



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**
Facultad de Químico Farmacobiología



**EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
Satureja macrostema SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO Y
LA CADENA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN
MITOCONDRIAS DE HÍGADO DE RATA CON DIABETES
TIPO 1.**

TESIS
que presenta:

BERENICE ERIDANI OLMOS ORIZABA

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

ASESORES DE TESIS:

D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

M.C OMAR ORTIZ AVILA



DEDICATORIA

A mis padres, **Rocio Orizaba** y **Bardomiano Olmos** por todo el apoyo y cariño, por ser los mejores papás del mundo lo cual me lleva a admirarlos cada día más. Los amo.

A mis padres **Imelda Valdez** y **Feliciano Olmos** por educarme y guiarme en este camino, por el amor que siempre han tenido para mi, por ser mi ejemplo a seguir y mi motivo de inspiración.

A toda mi familia, por que los amo y cada uno de ellos son pilares importantes en mi vida.

A todos mis amigos que son uno de mis mayores tesoros, cada uno de ellos importante y especial, que durante estos 5 años, algunos hasta más estuvieron apoyándome para que este sueño se hiciera realidad.

A **Samuel Ontiveros** por el apoyo y amor que me da, por estar a mi lado en mis fracasos y en mis triunfos en mis alegrías y en mis desventuras.



AGRADECIMIENTOS

Al **D.C Alfredo Saavedra Molina** por el apoyo para la realización de este proyecto, por su asesoría y dedicación.

Al **M.C Omar Ortiz Avila**, por su asesoría, por la paciencia y por todo el apoyo y dedicación que me brindo en este proyecto. Pero sobre todo quiero agradecerle por su amistad, que para mí es invaluable.

A mis sinodales **D.C Crhistian Cortés Rojo**, **D.C Rocio del Carmen Montoya Pérez**, **M.C Rafael Torres Martínez**, **D.C Sandra Sánchez Ceja**, y **D.C Ruth Noriega Cisneros** por su apoyo y asesoría.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioquímica, **Mary**, **Clau**, **Manyu**, **Andrés**, **Clau**, **Rox** por hacer que mi estancia en el laboratorio una experiencia divertida.

A mi hermano científico **Mauricio Esquivel**, por darme la oportunidad de recorrer este camino juntos, que se convirtió en una experiencia inolvidable a su lado, por su amistad y cariño. Te quiero.



AGRADECIMIENTOS

ESTA TESIS SE REALIZÓ GRACIAS AL APOYO ECONÓMICO PARCIAL DEL PROYECTO DE CONACYT “CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES” (169093) Y EL PROYECTO DE LA CIC-UMSNH 2.16 (2015), DEL DR. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1.- INTRODUCCIÓN.....	3
1.1.- Diabetes mellitus (DM)	3
1.2.- Complicaciones durante la DM	5
1.2.1 Retinopatía diabética.....	5
1.2.2.- Nefropatía diabética.....	5
1.2.3 Neuropatía diabética.....	5
1.2.4 Enfermedad cerebrovascular.....	6
1.2.5 Hepatopatía diabética.....	6
1.3.- Alteraciones mitocondriales durante la DM	8
1.4.-Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por la mitocondria.....	9
1.5. Terapias antioxidantes durante la diabetes.....	12
1.6. <i>Satureja macrostema</i> : características y propiedades.	13
1.6.1 Clasificación botánica de <i>Satureja macrostema</i>	14
1.6.2 Compuestos antioxidantes en plantas de nurite (<i>S. macrostema</i>)	15
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo General	18
4.2. Objetivos Específicos.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1 Animales	19
5.2 Aislamiento de mitocondrias.....	19
5.3 Inducción de estrés oxidativo en las mitocondrias e incubación con el extracto etanólico de <i>Satureja macrostema</i>	20
5.4 Actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE).....	20
5.5 Actividad de la NADH deshidrogenasa (complejo I)	20
5.5.1 Actividad de la succinato deshidrogenasa (complejo II).....	20
5.5.2 Actividad de succinato-citocromo c oxidorreductasa (complejo III)	21

5.5.3 Actividad citocromo <i>c</i> oxidasa (complejo IV)	21
5.6 Niveles de lipoperoxidación.....	21
5.7 Producción de especies reactivas de oxígeno.....	22
5.8 Análisis estadístico.....	22
6. RESULTADOS.....	23
6.1. Efecto del extracto etanólico de <i>Satureja macrostema</i> sobre la actividad de la CTE inducidos por la diabetes.....	23
6.2. Efecto del extracto etanólico de <i>Satureja macrostema</i> sobre los niveles de lipoperoxidación.	27
6.3. Efecto del extracto etanólico de <i>Satureja macrostema</i> sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria.	28
7. DISCUSIÓN	29
8. CONCLUSIÓN	32
9. BIBLIOGRAFÍA	33

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa, considerada un problema de salud pública. En México es la primera causa de mortalidad a nivel nacional debido a las complicaciones asociadas a este padecimiento. La diabetes está relacionada con una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) causada por la hiperglucemia, generando un estrés oxidativo, evento que es clave en la patogénesis de las complicaciones asociadas a la diabetes. El hígado es uno de los órganos que se afectan durante la DM, estudios demuestran que la hepatopatía diabética está fuertemente asociada con la resistencia a la insulina y precede a la manifestación de la diabetes tipo 2, en donde los radicales libres causan uno de los mecanismos más importantes de daño hepático.

Satureja macrostema, conocida como nurite, pertenece a la familia Lamiaceae y tiene gran importancia en la medicina tradicional de los pueblos purépechas en el estado de Michoacán.

En el presente trabajo se evaluó el efecto que tiene el extracto etanólico de *Satureja macrostema* sobre el estrés oxidativo y la cadena de transporte de electrones en mitocondrias en un modelo de diabetes inducida.

Se utilizaron ratas Wistar, a las cuales se les indujo la diabetes con una inyección intraperitoneal de estreptozotocina, se aislaron las mitocondrias de hígado y se incubaron con el extracto a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mg/ml.

Como resultados el extracto etanólico de *Satureja macrostema* aumentó la resistencia de los complejos II y IV de la cadena de transporte de electrones ante el estrés oxidativo que se produce durante la diabetes, mientras que en los grupos controles el efecto se observó en los complejos I y II, lo que redujo la producción de especies reactivas de oxígeno y como consecuencia una mayor protección de las membranas mitocondriales ante la lipoperoxidación.

PALABRAS CLAVE: Diabetes, Mitocondria, Hepatopatía, Antioxidante, Lipoperoxidación.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic degenerative disease, considered a public health problem. In México, is the leading cause of death nationwide due to complications associated with this condition. Diabetes is associated with an overproduction of reactive oxygen species (ROS) caused by hyperglycemia, generating oxidative stress that is a key event in the pathogenesis of complications associated with diabetes. The liver is one of the organs that are affected during the DM. Studies show that diabetic liver disease is strongly associated with insulin resistance and precedes the manifestation of type 2 diabetes, in which free radicals cause one mechanism most important of liver damage. *Satureja macrostema* known as nurite belongs to the Lamiaceae family and has great importance in the traditional medicine of the Purepecha people, state of Michoacan.

In this work the effect of the ethanol extract of *Satureja macrostema* on oxidative stress and the electron transport chain in a model of rat liver mitochondria induced-diabetes was evaluated. Wistar rats were used, to which diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin, the liver mitochondria were isolated and incubated with the extract at concentrations of 0.1, 0.5 and 1 mg / ml. As a result the ethanol extract of *Satureja macrostema* increases the resistance of complex II and IV of the electron transport chain in mitochondria where oxidative stress occurs during diabetes, while in the control groups the observed effect were only in complexes I and II, which reduced the production of reactive oxygen species and as a result in greater protection of mitochondrial membranes to lipid peroxidation.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Diabetes mellitus (DM)

La diabetes mellitus (DM) es un grupo de alteraciones metabólicas crónico-degenerativas, caracterizada por un estado constante de hiperglucemia persistente. Esto se debe a que el páncreas no produce insulina, o no lo suficiente, para ayudar a que la glucosa entre en las células del organismo, o la insulina que se produce no se utiliza correctamente.

La insulina es una hormona polipeptídica producida por las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, que regula el metabolismo de la glucosa. Incrementa el transporte de glucosa a las células e induce la formación de glucógeno en el hígado, logra cumplir su función gracias su unión con receptores en la membrana de la célula.

Existen tres principales tipos de diabetes:

- Diabetes mellitus tipo 1: Corresponden 5-10% casos. Caracterizada por una destrucción selectiva de las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas. Las personas con diabetes tipo 1 no producen insulina y deben usar inyecciones de insulina para controlar los niveles de glucosa en la sangre.¹
- Diabetes mellitus tipo 2: 80% casos. El páncreas no produce suficiente insulina o el cuerpo es incapaz de reconocerla y utilizarla correctamente.
- Diabetes mellitus gestacional: se caracteriza por hiperglucemia que aparece durante el embarazo, puede desaparecer al término de éste o persistir como diabetes clínica.

Los síntomas que se presentan durante la diabetes mellitus tipo 1 son: polidipsia, polifagia, poliuria, pérdida de peso sin alguna razón, dificultad para respirar, cambios en la visión y debilidad, estos síntomas pueden aparecer repentinamente (Figura 1). Las personas con DM tipo 2 pueden no presentar síntomas y son diagnosticados muchos años después de que comience la enfermedad, los síntomas son similares que en la DM tipo 1 pero menos evidentes.

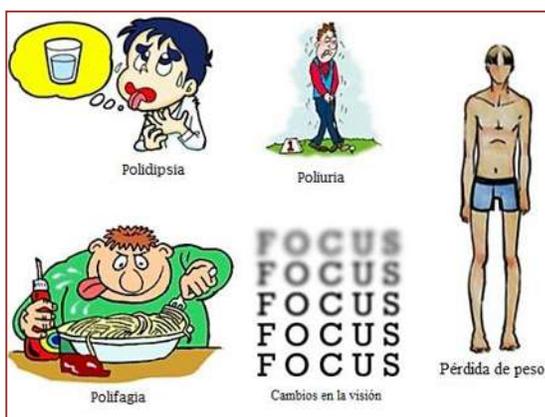


Figura 1. Síntomas presentes en la diabetes mellitus.

Según una encuesta nacional de salud y nutrición en 2012, en México la diabetes se encuentra entre las primeras causas de muerte, se estima que en México existen 34 millones de personas con DM. La federación internacional de diabetes (FID) estima que existen 382 millones de personas en todo el mundo con esta enfermedad. Existe una tendencia creciente de diabetes en personas cada vez más jóvenes, una tendencia que es muy preocupante para las futuras generaciones. En 2014, el 9% de los adultos mayores de 18 años tenían diabetes.

En el 2012 la diabetes fue la causa directa de 1,5 millones de muertes. Más del 80 % de las muertes por diabetes se registran en países de bajos y medianos ingresos. De seguir los patrones demográficos actuales, más de 592 millones de personas estarán afectadas de diabetes en una generación.²

En Michoacán la prevalencia de diabetes mellitus es del 7.5%, ha tenido un comportamiento variante, desde el 2005-2008, ocupando los tres primeros lugares como causa de mortalidad en la población y sólo en el 2009 ocupó la primera causa de muerte.³

1.2.- Complicaciones durante la DM

Las personas con diabetes corren el riesgo de desarrollar una serie de problemas de salud que pueden provocar discapacidad o la muerte. Los constantemente altos niveles de glucosa en sangre pueden conducir a enfermedades graves, se puede asociar con complicaciones agudas que pueden dar lugar a alteraciones importantes, como precipitación de accidentes cardiovasculares o cerebrovasculares, lesiones neurológicas, coma y riesgo vital, la hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia a daños a largo plazo, que provocan disfunción y fallo de varios órganos: en especial, ojos, riñones, nervios, corazón, vasos sanguíneos e hígado.⁴

1.2.1 Retinopatía diabética

La retinopatía es la afección de la microvascularización retiniana asociada a la hiperglucemia prolongada y otras condiciones vinculadas a la diabetes mellitus tales como la hipertensión.⁵

1.2.2.- Nefropatía diabética

La nefropatía diabética es una de las complicaciones más importantes de la diabetes de larga evolución.⁶ Alrededor del 20-30% de los pacientes diabéticos presentan evidencias de nefropatía aumentando la incidencia en la diabetes tipo 2.⁷ La nefropatía diabética constituye un síndrome clínico diferenciado caracterizado por albuminuria superior a 300 mg/24 h, hipertensión e insuficiencia renal progresiva. Los estados más graves de nefropatía diabética requieren diálisis o trasplante renal.⁸

1.2.3 Neuropatía diabética

La neuropatía está presente en el 40-50% de los diabéticos después de 10 años del comienzo de la enfermedad, tanto en los tipo 1 como en los tipo 2, aunque menos del 50% de estos pacientes presentan síntomas, podría definirse como la presencia de síntomas y/o signos de disfunción nerviosa periférica en personas con diabetes.⁹

1.2.4 Enfermedad cerebrovascular

Las complicaciones cerebrovasculares son 2 veces más frecuentes en los diabéticos que en los no diabéticos. La suma de los distintos factores de riesgo, como la hipertensión, la dislipemia y cardiopatía aumentan la frecuencia de las complicaciones cerebrovasculares en el diabético, aunque de todos ellos el más importante, sin duda, es la hipertensión.¹⁰

1.2.5 Hepatopatía diabética

El hígado es uno de los órganos que se afectan durante la DM. La excesiva gluconeogénesis en el hígado contribuye al constante estado de hiperglucemia, y este incremento crónico de los niveles de glucosa tiene un gran impacto sobre el mismo hígado.¹¹

El hígado juega un papel central y crucial en la regulación del metabolismo de los carbohidratos. Su funcionamiento normal es esencial para el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre y de un suministro continuo a los órganos que requieren una fuente de energía de la glucosa.¹²

La diabetes está relacionada con una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el hígado causada por la hiperglucemia, generando un estrés oxidativo, evento que es clave en la patogénesis de las complicaciones asociadas a la diabetes.¹³

Cuando las células hepáticas son expuestas a un exceso de estas especies reactivas, se produce el daño oxidativo y se afectan muchas funciones celulares.¹⁴ Este proceso puede alterar la expresión de determinados genes a través de la activación de factores de transcripción como NF-κB, que conduce a una activación de citoquinas, moléculas de adhesión, genes de supervivencia, etc. o pueden inducir alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial con consecuencias letales, la peroxidación lipídica iniciada por las ERO puede jugar un papel importante en la fibrogénesis hepática.¹⁵

En mitocondrias de hígado aisladas de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) se ha mostrado una disminución en la actividad de la Cadena de Transporte de Electrones (CTE), caracterizada por una disminución en el potencial de membrana y en el cociente respiratorio.¹⁶

La esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), incluye una serie de condiciones clinicopatológicas cada vez con mayor frecuencia en pacientes diabéticos,¹⁷ este desorden se caracteriza por un depósito significativo de lípidos en los hepatocitos, que puede progresar a esteatohepatitis no alcohólica, y aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares.¹⁸

La resistencia a la insulina (RI) y la obesidad son dos importantes elementos etiopatogénicos de la esteatosis hepática no alcohólica, ambas aumentan la afluencia de ácidos grasos libres (AGL) al hígado lo que induce una mayor producción de triglicéridos hepáticos. La RI, promueve la lipogénesis de *novo* de AGL, al sobreexpresar factores de transcripción lipogénicos tales como la proteína unida al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) el cual aumenta la malonil-CoA, la cual inhibe la oxidación de los AGL dando como resultado mayor disponibilidad hepática de AGL como sustrato para la síntesis de triglicéridos (Figura 2).¹⁹

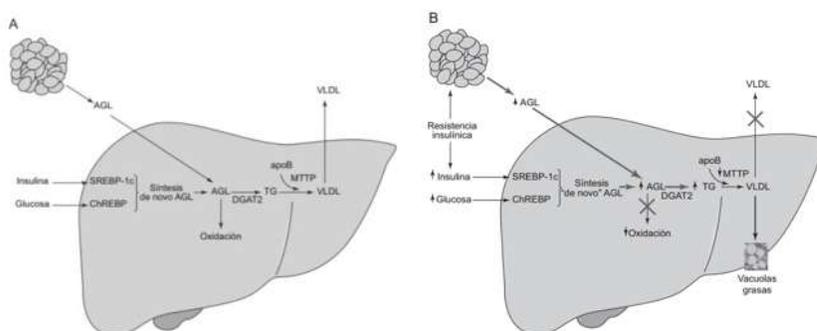


Figura 2. A) Síntesis hepática normal de triglicéridos y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). B) Fisiopatología de la EHNA. Influencia de la resistencia a la insulina en la EHNA.²⁰

1.3.- Alteraciones mitocondriales durante la DM

Las mitocondrias son los orgánulos celulares encargados de la obtención de la energía necesaria para las correctas funciones celulares, que mediante la utilización del oxígeno molecular (O_2), permiten obtener una gran cantidad de energía.¹³

Las mitocondrias están constituidas por dos membranas, una externa lisa y una interna fuertemente plegada, el espacio que hay entre estas dos membranas se conoce como espacio intermembranal. La membrana interna es donde se encuentra la CTE, que junto a la ATP sintasa se le conoce como el Sistema de Fosforilación Oxidativa, o sistema OXPHOS, y presenta un gran número de invaginaciones, para aumentar la superficie y permitir la inclusión de un mayor número de proteínas (Figura 3).²¹

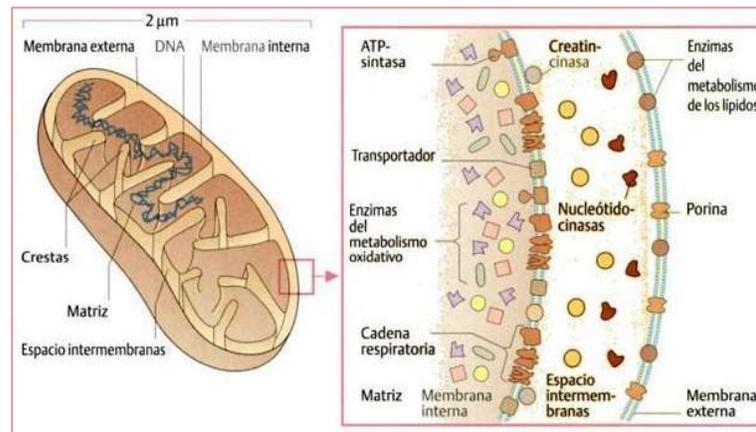


Figura 3. Estructura y composición de la mitocondria.²²

Se considera que la mitocondria es el sitio dentro de la célula donde se genera la mayor cantidad de ERO que desencadenan un estrés oxidativo, provocando defectos en el metabolismo mitocondrial y enfermedades.²³

1.4.-Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) por la mitocondria

Durante el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (CTE) los electrones de los equivalentes reductores NADH y FADH₂, son transportados secuencialmente a través de los diferentes complejos de la CTE.¹³ Los electrones son donados a los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) respectivamente, posteriormente la ubiquinona o coenzima Q acepta los electrones de estos dos complejos, sufriendo dos semireacciones de reducción a ubisemiquinona y ubiquinol recibiendo un electrón a la vez. Estos electrones son transportados al complejo III (UQ-citocromo *c* oxido-reductasa), al citocromo *c* y al complejo IV (citocromo *c* oxidasa) que los utiliza para reducir O₂ hasta H₂O.²⁴ Acoplado al transporte de electrones, los complejos I, III y IV de la cadena, traslocan protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana, generando un potencial de membrana que es aprovechado por la ATP sintasa o complejo V para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Figura 4).²³

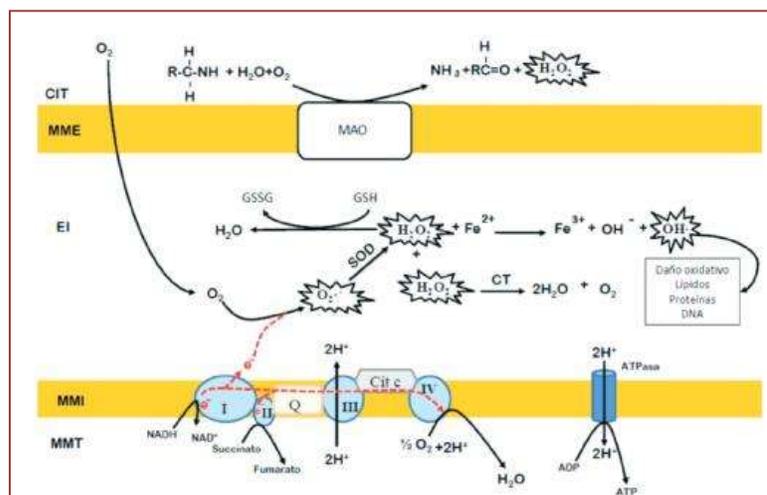


Figura 4. Producción de especies reactivas de oxígeno durante el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria.²⁵

Sin embargo la molécula de O_2 tiene una gran afección por los electrones y durante su transporte a través de la CTE debido a la fuga de electrones en los sitios redox de los complejos I y III, se generan especies reactivas de oxígeno (ERO).

Los electrones reaccionan con el O_2 dando como resultado la formación de anión superóxido O_2^- que es la principal especie reactiva de oxígeno producida por la mitocondria. La superóxido dismutasa mitocondrial (SODm) dependiente de manganeso convierte al O_2^- en peróxido de hidrógeno H_2O_2 , el cual en presencia de iones hierro o cobre forma el radical hidroxilo OH^\cdot , un radical altamente reactivo y más dañino a toda clase de biomoléculas. Para equilibrar la respuesta oxidante se dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de ERO preservando la integridad mitocondrial.²⁴

La producción de ERO, como el anión superóxido, da lugar a la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), activación de la vía de los polioles, inactivación de las enzimas antioxidantes y descontrol en el metabolismo del óxido nítrico (ON) y de las prostaglandinas.²⁶

Los lípidos, sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son las biomoléculas más susceptibles a ser atacadas por los radicales libres.²⁷ El proceso de daño oxidativo a los lípidos se denomina peroxidación lipídica, en esta reacción el radical libre formado oxida una cadena insaturada de lípido, dando como resultado la formación de un lípido hidroperoxidado y un radical alquilo el cual reacciona con una molécula de oxígeno y regenera la especie inicial, constituyendo una reacción en cadena (Figura 4).²⁸ La peroxidación de los lípidos genera especies como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2-nonenal, los cuales son considerados como citotóxicos, ya que pueden funcionar como agentes electrofílicos capaces de interactuar con otros componentes celulares, principalmente proteínas y ADN.

La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento celular.²⁹ El daño oxidativo a los lípidos de la membrana constituye un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas y provocando daño en su integridad.³⁰

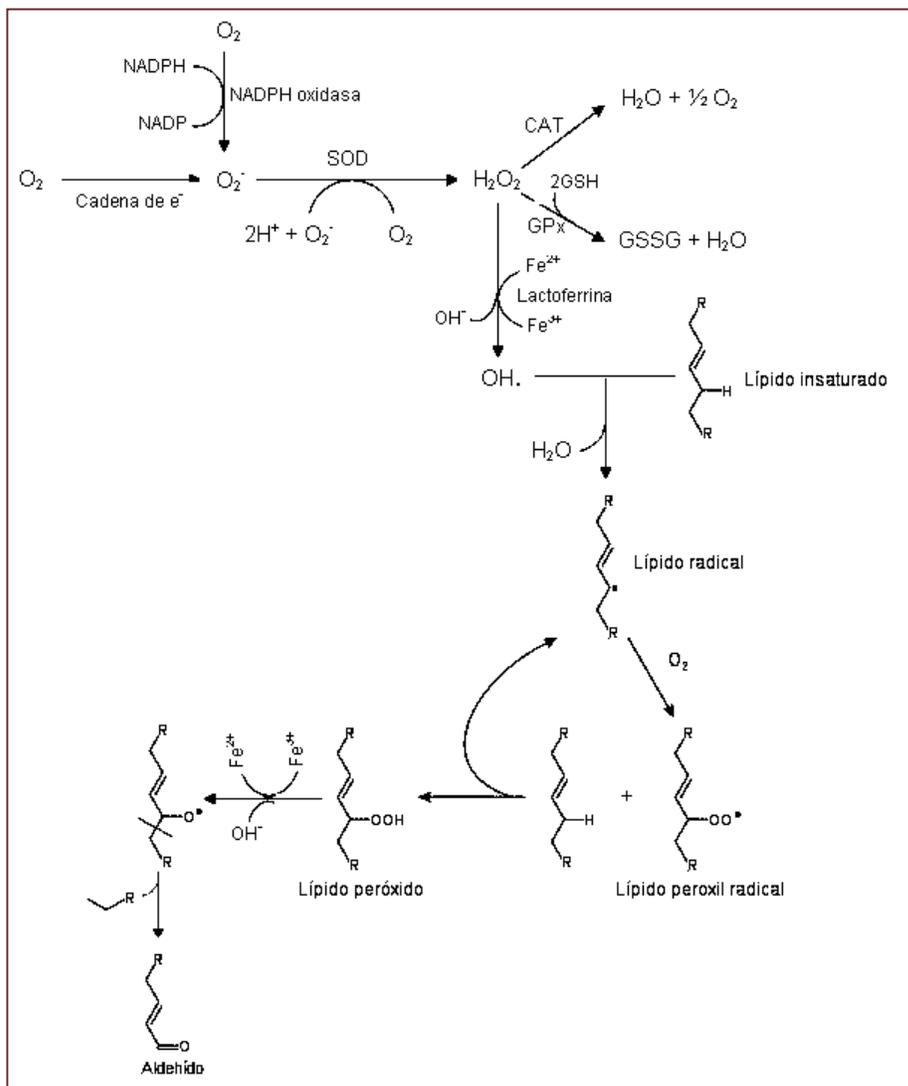


Figura 4. Mecanismo de peroxidación lipídica.³¹

1.5. Terapias antioxidantes durante la diabetes

Diversos estudios muestran que el equilibrio entre oxidantes y antioxidantes se ve alterado en pacientes diabéticos, ya que se observa una disminución en la actividad de los antioxidantes y, por ende, el aumento de especies reactivas,³² que se han implicado en la etiopatogenia de la enfermedad y en la aparición de complicaciones crónicas.

La generación de AGEs, la activación de la vía de los polioles y de las hexosaminas, así como la activación de las proteínas quinasas C están en estrecha relación con la generación de ERO que conducen a un estrés oxidativo crónico en estos pacientes.³³

Es importante mencionar que las ERO juegan un rol fisiológicamente importante pudiendo actuar a distintos niveles: como señales intracelulares y reguladora de genes implicados en el proceso de crecimiento y desarrollo celular, como inductores de la expresión de genes, en la regulación de la estructura y función de determinadas proteínas, intervienen en el control del tono muscular, participan en los procesos de eliminación de patógenos, entre otros aspectos importantes.³⁴ Por lo tanto los antioxidantes son indispensables de manera que se mantenga un equilibrio entre la cantidad de ERO y las defensas antioxidantes.³⁵

Algunos reportes muestran a la terapia antioxidante como una alternativa para prevenir y contrarrestar a las diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo, manteniendo el balance entre la formación y neutralización de los radicales libres (RL).³⁶

Estrategias terapéuticas con antioxidantes naturales tienen como objetivo disminuir el impacto que tiene las complicaciones asociadas con un aumento en el estrés oxidativo durante la diabetes como en el caso de la hepatopatía diabética.³⁷

Las plantas medicinales, de uso tradicional son consideradas una fuente importante de nuevos compuestos efectivos como hepatoprotectores como es el caso de *Taraxacum officinale* (diente de león) en la cual un estudio demuestra la acción hepatoprotectora y antioxidante.³⁸

La administración de D-limoneno, un monoterpeno, a ratas diabéticas, causó una reducción significativa en los niveles de peroxidación lipídica y un aumento en las actividades de las enzimas antioxidantes, en el plasma y en los tejidos.³⁹

Las dosis adecuadas del aceite esencial de canela indígena del quimiotipo linalol exhibieron un potencial terapéutico en el control glucémico en la diabetes, que fue al menos en parte el resultado de la secreción de insulina mejorada.⁴⁰

Cortés-Rojo *et al*, demostraron que el aceite de aguacate protege del daño mitocondrial que se produce durante la diabetes al aumentar la resistencia de los complejos respiratorios al estrés oxidativo y reducir la formación de ERO.⁴¹

1.6. *Satureja macrostema*: características y propiedades.

Las plantas aromáticas de la familia Lamiaceae son usadas como especias o té y han sido ampliamente estudiadas por la presencia de antioxidantes naturales. Algunos miembros del género *Satureja* tienen características aromáticas y medicinales, las hojas, flores y tallos son usados como infusión y en medicina tradicional, para tratar dolores musculares, náuseas, diarrea y enfermedades infecciosas.³⁷

Existen investigaciones realizadas acerca de la actividad antioxidante de las plantas del género *Satureja*, tanto en aceites esenciales como en extractos, en donde se demostró la capacidad de captura del radical DPPH de hasta 89,87 %.⁴²

Satureja macrostema Es una planta arbustiva de 1 a 2 m de alto con tallos erectos, ramas arqueadas y tiene flores solitarias o en grupos de 2-3 en las axilas de las hojas (Figura 5). Ha sido utilizada en la medicina tradicional como digestivo, carminativo, así como para combatir el dolor de estómago en los estados de Michoacán y Oaxaca. Esta planta se localiza en los estados de Michoacán, San Luis Potosí, Jalisco y Oaxaca.⁴³



Figura 5. Parte aérea *Satureja macrostema*.

1.6.1 Clasificación botánica de *Satureja macrostema*.

Clase	Dicotiledóneo	Magnoliopsida
Subclase		Asteridae
Orden	Tubiflorales	Labiales
Familia	Labiataeo	lamiaceae
Genero	<i>Satureja</i>	
Especie	<i>Macrostema</i>	

Satureja macrostema cuenta con diversos nombres comunes tales como; Nurite, Té Nurite, Té de Monte, Tabaquillo, Nurhitini te (Purépecha).⁴³

1.6.2 Compuestos antioxidantes en plantas de nurite (*S. macrostema*)

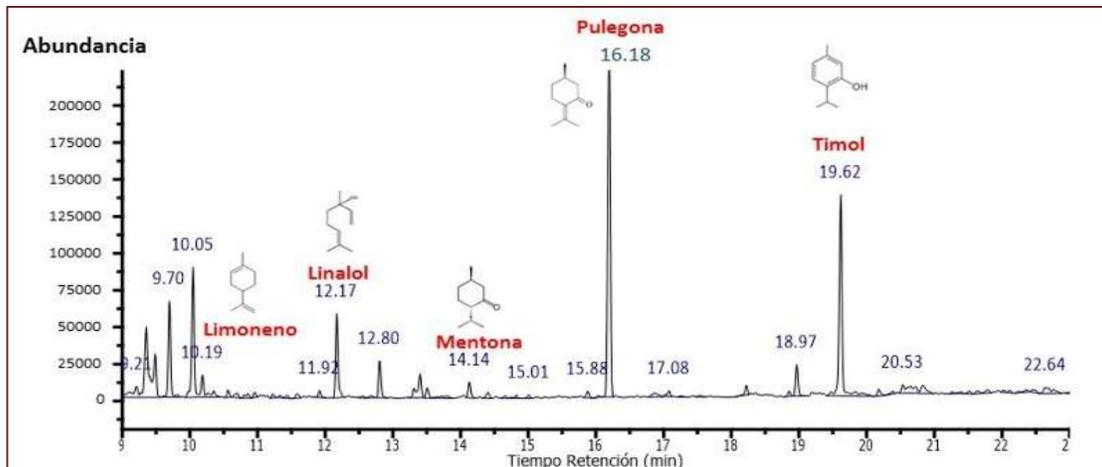


Figura 6. Cromatografía de aceites esenciales de la parte aérea de *Satureja macrostema* cultivadas en Invernadero.⁴⁴

Los terpenos son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbonos, llamado isopreno, son los metabolitos secundarios que dan las características organolépticas (aroma y sabor) de las plantas y que constituyen la mayor parte del aceite esencial producido por las plantas aromáticas.⁴⁵

Se ha demostrado que los terpenos tienen un comportamiento antioxidante que proporciona una protección relevante bajo condiciones de estrés oxidativo en diferentes enfermedades incluyendo hepáticas, renales, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, cáncer, diabetes, así como en los procesos de envejecimiento.⁴⁶

Investigaciones demuestran el potencial antioxidante y hepatoprotector del extracto metanólico de *Satureja macrostema* usando diversos ensayos antioxidantes, incluyendo DPPH, superóxido, el óxido nítrico (NO), captación de radicales hidroxilo y la actividad quelante de hierro en ratas con daño hepático.⁴⁷

2. JUSTIFICACIÓN

En la DM descompensada se favorece la aparición de complicaciones como es la hepatopatía diabética, complicación que se asocia a un incremento en el estrés oxidativo mitocondrial, produciendo trastornos en la función y metabolismo hepático, por lo cual se deben buscar alternativas para prevenir y mejorar la calidad de vida de las personas con esta enfermedad. El empleo del extracto etanólico de *Satureja macrostema* pudiera ser una alternativa en el tratamiento de la hepatopatía diabética, debido a que presenta antioxidantes que retardan o previenen el daño causado por las especies reactivas de oxígeno.



3. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de *Satureja macrostema* mejora la función de la CTE al disminuir el estrés oxidativo en mitocondrias de hígado de rata con diabetes tipo 1.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto del extracto etanólico de *Satureja macrostema* sobre la cadena de transporte de electrones y el estrés oxidativo en mitocondrias de hígado de rata con diabetes tipo 1.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluación del efecto del extracto etanólico de *Satureja macrostema* sobre la CTE en mitocondrias de hígado de rata con diabetes tipo 1.
- Determinar el efecto del extracto etanólico de *Satureja macrostema* sobre el estrés oxidativo en mitocondrias de hígado de rata con diabetes tipo 1.

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. 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 el grupo diabético.

Para el estudio las ratas fueron divididas al azar en dos grupos, de cuatro ratas cada uno. Grupo 1: control, Grupo 2: diabético.

5.2 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, los hígados fueron triturados y lavados con medio 1 (220mM manitol, 70 mM sacarosa, 2 mM MOPS y 1 mM EGTA, a pH 7.4). Los fragmentos fueron homogenizados y centrifugados a 2000 rpm y el sobrenadante se centrifugo nuevamente a 7500 rpm y la pastilla resultante fue lavada con medio 2 (220mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM MOPS, a pH 7.4) y centrifugada a 9000 rpm. Finalmente la pastilla se resuspendió en 500µl de medio 2. Todas las centrifugaciones se realizaron durante 10 minutos a 4°C. La concentración de proteína mitocondrial fue determinada mediante el método de Biuret.

5.3 Inducción de estrés oxidativo en las mitocondrias e incubación con el extracto etanólico de *Satureja macrostema*.

Se indujo estrés oxidativo en las mitocondrias aisladas incubándolas en buffer de fosfatos (50 mM KH₂PO₄, pH 7.6), adicionando una concentración de 25µM de Fe²⁺ e incubándolas durante 30 minutos a 4°C en agitación constante. El ion Fe²⁺ estimula en buffer de fosfatos la formación de radical OH• el cual es capaz de iniciar el proceso de lipoperoxidación (figura 7).⁴⁸ Las muestras fueron incubadas con el extracto etanólico de *Satureja macrostema* a concentraciones de 0.1 0.5 y 1 mg/ml.

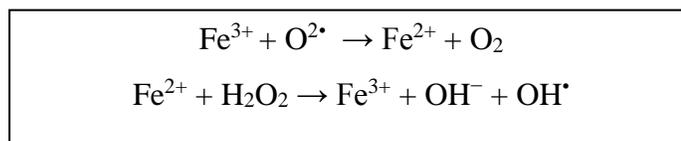


Figura 7. Reacción de Heber-Weiss

5.4 Actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE)

Las actividades de los complejos mitocondriales fueron determinadas en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550 a temperatura ambiente utilizando sustratos e inhibidores específicos para cada complejo y mitocondrias solubilizadas con Triton 10% en un buffer hipotónico.⁵⁰

5.5 Actividad de la NADH deshidrogenasa (complejo I)

0.3 mg/ml de mitocondrias en un volumen de 1ml de buffer de fosfato (50 mM KH₂PO₄, pH 7.6) se incubaron cinco minutos con 1mM de KCN, 1µg de antimicina A y 100 mM de EDTA. Al término de la incubación se agregaron 5mM de ferrocianuro de potasio y se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 340nm, transcurrido un minuto se agregó NADH y se continuó el trazo durante cuatro minutos más, durante los cuales se midió la oxidación del NADH.

5.5.1 Actividad de la succinato deshidrogenasa (complejo II)

0.3 mg/ml de mitocondrias en un volumen de 1ml de buffer de fosfato (50 mM KH₂PO₄, pH 7.6) se incubaron cinco minutos con 1mM de rotenona, 1µg de antimicina A y 1mM de KCN. Al término de la incubación se agregaron 80µM de 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) y se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm, transcurrido un minuto se agregó 10mM de succinato y se continuo el trazo durante cuatro

minutos más, durante los cuales se midió la reducción del DCIP el cual actúa como un aceptor artificial de electrones.

5.5.2 Actividad de succinato-citocromo c oxidoreductasa (complejo III)

0.3 mg/ml de mitocondrias en un volumen de 1ml de buffer de fosfato (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6) se incubaron cinco minutos con 1mM de rotenona y 1mM de KCN. Al término de la incubación se agregaron 1.5mg de citocromo *c* y se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm, transcurrido un minuto se agregó 10mM de succinato y se continuo el trazo durante dos minutos más, durante los cuales se midió la reducción del citocromo *c*. La reacción se detuvo al agregar 1 μ g de antimicina A la cual es un inhibidor del complejo III. La reducción del citocromo *c* sensible a antimicina se calculó restando a la actividad en presencia de succinato a la actividad en presencia de succinato + antimicina A.

5.5.3 Actividad citocromo c oxidasa (complejo IV)

0.3 mg/ml de mitocondrias en un volumen de 1ml de buffer de fosfato (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6) se incubaron cinco minutos con 1mM de rotenona y 1 μ g de antimicina A. Al término de la incubación se agregó 1.5mg de citocromo *c* previamente reducido con unos gramos de ditionita de sodio se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm, donde se midió la oxidación del citocromo *c*. La reacción se detuvo al agregar 1mM de KCN el cual es un inhibidor del complejo IV.

5.6 Niveles de lipoperoxidación

Los niveles de lipoperoxidación se midieron utilizando el método del ácido tiobarbiturico (TBARS).⁵¹ A 0.3 mg/ml de mitocondrias en un volumen de 1ml de buffer de fosfatos (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6), se le agregaron 2 ml de la solución ácida compuesta por ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico 0.375% y HCl 0.25N. Posteriormente, las muestras se calentaron a baño maría durante 30 minutos y después fueron enfriadas en hielo y centrifugadas a 7500rpm durante cinco minutos a 4°C. Finalmente, se extrajeron 2ml del sobrenadante y se leyeron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis a 532nm. Los resultados se expresaron como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

(TBARS), las cuales se calcularon en base al coeficiente de extinción molar del malondialdehído $1.56 \times 10^5 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5.7 Producción de especies reactivas de oxígeno

Esta determinación se realizó evaluando la oxidación de la sonda fluorescente 2',7'-diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCDHF-DA) por las ERO. En la celda se añadió 1mg/ml de suspensión de mitocondrias aisladas y 5 μl de DCDHF-DA (500 mM) para obtener un volumen final de 2ml de medio 2 de aislamiento de mitocondrias, la lectura de la fluorescencia se realizó a una λ de excitación de 485 nm y una λ de emisión a 520 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5000U.

Después de 1min se añadió una concentración de 10 mM de glutamato/malato y se midió el incremento en la fluorescencia. Los resultados fueron presentados como unidades arbitrarias de fluorescencia.⁵²

5.8 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de al menos 5 experimentos independientes. La significancia estadística de las diferencias entre las medias ($P < 0.05$) se determinaron mediante la prueba t de Student con el programa estadístico Sigma Plot versión 11.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto del extracto etanólico de *Satureja macrostema* sobre la actividad de la CTE inducidos por la diabetes.

La actividad de los complejos I, II, III y IV de la CTE se evaluaron utilizando inhibidores y sustratos específicos para cada complejo como se describió en materiales y métodos.

En el panel A que corresponde al grupo control se puede observar que la actividad del complejo I se vio disminuida con la adición del Fe^{2+} en un 33% , mientras que el grupo que fue incubado con el extracto a una concentración de 1mg/ml recupero la actividad en un 50%, sin embargo esta diferencia no es significativa. En el panel B correspondiente al grupo diabético no se observa diferencias entre los distintos grupos en la actividad del complejo I (Figura 8).

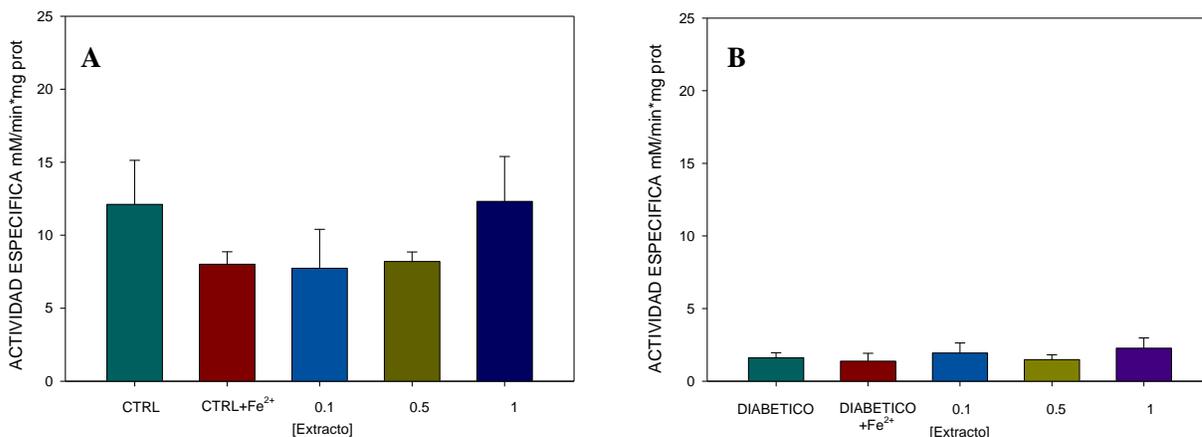


Figura 8. Actividad del complejo I (NADH deshidrogenasa) en mitocondrias de hígado incubadas con el extracto etanólico de *Satureja macrostema* a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1mg/ml. Grupo control (panel A n=4), grupo diabético (panel B n=4). Los datos se presentan como la media \pm E.E.

En la figura 9 se muestran los resultados del complejo II, en donde se puede observar en el panel A correspondiente al grupo control, que la actividad de este complejo disminuyó en un 40% en el grupo retado a un estrés con Fe^{2+} respecto al grupo control, mientras que los grupos incubados con el extracto presentaron una mayor actividad con las tres concentraciones del extracto de un 60 % ($p < 0.05$). En el panel B que corresponde al grupo diabético la actividad del complejo se ve más afectada, y se recupero solo parcialmente, sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa.

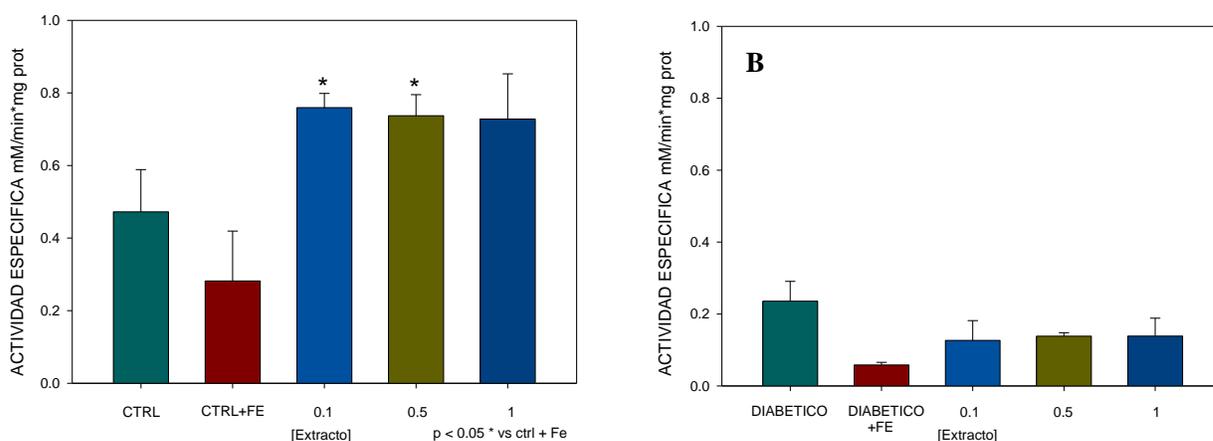


Figura 9. Actividad del complejo II (succinato deshidrogenasa) en mitocondrias de hígado incubadas con el extracto etanólico de *Satureja macrostema* a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1mg/ml. Grupo control (panel A n=4), grupo diabético (panel B n=4). Los datos se presentan como la media \pm E.E.

En la figura 10 que muestra los resultados de la actividad del complejo III se puede observar en el panel A que corresponde al grupo control, que el grupo tratado con Fe^{2+} muestra un descenso del 95% comparado con el control, la incubación con el extracto no muestra ninguna diferencia significativa de la actividad del complejo.

En el panel B podemos observar que la actividad del complejo fue menos sensible al tratamiento con Fe^{2+} y la incubación con las diferentes concentraciones del extracto no muestran efecto en la actividad de este complejo.

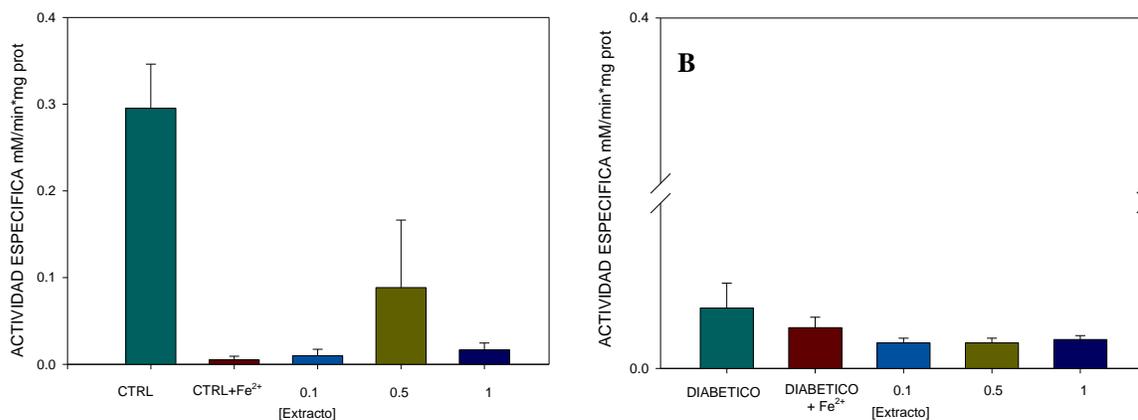


Figura 10.- Actividad del complejo III (succinato-citocromo c oxido-reductasa) en mitocondrias de hígado incubadas con el extracto etanólico de *Satureja macrostema* a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1mg/ml. Grupo control (panel A n=4), grupo diabético (panel B n=4). Los datos se presentan como la media \pm E.E.

En la actividad del complejo IV (Figura 11) se puede apreciar en el panel A correspondiente al grupo control, que no se presenta sensibilidad al tratamiento con Fe^{2+} , de igual forma se puede observar que no existen diferencias en la actividad del complejo IV en los grupos con las diferentes concentraciones del extracto.

En el panel B (grupo diabético) se puede observar que el tratamiento con Fe^{2+} disminuye en un 86% la actividad del complejo IV respecto al grupo control mientras que los grupos con el extracto muestran parcialmente un aumento en la actividad, siendo la concentración de 0.5 mg/ml la que presenta mayor actividad de hasta 4.2 veces más que el grupo tratado con Fe^{2+} ($p < 0.01$).

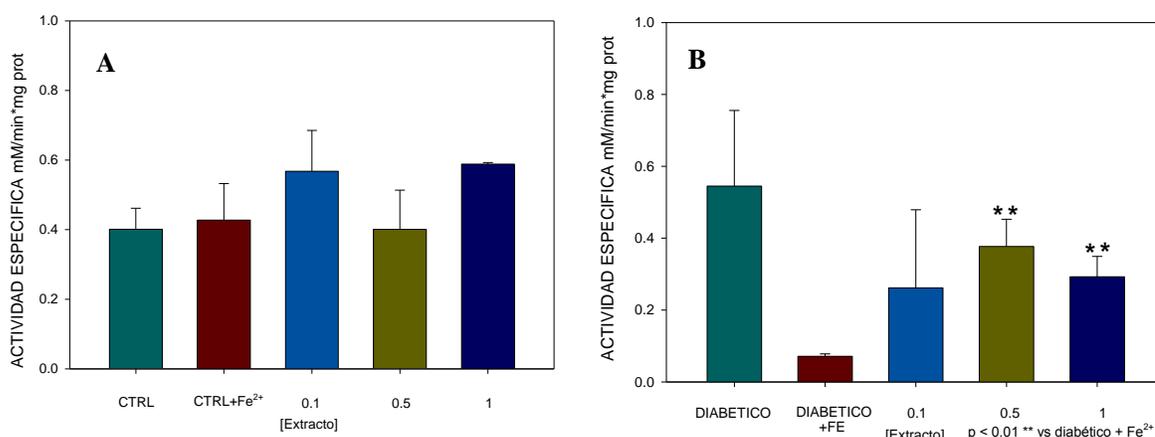


Figura 11. Actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) en mitocondrias de hígado incubadas con el extracto etanólico de *Satureja macrostema* a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1mg/ml. Grupo control (panel A n=4), grupo diabético (panel B n=4). Los datos se presentan como la media \pm E.E.

6.2. Efecto del extracto etanólico de *Satureja macrostema* sobre los niveles de lipoperoxidación.

Se determinaron los niveles de lipoperoxidación usando el método de formación de sustancias reactivas del ácido tiobarbiturico (TBARS) en las mitocondrias de hígado incubadas con las diferentes concentraciones del extracto, en donde se puede observar en la figura 12 en el panel A, que corresponde al grupo control, un aumento en el grupo que fue retado a un estrés con Fe^{2+} de hasta 8.6 veces más comparado con el grupo control ($p < 0.05$), y una disminución en los niveles de lipoperoxidación en los grupos incubados con el extracto de un 36% comparadas con el grupo que fue retado a un estrés con Fe^{2+} , siendo la concentración de 1 mg/ml la que presenta mayor protección contra la lipoperoxidación, sin embargo esta diferencia no fue significativa.

En el panel B se puede observar que el tratamiento con Fe^{2+} incrementa los niveles de lipoperoxidación en un de hasta 12 veces más comparado con el grupo control ($p < 0.001$) y los grupos que fueron incubados con el extracto presentan los niveles más bajos, comparados con el grupo retado a un estrés con Fe^{2+} , siendo la concentración de 0.1 mg/ml la que en este caso produjo una disminución en los niveles de lipoperoxidación del 89% ($p < 0.001$).

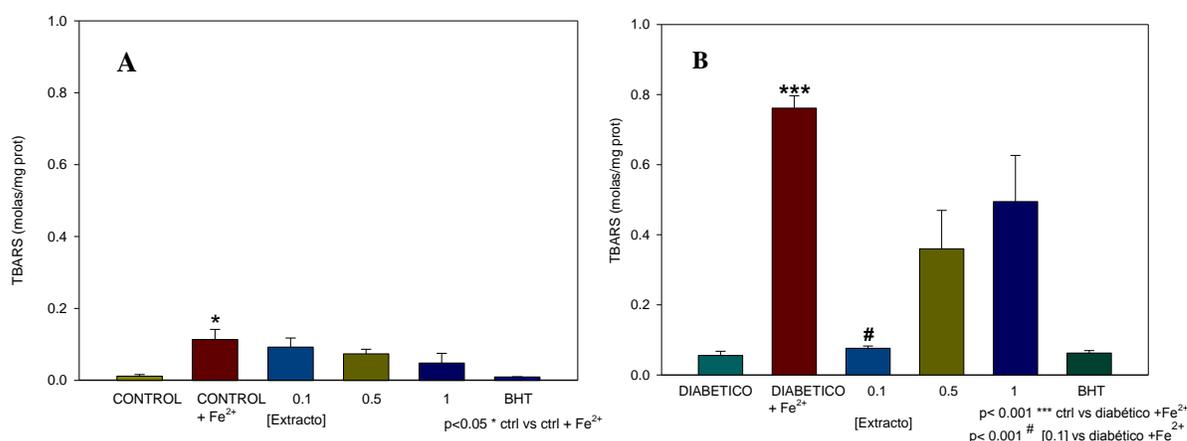


Figura 12. Niveles de lipoperoxidación en mitocondrias de hígado incubadas con el extracto etanólico de *Satureja macrostema* a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1mg/ml. Grupo control (panel A n=4), grupo diabético (panel B n=4). Los datos se presentan como la media \pm E.E.

6.3. Efecto del extracto etanólico de *Satureja macrostema* sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria.

Se determinó la producción de ERO utilizando una sonda fluorescente 2',7'-diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCDHF-DA) y glutamato/malato como sustrato mitocondrial.

La oxidación de la DCDHF-DA al compuesto fluorescente 2-7 diclorofluoresceína oxidada (DCF) por la presencia de H_2O_2 , permite utilizar esta reacción como indicador específico de la formación de esta especie reactiva.

En la figura 13 se muestran los resultados, en donde se puede observar en el panel A la producción de ERO en el grupo control, donde observa una tendencia a disminuir de los niveles de ERO en las muestras tratadas con las concentraciones del extracto comparadas con el grupo control quien produjo la mayor cantidad de ERO, siendo la concentración más alta de 1mg/ml la que disminuyó la producción de ERO un 70%. En el panel B que corresponde al grupo diabético no se observa ninguna diferencia significativa entre los distintos grupos.

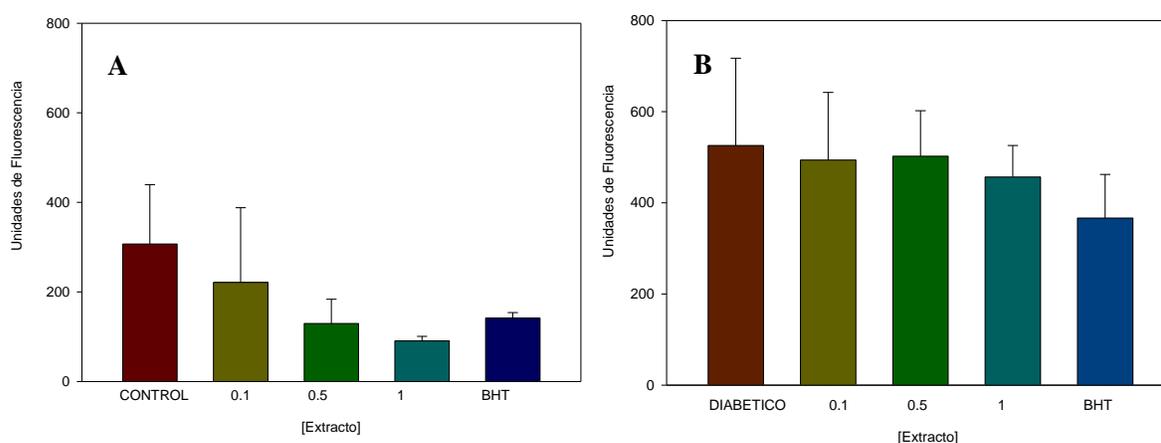


Figura 13. Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en mitocondrias de hígado incubadas con el extracto etanólico de *Satureja macrostema* a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1mg/ml durante 20 min a 4°C. Grupo control (panel A n=4), grupo diabético (panel B n=4). Los datos se presentan como la media \pm E.E.

7. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades con mayor prevalencia y repercusión sociosanitaria, no sólo por su elevada frecuencia, sino también por el impacto de las complicaciones crónicas de la enfermedad.⁵³

Con el tiempo, la diabetes puede dañar el corazón, los vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios. Se calcula que en 2012 fallecieron 1,5 millones de personas como consecuencia directa de la diabetes.¹

México ocupa actualmente el noveno lugar mundial en la prevalencia de diabetes. Este es un dato alarmante, y más aún cuando las proyecciones refieren que para el año 2025, el país ocupará el sexto o séptimo lugar.⁵⁴ Según proyecciones de la OMS, la diabetes será la séptima causa de mortalidad en 2030.⁵⁵

Estudios demuestran que la diabetes está relacionada con una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) causada por la hiperglucemia, evento que es clave en la patogénesis de las complicaciones asociadas a la diabetes.¹³

La diabetes se asocia con elevados niveles de marcadores de daño oxidativo, debido a alteraciones metabólicas en la mitocondria, como es el aumento en la producción de ERO, la peroxidación lipídica y la disminución de las defensas antioxidantes.⁵²

La esteatosis hepática no alcohólica (EHNA), es una de las complicaciones que se pueden presentar durante la diabetes, su importancia radica en la alta prevalencia en pacientes diabéticos y, desde el punto de vista hepático, en su progresiva evolución desde esteatosis a cirrosis y cáncer de hígado. Se ha observado que la EHNA da lugar a frecuentes alteraciones en el metabolismo lipídico y a un incremento del riesgo cardiovascular.⁵⁶

Estudios recientes enfatizan el papel de la resistencia a la insulina, el estrés oxidativo, la peroxidación de lípidos y la disfunción mitocondrial en el desarrollo y progresión de hígado graso no alcohólico.⁵⁷

Por lo que el estudio de nuevos tratamientos antioxidantes que ayuden a prevenir o contrarrestar las complicaciones causadas por el ERO en la diabetes es de suma importancia.

Se ha demostrado que antioxidantes presentes en la plantas previenen el desarrollo del estrés oxidativo en ratas con diabetes inducidas con estreptozotocina.⁵⁸ Los antioxidantes pueden actuar a diferentes niveles, inhibiendo la formación de ERO, eliminando los radicales libres, o aumentando las capacidades de defensa antioxidantes.⁵⁹

Por lo tanto en el presente trabajo se plantea que el extracto etanólico de *Satureja macrostema* ayuda a prevenir el estrés oxidativo en mitocondrias de hígado de rata con diabetes, lo que pudiera ayudar en la atenuación del desarrollo de complicaciones asociadas con la enfermedad.

En la medición de la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones, los resultados muestran que la actividad del complejo I de las mitocondrias de hígado se ve disminuida durante la diabetes y que el tratamiento con el extracto no muestra diferencia comparado con el grupo control (Fig. 8B). Mientras que el tratamiento con el extracto produjo un incremento en la actividad de este complejo solo en el grupo control, lo que podría disminuir la formación de ERO ya que el complejo I es uno de los máximos productores de éstas. (Fig. 8A).⁶⁰

La actividad del complejo II disminuyó durante la diabetes, (lo contrario en lo reportado en un artículo donde se muestra que en algunos casos la actividad del complejo II aumenta en mitocondrias de hígado de rata)¹¹ mientras que el tratamiento con el extracto produjo un incremento parcial en la actividad del complejo (Figura 9B). Por otro lado los resultados muestran que en el grupo control las incubaciones con el extracto presentaron una mayor actividad con las tres concentraciones (Figura 9A).

Por otra parte la actividad del complejo III disminuyó durante la diabetes, existen reportes en donde se demuestra que el complejo III es uno de los principales productores de especies reactivas de oxígeno de la cadena transportadora de electrones,⁶¹ y que además la actividad deficiente del complejo III está relacionada a daño hepático,⁶² los resultados nos muestran que el tratamiento con el extracto de *Satureja macrostema* no tiene ningún efecto en la actividad de este complejo en las mitocondrias del grupo diabético ni en el grupo

control, esto debido quizá a que las concentraciones del extracto no son las adecuadas para presentar un efecto a nivel del complejo III.

En tanto que el complejo IV presenta una mayor actividad en el grupo diabético cuando se incubaron las mitocondrias con las diferentes concentraciones del extracto, lo que ayudaría en la fase final del transporte electrónico y la obtención de energía.

En la medición de los niveles de peroxidación lipídica se observó que durante la diabetes los niveles aumentaron, el tratamiento con el extracto etanólico de *Satureja macrostema* disminuyó los niveles de lipoperoxidación, lo que ayudaría en la protección de las membranas mitocondriales disminuyendo el riesgo de daño celular, se han reportados antioxidantes que disminuyen los niveles de lipoperoxidación,³⁹ esto podría ser un posible mecanismo en el cual los antioxidantes presenten en el extracto actúan contra la peroxidación de lípidos en las mitocondrias de hígado.

Al medir la producción de especies reactivas de oxígeno se observó que los niveles descendieron en el grupo control cuando las mitocondrias fueron tratadas con el extracto, por su parte el grupo diabético presenta una mayor producción de especies reactivas de oxígeno, lo que concuerda con lo reportado en la literatura en donde la diabetes se observa un incremento en la producción de ERO, y que además un desbalance entre las ERO y los sistemas antioxidantes es un elemento patogénico importante de la resistencia a la insulina. En tanto que el tratamiento con el extracto no presentó ningún efecto en los niveles de producción de ERO.

Hay un flujo continuo de investigaciones que evidencian que el estrés oxidativo tiene un impacto significativo a la progresión de la diabetes y sus complicaciones, por lo tanto el tratamiento con el extracto etanólico de *Satureja macrostema* podría tener un efecto beneficioso previniendo y retrasando el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes, asociadas a un aumento del estrés oxidativo, destacando la importancia de la investigación continua y la necesidad de nuevos métodos para prevenir y tratar esta pandemia.

8. CONCLUSIÓN

El extracto etanólico de *Satureja macrostema* mejora parcialmente la función de la cadena de transporte de electrones al aumentar actividad de los complejos II y IV durante la diabetes protegiendo contra la lipoperoxidación, de igual forma mejora la actividad de los complejos I y II de manera significativa reduciendo la producción de especies reactivas de oxígeno y disminuyendo los niveles de lipoperoxidación en grupos controles mejorando la función mitocondrial.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Prevalencia de diabetes. World Health Organization. 2015. 20/09/2015; 5:30 pm <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>.
2. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. 21/09/2015; 7:00pm http://ensanut.insp.mx/doctos/FactSheet_ResultadosNacionales14Nov.pdf.
3. Tamayo Garibay, 2014. En Michoacán el 7.5% de la población padece algún tipo de diabetes. <http://lajornadamichoacan.com.mx/2014/11/en-michoacan-el-7-5-de-la-poblacion-padece-algun-tipo-de-diabetes/>.
4. Donald S. Fong, Lloyd A, Thomas W. Gardner, George King, George Blankenship, Jerry D. Cavallerano, Fredrick L. Ferris, Ronald Klein. 2003. Diabetic Retinopathy. The American diabetes Association. Diabetes Care. 26: S99.
5. The Royal College of Ophthalmologists. 2012. Diabetic Retinopathy Guidelines. 6-8.
6. Moreno F. A, Aguilera A, Valdés E. 2000. Nefropatía diabética. Medicine. 8: 1001-1008.
7. American Diabetes Association. 2000. Clinical Practice Recommendations. Diabetic Nephropathy. Diabetes Care. 23: S69.
8. Donnelly R, Emslie-Smith A. M, Gardner I. D, Morris A. D. 2000. Vascular complications of diabetes. BMJ; 320: 1063.
9. N. Hillman Gadea. 2000. Neuropatía diabética periférica. Medicine. 8(19): 1009-1016.
10. Mediavilla Bravo J.J. 2001. Complicaciones de la diabetes mellitus. Diagnóstico y tratamiento. SEMERGEN; 27: 143.
11. Hao J, Shen W, Sun L, Long J, Sharman E, Shi X, Liu J. 2011. Mitochondrial dysfunction in the liver of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats: improvement by a combination of nutrients. Br J Nutr. 106(5):648-55.
12. Gavin N. Levinthal, MD, Anthony S. Tavill, MD, FRCP, FACP. 1999. Liver Disease and Diabetes Mellitus. (2) 17.

-
13. Pérez-Gallardo R, Albarrán-Bravo S, Manzo-Avalos S, Saavedra-Molina A. 2009. Estrés oxidativo y las complicaciones asociadas a la diabetes. *Ciencia Nicolaita*. 51: 133.
 14. Tamura S, Shimomura I. 2005. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 115:1139-42.
 15. Duvnjak M, Lerotic I, Barsic N, Tomasic V, Virovic Jukić L, Velagic V. 2007. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterology*. 13:4539-50.
 16. Ferreira FM, Palmeira CM, Seica R, Moreno AJ, Santos MS. 2003. Diabetes and mitochondrial bioenergetics: alterations with age. *J Biochem Mol Toxicol*; 17(4):214-22.
 17. Brian P. Mulhall, Janus P. Ong, Zobair M. Younossi. 2002. Non-alcoholic fatty liver disease: An overview. 17, 1136.
 18. Tomislav B, Branko K, Lea D, Marko D. 2011. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Markers Are Associated with Insulin Resistance in Type 1 Diabetes. 56: 3656.
 19. Marko D, Ivan L, Neven B, Vedran T, Lucija J, Vedran V. 2007. Pathogenesis and management issues for non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 13(34): 4539-4550.
 20. Brea Hernando A, Puzo Foncillas J. 2010. Enfermedad del hígado graso no alcohólico y riesgo cardiovascular. *Clin Invest Arterioscl*. 22(6): 261.
 21. D. Acisclo Pérez Martos. 2013. Cadena de transporte de electrones mitocondrial, una nueva visión. *Hospital real y provincial de nuestra señora de gracia*. 18-19.
 22. Koolman J, Röhm. 2004. *Bioquímica texto y atlas*. 3ª edición. 210.
 23. Chow CK, Ibrahim W, Wei Z, Chan AC. 1999. Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Free Radic Biol Med*; 27: 580-587.
 24. Martínez-Abundis E, Sánchez-Rodríguez M. A, El Hafidi-Bentlakder M. 2005. Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. 30 (3) 82-89.

-
25. Delgado Olivares L, Betanzos Cabrera G, Sumaya Martínez M. T. 2010. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investigación y Ciencia, Universidad Autónoma de Aguascalientes.* 50; 12.
26. Ramos Ibarra M, Batista González C, Gómez Meda B, Zamora Pérez A. 2006. Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes. 8: 1-5.
27. Cheeseman, K. H. and Slater, T. F. 1993. "An introduction to free radical biochemistry." *Br. Med. Bull.* 49(3): 588-603.
28. Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. 2006. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química.* 17(2); 169.
29. Lippman, R. D. 1985. Rapid in vivo quantification and comparison of hydroperoxides and oxidized collagen in aging mice, rabbits and man. *Exp. Gerontol.* 20: 1-5.
30. Mark K. Shigenaga, Carlos J. Gimeno and Bruce N. Ames. 1989. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a Biological Marker of in vivo Oxidative DNA Damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9697.
31. Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral. Facultad Ciencias Médicas. UNR. Rosario – Argentina. 12/10/2015 9:00pm
<http://www.biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem%20estres%20oxidativo.pdf>
32. Maldonado Saavedra O, Jiménez Vázquez E, Guapillo Vargas M. R, Ceballos Reyes G. M, Méndez Bolaina E. 2010. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev Med UV.* 37.
33. Díaz M, Baiza LA, Ibáñez MA, Pascoe D, Guzmán AM, Kumate J. 2004. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac. Med. Mex.* 140(4):437-47.
34. Alonso Carrillo N. 2009. Actividad antioxidante de *Satureja macrostema*. Tesis de grado: Maestría en ciencia en alimentos. México DF.
35. Yogesha M, Grace Nirmala J, Narendhirakannan R. T. 2013. Antidiabetic and Antioxidant Properties of *Triticum aestivum* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Advances in Pharmacological Sciences.* 2013: 1-2.

-
36. Nuttall S.L, Kendall M.J, Martin U. 1999. Antioxidant therapy for the prevention of cardiovascular disease, *Quarterly Journal of Medicine*. 92, 239-244.
37. Eminagaoglu O, Tepe B, Yumrutas O, Askin A, Daferera D, Polissiou M, Sokmen A. 2007. The in vitro antioxidative properties of the essential oils and metanol extracts of *Satureja spicigera*. (K. Koch.) Boiss, and *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry*. 100: 339-343.
38. Favari L, Arce-Díaz C, Ortíz-Martínez J, Pablo-Pérez S, Soto C, Meléndez-Camargo M. 2013. Efectos hepatoprotector y antioxidante de *Taraxacum officinale* en el daño hepático agudo inducido por el tetracloruro de carbono en la rata. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 44 (4); 54.
39. Ramakrishnan M, Arumugam K, Ramalingam S. 2013. Protective Effects of D-Limonene on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 112; 175–181.
40. Shih-Chieh L, Wen-Xin X, Li-Yun L, Jia-Jung Y, Cheng-Tzu L. 2013. Chemical Composition and Hypoglycemic and Pancreas-Protective Effect of Leaf Essential Oil from Indigenous Cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum* Kanehira). *J. Agric. Food Chem.* 61; 4905–4913.
41. Ortiz-Avila O, Esquivel-Martínez M, Olmos-Orizaba B, Saavedra-Molina A, Rodríguez-Orozco A, Cortés-Rojo C. 2015. Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats. 2015; 1-7.
42. Naglaa Gamil S, Eman Abu-Gharbieh, Fatehia A. Bayoumi. 2015. Impact of phenolic composition on hepatoprotective and antioxidant effects of four desert medicinal plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 15:401.
43. Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2005. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. (Edición digital: INECOL 2010). 2: 674.
44. Torres-Martínez *et al.*, 2014. *Rev. Mex. Cien. For.* 5(21): 122-134.
45. Fundación CANNA: investigación científica & estudios científicos. Los terpenos. 15/12/2015. 8:00pm
<http://www.fundacion-canna.es/los-terpenos>
46. González-Burgos E, Gómez-Serranillos MP.2012. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity.

-
47. Gutierrez RM, Navarro YT. 2010. Antioxidant and hepatoprotective effects of the methanol extract of the leaves of *Satureja macrostema*. *Pharmacogn Mag.* 6(22): 125–131.
48. North JA, Spector AA, Buettner GR. 1992. Detection of lipid radicals by electron paramagnetic resonance spin trapping using intact cells enriched with polyunsaturated fatty acid. *J Biol Chem* 267(9):5743-5746.
49. Hallberg E. M., Shu Y., Hallberg R. L. 1993. Loss of mitochondrial HSP60 function: nonequivalent effects on matrix—targeted and intermembrane-targeted proteins. *Molecular and Cellular Biology.*13(5):3050–3057.
50. Cortés-Rojo C., Calderón-Cortés E., Clemente-Guerrero M., et al. 2009. Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 41(1):15–28.
51. Buege J. A., Aust S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology.* 1978; 52:302–310.
52. Ortiz Avila 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 grado: Maestría en ciencias en biología experimental. Morelia Michoacán.
53. Alberto Goday. 2002. Epidemiología de la diabetes y sus complicaciones no coronarias. *Rev Esp Cardiol.* 55(6):657-70.
54. Armando Arredondo, Esteban De Icaza. 2011. Costos de la Diabetes en América Latina: Evidencias del Caso Mexicano. *Value in Health.* 14; S85–S88.
55. Mathers C, Loncar D. 2006. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3(11):e442.
56. Konstantinos K, Amalia G, Faidon M, Jean-Marc L. 2011. Diabetes and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Experimental Diabetes Research.* 2012: 1-2.
57. Paschos P, Paletas K. 2009. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *HIPPOKRATIA.* 13, 1: 9-19.
58. Lupak MI, Khokhla MR, Hachkova GY, Kanyuka OP, Klymyshyn NI, Chajka YP, Skybitska MI, Sybirna NO. 2015. The alkaloid-free fraction from *Galega officinalis* extract prevents oxidative stress under experimental diabetes mellitus. *Ukr Biochem J.* 87(4):78-86.

-
59. Bajaj S, Khan A. 2012. Antioxidants and diabetes. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 16(2):S267-S271.
60. Cámara Navarro Y. 2005. Estudio funcional de la proteína desacopladora mitocondrial UCP3 en relación con la apoptosis y las especies reactivas de oxígeno. Tesis de grado: doctorado en biología. Barcelona.
61. Camps D, Ruffino S, Majul E, Joison A. Bioquímica del estrés oxidativo y de las especies reactivas de oxígeno. Cátedra de química III. Facultad de medicina. Universidad católica de Córdoba, Argentina. 3; 20.
62. Mitochondrial complex III deficiency. 2011. 05/01/2016 6:30pm.
<https://rarediseases.info.nih.gov/gard/8295/mitochondrial-complex-iii-deficiency/resources/1>