. D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* **45**, 466–472 (2011).
  32. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
  33. Uchida, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress.

- Prog. Lipid Res.* **42**, 318–343 (2003).
34. Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S. & Kalayci, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. 9–19 (2012).
  35. Schaur, R. J., Siems, W., Bresgen, N. & Eckl, P. M. 4-Hydroxy-Nonenal—a Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules* **5**, (2015).
  36. Cardoso, A. R., Kakimoto, P. A. H. B. & Kowaltowski, A. J. Diet-Sensitive Sources of Reactive Oxygen Species in Liver Mitochondria : Role of Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenases. **8**, 1–13 (2013).
  37. Tahara, E. B., Barros, M. H., Oliveira, G. A., Netto, L. E. S. & Kowaltowski, A. J. Dihydrolipoyl dehydrogenase as a source of reactive oxygen species inhibited by caloric restriction and involved in *Saccharomyces cerevisiae* aging. *FASEB J.* **21**, 274–83 (2007).
  38. Kakimoto, P. A. H. B., Tamaki, F. K., Cardoso, A. R., Marana, S. R. & Kowaltowski, A. J. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release from the very long chain acyl-CoA dehydrogenase. *Redox Biol.* **4**, 375–380 (2015).
  39. Sies, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* **4**, 180–183 (2015).
  40. Schieber, M. & Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* **24**, R453–R462 (2014).
  41. Lanza, I. R. Functional Assessment of Isolated Mitochondrial in vitro. **6879**, 1–19 (2009).
  42. Zorov, D. B., Juhaszova, M. & Sollott, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiol. Rev.* **94**, 909–950 (2014).
  43. Vogt, S., Rhiel, A., Weber, P. & Ramzan, R. Revisiting Kadenbach: Electron flux rate through cytochrome c-oxidase determines the ATP-inhibitory effect and subsequent production of ROS. *BioEssays* **38**, 556–567 (2016).
  44. Radi, R., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Naviliat, M. & Cayota, A. Unraveling peroxyxynitrite formation in biological systems. *Free Radic. Biol. Med.* **30**, 463–488 (2001).
  45. Radi, R. Structural Basis of its Functional Effects. **46**, 550–559 (2014).
  46. Bellanti, F., Villani, R., Facciorusso, A., Vendemiale, G. & Serviddio, G. Lipid oxidation products in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Free Radic. Biol. Med.* **111**, 0–1 (2017).
  47. Zhong, H. & Yin, H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biol.* **4**, 193–199 (2015).
  48. Chen, Z.-H. & Niki, E. 4-hydroxynonenal (4-HNE) has been widely accepted as an inducer of oxidative stress. Is this the whole truth about it or can 4-HNE also exert protective effects? *IUBMB Life* **58**, 372–3 (2006).
  49. Wojciech, Ł. & Agnieszka, G. Free Radical Biology and Medicine Antioxidants and HNE in redox homeostasis. (2016).

doi:10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.033

50. Andringa, K. K., Udoh, U. S., Landar, A. & Bailey, S. M. Proteomic analysis of 4-hydroxynonenal (4-HNE) modified proteins in liver mitochondria from chronic ethanol-fed rats. *Redox Biol.* **2**, 1038–1047 (2014).
51. Newman, J. C., He, W. & Verdin, E. Mitochondrial protein acylation and intermediary metabolism: Regulation by sirtuins and implications for metabolic disease. *J. Biol. Chem.* **287**, 42436–42443 (2012).
52. Wagner, G. R. & Payne, R. M. Widespread and Enzyme-independent N<sup>ε</sup>-Acetylation and N<sup>ε</sup>-Succinylation of Proteins in the Chemical Conditions of the Mitochondrial Matrix \*. **288**, 29036–29045 (2013).
53. Drazic, A., Myklebust, L. M., Ree, R. & Arnesen, T. The world of protein acetylation. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1864**, 1372–1401 (2016).
54. Hirschey, M. D. *et al.* SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* **464**, 121–125 (2010).
55. Anderson, K. A. & Hirschey, M. D. Mitochondrial protein acetylation regulates metabolism. *Essays Biochem.* **52**, 23–35 (2012).
56. Wagner, G. R. & Payne, R. M. Mitochondrial Acetylation and Diseases of Aging. *J. Aging Res.* **2011**, 1–13 (2011).
57. Choudhary, C. *et al.* Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science (80-. )*. **325**, 834–840 (2009).
58. Cimen, H. *et al.* Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* **49**, 304–311 (2010).
59. Pougovkina, O. *et al.* Mitochondrial protein acetylation is driven by acetyl-CoA from fatty acid oxidation. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3513–3522 (2014).
60. Thapa, D. *et al.* Acetylation of mitochondrial proteins by GCN5L1 promotes enhanced fatty acid oxidation in the heart. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **313**, H265–H274 (2017).
61. Fernandes, J. *et al.* Lysine Acetylation Activates Mitochondrial Aconitase in the Heart. *Biochemistry* **54**, 4008–4018 (2015).
62. Dittenhafer-Reed, K. E. *et al.* SIRT3 mediates multi-tissue coupling for metabolic fuel switching. *Cell Metab.* **21**, 637–646 (2015).
63. Grummer, R. R. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet. J.* **176**, 10–20 (2008).
64. Chung, Y., Brown, N. E., Martinez, C. M., Cassidy, T. W. & Varga, G. A. Effects of rumen-protected choline and dry propylene glycol on feed intake and blood parameters for Holstein dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* **92**, 2729–2736 (2009).
65. Delany, K. K. *et al.* Blood plasma concentrations of metabolic hormones and glucose during extended lactation in grazing cows or cows fed a total mixed



- ration. *J. Dairy Sci.* **93**, 5913–5920 (2010).
66. Armstrong, D. V. Heat Stress Interaction with Shade and Cooling. *J. Dairy Sci.* **77**, 2044–2050 (1994).
  67. Australia, D. Cool cows. Available at: <http://www.coolcows.com.au/go-on-alert/thi.htm>. (Accessed: 19th August 2017)
  68. Brosh, A. Heart rate measurements as an index of energy expenditure and energy balance in ruminants: A review. *J. Anim. Sci.* **85**, 1213–1227 (2007).
  69. Carriquiry, M., Weber, W. J., Fahrenkrug, S. C. & Crooker, B. A. Hepatic gene expression in multiparous Holstein cows treated with bovine somatotropin and fed n-3 fatty acids in early lactation. *J. Dairy Sci.* **92**, 4889–4900 (2009).
  70. Sakata, K. *et al.* University of Wisconsin solution versus modified Collins solution for canine heart preservation: An experimental study. *Int. J. Angiol.* **6**, 176–179 (1997).
  71. Nukala, V. N., Singh, I. N., Davis, L. M. & Sullivan, P. G. Cryopreservation of brain mitochondria : A novel methodology for functional studies. **152**, 48–54 (2006).
  72. Barrientos, A. & Assays, S. E. Evaluation of the Mitochondrial Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation System using Polarography and Spectrophotometric Enzyme Assays. 1–13 (2010).  
doi:10.1002/0471142905.hg1903s63.Evaluation
  73. Kuznetsov, A. V *et al.* Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* **3**, 965–976 (2008).
  74. Graciela, Â., Miragaya, M. H., Colenbrander, B. & Agu, A. Membrane changes during different stages of a freeze ± thaw protocol for equine semen cryopreservation. **59**, 1693–1705 (2003).
  75. Mardones, G. & Gonza, A. Selective plasma membrane permeabilization by freeze-thawing and immunofluorescence epitope access to determine the topology of intracellular membrane proteins. **275**, 169–177 (2003).
  76. Nichols, R. A., Wu, W. C., Haycock, J. W. & Greengard, P. Introduction of Impermeant Molecules into Synaptosomes Using Freeze / Thaw Permeabilization. (1989).
  77. Kuznetsov, A. V *et al.* Cryopreservation of mitochondria and mitochondrial function in cardiac and skeletal muscle fibers. **319**, 296–303 (2003).
  78. Kuznetsov, A. V. *et al.* Evaluation of Mitochondrial Respiratory Function in Small Biopsies of Liver. *Anal. Biochem.* **305**, 186–194 (2002).
  79. Gnaiger, E. in *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction* (eds. Dykens, J. A. & Will, I.) 326–353 (Wiley & Sons, Inc, 2008).
  80. Dimauro, I., Pearson, T., Caporossi, D. & Jackson, M. J. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res. Notes* **5**, 1 (2012).
  81. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
82. Spinazzi, M., Casarin, A., Pertegato, V., Salviasi, L. & Angelini, C. Assessment of mitochondrial respiratory chain enzymatic activities on tissues and cultured cells. *Nat. Protoc.* **7**, 1235 (2012).
  83. Janssen, A. J. M. *et al.* Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin. Chem.* **53**, 729–734 (2007).
  84. Riener, C. K., Kada, G. & Gruber, H. J. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 266–276 (2002).
  85. Porter, W. H., Yao, H. H. & Karounos, D. G. Laboratory and clinical evaluation of assays for beta-hydroxybutyrate. *Am. J. Clin. Pathol.* **107**, 353–358 (1997).
  86. Kuznetsov, A. V *et al.* Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers , tissues and cells. **3**, 965–976 (2008).
  87. Cassina, P. *et al.* Mitochondrial Dysfunction in SOD1 G93A -Bearing Astrocytes Promotes Motor Neuron Degeneration : Prevention by Mitochondrial-Targeted Antioxidants. *Neurobiol. Dis.* **28**, 4115–4122 (2008).
  88. Cassina, a & Radi, R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* **328**, 309–316 (1996).
  89. Salabei, J. K., Gibb, A. A. & Hill, B. G. Comprehensive measurement of respiratory activity in permeabilized cells using extracellular flux analysis. *Nat. Protoc.* **9**, 421–38 (2014).
  90. Unterluggauer, H., Garedew, A. & Hu, E. High-resolution respirometry – a modern tool in aging research. **41**, 103–109 (2006).
  91. Larsen, S., Wright-paradis, C., Gnaiger, E. & Helge, J. W. CRYOPRESERVATION OF HUMAN SKELETAL MUSCLE IMPAIRS. **33**, 169–175 (2012).
  92. Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C. & Castro, L. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1451–1464 (2002).
  93. Quijano, C. in *Nitric Oxide, Cell Signalling and Gene Expression* 99–143 (2005).
  94. Wagner, A. E. *et al.* Free radical scavenging and antioxidant activity of ascorbigen versus ascorbic acid: Studies in vitro and in cultured human keratinocytes. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 11694–11699 (2008).
  95. Grijalba, M. T. *et al.* Inhibition of membrane lipid peroxidation by a radical scavenging mechanism: a novel function for hydroxyl-containing ionophores. *Free Radic Res* **28**, 301–318 (1998).
  96. Bauman, D. E. in *Ruminant Physiology* 311–329 (CABI Publishing, 2000).
  97. Huber, K. *et al.* Metatypes with properly functioning mitochondria and anti-inflammation predict extended productive life span in dairy cows. *Sci. Rep.* **6**,

- 24642 (2016).
98. Sanyal, A. J. *et al.* Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* **120**, 1183–1192 (2001).
  99. Quijano, C., Trujillo, M., Castro, L. & Trostchansky, A. Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox Biol.* **8**, 28–42 (2016).
  100. Nir Markusfeld, O. What are production diseases, and how do we manage them? *Acta Vet Scand Suppl* **98**, 21–32 (2004).
  101. Meikle, A. *et al.* Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay : un enfoque multidisciplinario Advances in Knowledge of the Dairy Cow During the Transition Period in Uruguay : a Multidisciplinary Approach. *Agrociencia Uruguay* **17**, 141–152 (2013).
  102. Kossaibati, M. a. & Esslemont, R. J. The costs of production diseases in dairy herds in England. *Vet. J.* **154**, 41–51 (1997).
  103. Ingvarstsen, K. L., Dewhurst, R. J. & Friggens, N. C. On the relationship between lactational performance and health: Is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livest. Prod. Sci.* **83**, 277–308 (2003).
  104. Coiatelli, M. G. *et al.* An Attempt to Prevent Production Diseases in Dairy and ad hoc Treatment Cows by Intense Monitoring An attempt to prevent cows by intense monitoring and ad hoc treatment. (2016). doi:10.4081/ijas.2015.3918
  105. Fajardo, M. *et al.* Use of mixed rations with different access time to pastureland on productive responses of early lactation Holstein cows. *Livest. Sci.* **181**, 51–57 (2015).
  106. Chacko, B. K. *et al.* The Bioenergetic Health Index: a new concept in mitochondrial translational research. *Clin. Sci.* **127**, 367–373 (2014).
  107. Lima, F. S., Filho, M. F. S., Greco, L. F. & Santos, J. E. P. Effects of feeding rumen-protected choline on incidence of diseases and reproduction of dairy cows. *Vet. J.* **193**, 140–145 (2012).
  108. Pinotti, L. *et al.* Rumen-Protected Choline Administration to Transition Cows : Effects on Milk Production and Vitamin E Status. **21**, 18–21 (2003).
  109. Jayaprakash, G., Sathiyabarathi, M., Robert, M. A. & Tamilmani, T. Rumen-protected choline : A significance effect on dairy cattle nutrition. **9**, 837–841 (2016).
  110. Corbin, K. D. & Zeisel, S. H. Fatty Liver Disease and its Progression. **28**, 159–165 (2013).
  111. Hensley, K. *et al.* Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H(2)O(2) generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis* **21**, 983–989 (2000).
  112. Akude, E., Zhrebetskaya, E., Roy Chowdhury, S. K., Girling, K. & Fernyhough, P. 4-Hydroxy-2-Nonenal Induces Mitochondrial Dysfunction and Aberrant Axonal Outgrowth in Adult Sensory Neurons That Mimics Features of Diabetic Neuropathy. *Neurotox. Res.* **17**, 28–38 (2010).

113. Ceriani, M; Jasinsky, A; Oborsky, M; Mattiauda, D; Carriquiry, M. Effect of feeding a total mixed ration or pasture plus supplementation on milk production and composition during the lactation of multiparous Holstein cows. in *Sociedade Brasileira de Zootecnia* (2017).
114. Gross, J. J., Schwarz, F. J., Eder, K., van Dorland, H. A. & Bruckmaier, R. M. Liver fat content and lipid metabolism in dairy cows during early lactation and during a mid-lactation feed restriction. *J. Dairy Sci.* **96**, 5008–5017 (2013).
115. Pedernera, M. *et al.* Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture. *Vet. J.* **186**, 352–357 (2010).
116. Astessiano, A. L. *et al.* Metabolic and endocrine profiles and hepatic gene expression of Holstein cows fed total mixed ration or pasture with different grazing strategies during early lactation. *Acta Vet. Scand.* **57**, 1–12 (2015).
117. Niehoff, I.-D., Huther, L. & Lebzien, P. Niacin for dairy cattle: a review. *Br. J. Nutr.* **101**, 5–19 (2009).
118. Panda, S. *et al.* Role of niacin supplementation in dairy cattle: A review. *Asian J. Dairy Food Res.* **36**, 93–99 (2017).
119. Allen, M. S. & Bradford, B. J. Nutritional control of feed Intake in dairy cattle. *Rumin. Nutr. Symp.* 138–148 (2009).
120. Soares Melo, S., Meirelles, M. S., Jordão, A. A. & Vannucchi, H. Lipid peroxidation in nicotinamide-deficient and nicotinamide-supplemented rats. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **70**, 321–323 (2000).
121. Cettour-rose, P. *et al.* Europe PMC Funders Group The NAD + precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet induced obesity. **15**, 838–847 (2013).
122. Fu, W. J. *et al.* Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr.* **135**, 714–721 (2005).
123. Jornayvaz, F. & Shulman, G. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* **47**, 69–84 (2010).