



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Maestría en Ciencias en Biología Experimental

Tesis

“Efecto del aceite de aguacate sobre los sistemas de glutatión peroxidasa y tioredoxina en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Q.F.B. Claudia Guadalupe Flores Ledesma

Asesor:

**Doctor en Ciencias en Biología Experimental:
Christian Cortés Rojo**

**Morelia, Michoacán
México
Abril, 2017**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS**



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Maestría en Ciencias en Biología Experimental

Tesis

“Efecto del aceite de aguacate sobre los sistemas de glutatión peroxidasa y
tioredoxina en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas”

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

Q.F.B. Claudia Guadalupe Flores Ledesma

Asesor:

Doctor en Ciencias en Biología Experimental:
Christian Cortés Rojo

Morelia, Michoacán
México
Abril, 2017



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS

DEDICATORIA

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad, gracias Abba.

A mis padres J. Merced y Lupita les agradezco por darme vida, amor, formación y apoyo incondicional sin ustedes jamás lo hubiese logrado son mi inspiración y siempre lo serán.

A mis hermanos Alonso y Andrea gracias por su paciencia, amor, comprensión por apoyarme en todo momento durante esta etapa, siempre los llevare en mi corazón.

A mis abuelitos que han sido como mis padres a los cuales amo con todo mi corazón, siempre estaré agradecida con ustedes por todas sus enseñanzas y por ser un ejemplo de amor y perseverancia en mi vida.

A mis grandes amigas y compañeras de vida Perla y Celeste chicas son increíbles ustedes han hecho de mis días lo mejor, gracias por el apoyo y amor incondicional por todos y cada uno de los hermosos momentos que me hemos vivido sin ustedes no lo hubiese logrado las quiero demasiado.

AGRADECIMIENTOS

Al Dc Christian Cortes Rojo muchas gracias por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su gran equipo de trabajo la asesoria, confianza, paciencia y los recursos brindados para la realización de este proyecto. Gracias por todo el aprendizaje de vida que me ha dado y su amistad.

Al D.C. Alfredo Saavedra Molina por brindarme el espacio para realizar mi proyecto y por sus aportaciones.

A mis sinodales DC. Alain Raimundo Rodríguez Orosco, DC. Jesús campos García y Homero Reyes de la Cruz por su atención, apoyo, asesoría y aportes brindados durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio de Bioquímica del I.I.Q.B. Mony, Manjury, Clau, Omarsin, Cris, Roxy, Eridany, Maribel, Mau y Wicho, Donovan por compartirme su conocimiento y su gran apoyo para poder realizar todo este trabajo por formar parte de un gran equipo y por todos esos días de convivencia que ya extraño.

A mis compañeras de generación Celeste, Nancy, Pau, Ale, Manju, Sarita, Peniel y Lupita por compartir los momentos de clase y hacerlos menos pesados muchas gracias niñas.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.

Este trabajo se realizó con el apoyo otorgado al proyecto “Participación de la re-oxidación del NADH por el complejo I de mitocondrias de hígado en el efecto hipotrigliceridemiante del aceite de aguacate en ratas diabéticas”, por el Programa de Investigación 2016-2017 de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Diabetes mellitus.	2
1.1.1. Clasificación de la Diabetes mellitus.	2
1.1.2. Importancia de la Diabetes Mellitus en México y en el mundo.	3
1.2. Complicaciones de la microvasculares y macrovasculares de la DM.	3
1.3. El hígado.....	4
1.3.1. Funciones del hígado relacionadas con el metabolismo.	4
1.3.2. Catabolismo hepático de los ácidos grasos.	5
1.3.3. Enfermedad hepática no alcohólica (EHNA).	8
1.3.5. Alteraciones mitocondriales en la EHNA.	12
1.4. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).	15
1.4.1. Sistemas antioxidantes mitocondriales.	16
1.4.2. Catalasa.	17
1.4.3. Glutati6n.	17
1.4.4. Glutati6n peroxidasa (GPx).....	19
1.4.5. Tiorredoxina (Trx).	20
1.5 El aguacate, propiedades y nutrientes.....	22
1.5.1. El aceite de aguacate y su relaci6n con mitocondrias de EHNA de ratas diab6ticas.....	24
2. JUSTIFICACI6N.....	26
3. HIPOTESIS.	27
4. OBJETIVO GENERAL.....	28
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.	28
5. MATERIALES Y M6TODOS.	29
5.1. Animales.	29
5.2. Dise1o experimental.	29
5.3. Aislamiento de mitocondrias.....	30
5.4. Medici6n del consumo de ox6geno.	30

5.5. Oxidación de ácidos grasos.....	31
5.6. Actividad de citocromo c peroxidasa.....	31
5.7 Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR).....	31
5.8. Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX).....	32
5.9. Determinación de la actividad de glutatión y tiorredoxina reductasa (TrxR2).	32
5.10. Determinación de la concentración del NADH.	33
5.11. Geles desnaturizantes SDS-PAGE	33
5.12 Western blot	34
5.12.1 Transferencia de proteínas	34
5.12.2 Inmuno-detección	34
5.12.3 Revelado	35
5.13 Determinación de la concentración de proteínas método Bradford	35
6. RESULTADOS.....	36
6.1. Parámetros fisiológicos.	36
6.2. Efecto del aceite de aguacate en la oxidación de ácidos grasos en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.	39
6.3. Efecto de la diabetes y el aceite de aguacate en la concentración del NADH en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.	41
6.4. Efecto de la diabetes y el aceite de aguacate sobre la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en mitocondrias de hígado de ratas.....	42
6.5. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de glutatión reductasa (GR) y tiorredoxina (TrxR2) en mitocondrias de hígado de ratas.	42
6.6. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de expresión y tiorredoxina (Trx2) en mitocondrias de hígado de ratas.	43
6.7. Actividad de citocromo c peroxidasa.....	44
7. Discusión.	46
8. Conclusión.	53
9. Referencias.....	54

RESUMEN

La enfermedad hepática no alcohólica (EHNA) es una complicación de la diabetes mellitus. Se caracteriza por presentar una acumulación excesiva de triglicéridos en el hígado (esteatosis), seguida de inflamación (esteatohepatitis) y fibrosis (cirrosis). La esteatosis se ha asociado con una disminución de la oxidación β de ácidos grasos en la mitocondria de células hepáticas. Además, un incremento en la peroxidación de lípidos participa en el desarrollo de esteatohepatitis vía la estimulación de la síntesis de colágeno y la producción de citocinas inflamatorias. Previamente, se ha demostrado que el consumo de aceite de aguacate, una fuente rica de compuestos bioactivos, disminuye la peroxidación de lípidos y aumenta los niveles de glutatión (GSH) en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas (MHRD); además de que contrarresta la disminución de la actividad del complejo I de la cadena transportadora de electrones (CTE) por el estrés oxidativo asociado con la diabetes. Dado que la oxidación β depende de la re-oxidación del NADH por el complejo I y a que se desconoce mediante que mecanismo el aceite de aguacate aumenta los niveles de GSH, el objetivo de este trabajo fue investigar si el aceite de aguacate mejora la oxidación β debido a la disminución del NADH producido en la mitocondria y si el GSH aumenta a través de la inducción de los sistemas antioxidantes de la mitocondria.

En MHRD con diabetes tipo I inducida con estreptozotocina, se observó un aumento de la masa relativa del hígado de aprox. el doble, se encontró una disminución de la actividad de oxidación de ácidos grasos y de la actividad de glutatión reductasa y un aumento en los niveles de NADH mitocondriales. Estos eventos fueron disminuidos por la administración durante 90 días del aceite de aguacate por vía oral. En contraste, la condición de diabetes no alteró las actividades de glutatión peroxidasa, tioredoxina reductasa, ni citocromo c peroxidasa. Estos resultados sugieren que la administración del aceite de aguacate en ratas diabéticas disminuyó la masa relativa del hígado, restaurando los niveles de la oxidación β de ácidos grasos y relacionados con un menor nivel

de NADH. Lo anterior podría estar relacionado con el aumento de actividad de glutatión reductasa cuyo producto (GSH) antioxidante contrarresta el estrés oxidativo y la disminución de la actividad del complejo I de la CTE.

PALABRAS CLAVE: Diabetes, EHNA, mitocondria, aceite de aguacate, antioxidantes.

ABSTRACT

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a diabetic complication. It is characterized by excessive accumulation of triglycerides in the liver (steatosis), followed by inflammation (steatohepatitis) and fibrosis (cirrhosis). Steatosis has been associated with a decreased in β -oxidation of fatty acids in mitochondria of liver cells. In addition, an increase in lipid peroxidation is implicated in the development of steatohepatitis through the stimulation of collagen synthesis and the production of inflammatory cytokines. Previously, consumption of avocado oil, a rich source of bioactive compounds, has been decrease lipid peroxidation and increase glutathione (GSH) levels in rat liver diabetic mitochondria (MHRD); In addition to counteracting the decrease in the activity of the complex I from the chain of the electron transport chain (ETC) by the oxidative stress associated with diabetes. Given that β -oxidation depends on NADH reoxidation by complex I and that it is unknown the mechanism by which avocado oil increases the levels of GSH, the objective of this work was to investigate if the avocado oil improves β -oxidation due to decreased levels of NADH produced in mitochondria and whether GSH increases through the induction of mitochondrial antioxidant systems. In the MHRD with type I diabetic rats induced by streptozotocin, an increase in relative liver mass of approx. A decrease in fatty acid oxidation activity and glutathione reductase activity and an increase in mitochondrial NADH levels were found. Moreover, it was observed a two-fold augment in the relative weight of liver. All these events were decreased by 90-days avocado oil oral supplementation. In contrast, diabetes did not alter the activities of glutathione peroxidase, thioredoxin reductase neither cytochrome c peroxidase. These results suggest that avocado oil supplementation decreased the relative weight of liver in diabetic rats by improving β -oxidation of fatty acids because lower levels of NADH. This may be related with the increment in the activity of glutathione reductase, since this enzyme augments GSH concentration and this antioxidant counteracts the decrease in complex I activity by enhanced oxidative stress.

Key words: Diabetes, NAFLD, mitochondria, avocado oil, antioxidants.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Diabetes mellitus.

La diabetes mellitus (DB) es una enfermedad crónico degenerativa caracterizada por un conjunto de trastornos metabólicos que se caracterizan por un estado constante de hiperglucemia debido a la carencia relativa o absoluta de la producción de insulina por el páncreas o bien, la que se produce no es utilizada de manera eficiente por el organismo (López, 2009).

La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, la cual es producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas que está encargada de regular el metabolismo de la glucosa (Koolman y Rohm, 2004).

1.1.1. Clasificación de la Diabetes mellitus.

La diabetes se ha dividido en dos grandes grupos respecto a la administración de insulina en su tratamiento: los pacientes insulino-dependientes y los no insulino-dependientes.

➤ *Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)*

Producida por una destrucción total de las células beta del páncreas provocando la ausencia de síntesis de insulina, generalmente se presenta en pacientes con antecedentes familiares directos (Gómez *et al.*, 2014; Guzmán y Madrigal, 2003; OMS, 2016).

➤ *Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2)*

Se caracteriza por ser un trastorno complejo y multifactorial en el cual existe un déficit en la producción de insulina así como la incapacidad para incorporar la glucosa a las células musculares y el tejido adiposo debida a un defecto a la acción de la misma. Existe además la diabetes mellitus gestacional (DMG), que se manifiesta como una hiperglicemia que se detecta por primera vez durante el

embarazo especialmente a las 24 semanas de gestación, la cual es transitoria una vez que el embarazo llega a término pero predispone más a la mujer a padecer DM2 (Buchanan *et al.*, 2007; OMS, 2016; Sridhar *et al.*, 2014).

Los síntomas de DM1 y DM2 son poliuria, polidipsia, polifagia con pérdida de peso y visión borrosa, con la diferencia de que en la DM2, estos se pueden presentar tiempo después ya que la enfermedad puede ser asintomática varios años por lo que la mayoría de las personas ignoran que padecen la enfermedad (OMS, 2016; Zachary *et al.*, 2002).

1.1.2. Importancia de la Diabetes Mellitus en México y en el mundo.

En la actualidad 415 millones de personas en el mundo están diagnosticadas con algún tipo de Diabetes, mientras que para el año 2040 se prevé que 642 millones de personas padezcan dicha enfermedad según la *International Diabetes Federation* (IDF). México ocupa el segundo lugar respecto a la región de América del Norte y del Caribe con 11.5 millones de personas con algún tipo de Diabetes. En nuestro país la incidencia más alta se ubica en el grupo de edad de 60 a 64 años de edad del sexo femenino con 1,924.23 de cada 100,000. El estado de Michoacán de Ocampo ocupa el lugar número 17 a nivel nacional con casos positivos de esta enfermedad siendo la primer causa de muerte en el estado (Alonso, 2009; IDF, 2015; INEGI, 2013).

La DM impone una gran carga económica para los individuos así como para los sistemas nacionales de salud para brindar una atención adecuada. En México, las instituciones de salud gastan en promedio por paciente con diabetes 707 dólares al año (INEGI, 2013).

1.2. Complicaciones de la microvasculares y macrovasculares de la DM.

Durante el desarrollo de la DM se presentan complicaciones provocadas por la hiperglucemia dentro del organismo las cuales pueden ser agudas y crónicas. Las complicaciones agudas son cetoacidosis y coma hiperosmolar. Las complicaciones crónicas se subdividen en dos grandes grupos dependiendo del tamaño de los vasos capilares sanguíneos afectados, las complicaciones microvasculares representan daño al endotelio y musculo liso y se manifiestan

como nefropatía, retinopatía y neuropatía diabética. Por el contrario, si las alteraciones se presentan en vasos de mayor calibre se denominan complicaciones macrovasculares como: cardiopatía isquémica, enfermedad cerebrovascular y la vasculopatía periférica (Díaz *et al.*, 2004; López, 2009).

1.3. El hígado.

El hígado es el órgano más grande del cuerpo, localizado bajo el diafragma y las costillas, se extiende a través del lado izquierdo del cuerpo por encima del borde superior del estómago. Los hepatocitos son las células parenquimosas del hígado y comprenden el 60% del número total de células del órgano y el 80% del volumen celular total. Desempeña varias funciones fundamentales en el metabolismo y en relación a la glucosa, regula su homeostasis sistémica en mamíferos, mediante la detección de estímulos por la presencia de nutrientes y a su vez, la producción de sustancias bioactivas para la función de muchos órganos y tejidos (Kelley, 1992; Rolo *et al.*, 2006; Toshinari *et al.*, 2012).

1.3.1. Funciones del hígado relacionadas con el metabolismo.

En el hígado se realizan diversas funciones importantes para el metabolismo básico en animales como:

- Liposíntesis
- Lipogénesis de novo
- β -oxidación de ácidos grasos
- Lipolisis
- Síntesis y exportación de lipoproteínas

Durante el desarrollo de la DM las funciones del hígado así como de otros órganos son afectadas o interrumpidas debido a la constante hiperglucemia resultado de la pérdida de la regulación del metabolismo de la glucosa (Rolo *et al.*, 2006; Tessari *et al.*, 2009; Traverso *et al.*, 1999).

1.3.2. Catabolismo hepático de los ácidos grasos.

El metabolismo de los lípidos (oxidación de ácidos grasos y lipogénesis) implica varias vías interdependientes y "cruzadas". En modelos animales, se ha encontrado que el hígado podría acumular lípidos dentro de unas pocas semanas e incluso unos pocos días. Se ha sugerido que el hígado graso podría resultar de varios mecanismos alterados responsables del aumento de lípidos hepáticos.

El hígado transporta los ácidos grasos no esterificados de la sangre en proporción a su concentración, porque no hay evidencia de que el transporte hepático de ácidos grasos esté regulado. Los ácidos grasos absorbidos por el hígado se oxidan o esterifican para producir triglicéridos, que se almacenan dentro del hepatocito o se incorporan a partículas de lipoproteína de baja densidad (VLDL) para su exportación.

El incremento en la disponibilidad de los ácidos grasos en el hígado podría ser multifactorial debido a una mayor liberación de ácidos grasos en los adipocitos, el exceso de contenido de lípidos en la dieta, aumento de la lipogénesis *de novo* (LDN) (es decir, la síntesis endógena de AGL en el hígado) y una eliminación insuficiente (β -oxidación, síntesis y secreción de VLDL) (Fig. 1) (Marra *et al.*, 2008; Rolo *et al.*, 2011).

La β -oxidación mitocondrial es la vía oxidativa dominante para la eliminación de ácidos grasos en condiciones fisiológicas normales. Las mitocondrias catalizan la β -oxidación de AGL de cadena corta, media y larga, esta vía constituye el proceso principal por el cual los ácidos grasos se oxidan para rendir energía. Para su catabolismo, los ácidos grasos de cadena larga deben ser transformados a sus ésteres de acil-CoA, porque no pueden atravesar directamente la membrana interna mitocondrial. La transferencia a través de la membrana mitocondrial implica tres pasos diferentes: (1) la reacción catalizada por la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT1) de la membrana externa, que intercambia la CoA de la molécula de acil-CoA por una molécula de carnitina para formar el derivado acil-

carnitina. (2) El segundo paso es el transporte a través de la membrana interna de la mitocondria, catalizado por la carnitina/acilcarnitina translocasa y (3), la reconversión al éster de acil-CoA en la cara de la matriz de la membrana interna mitocondrial por la carnitina palmitoiltransferasa-2 (CPT2). La CPT1 es la puerta de entrada mitocondrial para los ácidos grasos, es el principal controlador del flujo de la β -oxidación hepática: su actividad es inhibida por el malonil-CoA, producto del primer paso de la síntesis de ácidos grasos (Rolo *et al.*, 2011; Serviddio *et al.*, 2008; Tessari *et al.*, 2009).

La β -oxidación implica cuatro reacciones individuales que generan equivalentes reductores (NADH y FADH₂), que luego pueden ser oxidados por la cadena de transporte de electrones (CTE). La energía liberada se utiliza para la síntesis de ATP mediante la fosforilación oxidativa.

La β -oxidación mitocondrial acorta progresivamente el acil-CoA dos unidades de carbono en cada ciclo (liberado como acetil-CoA), a través de una serie de reacciones de oxidación utilizando FAD²⁺, hidratación, oxidación por NAD⁺ y tiólisis, generando equivalentes reductores (NADH o FADH₂). El acetil-CoA derivado de la oxidación de ácidos grasos puede entrar en el ciclo de Krebs para su oxidación completa y la liberación de energía para el hígado o puede ser condensado, para formar cuerpos cetónicos (acetoacetato y β -hidroxibutirato) que se exportan para proporcionar energía para otros tejidos.

Se ha observado un aumento en la β -oxidación mitocondrial en pacientes con EHNA, así como en el hígado de ratones obesos diabéticos con esteatosis masiva o en el hígado de los roedores obesos inducidos por dieta. El incremento de la actividad de la β -oxidación se ha confirmado *in vivo* utilizando la prueba de aliento con ¹³C-octanoato de sodio. Además, un estudio reciente muestra que la oxidación de los ácidos palmítico y lignocérico se incrementa significativamente en un modelo de roedores con EHNA. Cabe señalar que la oxidación mitocondrial de AGL no se inhibe hasta que la respiración se ve gravemente afectada. Esto puede ocurrir porque la β -oxidación acelerada causa un flujo de electrones excesivo en la CTE y la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ERO), conduciendo

a la disfunción mitocondrial. A medida que la capacidad oxidativa de las mitocondrias se deteriora o se sobrepasa, los ácidos grasos citosólicos se acumulan. El deterioro severo de la CTE mitocondrial puede obstaculizar la reoxidación de NADH y FADH₂ bloqueando así secundariamente la oxidación de ácidos grasos. Esto debido a que la regeneración del NAD⁺ es esencial para la β -oxidación durante la reducción de acetoacetato en β -hidroxibutirato.

Además, el aumento de la lipogénesis observado en la EHNA aumenta la concentración de malonil-CoA, un reflejo de la lipogénesis *de novo* activa, que evita la oxidación de los AGL y los dirige a la esterificación para producir triglicéridos. Por el contrario, una concentración baja de malonil-CoA mejora la actividad de la CPT-1 favoreciendo el transporte de ácidos grasos en la mitocondria y la β -oxidación. De hecho, la expresión y/o actividad de la CPT-1 en el hígado aumenta en modelos de roedores con esteatosis y DM1. La β -oxidación en la mitocondria hepática parece ser mayor durante la EHNA, pero la acumulación de triglicéridos puede ser el producto de un aumento de síntesis *de novo* y el transporte deficiente de AGL en las mitocondrias (Begriche *et al.*, 2013; Marra *et al.*, 2008; Rolo *et al.*, 2011; Tessari *et al.*, 2009).

Debido a que la síntesis *de novo* de ácidos grasos contribuye directamente a la deposición de grasa *in situ*, se espera que inhiba la biosíntesis endógena de ácidos grasos hepáticos en el hígado graso. Sin embargo, los datos de estudios de modelos animales de EHNA y de resistencia a la insulina apoyan la noción de que un aumento en la síntesis *de novo* de ácidos grasos en el hígado es un evento clave que conduce a la esteatosis masiva. Por el contrario, estudios en seres humanos sugieren que la lipogénesis aumentada contribuye modestamente a la cantidad de triglicéridos sintetizados en el hígado. La insulina también regula la lipólisis, restringiendo la liberación de ácidos grasos por los adipocitos en condiciones de ayuno. El estado de resistencia a la insulina se asocian con el incremento de la lipólisis y liberación de ácidos grasos debido a la falta de inhibición de la lipasa sensible a las hormonas en los tejidos adiposos, lo que

resulta en un aumento de la afluencia hepática de ácidos grasos (Rolo *et al.*, 2011).

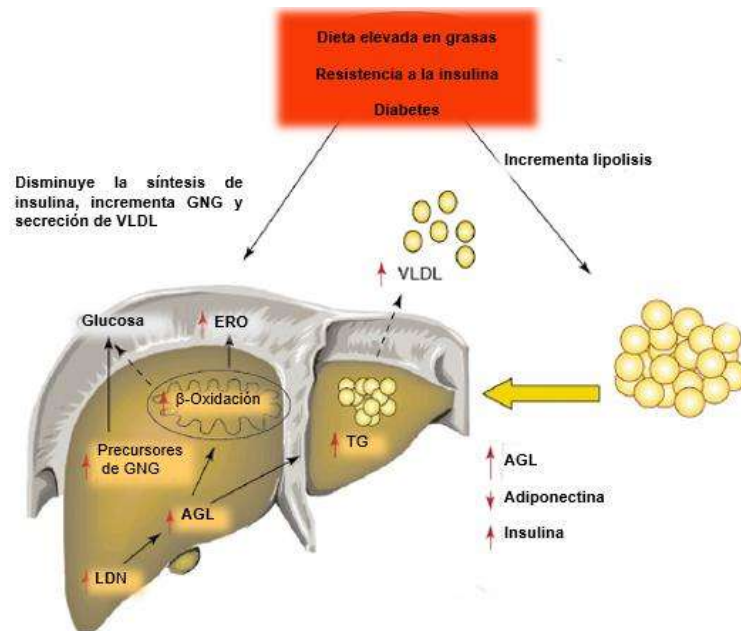


FIGURA 1. Mecanismos de acumulación de grasa en la esteatohepatitis no alcohólica. La dieta, la resistencia a la insulina y la diabetes provocan un incremento de AGL al hígado, debido al aumento de la lipólisis. El aumento de la lipogénesis de *novoy* lípidos de la dieta también contribuyen al almacenamiento de ácidos grasos. Tanto la generación de VLDL como la oxidación de AGL aumentan y son suficientes para prevenir la acumulación intrahepática de lípidos. Abreviaturas: DNL, liposoma de novo; GNG, gluconeogénesis; ERO, especies reactivas del oxígeno; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Tomado y modificado de Marra *et al.*, 2008.

1.3.3. Enfermedad hepática no alcohólica (EHNA).

La EHNA engloba una serie de alteraciones hepáticas que comienza con la acumulación excesiva de triglicéridos (esteatosis), progresa a un estado inflamatorio (esteatohepatitis) y cirrosis (hepatitis). La esteatosis se caracteriza por una infiltración de grasa macrovesicular del hígado en forma de triglicéridos en más del 5% de los hepatocitos y que puede progresar a largo plazo hasta esteatohepatitis no alcohólica (ENA) en 10% a 20% de los pacientes la cual comprende inflamación, fibrosis y finalmente, cirrosis hepática y cáncer. La EHNA está íntimamente relacionada con la resistencia a la insulina en el hígado y en el

tejido adiposo, así como con una disminución en la sensibilidad a la insulina en todo el organismo. Los pacientes con esteatosis suelen presentar DM, hipertrigliceridemia, obesidad e hipertensión, características que forman parte del síndrome de resistencia a la insulina (Begrache *et al.*, 2013; Bulum *et al.*, 2011; Chitturi *et al.*, 2002; IMSS, 2014).

La EHNA es una de las enfermedades hepáticas más comunes en el mundo y la principal en los países occidentales, su prevalencia es creciente debido a la epidemia actual de obesidad y DM mundial. Su prevalencia es del 3% en la población pediátrica general, llegando a 53% en los niños obesos y aumenta con la edad. Diversos estudios sugieren que la etnicidad juega un papel importante en el desarrollo de EHNA, siendo los hispanos las poblaciones con mayor riesgo, seguido de los blancos y después los afroamericanos. Según la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), México es el país con el mayor nivel de niños obesos en el mundo, lo cual implica que podría ser uno de los países con las mayores incidencias de EHNA, tomando en cuenta que la obesidad es uno de los factores que se consideran de alto riesgo para el desarrollo de EHNA (Mulhall *et al.*, 2002; IMSS, 2014).

1.3.4. Progresión de la EHNA: teoría de los “hits”

En 1998 Day y James propusieron la teoría de los “2 hits” o “2 pasos” la cual se ha ido modificando hasta la actualidad. El 1^{er} “hit” al hepatocito es la desregulación del metabolismo de los ácidos grasos, provocando su acumulación excesiva (esteatosis), aumentando la susceptibilidad del hígado a una lesión mediada por citocinas y adipocinas inflamatorias, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, lo cual comprende el 2 “hit”. Recientemente, se ha añadido un 3^{er} “hit” para reflejar la lesión crónica del hígado donde la muerte celular y la alteración de la proliferación de hepatocitos dan origen al desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática (Fig. 2) (Carrillo *et al.*, 2011; Dowman *et al.*, 2009).

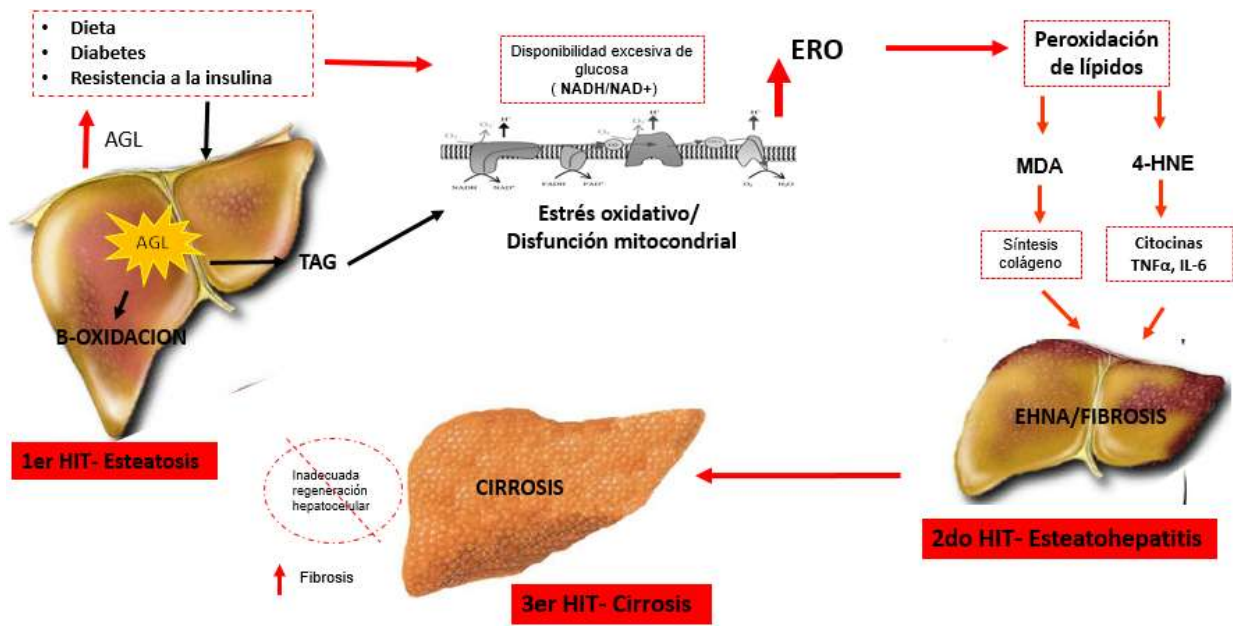


FIGURA 2. Desarrollo de la enfermedad Hepática no alcohólica (EHNA): Teoría de los “Hits”. “1 Hit” se caracteriza por acumulación de triglicéridos provocando aumento de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial exacerbando la producción de ERO y generando productos intermedios de la peroxidación de lípidos (malondialdehído y 4-hidroxinoneal) activando citocinas y adipocinas inflamatorias lo cual caracteriza el progreso a EHNA comprendiendo el “2 Hit”, la lesión crónica del hígado se caracteriza por desarrollar fibrosis y cirrosis hepática marcando el “3 Hit”. Tomado y modificada de Dowman *et al.*, 2009.

La esteatosis macrovesicular del 1^{er} “hit” se deriva del aumento en la captación y síntesis de ácidos grasos en el hígado. Los triglicéridos acumulados en los hígados de los pacientes con EHNA derivan de la esterificación de glicerol y AGL los cuales son oxidados en la mitocondria. Los AGL surgen en el hígado a partir de tres fuentes distintas: lipólisis (la hidrólisis de los triglicéridos en AGL y glicerol) dentro del tejido adiposo, a partir de la hidrólisis de los quilomicrones procedentes del intestino (dieta) y la lipogénesis *de novo* (Carrillo *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2016).

En contraste, los AGL pueden ser utilizados por la β -oxidación en las mitocondrias, pueden ser re-esterificados a triglicéridos, pueden ser almacenados como gotitas lipídicas o incorporados y exportados hacia la circulación como VLDL, las cuales se forman mediante la incorporación de triglicéridos en la apolipoproteína B (apoB) por la proteína de transferencia microsómica (MTP). Por lo tanto, la acumulación de triglicéridos ocurre cuando la tasa de importación o

síntesis de AGL por hepatocitos excede la tasa de exportación o catabolismo de estos (Begriche *et al.*, 2013; Dowman *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2016).

Aproximadamente, del 30 al 40 % de pacientes con esteatosis simple progresa a EHNA, el 2º “hit”, en este proceso están involucrados algunos eventos como la sobreproducción de ERO y especies reactivas del nitrógeno (ERN), lo que genera estrés oxidativo, peroxidación lipídica, aumento de la liberación de citocinas pro-inflamatorias y activación de las células estrelladas hepáticas y apoptosis. Sin embargo, el estrés oxidativo (desequilibrio entre la capacidad antioxidante y la producción de oxidantes a favor de estos últimos), es una característica central de la patogenia de la EHNA, ya que genera una disminución en la actividad enzimática de la cadena respiratoria involucrando la relación ADP/ATP produciendo daño en el ADN y las proteínas, altera la estructura y función de la membrana a través de la peroxidación lipídica.

Existen diferentes mecanismo que podrían explicar la exacerbada generación de ERO durante la EHNA: la inducción del citocromo P450 2E1, que produce ERO dentro de la mitocondria y el retículo endoplasmico, un incremento en la etapa inicial de la oxidación de ácidos grasos que produce H₂O₂ y un aumento en la oxidación de ácidos grasos mitocondriales que también participan en el generación de ERO (Begriche *et al.*, 2013; Carrillo *et al.*, 2011; Depner *et al.*, 2012; Tessari *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2016).

Los adipocitos bajo inflamación producen citocinas y quimiocinas, particularmente el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), las interleucina-6 (IL-6) y la quimiocina-CC (CCL2). El TNF- α fue la primera citocina proinflamatoria detectada en el tejido adiposo y participa en la regulación de la resistencia a la insulina. TNF- α e IL-6 inducen un estado de resistencia a la insulina en adipocitos estimulando la lipólisis de triglicéridos y la liberación de ácidos grasos en la circulación. Al mismo tiempo, los adipocitos extrahepáticos secretan adiponectina, un antiinflamatorio que facilita la distribución normal de los lípidos a los adipocitos para su almacenamiento. La adiponectina circulante regula los lípidos hepáticos a través de la β -oxidación por medio de la señalización de la proteína cinasa AMP-

activada (AMPK) que fosforila e inactiva a la acetil-CoA carboxilasa (ACC), incrementando el transporte de ácidos grasos libres en la mitocondria así como la β -oxidación restableciendo el equilibrio energético, al estimular la pérdida de lípidos de los adipocitos y disminuyendo la acumulación de estos en el hígado y músculo esquelético. (Depner *et al.*, 2012; Hasenour *et al.*, 2013; Tessari *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2016).

En el hígado sano, la muerte celular estimula la replicación de los hepatocitos maduros que reemplazan a las células muertas y reconstituyen la función normal del tejido. El estrés oxidativo inhibe la replicación de los hepatocitos maduros, activando otras vías de regeneración hepática como células estrelladas hepáticas (CEH) estas células pueden diferenciarse en células similares a hepatocitos y producen fibrosis y son las responsables de la deposición de matriz extracelular y colágeno, lo que sugiere que la pérdida acumulada de hepatocitos promueve la acumulación de células progenitoras y su diferenciación hacia los hepatocitos. Así, la proliferación alterada de progenitores de hepatocitos representa el "3 Hit" propuesto en la patogenia de EHNA.

A pesar de sus abundantes recursos antioxidantes, los hepatocitos sufren el efecto citotóxico del estrés oxidativo, que conduce a la muerte celular por necrosis y apoptosis, causando fibrosis y cirrosis hepática de la cual un 20 a 25% de los pacientes evolucionan a hepatocarcinoma (Carrillo *et al.*, 2011; Dowman *et al.*, 2009; Marra *et al.*, 2008; Tessari *et al.*, 2009).

1.3.5. Alteraciones mitocondriales en la EHNA.

Las mitocondrias están presentes en el citoplasma de todas las células eucariontes, son los proveedores de energía más importantes de la célula y juegan un papel fundamental en el metabolismo de los ácidos grasos. La mitocondria posee un sistema de doble membrana, una externa y una interna, que separan tres espacios bien definidos: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (Marra *et al.*, 2008; Voet y Voet, 2006; Yu *et al.*, 2016).

La energía necesaria para la producción del ATP es generada por la cadena de transporte de electrones (CTE), uno de los principales factores de generación de

ERO, la cual está conformada por cuatro complejos respiratorios (I, II, III, IV) que cruzan la membrana interna mitocondrial y están conectados eléctricamente por la ubiquinona (coenzima Q) y el citocromo c que son dos moléculas móviles transportadoras de electrones que se mueve entre los complejos respiratorios (Fig.3) (Karp, 2005; Koolman y Rohm, 2004).

La síntesis de ATP está acoplada a un potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{mt}$) que es generado por los complejos I, II y IV de la CTE, el cual impulsa a la F_1F_0 - ATPasa para generar ATP a partir de ADP y P_i . Durante la oxidación de sustratos provenientes del metabolismo como el NADH y el $FADH_2$ mientras que el aceptor final de electrones es el O_2 , el cual se reduce para formar H_2O (Estrada-Cano *et al.*, 2011; Karp, 2005).

La respiración mitocondrial se evalúa en los estados 3 (alto contenido de ADP y sustrato) y 4 (bajo contenido de ADP y alto de sustrato) para calcular el cociente respiratorio (Velocidad en estado 3/estado 4). El mismo es función del grado de acoplamiento mitocondrial y es un indicador de la integridad mitocondrial (Hroudová *et al.*, 2013).

Estado	Nivel de ADP	Nivel de Sustrato	Velocidad de respiración	Tasa de componente limitante
1	Bajo	Bajo	Baja	Aceptor de fosfato
2	Alto	Cercano a cero	Baja	sustrato
3	Alto	Alto	Rápida	Cadena respiratoria
4	Bajo	Alto	Rápida	Aceptor de Fosfato
5	Alto	Alto	Nula	Oxigeno

Tabla1. Estados respiratorios. . Tomado y modificado de Hroudová *et al.*, 2013.

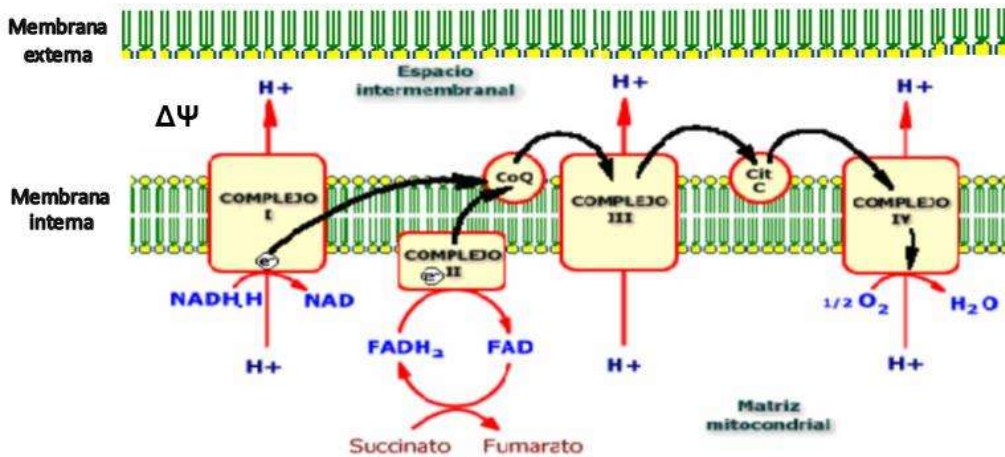


Figura 3. Complejos que integran a la cadena de transporte de electrones. Se indica la dirección del transporte de electrones a través de los complejos y de los H^+ . Complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo II (succinato deshidrogenasa), Complejo III (citocromo *c* oxidorreductasa) y Complejo IV (citocromo *c* oxidasa). Tomado y modificado de Karp, 2005.

Durante este proceso se generan ERO debido a la fuga de electrones en los sitios redox de los complejos I y III que bajo condiciones fisiológicas se neutralizan por sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, con lo que se preserva la integridad mitocondrial (Giacco *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo de la EHNA, se manifiestan adaptaciones metabólicas que intentan restringir la acumulación de grasa. Un mecanismo importante es la oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos. El aumento de la oxidación mitocondrial de AGL y otros sustratos, también podría ser una adaptación para producir más ATP necesario para la lipogénesis *de novo* y la gluconeogénesis. Sin embargo, múltiples estudios han demostrado que los niveles de ATP en el hígado están disminuidos en la EHNA. Otra adaptación importante en el hígado graso puede ser un aumento de la liberación de VLDL (Begrache *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2016). El hígado de los pacientes con EHNA se caracteriza por tener mitocondrias anormales, desde un punto de vista funcional, así como morfológico; son escasas, presentan hinchamiento y son redondas, con pérdida de crestas y la presencia de inclusiones paracrystalinas. Existen pruebas de que la disfunción mitocondrial participa en varios niveles de la patogénesis de la EHNA, ya que

perjudica el metabolismo de los lípidos, aumenta el estrés oxidativo y la producción de citocinas, provocando muerte celular, inflamación y fibrosis. Los defectos de la CTE son un factor determinante de la disfunción mitocondrial, así como las actividades enzimáticas reducidas de los complejos de la CTE, que durante la β -oxidación y la oxidación de los equivalentes reducidos NADH y FADH_2 en la CTE, promueven el aumento en la producción de ERO. La disminución de la actividad de la CTE, así como de ATP sintasa, se ha encontrado en hígados de pacientes con EHNA. El malondialdehído y el 4-hidroxinonal, resultado de la peroxidación de lípidos son capaces de disminuir al complejo IV, mientras que las ERO pueden dañar tanto el ADN mitocondrial (ADNmt) como a los centros hierro-azufre de la cadena respiratoria. La alteración en la fosforilación oxidativa aumenta la expresión de la proteína desacoplante 2 (UCP-2) en el hígado de pacientes con EHNA. Las citocinas inflamatorias, incluyendo $\text{TNF-}\alpha$, también contribuyen a la disfunción mitocondrial al interferir con la CTE y estimular la formación de $\text{O}_2^{\cdot-}$. La acumulación de colesterol dentro de las mitocondrias se ha identificado recientemente como un factor adicional que vincula la infiltración lípidos con el desarrollo de EHNA (Begrache *et al.*, 2013; Marra *et al.*, 2008; Rolo *et al.*, 2011; Serviddio *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2016).

1.4. Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

En mitocondrias de hígado aisladas de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) se ha mostrado una disminución en la actividad de la CTE, caracterizada por una disminución en el potencial de membrana y en el cociente respiratorio. La mayor parte de los electrones proporcionados a la CTE son transportados a lo largo de ésta, para finalmente llegar al complejo IV, donde reducen el oxígeno para formar agua. Sin embargo, una fracción de estos electrones se fugan a través del complejo I y III para formar el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), principalmente en el complejo I. Este radical sufre una dismutación por la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD) en peróxido de hidrogeno (H_2O_2).

El H_2O_2 es estable y menos reactivo que el $O_2^{\cdot-}$. La reacción del H_2O_2 con algunos metales de transición como el hierro o el cobre reducidos (Fe^{2+} Cu^+) a través de la reacción de Fenton da lugar a la formación del radical hidroxilo (OH^{\cdot}), que es el radical libre con la mayor reactividad conocida. Cualquier disminución significativa de la actividad de la CTE puede inducir sobreproducción de ERO, lo que desencadena estrés oxidativo (Cortés-Rojo, 2005; Ferreira *et al.*, 2003; Sudheeret *al.*, 2008; Ortiz-Avila *et al.*, 2015).

1.4.1. Sistemas antioxidantes mitocondriales.

Para prevenir y proteger a los componentes celulares del daño inducido por las ERO, los organismos aerobios han desarrollado un elaborado mecanismo de defensa para mantener un adecuado ambiente redox, mediante distintos mecanismos de eliminación y transformación de las ERO, denominado sistema de defensa antioxidante. Un antioxidante es aquella especie química que tiene como función retardar, prevenir o eliminar el daño oxidativo causado por las ERO en otras moléculas. Estos incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), la catalasa (Cat), el glutatión reducido (GSH) y la tiorredoxina (Trx)(Fig.4).

En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la generación y degradación de ERO, mientras que en pacientes con diabetes y EHNA estas defensas antioxidantes se han encontrado disminuidas, lo cual ha dado lugar a diversas investigaciones para determinar si los antioxidantes pueden contribuir a disminuir el daño ocasionado por la diabetes (Aon *et al.*, 2012; Begriche *et al.*, 2013; Cuerda *et al.*, 2011; Folch-Mallolet *al.*, 2004; Halliwell, 2006).

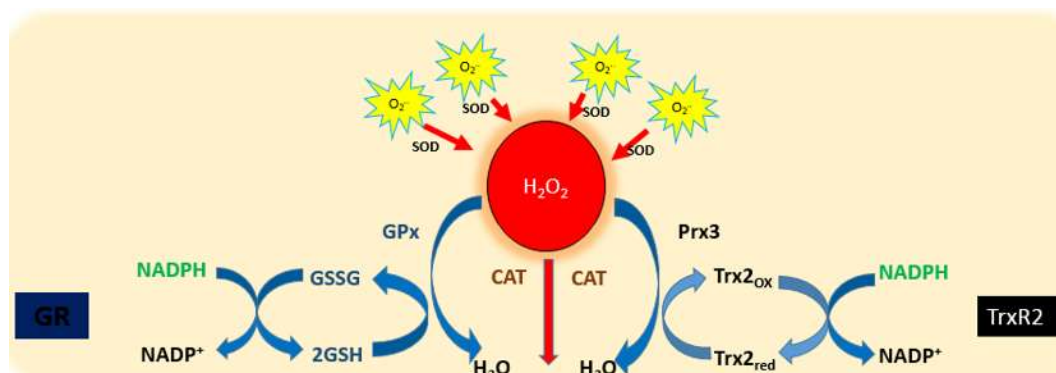


Figura 4. Principales sistemas antioxidantes. La SOD transforma el $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 , el cual es transformado en H_2O por la catalasa la glutatión peroxidasa y la tioredoxina a expensas de GSH y Trx, respectivamente. Las glutatión reductasa y las tioredoxina reductasa regeneran las especies reducidas de ambas defensas a expensas de NADPH. Tomado y modificado de Aon *et al.*, 2012.

1.4.2. Catalasa.

La catalasa es una enzima que tiene un grupo hemo como sitio activo. Se encuentra principalmente en los peroxisomas. Lleva a cabo la función de catalizar la conversión de H_2O_2 formado por la transformación catalizada por la SOD en H_2O y O_2 (Fig. 4). Se encuentra en diversos órganos y tiene una gran actividad en hígado y eritrocitos. La administración dirigida de catalasa en el hígado suprime la metástasis hepática y disminuye la actividad metaloproteínasa de matriz (MMP) y atenúa el depósito de colágeno. La catalasa es una enzima que tiene una baja afinidad por H_2O_2 , por lo que actúa concentraciones en el rango milimolar (Djordjevi *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2006; Weydert *et al.*, 2010). Las mitocondrias no contienen catalasa. En su lugar, el complejo IV puede actuar como una peroxidasa utilizando al citocromo c como donador de electrones. Sin embargo, su contribución a la remoción del H_2O_2 es marginal debido a que su afinidad por esta ERO es muy baja (Vygodina y Konstantinov, 2007).

1.4.3. Glutatión.

Las mitocondrias están expuestas a la generación constante de especies oxidantes. Para ello el orgánulo sigue siendo funcional debido a la existencia de sistemas de defensa antioxidante, de los cuales el glutatión reducido (GSH) es uno de los principales para prevenir o reparar el daño oxidativo generado durante el metabolismo aeróbico normal. Otras de sus funciones son de catálisis, metabólicas y de transporte. Una de sus principales funciones es actuar como sensor redox detecta y responde a ERO que pueden perturbar el equilibrio redox mitocondrial y citosólico.

El GSH es un tripéptido el cual se sintetiza a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina por la acción sucesiva de dos enzimas, la sintetasa de gamma glutamilcisteina y la sintetasa de glutatión, el cual contiene un grupo tiol libre. La formación de un enlace disulfuro entre dos moléculas de GSH da lugar al glutatión oxidado (GSSG). La enzima glutatión reductasa (GR) recicla el GSSG a GSH con la oxidación simultánea de β -nicotinamida adenindinucleótido fosfato (β -NADPH) producido en el ciclo de las pentosas fosfato (Fig.4) (Marí *et al.*, 2012).

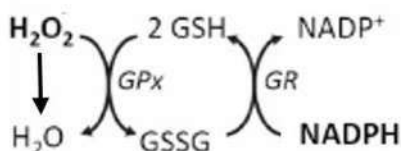


Figura 5. Recambio del par GSH/GSSG. El metabolismo del peróxido de hidrógeno se lleva a cabo principalmente por el GSH. El GSH se oxida a GSSG, que se reduce de nuevo a GSH por la GR dependiente de NADPH. Tomado y modificado de Aon *et al.*, 2012.

La síntesis de GSH se lleva a cabo sólo en el citoplasma. A pesar de la alta concentración de GSH en la matriz mitocondrial, el GSH no se sintetiza *de novo* en este orgánulo debido a que las mitocondrias carecen de las enzimas necesarias para la síntesis de GSH a partir de sus aminoácidos constituyentes (Griffith *et al.*, 1985; Marí *et al.*, 2012; Zhong *et al.* 2008).

En la membrana mitocondrial interna (MMI) se han identificado algunos transportadores de GSH, los acarreadores de 2-oxoglutarato (OGC) y dicarboxilato (DIC), los cuales son responsables de la exportación citosólica de GSH en mitocondrias hepáticas de rata. La conversión reversible de GSH a GSSG se produce tanto en las mitocondrias como en el citoplasma y se caracteriza por ser un proceso neto lento mientras que el transporte de regeneración es más rápido. La acumulación de ERO depende de la interacción entre la relación extramitocondrial de GSH/GSSG y la regeneración de GSH en la matriz mitocondrial (Aon *et al.*, 2012; Martensson *et al.*, 1990; Zhong *et al.*, 2008).

La glutatión reductasa es una enzima ubicua que se produce en todos los tipos de células, cataliza la reducción de GSSG a GSH por el NADPH. La GR es

esencial para el ciclo redox del glutatión, mantiene los niveles adecuados de reducción de GSH celular, proporciona protección contra hidroperóxidos así como radicales libres (Fig.5).

La relación GSH/GSSG se ha encontrado disminuida en hígados de ratas diabéticas al igual que en pacientes con EHNA. Otras defensas antioxidantes mitocondriales también son afectadas. Asimismo, en la actualidad, existe el interés en la modulación de los niveles de GSH celulares para proteger a las células contra el daño oxidativo y compuestos tóxicos (Aon *et al.*, 2012; Mannervik *et al.*, 1999; Marí *et al.*, 2012; Ortiz-Avila *et al.*, 2015).

1.4.4. Glutatión peroxidasa (GPx).

Las células de mamíferos tienen mecanismos elaborados de defensa antioxidante para controlar los efectos dañinos de las ERO. Se han encontrado dos tipos principales de glutatión peroxidasa (GPx). Uno se distingue por contener selenio en forma de selenocisteína unida covalentemente en su sitio activo, formando una "tríada catalítica" con triptófano y glutamina, que activa el resto de selenio para una reducción eficaz de peróxidos. Esta enzima dependiente de selenio es activa tanto para la reducción de H₂O₂ como de hidroperóxidos. El segundo tipo de glutatión peroxidasa consiste en proteínas que no dependen de Selenio para la catálisis. Esta clase está constituida por glutatión transferasas (Bhabak *et al.*, 2010; Flohe *et al.*, 2013; Tosatto *et al.*, 2008).

La enzima GPx requiere de algunas enzimas secundarias (GR y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) y cofactores (GSH, NADPH y glucosa-6-fosfato) para llevar a cabo su función y cuenta con una serie de isoenzimas. El ciclo enzimático de las GPx se inicia por la oxidación de selenol (Se⁻) por un sustrato de peróxido para formar ácido selénico (SeOH). El SeOH reacciona con tioles, comúnmente con GSH, generando un enlace de selenio-sulfuro, que es reducido por una segunda molécula de GSH. Las dos moléculas oxidadas de GSH forman GSSG, el cual se recicla a dos moléculas de GSH utilizando GR y NADPH (Fig. 4) (Flohe *et al.*, 2011; Mannervik, 1985; Weydert *et al.*, 2010).

Otras de las funciones de las GPx son como regulador de la inflamación, la apoptosis y otras cascadas de señalización de los principales procesos biológicos (Flohe *et al.*, 2013).

1.4.5. Tiorredoxina (Trx).

La regulación del equilibrio redox celular se determina críticamente por la actividad de varios sistemas antioxidantes. Recientemente se ha mostrado al sistema antioxidante de tiorredoxina de mamífero como un sistema de protección crítico debido a los nuevos descubrimientos de sus funciones como la regulación redox celular, el control del estrés oxidativo y la protección contra el daño oxidativo (Arné *et al.*, 2000; Yamawaki *et al.*, 2003).

En las mitocondrias, el sistema de Trx está constituido por peroxirredoxina 3 (Prx3) que descompone el H_2O_2 producido en la CTE, su actividad depende de la tiorredoxina reducida [Trx-(SH)₂ ó Trx₂], la cual tiene un sitio activo conservado (Cys-Gly-Pro-Cys) que cataliza las reducciones disulfuro de la proteína. La tiorredoxina oxidada formada (Trx-S₂) se reduce por tiorredoxina reductasa (TrxR2) de una manera dependiente de NADPH como donador de electrones (Fig.6) (Aon *et al.*, 2012; Arné *et al.*, 2000).

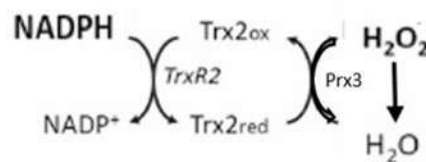


Figura 6. Ciclo de Trx. El metabolismo de peróxido de hidrógeno por Trx. El Prx3 ataca al H_2O_2 oxidando Trx₂red a aTrx₂ox, que se reduce de nuevo a Trx₂red por la TrxR2 dependiente de NADPH. Tomado y modificado de Aon *et al.*, 2012.

La reducción en la expresión y actividad de Trx2 en hepatocitos de ratón se asocia directamente con el desarrollo de esteatosis, mientras que Zhang y colaboradores concluyeron que Trx2 protege a las células hepáticas del estrés oxidativo. En mitocondrias de corazón se encontró que Trx2 disminuye la

concentración de H_2O_2 , además de que funciona como un factor anti-apoptótico (Chang *et al.*, 2012; Stanley *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

La tiorredoxina reductasa (TrxR2) pertenece a la familia de las oxidoreductasas de piridin nucleótidos disulfuro y su principal función es mantener las tiorredoxinas en estado reducido. La TrxR2 de mamíferos es una enzima homodimérica de 55 KDa, contiene una selenocisteína en el extremo C-terminal que constituye un centro redox activo implicado en la actividad catalítica. La isoforma mitocondrial en mamíferos es TrxR2, mantiene la tiorredoxina 2 (Trx2) en un estado reducido y juega un papel crítico en las funciones mitocondriales y celulares. TrxR2 se ha identificado en muchos tejidos diferentes, incluyendo al hígado de rata y a la corteza adrenal bovina. TrxR2 puede reducir además de la Trx2, hidroperóxidos lipídicos y varios sustratos de bajo peso molecular como DTNB, selenito, selenocisteína, vitamina K3 y aloxano (Miranda-Vizuet *et al.*, 2010; Nordberg *et al.*, 2001; Rigobello *et al.*, 2010).

1.4.6. Importancia del NADPH en los sistemas biológicos.

El NADPH es un portador de electrones que participa en muchas reacciones biosintéticas importantes que de otro modo serían energéticamente desfavorables. El NADPH actúa como un componente clave en los sistemas de antioxidantes celulares, es una fuente de electrones para la síntesis reductora de ácidos grasos, esteroides, ADN y también es el sustrato de la NADPH oxidasa que desempeña un papel clave en muchos procesos biológicos y patológicos mediante la generación de ERO.

El $NADP^+$ mitocondrial es generado a partir del NAD^+ por la NAD^+ cinasa (NADK). El NADPH puede ser generado de $NADP^+$ por la isocitrato deshidrogenasa (ICPm) la enzimas málica (MEPm) o la transhidrogenasa mitocondrial (TH) (Fig. 7).



Figura 7. Vía mitocondrial de generación de NADPH.

El mayor aporte de NADPH proviene de la fase oxidativa de la ruta de las pentosas fosfato, que produce 60% de los requerimientos celulares. Durante un conjunto especial de reacciones catabólicas que producen energía, dos átomos de hidrógeno se eliminan de una molécula de sustrato. Ambos electrones, pero sólo un protón (es decir, un ion hidruro H^-) se añaden al anillo de nicotinamida de $NADP^+$ para formar $NADPH+ (H^+)$; El segundo protón (H^+) se libera en solución. Esta es una reacción típica de oxidación-reducción en la que el sustrato se oxida y se reduce $NADP^+$.

El NADPH es uno de los factores más importantes en los sistemas antioxidantes celulares a través de las siguientes vías: en primer lugar, el NADPH es necesario para la regeneración del GSH a partir de GSSG a través de la acción de la glutatión reductasa. El GSH es esencial para las funciones de varias enzimas antioxidantes clave, incluyendo glutatión peroxidasa y glutatión S-transferasas. En segundo lugar, una gran parte de NADPH se une a la enzima catalasa para la eliminación de H_2O_2 . En tercer lugar, el NADPH es también un componente esencial del sistema de tiorredoxina (Alberts, 2015; Aydin, 2016; Roede *et al.*, 2012; Ying, 2008)

1.5 El aguacate, propiedades y nutrientes.

El aguacate (*Persea americana* Mill) es originario de América y pertenece a la familia Lauraceae. Tradicionalmente ha sido cultivado con fines alimenticios y medicinales debido a su alto contenido nutricional, así como por sus propiedades terapéuticas. México se considera el primer productor y exportador de aguacate en todo el mundo, específicamente de la variedad aguacate "Hass". Siendo Michoacán el principal productor de México, otros estados como Jalisco están ganando importancia a nivel nacional (Alvizouri *et al.*, 2009; Ranade *et al.*, 2015; SAGARPA, 2014).

Los aceites vegetales son la principal fuente de lípidos comestibles que se consumen en el mundo. Entre las frutas, los aguacates contienen altas cantidades de lípidos y se han aprovechado para la producción de aceite. El aceite de aguacate así como el de oliva son obtenidos por un método de extracción en frío, obteniéndose un aceite de alta pureza que conserva las propiedades bioactivas de los frutos. El aceite de aguacate contiene un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) siendo el componente principal el ácido oleico de un 50 a 70%. Además, contiene antioxidantes, bajo contenido de ácidos grasos saturados, sodio y es de sabor neutro. Esto lo hace adecuado para el consumo humano directo y se emplea como la fuente de grasa en dietas diseñadas para el control de peso, reducción del colesterol y disminución de la enfermedad cardiovascular. (Alvizouri *et al.*, 2009; Ashton *et al.*, 2006; Ozdemir *et al.*, 2003).

El aceite contiene altos niveles de ácido oleico (C18:1) (tabla 1), el cual es resistente al daño por peroxidación lipídica y se les ha atribuido efectos favorables sobre el perfil de lípidos en suero de pacientes con hiperlipidemia, hipertrigliceridemia y diabetes mellitus 2. Un estudio mostró que una dieta controlada y alta en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) como el C18:1 disminuye el riesgo cardiovascular, la mortalidad y morbilidad cardíacas (Alvizouri-Muñoz *et al.*, 1992; Alvarezouri *et al.*, 2009; Ashton *et al.*, 2006; Carranza *et al.*, 1995; Gylling *et al.*, 2001).

Acidos grasos		Porcentaje de contenido
Palmítico	C16:0	5,92 ± 0,1%
Palmitoleico	C16:1	0,2 ± 0,02%
Estearico	C18:0	1,86 ± 0,02%
Oleico	C18:1	55,9% ± 0,2
Linoleico	C18:2	24,9 ± 0,1%
Linolénico	C18:3	10,1 ± 0,1%
No identificado		0,92 ± 0,1%

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos presentes en el aceite de aguacate “Ahuacatlán”. Tomado y modificado de Ortiz-Ávila *et al.*, 2015

El aguacate es una rica fuente de antioxidantes, ya que contiene una amplia variedad de polifenoles, proantocianidinas, tocoferoles, xantofilas, vitaminas E y A, que han mostrado ser beneficiosos para la salud humana. La xantofila predominante en el aguacate es la luteína. Contiene pequeñas cantidades de carotenoides como el α -caroteno, el β -caroteno, la zeaxantina, la violaxantina, la neoxantina y la anteraxantina. Se ha demostrado que los carotenoides previenen la peroxidación de fosfolípidos en los eritrocitos de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. Se sabe también que estos carotenoides lipofílicos pueden tener efectos anti-cancerígenos. La evidencia experimental sugiere que estos compuestos poseen efectos protectores contra la peroxidación y son importantes en la protección de macromoléculas biológicas contra el daño oxidativo (Ashton *et al.*, 2006; Ranade *et al.*, 2015; Morales-Solorio, 2015). El fruto del aguacate tiene capacidad hepatoprotectora, debido a su contenido en flavonoides y fenólicos. Se ha reportado la inhibición del crecimiento *in vitro* de líneas celulares de cáncer de próstata por un extracto del aguacate rico en tocoferoles y carotenoides.

Tanto en adultos como en niños con EHNA, se ha demostrado que el tratamiento con α -tocoferol (vitamina E) mejora las enzimas hepáticas séricas. Del mismo modo, los pacientes con EHNA tratados con vitamina E y pioglitazona durante 6 meses mostraron una mejoría significativa (Ranade *et al.*, 2015; Sudheer *et al.*, 2008).

1.5.1. El aceite de aguacate y su relación con mitocondrias de EHNA de ratas diabéticas.

Se ha propuesto el uso de antioxidantes para retardar la progresión de y reducir la gravedad de las enfermedades que componen a la EHNA a través de su capacidad para disminuir el daño oxidativo originado en la mitocondria al atenuar

la generación de ERO. En relación a esto, se ha propuesto que la administración del aceite de aguacate podría ser una estrategia para lograr lo anterior debido a la amplia variedad de antioxidantes lipofílicos presentes en dicho producto. En mitocondrias de hígado de ratas con diabetes tipo II, se ha observado que la administración de aceite de aguacate previene la inhibición del complejo I inducida por esta enfermedad. La diabetes también provocó un aumento del ~100% en los niveles de peroxidación lipídica y la generación de ERO y una disminución severa de los niveles de GSH y aumento del GSSG (Ortiz-Ávila *et al.*, 2015). El tratamiento con aceite de aguacate previno todos estos efectos.

2. JUSTIFICACIÓN.

La producción mitocondrial de ERO y la peroxidación de lípidos están involucrados en el desarrollo de EHNA. El aceite de aguacate disminuye los niveles mitocondriales de ERO, peroxidación de lípidos y triglicéridos en mitocondrias de hígado de ratas con diabetes, enfermedad la cual está asociada con la EHNA. Dado que los eventos antes mencionados son claves en la progresión de la EHNA, es posible proponer que el aceite de aguacate podría ser una estrategia nutricional para contrarrestarla durante la diabetes. Sin embargo, se desconoce si los efectos del aceite fueron mediados por la capacidad de los compuestos antioxidantes del aguacate de penetrar las membranas mitocondriales y neutralizar la producción excesiva de ERO o si el aceite, mediante algún mecanismo, indujo un aumento en la capacidad de los sistemas antioxidantes de la mitocondria. Esta última posibilidad es más factible debido a que se ha descrito que el β -sitosterol, una fitohormona presente en el aceite de aguacate, puede aumentar la relación GSH/GSSG en macrófagos sometidos a estrés oxidativo (Vivancos y Moreno, 2011). Además, la primera posibilidad es menos factible debido a la impermeabilidad de la membrana interna mitocondrial a casi cualquier molécula excepto el O_2 , el CO_2 , los H^+ y el cianuro (Cortés-Rojo y Rodríguez-Orozco, 2011).

Por lo tanto, es importante conocer si el aceite de aguacate puede incrementar la capacidad de los sistemas antioxidantes mitocondriales, lo cual podría ser benéfico para prevenir y/o retrasar el desarrollo de la EHNA.

3. HIPOTESIS.

El aceite de aguacate mejora el catabolismo de ácidos grasos en hígado de rata diabética al incrementar la capacidad antioxidante de la mitocondria.

4. OBJETIVO GENERAL.

Determinar si el aceite de aguacate actúa sobre el catabolismo de ácidos grasos al mejorar la capacidad antioxidante de la mitocondria en hígado de rata diabética.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar el efecto del aceite de aguacate sobre la oxidación de ácidos grasos en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.
2. Determinar el efecto del aceite de aguacate sobre la concentración de NADH en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.
3. Determinar los efectos del aceite de aguacate sobre la actividad de los sistemas antioxidantes mitocondriales de hígado de ratas diabéticas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Animales.

Se emplearon ratas Wistar macho, entre 300-350 g, las cuales fueron mantenidas en un bioterio bajo condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Fueron alimentadas con una dieta especial para roedores y agua *ad libitum*. Para el manejo de los animales se siguieron las recomendaciones de la norma para el uso de animales expedida por la Secretaría de Agricultura en el párrafo de Regulaciones Federales para el Uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación también fue aprobada por el Comité Institucional para el Uso de Animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

5.2. Diseño experimental.

Para el estudio las ratas fueron divididas al azar en cuatro grupos, de ocho ratas cada uno. Grupo 1: control, Grupo 2: control + aceite de aguacate, Grupo 3: diabético y Grupo 4: diabético + aceite de aguacate. Los grupos 2 y 4 recibieron una dosis de aceite de aguacate equivalente a 1ml de AA (aceite de aguacate)/250 g de peso. Los grupos 1 y 3 recibían agua en vez de aceite. La administración se realizó vía oral diariamente durante un periodo de 90 días que inició 6 días después de la inducción de la diabetes. La diabetes fue inducida mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (45 mg/Kg), en ratas sometidas a un ayuno previo de 12 horas. Cinco días después de la inducción de la diabetes, se realizó la medición de los niveles de glucosa, los animales con niveles de glucosa mayores de 300 mg/dl fueron usados para conformar los grupos diabéticos (Ortiz-Ávila et al., 2013).

Cada quince días se pesaron los animales y se realizó la medición de los niveles de glucosa en sangre utilizando un glucómetro ACCU-CHEK. Después de 90 días

de tratamiento las ratas fueron sacrificadas por decapitación con un ayuno de 12 horas.

5.3. Aislamiento de mitocondrias.

Las mitocondrias de hígado se aislaron mediante centrifugación diferencial con el método descrito por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Para obtener las mitocondrias, el hígado fue triturado y lavado con medio 1 (220mM manitol, 70 mM sacarosa, 2 mM MOPS y 1 mM EGTA, a pH 7.4). Los fragmentos fueron homogenados y centrifugados a 2000 rpm y el sobrenadante se centrifugo nuevamente a 7500 g y la pastilla resultante fue lavada con medio 2 (220mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM MOPS, a pH 7.4) y centrifugada a 9000 g. Finalmente la pastilla se resuspendió en 500µl de medio 2. Todas las centrifugaciones se realizaron durante 10 minutos a 4°C. La concentración de proteínas mitocondriales fue determinada mediante el método de Biuret.

5.4. Medición del consumo de oxígeno.

Las mitocondrias recién aisladas fueron resuspendidas en un volumen final de 3mL de buffer para medir consumo de oxígeno (HEPES 10mM, KCl 100mM, KH_2PO_4 3mM y MgCl_2 3mM a pH de 7.4) en una cámara de vidrio sellada y la velocidad de consumo de oxígeno fue determinada a temperatura ambiente usando un electrodo de oxígeno de tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno YSI 5300 y a un graficador. Los trazos de respiración se iniciaron induciendo la respiración basal (estado 4) mediante la adición de 10mM de glutamato/malato y/o succinato como sustrato respiratorio. A los tres minutos se adicionaron 300µM de ADP para inducir la respiración en estado fosforilante (estado 3). La respiración fue inhibida primero con Oligomicina y en su totalidad con la adición de 1mM de KCN, lo cual permite descartar el consumo de oxígeno ajeno a la actividad de la CTE (Ortiz-Ávila *et al.*, 2015).

5.5. Oxidación de ácidos grasos.

La capacidad de las mitocondrias de oxidar ácidos grasos se realizó con el método modificado por (Turner *et al.*, 2007). Las mitocondrias recién aisladas fueron resuspendidas en un volumen final de 3mL de buffer para medir consumo de oxígeno (HEPES 10mM, KCl 100mM, KH_2PO_4 3mM y MgCl_2 3mM a pH de 7.4) en una cámara de vidrio sellada y la velocidad de consumo de oxígeno fue determinada a temperatura ambiente usando un electrodo de oxígeno de tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno YSI 5300 y a un graficador. Los trazos se iniciaron 2 minutos después de obtener una línea base, se agregó L-carnitina 2mM. 4 minutos después, se agregó palmitoil-CoA 0.3 mM y a los 4 minutos se adiciono ADP 100mM.

5.6. Actividad de citocromo c peroxidasa.

Esta actividad se determinó midiendo el O_2 producido por la descomposición del H_2O_2 . Las mitocondrias recién aisladas fueron resuspendidas en un volumen final de 3mL de buffer para medir consumo de oxígeno (HEPES 10mM, KCl 100mM, KH_2PO_4 3mM y MgCl_2 3mM a pH de 7.4) en una cámara de vidrio sellada y la velocidad de consumo de oxígeno fue determinada a temperatura ambiente usando un electrodo de oxígeno de tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno YSI 5300 y a un graficador. Se adicionaron los siguientes inhibidores de la CTE: KCN 1mM, Antimicina A 1mM y 2mM de rotenona. Las mitocondrias se incubaron durante 2 minutos con los inhibidores y después se inició el trazo con una línea base de 1 minuto y enseguida se agregó 20mM de H_2O_2 .

5.7 Determinación de la actividad glutatión reductasa (GR).

Para determinar esta actividad, 0.6mg/mL de proteína mitocondrial se resuspendió en buffer de fosfatos 2mM y EDTA 2mM (pH de 7.0). Se adicionó NADH 2mM y H_2O hasta 1ml a una temperatura de 30°C. Inmediatamente se colocó la celda en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550 a 340 nm y se empezó a registrar la reacción para obtener una línea base, al cabo de 1 minuto se

adiciono GSSG 20 mM para monitorear la oxidación de NADH por 5 minutos más. Como controles, se realizó una reacción que contiene todos los componentes anteriormente mencionados, salvo GSSG, y se preparó otra reacción que contiene todos los componentes de la lista, excepto la muestra. Los ensayos se realizaron por duplicado. Una unidad de actividad de glutatión reductasa se define como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de 1 mol de GSSG por minuto (equivalente a la oxidación de 1 mol de NADH por minuto) (Mannervik, 1999).

5.8. Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX).

La actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) se determinó según el método modificado por Flohe y Gunzler (1984). 0.3 mg/mL de proteína mitocondrial se suspendió en buffer de fosfatos 0.1M (EDTA 1 mM + azida de sodio 1mM a pH de 7.0), se adicionó glutatión reductasa 2.4U/mL, GSH 10mM, NADH 1.5mM y se incubó durante 3 minutos a 37°C. Después, esta mezcla se colocó en una celda de cuarzo y la absorbancia se registró en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550 a 340 nm durante 3 min para obtener una línea base. Posteriormente, se adicionó H₂O₂ 30 mM y se registró por 3 minutos la oxidación de NADH hasta alcanzar de nuevo la línea base. Como controles, se realizó una reacción que contenía todos los componentes anteriormente mencionados, excepto la muestra. Los ensayos se realizaron por duplicado.

5.9. Determinación de la actividad de glutatión y tiorredoxina reductasa (TrxR2).

La actividad de TrxR2 se puede medir en mitocondrias de tejidos mediante la reducción de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)(DTNB), utilizando el método descrito por Rigobello *et al.*, 2010. 1mg/mL de proteína mitocondrial se

resuspendió en 40µl de buffer de fosfato 0.2M con EDTA 5mM (pH 7.4). Las mitocondrias se solubilizaron durante 1 hora a 0°C con CHAPS 75mM sometiendo a agitación con un vórtex ocasionalmente. Después, 1mg/mL de proteína se transfirió a dos celdas, una de muestra y una de referencia. A ambas celdas se les adicionó DTNB 1mM. La reacción se inició mediante la adición de NADH 25mM a la celda muestra y la absorbancia se registró en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550 a 412nm por 2 minutos. Por otro lado a dos segundos similares (muestra y referencia) se le agregó todo lo antes mencionado y se le añadió auranofina 1µM para inhibir la glutatión reductasa y determinar la actividad de Trx2R.

5.10. Determinación de la concentración del NADH.

La reducción del NADH se determinó utilizando el método modificado de Schönfeld *et al.*, 2010. Se utilizó 0.5mg/mL de proteína mitocondrial resuspendida en buffer 50mM KH₂PO₄. La absorbancia se registró en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550 a 340 nm y se corrió una línea base durante 1 minuto. Después, se agregó succinato como sustrato y se dejó correr 1 minuto más la reacción, después de lo cual se adicionó KCN 0.4 M. La absorbancia se registró 1 minuto más y se adiciono Antimicina A 1mM.

5.11. Geles desnaturizantes SDS-PAGE

A partir de mitocondrias aisladas se cuantificaron las proteínas totales de los extractos, se tomaron 40 mg de proteínas, las cuales fueron desnaturizadas con 35µl de buffer de carga SDS (Tris-HCl 0.06M, pH6.8, 5% de glicerol, 4% SDS, 4% β-mercaptoetanol y 0.0025% de azul de bromofenol) durante 15 minutos a 95 °C.

Las muestras fueron cargadas en un mini-gel de acrilamida desnaturizante SDS-PAGE (gel separador: 18% de bis-acrilamida, buffer tris 1.5M pH 8.8, SDS 0.1%, persulfato de amonio 0.05% y 0.009% de Temed. Gel concentrador: 5% de bis-acrilamida, buffer tris 0.5 M pH6.8, persulfato de amonio 0.05% y 0.009% de

Temed), se usó el sistema Bio-Rad Mini-PROTEAM Tetra System y la electroforesis se corrió a 120V durante 2.5 horas.

5.12 Western blot

5.12.1 Transferencia de proteínas

Después de la electroforesis del gel SDS-PAGE se realizó la transferencia de proteínas usando el sistema Bio-Rad TRANS-BLOT SD SEMY-DRY TRANSFER CELL, se cortó la membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel de acrilamida usando guantes de latex para evitar tocar la membrana con la piel, el sistema se coloca en el siguiente orden: 1. Base; 2. Papel filtro ultra-grueso biorad; 3. Membrana de nitrocelulosa; 4. Gel de acrilamida; 5. Papel filtro ultra-grueso biorad; 6. Tapa del cátodo con seguros y 7. Tapa de seguridad. Antes de armar el sistema los papeles filtros son humedecidos con buffer de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%), el gel fue transferido a 15 voltios por 45 minutos (NOTA: si se usa membrana de nitrocelulosa no se debe dejar más de este tiempo puesto que se puede perder la muestra). Al finalizar la transferencia se tiñe el gel y la membrana de nitrocelulosa con azul brillante de comassie y rojo de ponceau respectivamente para corroborar que la transferencia haya sido eficiente.

5.12.2 Inmuno-detección

En un recipiente se colocó la membrana teñida y se puso a destañir con 20 mililitros de TBS-T (Tris-HCL 10 mM; NaCl 0.9%; tween 0.1% pH 7.8) durante 30 minutos en agitación constante a temperatura ambiente, se desechó el TBS-T y se cambió por TBS-T con leche de bloqueo 5% y se puso a bloquear durante una hora en agitación constante a temperatura ambiente, después del bloqueo la

membrana fue lavada con 15 mililitros de TBS-T tres veces en agitación constante durante 5 minutos cada lavado. Se diluyó el anticuerpo primario anti-Trx-2 en TBS-T con leche en proporción 1:10,000 y se agregó a la membrana incubándose 12-14 horas en agitación suave a 4°C. Transcurrido este tiempo se recupera el anticuerpo y se almacena a -20 °C, la membrana se lavó con TBS-T durante 7 minutos 3 veces a temperatura ambiente. Después se diluyó el anticuerpo secundario IgG anti-rabbit en TBS-T en proporción 1:5000 y se incubó con la membrana durante 4 horas en agitación suave a 4°C. Se recuperó el anticuerpo y se guardó a -20°C, la membrana fue lavada con TBS-T por periodos de 3 minutos durante tres veces y una vez con TBS durante 5 minutos.

5.12.3 Revelado

En un recipiente se mezcló las soluciones de luminol y peróxido de hidrógeno en proporción 1:1, se colocó la membrana sobre esta mezcla y se agitó manualmente durante 5 minutos, se retiró la membrana y se escurrió en una toalla sanitaria, la membrana fue revelada en un equipo ChemiDoc XRS+ System con el software Image Lab.

5.13 Determinación de la concentración de proteínas método Bradford

Para la determinación de proteínas se utilizó el método de Bradford se realizó una curva de calibración con un stock de proteína BSA 1 mg/ml, en tubos Eppendorff se colocó 0, 5, 10, 15 y 20 µl del stock de proteína aforando a 100µl con solución salina 0.15 M de NaCl, para la cuantificación de las muestras se tomó 2µl de cada una y también se aforo a 100µl con solución salina, se agregó 500µl de agua destilada y 400µl de reactivo azul brillante de comassie se vortexeo y se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 595 nm de absorbencia. Se graficó la curva de calibración graficando absorbencia contra concentración de proteína. Las absorbencias de las muestras fueron extrapoladas a esta curva de calibración para la determinación de su concentración proteica.

6. RESULTADOS.

6.1. Parámetros fisiológicos.

Se realizó un registro de los niveles de glucosa durante los 90 días de tratamiento y se observó en el grupo diabético un incremento en los niveles de glucosa por encima de los 400 mg/dL, mientras que el consumo del aceite de aguacate no mostro efecto hipoglucemiante en este modelo de diabetes mellitus, excepto en los últimos 15 días del tratamiento, aunque el efecto fue muy discreto. Se observó también que no hubo ningún efecto sobre los niveles de glucosa en las ratas normales que consumieron el aceite de aguacate (Fig. 1). Esto indica que los efectos del aceite de aguacate sobre la función mitocondrial, oxidación de ácidos grasos y la actividad de los sistemas antioxidantes que se muestran en los siguientes apartados no son debidos a una normalización de los niveles de glucosa.

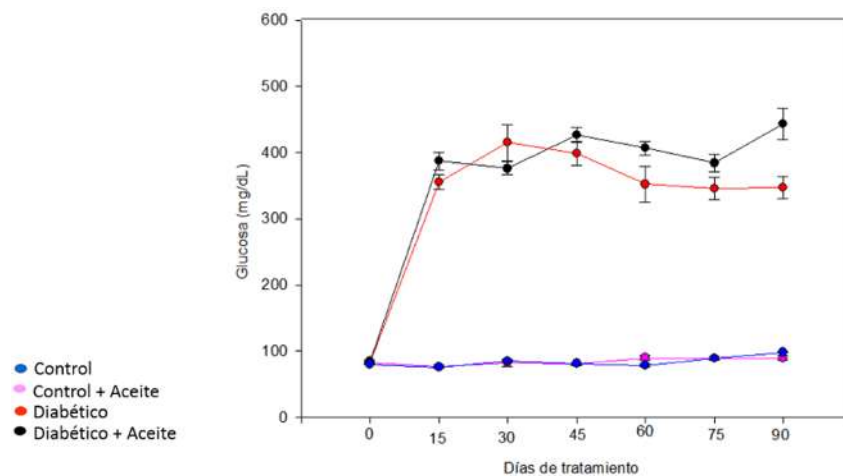


Figura 1.- Niveles de glucosa durante los 90 días de tratamiento. Se realizó la medición de glucosa cada quince días durante todo el tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e de n=8.

También se realizó un registro de la masa corporal de los animales durante todo el tratamiento, en las ratas control hubo un incremento de la masa conforme transcurrieron los días de tratamiento. El consumo del aceite de aguacate disminuyó la ganancia de peso respecto a los animales control, esto a pesar de que el aceite de aguacate implicaba un consumo extra de grasa (Fig. 2), Mientras tanto, como era de esperarse, los animales del grupo diabético experimentaron una pérdida de peso a lo largo de todo el tratamiento, lo cual fue ligeramente atenuado por el aceite de aguacate.

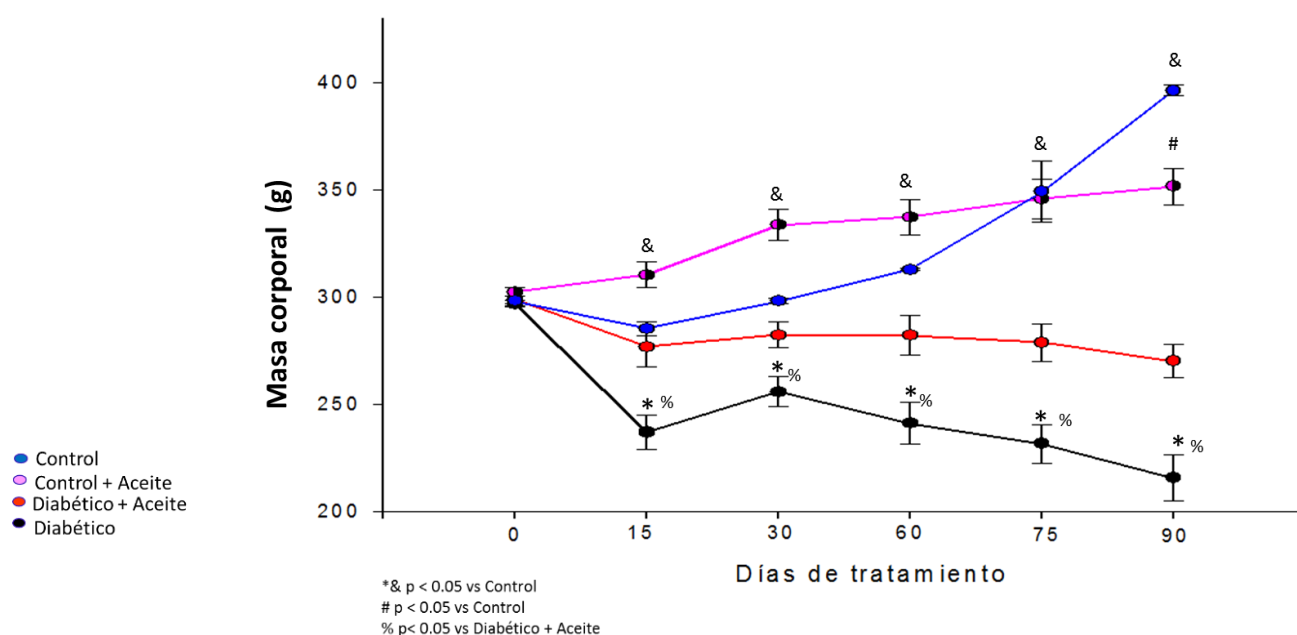


Figura 2.- Niveles de masa corporal durante los 90 días de tratamiento. Se llevó a cabo el registro de la masa corporal cada quince días durante todo el tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e de n=8.

Al término del tratamiento los animales fueron sacrificados con un ayuno previo de 12 horas y se registró el peso de los hígados extraídos. El único efecto significativo observado fue un incremento de 1.1 veces ($p < 0.05$) en la masa del hígado de ratas diabéticas vs. la masa del hígado de las ratas control + aceite de aguacate, mientras que respecto a los animales control, la masa del hígado

incremento pero de manera no significativa (Fig.3). Por otro lado, se calculó la masa relativa del hígado dividiendo la masa del hígado entre la masa corporal de cada animal (Fig. 4). Se puede observar que la diabetes indujo un incremento de 1.8 veces en la masa relativa del hígado, mientras que respecto a los efectos del aceite de aguacate, se observó que el efecto de la diabetes se previno parcialmente ya que el incremento en la masa relativa en el grupo diabetes + aceite fue de 1.4 veces respecto al control. Por otro lado en el grupo control + aceite de aguacate se observó una disminución muy discreta en la masa relativa del hígado.

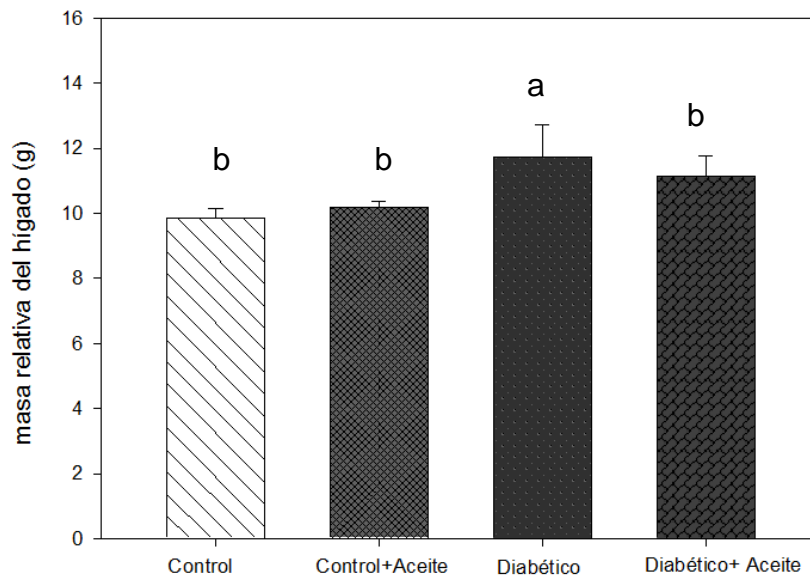


Figura 3.- Masa del hígado. Registro de masa de los hígados posterior al sacrificio de los animales. Los datos se presentan como la media \pm e.e de n=8.

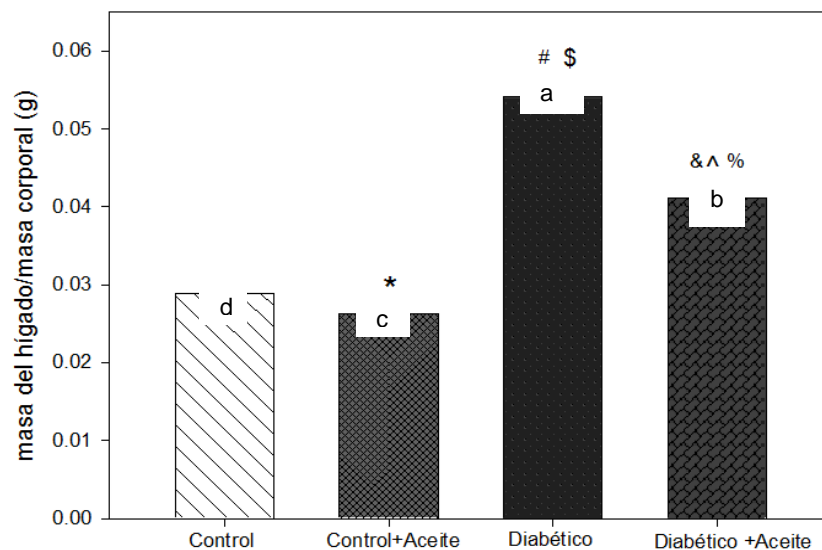


Figura 4.- Masa relativa del hígado. Relación de la masa de los hígados respecto a la masa de los animales. Los datos se presentan como la media \pm e.e de n=8, Tukey *p<0.05.

6.2. Efecto del aceite de aguacate en la oxidación de ácidos grasos en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.

Con el objetivo de determinar si la diabetes disminuyó la capacidad de las mitocondrias hepáticas de oxidar ácidos grasos, se midió la respiración en estado fosforilante (estado 3) en presencia de palmitoil-CoA como sustrato y de carnitina para facilitar el ingreso del ácido graso a la matriz mitocondrial. En la figura 5 se observa que la respiración bajo estas condiciones se inhibió 2.2 veces en el grupo diabético respecto al grupo control. Este efecto fue parcialmente recuperado por el aceite de aguacate. Respecto al grupo control, también se detectó una inhibición de la respiración aunque de menor magnitud que la observada en el grupo diabético.

Para descartar que la inhibición de la respiración en presencia de palmitoil-CoA fuera debida a un defecto a nivel de la CTE y no a un defecto en la β -oxidación, se determinó la velocidad de respiración en estado fosforilante en presencia de ADP (estado 3) usando sustratos de la CTE como el glutamato-malato o el succinato. Respecto al primer sustrato (Fig. 6 panel A), aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, se observó una tendencia de la respiración a disminuir en los grupos control + aceite de aguacate y el diabético, no obstante la inhibición en ambos casos no fue de la misma magnitud que la encontrada con el palmitoil-CoA como sustrato respiratorio. Una misma tendencia se observó en presencia de succinato como sustrato (Fig. 6, panel B). En conjunto, estos resultados sugieren que la capacidad de las mitocondrias de ratas diabéticas de oxidar ácidos grasos disminuye principalmente por anomalías en los pasos de la

β -oxidación que suplen de sustratos respiratorios a la CTE, no obstante que la inhibición de la transferencia de electrones de la CTE podría tener un papel secundario y mínimo en este fenómeno. Sin embargo, independientemente de esto, el aceite de aguacate previno parcialmente la inhibición de la oxidación de ácidos grasos.

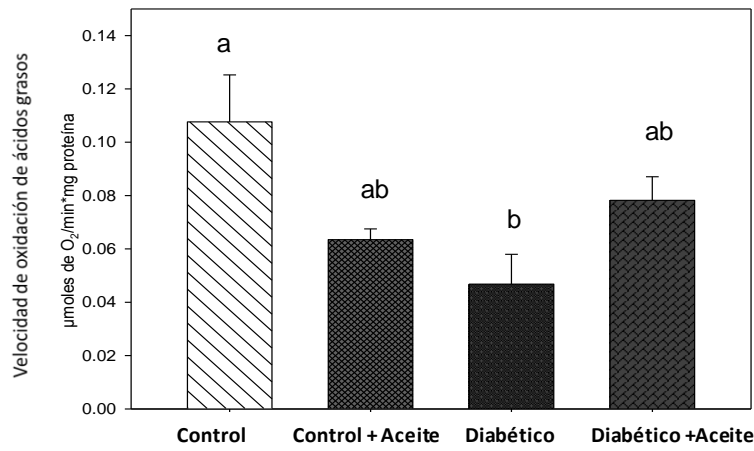
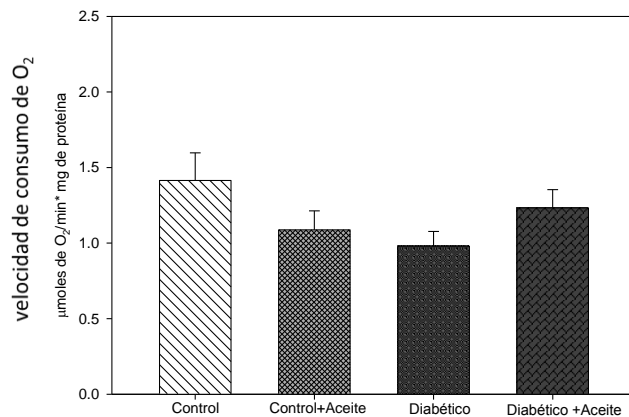


Figura 5.-Efectos del aceite de aguacate y la diabetes en la respiración en presencia de palmitoil-CoA como sustrato. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=8, Tukey *p<0.05.

A



B

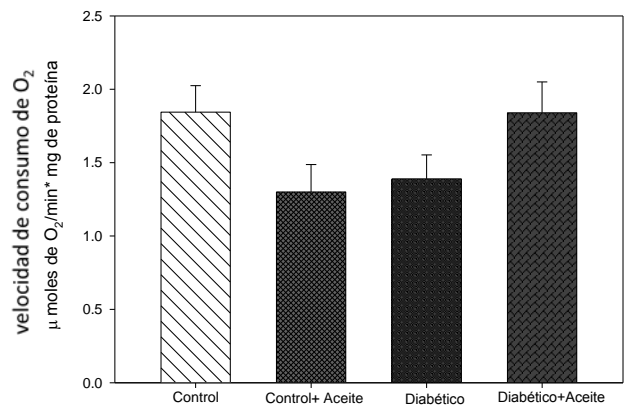


Figura 6.-Efectos de la diabetes y el aceite de aguacate en la respiración en estado 3 de mitocondrias de hígado utilizando glutamato-malato (panel A) o succinato (panel B) como sustratos. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=8, Tukey *p<0.05.

6.3. Efecto de la diabetes y el aceite de aguacate en la concentración del NADH en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.

En la figura 7 se observa la concentración de dinucleótidos de adenin nicotinamida en los cuatro grupos al término de los tratamientos. Se observa que tanto el aceite de aguacate en el grupo control y la diabetes provocaron un aumento en los niveles de NADH de más de 4 veces respecto al grupo control. La administración de aceite de aguacate previno parcialmente este efecto, puesto que la reducción de nucleótidos solo fue del doble. Estos resultados sugieren que los mecanismos de re-oxidación del NADH a NAD⁺ se encuentran alterados en los grupos control + aceite y diabético, lo cual podría estar relacionado con la inhibición de la respiración con palmitoil-CoA observada en la Fig. 5.

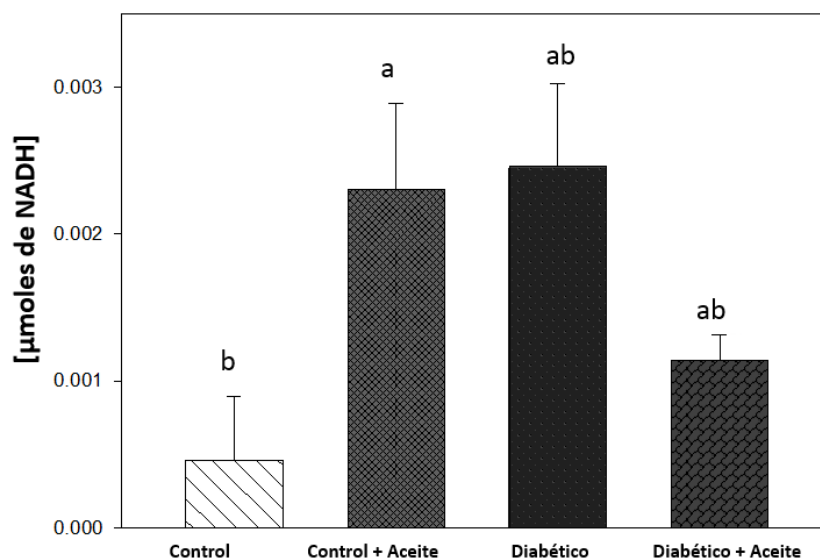


Figura 7.- Efectos de la diabetes y el aceite de aguacate sobre la concentración de NAD(H)⁺ mitocondrial los datos se presentan como la media ± e.e. de n=4, Tukey *p<0.05.

6.4. Efecto de la diabetes y el aceite de aguacate sobre la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) en mitocondrias de hígado de ratas.

La actividad de Gpx se determinó cuantificando el NADH necesario para regenerar el glutatión oxidado utilizado para la remoción del H₂O₂ por esta enzima. Como se observa en la Fig. 8, ni la diabetes ni los tratamientos con el aceite de aguacate tuvieron algún efecto sobre la actividad de esta enzima.

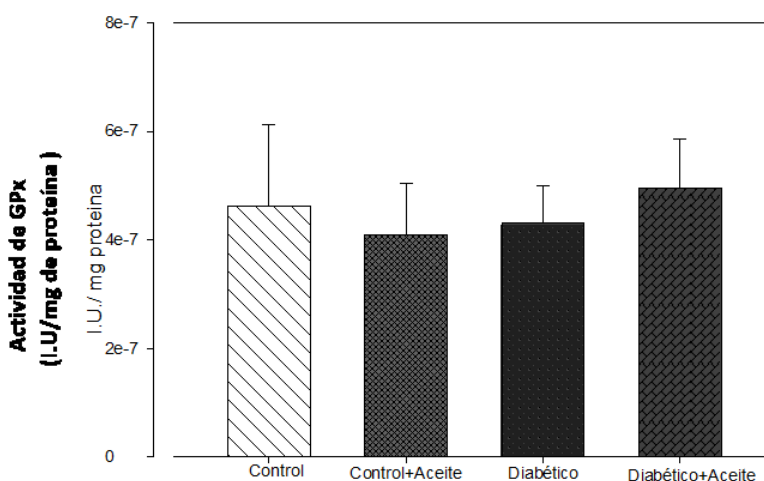


Figura 8.- Efecto de la diabetes y el aceite de aguacate en la actividad de la GPx de mitocondrias de hígado de rata. Los datos se presentan como la media ± e.e. de n>4, Tukey *p<0.05.

6.5. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de glutatión reductasa (GR) y tiorredoxina (TrxR2) en mitocondrias de hígado de ratas.

En el panel A de la Fig. 10 se muestra la actividad de GR en los cuatro grupos experimentales al término de los tratamientos. Se observa una disminución de 1.3

veces en la actividad de esta enzima del grupo diabético ($p < 0.05$) respecto al grupo control y una recuperación total de esta actividad ejercida por la administración de aceite de aguacate en el grupo diabético.

Por otro lado, se estimó la actividad de TrxR2 en las mismas muestras mediante su inhibición con auranofina. Contrario a lo observado en con la GR, la actividad de TrxR2 (Panel B) no sufrió cambios significativos en ninguno de los grupos.

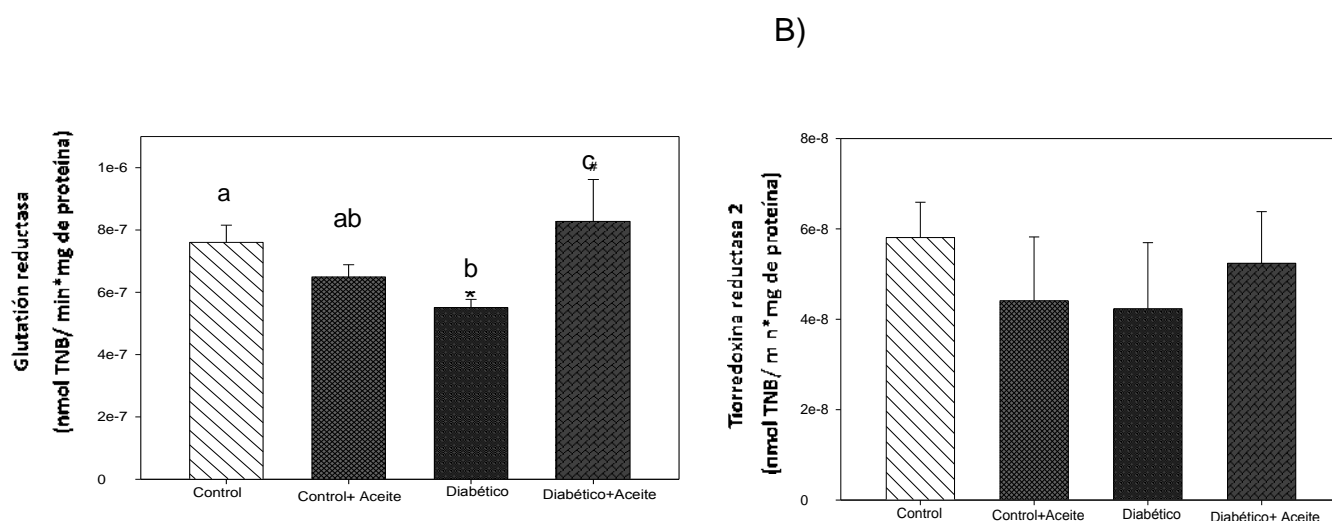


Figura 9.- Efecto de la diabetes y el aceite de aguacate en la actividad de glutatión reductasa (Panel A) y tiorredoxina reductasa (Panel B) en mitocondrias de hígado de rata. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de $n > 4$, Tukey $*p < 0.05$.

6.6. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de expresión y tiorredoxina (Trx2) en mitocondrias de hígado de ratas.

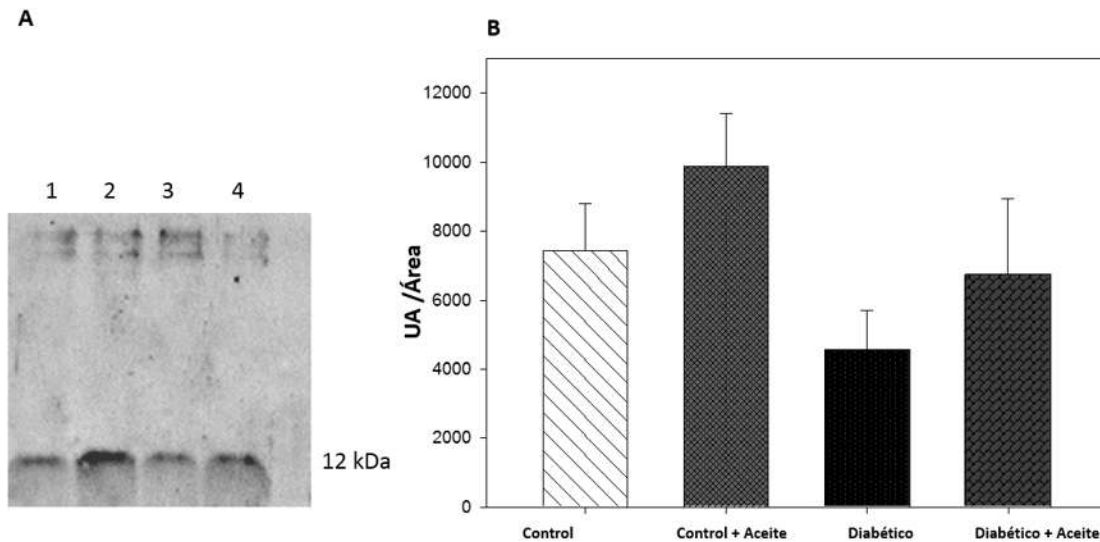


Figura 10.- Inmuno detección de tioredoxina (Trx2). Panel A mitocondrias de hígado, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida de 18% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para la identificación de la proteína Trx2, se usó el anticuerpo policlonal anti-Trx2 y como anticuerpo secundario anti-rabbit IgG, el orden de los carriles es el siguiente: carril 1 grupo control, carril 2 control+ aceite, carril 3 diabético, carril 4 diabetico+aceite. Panel B densitometría del promedio de 3 experimentos por separado. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de $n=3$, Tukey $*p<0.05$.

6.7. Actividad de citocromo c peroxidasa.

La actividad de citocromo c peroxidasa por el complejo IV se observa en la Fig 10. La diabetes indujo una discreta disminución de 1.1 veces en relación con el grupo control, lo cual fue recuperado por el tratamiento con aceite de aguacate. Asimismo, el aceite de aguacate aumentó esta actividad en las mitocondrias del grupo control.

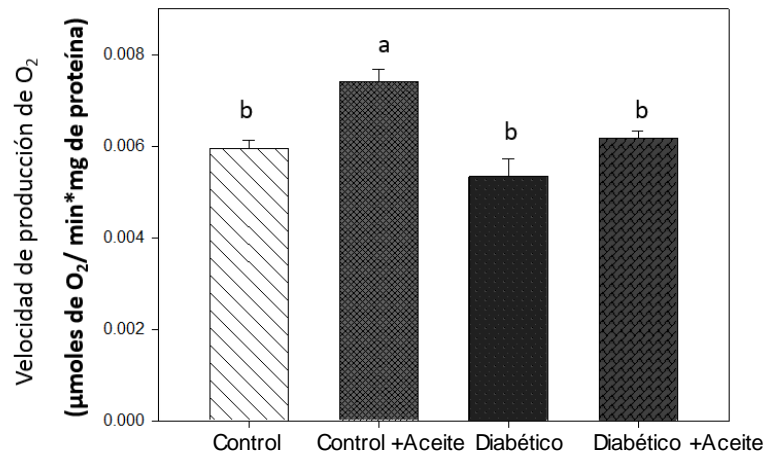


Figura 11.- Efecto de la diabetes y el aceite de aguacate en la actividad de citocromo c peroxidasa. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=8, Tukey *p<0.05.

7. Discusión.

El presente estudio muestra que en mitocondrias de hígado de ratas, la diabetes disminuye la oxidación de ácidos grasos en un 70% (Fig. 5), incrementa en 5.3 veces la concentración del NADH (Fig. 7), inhibe en 27.5% la actividad de la glutatión reductasa (Fig. 9 panel A), acompañado de un incremento de casi el doble en la masa relativa del hígado (Fig. 4), lo cual es un signo de hipertrofia hepática. Estos eventos fueron disminuidos en mayor o menor grado por la administración de aceite de aguacate, sin que hubiera cambios en los niveles de glucosa de las ratas diabéticas (Fig. 1) y sin prevenir la pérdida gradual de peso en estos animales (Fig. 2). Asimismo, se observó que las ratas del grupo control + aceite de aguacate aumentaron menos de peso corporal desde el inicio del estudio al final, de tal modo que en este punto, las ratas control pesaron 50g menos que las ratas control + aceite de aguacate (Fig. 2). Esto concuerda con un estudio en humanos donde el consumo diario de aguacate indujo una disminución del peso en personas con obesidad (Alvizouri Muñoz y Rodríguez Barrón, 2009). El aceite de aguacate contiene alrededor de un 60% de ácido oleico (C18:1) (Ortiz-Avila *et al.* 2015). A su vez, se ha observado que la administración del C18:1 induce una disminución del peso corporal de ratas al disminuir la sensación de apetito a nivel del hipotálamo (Obici *et al.* 2002). Por lo tanto, la disminución del peso en las ratas control por el aceite de aguacate podría estar relacionado con una disminución del apetito debido a su contenido de C18:1.

La β -oxidación de ácidos grasos que se lleva a cabo en la matriz mitocondrial juega un papel crucial en el metabolismo hepático de ácidos grasos al disminuir su acumulación en este órgano y el desarrollo de estados patológicos avanzados como esteatohepatitis, cirrosis y encefalopatía hepática. La velocidad de oxidación de ácidos grasos por esta vía está regulada por el transporte de los ácidos grasos de cadena larga hacia la matriz mitocondrial por la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-1). Por otro lado, la deshidrogenación de los ácidos grasos durante la generación de acetil-CoA y el acortamiento del ácido graso en 2 carbonos durante cada ciclo de oxidación es llevada a cabo por las acil-CoA deshidrogenasas de

cadena corta, mediana y larga y la L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. La primera es dependiente de FAD y transfiere los electrones al complejo III de la cadena de transporte de electrones (CTE) vía la flavoproteína de transferencia de electrones. La segunda requiere de NAD^+ como aceptor de electrones y el NADH formado es reoxidado por el complejo I de la CTE (Fromenty y Pessayre 1995).

Un factor primordial que puede disminuir la β -oxidación y favorecer la acumulación hepática de lípidos es una inhibición severa de la actividad del complejo I, lo cual puede dar lugar a un aumento a la relación NADH/NAD^+ y como consecuencia, a una inhibición de la actividad de la L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (Latipää *et al.*, 1986). En relación a lo anterior, la inhibición de la oxidación del palmitoil-CoA observada en la Fig. 5, sugiere que la hipertrofia hepática (Fig. 4) puede ser debida al desarrollo de esteatosis (no hiciste cortes histológicos para sustentarlo), puesto que en la diabetes inducida con estreptozotocina, la hipertrofia hepática ha sido relacionada con una acumulación excesiva de triglicéridos (Zafar *et al.* 2010). A su vez, esto concuerda con el aumento en la generación de NADH en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas en relación al grupo control (Fig. 7) cuando las mitocondrias se incubaron con succinato para generar un exceso de NADH vía la estimulación de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs. Otra observación que concuerda con la idea de una relación entre la hipertrofia hepática y la disminución de la oxidación β de ácidos grasos en ratas diabéticas es de un 50% de la actividad del complejo I reportada en un estudio previo bajo las mismas condiciones experimentales de este trabajo (Ortiz-Avila *et al.* 2015). Se podría argumentar que la disminución de la capacidad de las mitocondrias de respirar en presencia de palmitoil-CoA pudiera ser debida a una capacidad disminuida de las mitocondrias de respirar con cualquier sustrato, debido, por ejemplo, a una disminución de la actividad del complejo IV, el cual dona los electrones al O_2 , que es el aceptor final de electrones de la cadena. Sin embargo, como se observa en las Figura 6 panel C y D no hubo una disminución significativa de la respiración en estado 3 cuando se usó glutamato-malato o succinato como sustratos. Dado que el ensayo de respiración con el palmitoil-CoA se realizó en estado 3 (esto es, se agregó ADP para eliminar

la restricción que causa al potencial de membrana alto en estado 4 en la velocidad de respiración), esto significa que el defecto en la respiración con el palmitoil-CoA es atribuible a una alteración en la β -oxidación *per se*. Con en base en lo anterior, se puede proponer que la diabetes indujo hipertrofia hepática debido a la disminución de la oxidación β de ácidos grasos en la mitocondria al disminuir la concentración del NADH generado en esta vía por una disminución severa de la actividad del complejo I de la CTE, lo que causó la acumulación de triglicéridos en este órgano, no obstante que faltan estudios histopatológicos para confirmar esta hipótesis.

La administración del aceite de aguacate disminuyó parcialmente el grado de hipertrofia hepática (Fig. 4), lo cual concuerda con una tendencia de este tratamiento a prevenir de manera parcial la oxidación de ácidos grasos (Fig. 5) y con una disminución en la concentración de NADH (Fig. 8). Asimismo, se ha reportado que el aceite de aguacate previene la disminución de la actividad del complejo I inducida por la diabetes (Ortiz-Avila et al. 2015). Por lo tanto, esto sugiere que el mecanismo por el cual el aceite de aguacate previno parcialmente la hipertrofia hepática es mediante una mayor utilización de los ácidos grasos hepáticos por la β -oxidación disminuyendo la concentración del NADH debido a un aumento en la actividad del complejo I de la CTE. La prevención parcial de la hipertrofia hepática podría ser explicada en función de que no solo la disminución de la β -oxidación provoca la acumulación de lípidos en el hígado de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, sino que contribuye además a un aumento en la importación hepática de ácidos grasos del plasma y una disminución en la capacidad de secreción hepática de lipoproteínas debido a una deficiencia en la síntesis de apolipoproteína B (Ohno *et al.*, 2000). Por lo tanto, es posible que los componentes del aceite de aguacate no tengan efecto en esos procesos, pero se requieren más experimentos para confirmarlo.

Durante procesos que involucran el desarrollo de estrés oxidativo mitocondrial como p. ej., la diabetes (Rolo y Palmeira, 2006), el complejo I se inhibe por un proceso que involucra la glutationilación de residuos de cisteína libres que regulan

la actividad de esta enzima. Esto ocurre cuando aumenta la formación de ERO en la mitocondria e incrementa la oxidación del glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) por la actividad de la glutatión peroxidasa (Gpx), lo que favorece que el GSSG se conjugue con los grupos –SH de dicho complejo para disminuir su actividad. Sin embargo, este proceso es reversible gracias a la actividad de la glutarredoxina 2 (Grx2), la cual reduce los cisteínas glutationalizadas del complejo I utilizando GSH como agente reductor (Hurd et al. 2008). Entre las enzimas antioxidantes analizadas en este trabajo, la actividad de glutatión reductasa se vio disminuida en mitocondrias del grupo diabético y este efecto fue impedido por el tratamiento con aceite de aguacate (Fig. 10 panel A). En estudios previos, se ha encontrado que la diabetes induce una disminución en el contenido de GSH en mitocondrias de hígado (Ortiz-Avila et al. 2015), cerebro (Ortiz-Avila et al. 2015b) y riñones (Ortiz-Avila et al. 2017) de ratas diabéticas y que este efecto es recuperado en su totalidad por la administración del aceite de aguacate. Así, al menos en mitocondrias de hígado, el aumento en la actividad de glutatión reductasa podría ser responsable de la recuperación del GSH a los niveles de ratas control. Por lo tanto, podría existir también una relación entre el aumento en la actividad de la glutatión reductasa y la mejora en la β -oxidación en mitocondrias de ratas diabéticas tratadas con el aceite de aguacate, ya que al aumentar la biodisponibilidad del GSH por la glutatión reductasa, esto podría favorecer el mantenimiento de las cisteínas libres del complejo I en estado reducido y mejorar su actividad, lo cual a su vez, aumentaría la velocidad de oxidación de ácidos grasos al verse favorecida la concentración del NADH por el complejo I, lo que disminuiría la disponibilidad de NAD^+ para la actividad de la L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa. Además, de manera indirecta, el efecto del aceite de aguacate sobre esta enzima podría ser también responsable de la disminución de la peroxidación de lípidos observada en los estudios arriba referidos, ya que este proceso es contrarrestado en mitocondrias por la glutatión peroxidasa 4, la cual es dependiente de GSH para su actividad antioxidante (Imai et al. 2003).

Un hallazgo que podría explicar el aumento en la actividad de glutatión reductasa por el aceite de aguacate es el incremento en la relación GSH/GSSG

inducido por β -sitosterol en células sujetas a estrés oxidativo, lo cual se encontró que ocurre mediante la unión de esta fitohormona al receptor de estrógenos de la membrana celular y la activación de la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa (Vivancos y Moreno, 2005). En una caracterización preliminar de los componentes del aceite de aguacate utilizado en este estudio, se determinó la presencia de β -sitosterol (Morales-Solorio 2015). Además se ha reportado la presencia del receptor de estrógenos en el hígado (Porter et al. 1987). Lo anterior hace factible proponer la hipótesis de que el β -sitosterol contenido en el aceite de aguacate podría unirse al receptor de estrógenos del hígado e inducir la actividad de glutatión reductasa en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas, lo cual explicaría el aumento en los niveles de GSH observados con anterioridad en mitocondrias del mismo órgano en ratas diabéticas tratadas con aceite de aguacate (Ortiz-Avila et al. 2015).

En contraste con lo observado con la glutatión reductasa, no se observó ningún cambio en relación a la actividad de la tiorredoxina reductasa (Fig. 9 panel B), sin embargo la expresión de esta enzima se ve favorecida con la administración de aceite de aguacate en ambas condiciones sin llegar a ser significativo (Fig. 10 panel B). Esta enzima participa junto con la tiorredoxina en la señalización celular mediante la conversión del estado redox de sus proteínas blanco que participan en vías de señalización (p. ej., cinasas de proteínas) a través de reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Además, la interacción entre la tiorredoxina y sus proteínas blanco depende del estado redox de la tiorredoxina. El cambio reversible de esta interacción regula características de las proteínas de señalización efectoras de la tiorredoxina tales como su actividad, su localización intracelular y sus niveles de expresión, lo cual lleva a la alteración de la señalización redox. La tiorredoxina juega un papel central en la regulación de la señalización redox y en la determinación del destino de la célula (sobrevivencia o apoptosis), especialmente en mamíferos (Matsuzawa 2016). Por lo tanto, y en particular la isoforma mitocondrial de la tiorredoxina reductasa, ha sido involucrada principalmente en la señalización redox más que en la defensa antioxidante ya que se demostró que fibroblastos de embriones mutantes en esta enzima se

vuelven hipersensibles al estrés oxidativo únicamente cuando se inhibe la síntesis de glutatión (Conrad et al. 2004). Por otra parte, el H_2O_2 generado en las mitocondrias producto de la dismutación enzimática o espontánea del radical $O_2^{\cdot-}$ puede jugar un papel crucial en el estrés oxidativo mitocondrial debido a su reactividad con metales de transición como el Cu o el Fe, los cuales se encuentran presentes en la mitocondria, para formar al altamente reactivo radical hidroxilo (OH^{\cdot}) mediante la reacción de Fenton. En la mitocondria, las glutatión peroxidasas son las principales encargadas de la reducción del H_2O_2 a H_2O debido a la ausencia de catalasa en este orgánulo. Sin embargo, se ha descrito que también el complejo IV puede funcionar como una peroxidasa utilizando citocromo *c* como donador de electrones, no obstante que su actividad se considera “parásita” debido a que es baja comparada con la actividad de las peroxidasas clásicas (Vygodina y Konstantinov, 2007; Cortés-Rojo et al. 2011). Tomando en cuenta las consideraciones anteriores acerca de la función del sistema de tiorredoxina en la señalización celular más que en la protección contra el estrés oxidativo así como la baja actividad de peroxidasa del complejo IV, es como se puede explicar que ninguno de estos dos sistemas sufra modificaciones importantes en su actividad con la diabetes ni con el tratamiento con aceite de aguacate, no obstante que se observaron cambios en la citocromo *c* peroxidasa de mitocondrias de ratas diabéticas pero que fueron muy discretos. Lo anterior deja a la glutatión reductasa como la enzima responsable de la disminución de la capacidad antioxidante mitocondrial durante la diabetes en el hígado y como blanco de los efectos benéficos del aceite de aguacate, puesto que además, tampoco se observaron diferencias claras respecto a la actividad de glutatión peroxidasa (Fig. 8).

La mejora en la oxidación del NADH ha sido estudiada por otros autores como una estrategia para disminuir las alteraciones hepáticas tales como la esteatosis durante enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico. Un ejemplo de ello es el aumento en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos y la disminución del grado de esteatosis obtenido mediante la activación de la enzima citosólica NADH: quinonaoxidoreductasa 1 por el compuesto de origen natural β -lapacona (Hwang *et al.*, 2009). Sin embargo, la utilidad clínica de este compuesto ha sido

limitada debido a su alta citotoxicidad (Dubin et al. 2001). Por lo tanto, el aceite de aguacate podría ser una mejor alternativa nutricional que coadyuve a la disminución de la enfermedad hepática no alcohólica resultado de enfermedades metabólicas como la diabetes debido a sus efectos a nivel de la función de la mitocondria y el estrés oxidativo generado en ella.

8. Conclusión.

El aceite de aguacate mejoró la oxidación mitocondrial de ácidos grasos en ratas diabéticas, en asociación con una disminución en la concentración de NADH y una actividad aumentada de la glutatión reductasa, lo cual podría estar relacionado con una disminución de la hipertrofia hepática.

9. Referencias

Aceite Ahuacatlán. Un producto de Diricom, S.A. de C.V. © 2013.
<http://www.ahuacatlan.com.mx/aceite.htm>

Alberts B, Johnson A Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. (2015). Molecular Biology of the Cell. Sexta edición: Editorial Garland Science. New York. pp 66-69

Alonso-Cruz C. 2009. Con diabetes 25 mil michoacanos. Cambio de Michoacán.
<http://www.cambiodemichoacan.com.mx/vernota.php?id=96546>

Alvizouri-Muñoz M, Carranza-Madrigal J, Herrera-Abarca JE, Chávez- Carbajal F, Amezcua-Gastelum JL. (1992). Effects of avocado as a source of monounsaturated fatty acids on plasma lipid levels. *Archives of Medical Research*. 23 (4):163–167

Alvizouri-Muñoz M, Rodríguez-Barrón A. (2009). Efectos médicos del aguacate. *Medicina Interna de México*. 25 (5):379-85

Aon M, Stanley B, Sivakumaran V, Kembro J, O'Rourke B, Paolocci N, Cortassa S, (2012). Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: An experimental-computational study. *The Journal of General Physiology*. 139 (6):479–491

Arnér E, Holmgren A. (2000). Measurement of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase. *Protocols in Toxicology*. 474 (10):7.4

Ashton O, Wong M, Mcghiet T, Vather R, Wang Y, Requejo-Jackman C, Ramankutty P, Woolf A. (2006). Pigments in Avocado Tissue and Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (13): 10151-10158

Aydin B. (2016). Effects of argan oil on the mitochondrial function, antioxidant system and the activity of NADPH- generating enzymes in acrylamide treated rat brain. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 87 (3): 476–481

Begrliche K, Massart J, Robin MA, Bonnet F, Fromenty B. (2013). Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 58 (4):1497-507

Bhabak K, Mugesh G. (2010). Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. *Accounts of Chemical Research* . 43 (11):1408-19

Buchanan TA, Xiang A, Watanaber R.. (2007). What Is Gestational Diabetes?. *Diabetes Care*. 30 (2): S105-S111

Bulum T, Kolaric B, Duvnjak L, Duvnjak M. (2011). Nonalcoholic Fatty Liver Disease Markers Are Associated with Insulin Resistance in Type 1 Diabetes. *Digestive Diseases and Sciences*. 56 (12): 3655-63

Carranza-Madrigal J, Alvizouri-Muñoz, Alvarado M, Chávez F, Gómez M, Herrera-Abarca JE. (1995). Effects of avocado on the level of blood lipids in patients with phenotype II and IV dyslipidemias. *Archivos de Cardiología de México*. 65 (4):342–348

Carrillo R, Muciño J. (2011). Hígado graso y esteatohepatitis no alcohólica. Facultad de Medicina de la UNAM. 54:3

Chang M, Chen J, Chang M, Yeh C, Lin W, Liang C, Huang S, Dang K, Chiu C, Lin D. (2008). Acute expression of hepatitis C core protein in adult mouse liver: Mitochondrial stress and apoptosis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 43 (6):747-55.

Chitturi S, Abeygunasekera S, Farrell G. (2002). Nonalcoholic steatohepatitis and insulin resistance: insulin hypersecretion and specific association with the insulin resistance syndrome. *Hepatology*. 35 (34):373–379.

Conrad M, Jakupoglu C, Moreno SG, Lippl S, Banjac A, Schneider M, Beck H, Hatzopoulos AK, Just U, Sinowatz F, Schmahl W, Chien KR, Wurst W, Bornkamm GW, Brielmeier M. (2004) Essential role for mitochondrial thioredoxin reductase in hematopoiesis, heart development, and heart function. *Molecular and Cellular Biology*. 24 (21):9414-23.

Cortés-Rojo C, Estrada-Villagómez M, Calderón-Cortés E, Clemente-Guerrero M, Mejía-Zepeda R, Boldogh I, Saavedra-Molina A. (2011) Electron transport chain dysfunction by H₂O₂ is linked to increased reactive oxygen species production and iron mobilization by lipoperoxidation: studies using *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 43 (2):135-47.

Cortés-Rojo C. (2005). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. pp 6-20.

Cuerda C, Luengo L, Valero M, Vidal A, Burgos R, Calvo F, y Martínez C. (2011) Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. *Nutrición Hospitalaria*. 26 (1):68-78

Depner C, Torres-Gonzalez M, Tripathy S, Milne G, Jump D. (2012). Menhaden Oil Decreases High-Fat Diet–Induced Markers of Hepatic Damage, Steatosis, Inflammation, and Fibrosis in Obese Ldlr2/2 Mice1–3. *The Journal of Nutrition*. 142 (23): 1495–1503

Díaz M, Baiza L, Ibáñez M, Pascoe D, Guzmán A (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta médica de México*. 140 (4): 437-448

- Djordjevic VB, (2004). Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology*.237 (11):57-89.
- Dowman J, Tomlinson J, Newsome P. (2009). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Quarterly journal of medicine* . 103 (11):71–83
- Dubin M, Fernandez Villamil SH, Stoppani AO. (2001) Cytotoxicity of beta-lapachone, annaphthoquinone with possible therapeutic use. *Medicina*. 61 (3):343-50.
- Estrada-Cano A, González-Halphen D. (2011). F1F0-ATP sintasa y sus diferencias estructurales. 30 (3): 98-108
- Flohe L, Toppo S, Cozza G, Ursini F. (2011). A comparison of thiol peroxidase mechanisms. *Antioxidants and Redox Signaling* .15 (23):763–780
- Flohe R, Maiorino M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta* .. 1830 (11):3289–3303
- Folch-Mallol J. L, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias-Robles A. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* .46 (1):24-46.
- Fromenty B, Pessayre D. (1995) Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacology & Therapeutics*. 67(1):101-54.
- Giacco F, Brownlee M. (2010). Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research* .107 (43):1058-1070.
- Gómez-R I, Pérez-M M, Montoya-C I. (2014).Diabetes mellitus tipo 1: breve revisión de los principales factores psicológicos asociados. *Anales de Pediatría*.82 (1):143-146
- Griffith O, Meister A. (1985) Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.. 82 (56):4668-4672
- Guzmán J, Madrigal B. (2003). Revisión de las características clínicas, metabólicas y genéticas de la diabetes mellitus. *Bioquímica*. 28 (2):1-22
- Gylling H, Miettinen T. (2001). A review of clinical trials in dietary interventions to decrease the incidence of coronary artery disease. *Current Controlled Trials* .2 (34):123-128.
- Halliwell, B, and Gutteridge, J.M.C. (2006). Free Radicals in Biology and Medicine. Cuarta Editorial. Oxford University Press. New York, USA. pp 888.
- Hasenour C, Berglund E, Wasserman D. (2013).Emerging role of AMP-activated protein kinase in endocrine control of metabolism in the liver. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 366 (2): 152–162

Hroudová J, Zdeněk F.(2013). Control mechanisms in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Neural Regeneration Research*. 8(4): 363–375

Hurd T, Requejo R, Filipovska A, Brown S, Prime TA, Robinson AJ, Fearnley IM, Murphy MP. (2008) Complex I within oxidatively stressed bovine heart mitochondria is glutathionylated on Cys-531 and Cys-704 of the 75-kDa subunit: potential role of cys residues in decreasing oxidative damage. *Journal of Biological Chemistry* .283 (36):24801-15.

Hwang J, Kim D, Jo E, Kim Y, Jo Y, Park J, Yoo S, Park M, Kwak TH, Kho Y, Han J, Choi H, Lee S, Kim J, Lee I, Kyung T, Jang C, Chung J, Kweon G, Shong M. (2009) Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice. *Diabetes*. 58(4):965-74.

Imai H, Nakagawa Y. (2003) Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 34 (2):145-69.

Instituto Mexicano del Seguro Social. (2014).Guía de práctica clínica: diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hepática grasa no alcohólica. pp 1-11

Karp G. (2006). Biología Celular y molecular. Conceptos y experimentos. Cuarta edición. Editorial Mc Graw Hill. pp: 130-232.

Kelley W. (1992). Medicina Interna. Segunda Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. pp 451-453

Koolman J, Rohm KH, (2004). Bioquímica Texto y Atlas. Tercera edición. Madrid, España: Editorial Panamericana. pp 76-78

Latipää PM, Kärki TT, Hiltunen JK, Hassinen IE. (1986) Regulation of palmitoylcarnitine oxidation in isolated rat liver mitochondria. Role of the redox state of NAD(H). *Biochimica et Biophysica Acta* .. 875 (2):293-300.

López G. (2009). Diabetes mellitus: classification, pathophysiology, and diagnosis. *Medwave*. (12): e4315

Mannervik A B. (1985). Glutathione Peroxidase. *Methods in enzymology*. 113:490-495

Mannervik B, (1999). Measurement of Glutathione Reductase Activity. *Protocols in Toxicology*.7.2.1-7.2.4

Marí M, Morales A, Colell A, García C, Kaplowitz N, Fernández J. (2012). Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1830 (5): 3317–3328

Marra F, Gastaldelli A, Svegliati G, Tell G, Tiribelli C. (2008). Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis. *Trends in Molecular Medicine*.14:2

Martensson J, Lai J, Meister A. (1990). High-affinity transport of glutathione is part of a multicomponent system essential for mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.87 (112):7185-7189

Matsuzawa A.(2016) Thioredoxin and redox signaling: roles of the thioredoxin system in control of cell fate. *Archives of Biochemistry and Biophysic*.617 (75):101-105.

Miranda-Vizuet A, Damdimopoulos A, Spyrou G.(2000). The Mitochondrial Thioredoxin System. *Antioxidants and redox signaling*. 4(2):801-810

Morales Solorio M.(2015) Efectos del aceite de aguacate y su extracto etéreo en la función mitocondrial y el estrés oxidativo en hígado de rata. Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Licenciado en Químico Farmacobiólogo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Mulhall B, Ong J, Younossi Z.(2002).Non-alcoholic fatty liver disease: An overview. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 17 (65):1136–1143

Nordberg J, Arnér J. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* .31 (11):1287–1312

Obici S, Feng Z, Morgan K, Stein D, Karkhanias G, Rossetti L. (2002). Central administration of oleic acid inhibits glucose production and food intake. *Diabetes*. 51(2):271-5.

Ohno T, Horio F, Tanaka S, Terada M, Namikawa T, Kitoh J. (2000) Fatty liver and hyperlipidemia in IDDM (insulin-dependent diabetes mellitus) of streptozotocin-treated shrews. *Life Sciences Advanced* 66 (2):125-31.

Organización mundial de la salud. Prevalencia de Diabetes .2016.

Ortiz-Avila O, Esquivel-Martínez M, Olmos-Orizaba BE, Saavedra-Molina A, Rodríguez-Orozco AR, Cortés-Rojo C. (2015b). Avocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats. *Journal of Diabetes Research*.. 201 (45):485759.

Ortiz-Ávila O, Esquivel-Martínez M, Olmos-Orizaba BE, Saavedra-Molina A, Rodríguez-Orozco AR, Cortés-Rojo C. (2015). Avocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats. *Journal of Diabetes Research*. 2015(3):485759.

Ortiz-Avila O, Figueroa-García MD, García-Berumen CI, Calderón-Cortés E, Mejía-Barajas JA, Rodríguez-Orozco AR, Mejía-Zepeda R, Saavedra-Molina A, Cortés-Rojo C. (2017) Avocado oil induces long-term alleviation of oxidative damage in kidney mitochondria from type 2 diabetic rats by improving glutathione status. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 49 (2):205-214

Ortiz-Avila O, Gallegos-Corona MA, Sánchez-Briones LA, Calderón-Cortés E, Montoya-Pérez R, Rodríguez-Orozco AR, Campos-García J, Saavedra-Molina A, Mejía-Zepeda R, Cortés-Rojo C. (2015) Protective effects of dietary avocado oil on

impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* . 47(4):337-53.

Ortiz-Ávila O, Sámano-García CA, Calderón-Cortés E, Pérez-Hernández IH, Mejía-Zepeda R, Rodríguez-Orozco AR, Saavedra-Molina A, Cortés-Rojo C, (2013). Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 45 (11): 271–287.

Ortiz-Ávila O. (2012). EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ACEITE DE AGUACATE SOBRE LAS ALTERACIONES EN EL TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE ELECTRONES Y LA RESISTENCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA DIABETES. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. pp 13-15

Ozdemir F, Topuz A. (2003). Changes in dry matter, oil content and fatty acids composition of avocado during harvesting time and post-harvesting ripening period. *Food Chemistry*. 86 (5): 79–83

Porter LE, Elm MS, Van Thiel DH, Eagon PK. (1987) Hepatic estrogen receptor in human liver disease. *Gastroenterology*. 92(3):735-45.

Ramos G, Di Naso F, Porawski M, Marcolin E, Kretzmann N, Barros Falcão Ferraz A, Richter M, Marroni C, Possa N. (2012). Treatment with Aqueous Extract from *Croton cajucara* Benth Reduces Hepatic Oxidative Stress in Streptozotocin-Diabetic Rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012 (65): 7

Ranade S, Thiagarajan P. (2015). A Review on *Persea Americana* Mill. (Avocado) - Its Fruit and Oil. *International Journal of PharmTech Research*. 8(6):72-77

Rigobello M, Bindoli A, (2010). Mitochondrial Thioredoxin Reductase: Purification, Inhibitor Studies, and Role in Cell Signaling. *Methods in Enzymology*. 474 (7):109-120

Rigobello M, Bindoli A. (2010). Mitochondrial Thioredoxin Reductase: Purification, Inhibitor Studies, and Role in Cell Signaling. *Methods in Enzymology*. 474 (7):117-118

Roede J, Go Y, Jones D. (2012). Redox Equivalents and Mitochondrial Bioenergetics. *Mitochondrial Bioenergetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 810 (17):249-278

Rolo A, Teodoro J, Palmeira C. (2011). Role of oxidative stress in the pathogenesis of non alcoholic steatohepatitis. *Free Radical Biology and Medicine*. 52 (21):59–69

Rolo AP, Palmeira CM. (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 212 (2):167-78.

Sanz A, Pamplona R, Barja G. (2006). Is the mitochondrial free radical theory of aging intact?. *Antioxidants and Redox Signaling*.8 (3-4):582-99.

Schönfeld P, Więckowski M, Lebedzińska M, Wojtczak L. (2010). Mitochondrial fatty acid oxidation and oxidative stress: Lack of reverse electron transfer-associated production of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1797 (43): 929–938

Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Viña J, Vendemiale G, Altomare E. (2008). Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Molecular Aspects of Medicine* 29 (12): 22–35

Sridhar S, Xu F, Darbinian J, Quesenberry C, Ferrara A, Hedderson M. (2014). Pregravid Liver Enzyme Levels and Risk of Gestational Diabetes Mellitus During a Subsequent Pregnancy. *American Diabetes Association. Diabetes Care*. 37 (7): 1878-1884

Stanley B, Sivakumaran V, Shi S, McDonald L, Lloyd D, Watson W, Aon M, Paolucci N. (2011). Thioredoxin Reductase-2 Is Essential for Keeping Low Levels of H₂O₂ Emission from Isolated Heart Mitochondria. *The journal of biological chemistry*. 286 (38): 33669–33677

Sudheer K, Mantena, Adrienne L. King, Kelly K. Andringa, Heather B. Eccleston, Bailey S. (2008). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases. *Free Radical Biology and Medicine* 44 (5): 1259–1272

Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. (2009). Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 19 (4): 291-302

Tosatto S, Bosello V, Fogolari F, Mauri P, Roveri A, Toppo S, Flohe L, Ursini F, Maiorino M. (2008). The catalytic site of glutathione peroxidases. *Antioxidants & Redox Signaling* ..10 (9): 1515-1526

Toshinari T, Hirofumi M, Tsuguhito O, Shuichi K. (2012). Fatty liver as a consequence and cause of insulin resistance: Lessons from type 2 diabetic liver. *Endocrine Journal*. 59 (9): 745-763

Traverso N, Menini S, Odetti P, Pronzato A, Cottalasso D, Marinari U. (1998). LIPOPEROXIDATION IN HEPATIC SUBCELLULAR COMPARTMENTS OF DIABETIC RATS. *Free Radical Biology and Medicine*. 26 (5): 538–547

Turner N, Bruce C, Beale S, Hoehn K, So T, Rolph M, Cooney G. (2007). Excess Lipid Availability Increases Mitochondrial Fatty Acid Oxidative Capacity in Muscle. *American Diabetes Association*. 56 (2085): 2092, 2007

Vivancos M, Moreno JJ. (2005) β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Biology & Medicine*. 39(1):91-7.

Voet D, y Voet G, J. (2006.) Bioquímica. Tercera edición. Buenos Aires: Editorial medica panamericana. pp. 193.

Vygodina TV, Konstantinov AA. (2007) Peroxidase activity of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Biochemistry (Moscow)* . 72 (10):1056-64.

Weydert C, Cullen J. (2010). MEASUREMENT OF SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE, AND GLUTATHIONE PEROXIDASE IN CULTURED CELLS AND TISSUE. *Nature Protocols* .5(1): 51–66.

Yamawaki H, Haendeler J, Berk B. (2003). Thioredoxina Key Regulator of Cardiovascular Homeostasis. *American Heart Association*. 93 (23):1029-1033

Ying Weihai. (2008). NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in Cellular Functions and Cell Death: Regulation and Biological Consequences. *Antioxidants and redox signaling*. 10(2):179-206

Young-Mi, Jones D. (2009). Thioredoxin Redox Western Analysis. *Current Protocols in Toxicology* .17 (2).12.1-17.12.12

Yu J, Marsh S, Hu J, Feng W, Wu C. (2016). The Pathogenesis of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Interplay between Diet, Gut Microbiota, and Genetic Background. *Gastroenterology Research and Practice*. 20 (4):1-13

Zachary T, Bloomgarden, M. (2002). The Epidemiology of Complications. *Diabetes Care*. 25 (5): 924-932

Zafar M, Naeem-ul-Hassan Naqvi S. (2010) Effects of STZ-induced diabetes on the relative weights of kidney, liver and pancreas in albino rats: a comparative study. *International Journal of Morphology*. 28(1):135-142.

Zhang J, Cui X, Wang L, Liu F, Jiang T, Li C, Li D, Huang M, Liao S, Wang J, Chen J, Jia H, He J, Tang Z, Yin Z, Liu M, (2014). The mitochondrial thioredoxin is required for liver development in zebra fish. *Current Molecular Medicine*. 14(6):772-82

Zhong Q, Putt D, Xu F, Lash L, (2008). Hepatic mitochondrial transport of glutathione: Studies in isolated rat liver mitochondria and H4IIE rat hepatoma cells *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 474(1):11-17