



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

T E S I S

**“EFECTO DE LA DESESTABILIZACION DE LOS
SUPERCOMPLEJOS RESPIRATORIOS POR EFECTO DE UN
DETERGENTE EN MITOCONDRIAS DE HIGADO DE RATAS
DIABETICAS”**

PRESENTA:

ALAN ALEJANDRE BUITRÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

ASESOR DE TESIS:

DOCTOR EN CIENCIAS

CHRISTIAN CORTES ROJO



Morelia, Michoacán. Enero 2022

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo, así como también a la facultad de Químico farmacobiología de la misma institución y al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la misma Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo.

Un agradecimiento especial al asesor de mi tesis el D.C. Christian Cortes Rojo por su apoyo y guía en este trabajo, al igual que el de todos mis sinodales.

Agradezco de igual manera a los profesores de la institución por el conocimiento brindado que me han formado en la persona que soy ahora.

DEDICATORIA

A mi madre, Alejandra, por nunca rendirse, por su apoyo y amor incondicional. A mi abuelo Benito, a mi abuela Laura, mi hermana Itzel, que fueron eslavones clave en toda mi vida y proceso, y para todos los que siempre han creído en mí, esto es por ustedes.

RESUMEN

La diabetes mellitus es una alteración del metabolismo caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), causada por un defecto de la secreción o acción de la insulina. La insulina se produce en los islotes de Langerhans del páncreas. Se considera que una persona es diabética cuando la glucemia se sitúa por encima de 126 mg/dL en ayunas y de 200 mg/dL dos horas después de las comidas.

La diabetes es un factor que desencadena la enfermedad hepática no alcohólica (EHNA). Esta enfermedad se define como una entidad clínico-patológica que engloba un amplio espectro de lesiones en el hígado. Existe una fuerte asociación entre la severidad de la esteatosis y el riesgo de desarrollo de EHNA en función del grado de peroxidación lipídica. Además de ser una fuente de especies reactivas de oxígeno (ERO) a través de los sistemas oxidativos. La estructura de la mitocondria es crucial para su funcionamiento. La mitocondria es la principal fuente de adenosin trifosfato ATP en células eucariontes. La energía necesaria para la producción del ATP es generada por la cadena transportadora de electrones (CTE), la cual consta de cuatro complejos multiproteicos. En años recientes, ha crecido la evidencia de que los complejos de la CTE se asocian en proporciones variables formando ensamblajes supramoleculares denominados supercomplejos (SCs). Esto ha dado lugar a cuestionar el modelo clásico acerca de la organización individual de los complejos de la CTE

El aguacate es una fruta que contiene una amplia variedad de antioxidantes incluyendo, carotenoides, tocofenoles, clorofilas, vitaminas y ácido oleico (C18:1) como el principal ácido graso, constituyendo del 50-70% del total de ácidos grasos. Además de los efectos favorables de los ácidos grasos monoinsaturados del aguacate en el perfil lipídico sérico y riesgo cardiovascular así como también disminuye el daño en algunos componentes de la CTE de mitocondrias de hígado de ratas diabéticas al mejorar la resistencia al daño peroxidativo.

(Mitocondria, célula, aguacate, diabetes, supercomplejos)

ABSTRACT (*Diabetes, mitochondria, activity*)

Diabetes mellitus is an alteration of metabolism characterized by increased blood glucose levels (hyperglycemia), caused by a defect in the secretion or action of insulin. Insulin is produced in the islets of Langerhans of the pancreas. A person is considered diabetic when blood glucose is above 126 mg/dL fasting and 200 mg/dL two hours after meals.

Diabetes is a factor that triggers non-alcoholic liver disease (NASH). This disease is defined as a clinical-pathological entity that encompasses a wide spectrum of lesions in the liver. There is a strong association between the severity of steatosis and the risk of developing NASH depending on the degree of lipid peroxidation. In addition to being a source of reactive oxygen species (ROS) through oxidative systems.

The structure of the mitochondria is crucial for its functioning. The mitochondria are made up of two membranes, one outer and one internal. The outer membrane that separates the mitochondria from the cytoplasm is a lipid bilayer with channels called porins, which make this membrane more permeable. Mitochondria are the main source of adenosine triphosphate (ATP) in eukaryotic cells. The energy needed for atp production is generated by the electron transport chain (ETC), which consists of four multiprotein complexes. In recent years, evidence has grown that ETC complexes are associated in varying proportions forming supramolecular assemblies called supercomplexes (SCs). This has led to questioning the classical model about the individual organization of ETC complexes.

Avocado is a fruit that contains a wide variety of antioxidants including, carotenoids, tocopherols, chlorophylls, vitamins and oleic acid (C18:1) as the main fatty acid, constituting 50-70% of total fatty acids. In addition to the favorable effects of avocado monounsaturated fatty acids on serum lipid profile and cardiovascular risk in addition to also decreasing damage to some components of the ETC of liver mitochondria of diabetic rats by improving resistance to peroxidative damage.

INDICE.

	Pag.
1. INTRIDUCCION.....	8
1.1. Diabetes Mellitus.....	8
1.2. Tipos de Diabetes.....	8
1.3. Prevalencia.....	8
1.4. Complicaciones durante la Diabetes Mellitus (DM).....	9
1.5. Enfermedad Hepática No Alcohólica (EHNA).....	10
1.6. Teoría de los hits de la EHNA.....	10
1.7. Disfunción mitocondrial por Esteatohepatitis.....	11
1.8. Cadena Transportadora de Electrones (CTE).....	13
1.9. Especies Reactivas de Oxígeno (ERO).....	16
1.10. Supercomplejos Respiratorios.....	18
1.11. Evidencia de canalización entre complejo I y Complejo III.....	20
1.12. El aceite de aguacate.....	20
1.13. Papel de la cardiolipina sobre la actividad de los SCs mitocondriales.....	22
1.2. Tritón X-100.....	23
2. JUSTIFICACIÓN.....	25
3. HIPOTESIS.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. Objetivo general.....	27
4.2. Objetivos específicos.....	27
5. MATERIALES Y METODOS.....	28
5.1. Modelo experimental.....	28
5.2. Diseño experimental.....	28
5.3. Aislamiento de mitocondrias.....	29
5.4. Actividad de la NADH:citocromo c oxidoreductasa.....	29
5.5. Producción de ERO.....	30
6. RESULTADOS.....	31

6.1. Efecto del detergente Tritón X-100 sobre la actividad de la NADH: citocromo c oxidoreductasa.....	31
6.2. Efecto del detergente Tritón X-100 sobre la producción de ERO.....	35
7. DISCUSIÓN.....	36
8. CONCLUSIÓN.....	39
9. BIBLIOGRAFÍA.....	40

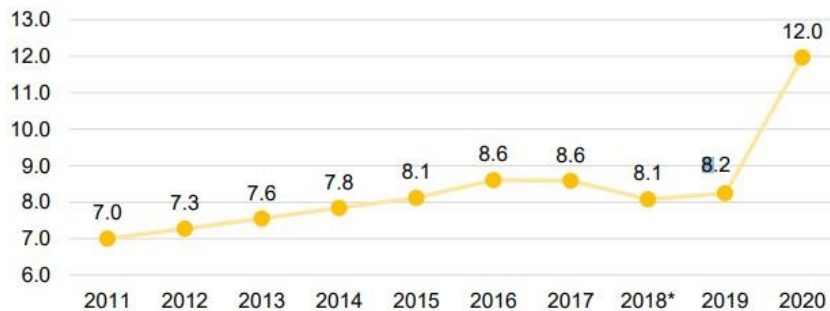
1. INTRODUCCION

1.1. Diabetes Mellitus. La diabetes mellitus es una alteración del metabolismo caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia), causada por un defecto de la secreción o acción de la insulina. La insulina se produce en los islotes de Langerhans del páncreas. En una persona con diabetes, la glucosa no puede ingresar a las células y su concentración sanguínea continúa elevándose. Como consecuencia, la falta de glucosa en los tejidos dependientes de insulina da lugar a una disminución en la producción de energía y se alteran sus funciones (*Frenk Mora, et al, 2011*).

1.2. Tipos de Diabetes. La diabetes tipo 1 (anteriormente denominada diabetes insulino dependiente o juvenil) se caracteriza por la ausencia de síntesis de insulina. La diabetes tipo 2 (llamada anteriormente diabetes no insulino dependiente o del adulto) tiene su origen en la incapacidad del cuerpo para utilizar eficazmente la insulina debido a que se desarrolla una resistencia a las acciones de esta hormona, no obstante su unión a su receptor en los tejidos periféricos. Esto a menudo es consecuencia del exceso de peso o la inactividad física.

La diabetes gestacional corresponde a una hiperglucemia que se detecta por primera vez durante el embarazo. (*OMS. 2016*)

1.3. Prevalencia de la diabetes. En la actualidad, México es uno de los países con mayor número de personas con diabetes mellitus en el mundo. La diabetes es actualmente la tercera causa de mortalidad en México tanto a nivel global, como entre los hombres, en las mujeres ocupa el segundo lugar. En 2011 hubo una tasa del 7.0 en defunciones por diabetes en el país, llegando a una tasa del 12.0 de mortalidad para el año 2020. (*Esquema 1*) (*INEGI,2020*)



Esquema 1. Tasa de defunciones registradas por diabetes mellitus por cada 10 000 habitantes 2011 – 2020 (INEGI. 2020)

Las mayores tasas por entidad federativa de residencia habitual por cada 10 000 mil habitantes se presentan en Tabasco con 17.6, Tlaxcala con 16.0 y Ciudad de México con 15.8, mientras que las más bajas se presentan en Aguascalientes con 6.1, Baja California Sur con 6.3 y Quintana Roo con 6.8.

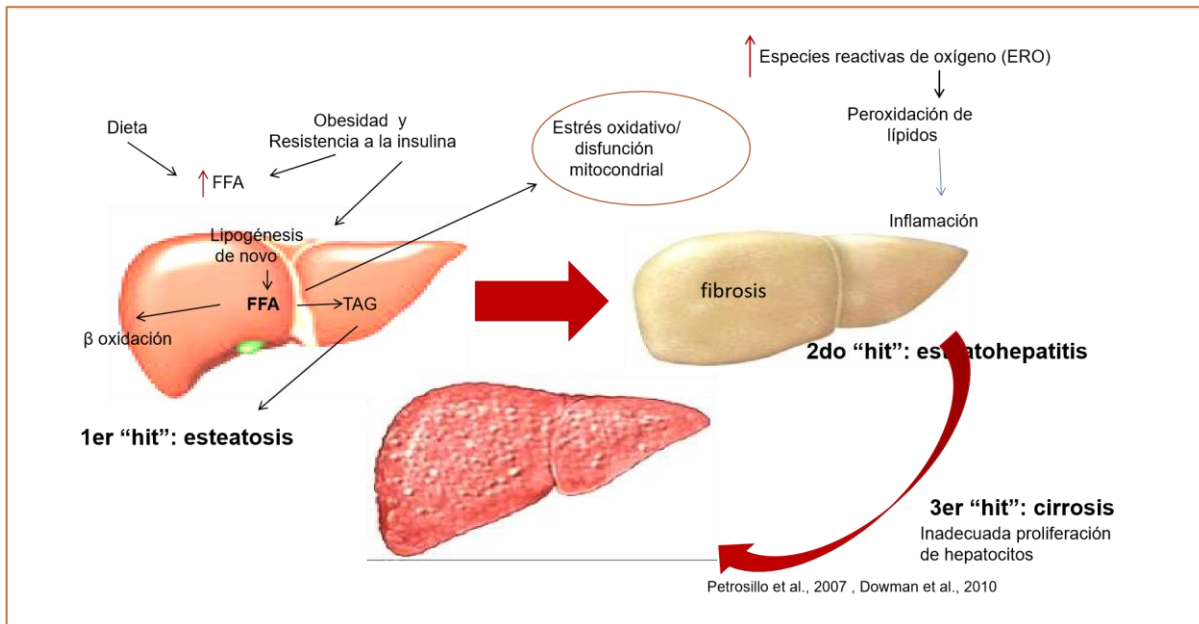
1.4. Complicaciones de la Diabetes Mellitus (DM). Bajo el término de complicaciones crónicas de la DM se agrupa un conjunto de procesos causados a largo plazo por las alteraciones metabólicas características de este padecimiento. Antes del descubrimiento de la insulina, los diabéticos jóvenes habitualmente morían en poco tiempo por complicaciones agudas derivadas de la hiperglucemia, antes de poder desarrollar complicaciones crónicas (López de la Torre, 2001).

La hiperglucemia es el efecto común de la diabetes descontrolada, con el paso del tiempo la enfermedad puede causar daños, disfunción e insuficiencia de diversos órganos, las complicaciones de la diabetes son potencialmente devastadoras y a menudo son una amenaza para la vida. Las complicaciones diabéticas incluyen infecciones de la piel, la enfermedad coronaria, el daño cardiaco, la arteriosclerosis, la nefropatía, la retinopatía, el pie diabético, la neuropatía, la hiperinsulinemia, así como el hígado graso no alcohólico (Giacco et al., 2010; Raza et al., 2011; FID, 2015).

1.5. Enfermedad Hepática No Alcohólica (EHNA). La diabetes es un factor que desencadena la EHNA. Esta enfermedad se define como una entidad clínicopatológica que engloba un amplio espectro de lesiones en el hígado. Una de ellas es la esteatosis hepática no alcohólica, la cual es una acumulación excesiva de grasa en el hígado y un deterioro de las células hepáticas aun en la ausencia del consumo de alcohol. La EHNA puede progresar de esteatosis a esteatohepatitis, cirrosis y carcinoma hepatocelular (*Zeng Lu et al, 2014*)

En la actualidad, se considera que el principal factor patogénico de la esteatosis hepática es el incremento del flujo y de la captación hepática de ácidos grasos libres (AGL) circulantes procedentes de una lipólisis periférica excesiva, todo ello como consecuencia de la resistencia a la insulina (RI) en el tejido adiposo. Otros factores que pueden contribuir a la acumulación de grasa en el hígado son el aumento de la lipogénesis hepática, la disminución de la β -oxidación mitocondrial de los AGL, así como un incremento insuficiente en la secreción hepática de triglicéridos (Coolestasis). (*García Monzón.,2011*)

1.6. Teoría de los hits de la EHNA. La teoría más aceptada en la actualidad para explicar la patogénesis de la EHNA se denomina teoría de los hits (Esquema 2). El primer hit consiste en que cambios en la dieta, la obesidad y la resistencia a la insulina, elevan los niveles de ácidos grasos libres tanto en el interior como al exterior del hígado, los cuales empiezan a ser almacenados en forma de triacilglicéridos (TAG), estableciéndose así la esteatosis o el “primer hit”. Esto da lugar a un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) en la mitocondria, provocando estrés oxidativo y disfunción mitocondrial. Las ERO inducen la peroxidación de los lípidos acumulados en el primer hit, y los productos finales de dicho proceso tales como el 4-hidroxinonal (4-HNE) inducen inflamación, estableciéndose así la esteatohepatitis o “el segundo hit”. Lo anterior conduce a una inadecuada proliferación de hepatocitos y el desarrollo de fibrosis, desarrollándose cirrosis o el “tercer hit”. (*Bulum et al., 2011; Dowman et al., 2015*).



Esquema 2.- Teoría de los hits. Tomado y modificado de Bulum et al., 2011; Dowman et al., 2015. FFA: ácidos grasos libres; TAG: triacilglicéridos.

1.7. Disfunción mitocondrial en la esteatohepatitis. La β -oxidación mitocondrial es la ruta principal de oxidación de ácidos grasos. Las coenzimas reducidas $FADH_2$ y $NADH$ generados en este proceso y en la oxidación del Acetil-CoA en el ciclo de Krebs donan sus electrones a la cadena de transporte de electrones (CTE), produciéndose ATP por la fosforilación del ADP por la F_1F_0 ATP sintasa, la cual es propulsada por el retorno a la matriz de los protones que los complejos respiratorios bombean de la matriz al espacio intermembranal. Sin embargo, los electrones provenientes de la oxidación del $NADH$ o el $FADH_2$ pueden fugarse de los sitios redox de los complejos de la CTE, reduciendo al oxígeno en radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y otras ERO. Las ERO producidas en este y otros procesos son neutralizadas por sistemas enzimáticos tales como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (Gpx), y por antioxidantes exógenos tales como las vitaminas E y C. Se ha encontrado disfunción mitocondrial en pacientes con EHNA, así como anomalías ultraestructurales, actividad reducida de los complejos de la CTE, fosforilación oxidativa deficiente y un descenso en la

concentración de ATP intracelular, lo que compromete la respuesta de la célula ante cualquier tipo de daño celular (*Buqué, et al., 2008*).

Se puede considerar que las causas de una menor capacidad de producir ATP son dos: 1) la interrupción o bloqueo de la CTE en alguno de sus complejos enzimáticos, lo que provoca una disminución en el transporte de electrones a las moléculas de oxígeno; 2) la disipación del gradiente de protones a ambos lados de la membrana mitocondrial interna que impulsa a la ATP sintasa. Al igual que otros tipos celulares, los hepatocitos pueden desarrollar mecanismos adaptativos para mantener un flujo de electrones similar al de un tejido normal. Unos mecanismos implican el aumento del tamaño de las mitocondrias y de las crestas mitocondriales, lo que da lugar a un aumento en la síntesis de las proteínas de los complejos respiratorios y en la disponibilidad de la coenzima Q, mientras que otros implican la activación del proceso de biogénesis mitocondrial (*Buqué, et al., 2008*).

En un hepatocito esteatósico con mitocondrias disfuncionales, una parte sustancial de los ácidos grasos se metabolizan por los sistemas oxidativos peroxisomal y mícrosomal. Los peroxisomas realizan varios ciclos de la β -oxidación para acortar la longitud de los ácidos grasos de cadena larga y muy larga, eicosanoides y ésteres de CoA (Coenzima A) de intermediarios de los ácidos biliares, produciendo acetil-CoA y H_2O_2 . (*Buqué, et al., 2008*)

Existe una fuerte asociación entre la severidad de la esteatosis y el riesgo de desarrollo de EHNA en función del grado de peroxidación lipídica. Además de ser una fuente de ERO a través de los sistemas oxidativos, son un sustrato idóneo para la generación de aldehídos reactivos. Estos productos tienen capacidad para bloquear la síntesis de nucleótidos y proteínas y aumentar el factor de crecimiento tumoral β_1 , que promueve la formación de cuerpos de Mallory. Además, resultan ser potentes quimioatrayentes de células inflamatorias y activadores de células estrelladas, pudiendo perpetuar la respuesta inflamatoria al activar la secreción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión como ICAM-1, Eselectina y P-selectina. Todos estos fenómenos pueden producir muerte celular por apoptosis y necrosis, inflamación y fibrosis, que son las huellas histológicas de la EHNA. El conjunto de evidencias es tal que es ampliamente aceptada la idea de

que el daño oxidativo masivo causado por aldehídos reactivos es la base del tránsito a esteatohepatitis. (Buqué, et al., 2008)

Los niveles elevados de ácidos grasos intrahepáticos proveen una fuente de estrés oxidativo que en su mayor parte puede ser responsable de la progresión de esteatosis a esteatohepatitis y cirrosis. La peroxidación de estos lípidos lleva a la muerte celular con el depósito hialino de Mallory y la consecuente síntesis de colágeno. La inducción de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa y la interleucina 8 producen la muerte del hepatocito. (D'Angelo, et al. 2009).

La deficiencia de enzimas de la β -oxidación ha sido reconocida como una importante causa de esteatosis micro vesicular y esteatohepatitis. La pérdida de estas enzimas también provoca una hiperactividad del receptor alfa activado por proliferadores peroxisomales (PPAR- α). Estos están implicados en la síntesis de la proteína 2 hepática, la cual se encuentra sobreexpresada en el hígado de los pacientes con EHNA. (D'Angelo, et al. 2009).

1.8. Cadena de transporte de electrones (CTE). Durante la EHNA se produce un exceso de ERO debido a disfunción mitocondrial (Giacco et al, 2010; Dowman et al., 2015). La estructura de la mitocondria es crucial para su funcionamiento. La mitocondria se compone de dos membranas, una externa y una interna. La membrana externa que separa a la mitocondria del citoplasma es una bicapa lipídica con unos canales denominados porinas, que hacen que esta membrana sea más permeable, permitiendo el paso de moléculas menores de 10 KDa y el paso de moléculas hidrofílicas a través de ella. Debido a la poca selectividad de la membrana externa, el espacio intermembranal es químicamente similar al citoplasma. (Pérez Martos, 2013).

La membrana interna, que define el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial, es mucho más impermeable que la membrana externa. Esta impermeabilidad, necesaria para la generación del gradiente de protones, impide el paso de iones, por lo que la entrada de proteínas, sustratos e iones a la mitocondria depende de la presencia de proteínas de transporte específicas, que aprovechan el gradiente de protones y el ATP para llevar a cabo su función (Pérez Martos, 2013).

La mitocondria es la principal fuente de ATP en células eucariontes. La energía necesaria para la producción del ATP es generada por la CTE, la cual consta de cuatro complejos multiproteicos (Esquema 3):

➤ **Complejo I: NADH deshidrogenasa.** Es una proteína en forma de L, es el más grande de los complejos al estar formado por 45 subunidades, de las cuales, 14 están involucradas en su catálisis, mientras que el resto, son consideradas subunidades accesorias. Contiene un flavin mononucleótido (FMN) el cual está involucrado en la oxidación del NADH y 8 centros hierro-azufre (2 binucleares y 6 tetranucleares) los cuales transfieren los electrones hasta el sitio de unión a ubiquinona (*Wirth et al. 2016*). El NADH es el donador de electrones, el FMN los acepta y se reduce a FMNH₂. Se transfieren los electrones desde el FMNH₂ a los centros Fe-S, posteriormente los electrones se transfieren a la ubiquinona (*Mckee et al., 2003*).

El complejo I tiene por función oxidar las moléculas de NADH que se producen en el catabolismo. La energía producida por esta reacción se utiliza para translocar protones desde la matriz hacia el espacio intermembranal para la generación de un gradiente electroquímico, mientras que los electrones son transferidos al complejo III. (*Wirth et al., 2016*)

➤ **Complejo II: Succinato deshidrogenasa.** Es la única enzima del ciclo de Krebs unida a la membrana y cuya totalidad de subunidades están codificadas en el núcleo. Cataliza la oxidación del succinato a fumarato, transfiriendo los electrones del FADH₂ hacia la ubiquinona. Esta es la única enzima de la CTE que no transloca protones (*Pardo et al., 2001*).

➤ **Complejo III: ubiquinona:citocromo c oxidorreductasa.** Está constituido por dos citocromos de tipo *b*, un citocromo *c*₁ y un centro Fe-S. Se encarga de transferir dos electrones desde un quinol de relativamente bajo potencial redox a una molécula de citocromo *c* y bombea cuatro protones hacia el espacio intermembranal por cada par de electrones transferidos a dos moléculas de citocromo *c*. La transferencia de los electrones comienza con la oxidación bifurcada del ubiquinol por la proteína Fe-S del complejo III, posteriormente, esta proteína reducida transfiere un electrón al citocromo *c*₁, el cual lo transfiere luego al citocromo *c*. El electrón restante se transfiere al citocromo *b* a través de sus grupos hemo *b* de

alto y bajo potencial. Durante este proceso, se traslocan de manera neta 4 protones por cada par de electrones transferidos al citocromo *c* usando la energía de las reacciones redox que ocurren en el complejo. (*Trumpower, 1990; Mckee, 2003*)

➤ **Complejo IV: Citocromo *c* oxidasa.** Posee entre seis y trece subunidades, dependiendo de la especie. Puede tener también dos átomos de cobre, además de los átomos de hierro de los hemos de los citocromos *a* y *a₃* (*Trumpower, 1990; Mckee, 2003*). Es el aceptor final de electrones de la CTE y transloca protones hacia el espacio intermembranal. Es capaz de formar agua metabólica al utilizar al oxígeno molecular como aceptor final de electrones.

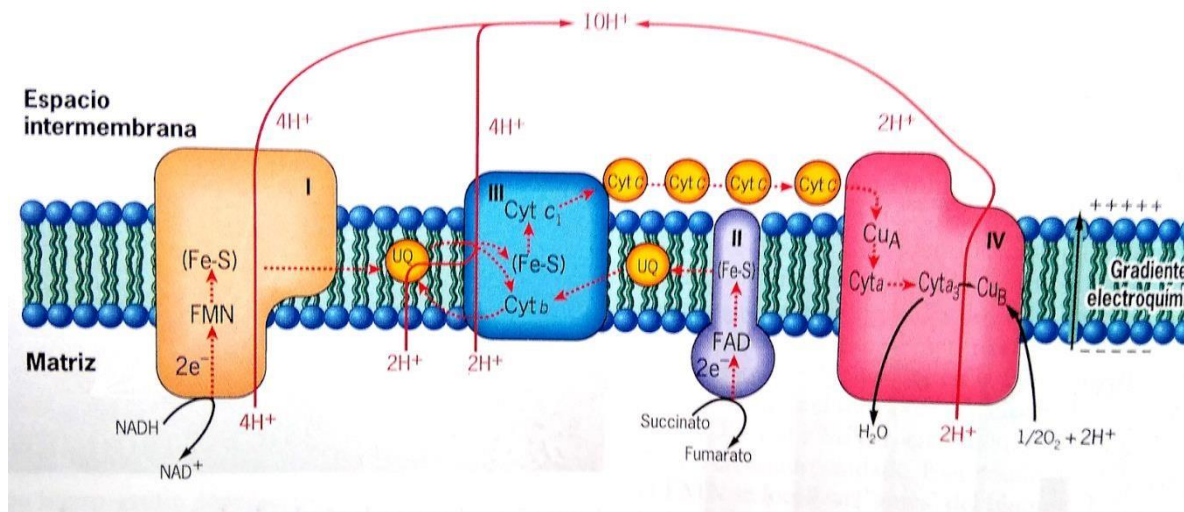
➤ **F₁F₀-ATP sintasa.** Está formada por dos componentes: el componente F₀, que contiene tres tipos de proteínas integrales de membrana, designadas a, b y c. Las subunidades a y b están rígidamente concentradas entre sí, mientras que la subunidad c compone un anillo con forma de rosquilla en el plano de la membrana. La porción de la subunidad F₁ es un complejo soluble en agua de polipéptidos distintos con la composición $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ (*Jarvey et al., 2006*). Esta enzima funciona en forma reversible: puede sintetizar ATP usando el gradiente electroquímico de H⁺ generado por la CTE y puede hidrolizar ATP para bombear protones contra un gradiente electroquímico (*Voet et al., 2007*).

La CTE está conformada también por componentes esenciales para su funcionamiento como son:

- **Ubiquinona:** también conocida como Coenzima Q, es una molécula soluble en solventes orgánicos, se encuentra en la membrana interna mitocondrial y puede sufrir cambios redox en dos electrones (*Jiménez, 2003*). Se reduce de manera sucesiva a ubisemiquinona (UQH[•]) y finalmente a ubiquinol (UQH₂). Acepta un par de electrones del NADH o el FADH₂ a través del complejo I y II, respectivamente. (*Vasudevan., 2011*).

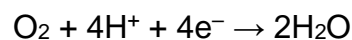
- **Citocromos:** los citocromos son proteínas que contienen porfirinas que tienen ligado un átomo de hierro. Existen citocromos que son hidrosolubles, otros que son liposolubles. Otra peculiaridad es que existen citocromos móviles como por ejemplo el citocromo *c*, aunque la gran mayoría funcionan asociadas a macromoléculas como pueden ser los complejos III y IV.

Los electrones se transfieren desde los equivalentes reductores NADH o FADH₂ hacia el aceptor final de electrones, el oxígeno, a través de los citocromos en el siguiente orden: *b*, *c*₁, *c*, *a* y *a*₃ (Esquema 3). Los diversos citocromos tienen grupos hemo y ligandos axiales ligeramente distintos, lo cual genera diferentes ambientes para el ion Fe, por ello, cada citocromo tiene un potencial de reducción diferente, o tendencia a aceptar un electrón; una propiedad importante que dicta el flujo unidireccional de los electrones a lo largo de la cadena. (Karp, 2005).



Esquema 3. Cadena de transporte de electrones mitocondrial (Karp, 2005).

1.9. Especies reactivas de oxígeno. En los organismos aerobios, el oxígeno es el último aceptor de los electrones en la CTE. El complejo IV reduce completamente el oxígeno a agua por la adición de cuatro protones y 4 electrones.



A esta reacción también se le conoce como reducción tetravalente del oxígeno, indicando que este complejo reduce completamente al oxígeno y no libera especies parcialmente reducidas. Acoplado al proceso de respiración o consumo de

oxígeno, las células sintetizan la mayor parte del trifosfato de adenosina (ATP) que se requiere para los diversos procesos celulares. A estos dos procesos acoplados, la transferencia de electrones y la síntesis de ATP a partir del ADP, se le conoce como fosforilación oxidativa.

Aunque el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios, llega a ser tóxico a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones a la concentración normal. A este hecho contrastante se le conoce como la “paradoja del oxígeno”. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas especies, como posteriormente se explicará, son más reactivas que el oxígeno en su estado basal de triplete, que es la molécula de oxígeno que transferirá energía durante la colisión entre el oxígeno singulete o triplete excitado y este para generar oxígeno singulete basal (*Sandoval Altamirano, 2012*). Las principales especies son: **(a)** las que se producen por la ruptura o la excitación del oxígeno (oxígeno atómico, ozono y el oxígeno singulete) y **(b)** las parcialmente reducidas (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) (*Cárdenas et al., 2006*).

1.9.1 Producción de ERO en la diabetes

La diabetes es una enfermedad que se caracteriza por un aumento en la generación de ERO, lo cual comienza en etapas muy tempranas de la enfermedad y aumenta mientras progresa la misma (*Wiernsperger, 2009*). Las complicaciones de esta enfermedad están asociadas a un incremento en el estrés oxidativo debido al constante estado de hiperglucemia. En mitocondrias de hígado de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) se ha encontrado una disminución en la actividad de la CTE y una alta producción de ERO (*Ortiz-Ávila et al., 2013*).

Durante la diabetes, la sobreproducción mitocondrial de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se ha relacionado con la disminución de los sistemas antioxidantes al activar distintas vías que están relacionadas con el aumento del estrés oxidativo (*Rolo et al., 2006*). Estos mecanismos convergen en la sobreproducción mitocondrial de $O_2^{\cdot-}$, haciendo que la hiperglucemia estimule un incremento del potencial transmembranal mitocondrial, con bloqueo del transporte de electrones, aumento de la vida media de la ubisemiquinona y reducción parcial del O_2 (*Sánchez et al., 2009*).

Dentro de los mecanismos a través de los cuales la hiperglucemia puede inducir daño se encuentra el aumento de la formación de sorbitol, seguido de una disminución de la poza de NADPH, lo que afecta la regeneración de glutatión reducido (GSH), por lo que se incrementa la actividad de la vía de los polioles. Por otro lado, en condiciones de hiperglucemia, existe una alta producción de productos finales de glicosilación avanzada (AGE), que causan gran deterioro ya que modifican proteínas intracelulares, proteínas que son componentes de la matriz extracelular y proteínas plasmáticas, lo que promueve la producción de ERO.

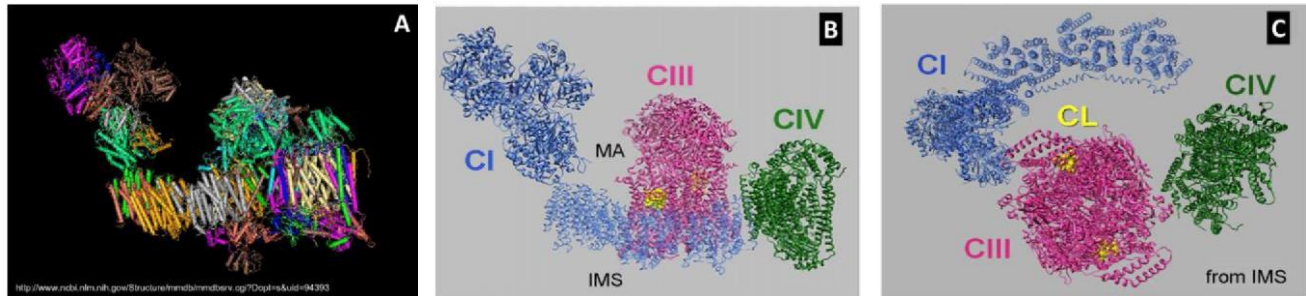
(González, 2009).

1.10. Supercomplejos respiratorios. En años recientes, ha crecido la evidencia de que los complejos de la CTE se asocian en proporciones variables formando ensamblajes supramoleculares denominados supercomplejos (SCs). Esto ha dado lugar a cuestionar el modelo clásico acerca de la organización individual de los complejos de la CTE (Lenaz. *et al*, 2016).

En el “Modelo de colisión al azar”, aceptado por la mayoría de los investigadores en la década de los 80’s del siglo pasado, la CTE se describe como complejos respiratorios integrados en la membrana interna mitocondrial por separado, entidades libres flotantes, que usan ubiquinona y citocromo c como portadores de alta difusión de electrones.

Una demostración clara de la presencia de ensamblajes respiratorios provino durante la década pasada de investigaciones en mitocondrias de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y de mamíferos. En particular, la electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes (BN-PAGE) de mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae* solubilizadas en digitonina, las cuales no poseen complejo I, reveló dos bandas con masas aparentes de aproximadamente 750 y 1000 KDa conteniendo las subunidades de los complejos III y IV. Interacciones similares de SCs fueron investigadas en mitocondrias de corazones bovinos: interacciones Complejo I-III fueron aparentes con una estequiometría $C_{1}C_{III2}$, las cuales también se encontraron asociadas con el complejo IV con estequiometrias $C_{1}C_{III2}C_{IV1}$ (Esquema 4). (Lenaz. *et al*, 2016)

En este último SC, la ubiquinona se ubica en frente del complejo III con una separación de 13 nm dentro del núcleo de la membrana del SC. La ubiquinona posiblemente viaja a través de este espacio, el cual esta presuntamente lleno de lípidos membranales. Se reportó también la presencia de muchos fosfolípidos en los SCs de mitocondrias de mamíferos purificadas, siendo el principal el fosfolípido cardiolipina. (*Lenaz. et al, 2016*)



Esquema 4. Supercomplejo I₁III₂IV₁ de mitocondrias de bovino (A) Modelo obtenido por criomicroscopía electrónica. (B) Vista lateral; (C) vista desde el espacio intermembrana (IMS), mostrando dos moléculas de cardiolipina (CL en amarillo) en la cavidad de cada monómero de complejo III. MA denota la matriz mitocondrial. (Fuente: *Lenaz. et al, 2016*).

Se cree que la organización en SCs sirven para favorecer el flujo de electrones a través de la CTE, para que ésta sea más eficiente, aumentar la velocidad a la cual se transportan los electrones y que menos electrones se fuguen de la cadena para disminuir la formación de ERO. La formación de estos supercomplejos es dependiente de la cardiolipina. (*Lenaz. et al, 2016.*)

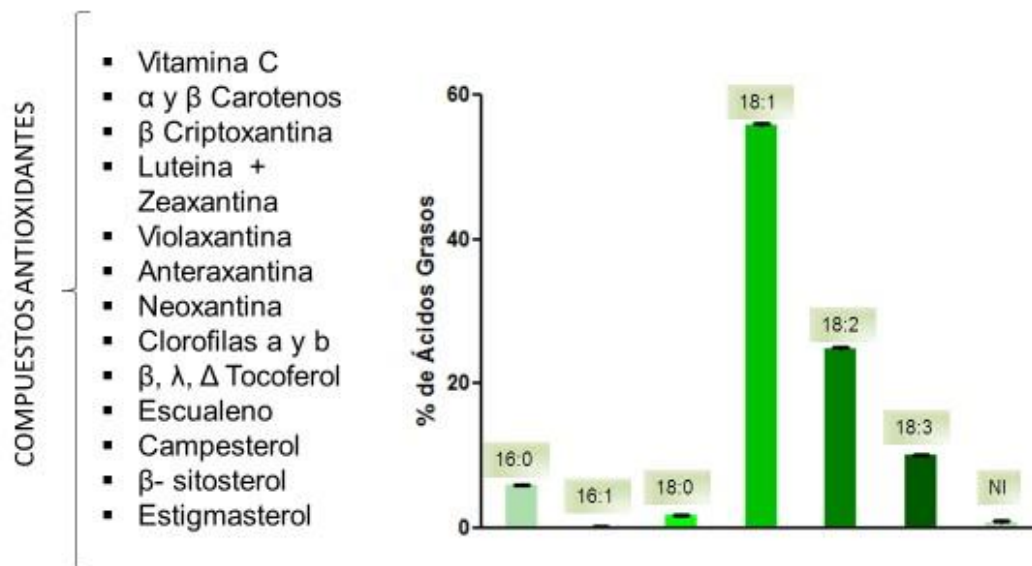
1.11. Evidencia de canalización de electrones entre los complejos I y III.

Inmediatamente después del descubrimiento de los SCs, se propuso que la consecuencia natural de estos ensamblajes es la canalización de los sustratos o la catálisis mejorada en la transferencia de electrones entre los complejos.

La canalización del sustrato es la transferencia directa de un intermediario entre los sitios activos de dos enzimas que catalizan reacciones consecutivas. En el caso de la transferencia de electrones, esto significa la transferencia directa de electrones entre dos enzimas consecutivas por reducción sucesiva y reoxidación del intermediario sin su difusión en el medio (*Lenaz. et al, 2016*).

1.12. El aceite de aguacate. El aguacate (*Persea americana Mill*) es fuente de MUFA (Ácidos Grasos Monoinsaturados) con algunos efectos potenciales benéficos para la salud tales como disminución de triacilglicéridos en sangre (*López Ledesma et al. 1996*) y el mejoramiento de la absorción de antioxidantes de la dieta (*Unlu et al. 2005*). En cuanto al aporte nutricional, una porción de 100g de aguacate contiene 23g de lípidos mayormente ácidos grasos monoinsaturados, 2g de proteína, 1g de carbohidratos y no contiene colesterol (*Morillas-Ruiz et al., 2012*). También contiene algunos antioxidantes carotenoides incluyendo luteína, anteraxantína, neoxantína y violaxantína (*Ashton et al. 2006*).

El aguacate es una fruta que contiene una amplia variedad de antioxidantes incluyendo, carotenoides, tocofenoles, clorofilas, vitaminas y ácido oleico (C18:1) como el principal ácido graso, constituyendo del 50-70% del total de ácidos grasos. Además de los efectos favorables de los ácidos grasos monoinsaturados del aguacate en el perfil lipídico sérico y riesgo cardiovascular (*Alvizouri-Muñoz et al. 1992; Carranza et al. 1995*), (Esquema 5) el aceite de aguacate también disminuye el daño en algunos componentes de la CTE de mitocondrias de hígado de ratas diabéticas al mejorar la resistencia al daño peroxidativo. (*Ortiz Ávila et al, 2013, 2015.*)



Esquema 5. Componentes del aceite de aguacate. Ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), ácido linoléico (18:3), NI: no identificados. Fuente: *Dreher and Davenport, 2013; Ortiz-Ávila et al., 2015.*

Se han realizado estudios en donde se ha mostrado que el aceite de aguacate contrarresta algunos defectos responsables de niveles elevados de producción de ERO en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas, tales como la pérdida de citocromos $c+c_1$ y un transporte defectuoso de electrones en el complejo III, además de un aumento de la resistencia de ese complejo al efecto nocivo del estrés oxidativo *in vitro* inducido por Fe^{2+} , un generador de radicales OH^\square (*Ortiz Ávila et al.2013*).

Se ha observado que la actividad del complejo I en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas disminuyó casi un 50% respecto a la actividad de mitocondrias de ratas sanas, lo cual fue contrarrestado por la administración de aceite de aguacate (*Ortiz Ávila et al, 2015*). Con respecto a las ERO, su velocidad de producción se incrementó en el complejo I de mitocondrias de ratas diabéticas, mientras que la administración del aceite de aguacate disminuyó la producción de ERO al nivel de las mitocondrias de animales sanos.

1.13. Papel de la cardiolipina sobre la actividad de los SCs mitocondriales. Con relación a la EHNA, se ha demostrado que la actividad del complejo I disminuye debido a una pérdida de cardiolipina y a un aumento en su peroxidación, de tal modo que la restitución de la cardiolipina a través de la incubación de las mitocondrias con liposomas de cardiolipina restaura su actividad (*Petrosillo et al. 2007*). En ratas diabéticas, se ha observado que la adición de cardiolipina restauró la actividad del complejo I en mitocondrias de hígado, lo cual sugiere que en la diabetes, el complejo I pierde su actividad debido a alteraciones en este fosfolípido (*Hernández-Esparza et al., 2020*). Por otro lado, se observó que el tratamiento con cardiolipina disminuyó la actividad del complejo I de ratas sanas debido a que, en las mitocondrias sanas, al no haber déficit de cardiolipina, el exceso de cardiolipina adicionada exógenamente podría estar ejerciendo un efecto caustico, induciendo alteraciones estructurales en la membrana, responsables de la disminución de la actividad del complejo I. En contraparte, al no suceder lo mismo en las mitocondrias de ratas diabéticas, esto apoya la idea de que las últimas son deficientes en cardiolipina y esto contribuye a la disminución de la actividad del complejo. (*Hernández-Esparza, 2017*).

En contraste con lo observado en mitocondrias de ratas diabéticas, la adición de cardiolipina a las mitocondrias diabéticas que consumían aceite de aguacate, disminuyó la actividad del complejo I de una manera similar a lo observado en las mitocondrias del grupo de ratas sanas, lo cual sugiere que la administración del aceite de aguacate contrarrestó la disminución de la actividad del complejo I inducida por la diabetes al atenuar las alteraciones inducidas por la diabetes en el contenido o la peroxidación de la cardiolipina. (*Hernández Esparza, 2017*).

1.2 TRITON X-100

Los surfactantes polioxietilênicos, de amplia aplicación en el campo de la tecnología químico-farmacéutica, se han utilizado igualmente en estudios de disociación y reconstitución de biomembranas.

Los detergentes de la serie TRITON X son surfactantes no iónicos cuya molécula presenta un polo hidrófobo.

El Triton X-100 se ha utilizado en la solubilización de membranas de eritrocitos, en la extracción de proteínas integrales, receptores, antígenos, enzimas de membrana, etc. Comparado con los detergentes aniónicos y catiónicos el Triton X-100 es un detergente calificado como "suave" por no producir generalmente cambios conformacionales drásticos ni efectos desnaturalizantes en las proteínas. La ausencia de carga de su grupo hidrófilo y el volumen y rigidez del grupo hidrófobo dificulta su penetración en las grietas de la superficie de la proteína, por lo que se conserva generalmente la estructura cuaternaria en las proteínas oligoméricas de membrana, aunque también se han descrito algunos casos de pérdida de actividad y cambios. (*Garcia-Gurtubay, 2015*).

Estudios de la permeabilidad de capas lipídicas negras en presencia de detergentes y de la unión de anfífilos fluorescentes y anestésicos a los liposomas, sugieren que, cuando se añade una pequeña cantidad de detergente a los liposomas, parte de él se incorpora a la estructura de la bicapa sin romperla. (*GarciaGurtubay, 2015*).

Una vez saturada la bicapa, la posterior adición de más detergente provoca la formación de micelas mixtas que estarán saturadas de fosfolípido.

Cuando se añaden cantidades crecientes de detergente a una suspensión de liposomas preparados con fosfolípidos puros, el proceso de solubilización comprende las siguientes fases:

- 1.- Unión del detergente que se incorpora a la bicapa provocando la alteración de sus propiedades físicas.
- 2.- Transición de fase laminar-micelar cuando la bicapa esté saturada de detergente. Se forman micelas mixtas.

3.- Después de que la transición de fase se ha completado, la relación detergente/fosfolípido aumenta, y el tamaño de las micelas mixtas disminuye.

Si la concentración de detergente libre se eleva por encima de la necesaria para saturar los centros de alta afinidad de enlace de la seroalbúmina, se produce la unión del detergente sobre otros centros de la proteína en forma cooperativa, al mismo tiempo que se producen cambios conformacionales y desnaturalización. *(Garcia-Gurtubay, 2015).*

A medida que aumenta la concentración de detergente, una vez sobrepasada la concentración crítica, se produce la unión de cantidades crecientes del mismo a la membrana hasta llegar a una saturación análoga a la producida en bicapas lipídicas, y a partir de ahí comienza la desintegración de la membrana con desaparición de su estructura laminar lo que sería equivalente a su "solubilización". Este concepto para membranas es empírico ya que mientras en sistemas lipídicos puros la solubilización se alcanza con la formación de micelas mixtas, la complejidad del proceso en las membranas obliga a adoptar otros criterios basados en el decrecimiento de la turbidez de una suspensión de membranas, el incremento de material no sedimentable y la desaparición de imágenes laminares continuas en observaciones al microscopio electrónico. *(Garcia-Gurtubay, 2015).*

Cuando la concentración del detergente se eleva por encima de la necesaria para producir la transición de fase se produce la separación de los lípidos y las proteínas. En este momento la concentración de detergente será tal que los lípidos estarán solubilizados en forma de micelas mixtas y las proteínas tendrán saturada su capacidad de unión con el detergente. La cantidad de detergente necesaria dependerá de su naturaleza y de la composición de la membrana. La deslipidización puede considerarse como una eliminación progresiva de lípidos de los complejos lipoproteína-detergente formados durante la desintegración de la membrana. Al aumentar la concentración del detergente los lípidos unidos a proteínas son intercambiados por moléculas del detergente y trasladados a micelas mixtas lípido-detergente resultando así la separación de los lípidos y las proteínas. *(GarciaGurtubay, 2015).*

2. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es la tercera causa de mortalidad en México, la cual desencadena la disfunción de diferentes órganos entre ellos el hígado. Dentro de las alteraciones hepáticas más graves asociada a la diabetes se encuentra la EHNA, para la cual actualmente no existen tratamientos farmacológicos

Asimismo, se ha descrito que la diabetes ocasiona disfunción mitocondrial al inhibir la actividad de los complejos de la CTE, lo que aumenta la producción de ERO, las cuales están involucradas en los mecanismos de daño a los distintos órganos blanco de la diabetes, incluido el hígado.

En estudios previos, en modelos animales se demostró que el aceite de aguacate disminuye la sensibilidad de las membranas mitocondriales al daño oxidativo y contrarresta la inhibición de los complejos de la CTE inducida por la diabetes y, por lo tanto, disminuye la producción de ERO.

Sin embargo, se desconoce si los efectos benéficos del aceite de aguacate sobre las actividades de los complejos de la CTE en ratas diabéticas están relacionados con la preservación de la función de los supercomplejos respiratorios.

3. HIPOTESIS.

El aceite de aguacate aumenta la estabilidad de los supercomplejos respiratorios de mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

Evaluar si el aceite de aguacate aumenta la estabilidad de los supercomplejos respiratorios de mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.

4.2. Objetivos Específicos.

- Evaluar la influencia del aceite de aguacate en el efecto desestabilizador de un detergente en el transporte de electrones de mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.
- Evaluar la influencia del aceite de aguacate en el efecto desestabilizador de un detergente en la producción de ERO de mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Modelo Experimental

Se utilizaron ratas Wistar macho, de entre 300-350 g de peso corporal, las cuales fueron alimentadas con una dieta especial para roedores y agua. Se mantuvieron en un bioterio bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y temperatura controlada.

La diabetes fue inducida en ratas sometidas a un ayuno previo de 12 horas, mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (45 mg/Kg). Cinco días después se realizó la medición de los niveles de glucosa, los animales con niveles de glucosa mayores de 150 mg/dL fueron usados para conformar los grupos diabéticos (Ortiz-Avila et al. 2015).

Se siguieron las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana expedida por la Secretaría de Agricultura en el párrafo de Regulaciones Federales para el Uso y Manejo de Animales (NOM-062-ZOO-1999).

5.2. Diseño Experimental

Las ratas fueron divididas en cuatro grupos de cuatro ratas cada uno; Grupo 1: control, Grupo 2: diabético, Grupo 3: control + aceite de aguacate y Grupo 4: diabético + aceite de aguacate. Los grupos 3 y 4 recibieron una dosis de 1 mL/250 mg de peso de aceite de aguacate marca Ahuacatlán (Diricom, S.A de C.V., México) (Ortiz-Ávila et al., 2015). La administración se realizó vía oral durante un periodo de 90 días. Durante el periodo de la administración cada quince días se pesaron los animales y se realizó la medición de los niveles de glucosa en sangre utilizando un glucómetro ACCU-CHECK[®] para todos los grupos. Después de 90 días de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por decapitación con un ayuno de 12 horas.

5.3. Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias de hígado se aislaron mediante centrifugación diferencial (Ortiz-Avila et al. 2015). Para obtener las mitocondrias, el hígado fue triturado y lavado con medio 1 (220mM manitol, 70 mM sacarosa, 2 mM MOPS y 1 mM EGTA, a pH 7.4). Los fragmentos fueron homogenizados y centrifugados a 2000 rpm y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 7500 rpm y la pastilla resultante fue lavada con medio 2 (220mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM MOPS, a pH 7.4) y centrifugada a 9000 rpm. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 500 μ L de medio 2. Todas las centrifugaciones se realizaron durante 10 minutos a 4°C en el rotor SS20 de una centrifuga Sorvall RC6+. La concentración de proteína mitocondrial fue determinada mediante el método de Biuret.

5.4. Actividad de la NADH citocromo c oxidorreductasa (Complejo I-III).

Esta determinación fue llevada a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2550. Se utilizaron 0.1 mg/mL de mitocondrias en un volumen total de 1 mL de medio NaCl/Imidazol (150 mM/75 mM, pH 7) el cual se incubó por 5 min con 2 mM de KCN, para inhibir el complejo IV. Posteriormente, se adicionaron 1.5 mg de citocromo c y se inició la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm. Transcurrido un minuto se añadieron 1 mM de NADH como sustrato del complejo I y se continuó el trazo dos minutos más durante los cuales se midió la reducción del citocromo c. La reacción se detuvo al agregar 1 μ g de antimicina A, la cual es un inhibidor del complejo III. La reducción del citocromo c sensible a antimicina se calculó restando la pendiente del trazo en presencia de NADH + antimicina A, a la pendiente obtenida en presencia de NADH, usando el coeficiente de extinción molar de citocromo c de 19.1 mM⁻¹cm⁻¹.

Para determinar el efecto del detergente Tritón X-100 en la actividad de la NADH: citocromo *c* oxidorreductasa, 0.1 mg/mL de mitocondrias resuspendidas en un volumen total de 1mL de medio NaCl/Imidazol se incubaron con 0%, 0.125%, 0.5%, y 1% del detergente Tritón X-100. (García-Gurtubay, 2015). Las incubaciones se realizaron por 10 minutos y posterior a los primeros 5 minutos, se adicionaron 2 mM de KCN y se continuó con la incubación. Finalmente, se añadieron 1.5 mg de citocromo *c* y se realizó la lectura en el espectrofotómetro como se describió anteriormente.

5.5. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO).

Esta determinación se realizó evaluando la oxidación por las ERO de la sonda fluorescente 2´7´-diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCDHF-DA). La lectura de la fluorescencia se realizó a una λ de excitación de 491 nm y una λ de emisión a 518 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301. Se utilizó 0.1 mg/mL de suspensión de mitocondrias aisladas en medio NaCl/Imidazol y 5 μ L de DCDHF-DA (500 mM) para obtener un volumen final de 2mL, aforando con medio NaCl/Imidazol y se llevó a agitación durante 20 minutos en un baño de hielo. Posteriormente a la incubación de la muestra, se inició la lectura de fluorescencia y después de 1 minuto, se agregó 1 mM de NADH como sustrato del complejo I y se midió el incremento de la fluorescencia durante 19 minutos. La velocidad de generación de ERO se expresó como el cambio de unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) por min^{-1} por mg proteína⁻¹.

Para determinar el efecto del detergente Tritón X-100 en la producción de ERO, 0.1 mg/mL de mitocondrias resuspendidas en un volumen total de 1mL de medio NaCl/Imidazol se incubaron con 0%, 0.125%, 0.5%, y 1% del detergente Tritón X-100. Posteriormente, se determinó la producción de ERO como se indicó anteriormente.

6. RESULTADOS

6.1. Actividad de la NADH:citocromo c oxidorreductasa.

Referente a la actividad NADH:citocromo c oxidorreductasa (representativa de la actividad de los supercomplejos I-III) de la CTE, se puede observar que todos los grupos tuvieron una actividad similar sin el detergente Tritón X-100, excepto por el grupo control + aceite de aguacate que tuvo una actividad mayor respecto a los demás grupos (Fig.1), y el grupo diabético que fue el que presentó menor actividad.

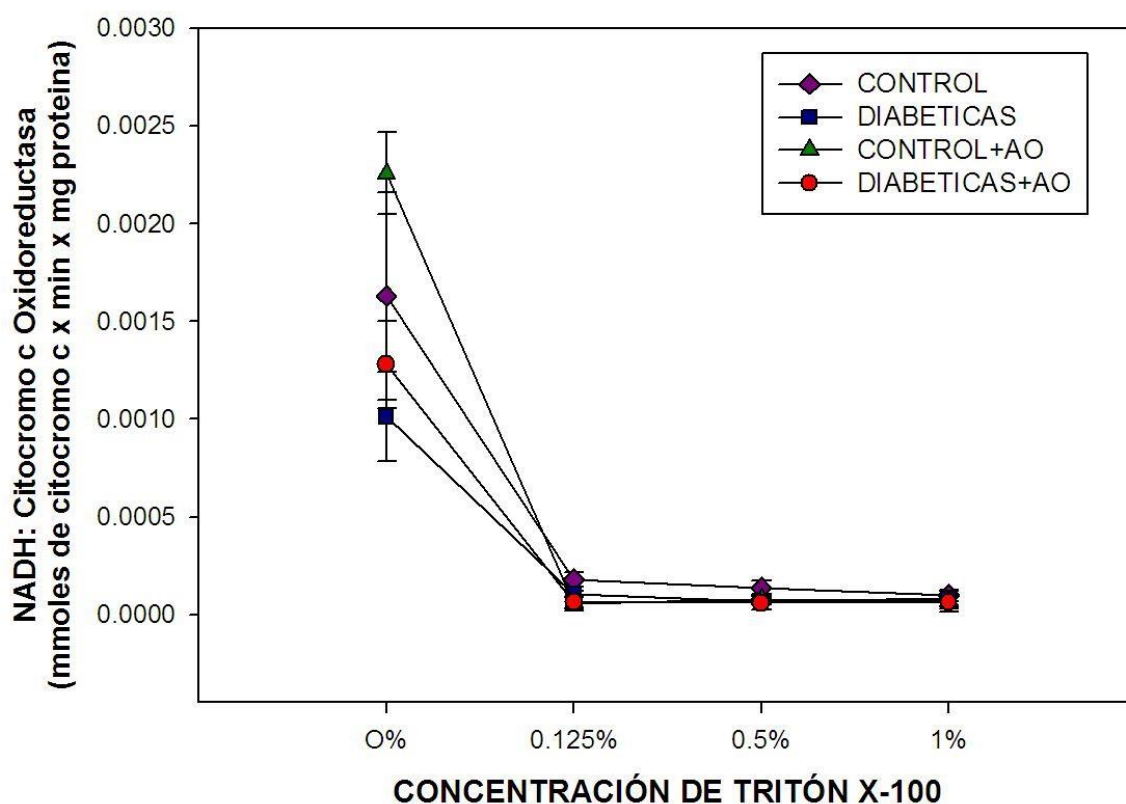


Figura 1.- Actividad de la NADH: citocromo c oxidorreductasa (representativa de la actividad de los supercomplejos complejo I-III). Los datos se representan como la media \pm error standard de n=4

En la Figura 2 se presenta un acercamiento de la Fig. 1 a partir de la primera concentración del detergente Tritón X-100, donde se observa que la actividad de todos los grupos fue menor que la observada en ausencia de detergente. Se observa que los grupos diabéticos + aceite de aguacate y control + aceite de aguacate se inhibieron en mayor grado que sus respectivas contrapartes sin aceite de aguacate.

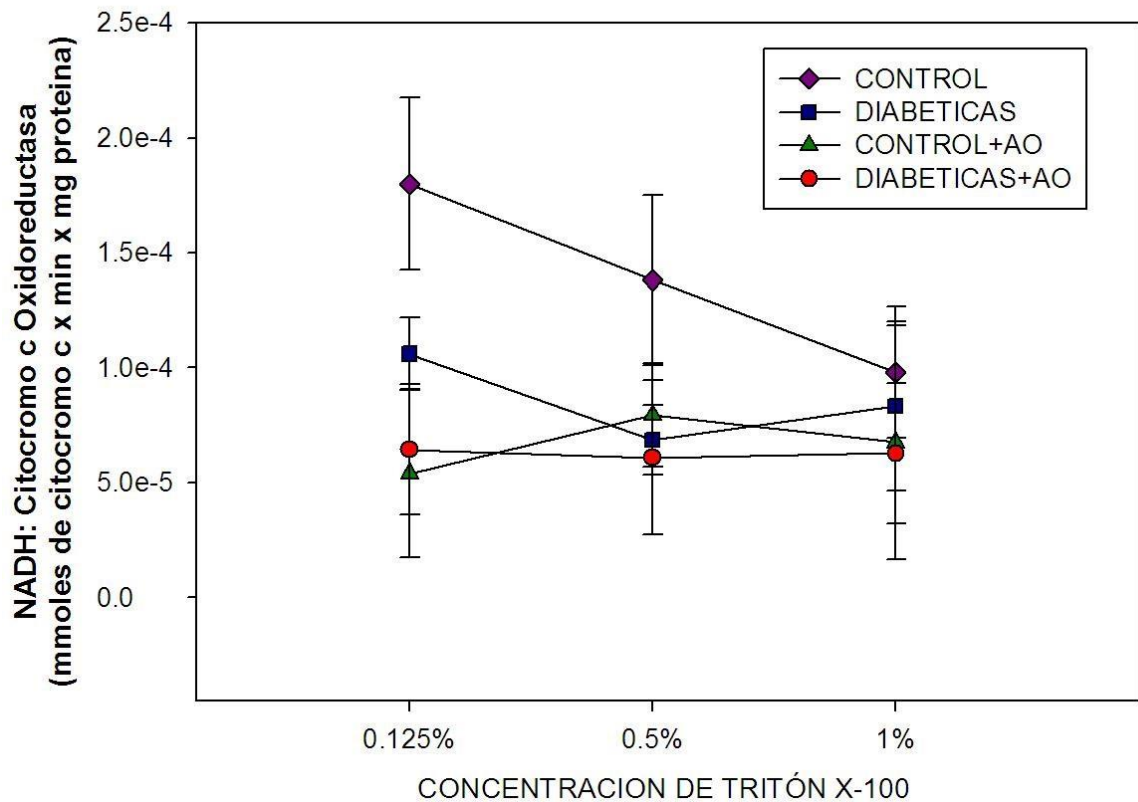


Figura 2.- Actividad de la NADH:citocromo c oxidorreductasa, acercamiento de la Fig. 1. Los datos se representan como la media \pm error standard de n=4

Se observa como era de esperarse que la actividad del grupo control es la menos sensible al efecto desestabilizador del Tritón X-100 a las concentraciones de 0.5% y 1%, mientras que el resto de los grupos se inhibieron prácticamente en la misma proporción.

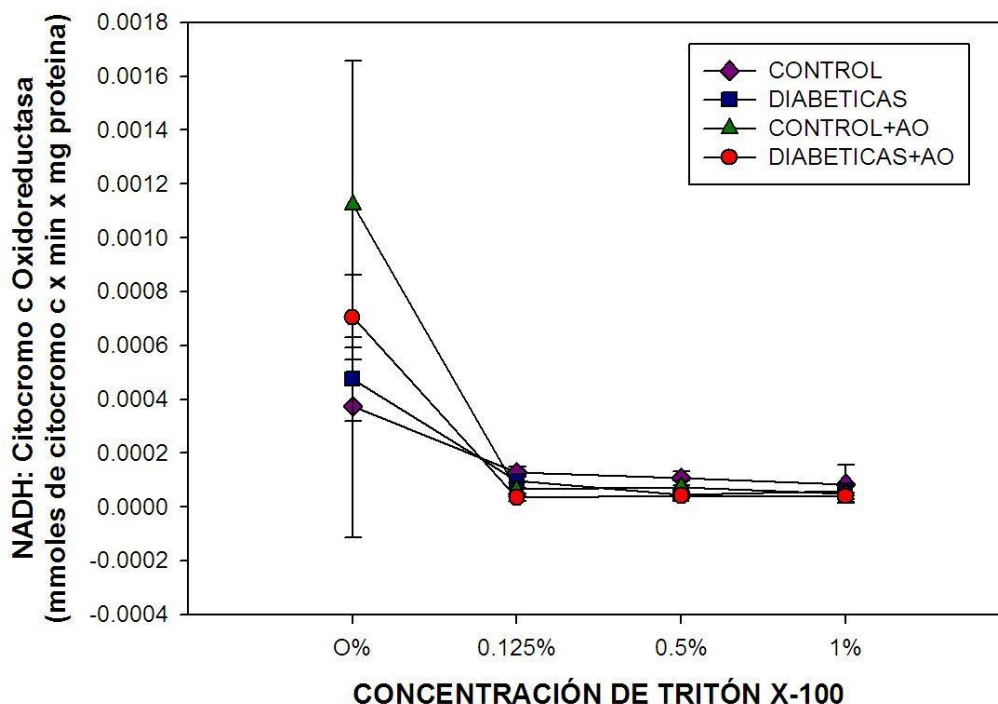


Figura 3.- Efecto del Tritón X-100 en la actividad de la de la NADH:citocromo c oxidorreductasa en presencia de antimicina A. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de n= 4.

Se decidió graficar las velocidades de reducción de citocromo c en presencia de antimicina A, un inhibidor del complejo III, para determinar si la fuga de electrones provocada por el bloqueo del complejo III es dependiente de la estabilidad de los supercomplejos. Lo anterior debido a que el citocromo c puede ser reducido también por los electrones fugados de la CTE (Fig. 3). Se observa que, en ausencia del detergente, los grupos control + aceite de aguacate y diabético + aceite de aguacate fueron los menos sensibles a la inhibición con antimicina A, mientras que los grupos control y diabético fueron los más sensibles. Esto indica mayor fuga de electrones en los grupos con aceite de aguacate en presencia de antimicina A.

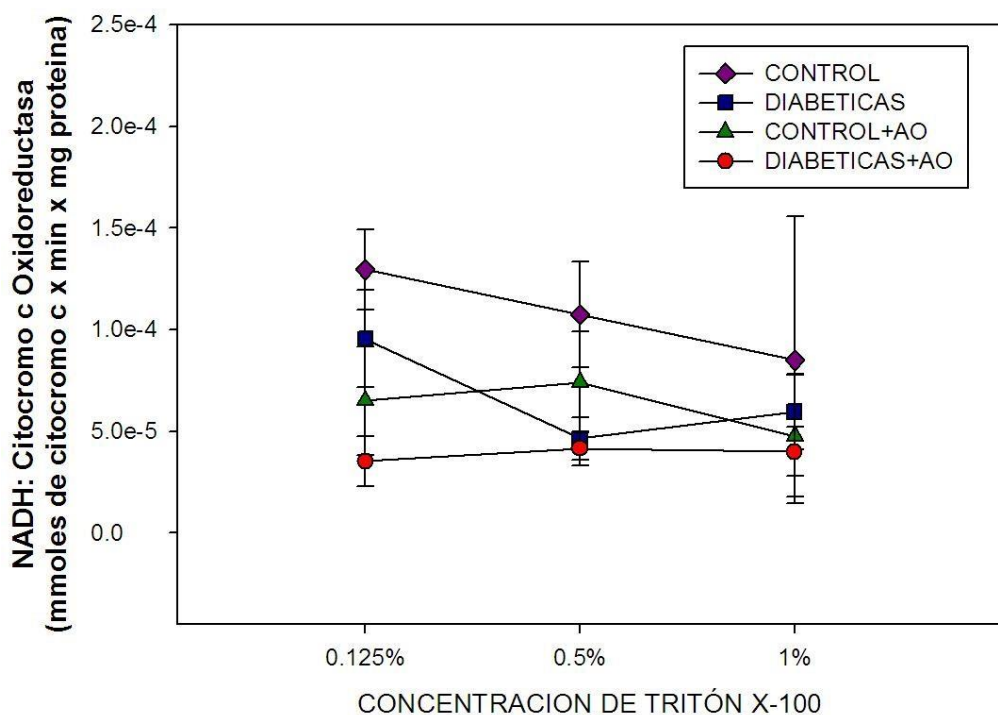


Figura 4.- Efecto del Tritón X-100 a 0.125%, 0.5% y 1% en la actividad de la de la NADH:citocromo c oxidorreductasa en presencia de antimicina A, acercamiento de la Fig. 3. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de $n=4$.

En la Fig. 4 se graficaron las actividades solo en presencia de detergente para poder apreciar mejor las diferencias entre los grupos experimentales. Se puede notar que el grupo control es el menos sensible a la adición de detergente, mientras que en el grupo diabético hay una caída abrupta de la reducción de citocromo c a partir de 0.5% de Tritón X-100. En contraste, el grupo diabético + aceite de aguacate presenta casi nula reducción del citocromo c a cualquier porcentaje de Tritón X-100, mientras que una tendencia parecida se aprecia control + aceite de aguacate. Esto indica que la fuga de electrones disminuye drásticamente en los grupos con aceite de aguacate una vez que se desestabilizan los supercomplejos, mientras que lo contrario ocurre en su ausencia.

6.2. Formación de ERO.

Se determinó el efecto de la desestabilización de los supercomplejos por Triton X-100 en la producción de ERO utilizando NADH, un sustrato del complejo I (Fig. 5). Se puede observar que la producción de ERO fue mayor en el grupo Control+AO a cualquier concentración de detergente, llegando a niveles cercanos a los del grupo diabético. Por otro lado, se observó que la desestabilización de los complejos en los grupos diabetes + aceite de aguacate disminuyó la producción de ERO casi a niveles nulos, de manera similar al grupo control. Esto sugiere que el aceite de aguacate disminuye la producción de ERO en la CTE a pesar de que su organización en forma de supercomplejos se vea afectada, lo cual concuerda con la menor fuga de electrones inducida en este grupo al inhibir el complejo III con antimicina A (Fig. 5)

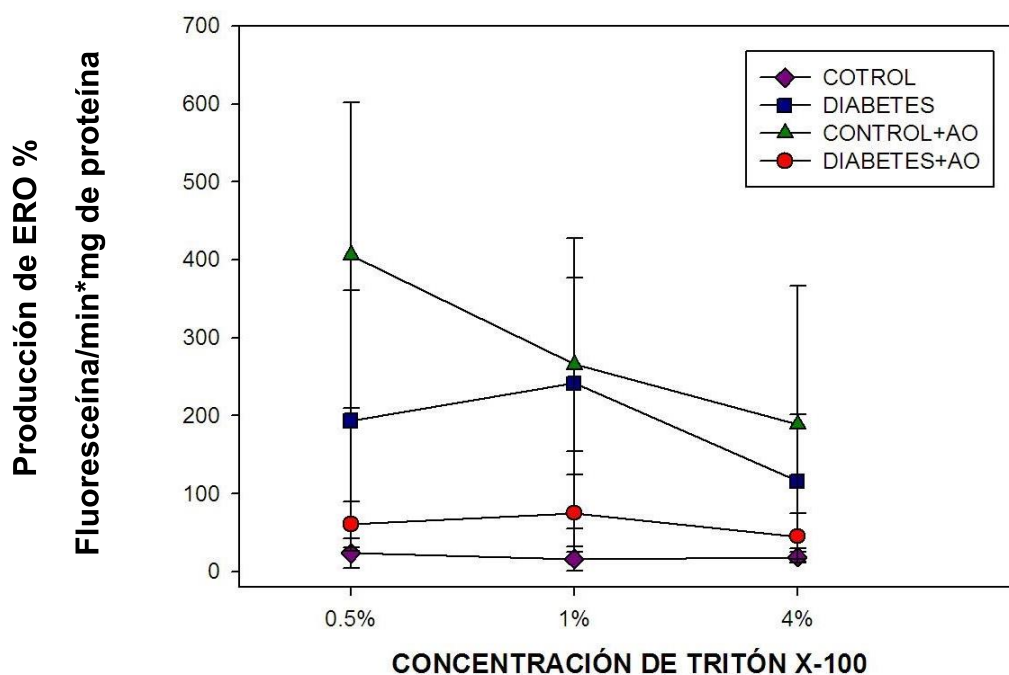


Figura 5.- Efecto del Tritón X-100 en la producción de ERO con un sustrato del complejo I. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de $n=4$.

7. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que el aceite de aguacate tiene efectos benéficos en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas. La diabetes disminuye la actividad del complejo I de la CTE, aumenta al doble la producción de ERO y la peroxidación de lípidos. Todas estas alteraciones fueron normalizadas por la administración del aceite de aguacate en la dieta (Ortiz-Ávila *et al.* 2015).

Los resultados del presente estudio muestran que la actividad NADH: citocromo c oxidorreductasa en la ausencia del detergente Tritón X-100 (Fig 1), la cual es representativa de la actividad de los supercomplejos I-III, fue elevada en el grupo control + aceite de aguacate, aun por encima del grupo control y todos los demás grupos de estudio. Asimismo, se muestra una mejora en la actividad del supercomplejo I-III en el grupo diabético + aceite de aguacate con respecto al grupo diabético, lo cual sugiere que la adición del aceite de aguacate no solo mejora la actividad de los complejos I y III de manera individual como se ha demostrado en estudios previos (Ortiz-Avila *et al.* 2013, 2015), sino que también podría estar estabilizando sus interacciones al proteger la integridad de los fosfolípidos de las membranas mitocondriales como se ha demostrado anteriormente para mitocondrias de hígado de ratas diabéticas (Ortiz-Avila *et al.* 2015, HernándezEsparza 2017).

Se puede observar una disminución gradual en todos los grupos de estudio al adicionar el detergente Tritón X-100 a las diferentes concentraciones utilizadas, lo cual es reflejo de la desestabilización de los supercomplejos I y III y disminución de la canalización de electrones entre estos dos complejos. Se observó que todos los grupos tuvieron una actividad más baja desde la primera concentración al 0.125% y siguió esa tendencia hasta la concentración final de 1%, (Fig. 2). Este resultado sugiere que la diabetes induce una mayor tendencia a la desestabilización de los supercomplejos. Lo anterior podría estar relacionado con los cambios en la composición de ácidos grasos que produce el aceite de aguacate en la membrana interna mitocondrial de ratas diabéticas, donde se ha observado un aumento en el porcentaje de ácidos grasos saturados y una disminución drástica en el porcentaje

de ácidos grasos monoinsaturados (Ortiz-Avila et al. 2015), lo cual podría alterar la fluidez de la membrana y sus respuestas a la adición creciente de detergente. Sin embargo, es importante resaltar que este estudio se limitó a medir la reducción del citocromo *c* (la última reacción catalizada por el supercomplejo), pero no la primera reacción que es la oxidación del NADH. Por lo tanto, hacen falta más estudios tanto cinéticos como de BN-PAGE para corroborar si los cambios observados en la actividad medida en este estudio correlacionan con evidencia física de la organización de los supercomplejos.

No obstante lo anterior, se observó que el grupo diabético + aceite de aguacate fue el más sensible al bloqueo del transporte de electrones del complejo III al citocromo *c* con el inhibidor antimicina A, cuando los supercomplejos fueron desestabilizados con concentraciones crecientes de Tritón X-100 (Fig. 4), lo cual refleja una menor fuga de electrones en la CTE de ese grupo cuando los supercomplejos son desestabilizados. Esto se puede inferir debido a que el citocromo *c* puede ser reducido de manera no catalítica vía la formación de radical superóxido (Lenaz et al. 2016). Por lo tanto, puede considerarse que los grupos que reducen a una mayor tasa al citocromo *c* en presencia de antimicina A tienen una mayor fuga de electrones, ya que la antimicina A garantiza el bloqueo de la transferencia catalítica de electrones entre el complejo III y su sustrato el citocromo *c*. El resultado anterior y el de la Fig. 1 en el grupo diabético + aceite de aguacate, sugieren que la menor producción de ERO reportada por Ortiz-Avila et al. (2015) en mitocondrias de hígado de ratas tratadas con aceite de aguacate, es debida a la posible presencia de antioxidantes del aceite que puedan neutralizar las ERO, pero no a una mayor resistencia a la desestabilización por el detergente Tritón X-100 como lo muestra la Fig. 2.

En el caso de la formación de ERO se observó que el grupo control no presenta una alta producción de ERO (Fig. 5), como era de esperarse al ser mitocondrias de animales sanos, en contraste con el grupo diabético cuya producción de ERO es elevada sin el detergente y desde su primera concentración. Por otro lado, el grupo control + aceite de aguacate tuvo una producción de ERO muy elevada incluso por encima del grupo diabético, lo cual puede ser el resultado

de la solubilización de la cardiolipina mitocondrial por el detergente y una rápida desestabilización de los supercomplejos.

8. CONCLUSIÓN

El tratamiento con aceite de aguacate indujo en mitocondrias de ratas diabéticas una desestabilización más profunda de los supercomplejos respiratorios CI-CIII por el detergente Tritón X-100, similar a lo observado en las ratas diabéticas, lo cual podría ser debido a los cambios que induce la diabetes en la composición de ácidos grasos de membranas mitocondriales. Sin embargo, la baja producción de ERO y de reducción de citocromo *c* con antimicina A en las mitocondrias del grupo diabetico+AO pero no del grupo diabético en presencia de detergente, sugiere que los efectos benéficos del aceite de aguacate en mitocondrias de ratas diabéticas podrían ser debidos a la neutralización del radical superóxido por los antioxidantes del aceite de aguacate y no por una mayor estabilización de los supercomplejos respiratorios.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alvizouri F., Rodríguez A. (2009). Efectos Médicos del aguacate. Med Int Mex. 25 (5): 379-85.

Catalina Paz Sandoval Altamirano, (2012), Estudio de la reactividad de oxígeno molecular singulete y flavonoides. Efecto del medio, Santiago Chile.

D'Angelo B. M. G., Andrea Mariel Actis: Daniela Outomuro. (2009), Hígado Graso no Alcohólico., Buenos Aires Argentina.

Dowman J, Tomlinson J, Newsome P. (2009). Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. Q J Med. 103:71–83

García Monzón C., Enfermedad Hepática Grasa no Alcohólica, Madrid.

Giacco F, Brownlee M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. Circ Res. 107(9):1058-70.

Hernández Esparza M. J. (2017) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas.

Hernández-Esparza M.J., Flores-Ledesma C.G., Montoya-Pérez R., Calderón-Cortés E., Saavedra-Molina A., Rodríguez-Orozco A.R. and Cortés-Rojo C. (December 9th 2020). Thiol Reduction and Cardiolipin Improve Complex I Activity and Free Radical Production in Liver Mitochondria of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats [Online First], IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.95112. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/thiol-reduction-and-cardiolipinimprove-complex-i-activity-and-free-radical-production-in-liver-mito>

José Ignacio Garcia-Gurtubay García. Efectos del Detergente no iónico Tritón X-100 sobre la Membranas Mitocondriales, Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid, 2015.

Jorge Escobedo de la Peña, Luisa Virginia Buitrón-Granados, Jesús Cenobio Ramírez Martínez, Raymundo Chavira Mejía, Herman Schargrodsy, Beatriz Marcet

Champagne, Diabetes en México; Estudio CARMELA, 2011. Cir Cir 2011;79:424-431

Julio Frenk Mora, Enrique Ruelas Barajas, Roberto Tapia Conyer, Roberto Castañón Romo, María Eugenia de León-May, Guido Belsasso, Misael Uribe Esquivel, Eduardo González Pier, Gonzalo Moctezuma Barragán, Gustavo Lomelín Cornejo, Oscar Velázquez Monroy, Programa de acción; Diabetes Mellitus, 2001. Primera Edición, 2001-11-22, ISBN 970-721-001-X

Karp G. (2005). Biología Celular y Molecular. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill. 196-213.

Lenas G., Tioli G., Falasca A. I., Complex I Function in Mitochondrial Supercomplexes. Biochimica et Biophysica Acta 1857 (2016) 991-1000

López de la Torre M., Diabetes Mellitus, Complicaciones. Organización de las Naciones Unidas, 2016.

Ortiz-Ávila O, Gallegos-Corona MA, Sánchez-Briones LA, Calderón-Cortés E, Montoya-Pérez R, Rodríguez-Orozco AR, Campos-García J, Saavedra-Molina A, Mejía-Zepeda R, Cortés-Rojo C. (2015) Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. J Bioenerg Biomembr. 47(4):337-53.

Pérez Martos A. (2013) Cadena de Transporte de Electrones Mitocondrial; Una Nueva Visión.

Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Ferri D, Paradies G. (2007) Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. Biochim Biophys Acta. 1767(10):1260-7.

X. Buque, p. Aspichueta y B. Ochoa., (2008) Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad.

Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V (2016) Structure and function of mitochondrial complex I. Biochim Biophys Acta. 1857(7):902-14.

Zeng Lu, Wai J. Tang, Jin Y.Yin, Bei J. Zhou, Signal Traductions and Nonalcoholic Fatty Liver; A Mini-Review. Int J clin Exp Med 2014.Int J Clin Exp Med 2014; 7(7):16C24-1631.