



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA BIOTINA EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL Y
EL ESTRÉS OXIDANTE EN RATAS DIABÉTICAS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

PRESENTA:

P.Q.F.B. MA. GUADALUPE ARELLANO SALGADO

ASESOR:

Doctor en Ciencias Biomédicas Asdrúbal Aguilera Méndez

CO-ASESOR:

Doctor en Ciencias Biológicas Francisco Alfredo Saavedra Molina

MORELIA; MICHOACÁN, MÉXICO. AGOSTO 2022.



La presente investigación se realizó en el:

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Laboratorio de Bioquímica y Genética de la Nutrición

Laboratorio de Bioquímica

Edificio B3, Ciudad Universitaria

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios, por regalarme la dicha de tener vida y salud para poder concluir esta etapa de mi vida tan importante y anhelada. Que me ama por quien soy y amo por encima de todo. Mi compañero de alegrías y tristezas a quien le debo la fortaleza de seguir adelante.

A mi madre, Francelia Salgado, por ser una increíble mujer, a quien amo y admiro por su fuerza y valentía de salir adelante día con día, por enseñarme el camino lleno de valores y principios para mi crecimiento personal y profesional. La mujer con el amor más puro e infinito que, con el sudor de su frente ha logrado grandes cosas. Mi ejemplo a seguir.

A mi padre, César Arellano, por todo el apoyo y comprensión que siempre ha mostrado hacia mí, por orientarme con sus experiencias, por cuidar de mí y siempre estar al pendiente a cada paso que doy sin importar la distancia. A quien amo y respeto por, sobre todo. Gracias por todos los momentos que me has regalado papá y por ser una de mis más grandes inspiraciones para ser una química.

A mi hermano, Julio César, por cuidarme siempre y ser un gran compañero de aventuras. Por compartir conmigo momentos mágicos y ser mi confidente. Por ser el hermano mayor más paciente y comprensivo que hay. Te amo y admiro por el gran ser humano que eres al día de hoy.

A Martin, por ser mi compañero en la etapa más importante de mi vida, que con su amor y apoyo me ha impulsado a seguir adelante en los momentos más difíciles para mí. Por ser un gran amigo y confidente, al cual amo muchísimo y espero seguir escribiendo mi historia a su lado.

A mis amigos, Patricia Quiterio, Mayra González, Javier Castro y Aarón Rojo; quienes me estiman y me apoyan al igual que yo a ellos, las personas con las que más he compartido momentos increíbles y experiencias inolvidables. Que me permitieron conocerlos y aprender muchísimo de cada uno. Gracias infinitas por ser los mejores amigos durante todo este trayecto de la carrera y lo que resta de mi vida, en especial a Paty y May, que fueron las mejores amigas, las que siempre me escuchaban en los momentos más difíciles y que siempre tuvieron un consejo para mí, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis asesores de tesis el D.C. Asdrúbal Aguilera Méndez, quien, con su constante apoyo, ejemplo de trabajo y sobre todo su paciencia, me impulso a salir adelante con mi proyecto, preocupándose siempre no solo por la parte académica sino también en la parte humana y al D.C. Alfredo Saavedra Molina, quien me asesoró en muchas cuestiones académicas y sobre todo por permitirme desarrollar toda mi parte experimental en su laboratorio, procurando siempre que no hiciera falta nada de lo necesario para la realización de este proyecto, sin ellos nada de esto sería posible.

Al M.C. Donovan Peña Montes, quien, me dedico todo su tiempo y paciencia en explicarme a detalle cada procedimiento y que ante las dudas siempre tenía una solución para mí. Agradezco muchísimo su disposición y amabilidad para guiarme en la parte experimental, sobre todo agradezco cada consejo que me brindo tanto para lo académico como la vida personal.

Agradezco a la doctora Xóchitl Leticia Ruíz Pérez, por aportarme muchos conocimientos para mi crecimiento profesional quien, de alguna manera siempre hacia ver todo desde un punto más sencillo. Agradezco su tiempo y paciencia que demostró desde un principio y por el gran ser humano que es.

A mis sinodales, la M.C. Flora Maria Cabrera Matias, el D.C. Zurisaddai Hernández Gallegos y la D.C.E. Ana Gabriela Campos Arroyo, por aceptar ser parte del comité de mis sinodales, agradezco el tiempo que dedicaron a la revisión de mi tesis, así como también sus consejos para mejorar como profesionista.

A mis compañeros y amigos tesisistas, Celina Medina, José Carlos Ayala, Jocelyne Hernández y, a mi amigo Lalo Murguía de servicio social que estuvieron conmigo en el laboratorio de Bioquímica y Genética de la Nutrición, apoyándome y compartiendo risas, tristezas, alegrías, entusiasmo y muchos momentos increíbles. Agradezco todo el apoyo que me brindaron en este proyecto e incluso los consejos que me dieron para tener un mejor crecimiento personal, sin duda se convirtieron en parte de mi familia. Los estimo y siempre los extrañaré a donde quiera que vaya.

Por último, quiero darles las gracias a todos y cada uno de mis profesores de la **Facultad de Químico Farmacobiología** que, aportaron todos sus conocimientos para mi crecimiento académico y profesional, quienes me impulsaron a ser mejor cada día y agradezco todos los consejos que me dieron. Infinitas gracias por el amor y el tiempo que le ponen a su profesión. A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo** a quien agradezco la

estancia que me brindo y la oportunidad de formarme profesionalmente conforme a su misión humanista. Me siento orgullosa de ser egresada de esta maravillosa universidad.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Diabetes.....	4
1.2. Clasificación	4
1.2.1. Diabetes mellitus tipo 1.....	5
1.2.2. Diabetes mellitus tipo 2.....	7
1.2.3. Diabetes gestacional	8
1.2.4. Otros tipos de diabetes	8
1.2.5. Diabetes mellitus farmacológica o experimental.....	9
1.3. Epidemiología	10
1.4. Factores de riesgo.....	11
1.5. Estrés oxidante	12
1.6. Función mitocondrial	14
1.6.1. Los transportadores de electrones actúan como complejos multienzimáticos	17
1.6.2. Complejo I	19
1.6.3. Complejo II	20
1.6.4. Complejo III	21
1.6.5. Complejo IV	22
1.7. Estrés oxidante en la diabetes	23
1.8. Complicaciones de la diabetes.....	24
1.9. Generalidades del hígado	26
1.10. Tratamiento farmacológico de la diabetes	29
1.11. La biotina	31
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	33
3. JUSTIFICACIÓN.....	34

4. HIPÓTESIS.....	35
5. OBJETIVOS.....	35
5.1. General	35
5.2. Específicos.....	35
6. MATERIAL Y MÉTODOS	36
7. RESULTADOS	42
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	49
9. CONCLUSIONES	53
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la estreptozotocina	10
Figura 2. Mecanismo general de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno.....	13
Figura 3. Estructura y partes de la mitocondria	16
Figura 4. Vías bioenergéticas mitocondriales.....	17
Figura 5. Elementos de la cadena respiratoria.....	18
Figura 6. Estructura gráfica del complejo I mitocondrial	19
Figura 7. Estructura gráfica del complejo II mitocondrial	20
Figura 8. Estructura gráfica del complejo III mitocondrial	21
Figura 9. Estructura gráfica del complejo IV mitocondrial.....	23
Figura 10. Esquema del desarrollo de algunas enfermedades causadas por la producción de radicales libres.....	23
Figura 11. Complicaciones crónicas de la diabetes.....	25
Figura 12. Esquema de la fisiología del hígado.....	26
Figura 13. Anatomía morfológica del hígado.....	27
Figura 14. Segmentos hepáticos, venas suprahepáticas, vena porta y vía biliar	28
Figura 15. Fórmula química de la biotina	32
Figura 16. Efecto del tratamiento con biotina sobre algunas variantes fisiológicas	43
Figura 17. Efecto del tratamiento con biotina sobre los niveles de glucosa en ayuno y la tolerancia a la glucosa en ratas tratadas con biotina durante 15 días	45
Figura 18. Efecto del tratamiento con biotina sobre la sensibilidad a la insulina en ratas tratadas con biotina durante 15 días	46
Figura 19. Efecto de la biotina sobre la producción de ERO en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas tratadas con biotina durante 15 días	47
Figura 20. Efecto de la biotina sobre la actividad de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial en hígado de ratas diabéticas	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los diferentes tipos de diabetes.	5
Tabla 2. Factores de riesgo para la diabetes tipo 2.....	11

ABREVIATURAS

DM. Diabetes mellitus.

STZ. Estreptozotocina.

NADH. Nicotinamida adenina dinucleótido reducido.

RL. Radicales libres.

KCN. Cianuro de potasio.

BSA. Albúmina sérica bovina.

K₂HPO₄. Fosfato dipotásico.

KH₂PO₄. Fosfato monopotásico.

FAD. Flavín adenín dinucleótido.

FADH₂. Flavín adenín dinucleótido.

FMN. Flavín mononucleótido.

QH₂. Ubiquinol.

CoQ. Coenzima Q.

O₂. Oxígeno.

O₂•⁻. Radical superóxido.

OH•. Radical hidroxilo.

AA. Antimicina A.

C₆N₆FeK₄. Ferrocianuro de potasio.

PBS. Búfer salino de fosfato.

DCIP. Diclorofenol indofenol.

Cit c. Citocromo c.

diH₂O. Agua desionizada.

H₂O. Agua.

ADA. American Diabetes Association.

OMS. Organización Mundial de la Salud.

DG. Diabetes gestacional.

HDL. Lipoproteínas de alta densidad.

LDL. Lipoproteínas de baja densidad.

CIAD. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.

INSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

EO. Estrés oxidante.

SOD. Enzima Superóxido dismutasa.

CAT. Catalasa.

GPx. Glutación peroxidasa.

PX. Peroxisomas.

H₂O₂. Peróxido de hidrogeno.

GSSH. Glutación oxidado.

GSH. Glutación reducido.

ERO. Especies reactivas de oxígeno.

NOM. Norma Oficial Mexicana.

NO. Óxido nítrico.

HbA1c. Hemoglobina glicosilada.

CRM. Cadena respiratoria mitocondrial.

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

ARN. Ácido ribonucleico.

ATP. Adenosín trifosfato.

ADP. Adenosín difosfato.

Pi. Fosforo inorgánico.

PPAR. Receptores activados por proliferadores peroxisomales.

DM1 A. Diabetes Mellitus tipo 1A.

DM1 B. Diabetes Mellitus tipo 1B.

ICA. Anticuerpos antiislotes.

ADA. American Diabetes Association.

HLA. Human leukocyte antigen.

anti-GAD. anticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico.

anti-IA2. anticuerpos contra la proteína tirosina fosfatasa.

PC. Piruvato carboxilasa.

PCC. Propionil-CoA carboxilasa.

MCC. Metilcrotonil-CoA carboxilasa.

cGMP. Guanosín monofosfato cíclico.

AMPK. Proteína cinasa activada por adenina monofosfato.

IP. Intraperitoneal.

KCl. Cloruro de potasio.

MgCl₂. Cloruro de magnesio.

H2DCFDA. Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína.

DCFDA. Diclorofluoresceína.

C₆N₆FeK₄. Ferrocianuro de potasio.

TTFA. Ácido trifluoroacético.

ES. Error estándar.

CTE. Cadena de transporte de los electrones.

RESUMEN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa que se caracteriza por un estado de hiperglucemia persistente, la cual contribuye al mantenimiento de un ambiente oxidante. Algunas de las principales complicaciones derivadas de la diabetes están relacionadas con el hígado, ya que se ha reportado que bajo condiciones de hiperglicemia el hígado es uno de los principales órganos que está sujeto a la disfunción y muerte celular mediante el efecto del estrés oxidante. El presente trabajo se enfocó en el estudio de los efectos de la administración de biotina en el metabolismo de glucosa, así como en la funcionalidad de los complejos enzimáticos de la cadena de transporte de los electrones mitocondriales y efectos antioxidantes en mitocondrias de hígado utilizando un modelo de diabetes mellitus inducida con estreptozotocina. Para ello, se realizaron estudios *in vivo* utilizando 24 ratas macho de la cepa Wistar de un peso promedio de 220 ± 25 g, las cuales se agruparon de forma aleatoria en 4 grupos experimentales: (1) grupo control; (2) grupo control + biotina (2 mg/kg); grupo normoglucémico tratadas con biotina (2 mg/kg) por 15 días vía IP; (3) grupo control diabético, por dosis única de STZ (45 mg/kg) y (4) grupo diabético + biotina (2 mg/kg), tratadas durante 15 días vía IP. Se determinaron la tolerancia a la glucosa y la resistencia a la insulina. Al finalizar el tratamiento, se llevó a cabo la disección del hígado para la obtención de mitocondrias y se evaluó la función de los complejos enzimáticos y la producción de especies reactivas de oxígeno. Los resultados obtenidos en la experimentación demostraron que la biotina reguló la producción de ERO, disminuyó los niveles de glucosa en sangre, mejoró la resistencia a la insulina y promovió una regulación en la actividad de los complejos respiratorios. En conclusión, se demostró que la biotina tiene actividad antioxidante, hipoglucemiante y regula de la actividad en la cadena de transporte de los electrones. Por lo tanto, la biotina posee potencial para su uso como coadyuvante con fármacos antidiabéticos, así como un posible tratamiento y/o prevención de enfermedad hepática que se pueda desarrollar durante la diabetes.

Palabras clave: biotina, diabetes, estrés oxidante, mitocondria, hígado.

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a chronic degenerative disease characterized by a state of hyperglycemia, which contributes to the maintenance of an oxidizing environment. Some of the main complications of diabetes are related to the liver, since it has been reported that under hyperglycemic conditions, the liver is one of the main organs that is subject to dysfunction and cell death through the effect of oxidative stress. The present work focused on the study of the effects of biotin administration on glucose metabolism, the functionality of the enzyme complexes of the mitochondrial electron transport chain and antioxidants effects in liver mitochondria using a streptozotocin induced diabetes mellitus model. To achieve this, in vivo studies were carried out using 24 male rats of the Wistar strain with an average weight of 220 ± 25 g, and rats were randomly grouped into 4 experimental groups: (1) control group; (2) control group + biotin (2 mg/kg), normoglycemic group + biotin (2 mg/kg).; (3) diabetic control group, by a single dose of STZ (45 mg/kg) and (4) diabetic group + biotin (2 mg/kg). The rats were treated intraperitoneally for 15 days with biotin. Glucose tolerance and insulin resistance were tested. At the end of the treatment, the liver was dissected to obtain the mitochondria and the function of the enzyme complexes and the production of reactive oxygen species were evaluated. The results obtained in the experimentation showed that biotin has antioxidant activity and decreased blood glucose levels, improved insulin resistance and promoted regulation of the activity of respiratory complexes. In conclusion, biotin has been shown to have antioxidant and hypoglycemic activity and regulate activity in the electron transport chain. Therefore, biotin has potential for use as an adjuvant with antidiabetic drugs, as well as a possible treatment and/or prevention of liver disease that may develop during diabetes.

Keywords: biotin, diabetes, oxidative stress, mitochondria, liver.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es un trastorno metabólico, caracterizado principalmente por hiperglicemia persistente (Mora et al., 2009). Varios procesos patológicos se encuentran involucrados en su desarrollo (Gavin et al., 1997), los que van desde la destrucción autoinmune de las células β en el páncreas, con la consecuente deficiencia de la insulina, hasta las anormalidades resultantes de la resistencia a la acción de la insulina (Mora et al., 2009). Así, en la actualidad este padecimiento es una de las principales causas de muerte en México y en el mundo (Aguilera, 2020).

El aumento de información que se tuvo de la historia natural de la DM, de su etiología y del conocimiento de la fisiopatología de sus complicaciones crónicas ha obligado a que, se revisaran los criterios diagnósticos y se reclasificaran los diferentes procesos que en ella se incluyen. Conget (2002) asegura que la revisión de los criterios diagnósticos y de la clasificación de la DM se llevó a cabo en los años 1997 y 1998 en sendos documentos consensuados por los comités de expertos de la American Diabetes Association (ADA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS).

1.2. Clasificación

La ADA (2014) clasifica la DM en cuatro categorías según su etiología y características fisiopatológicas (Tabla 1):

- Diabetes mellitus tipo 1
- Diabetes mellitus tipo 2
- Diabetes gestacional
- Otros tipos específicos de DM

Tabla 1. Clasificación de los tipos de diabetes.

TIPO	CARACTERÍSTICAS
Diabetes tipo 1 (insulinodependiente)	
DM tipo 1A	Destrucción autoinmune de las células β .
DM tipo 1B	Carecen de inmunomarcadores indicadores de un proceso autoinmune destructivo de las células β pancreáticas. La categoría 1B idiopática.
Diabetes tipo 2 (no insulinodependiente)	
DM tipo 2 común	Varía entre resistencia a la insulina predominante con déficit relativo de insulina y defecto secretor de insulina predominante con resistencia a la insulina.
Diabetes del adulto de inicio juvenil	
MODY 1	Mutación en gen del factor nuclear de hepatocitos 4 α (HNF-4 α).
MODY 2	Mutación en el gen de glucocinasa.
MODY 3	Mutación en gen del factor nuclear de hepatocitos 1 α (TCF-1).
MODY 4	Mutación en gen del factor promotor insulínico 1 (1PF1).
MODY 5	Mutación en gen del factor nuclear de hepatocitos 1 β (HNF-1 β).
MODY 6	Mutación en gen de diferenciación neurógena (NEUROD1).
MODY X	Mutación en gen de RNAt de leucina mitocondrial. Mutación en gen de la insulina. Mutación en gen del receptor.
Tipo de diabetes secundarias a circunstancias o patologías primarias	
Diabetes por pancreatopatía	• Pancreatitis crónica • Operaciones quirúrgicas • Diabetes tropical
Diabetes como consecuencia de endocrinopatías	• Enfermedad de Cushing • Glucocorticoides • Acromegalia
Otros tipos de diabetes	• Diabetes gestacional • Diabetes secundaria a supresión inmunitaria • Diabetes que acompaña síndromes genéticos como el de Prader – Willi • Diabetes por farmacoterapia

Tipos de diabetes causadas por diversos procesos patológicos (Modificado de Álvarez 2013).

1.2.1. Diabetes mellitus tipo 1

La DM tipo 1 también denominada diabetes mellitus insulinodependiente o juvenil (Conget, 2002), representa entre el 5 y 10 % (López, 2009) del total de los pacientes con diabetes (Socarrás *et al.*, 2002), generalmente es diagnosticada en niños, adolescentes y adultos jóvenes; puede desarrollarse por herencia y está caracterizada por una producción deficiente o total de insulina por parte de las células β -pancreáticas (Cordero y Pinto, 2014). A su vez la DM 1 se subdivide en dos subtipos, DM1 A o autoinmune y DM1 B o idiopática (Conget, 2002).

1.2.1.1. Diabetes mellitus tipo 1A o autoinmune

La autoinmunidad es definida como la reacción del sistema inmune contra componentes del organismo, causada por una pérdida de tolerancia hacia las moléculas propias. Este ataque es la causa de las enfermedades autoinmunitarias (Alba *et al.*, 2004).

Por su parte, la DM1 A es una enfermedad inmunoinflamatoria crónica en la que existe una inflamación selectiva de las células β del páncreas la cual es mediada por los linfocitos T activados (Conget, 2002), en la patogenia participan mediadores de la inflamación con diversas combinaciones de citoquinas las cuales tienen un efecto sinérgico citotóxico en las células beta, principalmente induciendo la apoptosis (Díaz y Delgado, 2016), está caracterizada por la presencia de insulinitis asociada al daño en la célula beta y finalmente la destrucción de estas (López, 2009). Se han identificado una gran cantidad de autoanticuerpos que están relacionados con el desarrollo de la DM1 A, principalmente se encuentran los anticuerpos antiislotes (ICA), los anticuerpos antidescarboxilasa del ácido glutámico (anti-GAD), anticuerpos contra la proteína tirosina fosfatasa (anti-IA2) y el autoanticuerpo ZnT8 (Díaz y Delgado, 2016).

Existen factores que contribuyen a que un individuo sea susceptible a desarrollar la enfermedad, pero que por sí solos no la desencadenan (Alba *et al.*, 2004). Se asocia a ciertos haplotipos HLA de predisposición para la diabetes (Aguilera, 2015), que contribuyen a una presentación más eficaz de un péptido relevante en la enfermedad. También los factores ambientales influyen en la aparición de la enfermedad como: la incidencia estacional, factores geográficos, dieta, virus etc. En un individuo genéticamente susceptible los factores ambientales facilitan el proceso autoinmunitario de destrucción selectiva iniciado por un elemento desconocido (Alba *et al.*, 2004). En este tipo de diabetes varía la destrucción de las células productoras de insulina dependiendo de cada individuo, suele ser más rápida en jóvenes y niños que en adultos. Por otro lado, otros pacientes, principalmente adultos, pueden llegar a mantener su función β -pancreática residual durante un largo periodo (Aguilera, 2015).

1.2.1.2. Diabetes mellitus tipo 1B o idiopática

En la DM tipo 1B se conoce muy poco de su etiología, evolución y pronóstico. Este tipo de diabetes escribe aquellos pacientes con insulinopenia (fluctuante) inicial, tendencia a la cetosis o cetoacidosis (Conget, 2002), no tiene ninguna evidencia de autoinmunidad y no se le asocia a haplotipos de predisposición, la mayoría de los pacientes afectados son de origen afroamericanos, asiáticos, nativo americano o hispanoamericano (Aguilera, 2015). Hay autores que la consideran más a un subtipo de DM2 con tendencia a la cetosis (Díaz y Delgado, 2016).

1.2.2. Diabetes mellitus tipo 2

La DM 2 está dada por el 90 % (López, 2009) del total de los diabéticos (Socarrás *et al.*, 2002), este tipo de DM es denominada no insulinodependiente o de inicio de edad adulta, debido a acciones ineficaces de la insulina (Cordero y Pinto, 2014) y afecta a las personas que están por encima de los 40 años (Conget, 2002), aunque puede manifestarse en cualquier otro momento de la vida (Socarrás *et al.*, 2002). Tiene relación con otras patologías como la hipertensión, obesidad, los niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL), los niveles altos de lipoproteínas de baja densidad (LDL), de triacilglicéridos y un aumento del riesgo cardiovascular, anomalías en las que el hiperinsulinismo tiene un papel importante (Díaz y Delgado, 2016). Por su parte, en la fisiopatología de la DM 2 se unen varios defectos para que finalmente se presente la hiperglucemia, el principal de ellos es la insulinorresistencia a nivel del hígado, músculo liso y tejido adiposo (López, 2009).

Teniendo como referencia la íntima relación que mantiene la secreción de insulina y la sensibilidad a la acción de la hormona en el control de la homeostasis de la glucosa, es prácticamente imposible disertar por separado la contribución de cada una de ellas a la etiopatogenia de la DM2 (Conget, 2002). Se habla de resistencia periférica a la insulina cuando se produce en el músculo estriado, en donde disminuye la captación y el metabolismo de la glucosa; y por su parte, de resistencia central a la insulina cuando se desarrolla en el hígado, donde se aumenta la producción de glucosa dando pie a una hiperglucemia en ayuno (López, 2009).

Por otro lado, no se conoce exactamente la causa que desencadena el desarrollo de la DM2 (Díaz y Delgado, 2016), si bien se ha visto la expresión

fenotípica de los defectos genéticos que condicionan las alteraciones en la secreción de insulina y en su acción periférica (Conget, 2002). Además de diversos factores ambientales como el sedentarismo, contaminación ambiental e incluso la alimentación, que tienen un papel importante para su desarrollo (Díaz y Delgado, 2016). Cualquiera que sea el defecto inicial de esta patología, el mal funcionamiento de las células beta pancreáticas es una condición evidente en el desarrollo final de la enfermedad y en su presentación clínica (Conget, 2002).

1.2.3. Diabetes gestacional

La diabetes gestacional (DG) se define como una intolerancia a los hidratos de carbono de severidad variable, que comienza y se diagnostica por primera vez durante el embarazo y finaliza una vez concluido el embarazo (Almirón, 2005). Es la tercera categoría clínica más importante en la clasificación de la diabetes (Duarte *et al.*, 2004). La raza, edad e índice de masa corporal son factores de riesgo para el desarrollo de esta patología (Ríos, 2014). Además, existe evidencia de que incluso hiperglucemias leves (García, 2008) representan un factor de riesgo severo para la embarazada y un problema de salud para el producto (Duarte *et al.*, 2004).

Por otro lado, la DG, a diferencia de los otros tipos de diabetes, no es causada por la falta de insulina, sino por efectos bloqueadores de otras hormonas en la insulina producida, denominada resistencia a la insulina y que por lo general se presenta a partir de las 20 semanas de gestación (Almirón, 2005). Esta patología altera diversos sistemas en el feto, incrementa el riesgo de anomalías esqueléticas como el síndrome de regresión caudal, anomalías espinales, composición corporal, incluyendo macrosomía y dificultad respiratoria (Arizmendi *et al.*, 2012).

1.2.4. Otros tipos de diabetes

Este grupo está constituido por 8 subgrupos, que en su totalidad son de baja frecuencia, menos del 5 % (Sanzana y Durruty, 2016). La forma en que se presentan estos tipos de DM varía dependiendo de la causa subyacente, algunas de las formas de este tipo son en extremo raras. En su mayoría, la historia familiar, los antecedentes patológicos y de la medición recibida ayuda a su identificación (Conget, 2002). Los 8 subgrupos están constituidos por defectos genéticos en la

función de las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas exocrino, endocrinopatías, infecciones, formas infrecuentes de diabetes mediada por inmunidad, otros síndromes genéticos ocasionalmente asociados a diabetes y las inducidas por fármacos y sustancias (Gross *et al.*, 2002).

1.2.5. Diabetes mellitus farmacológica o experimental

A pesar de que existe una gran variedad de información sobre los diferentes factores que desencadenan los mecanismos bioquímicos asociados a la DM, así como también las complicaciones y tratamientos, aún queda mucho por seguir estudiando. De esta forma, los modelos animales juegan un papel muy importante tanto en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos como en las estrategias para el diagnóstico y tratamiento. Estos modelos biológicos animales desarrollan muchas de las manifestaciones clínicas de la diabetes humana a través de distintos métodos (Bequer *et al.*, 2016). Algunos fármacos pueden inducir trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono, mediante distintos mecanismos. Pueden desarrollar diabetes en individuos predispuestos que ya tienen alguna alteración en la secreción o la acción de la insulina. Estos fármacos dañan de forma permanente las células β pancreáticas, un ejemplo es la estreptozotocina (STZ) en roedores (Sanzana y Durruty, 2016; Ramos y Domingo, 1994).

1.2.5.1. Estreptozotocina

La STZ es usada como uno de los métodos para la inducción de diabetes experimental en animales. Se trata de un antibiótico, que presenta propiedades diabetogénicas (Figura 1) (González *et al.*, 2010). La dosis diabetogénica es la cantidad de agente inductor que en un 80 % de los animales, les produce hiperglucemia sostenida, necrosis de las células β del islote pancreático y no causa daños a otros órganos (Ramos y Domingo, 1994).

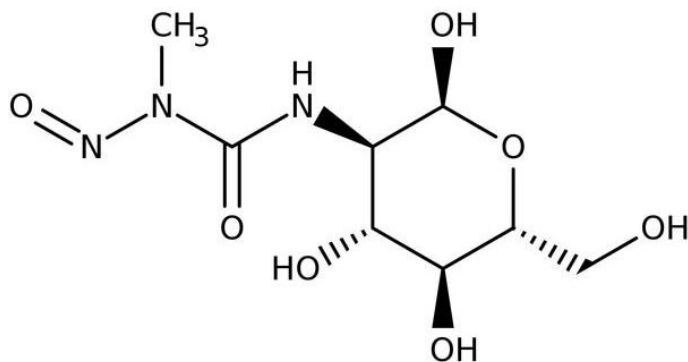


Figura 1. Estructura química de la estreptozotocina. Químicamente, la STZ es una metilnitrosourea derivada de la 2-desoxiglucosa.

Las nitrosoúreas, como la STZ producen daño al DNA a través de la alquilación de sitios específicos de sus bases generando radicales libres como por ejemplo el óxido nítrico (NO). También se ha descubierto que aumentan la producción del ión superóxido por el sistema xantina oxidasa de las células pancreáticas, así como también estimulan la producción de H_2O_2 que lleva como consecuencia la fragmentación del DNA en islotes pancreáticos aislados de rata (Mora *et al.*, 2009).

1.3. Epidemiología

La DM es una enfermedad que posee un gran impacto en la vida de las personas en México y el mundo. De acuerdo con la Federación Internacional de la Diabetes se estimó en el año 2019 una prevalencia mundial de 9.3 %, equivalente a 463 millones de adultos con diabetes y se calcula que aumente a 700 millones para el año 2045, con una prevalencia del 10.9 % (11.1 % en varones y 10.8 % en mujeres). Esta estimación es considerada mayor en la población urbana (10.9 %) que en la población rural (7.2 %) (CIAD, 2020). Por su parte, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) en 2012 y 2018 reportaron casos con diagnósticos previos de diabetes, teniendo prevalencias del 9.2 % para el 2012 y 10.3 % (9.1 % en varones y el 11.4 % en mujeres) para el año 2018 (Instituto Nacional de Salud Pública, 2018). De igual manera, la Federación Internacional de la Diabetes reportó que, en el año 2019, existían 12.8 millones de personas con diabetes en México y que para el año 2045, la cantidad de personas afectadas por diabetes aumentará a 22.9 millones, ocupando el sexto lugar en número de personas con diabetes a nivel mundial en ambos años (CIAD, 2020).

La DM es la segunda causa de muerte en México con 101,257 defunciones durante el año 2018 (INEGI, 2019). En México los estados con mayor número de personas afectadas por la DM2 son, Campeche, Tamaulipas, Hidalgo, CDMX y Nuevo León que corresponden el 12-14 % de la población (Instituto Nacional de Salud Pública, 2018).

1.4. Factores de riesgo

Existen factores de riesgo asociados al desarrollo de los diversos tipos de diabetes, algunos de ellos se pueden modificar o controlar (Tabla 2). Sin embargo, existen factores que no son modificables (Palacios *et al.*, 2012).

Tabla 2. Factores de riesgo para la diabetes tipo 2.

MODIFICABLES	NO MODIFICABLES
• Sobre peso y obesidad (central y total)	• Raza
• Sedentarismo	• Historia familiar
• Síndrome metabólico	• Edad
• Hipertensión arterial	• Sexo
• HDL-C bajo	• Historia de diabetes gestacional
• Hipertrigliceridemia	
• Factores dietéticos	

En la tabla se describen factores de riesgo asociados al desarrollo de algunos tipos de diabetes en donde algunos de ellos pueden ser modificados para su prevención y muchos otros no (Modificado de Palacios, Durán y Obregón 2012).

Como se mencionó anteriormente, en la DM1 existen factores que contribuyen a que un individuo sea susceptible a desarrollar la enfermedad, pero que por sí sola no la desencadenan (Conget, 2002; Alba *et al.*, 2004). Tal es el caso de los factores ambientales, inmunes y genéticos (Katsarou *et al.*, 2017). Mientras que los factores de riesgo que contribuyen a la prevalencia de la DM2, incluyen el sobrepeso u obesidad, edad, historia familiar, sedentarismo, dieta y antecedentes de diabetes gestacional (Tabla 2) (Palacios *et al.*, 2012).

La mayoría de los factores de riesgo relacionados a la diabetes contribuyen a un ambiente oxidante (Rains y Jain, 2011), el cual puede ser un elemento patogénico importante en la sensibilidad a la insulina (Cruz *et al.*, 2011), ya sea por alteraciones en la tolerancia a la glucosa o por un incremento a la resistencia a la insulina (Rains y Jain, 2011). Esto es porque durante el estado de estrés oxidante no se estimulan de forma adecuada las vías de señalización mediadas por esta hormona. Por lo que, el estrés oxidante es uno de los principales factores de riesgo que determinan el comienzo y la progresión de complicaciones tardías de la DM (Cruz *et al.*, 2011). Existe una gran cantidad de evidencia experimental que indica que la hiperglucemia, contribuye al mantenimiento de un ambiente oxidante (Rains y Jain, 2011).

1.5. Estrés oxidante

El estrés oxidante (EO) se define como, *“el resultado de reacciones metabólicas que utilizan O_2 y que representan el desbalance entre las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes que están presentes en el organismo, a favor de la producción y permanencia de las especies reactivas de oxígeno, manifestándose diversos estados fisiopatológicos”* (Sánchez y Méndez, 2013; Mora, *et al.*, 2009).

A pesar de que el oxígeno es uno de los gases más importantes y esenciales de la vida (Cárdenas y Pedraza, 2005), también es una especie altamente reactiva y que en exceso en las células es nocivo debido a la formación de especies reactivas generadas durante su oxidación (Sánchez y Méndez, 2013). Los radicales libres (RL), son especies químicas con un electrón desapareado, lo que le da una configuración inestable y, por lo tanto, una gran capacidad de reaccionar con otras moléculas, causando la oxidación de estas (Cruz, *et al.*, 2011). Existe un término que incluye a los RL derivados del oxígeno (O_2) y a otras especies no radicales (Venero, 2002), pero que son sus precursores o moléculas intermediarias en la formación de estos que son también potencialmente dañinos (Cruz, *et al.*, 2011) y es el de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Venero, 2002).

Las ERO, incluyen el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Cruz, *et al.*, 2011). A bajas concentraciones las ERO presentan efectos benéficos, pues participan en diferentes funciones fisiológicas de la célula; como defensa contra agentes infecciosos y sistema de

señalización celular. Sin embargo, el efecto dañino de los RL en los sistemas biológicos produce estrés oxidante generado por la deficiencia de antioxidantes e incremento de las ERO (Sánchez y Méndez, 2013).

Los antioxidantes en cambio, se puede definir como *“Cualquier sustancia que, a bajas concentraciones, comparado con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación del sustrato”* (Cárdenas y Pedraza, 2005). Al interactuar con el RL, el antioxidante le cede un electrón, lo oxida y se transforma en un RL débil no tóxico, impidiendo que el RL se una a otras moléculas. Los antioxidantes sacrifican su propia integridad molecular con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante. Los sistemas antioxidantes se han clasificado de acuerdo con su estructura química y función biológica en enzimáticos y no enzimáticos (Cruz, et al., 2011). El sistema enzimático se compone de enzimas que previenen la formación o bien neutralizan los RL degradándolos a moléculas menos nocivas mediante mecanismos bioquímicos específicos. El proceso inicia con la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 por la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), por otro lado, la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) que actúan convirtiendo el H_2O_2 en H_2O (Fig. 2).

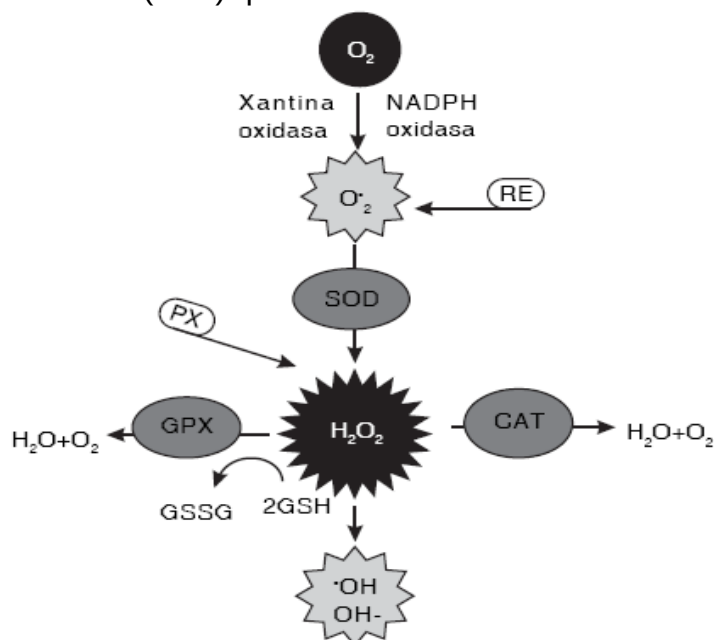


Figura 2. Mecanismo general de producción y neutralización de especies reactivas de oxígeno. El $O_2^{\bullet-}$ es degradado por la enzima SOD produciendo H_2O_2 el cual también es generado por los peroxisomas (PX). El H_2O_2 es sustrato de la enzima GPx que emplea como cofactor a dos moléculas de glutatión reducido (GSH) oxidándolo a GSSG en la reacción, para reducir el H_2O_2 a H_2O . La CAT es otra enzima que emplea como sustrato al H_2O_2 reduciéndolo a H_2O (Modificado de Sánchez y Méndez, 2013).

En cambio, el sistema antioxidante no enzimático se comprende de compuestos que actúan en conjunto para formar un sistema íntegro en donde la dieta es la mayor fuente de antioxidantes y microelementos para la síntesis de enzimas antioxidantes (Sánchez y Méndez, 2013), algunos ejemplos de estos antioxidantes no enzimáticos son el glutatión, ácido lipoico, la bilirrubina, las ubiquinonas, la vitamina E (alfa-tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), vitamina A, vitamina B, acetil-L-carnitina, coenzima Q10, etc. (López *et al.*, 2012). Mientras que varios metales como Cu, Zn, Mn y Fe participan como componentes o cofactores de enzimas antioxidantes; al igual que algunas vitaminas como ácido fólico, ácido ascórbico, α -tocofenol y β -caroteno, quienes actúan como atrapadores de las ERO (Sánchez y Méndez, 2013).

Dentro del metabolismo celular existen numerosos sitios de generación de especies oxidantes, una de ellas es la cadena respiratoria mitocondrial (CRM), cuya participación en el desarrollo de daño oxidativo ha sido objeto de muchas investigaciones, pues, se considera que la mitocondria es el sitio donde se genera la mayor cantidad de ERO que conduce EO, provocando defectos en el metabolismo de la mitocondria y algunas enfermedades (Martínez *et al.*, 2005).

1.6. Función mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo de origen endosimbionte, con genoma propio (Ortega *et al.*, 2021), forma parte de las células eucariotas ocupando hasta el 20 % de su volumen (De la Fuente, 2018). Tiene un tamaño variable entre 0.1 μm y 0.5 μm de diámetro, pero, pueden alcanzar una longitud máxima de 7 μm esto depende de la actividad de la célula (Sánchez y Arboleda, 2008). Su estructura es ovoide y se consideran inusuales debido a que está constituida por dos membranas que la divide en cuatro compartimentos distintos, los cuales son: una membrana externa, una membrana interna, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Figura 3) (De la Fuente, 2018).

La membrana externa es una bicapa lipídica, continua, uniforme y está formada por 40 % lípidos y 60 % proteínas que forman poros, llamados porinas o canales aniónicos dependientes de voltaje (Sánchez y Arboleda, 2008). Estos canales la hacen permeable a iones, metabolitos y moléculas pequeñas (Nelson y Cox, 2009). De igual manera, la membrana externa mitocondrial posee receptores de importación capaces de reconocer secuencia de direccionamiento de las

proteínas que están destinadas a la mitocondria, unos ejemplos de esto son: ADN y ARN polimerasas mitocondriales (Sánchez y Arboleda, 2008).

Por otro lado, la membrana interna difiere de la membrana externa en su organización molecular. Posee el 20 % de lípidos y el 80 % de proteínas (Ortega *et al.*, 2021). Se encuentra plegada formando diversas crestas que se consideran de suma importancia, ya que en ellas se lleva a cabo el transporte de los electrones para la producción de energía en forma de ATP (De la Fuente, 2018). Estas crestas pueden presentarse en estructuras lamelares o tubulares, cuyo número depende de la demanda energética de la célula (Sánchez y Arboleda, 2008). La membrana interna es impermeable a la mayoría de iones y moléculas pequeñas. Las especies que logran atravesar esta membrana lo hacen a través de transportadores específicos, esta permeabilidad selectiva le permite separar a los intermediarios y enzimas de las rutas metabólicas que ocurren en el citosol de los que se producen en la matriz (Nelson y Cox, 2009). Estructuralmente cuenta con un bajo contenido de colesterol y un alto contenido de cardiolipina, lo cual permite que entren los lípidos del citosol a la matriz para que se lleve a cabo la β -oxidación (Sánchez y Arboleda, 2008). Así mismo, estos lípidos junto con los aminoácidos y el piruvato son llevados a la matriz mitocondrial por transportadores específicos para ser incorporados al ciclo del ácido cítrico. También el ADP y P_i son transportados al interior de la matriz mientras que el ATP recién sintetizado es expulsado al exterior (Nelson y Cox, 2009).

Entre ambas membranas queda delimitado el espacio intermembranal, está compuesto por un líquido similar al hialoplasma y contiene todas las moléculas o sustancias que las porinas de la membrana externa dejan pasar; además, es rico en protones que provienen de los complejos de la cadena respiratoria. Por otro lado, la matriz mitocondrial es ligeramente densa y finamente granulosa debido a los gránulos densos de las acumulaciones de iones de Ca^{++} y Mg^{++} , también contiene moléculas de ADN y ARN mitocondrial, iones, metabolitos a oxidar y ribosomas tipo 70S (mitoribosomas), que realizan la síntesis de algunas proteínas (Sánchez y Arboleda, 2008).

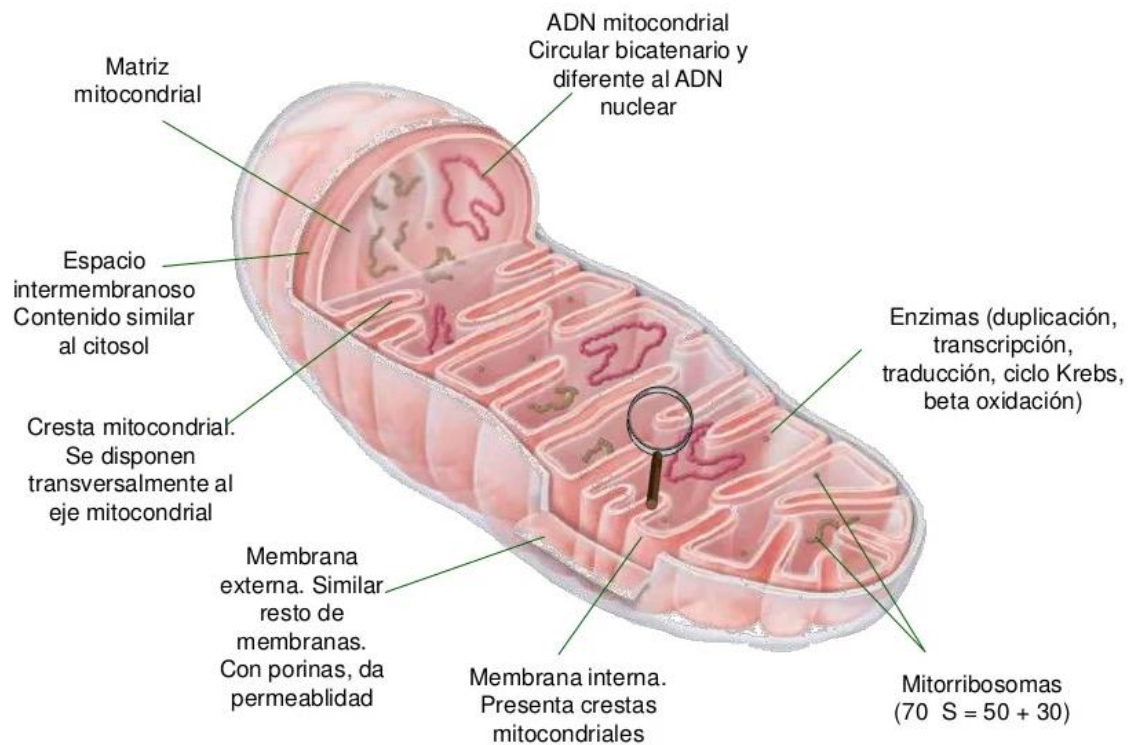


Figura 3. Estructura y partes de la mitocondria. Se muestra la forma representativa de la estructura de la mitocondria y alguna de las partes que la componen (Modificado de Parada, 2019).

Diferentes vías bioenergéticas contribuyen al metabolismo energético en la mitocondria, como la β -oxidación, el ciclo del ácido cítrico y la oxidación del piruvato, los cuales se llevan a cabo en la matriz mitocondrial, y la vía final común, es la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en la membrana interna a través de los complejos enzimáticos (Figura 4) y que generan el 80-90 % del ATP celular (Marín y Gondenthal, 2002). Todas estas rutas energéticas ocurren en la mitocondria a excepción de la glucólisis que tiene cabida en el citosol (Nelson y Cox, 2009).

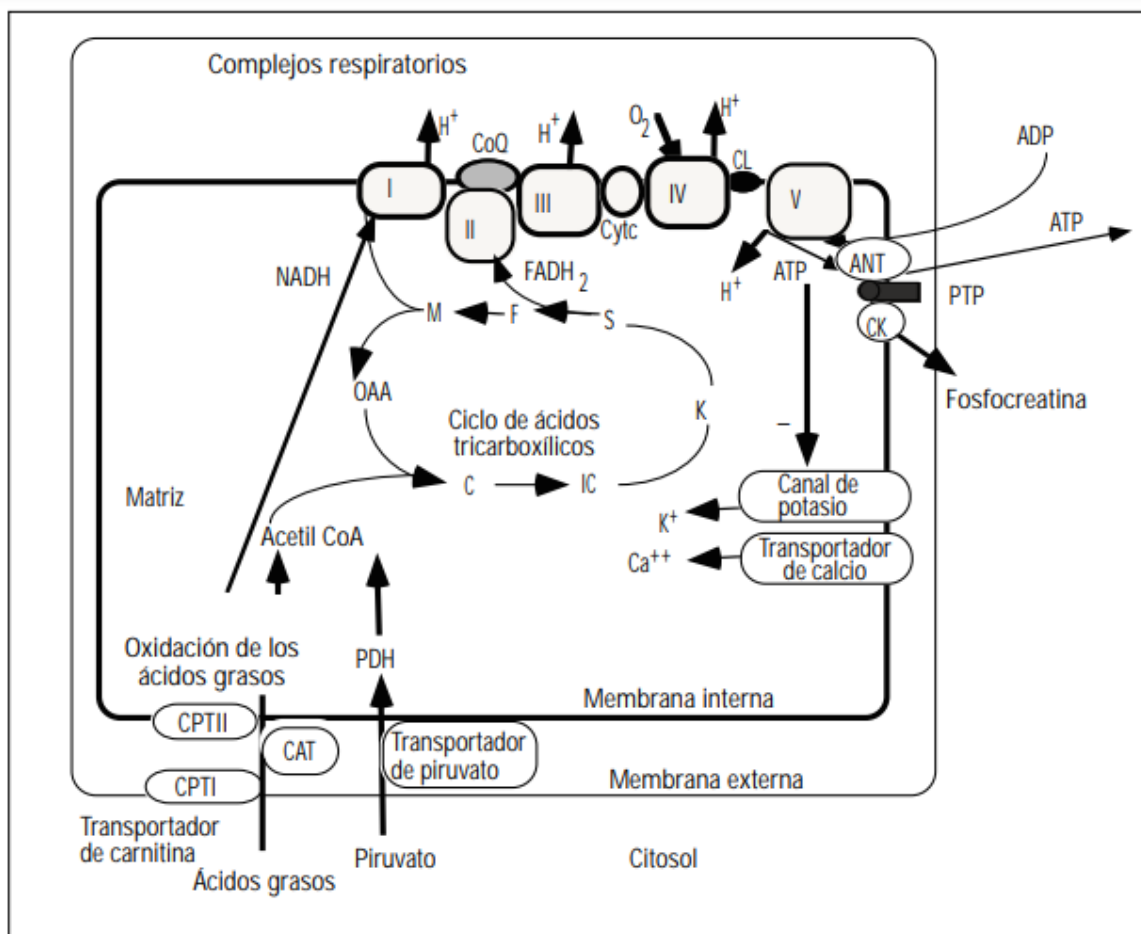


Figura 4. Vías bioenergéticas mitocondriales. Complejos respiratorios I-V localizados en la membrana interna mitocondrial con los componentes asociados en la transferencia de los electrones, coenzima Q (CoQ) y Citocromo C (Cit c). También se observan las vías de oxidación de piruvato, β-oxidación, de los ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs) que están asociados a la matriz (Modificado de García y Goldenthal, 2002).

1.6.1. Los transportadores de electrones actúan como complejos multienzimáticos

En los seres humanos, las mitocondrias contienen su propio DNA en forma de doble cadena, que engloban 16,569 pares de bases que codifican 13 proteínas, de las cuales constituyen una parte de los 5 complejos enzimáticos que participan en el transporte de los electrones y la fosforilación oxidativa (García y Goldenthal, 2002). Los transportadores de electrones que participan en la fosforilación oxidativa de la mitocondria se encuentran organizados en complejos supramoleculares incrustados en la membrana interna que se pueden separar

físicamente. Son cuatro complejos los que participan, siendo todos ellos capaces de catalizar la transferencia electrónica a través de una porción de la cadena. Los complejos I y II son los encargados de catalizar la transferencia de electrones hacia la ubiquinona, pero partiendo de dos dadores electrónicos diferentes: siendo el NADH para el complejo I y el FADH_2 (proveniente del ciclo del ácido cítrico) para el complejo II. El complejo III transfiere los electrones al citocromo c y el citocromo c los transfiere al complejo IV que completa la secuencia de la cadena respiratoria transfiriendo los electrones desde el citocromo c al O_2 (Figura 5) (Nelson y Cox, 2009).

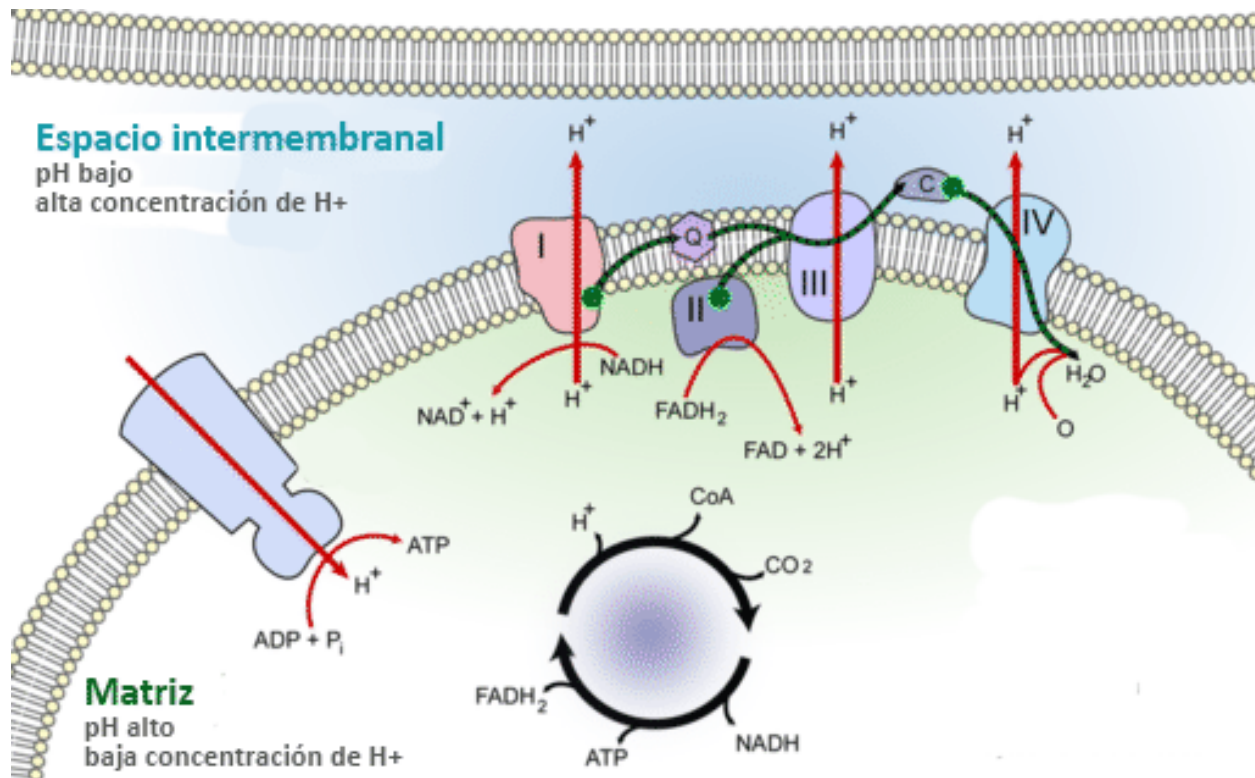


Figura 5. Elementos de la cadena respiratoria. Esta ruta metabólica se conforma por cuatro principales complejos enzimáticos, NAD deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), citocromo reductasa (complejo III) y citocromo oxidasa (complejo IV) y se encuentran conectados entre sí por dos transportadores de electrones móviles que son la ubiquinona y el citocromo c (Modificado de Merino y Noriega, 2011).

1.6.2. Complejo I

El complejo I también es llamado NADH: ubiquinona oxidorreductasa o NAD deshidrogenasa (Figura 6), es una enzima que tiene forma de L, con uno de sus brazos en la membrana y el otro se prolonga hacia la matriz. En mamíferos está compuesta por aproximadamente 42 cadenas polipeptídicas diferentes de las cuales se encuentra una flavoproteína que contiene flavín mononucleótido (FMN) y como mínimo seis centros Fe-S. Este complejo cataliza dos procesos simultáneos: a) la transferencia exergónica de un ión hidruro que proviene del NADH hacia la ubiquinona y un protón de la matriz y b) la transferencia endergónica de los cuatro protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana (Nelson y Cox, 2009). La reacción que cataliza este complejo es vectorial; es decir que mueve los protones desde una localización específica a otra, por esto la matriz se carga de forma negativa debido a la salida de los protones mientras que el espacio intermembrana es cargado positivamente (Figura 6) (Nelson y Cox, 2009).

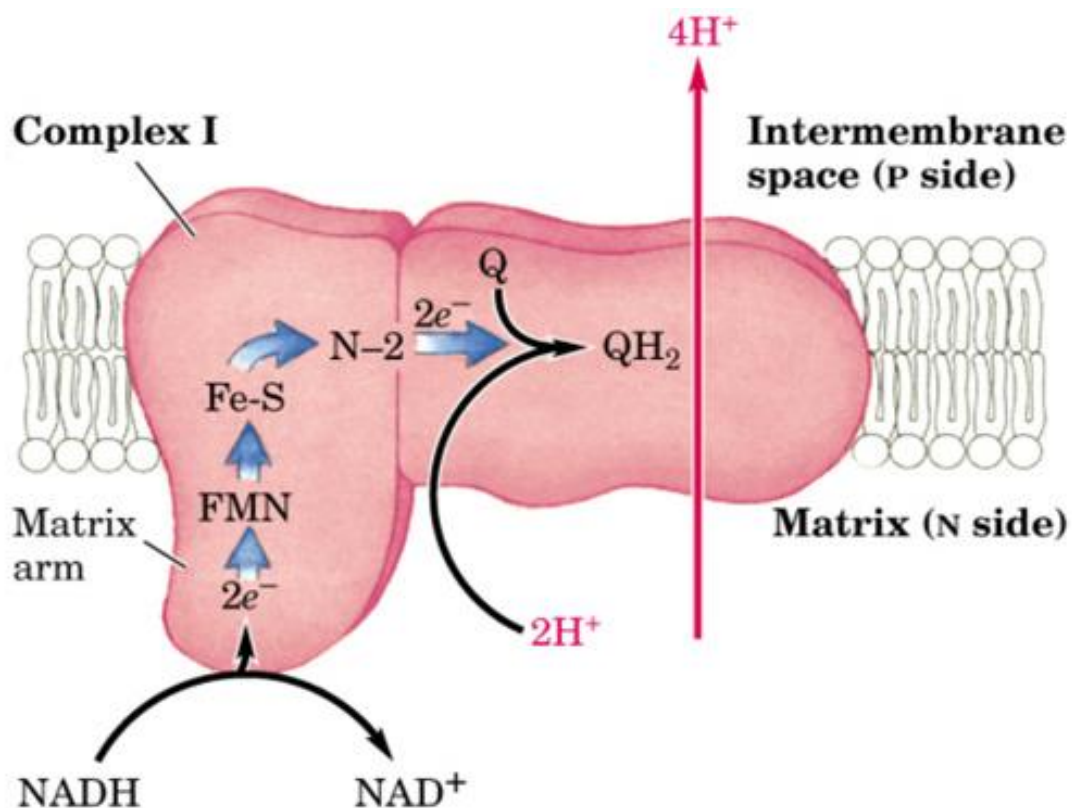


Figura 6. Estructura gráfica del complejo I mitocondrial. Se muestra la forma representativa de la estructura del complejo I y las funciones que lleva a cabo en el proceso de la cadena de transportes electrones (Modificado de Merino y Noriega, 2011).

1.6.3. Complejo II

El complejo II también es mencionado en la literatura como succinato deshidrogenasa (Figura 7) y es la única enzima que se encuentra ligado a la mitocondria proveniente del ciclo del ácido cítrico. Está formado por cinco grupos prostéticos y cuatro subunidades proteicas diferentes. Las subunidades C y D son proteínas integrales de membrana, ambas poseen tres hélices transmembrana y las subunidades A y B se extienden hacia la matriz; ambas contienen tres centros 2Fe-2S, un sitio de unión para el sustrato succinato y un FAD unido. Cuenta con un sitio de unión a la ubiquinona y un grupo hemo (hemo *b*) (Nelson y Cox, 2009). De acuerdo con Nelson y Cox (2009), el grupo hemo *b* no se encuentra en la ruta directa de transferencia de los electrones, sino que podría desarrollar la habilidad de reducir la frecuencia con la que los electrones “se pierden” fuera de la ruta, es decir, desplazándose del succinato al oxígeno molecular para finalmente producir las ERO (Fig. 7).

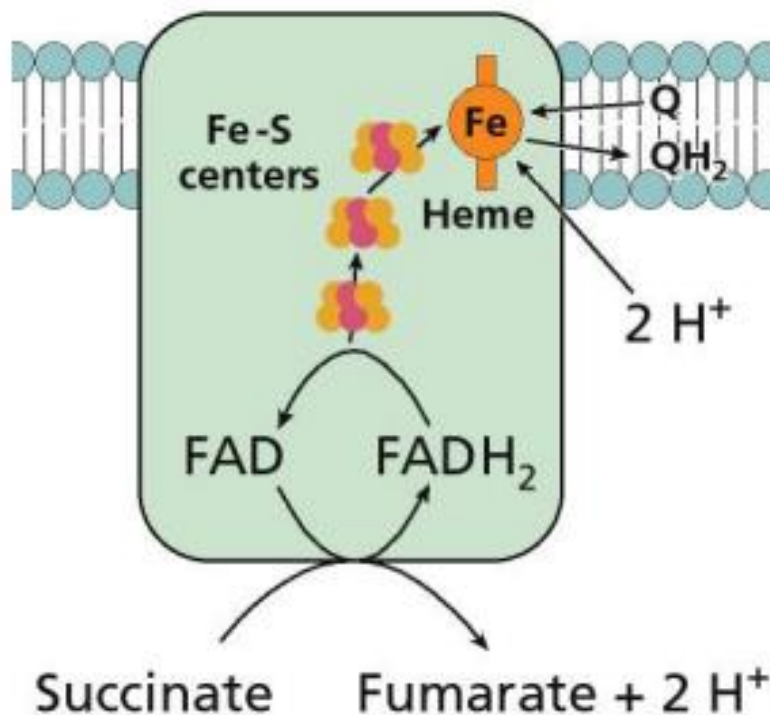


Figura 7. Estructura gráfica del complejo II mitocondrial. Se muestra la forma representativa de la estructura del complejo II y las funciones que lleva a cabo en el proceso de la cadena de transportes electrones (Modificado de Merino y Noriega, 2011).

1.6.4. Complejo III

El complejo III también denominado complejo citocromo *bc₁* o ubiquinona: citocromo c oxidorreductasa (Figura 8), su función es la de transferir los electrones desde el ubiquinol (QH_2) al citocromo c con su consecuente transporte de electrones vectorial desde la matriz al espacio intermembrana (Nelson y Cox, 2009). La unidad funcional de este complejo es un dímero con las dos unidades monoméricas del citocromo *b* formando una especie de “cueva” en el centro de la membrana, esto le permite a la ubiquinona la libertad de movimiento desde la matriz de la membrana hacia el espacio intermembrana, esto ocurre mientras lanza protones y electrones a través de la membrana mitocondrial interna (Figura 8) (Nelson y Cox, 2009).

La secuencia es simple: el QH_2 se oxida a *Q*, al mismo tiempo que se reducen dos moléculas del citocromo c. Luego de que su único hemo acepte un electrón del complejo III, este se desplaza hacia el complejo IV para cederle el electrón (Nelson y Cox, 2009).

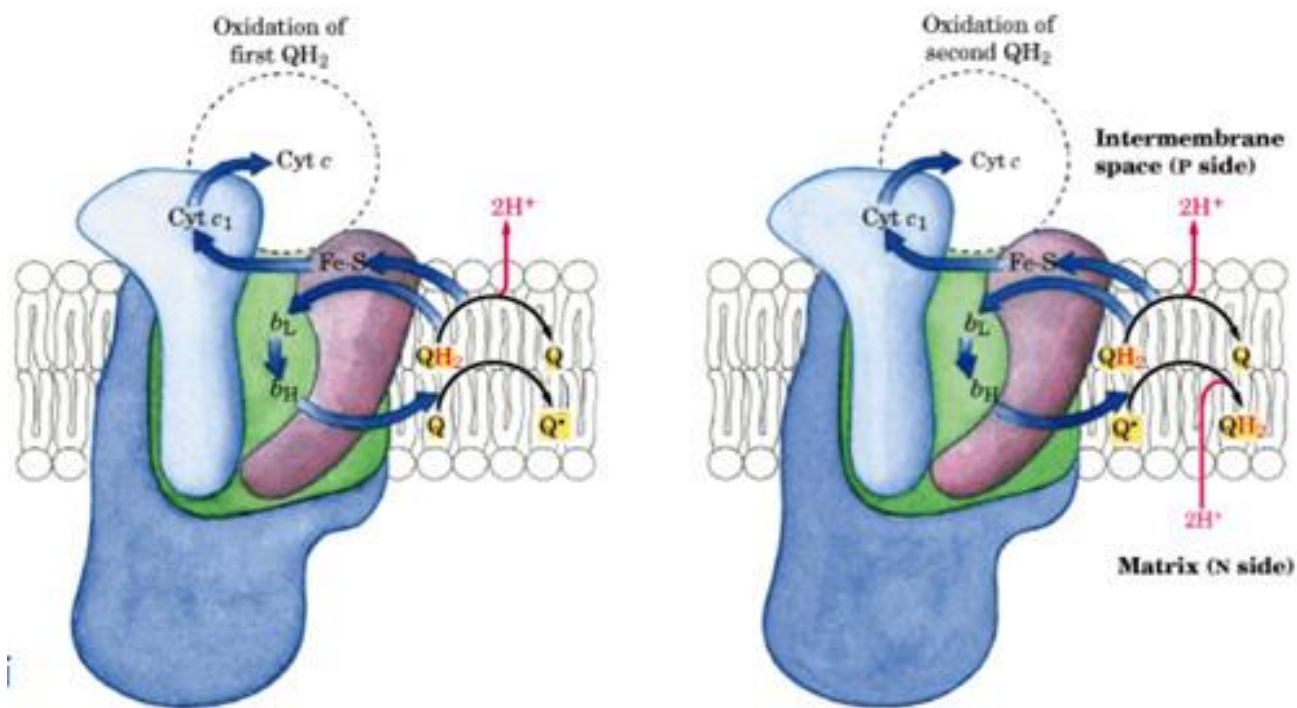


Figura 8. Estructura gráfica del complejo III mitocondrial. Se muestra la forma representativa de la estructura del complejo III y las funciones que lleva a cabo en la cadena de transportes electrones (Modificado de Merino y Noriega, 2011).

1.6.5. Complejo IV

Para el último paso de la cadena transportadora de electrones, el complejo IV o también conocido con el nombre de citocromo oxidasa (Figura 9), transporta los electrones que van desde el citocromo C al O_2 para reducirlo a H_2O . Es una enzima muy grande, en donde la subunidad II está compuesta por dos iones Cu que forman complejo con los grupos $-SH$ de dos residuos de Cys en un centro binuclear (Cu_A). La subunidad I está compuesta por dos grupos hemo (α y α_3) y un ión Cu (Cu_B). El hemo α_3 junto con el Cu_B forman el segundo centro binuclear el cual acepta los electrones del hemo α y finalmente los transfiere al O_2 unido al hemo α_3 (Figura 9) (Nelson y Cox, 2009).

Debido a lo anteriormente mencionado, la mitocondria es considerada parte importante de la vida y la muerte celular. En ella se llevan a cabo funciones importantes para mantener el equilibrio metabólico, ya que provee la energía necesaria para casi todos los procesos celulares, energía que finalmente permite llevar a cabo funciones como la contracción muscular, mantener los gradientes iónicos, para poder llevar a cabo acumulación y secreción de hormonas y neurotransmisores, además de que participa en la muerte celular por el mecanismo de apoptosis. Por esta razón es evidente que cualquier alteración en las funciones de la mitocondria pueda detonar una enfermedad, provocando alteraciones en su metabolismo o incluso la muerte celular (Martínez *et.al.*, 2005).

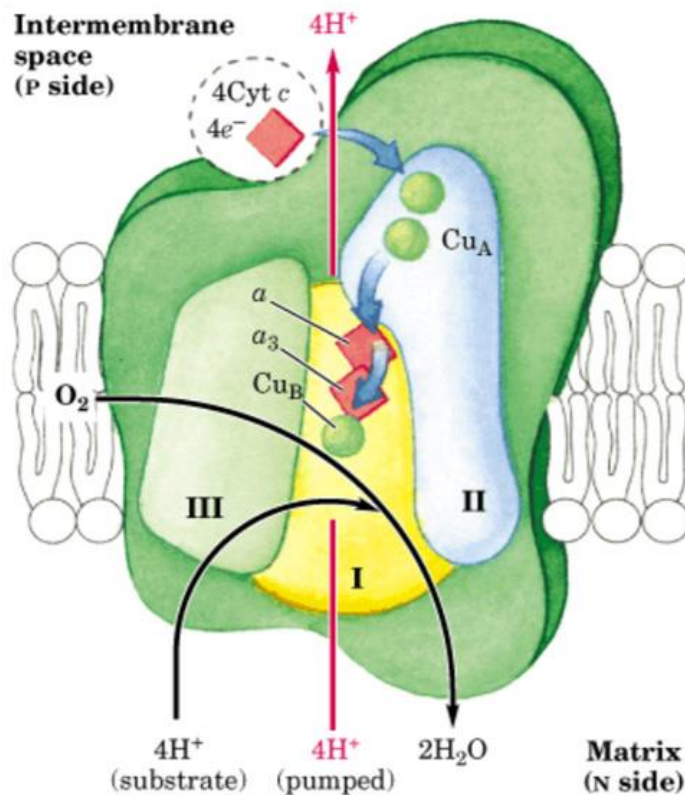


Figura 9. Estructura gráfica del complejo IV mitocondrial. Se muestra la forma representativa de la estructura del complejo IV y las funciones que lleva a cabo en la cadena de transportes electrones (Modificado de Merino y Noriega, 2011).

1.7. Estrés oxidante en la diabetes

La mitocondria es el orgánulo celular donde se llevan a cabo diversas reacciones bioquímicas importantes del metabolismo intermediario celular, pero la función más importante que se le atribuye es la respiración celular que permite la síntesis de la mayor parte de ATP necesario para los procesos que requieren la energía. Sin embargo, como parte de este proceso de respiración, se forman ERO (Guzmán *et al.*, 2006). Las ERO y el establecimiento de EO afectan a una gran cantidad de funciones fisiológicas que participan en el desarrollo de enfermedades humanas de tipo crónico degenerativas con impacto epidemiológico (Figura 10) (Sánchez y Méndez, 2013).



Figura 10. Esquema del desarrollo de algunas enfermedades causadas por la producción de radicales libres. Ejemplos de la generación exógena de radicales libres y efectos adversos del estrés oxidativo en la patogénesis de diversas enfermedades (Modificado de Sánchez y Méndez, 2013).

Esta producción de ERO es debida a una disfunción en la mitocondria de la cual han sido identificadas los procesos de enfermedad y tienen un papel importante, por ejemplo, el daño mitocondrial en células β -pancreáticas causa diabetes (Martínez *et al.*, 2005). Aunque existen diversas evidencias experimentales en donde indican que el EO puede detonar el comienzo y la progresión de complicaciones tardías de la DM, aún hay disputa acerca de si el incremento de este fenómeno está asociado o es origen en el desarrollo de esta enfermedad metabólica (Nicholls, 2002). Existen diferentes mecanismos que se encuentran implicados en el incremento del EO en la diabetes mellitus, como: la glucación de proteínas, la activación de la vía de los polioles, la disminución de las defensas antioxidantes y la autooxidación de la glucosa (Cruz *et al.*, 2011). En este último, cuando la glucosa esta elevada altera la función de las proteínas y junto con la autooxidación de los azúcares dan pie a la producción de ERO, por la disminución de la hemo-oxigenasa-1 que afecta a las células β -pancreáticas, promoviendo de esta manera el mecanismo fisiopatológico de esta enfermedad (Sánchez y Méndez, 2013).

1.8. Complicaciones de la diabetes

Los pacientes que tienen diabetes mellitus desarrollan complicaciones a largo plazo o crónicas (Mediavilla, 2001). Durante esta patología los órganos del cuerpo se encuentran afectados de forma crónica por múltiples factores, como, por ejemplo; hiperglucemia crónica, estrés oxidante, hipoxia tisular, genética (Páez *et al.*, 2016), dislipidemia, hipertensión arterial, entre otros (Mediavilla, 2001). Las principales complicaciones crónicas a nivel vascular de la diabetes (Figura 11) se clasifican en (Páez *et al.*, 2016): a) macrovasculares (equivalente a arteriosclerosis), quienes afectan de forma general a las arterias produciendo, enfermedad cardíaca coronaria, cerebrovascular y vascular periférica; b) microvasculares, que incluyen la nefropatía, retinopatía y neuropatía, y c) pie diabético, esta complicación es consecuencia de la neuropatía y/o de la afección vascular de origen macroangiopático (Fig. 11) (Flores y Aguilar, 2006).

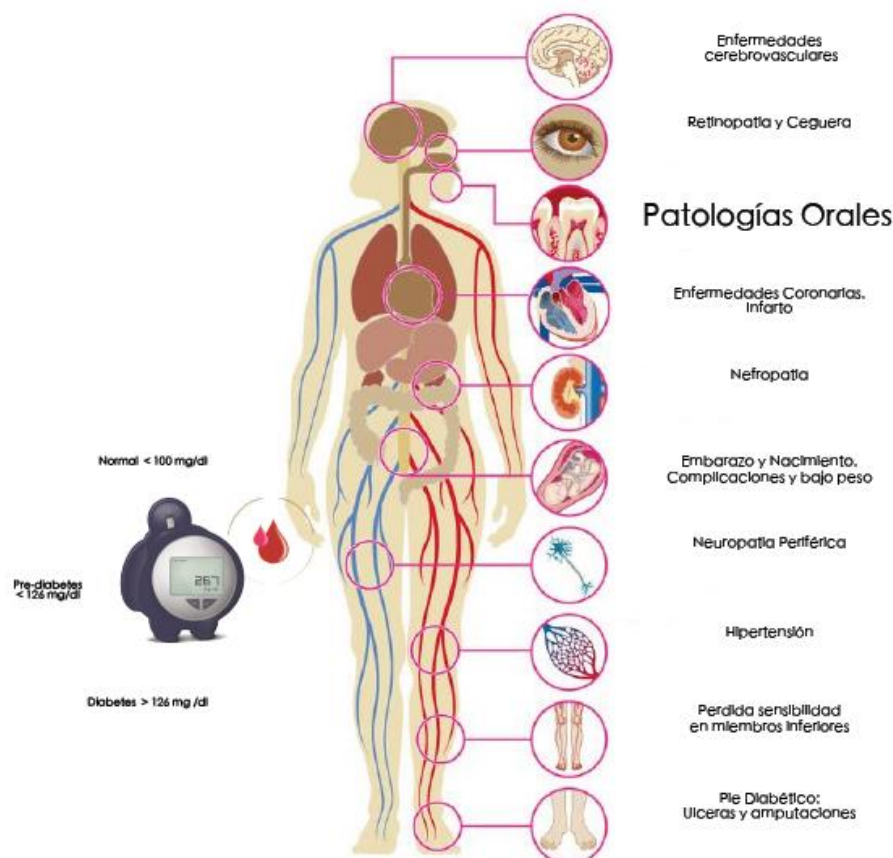


Figura 11. Complicaciones crónicas de la diabetes. Complicaciones microvasculares y macrovasculares más comunes que genera la diabetes (Tomado de Díaz, 2012).

Las consecuencias de las complicaciones macrovasculares conforman un incremento de 3 a 4 veces en la morbilidad y mortalidad cardiovascular, siendo la principal causa de muerte en los diabéticos. Por otro lado, las consecuencias de las complicaciones microvasculares y del pie diabético afectan en gran parte la calidad de vida de estos pacientes (Mediavilla, 2001).

Las enfermedades crónicas que se relacionan con el hígado presentan una alta morbilidad a nivel mundial, su prevalencia e incidencia varían dependiendo de la población estudiada (Miranda y Reza, 2008). Las complicaciones hepáticas en las personas diabéticas son comunes, el estrés oxidante como resultado de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos que provienen de los triglicéridos y del aumento de citoquinas inflamatorias, se consideran los factores causales de fibrosis, inflamación y daño hepático (Quevedo *et al.*, 2019).

1.9. Generalidades del hígado

El hígado es el órgano sólido de mayor tamaño del organismo (Figura 12) (Rodríguez *et al.*, 2017), tiene una coloración parda rojiza, presenta una superficie externa lisa, está constituido por un parénquima friable que se encuentra rodeado de una cápsula fibrosa delgada (cápsula de Glisson) (Castaing y Veilhan, 2006). Tiene un peso aproximado de 1400-1800 g dependiendo del peso corporal y el sexo, lo que supone alrededor del 2 % del peso de una persona adulta (Sibulesky, 2013), mientras que en roedores el hígado comprende del 4-5 % del peso corporal (Möller y Vázquez, 2011). La irrigación sanguínea que recibe depende del 75 % de la vena porta y el 25 % de la arteria hepática (Manterola *et al.*, 2017).

El hígado, realiza diversas funciones en su sistema (Figura 12), además de tener funciones digestivas y excretoras que se relacionan con la formación de bilis, es un órgano importante en los procesos metabólicos. Esto gracias a su posición estratégica y a sus funciones metabólicas. Además de que regula la homeostasis calórica y el metabolismo proteico, este órgano desempeña una función importante en el metabolismo de vitaminas, hormonas y xenobióticos, además de almacenamiento de metales, vitaminas y en la respuesta inmunitaria (Fig. 12) (Pozo *et al.*, 2022).

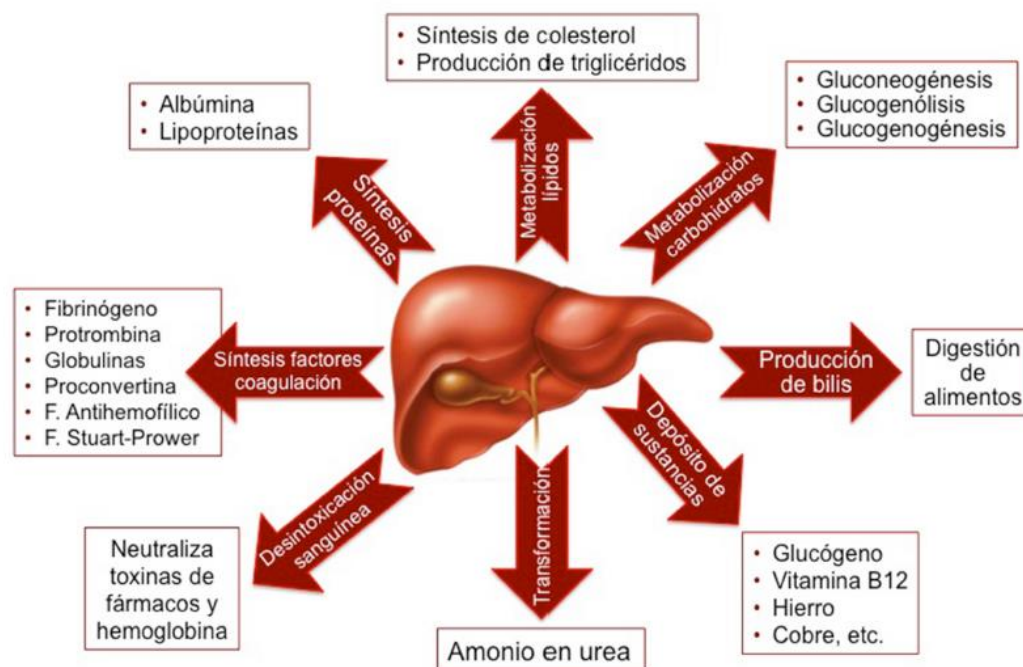


Figura 12. Esquema de la fisiología del hígado. Se muestra el conjunto de propiedades y funciones del hígado (Tomado de Manterola *et al.*, 2017).

En humanos la anatomía morfológica “clásica” del hígado en la apariencia externa (Castaing y Veilhan, 2006), está dividido por un ligamento falciforme que lo divide en dos lóbulos principales, un lóbulo derecho mayor y un lóbulo izquierdo más pequeño (Figura 13) (Sibulesky, 2013). En cambio, en la superficie posterior el hilio hepático delimita dos lóbulos accesorios (cuadrado y caudado o de Spigel) (Castaing y Veilhan, 2006).

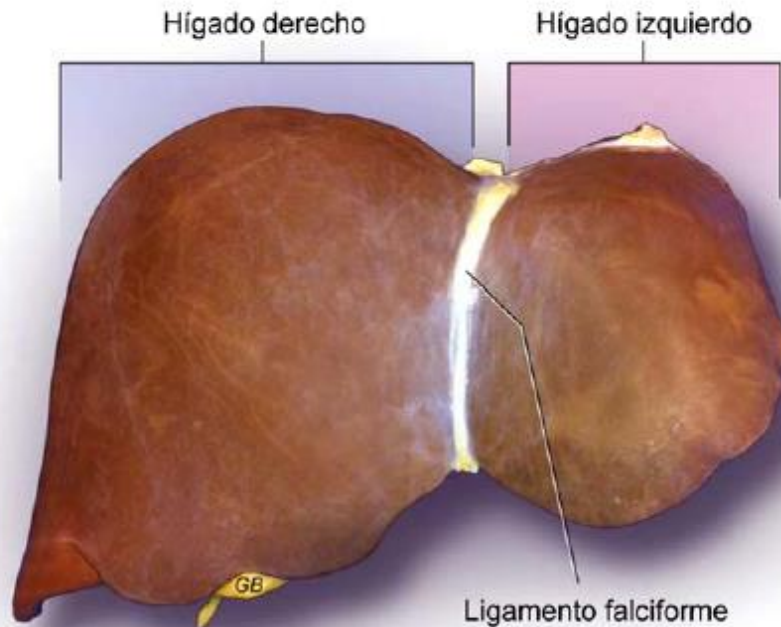


Figura 13. Anatomía morfológica del hígado. Representación de la estructura y las partes principales en que se divide el hígado (Tomado de Sibulesky, 2013).

De acuerdo a la clasificación de Couinaud, el hígado se divide en ocho segmentos funcionales independientes (Figura 14), cada uno de estos segmentos cuenta con su propio pedículo portal, que está formado por una rama arterial hepática, una rama de la vena porta y un conducto biliar y, por otro lado, está la rama venosa hepática que lleva el flujo de salida (Rodríguez *et al.*, 2017). El segmento I, corresponde al lóbulo de Spigel; el segmento II, corresponde al sector posterior izquierdo; el segmento III y IV, constituyen el sector anterior izquierdo, donde el segmento III se localiza a la izquierda y el segmento IV a la derecha de la fisura umbilical y del ligamento redondo; el segmento V, corresponde la parte inferior y el VIII a la parte superior del sector anterior derecho; el segmento VI,

conforma la parte inferior y el segmento VII a la parte superior del sector posterior derecho (Castaing y Veilhan, 2006).

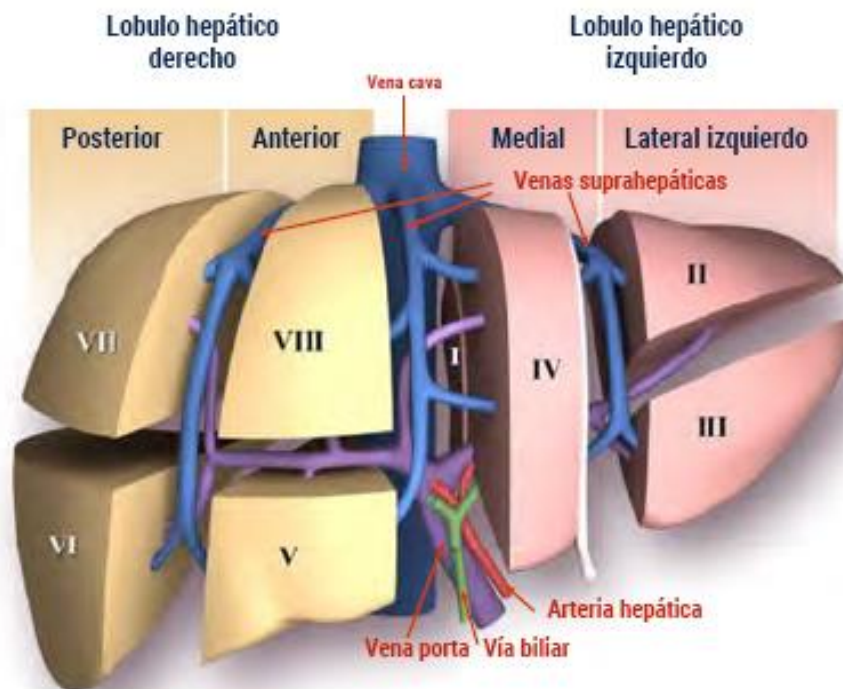


Figura 14. Segmentos hepáticos, venas suprahepáticas, vena porta y vía biliar. Representación clínica de todos los segmentos hepáticos funcionales, rama arterial, rama vena porta y conducto biliar que constituyen el funcionamiento del hígado (Tomado de Rodríguez *et al.*, 2017).

El hígado es uno de los órganos centrales para la regulación de la glicemia, es responsable del 90% de la producción endógena de glucosa a través de diversas rutas metabólicas como la gluconeogénesis y glicogenolisis. Es decir, que en estados de ayuno produce la glucosa necesaria para el metabolismo celular. Debido a la importancia de la funcionalidad del hígado en la homeostasis de la glicemia, se espera que cualquier enfermedad que pueda afectarlo tenga la potencialidad de producir alteraciones en el metabolismo de la glucosa, principalmente en personas con DM2, pero, que también se pueden desarrollar en personas sanas (Buil, 2015). La DM se asocia fuertemente con las enfermedades crónicas hepáticas (ECH), desde las alteraciones de enzimas hepáticas hasta carcinoma hepatocelular, hígado graso no alcohólico (EHGNA), esteatohepatitis no alcohólico (EHNA) y cirrosis (Ramos *et al.* 2017).

La EHGNA es generalmente asintomática, antes considerada como una enfermedad benigna, en la actualidad ya no es considerada de esta forma ya que

en una considerable proporción de los pacientes con EHGNA suele evolucionar a EHNA, así como también en un porcentaje considerable de pacientes con EHGNA puede desarrollar cirrosis hepática, con el riesgo inherente de desarrollar carcinoma hepatocelular (Ramos *et al.* 2017). Estudios actualmente proponen que el EHGNA es un factor de riesgo importante en el desarrollo de DM2, principalmente cuando el EHGNA se presenta en combinación con obesidad y resistencia a la insulina (Aguilera, 2018). Diversos mecanismos que implican la resistencia a la insulina se asocian con el desarrollo de esteatosis hepática (Ramos *et al.*, 2017). De esta forma, la resistencia a la insulina periférica desencadena un aumento en el flujo de los ácidos grasos libres al hígado, esto lo hace a través de la reducción del efecto supresor de la insulina sobre la lipólisis en el tejido adiposo, mientras que la resistencia a la insulina hepática promueve la acumulación de lípidos en el hígado favoreciendo el desarrollo de esteatosis y su progresión a enfermedad de hígado no alcohólica (Buil, 2015).

En el hígado, la insulina fomenta la lipogénesis de novo y la gliceroneogénesis, estos procesos se encuentran aumentados en la EHGNA, lo que contribuye a la síntesis de triglicéridos hepáticos y el desarrollo de esteatosis (Ramos *et al.*, 2017). La esteatosis hepática simple tiene muy pocas complicaciones, pero si no es tratada puede progresar a EHNA, la cual a su vez si no es controlada, puede continuar a fibrosis y pasar a ser un factor de riesgo alto para el desarrollo de cirrosis y cáncer hepático (Aguilera, 2018).

1.10.Tratamiento farmacológico de la diabetes

El fundamento del tratamiento para la diabetes está dirigido a aliviar los síntomas, mejorar la calidad de vida de los pacientes y prevenir las complicaciones agudas y crónicas (Santa y Zacarías, 2002). A los pacientes que padecen diabetes se les debe ofrecer educación continua, ordenada y sistematizada con objetivos claros en el diagnóstico y durante la evolución de la enfermedad (Selli *et al.*, 2005). Un tratamiento médico nutricional es una de las principales recomendaciones para favorecer la disminución del peso y el control glucémico, dentro de los cuales se destacan las modificaciones en la alimentación, el ejercicio y las terapias conductuales (Velázquez *et al.*, 2013). Sin embargo, con el paso del tiempo todo ello no basta para mantener un control glucémico adecuado, debiendo considerarse la administración de un tratamiento farmacológico en los pacientes, tras un periodo razonable según su progreso después del diagnóstico (Perel, 2018).

En pacientes con DM2, con o sin obesidad, el tratamiento con metformina reduce de 1-2 % la HbA1c. Cuando los pacientes tienen obesidad el uso de la biguanida se asocia con pérdida de peso de 1-5 kg, sin aumentar el riesgo de hipoglucemia. La metformina es el fármaco más utilizado dentro del grupo de las biguanidas gracias a que tiene menor riesgo de asociarse a acidosis láctica, a nivel gastrointestinal reduce la absorción de la glucosa, estimula la captación de glucosa por las células, incrementa la unión de insulina al receptor e inhibe la gluconeogénesis.

Ante una hiperglucemia posprandial, están indicados los inhibidores de alfa-glucosidasa; un ejemplo, es la acarbosa, actúan retrasando la digestión de carbohidratos, mudando la absorción a las partes más distales del colon y el intestino delgado, permiten ampliar el tiempo a las células beta para aumentar la secreción de insulina, esto lo hacen retrasando la entrada de glucosa a la circulación sistémica. El uso de tiazolidinedionas aumenta la sensibilidad a la insulina sin afectar su secreción, su mecanismo de acción promueve la captación de glucosa en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado a través de los receptores celulares nucleares PPAR (Receptores activados por proliferadores peroxisomales); un ejemplo, de este tratamiento es la rosiglitazona. Además, los pacientes con DM1 utilizan la terapia con insulina para su supervivencia ya que es necesaria para el metabolismo normal de carbohidratos, grasas y proteínas, a diferencia de los pacientes con DM2 que no la necesitan; sin embargo, con el paso del tiempo pueden llegar a necesitarla, ya que van disminuyendo su producción de insulina, haciendo necesaria la administración exógena de insulina para su control glucémico (Vinces *et al.*, 2019; Santa y Zacarías, 2002; Velázquez *et al.*, 2013; Selli *et al.*, 2005 y Perel, 2018).

Como ya se habló anteriormente, la DM es una enfermedad multifactorial que está ligada al metabolismo energético, principalmente en el manejo de carbohidratos y grasas, no obstante, la gran mayoría de micronutrientes también están involucrados ya sea como la causa o efecto de esta enfermedad. Como se sabe, la principal causa y consecuencia de la diabetes es el desequilibrio que existe entre la formación de RL y el control por el lado de los antioxidantes naturales (Valdés *et al.*, 2015). Desde hace varios años, se encontró que las deficiencias de vitaminas se correlacionan con alteraciones metabólicas (Riverón y Fernández, 2017), como el aumento del estrés oxidante, la resistencia a la insulina la disfunción endotelial y el deterioro del metabolismo de la glucosa y los lípidos, las cuales conducen al desarrollo de diversas patologías relacionadas con el síndrome metabólico (Aguilera *et al.*, 2022). Ya que su función como cofactores en

las rutas metabólicas de la glucosa, la función β -pancreática celular y la cascada de señalización de la insulina sugieren que su deficiencia tiene un papel importante en el desarrollo de la diabetes (Via, 2012).

Las vitaminas son compuestos químicos que los seres humanos no podemos sintetizar o solo en cantidades mínimas y que son muy esenciales para una gran cantidad de rutas metabólicas. Durante los últimos años numerosos estudios en cultivos celulares y animales de laboratorio han demostrado evidencias de que las vitaminas tiene una gran diversidad de funciones como, modular la expresión génica, la proliferación y la diferenciación celular, etc. Además, las vitaminas en concentraciones farmacológicas demuestran sus beneficios en enfermedades que se relacionan con el síndrome metabólico, de los cuales están propuestos principalmente la modulación de la expresión génica y las vías de señalización que producen efectos como, antihipertensivos, antiinflamatorios, antioxidantes, hipolipemiante e hipoglucemiante (Aguilera *et al.*, 2022).

1.11. La biotina

La biotina, también es llamada vitamina B7 o H, pertenece al grupo de las vitaminas hidrosolubles del complejo B, indispensable para el metabolismo y el crecimiento celular (Aguilera y Manuel, 2016). Es una vitamina que participa como coenzima en el metabolismo intermediario y se une covalentemente a las carboxilasas (Riverón y Fernandez, 2017). La pueden sintetizar las plantas, la mayoría de las bacterias y algunos hongos. Es un compuesto heterocíclico, conformado por un anillo de imidazolidona enlazado a un anillo de tetrahidrotiofeno y lateralmente unido con una cadena de ácido valérico (Figura 15) (Aguilera *et al.*, 2013).

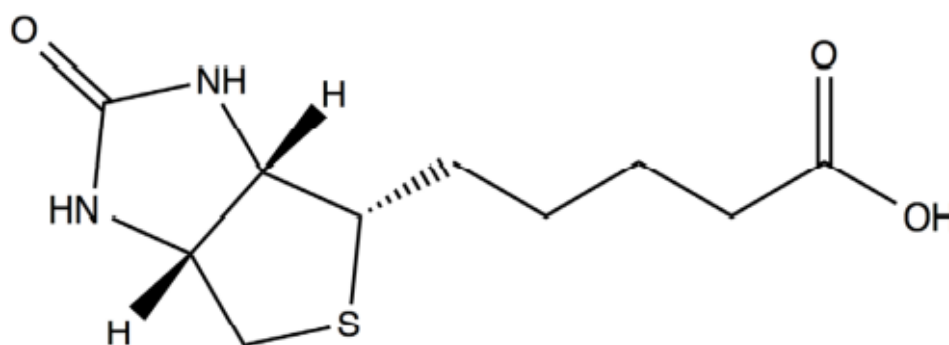


Figura 15. Estructura química de la biotina. Compuesto heterocíclico, con un anillo de imidazolidona, unido a un anillo de tetrahidrotiofeno y con un ácido valérico unido lateralmente (Tomado de Aguilera *et al.*, 2013).

La biotina en mamíferos actúa como cofactor de cuatro carboxilasas (Rodríguez, 2000): piruvato carboxilasa (PC), que participa en la gluconeogénesis; propionil-CoA carboxilasa (PCC) implicada en el catabolismo de los ácidos grasos de cadena impar y de los aminoácidos de cadena ramificada; metilcrotonil-CoA carboxilasa (MCC) que es esencial para la degradación de la leucina y la acetil-CoA que participa en la biosíntesis y elongación de los ácidos grasos (Valdés, 2015). Las tres primeras son enzimas mitocondriales y la última es una enzima citosólica (Rodríguez, 2000). Las carboxilasas son sintetizadas como apocarboxilasas (Fig. 16) y participan en diversos procesos metabólicos como la gluconeogénesis, la lipogénesis, la oxidación lipídica y el catabolismo de aminoácidos (Aguilera *et al.*, 2013). En mamíferos, la biotina tiene un papel muy importante en la proliferación y diferenciación celular, así como también su participación en la regulación de la síntesis de ciertas proteínas, de las cuales se encuentran varias enzimas reguladoras del metabolismo de la glucosa (Rodríguez, 2000).

Conocer los mecanismos moleculares en donde la biotina pueda tener un efecto hipotensivo, un efecto hipoglucémico y un efecto hipolipemiante, permitirá determinar su posible uso como auxiliar en los tratamientos utilizados en las enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico, como la hipertensión, dislipidemias o incluso la diabetes (Aguilera y Manuel, 2016), pues, en un estudio en ratas diabéticas con suplementos de biotina resultó tener efectos antidiabéticos, previniendo la resistencia a la insulina a través de un aumento en la expresión de la proteína transportadora de glucosa GLUT4 (Valdés, 2015), parte del mecanismo de este fenómeno involucra la expresión del gen de la hexocinasa inducida por la biotina que aumenta la capacidad hepática de la glucosa, además esta vitamina regula la transcripción del receptor de insulina mejorando la función pancreática celular (Via, 2012). Por otro lado, en la actualidad, se sabe que la biotina modifica la expresión génica y los procesos biológicos en concentraciones farmacológicas. Las acciones que ejerce la biotina en la expresión génica se producen a nivel transcripcional y traduccional, con efectos en diversos procesos como biológicos, metabólicos, en la reproducción y el desarrollo (Riverón y Fernández, 2027).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Se han comprobado en modelos de rata y ratón que la biotina a concentraciones de 2 mg/kg de peso y 14 mg/kg de peso, disminuye la presión arterial (Larrieta *et al.*, 2012; Aguilera y Fernández, 2012), así como también mejora la acción y secreción de insulina (Juturu y Komorowski, 2006) y disminuye la glucosa en sangre a niveles considerados normales (Aguilera *et al.*, 2019). Por otro lado, se ha demostrado que la biotina a estas mismas concentraciones tiene efecto hipotrigliceridémico (Larrieta *et al.*, 2012; Aguilera y Fernández, 2012), a través de la vía de señalización de la cGMP y AMPK (Aguilera y Fernández, 2012).

Por otro lado, en un estudio realizado por Peña-Montes y colaboradores (2020) se encontró que existe disfuncionalidad en la actividad de los complejos enzimáticos mitocondriales en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, junto con un incremento significativo de aproximadamente 46% en la producción de ERO en los individuos diabéticos en comparación con el grupo control, así como daños oxidativos mitocondriales. Sin embargo, Aguilera- Méndez *et al.*, (2018) demostraron que, en un modelo de síndrome metabólico desarrollado por la ingesta crónica de fructosa, la biotina ejerce un efecto protector en donde reduce la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la dislipidemia, la hipertensión y la lipoperoxidación hepática. A pesar de que existen diversos estudios de la biotina, son pocos los que demuestran sus efectos en los mecanismos moleculares, por los cuales se producen los efectos sistémicos (Aguilera y Serrato, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes es un problema de salud severo que trae consigo una serie de complicaciones, que han incrementado el porcentaje de mortalidad en México y el mundo. El estrés oxidante es una de las principales complicaciones de la diabetes ya que afecta una gran cantidad de funciones fisiológicas, esta producción de ERO es debida a una disfunción en la mitocondria. Existen diversas investigaciones para prevenir la diabetes y mejorar el estilo de vida de quienes la padecen. Por esta razón, la presente investigación se enfoca al estudio del efecto de la biotina en la función mitocondrial y el estrés oxidativo en ratas diabéticas que permitirá ampliar el conocimiento de sus efectos y mecanismos de acción, para su posible uso como tratamiento.

4. HIPÓTESIS

La biotina disminuye el estrés oxidativo y mejora la función mitocondrial en ratas diabéticas.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar el efecto de la biotina sobre el estrés oxidativo y la función mitocondrial en ratas con diabetes experimental.

5.2. Específicos

- 1.- Determinar el efecto hipoglucémico de la biotina en ratas diabéticas.
- 2.- Evaluar en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas la actividad de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial.
- 3.- Determinar en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas la producción de ERO.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Modelo experimental

Se utilizaron 24 ratas macho de la cepa Wistar (220 ± 25 g de peso) y se manipularon de acuerdo con los lineamientos establecidos en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 y con los lineamientos del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB). Los animales se mantuvieron en jaulas con ciclos de luz y oscuridad de 12h/12h y a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con alimento y agua *ad libitum* durante toda la experimentación.

6.2. Protocolo experimental

Se tuvieron cuatro grupos de 6 ratas cada uno distribuidas de forma aleatoria, (1) grupo control, al cual no se le administró tratamiento; (2) grupo control + biotina, siendo un grupo normoglucémico con un tratamiento de biotina (2 mg/kg de peso corporal) durante 15 días vía intraperitoneal (IP); (3) grupo control diabético, se le indujo diabetes con una dosis única de STZ (45 mg/kg de peso corporal) y (4) grupo diabético + biotina, al cual se le indujo diabetes con STZ y un tratamiento con biotina durante 15 días vía IP. Al finalizar el tratamiento, se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa y de resistencia a la insulina.

6.2.1. Curva de tolerancia a la glucosa

Para la curva de glucosa los animales tuvieron un ayuno de 10h y se les administró vía IP una carga de glucosa (2 g/kg de peso corporal) y se cuantificó la glucosa en sangre de la vena caudal a los 0, 30, 60 y 90 minutos.

6.2.2. Curva de resistencia a la insulina

Para la curva de resistencia a la insulina se administró vía IP insulina (1 UI/kg de peso corporal) y se midió la glucosa en sangre de la vena caudal a los tiempos 0, 30, 60 y 120 minutos transcurridos. Todas las mediciones de glucosa que se tomaron para ambas curvas se realizaron empleando un glucómetro (Marca, Accu-Chek Performa) con tiras reactivas de igual marca.

6.3. Preparación de Biotina como tratamiento

Para la administración de la biotina se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 40 mg de biotina en 20 mL de PBS (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ y KH₂PO₄), haciendo la dilución con un agitador magnético, una vez que la biotina se disolvió por completo se ajustó el pH a 7.4, se filtró con un filtro de membrana Millex® -GS 33 mm, se depositó en un tubo Falcon estéril y se mantuvo en refrigeración a 4°C, para la administración posterior vía intraperitoneal.

6.4. Aislamiento de mitocondrias de hígado

Se indujo sueño profundo a las ratas mediante la aplicación de dosis única de pentobarbital sódico (75 mg/kg de peso corporal) vía IP. El tiempo estimado de la sedación profunda fue de 10 minutos y se realizó una laparotomía para disectar el hígado completo. Para realizar el aislamiento de mitocondrias de hígado de rata, se utilizó el método modificado de Saavedra-Molina y Devlin (1997). El hígado se colocó en medio 1 con la siguiente composición: manitol 220 mM; sacarosa 70 mM; MOPS 2 mM y EGTA 1 mM (se disolvió con NaOH previamente). El medio 1 se ajustó a un pH de 7.4 y se mantuvo en refrigeración a 4°C máximo durante 30 días. Una vez que se colocó el hígado en el medio 1, se seccionó con tijeras quirúrgicas para liberar la sangre dentro de este, con lavados repetitivos de medio 1 en el proceso, después se homogenizó en un POTTER-ELVEHJEM a 500-600 RPM. Se decantó el homogenado en un tubo de centrifuga previamente desionizado (con una piseta que contenga agua desionizada) y frío, se nivelaron los volúmenes de todos los tubos con medio 1 para centrifugar a 2000 RPM durante 10 minutos a 4°C.

Después de centrifugar se decantó el sobrenadante en un tubo frío y se equilibraron los volúmenes con medio 1 para centrifugar a 7000 RPM durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se recuperó el pélet (fracción mitocondrial), se adicionaron 2 mL del medio 2 (manitol 220 mM; sacarosa 70 mM y MOPS 2 mM) y 160 µL de albúmina de suero bovino (BSA). La fracción mitocondrial se resuspendió con un pincel de manera muy suave y se nivelaron los volúmenes de los tubos con medio 2 para centrifugar a 9000 RPM por 10 minutos a 4°C, una vez que se terminó este procedimiento se descartó el sobrenadante y se agregaron 0.5 mL de medio 2 para resuspender. Por último, la fracción mitocondrial se transfirió a tubos cónicos de 0.5 mL (Mca, Eppendorf) y se mantuvieron en congelación a -70°C para su posterior uso.

Para la determinación de especies reactivas de oxígeno y de la actividad de los cuatro complejos enzimáticos se utilizó el método modificado de Peña-Montes y colaboradores (2020).

6.5. Determinación de especies reactivas de oxígeno

Primero se realizó cuantificación de proteínas por el método de Biuret y utilizando albumina de suero bovino como estándar, para verificar que el análisis era equitativo de acuerdo con la cantidad de mitocondrias que se debe tomar para cada muestra procesada. Se prepararon 100 mL de medio de oximetría para mitocondrias de hígado con la siguiente composición: HEPES 10 mM; KCl 100 mM; KH_2PO_4 3 mM y MgCl_2 3 mM, se ajustó el pH a 7.4 y se refrigeró a 4°C. La producción de ERO, se evaluó empleando la sonda fluorescente H2DCFDA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína), midiendo la fluorescencia mediante un espectrofluorofotómetro RF-5301_{PC} SHIMADZU. Se colocaron 2 mL de medio de oximetría en un tubo de ensaye y se adicionó la muestra mitocondrial con la cantidad calculada por el método de Biuret, se mezcló y se adicionaron 5µL de DCFDA (diclorofluoresceína), se agitó perfectamente y se protegió de la luz ambiental. La muestra preparada se incubó en hielo con agitación durante 10 minutos y se transfirió a una celda de plástico de 1 cm para su lectura. Se inició la lectura del trazo en el espectrofluorofotómetro, a las longitudes de onda de emisión 518 nm y excitación 491 nm, con una sensibilidad baja durante 15 minutos. Después de transcurrido 1 minuto de la lectura del trazo se adicionaron 20 µL de succinato (10 mM) (sustrato) y se dejó continuar el trazo hasta terminar para su análisis posterior.

6.6. Determinación de la actividad del complejo I mitocondrial

Se prepararon diferentes reactivos: Cianuro de potasio (KCN) 0.2 M, antimicina A (AA) 0.5 mM, rotenona 2 mM, BSA 10 mg/mL, ferrocianuro de potasio ($\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$) 10 mM, NADH 10 mM y búfer de fosfatos 250 mM. Para el NADH se pesaron 7.094 mg de reactivo y se disolvió en 1 mL de búfer Tris (con una concentración de 1.5 M, pH 8.8) y se mantuvo en refrigeración a -20°C . Se preparan 100 mL de búfer de fosfatos (250 mM) que contiene: 3.203 g K_2HPO_4 y 0.8995 g KH_2PO_4 , se disolvió en diH_2O , se ajustó el pH a 7.5 y se refrigeró a 4°C . La preparación del ferrocianuro de potasio tiene que ser al momento de la experimentación pesando 3.2926 mg en una balanza analítica y disolviendo en 1 mL de diH_2O . Por último, los inhibidores de complejos, rotenona y AA se disolvieron en etanol, excepto el KCN que se disolvió en diH_2O .

Para medir la actividad del complejo I, se tomó 50 μg de muestra de mitocondrias y se resuspendieron en 1520 μL de diH_2O , se mezclaron e incubaron por 2 minutos. Se adicionaron: 400 μL búfer de fosfatos (250 mM), 40 μL de BSA (10 mg/mL), 10 μL de AA (0.5 mM) y 10 μL de KCN (0.2 M), se mezclaron e incubaron durante 7 minutos, posteriormente se adicionan 40 μL de $\text{C}_6\text{N}_6\text{FeK}_4$ (10 mM). La muestra se transfirió a una celda de cuarzo de 1 cm del espectrofluorofotómetro RF-5301_{PC} SHIMADZU y se inició el trazo a una temperatura de 37°C a las longitudes de onda de emisión a 464 nm y excitación a 352 nm con sensibilidad alta durante 6 minutos. A los 30 segundos de iniciar el trazo se agregaron 10 μL de NADH (10 mM), a los dos minutos y medio posteriores se adicionaron 10 μL de rotenona (2 mM) y a los cuatro minutos y medio se adicionaron 10 μL de NADH. Se dejó finalizar el trazo y se guardaron los resultados para su posterior análisis.

6.7. Determinación de la actividad del complejo II mitocondrial

En una celda de plástico de 12,5 x 12,5 x 45 mm se resuspendieron 0.2 mg de proteína en 800 μL de diH_2O , se incubó durante 2 min y se agregaron: 200 μL de búfer de fosfatos 0.25 mM, 20 μL de succinato 0.5 M, 20 μL de BSA 10 mg/mL

¹, 5 μL de rotenona 2 mM, 5 μL de antimicina A 0.5 mM y 5 μL de KCN 0.2 M, se agito e incubo durante 3 minutos. Posteriormente se adicionaron 5 μL de diclorofenol indofenol (DCIP) se mezclaron bien y se realizó un blanco en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS, la celda se introdujo en el espectrofotómetro se inició el trazo a 37°C y una longitud de onda de 600 nm durante 5 min. Transcurridos los 2 minutos y medio se adicionaron 5 μL de TTFA 100 mM, se deja finalizar el trazo y se guardaron los resultados para su posterior análisis.

6.8. Determinación de la actividad del complejo II - III mitocondrial

Se resuspendió 0.1 mg de muestra mitocondrial en 800 μL de diH_2O en una celda de plástico de 12,5 x 12,5 x 45 mm, se mezcló la muestra y se incubó durante 2 minutos para la inducción de choque osmótico. Posteriormente se agregaron: 200 μL de búfer de fosfatos 0.25 M, 20 μL de succinato 0.5 M, 20 μL de BSA 10 mg/mL^{-1} , 5 μL de EDTA-Na 50 mM, 5 μL de rotenona 2 mM y 5 μL de KCN 0.2 M, se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 10 μL de citocromo c (oxidado) homogenizando perfectamente la muestra, se inició el trazo con la celda dentro del espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS a 37°C con una longitud de onda de 550 nm. Se adicionaron 5 μL de antimicina A 0.5 mM y después de 1 minuto de lectura en el espectrofotómetro. Por último, se finalizó en trazo y se guardaron para su posterior análisis.

6.9. Determinación de la actividad del complejo IV mitocondrial

En una celda de plástico de 12,5 x 12,5 x 45 mm se resuspendió 0.1 mg de la muestra mitocondrial en 800 μL de diH_2O , se homogenizó e incubó 2 minutos a temperatura ambiente para la inducción de choque osmótico, al finalizar la incubación se adicionaron: 200 μL de búfer de fosfatos 0.25 M, 20 μL de BSA 10 mg/mL^{-1} , 5 μL de rotenona 2 mM, 5 μL de TTFA 100 mM y 5 μL de antimicina A 0.5 mM, se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y enseguida se adicionaron 15 μL de citocromo c (reducido previamente con ditionita de sodio), se leyó el trazo en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV VIS durante 2

minutos a 37°C con una longitud de onda de 550 nm. Por último, se dejó terminar el trazo y se guardaron los resultados para su posterior proceso.

6.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism 7.00. Los datos se representan como el promedio $\pm$ error estándar (ES). La significancia estadística se determinó por análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguida de una prueba post-hoc Tukey de comparación múltiple. Se consideró como estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

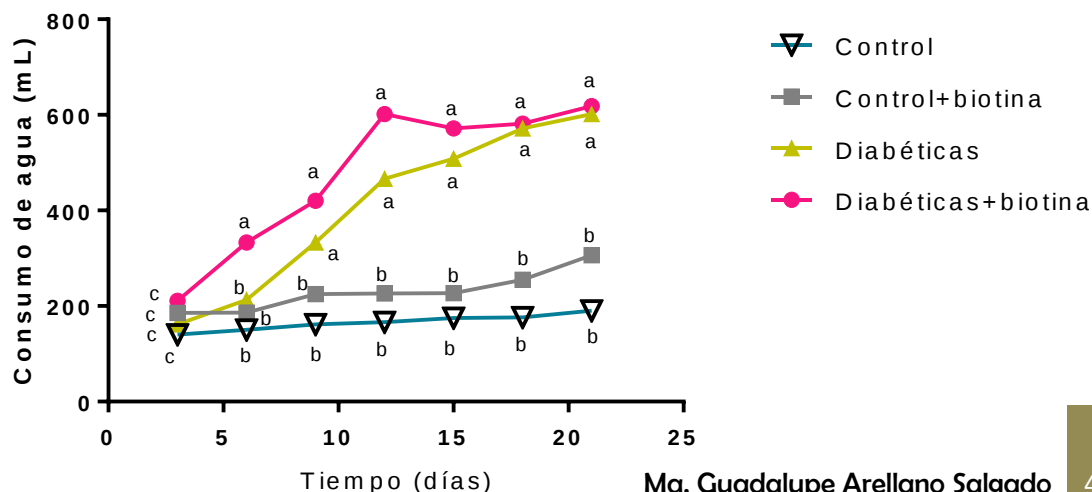
7. RESULTADOS

7.1. Parámetros fisiológicos

Con la finalidad de monitorear el estado de salud de los animales experimentales se realizaron ensayos en ratas con y sin diabetes experimental. Para ello, se monitorearon el consumo de agua y alimento cada 3 días a partir de que se inició el tratamiento con biotina. En la figura 17 se muestra el efecto fisiológico en las ratas tratadas con biotina en comparación al grupo control. La figura 17A representa el consumo de agua de cada grupo de animales durante 3 semanas, donde se puede observar que no existió una diferencia significativa en el consumo de agua de los grupos controles; sin embargo, también se observa que, después de la primera semana los grupos diabéticos aumentaron su consumo de agua dando así una diferencia significativa. El grupo diabético + biotina en la última semana de tratamiento comenzó a disminuir ligeramente su consumo.

Por otro lado, la figura 17B representa el alimento consumido por cada grupo de ratas. No se presentó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de ratas control; sin embargo, los grupos diabéticos aumentaron su consumo de alimento durante las primeras semanas teniendo así, una diferencia estadística significativa en comparación al grupo control. En la última semana de tratamiento el grupo diabético + biotina presentó una ligera disminución en su consumo de alimento.

A



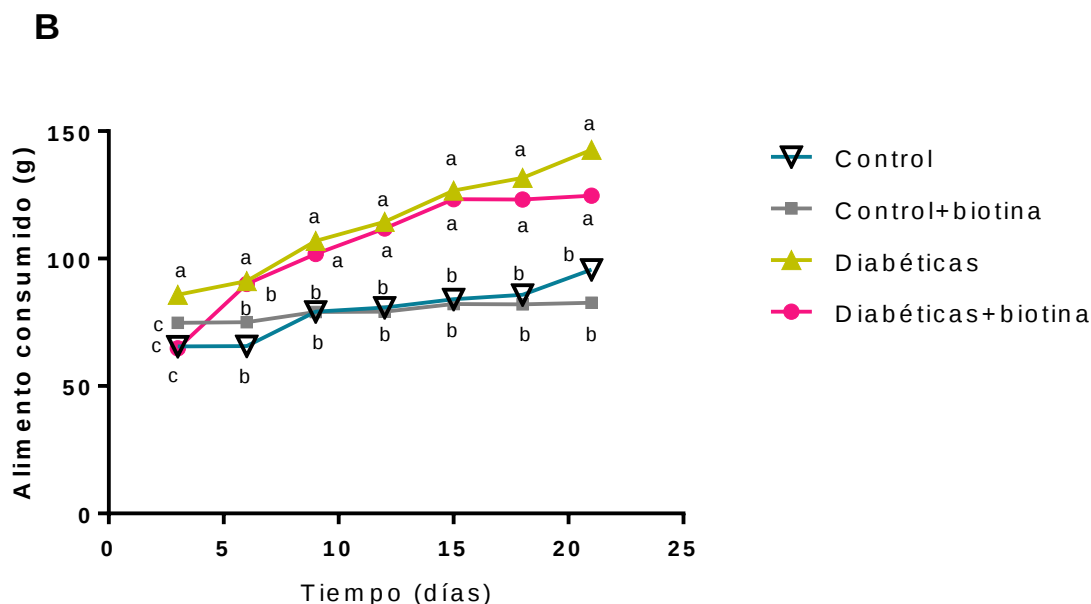


Figura 16. Efecto del tratamiento con biotina sobre algunas variantes fisiológicas. Agua (A) y alimento (B) consumidos por las ratas tratadas. Los valores representan las medias ($n = 6$) $\pm$ el error estándar. Letras diferentes indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$). ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

7.2. Efecto de la biotina sobre la tolerancia a la glucosa

Después de los 15 días de tratamiento con biotina, los niveles de glucosa en sangre del grupo diabético + biotina no revelaron diferencias estadísticas con respecto a los grupos control, es decir que, la biotina regula los niveles de glucosa en sangre a niveles considerados normales en ratas en este modelo de diabetes experimental. En la figura 18A también se observa que el grupo diabético aumenta los niveles de glucosa obteniendo una diferencia estadística significativa con respecto a los grupos controles y el grupo diabético con tratamiento. Por otro lado, en la figura 18B se demuestra una diferencia significativa entre ambos grupos diabéticos, pues la biotina disminuyó considerablemente los niveles de glucosa en sangre en ayuno del grupo diabético + biotina a niveles considerados normales.

Acorde a lo anterior, durante la prueba de tolerancia a la glucosa, los picos de glucosa en sangre del grupo diabético a los 30 y 60 minutos posteriores a la carga de glucosa (2 g/kg de peso corporal) fueron significativamente mayores

comparados con el grupo control (Figura 18A). Por otra parte, los picos de glucosa de las ratas del grupo control + biotina y diabético + biotina a los 30, 60 y 120 minutos en respuesta a la carga de glucosa fueron significativamente menores comparados con los picos de glucosa del grupo diabético (Figura 18A). En resumen, el tratamiento con biotina durante las últimas semanas del periodo experimental mejoró la tolerancia a la glucosa en las ratas diabéticas tratadas.

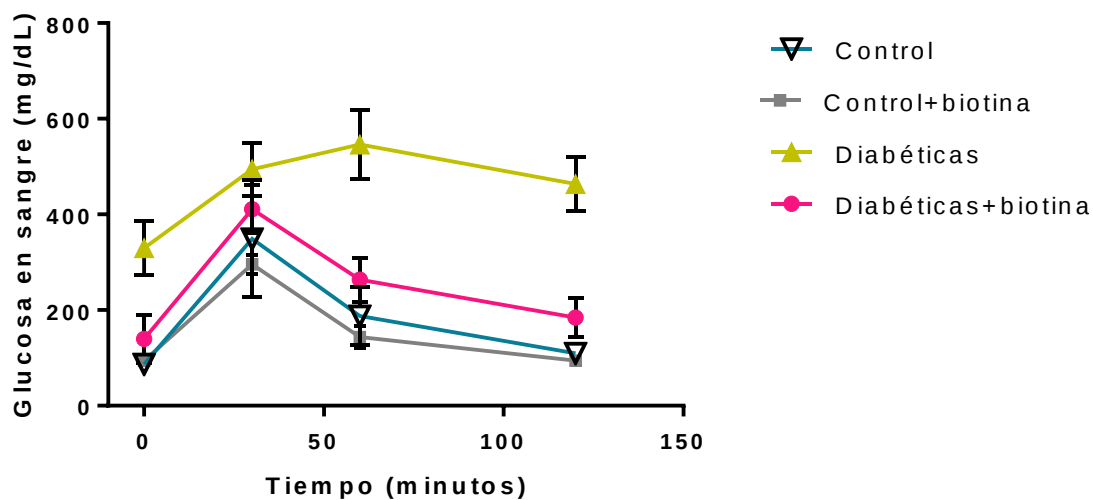
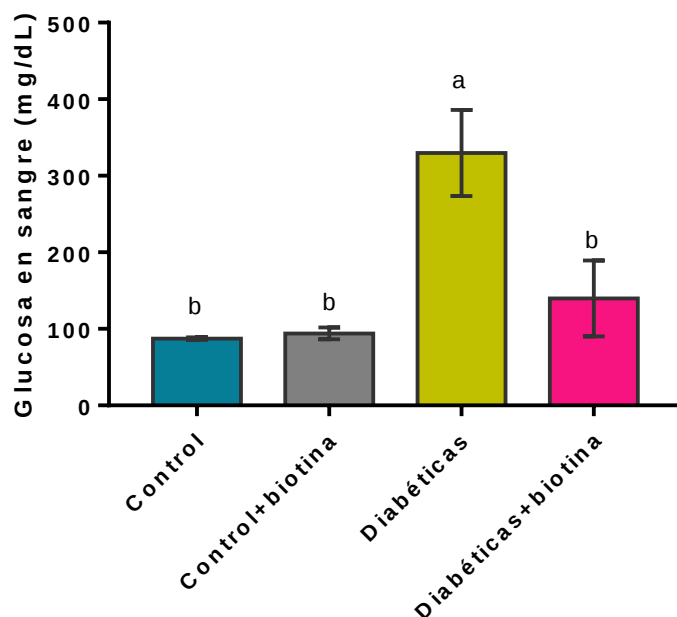
A**B**

Figura 17. Efecto del tratamiento con biotina sobre los niveles de glucosa en ayuno y la tolerancia a la glucosa en ratas tratadas con biotina durante 15 días. Curvas de glucosa en sangre después de una carga de glucosa intraperitoneal en ratas tratadas con biotina (A) y niveles de glucosa en sangre en ayuno (B). Los valores representan las medias ($n = 6$) de la concentración de glucosa en sangre $\pm$ el error estándar. Letras diferentes indica diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$) basado en la prueba ANOVA seguida de una prueba de Tukey.

7.3. Efecto de la biotina sobre la resistencia a la insulina

El análisis detallado de la homeostasis de la glucosa *in vivo* debe incluir una medida de resistencia a la insulina. Por esta razón, se evaluó el efecto de la biotina en la resistencia a la insulina. Dos días después de realizar la prueba de tolerancia a la glucosa se realizó la prueba de resistencia a la insulina, donde, se midieron los niveles de glucosa en sangre en las ratas y posteriormente se les administró por vía IP insulina (1 U/kg de peso). Aunque la insulina disminuyó los niveles de glucosa en sangre de todos los grupos de animales, la magnitud del efecto de la insulina sobre la glucosa fue diferente para cada tratamiento. Como se muestra en la figura 19 los picos de glucosa del grupo diabético no se redujeron en comparación con el grupo control, sino todo lo contrario, fueron mayores a los 60 y 90 minutos posteriores a la administración de insulina comparados con el grupo control y los grupos con tratamiento. Por otra parte, el grupo diabético + biotina mostró una reducción de los niveles de glucosa después de la administración IP de insulina, dicha reducción persistió hasta el término de la prueba y fue estadísticamente significativa comparada con el grupo diabético (Figura 19). En resumen, el tratamiento con biotina IP durante 15 días disminuyó la resistencia a la insulina en comparación con individuos diabéticos sin el tratamiento quienes aumentaron su nivel de resistencia a la insulina.

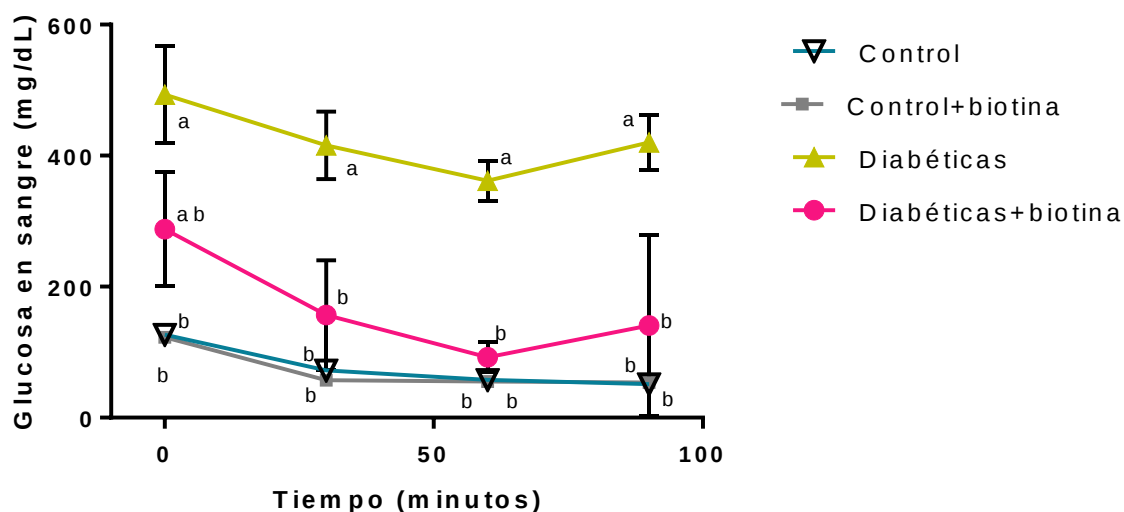


Figura 18. Efecto del tratamiento con biotina sobre la sensibilidad a la insulina en ratas tratadas con biotina durante 15 días. Los valores representan la concentración de glucosa en sangre posterior a la administración exógena de insulina (1 UI/kg de peso corporal). Los datos representan la media ($n = 6$) $\pm$ el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$) basado en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

7.4. Efecto de la biotina sobre la producción de ERO en las mitocondrias de hígado de ratas diabéticas

Para conocer la capacidad que tiene la biotina de contrarrestar la producción de ERO en la diabetes, se llevó a cabo la determinación de los niveles de producción de estas dentro de la CTE mitocondrial (Figura 20). En donde, se presentaron diferencias significativas entre grupos. Hubo una disminución del 76.75 % de la producción de ERO en el grupo diabético tratado con biotina en comparación con los grupos diabético y control + biotina, es decir, que el grupo diabético + biotina generó una cantidad de ERO similar a un grupo control, quienes no presentaron una diferencia estadística significativa.

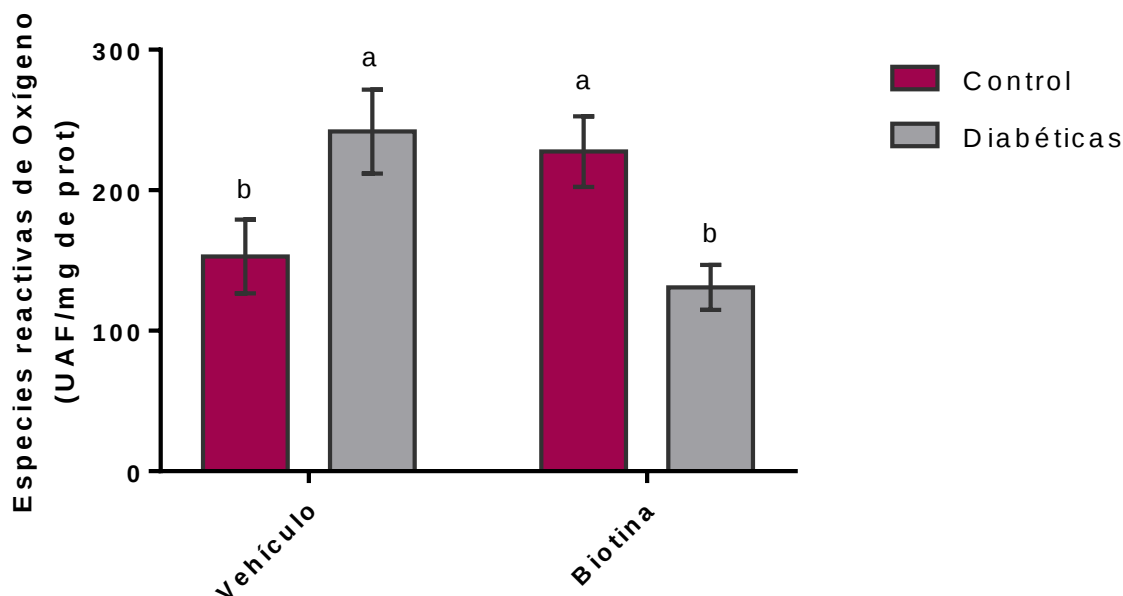


Figura 19. Efecto de la biotina sobre la producción de ERO en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas tratadas con biotina durante 15 días. Los valores representan la media ($n=6$) $\pm$ el error estándar. Letras diferentes indica diferencias significativas entre tratamientos ($P<0.05$) basado en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

7.5. Efecto de la biotina sobre la actividad de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial en hígado de ratas diabéticas

Para conocer la funcionalidad de la CTE y al mismo tiempo conocer el efecto que posee la biotina como tratamiento durante la diabetes sobre los complejos enzimáticos mitocondriales, se llevó a cabo la determinación de la actividad de estos (Figura 21). Las ratas del grupo diabético mostraron un incremento significativo en la actividad del complejo I y II (Figura 21A y 21B), por otro lado, las ratas de los otros grupos mantuvieron la actividad sin presentar una diferencia significativa entre ellos. Por otro lado, la actividad del complejo III, aumentó significativamente en un 13.19 % para el grupo control + biotina en comparación al grupo control. En cambio, la actividad del complejo IV, no mostró cambios significativos entre los grupos.

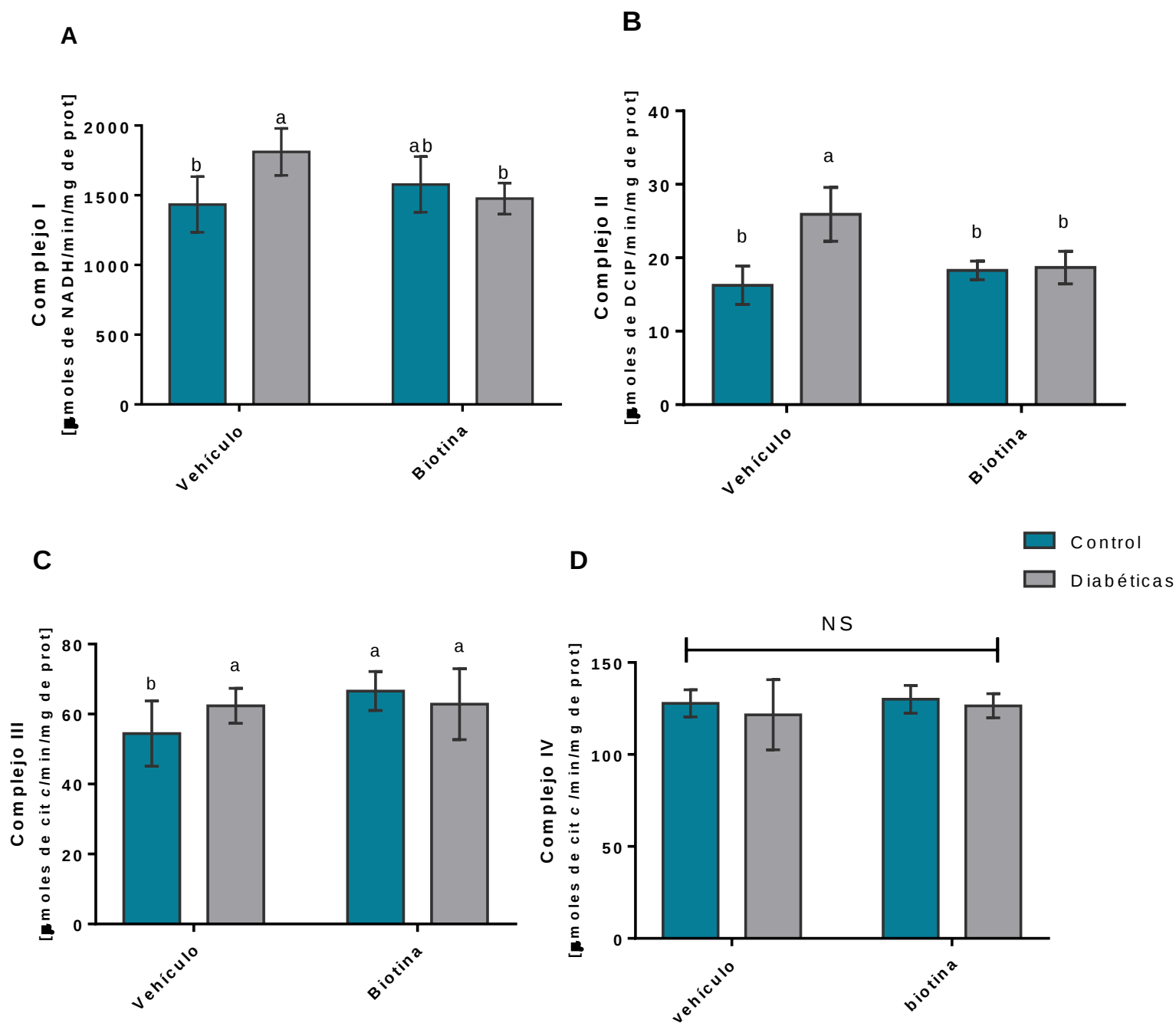


Figura 20. Efecto de la biotina sobre la actividad de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial en hígado de ratas diabéticas. Complejo I (A), Complejo II (B), Complejo III (C) y Complejo IV (D). Los valores representan la media ($n = 6$) $\pm$ el error estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$) basado en la prueba ANOVA y la prueba de comparación múltiple de Tukey.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La diabetes mellitus es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en México (INEGI, 2019). Es una enfermedad que posee un enorme impacto en la vida de las personas tanto en nuestro país como en el mundo (CIAD, 2020), por ello ha sido muy importante y necesario estudiar los mecanismos de acción de distintos fármacos o micronutrientes que puedan servir como tratamiento de esta patología y contrarrestar o retardar sus complicaciones (Sánchez y Méndez, 2013; Valdés *et al.*, 2015). La biotina es una vitamina que podría ser utilizada para este fin, ya que ha demostrado tener efectos importantes para mejorar algunas de las complicaciones que genera la diabetes como la reducción de la hiperglucemia e incluso complicaciones de quienes padecen alguna enfermedad relacionada al síndrome metabólico (Aguilera y Manuel, 2016; Aguilera *et al.*, 2013; Riverón y Fernández, 2017). Se sabe que la diabetes está relacionada con el estrés oxidante (Cruz *et al.*, 2011; McCarty, 2017; Sánchez y Méndez, 2013) y otros componentes que están ligados a la disfunción mitocondrial, pero es muy difícil poder determinar con precisión a cada uno de los componentes que participan (Guzmán *et al.*, 2006; Sánchez y Méndez, 2013). Sin embargo, la producción de especies reactivas de oxígeno son el principal partícipe que desencadena diversas complicaciones en quienes la padecen (McCarty, 2017) y también son un indicativo de un mal funcionamiento mitocondrial (Martínez *et al.*, 2005). Por lo tanto, en esta tesis se evaluó el efecto antioxidante de la biotina en ratas diabéticas, así como también se demostró que contrarresta la resistencia a la insulina, mejora la función de los complejos enzimáticos mitocondriales y tiene un efecto hipoglucémico efectivo.

En los modelos diabéticos en ratas Wistar, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en relación con el consumo de agua y alimento, lo cual habla de que la biotina no contrarresta ese síntoma desarrollado durante la enfermedad. Así mismo, en los grupos controles tampoco se observaron diferencias en el consumo, lo cual, valida el uso del modelo animal para estudios posteriores, debido a que no se observaron cambios metabólicos evidentes que pudieran influir por el consumo de biotina *per se* (Toledo, 2014).

Para saber si la biotina ejercía un efecto protector sobre la sensibilidad a la insulina durante la diabetes como se ha reportado en varios estudios, se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa y una prueba de sensibilidad a la insulina. Después de 15 días de tratamiento con biotina vía IP, se les realizó una prueba de tolerancia a la glucosa, lo cual nos arrojó que, la biotina disminuyó los niveles de glucosa en sangre en el grupo diabético + biotina en ayunas a niveles

considerados normales, pues no tuvo diferencia significativa con respecto al grupo control y control + biotina. Por otro lado, los niveles de glucosa en el grupo diabético se incrementaron significativamente en comparación con los otros grupos.

Los hallazgos que se encontraron es este trabajo de investigación respaldan estudios previos que demuestran el efecto hipoglucémico que tiene la biotina al ser suministrada en ratas diabéticas, está en concordancia con lo reportado por otros autores (Aguilera *et al.* 2018; Riverón y Fernández, 2017). En lo que respecta a la curva de resistencia a la insulina, la concentración de glucosa en el grupo diabético fue mucho mayor en comparación a los otros grupos; sin embargo, si se observó un efecto protector de la biotina sobre la reversión de resistencia a la insulina en la diabetes (Aguilera *et al.*, 2018; Valdés *et al.*, 2015), ya que en el grupo diabético + biotina se observó que hubo una repuesta positiva, ya que no se observaron diferencias significativas en comparación a las respuestas de los grupos control y control + biotina.

En un estudio realizado por Aguilera y colaboradores en 2018, probaron el efecto protector de la biotina en el síndrome metabólico inducido por alta fructosa en ratas, se describe que, la fructosa aumento los niveles de glucosa en sangre en el grupo fructosa, en comparación con todos los grupos y que la suplementación con biotina evitó significativamente ese aumento de glucosa en ayunas provocado por la dieta alta en fructosa en el grupo fructosa + biotina sin tener una diferencia significativa con respecto al grupo control y control + biotina (Aguilera *et al.*, 2018). En diversos estudios se demuestra que la biotina desempeña un papel importante en diversas vías metabólicas como la gluconeogénesis y la síntesis de ácidos grasos al actuar como grupo prostético de las carboxilasas. Además de que la biotina exhibe efectos principales sobre la expresión de la glucosinasa en el hígado y páncreas, la glucosinasa es una enzima clave de la glucólisis que aumenta el catabolismo de la glucosa, regula su metabolismo en sangre y las concentraciones de lípidos en plasma. Por otro lado, un estudio de un modelo en ratas diabéticas demostró que la biotina repelía los genes gluconeogénicos y su transcripción mediante una vía independiente de la señalización de la insulina, así como también, las concentraciones suprafisiológicas de biotina pueden activas la gluamilato ciclase, que promueve la función de la insulina en el músculo (Hemmati, Babaei y Abdolsalehei, 2013).

Al evaluar el efecto de la biotina sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria de hígado, se observó que en las ratas diabéticas

con suministro de biotina (2 mg/kg de peso corporal) se produjo una disminución en la producción de ERO en comparación a la producción de estas en ratas diabéticas sin tratamiento, obteniendo una diferencia significativa de hasta un 76.75 %. El flujo excesivo de sustrato que llega a la mitocondria como resultado en respuesta a la hiperglucemia es en parte el responsable del incremento de ERO y daños oxidativos. Por otro lado, también se demostró que el tratamiento ayudó a igualar la producción de ERO al del grupo control. Es decir, que la biotina como tratamiento en ratas diabéticas, disminuyó la producción de estas especies a niveles considerados normales. Sin embargo, en los estudios que se realizaron para la determinación de la producción de especies, se observó que, la administración de biotina en individuos completamente sanos, incremento la producción de ERO igual que las del grupo diabético, sin obtenerse una diferencia significativa para ambos grupos, al ser la biotina cofactor de las carboxilasas, esto puede aumentar rutas oxidativas como la de la beta oxidación que incrementa el flujo de electrones en la cadena respiratoria, sin ser dañino.

Estudios previos han reportado que durante la DM existen alteraciones en el metabolismo hepático, ya que el hígado es el órgano principal de la glicemia, es el responsable del 90% de la producción endógena de glucosa a través de rutas metabólicas como la gluconeogénesis y glicogenolisis, comprendiendo esta función principal del hígado sobre la homeostasis de la glucosa, se espera que cualquier enfermedad o alteración que lo afecte tenga la potencialidad de producir alteraciones en el metabolismo de la glucosa tanto en individuos sanos como los que padecen de DM, algunas alteraciones en el metabolismo hepático durante la DM se encuentran asociadas con disfuncionalidad mitocondrial (Vignolo *et al.*, 2020). Por esto, es importante estudiar la actividad de los complejos enzimáticos respiratorios debido a la disfuncionalidad que puedan presentar. Algunas alteraciones de los complejos mitocondriales pueden ser debido a daños oxidativos en particular en la diabetes ya que, un blanco frecuente del ataque de estos agentes son los lípidos de las membranas de diversas células en general (principalmente las membranas mitocondriales), alterando su estructura y fluidez, afectando su funcionalidad, provocando lipoperoxidación, inflamación y ruptura de células (Calderón *et al.*, 2013).

Para esto, se determinaron las actividades de estos complejos para examinar los efectos de la biotina sobre la funcionalidad mitocondrial (Peña *et al.*, 2020). En este modelo de diabetes experimental inducido con STZ (45 mg/kg de peso), se observó que en el grupo control y el grupo diabético + biotina tuvieron una actividad similar para el complejo I sin mostrar una diferencia significativa,

pero si se obtuvo una ligera diferencia significativa de 29.47 % en la actividad de este complejo comparando ambos grupos diabéticos, en donde el grupo diabético + biotina disminuyó su actividad con respecto al grupo diabético sin tratamiento.

Por otro lado, en la evaluación de la actividad del complejo II, se observó que el grupo diabético aumento la actividad de este complejo en comparación con el grupo control, dándonos a conocer que, durante la DM existen este tipo de disfuncionalidades en los complejos enzimáticos como se mencionó anteriormente. También se obtuvo un pronunciado decremento de la actividad en el grupo diabético con tratamiento en comparación al del grupo diabético, obteniendo una diferencia significativa importante del 34.59 %, ejerciendo la biotina un efecto protector sobre la función del complejo II durante enfermedad, de la misma manera, el grupo control, control + biotina y diabético + biotina no tuvieron diferencia significativa. Esto habla de la posibilidad que la biotina mantenga de forma normal la actividad del complejo II durante la enfermedad. En la evaluación del complejo III, se observó que los grupos: diabético, control + biotina y diabético + biotina no presentaron ninguna diferencia estadísticamente representativa entre ellos, sin embargo, el grupo control + biotina presentó una ligera tendencia representativa del 13.19 % en comparación al grupo control. Asimismo, en la evaluación del complejo IV no se presentaron diferencias estadísticas entre ningún grupo. En un estudio realizado por Trejo (2021), obtuvo una respuesta parecida a la obtenida en esta investigación a pesar de no tratarse del mismo compuesto pues, el tratamiento con *E. carlinae* tampoco demostró tener un efecto sobre la actividad de este complejo.

9. CONCLUSIONES

1. El tratamiento con biotina en ratas diabéticas disminuyó los niveles de glucosa en sangre a niveles considerados normales, demostrando tener un efecto hipoglucémico exitoso, así como también disminuyó la resistencia a la insulina.
2. Los resultados de la presente investigación demuestran que la biotina como tratamiento durante la diabetes posee actividad antioxidante, al disminuir la producción de ERO en las mitocondrias de hígado.
3. En ratas diabéticas el tratamiento con biotina mejora la actividad en los complejos enzimáticos I y II de la CTE en la mitocondria.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, A. (2020). La nutrición materna y la programación metabólica: el origen fetal de las enfermedades crónicas degenerativas en los adultos. *CIENCIA ergo-sum*. 27(3). <https://doi.org/10.30878/ces.v27n3a7>
- Aguilera, A. (2018). Esteatosis hepática no alcohólica: una enfermedad silenciosa. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 56(6): 544-9.
- Aguilera, A., Beltrán, E., Urquiza, H., Saavedra, A., Boone, D y Fernández, C. (2013). Triglicéridos y su relación con el síndrome metabólico. *Ciencia Nicolaita*. (58): 51-66.
- Aguilera, A., Boone, D., Nieto, R., Villafañá, S., Saavedra, A. y Ventura, J. (2022). Role of vitamins in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 474:117–140. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02619-x>.
- Aguilera, A., Espino, R., Toledo, Z.J., Hernández, Z., Villafañá, S., Nieto, R., Serrato D. y Manuel, G.C. (2019). Biotin improves relaxation of rat aortic rings in combination with antihypertensive drugs. *PharmaNutrition*. 8(2019): 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2019.100147>
- Aguilera, A. y Fernández, C. (2012). The hypotriglyceridemic effect of biotin supplementation involves increased levels of cGMP and AMPK activation. *International union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc*. 38(5): 387-394.
- Aguilera, A., Hernández, M.G., Rueda, A.C., Guajardo, C., Nieto, R., Serrato, D., Ruíz, L.F. y Guzmán, J.A. (2018). Protective effect of supplementation with Biotin against high-fructose-induced metabolic syndrome in rats. *Nutrition research*. 57: 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2018.06.007>
- Aguilera, A. y Manuel, G.C. (2016). Biotina: la vitamina superpoderosa. *Saber más*. (28): 15-17.
- Aguilera, A., Serrato, D., y Nieto, R. (2013). La biotina: Una vitamina vieja con funciones nuevas. *Biológicas*. 15(1): 24-30.

- Aguilera, E. (2015). Diagnóstico y tipos de diabetes en niños y adolescentes. *Servicio de Endocrinología y Nutrición*. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Barcelona. 06(03): 98-100.
- Alba, A., Verdaguer, J. y Vives, M. (2004). Diabetes mellitus tipo 1: autoinmunidad frente a las células beta. *Endocrinología nutricional*. 51(3): 121-125.
- Almirón, M.E., Gamarra, S.C. y González, M.S. (2005). Diabetes gestacional. *Revista de Posgrado de la Vía Cátedra de Medicina*. 7(152): 23-27.
- Álvarez, L. (2013). Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células β pancreáticas. *Endocrinología y Nutrición*. 21(3): 98-106.
- Arizmendi, J., Carmona, V., Colmenares, A., Gómez, D. y Palomo, T. (2012). Diabetes gestacional y complicaciones neonatales. *Revista fac. Médica*. 20(2): 50-60.
- Bequer, L., Gómez, T., Molina, J.L., Artiles, D., Bermúdez, R. y Clápes, S. (2016). Acción de la estreptozotocina en un modelo experimental de inducción neonatal de la diabetes. *Bioquímica*. 2016(36): 230-238. doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.2686>
- Buil, P. ¿Existe relación entre el hígado graso y la diabetes mellitus tipo 2? Guía de actualización de diabetes. Junio de 2015.
- Calderón, J.V., Muñoz, E.G. y Quintanar, M.A. (2013). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista de educación bioquímica*. 32(2).
- Castaing, D. y Veihan, A. (2006). Anatomie du foie et des voies biliaires. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Techniques chirurgicales-Appareil digestif. pp. 40-760.
- CIAD. (2020). La pandemia de diabetes en México. CONACYT. <https://www.ciad.mx/notas/item/2450-la-pandemia-de-diabetes-en-mexico>
- Conget, I. (2002). Diagnóstico, clasificación y patogenia de la diabetes mellitus. *Revista Española de cardiología*. 55(5): 528-535. doi: 10.1016 / s0300-8932 (02) 76646-3.
- Cordero, A. y Pinto, R. (2014). Diabetes mellitus tipo 1 y 2. Estudio epidemiológico del primer año del servicio de Consulta Externa del Hospital Regional de

- Alta Especialidad de Ixtapaluca. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*. 7(1): 10-18.
- Cortés, C., Estrada, M., Manzo, S. y Saavedra, A. (2009). Influencia de la peroxidación de lípidos sobre el daño oxidativo mitocondrial y la integridad de *Saccharomyces cerevisiae*. *Información tecnológica*. 20(2): 71-81. doi: 10.1612/inf.tecnol.4043it.08
- Cruz, J., Licea, M.E., Hernández, P., Abraham, A.A y Yanes, M. (2011). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Revista Mexicana Patología Clínica*. 58(1): 4-15.
- De la Fuente, C.E. (1 de febrero de 2018). Mitocondrias: más allá de la producción de energía celular. *CIENCIORAMA*. Recuperado de <http://www.cienciorama.unam.mx/#!titulo/555/?mitocondrias--mas-alla-de-la-produccion-de-energia-celular>
- Díaz, L. y Delgado, E. (2016). Diabetes mellitus. Criterios diagnósticos y clasificación. Epidemiología. Etiopatogenia. Evaluación inicial del paciente con diabetes. *Medicine*. 12(17): 935-946.
- Duarte, M., Muñoz, G., Rodríguez, J. y Escorza, A.B. (2004). Prevalencia, detección y tratamiento de la diabetes gestacional. *Revista salud pública y nutrición*. 5(1).
- Flores, J. y Aguilar, F. (2006). Diabetes mellitus y sus complicaciones. La epidemiología, las manifestaciones clínicas de la diabetes tipo 1 y 2. Diabetes gestacional. Parte 1. *Plasticidad y Restauración Neurológica*. 5 (2): 139-151.
- García, C. (2008). Diabetes mellitus gestacional. *Medicina interna de México*. 24(2): 148-156.
- Gavin, J.R., Alberti, M.M., Davidson, M.B., de Franzo, R.A., Ralph, A. et al. (1997). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of Diabetes mellitus. *Diabetes care*. 20(7), 1183-1197. doi: 10.2337 / diacare.20.7.1183
- González, M.S., Márquez, A.A., Meléndez, C.E., y López, A.A. (2010). Efecto del extracto de hojas Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) en la Diabetes Mellitus inducida por estreptozotocina en ratones. *Gaceta de ciencias veterinarias*. 15(2): 64-71.

- Gross, J.L., Silveiro, S.P., Camargo, J.L., Reichelt, A.J. y Azevedo, M.J. (2002). Diabetes Melito: Diagnóstico, Classificação e Avaliação do Controle Glicêmico. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 46(1): 16-26.
- Guzmán, A., Velázquez, A y Sierra, M.P. (2006). Óxido nítrico, estrés nitrosante y función mitocondrial. *Revista de endocrinología y nutrición.* 14(4): 227-232.
- Hemmati, M., Babaei, H. y Abdolsalehei, M. (2013). Survey of the Effect of Biotin on Glycemic Control and Plasma Lipid Concentrations in Type 1 Diabetic Patients in Kermanshah in Iran (2008-2009). *Oman Medical Journal.* 28(3):195-198. DOI 10. 5001/omj.2013.53.
- INEGI. (2019). Características de las defunciones registradas en México durante 2018. (538): 1-65. Recuperado de <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2019/EstSociodemo/DefuncionesRegistradas2019.pdf>
- Instituto Nacional de Salud Pública (ENSANUT). (2018, 30 de Julio). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Presentación de resultados. *Secretaría de Salud.* pp. 1-42. Recuperado de https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2018/doctos/informes/ensanut_2018_presentacion_resultados.pdf
- Juturu, V. y Komorowski, J. (2006). Effect of Chromium Picolinate/Biotin Supplementation with Diabetes Education on Blood Sugar Levels in Type 2 Diabetes: A Pilot Program. *The Internet Journal of Nutrition and Wellness.* 3(1): 1-4.
- Larrieta, E., Velasco, F., Vital, P., López, T., Lazo, M.L., Rojas, A. y Fernandez, C. (2010). Pharmacological concentrations of biotin reduce serum triglicerides and the expression of lipogenic genes. *European Journal of Pharmacology.* (644): 263-268.
- López, A., Fernando, C., Lazarova, Z., Bañuelos, R. y Sánchez, S.H. (2012). Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades. *Revista ANACEM.* 6(1): 48-53.
- López, G. (2009). Diabetes mellitus: clasificación, fisiopatología y diagnóstico. *Revista Biomédica revisada por pares.* 9(12). doi: 10.5867/medwave.2009.12.4315.

- López, L., Lobo, J.A y Yanes, W. (2005). Epidemiología de la diabetes mellitus. *Duazary*. 2(2): 143-146.
- Manterola, C., Del Sol, M., Ottone, N. & Otzen, T. (2017). Anatomía quirúrgica y radiológica del Hígado. Fundamentos para las resecciones hepáticas. *Int. J. Morphol.* 35(4): 1525-1539.
- Martínez, E., Sánchez, M.A., Hafidi, M.E. (2005). Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica*. 30(3): 82-89.
- McCarty, M.F. (2017). Supplementation with Phycocyanobilin, Citrulline, Taurine, and Supranutritional Doses of Folic Acid and Biotin—Potential for Preventing or Slowing the Progression of Diabetic Complications. *Healthcare*. 5(15): 1-28. doi:10.3390/healthcare5010015.
- Merino, J. y Noriega, M.J. (2011). Fosforilación oxidativa. Universidad de Cantabria. *Open course ware*. pp. 1-8. Recuperado de <https://ocw.unican.es/pluginfile.php/879/course/section/967/Tema%25204C-Bloque%2520I-Fosforilacion%2520Oxidativa.pdf>
- Miranda, L.M. & Reza, A. (2008). Obesidad, inflamación y diabetes. *Gac. Med. Méx.* 144(1): 39-46.
- Möller, R. & Vazquez, N. (2011). Anatomía del hígado de la Rata Wistar (*Rattus norvegicus*). *Int. J. Morphol.* 29(1): 76-79.
- Mora, A.E., Aragón, D.M y Ospina, L.F. (2009). Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. VITAE, *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 16(3): 311-319.
- Nelson, D.L., y Cox, M.M. (2009). Lehninger Principios de Bioquímica. 5^{ta} ed. Barcelona, España: editorial Omega.
- Nicholls, D.G. (2002). Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease. *The international journal of Biochemistry & Cell Biology*. 34: 1372-1381.
- Ortiz, O., Esquivel, M., Olmos, B.E., Saavedra, A., Rodriguez, A.R. & Cortés, C. (2015). Avocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats. *Journal of diabetes research*. 2015, 1-9. doi: 10.1155 / 2015/485759

- Palacios, A., Durán, M y Obregón, O. (2012). Factores de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 y síndrome metabólico. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*. 10(1): 34-40.
- Parada, R. (20 de noviembre de 2019). Mitocondrias. Lifeder. Recuperado de <https://www.lifeder.com/mitocondrias/>
- Peña, D.J., Huerta, M., Ríos, M., Trujillo, X., Cortés, C., Huerta, M. y Saavedra, A. (2020). Effects of dietary iron restriction on kidney mitochondria function and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Mitochondrion*. 54: 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.07.001>.
- Perel, C. (2018). Insuficiencia cardíaca y diabetes Nuevos tratamientos para la diabetes. *Federación argentina de cardiología*. 13(4): 155-169.
- Perez, M. y Ruano, A. (2004). Vitaminas y salud. *Ámbito farmacéutico*. 23(8): 96-106.
- Pozo, M.J., Camello, C., y Camello, P.J. (2022). Fisiología hepática. *All Rights Reserved*. 3(0): 1-17.
- Quevedo, N., Pérez, R. y Sánchez, I.S. (2019). Correlación entre marcadores serológicos y ecográficos en pacientes con hígado graso no alcohólico y diabetes mellitus tipo 2. *Revista Médica Sinergia*. 4(8): 2215-5279. <https://doi.org/10.31434/rms.v4i8.264>.
- Rains, J y Jain, S.K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*. 50(5): 567-675. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.
- Ríos, W. (2014). Complicaciones obstétricas de la diabetes gestacional: criterios de la IADPSG y HAPO. *Perinatología y reproducción humana*. 28(1): 27-32.
- Riverón, L. y Fernández, C. (2017). Pharmacological Effects of Biotin in Animals. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 17(0): 1-12.
- Ramos, B., Macías, M. y Tinajones, F.J. (2017). Hígado graso no alcohólico y diabetes tipo 2: epidemiología, fenotipo y fisiopatología del paciente con diabetes e hígado graso no alcohólico. *Endocrinol Diabetes Nutr Supl*. 1(2): 16-20.

- Rodríguez, N., Calderín, M.P., García, G. (2017). Tema 4: Hígado. Bazo. Vesícula y vía biliar. Editorial Medica Panamericana. pp: 2-5.
- Rodríguez, R. (2000). Importancia del metabolismo de la biotina. *La revista de investigación clínica*. 52(2): 194-199.
- Sánchez, V y Méndez, N. (2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Revista de investigación médica sur México*. 20(3): 161-168.
- Santa, N.M. y Zacarías, R. (2002). Tratamiento farmacológico para la diabetes mellitus. *Revista del hospital general "Dr. Manuel Gea González"*. 5(1-2): 33-41.
- Sanzana, M.G y Durruty, P. (2016). Otros tipos específicos de diabetes mellitus. *Revista médica clínica condes*. 27(2): 160-170.
- Selli, L., Papaléo, L., Meneghel, S. y Torneros, J. (2005). Técnicas educacionales en el tratamiento de la diabetes. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro. 21(5):1366-1372.
- Sibulesky, L. (2013). Anatomía normal del hígado. *Clinical Liver Disease*. 2(S4): S61-S64. doi: 10.1002/cld.124
- Socarrás, M.M., Bolet, M. y Licea, M. (2002). Diabetes mellitus: tratamiento dietético. *Revista Cubana Investigación Biomédica*. 21(2): 102-108. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0864-03002002000200007.
- Toledo, Z.J. (2014). Estudio del efecto hipotensor de la biotina en la contracción arterial (tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.
- Trejo, C.M. (2021). Actividad antioxidante y antiinflamatoria del extracto de acetato de etilo de inflorescencias de *Eryngium carlinae* en hígado de ratas con diabetes experimental (tesis de maestría). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.
- Valdés, R., Guadarrama, A.L., Carrillo, M. y Benítez, A.D. (2015). Vitamins and Type 2 Diabetes Mellitus. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 15(1): 54-63.

- Velázquez, L.E., Sil, M.J., Domínguez, E.R., Torres, L.P. y Medina, J.H. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista médica del instituto mexicano del seguro social*. 51(1): 1-16.
- Venero, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31(2).
- Via, M. (2012). The Malnutrition of Obesity: Micronutrient Deficiencies That Promote Diabetes. *ISRN Endocrinology*. 2012: 1-8. doi:10.5402/2012/103472.
- Vignolo, P., Elgueta, K., López, G., Durruty, P., Gómez, P. y Sanzana, G. (2020). Enfermedades hepáticas y su relación con hiperglicemia. NetMD Connect Healthcare. Recuperado de <https://netmd.org/endocrinologia-y-diabetes/endocrinologia-y-diabetes-articulos/enfermedades-hep%C3%A1ticas-y-su-relaci%C3%B3n-con-hiperglicemia>.
- Vinces, M.I., Espinel, P.M., Pico, A.N., Del Catillo, S.E., Chávez, G.E. y Betancourth, E.D. (2019). Tratamiento farmacológico para pacientes con diabetes. *Revista científica dominio de las ciencias*. 5(1): 69-90. <http://dx.doi.org/10.23857/dom.cien.pocaip.2019.vol.5.n.1.69-90>.