



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO - BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TESIS

**“CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO
PROTECTOR DEL ACEITE DE AGUACATE
CONTRA LA DISFUNCIONALIDAD DE LA
CADENA RESPIRATORIA DE MITOCONDRIAS
DE HÍGADO DE RATAS DIABÉTICAS”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

IBQ. MANJURY JATZIRY HERNÁNDEZ ESPARZA

ASESOR DE TESIS:

D. C. CHRISTIAN CORTÉS ROJO

MORELIA, MICHOACÁN

ABRIL, 2017

AGRADECIMIENTOS

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
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La diabetes.....	1
1.2. Complicaciones durante la DM	3
1.3. El daño hepático durante la diabetes	3
1.3.1. Enfermedad Hepática No Alcohólica	4
1.4. Cadena de transporte de electrones	5
1.5. Especies reactivas de oxígeno.....	9
1.6. Flujo reverso de electrones	11
1.7. Daño oxidativo de los complejos	12
1.7.1. Daño oxidativo en lípidos.....	12
1.7.2. Oxidación de grupos tioles	13
1.8. El aceite de aguacate.....	14
2. JUSTIFICACIÓN.....	17
3. HIPÓTESIS.....	18
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo General	¡Error! Marcador no definido.
4.2. Objetivos particulares.....	¡Error! Marcador no definido.
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1. Modelo Experimental.....	20
5.2. Diseño Experimental	20
5.3. Aislamiento de mitocondrias	20
5.4. Actividad de los complejos de la CTE	21
5.4.1. Actividad de la NADH deshidrogenasa (complejo I)	21
5.4.2. Actividad de la succinato deshidrogenasa (complejo II)	21
5.4.3. Actividad del succinato-citocromo c oxidorreductasa (complejo II - III)	22
5.4.4. Actividad citocromo c oxidasa (complejo IV)	22
5.5. Papel de la cardiolipina en la actividad del complejo I	23
5.5.1. Preparación de liposomas de cardiolipina	23
5.5.2. Fusión liposoma - mitocondrias	23
5.5.3. Actividad del complejo I con cardiolipina	23
5.5.4. Reducción de los grupos tioles del complejo I.....	23

5.6.	Producción de especies reactivas de oxígeno	24
5.6.1.	Producción de especies reactivas de oxígeno en el complejo I con cardiolipina y β -mercaptoetanol	25
5.7.	Análisis estadístico	25
6.	RESULTADOS	26
6.1.	Parámetros fisiológicos de los animales de experimentación.	26
6.2.	Actividad de los complejos de la CTE	29
6.3.	Efectos de la cardiolipina en la actividad del complejo I.....	31
6.4.	Reducción de los grupos tioles del complejo I	32
6.5.	Efectos de la cardiolipina y el β -Mercaptoetanol en la actividad del complejo I.....	33
6.6.	Efecto del aceite de aguacate sobre la velocidad de producción de especies reactivas de oxígeno	33
6.6.1.	Flujo de electrones hacia adelante a partir del complejo I	33
6.6.2.	Flujo reverso de electrones	34
6.6.3.	Formación de ERO en el segmento complejo II-III de la ETC	35
6.6.4.	Papel de la cardiolipina y el β -mercaptoetanol en la velocidad de generación de ERO a partir del complejo I	36
7.	Discusión	38
8.	Conclusión	46
9.	Bibliografía.....	47

RESUMEN

La diabetes es un problema global con grandes consecuencias socioeconómicas debido a sus complicaciones en diferentes órganos. Una de estas complicaciones es la enfermedad hepática no alcohólica (EHNA), la cual está relacionada con el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en las mitocondrias del hígado. El desarrollo de EHNA se ha relacionado con alteraciones a nivel mitocondrial tales como el daño oxidativo en los complejos de la CTE, que puede ser debido a alteraciones del estado redox de los grupos tioles de las cisteínas de los complejos o por alteraciones en la cardiolipina en la membrana interna mitocondrial. En mitocondrias de hígado de ratas diabéticas se ha encontrado que la actividad del complejo I de la cadena respiratoria disminuye y que esto provoca una producción excesiva de ERO y la peroxidación de lípidos de membrana. Estos efectos pueden ser atenuados por la administración de aceite de aguacate. Sin embargo se desconoce si la producción de ERO en el complejo I es por un flujo hacia adelante o reverso de electrones y si la disminución de su actividad está relacionada con alteraciones en sus sulfhidrilos libres o en el contenido de cardiolipina en la membrana interna mitocondrial. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la dirección del flujo de electrones en la producción de ERO y el papel de la cardiolipina y el estado redox de los tioles en la disminución de la actividad del complejo I de mitocondrias de hígado de ratas diabéticas. En la diabetes, la actividad del complejo I pudo ser restaurada por la adición de β -mercaptoetanol o cardiolipina, mientras que en mitocondrias de las ratas control y diabéticas tratadas con aceite de aguacate, la adición de β -mercaptoetanol o cardiolipina disminuyeron la actividad del complejo. Se observó un aumento en la formación de ERO las mitocondrias de ratas diabéticas usando como sustrato glutamato-malato pero no cuando se usó succinato y rotenona, un inhibidor del flujo reverso de electrones. La combinación de β -mercaptoetanol y cardiolipina disminuyó drásticamente la formación de ERO con glutamato malato. Estos resultados sugieren que durante la diabetes la actividad del complejo I disminuye probablemente debido a alteraciones en el estado redox de los tioles del complejo y en la cantidad de cardiolipina en la membrana interna mitocondrial, lo cual estimula la producción de ERO en flujo de electrones hacia

adelante, efectos que son contrarrestados en su totalidad por la administración de aceite de aguacate.

Palabras claves: hígado graso, disfunción mitocondrial, diabetes tipo 1, ERO, radicales libres.

ABSTRACT

Diabetes is a global health problem with a high socioeconomic impact because of its complications in different organs. One of these complications is non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), which is related with increased reactive oxygen species (ROS) in mitochondria. The development of NAFLD has been related to mitochondrial alterations such as oxidative damage in the complexes of the electron transport chain (ETC), which in turn can be attributed to alterations either in the redox state of the cysteine groups from the complexes or in the cardiolipin contained in the inner mitochondrial membrane. It has been found that diabetes decreases the activity of complex I of the ETC in liver mitochondria and this causes an excessive production of ROS and enhanced lipid peroxidation. This was attenuated by avocado oil supplementation. However, it is unknown whether ROS production at the complex I is caused by reverse or forward electron transfer and if its decreased activity is provoked by alterations either in the redox state of its sulfhydryl groups or in cardiolipin. Therefore, the goal of this work was to determinate the direction of electron flow during ROS production and role of cardiolipin and thiol redox state in the decrease of complex I activity in liver mitochondria from diabetic rats. Decreased complex I activity in the diabetic group decreased by alterations in both cardiolipin and the redox state of thiols. As well as the activity of the complex was restored by cardiolipin or β -mercaptoethanol, while in mitochondria from control and diabetic groups treated with avocado oil, these agents decreased the activity of the complex. It was observed ROS production augmented using glutamate-malate as substrates but not when it was used succinate plus rotenone. Rotenone is an inhibitor of reverse electron transfer. The combination of cardiolipin and β -mercaptoethanol decreased drastically ROS production with glutamate-malate. These results suggest that diabetes disease decreases the activity of the complex I by inducing alterations in both the redox state of thiols from the complex I and cardiolipin, which stimulates

ROS production in forward mode, being these abnormalities counteracted by avocado oil supplementation.

Keywords: fatty liver; free radicals; mitochondrial dysfunction; type I diabetes; ROS.

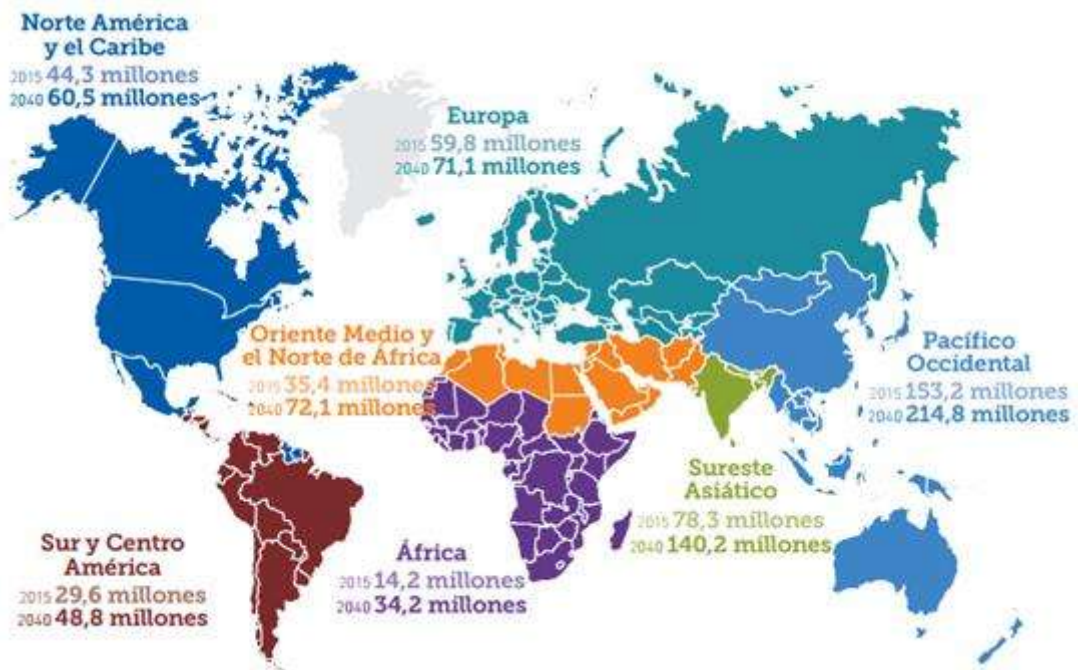
1. INTRODUCCIÓN

1.1. La diabetes

La diabetes es un trastorno metabólico, que se caracteriza por hiperglucemia crónica y trastornos del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas, como consecuencia de anomalías en la secreción o del efecto de la insulina (OMS, 2015). Hay dos tipos de diabetes; la diabetes tipo I es causada por una reacción autoinmune, en la que el sistema de defensas del organismo ataca las células productoras de insulina del páncreas. Como resultado, el organismo deja de producir la insulina que necesita; principalmente se presenta en niños y adultos jóvenes y los pacientes son considerados insulino-dependientes (OMS, 2015). Los síntomas comunes de la diabetes tipo I incluyen: debilidad, dificultad para respirar, pérdida de la visión, pérdida de peso, polidipsia, polifagia, poliuria. Estos síntomas pueden aparecer abruptamente (World Health Organization, 2015).

En la diabetes tipo II, a diferencia de la tipo I, los enfermos no son insulino-dependientes, ya que el organismo desarrolla resistencia a las acciones de la insulina, impidiendo el transporte de glucosa al músculo y tejido adiposo, por lo que la glucosa se acumula en la sangre (OMS, 2015). Las personas con diabetes tipo II pueden tener síntomas similares a los que presentan los enfermos de diabetes tipo I, pero menos evidentes. Frecuentemente, no presentan síntomas y son diagnosticados muchos años después de que comienza la enfermedad, por lo que casi la mitad de las personas diagnosticadas con diabetes tipo II no se dan cuenta de su condición (World Health Organization, 2015).

Dentro de las principales causas por las cuales se presenta la diabetes se encuentran el sedentarismo, la alimentación, la obesidad, la etnicidad, la edad, entre otras. Consecuente a estas causas, de acuerdo con datos estadísticos establecidos por la Federación Internacional de Diabetes, se estimó que en el mundo había más de 415 millones de personas con diabetes en el 2015 y que en América del Norte existen más de 44.3 millones de personas diagnosticadas como se muestra en el esquema 1 (FID, 2015).



Esquema 1.- Prevalencia de la diabetes a nivel mundial. Tomado y modificado de Federación Internacional de Diabetes (FID, 2015).

En nuestro país, en el año 2014, se presentaron más de 10 millones de personas diagnosticadas con diabetes, mientras que en el 2013, el *Consejo para la Prevención Contra Accidentes (CONAPRA)*, estableció que dentro de las 10 causas más frecuentes de mortalidad, la diabetes ocupa el primer lugar por encima de las enfermedades del corazón, así como las enfermedades cerebrovasculares, como se muestra en el gráfico 1. En México, la DM es la primera causa de muerte desde el año 2000. Aparentemente, la mortalidad en México es más alta en mujeres mayores de 55 años, aunque hay reportes de tasas superiores en el género masculino (Gutiérrez-Vázquez *et al.*, 2006).

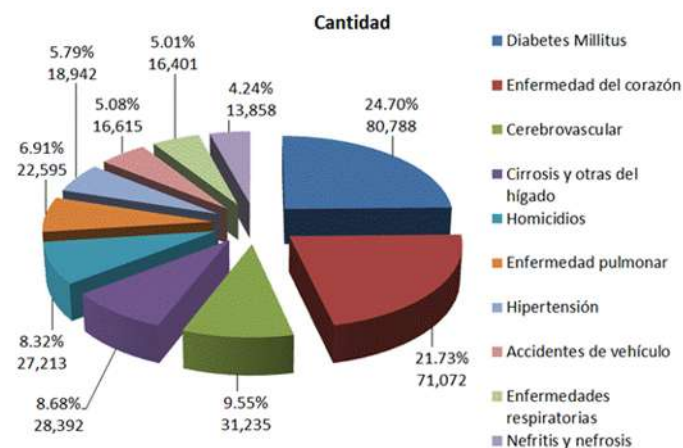


Gráfico 1.- Causas de mortalidad de mayor frecuencia en México. Consejo Nacional para la Prevención Contra Accidentes (CONAPRA, 2013). Tomado de conapra.salud.gob.mx.

En Michoacán, la diabetes es la primera causa de muerte y va en aumento cada año. En la actualidad, unas 108 mil personas padecen esta enfermedad y de esta cifra el 55% presenta diversas complicaciones (ENSANUT, 2016).

1.2. Complicaciones durante la DM

El incremento de los niveles de glucosa en la sangre (hiperglucemia), es el efecto común de la diabetes descontrolada, con el paso del tiempo la enfermedad puede causar daños, disfunción e insuficiencia de diversos órganos, las complicaciones de la diabetes son potencialmente devastadoras y a menudo son una amenaza para la vida. Las complicaciones diabéticas incluyen infecciones de la piel, la enfermedad coronaria, el daño cardíaco, la arteriosclerosis, la nefropatía, la retinopatía diabética, el pie diabético, la neuropatía diabética así como hígado graso (Giacco *et al.*, 2010; Raza *et al.*, 2011; FID, 2015).

1.3. El daño hepático durante la diabetes

El hígado es uno de los principales órganos que se afectan durante la diabetes, ya que se encarga de una amplia gama de funciones orgánicas, como por ejemplo: presenta un importante papel en la digestión, regula la

producción, almacenamiento y liberación de glucosa, triacilglicéridos y colesterol, entre otros (Franciscus *et al.*, 2008).

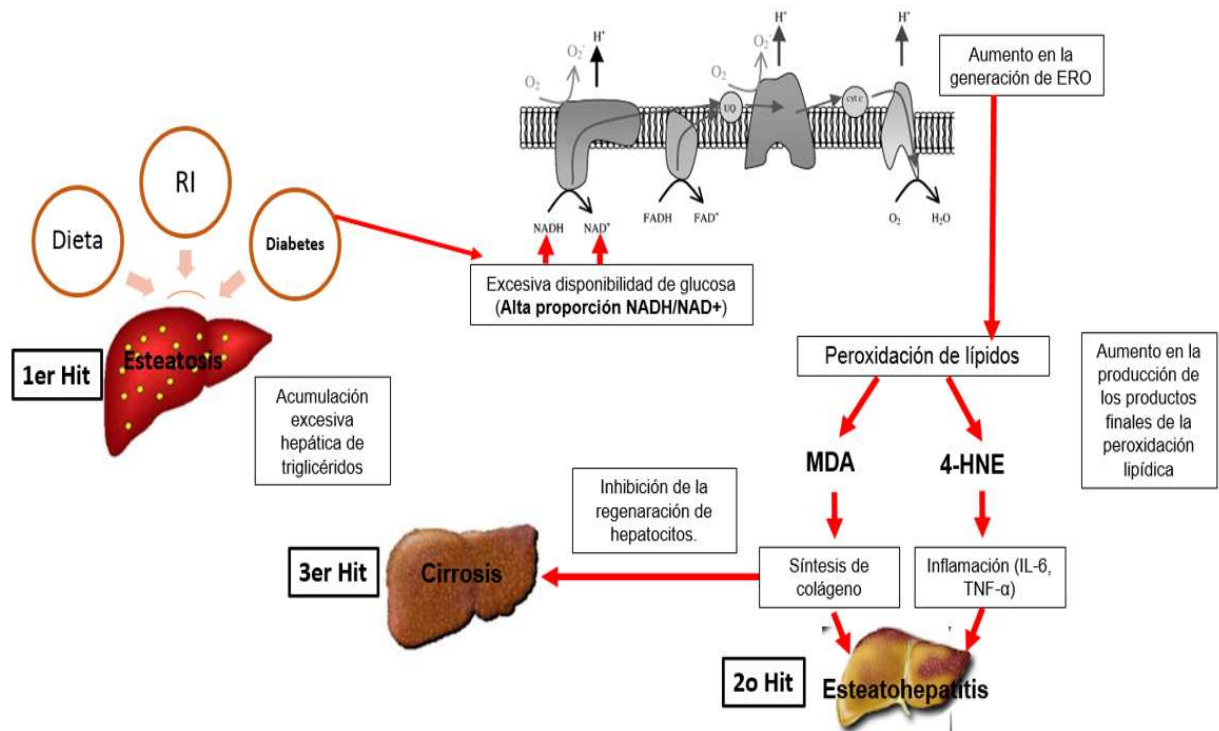
En condiciones de gluconeogénesis excesiva en el hígado, se contribuye a un constante estado de hiperglucemia en la diabetes. El incremento crónico de los niveles de glucosa tiene un impacto negativo en el hígado debido a que produce depósitos excesivos de glucógeno, así como esteatosis (Hao *et al.*, 2011), lo cual está relacionado con alteraciones en el metabolismo de lípidos (Almon *et al.*, 2009). Estas complicaciones están asociadas a un incremento en el estrés oxidativo debido al constante estado de hiperglucemia que se presenta durante la diabetes.

1.3.1. Enfermedad Hepática No Alcohólica

La enfermedad hepática no alcohólica (EHNA) comprende un conjunto de alteraciones que ocurren en el hígado ocasionadas por la desregulación del metabolismo de lípidos y carbohidratos. Estas alteraciones promueven el desarrollo de esteatosis, que se presenta cuando hay una acumulación excesiva de triglicéridos, la esteatohepatitis, que se manifiesta por inflamación del hígado, acumulación de ácidos grasos y fibrosis y la cirrosis, que ocurre cuando hay un aumento de fibrosis (Musso, 2011).

Los eventos que dan lugar a la progresión de la EHNA se han englobado en la “teoría de los hits”, la cual establece que la resistencia a la insulina o la diabetes ocasionan una acumulación hepática de triglicéridos, lo que ocasiona la inhibición de la lipólisis y un incremento en la lipogénesis de *novo*, dando lugar a la esteatosis (primer “hit”). La resistencia a la insulina en el hígado y en el tejido adiposo provoca una excesiva disponibilidad de glucosa, lo que origina una alta proporción en la relación NADH/NAD⁺ y un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Las ERO y la acumulación hepática de triacilglicéridos, favorecen la peroxidación de lípidos por lo que aumentan las concentraciones de productos finales de la peroxidación lipídica como el malondialdehído (MDA), el cual estimula la síntesis de colágeno y el 4-hidroxinonenal, que desencadena la inflamación activando la interleucina-6 y la vía TNF- α ; estos eventos provocan esteatohepatitis el cual es el segundo “hit”. Cuando se inhibe la regeneración

de los hepatocitos, se produce fibrosis, lo que da lugar a cirrosis, el tercer “hit” (Bulum *et al.*, 2011; Dowman *et al.*, 2015).



Esquema 2.- “Teoría de los Hits”. Esteatosis (1er hit), Esteatohepatitis (2º hit), Cirrosis (3er hit). Tomado y modificado de Dowman *et al.*, 2015.

1.4. Cadena de transporte de electrones

Durante la EHNA se produce un exceso de especies reactivas de oxígeno en la cadena de transporte de electrones, debido a la disfunción mitocondrial (Giacco *et al.*, 2010; Dowman *et al.*, 2015).

La mitocondria es la principal fuente productora de ATP en células eucariotas. La energía necesaria para la producción del ATP se genera por la cadena transportadora de electrones, la cual consta de cuatro complejos multiproteicos:

- **Complejo I (NADH deshidrogenasa).** Es una proteína en forma de L, es el más grande de los complejos al estar formado por 45 subunidades, de las cuales, 14 están involucradas en su catálisis, mientras que el resto, son consideradas subunidades accesorias. Contiene un flavin

mononucleótido (FMN) el cual está involucrado en la oxidación del NADH y 8 centros hierro-azufre (2 binucleares y 6 tetranucleares), los cuales transfieren los electrones hasta el sitio de unión a ubiquinona (Wirth *et al.*, 2016). El NADH es el donador de electrones, el FMN los acepta y se reduce a FMNH₂. Se transfieren los electrones desde el FMNH₂ a los centro Fe-S; posteriormente, los electrones se transfieren a la coenzima Q (ubiquinona) (Mckee *et al.*, 2003).

- **Complejo II (succinato deshidrogenasa).** Es la única enzima del ciclo de Krebs unida a la membrana interna mitocondrial. Pertenece a una familia de enzimas de membrana que cataliza la oxidación del succinato a fumarato y transfiere los electrones del FADH₂ hacia la ubiquinona (Pardo *et al.*, 2001).
- **Complejo III (ubiquinona: citocromo c oxidorreductasa).** Está constituido por dos citocromos de tipo *b*, un citocromo *c*₁ y un centro Fe-S. Se encarga de transferir dos electrones desde un quinol de relativamente bajo potencial redox a un citocromo *c* y bombea cuatro protones al lado electropositivo de la membrana por cada par de electrones transferidos a dos moléculas de citocromo *c*; esto ocurre debido a que la UQ es liposoluble, difunde dentro de la membrana interna entre los donadores de electrones de los complejos I o II y el aceptor del complejo III. La transferencia de los electrones comienza con la oxidación bifurcada de la UQH₂ por la proteína Fe-S del complejo III. Posteriormente, esta proteína reducida transfiere un electrón al citocromo *c*₁, el cual lo transfiere luego al citocromo *c*. El electrón restante se transfiere al citocromo *b* a través de sus grupos hemo *b* de alto y bajo potencial. Durante este proceso, se traslocan de manera neta 4 protones por cada par de electrones transferidos al citocromo *c* usando la energía de las reacciones redox que ocurren en el complejo.
- **Complejo IV (citocromo c oxidasa).** Posee entre seis y trece subunidades, dependiendo de la especie. Puede tener también dos átomos de cobre, además de los átomos de hierro de los hemos de los

citocromos a y a_3 . El átomo de hierro del cit a_3 está asociado a un átomo de cobre denominado CuB, mientras que el otro átomo de cobre, el CuA se encuentra cerca del cit a . Éste complejo transfiere los electrones desde el citocromo c hasta el último aceptor de los electrones, el oxígeno, que se reduce a agua. (Trumpower, 1990; Mckee, 2003).

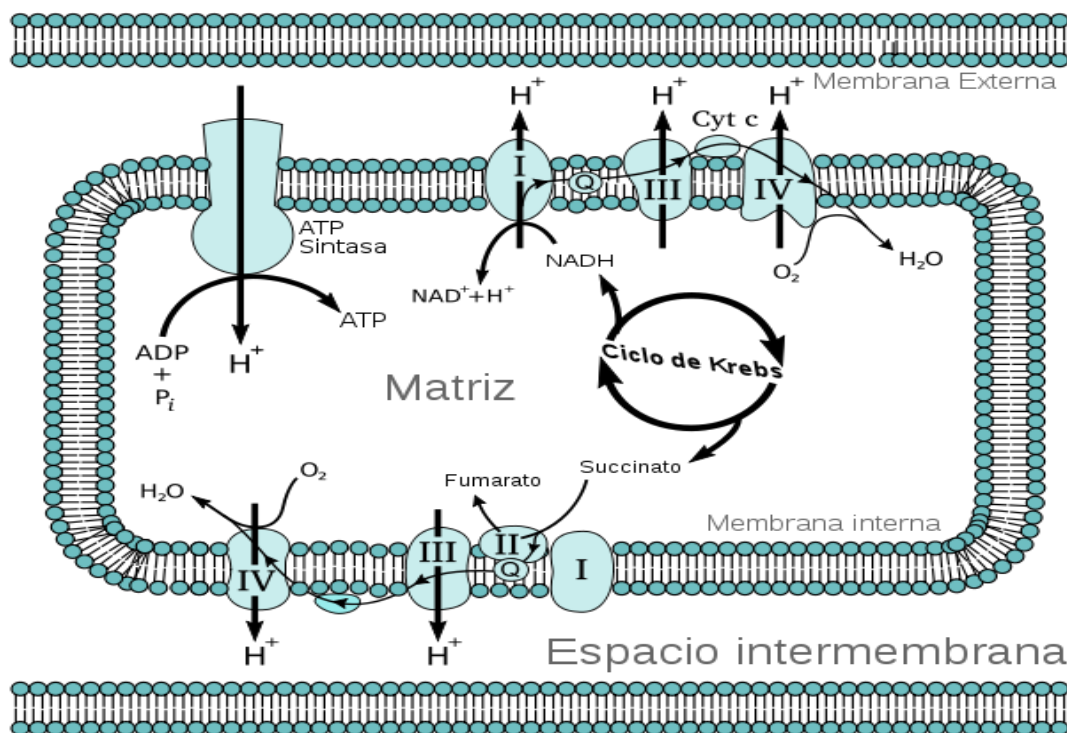
- **F₁F₀-ATP sintasa.** Está formada por dos componentes principales, que son proteínas multiméricas. El componente F₀ contiene tres tipos de proteínas integrales de membrana, designadas a , b y c . Las subunidades a y b están rígidamente concentradas entre sí, mientras que la subunidad c compone un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

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

- **Coenzima Q.** Es una molécula soluble en solventes orgánicos, se encuentra en la membrana interna mitocondrial y tiene la capacidad de oxidarse y reducirse (Jiménez, 2003). También es conocida como ubiquinona (UQ), la que se reduce de manera sucesiva a ubisemiquinona (UQH[•]) y finalmente a ubiquinol (UQH₂). Acepta un par de electrones del NADH o el FADH₂ a través del complejo I y II, respectivamente (Vasudevan, 2011).
- **Citocromos.** Los electrones se transfieren desde los equivalentes reductores NADH o FADH₂ hacía el aceptor final de electrones, el oxígeno, a través de los citocromos en el siguiente orden: b , c_1 , c , a y a_3 . Los diversos citocromos tienen grupos hemo y ligandos axiales ligeramente distintos, lo cual genera diferentes ambientes para el ion Fe, por ello, cada citocromo tiene un potencial de reducción diferente, o

tendencia a aceptar un electrón; una propiedad importante que dicta el flujo unidireccional de los electrones a lo largo de la cadena.

Los complejos I y II tienen la función de oxidar los equivalentes reductores provenientes del metabolismo; el NADH es oxidado en el complejo I, mientras que el FADH₂ en el complejo II. Los electrones provenientes de estas reacciones son transportados al complejo III por la ubiquinona que funciona como acarreador móvil de electrones. El ubiquinol formado es oxidado a ubiquinona por el complejo III, el cual transfiere un electrón al citocromo c. Este es oxidado por el complejo IV siendo el aceptor final de electrones el O₂, el cual se reduce para formar H₂O. Las reacciones redox en los complejos I, III y IV están acopladas a una translocación de protones de la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal dando lugar a un potencial electroquímico $\Delta\Psi$, el cual impulsa a la F₁F₀ATPasa para generar ATP a partir de ADP y Pi (Karp, 2005).



Esquema 3.- Complejos de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa. Complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo II (Succinato deshidrogenasa), Complejo III (Citocromo c oxidorreductasa) y Complejo IV (Citocromo c oxidasa). Tomado y modificado de wikibooks.org (2014).

En la cadena de transporte de electrones la respiración mitocondrial se presenta cuando 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 control respiratorio (velocidad en estado 3/estado 4). El mismo es función del grado de acoplamiento mitocondrial y es un indicador de la integridad mitocondrial. Las condiciones a las cuales se presentan los estados correspondientes a la respiración mitocondrial se muestran en la tabla I.

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	Oxígeno

Tabla 1.- Estados de respiración mitocondrial. Propiedades de los estados de respiración mitocondrial. Tomado y modificado de Hroudová *et. al.*, (2014).

1.5. Especies reactivas de oxígeno

Durante el proceso de la producción de ATP en la cadena transportadora de electrones, se producen especies reactivas de oxígeno 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). La generación de ERO se favorece por un aumento en la relación NADH/NAD⁺, por la disminución en la actividad de uno de los complejos respiratorios debido a algún daño en alguna de sus subunidades, por la peroxidación de lípidos de membrana, o también por la pérdida de grupos hemo o los centros Fe-S. Los componentes del potencial electroquímico, el ΔpH y el $\Delta \Psi$ son de vital importancia para el buen funcionamiento mitocondrial ya que pueden modular la generación de ERO.

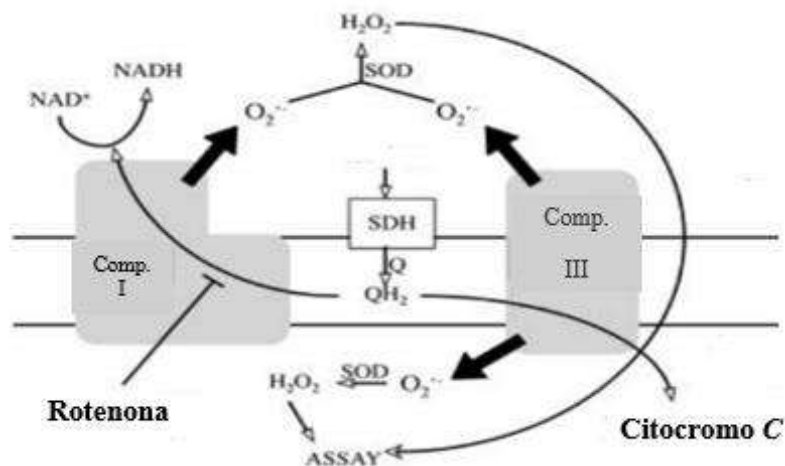
La diabetes es una enfermedad que se caracteriza por un aumento en la generación de ERO, lo cual comienza en etapas muy tempranas de la enfermedad y aumenta mientras progresa (Wiernsperger, 2009). Las complicaciones de esta enfermedad están asociadas a un incremento en el estrés oxidativo debido al constante estado de hiperglucemia. En mitocondrias de hígado de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ) se ha encontrado una disminución en la actividad de la CTE y una alta producción de ERO (Ortiz-Ávila *et al.*, 2015).

Durante la diabetes, la sobreproducción mitocondrial de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), se ha relacionado con la disminución de los sistemas antioxidantes al activar distintas vías que están relacionadas con el aumento del estrés oxidativo (Rolo *et al.*, 2006). Estos mecanismos descritos a continuación convergen en la sobreproducción mitocondrial de $O_2^{\cdot-}$, haciendo que la hiperglucemia estimule un incremento del potencial transmembranal mitocondrial, con bloqueo del transporte de electrones, aumento de la vida media de la ubisemiquinona y reducción parcial del O_2 (Sánchez *et al.*, 2009). Dentro de estos mecanismos a través de los cuales la hiperglucemia puede inducir disfunción, se encuentra el aumento de la formación de sorbitol, seguido de una reducción de la disposición de NADPH afectando la regeneración de glutatión reducido (GSH), por lo que se incrementa la actividad de la vía de los polioles. Por otro lado, en condiciones de hiperglucemia existe una alta producción de productos finales de glicosilación avanzada (AGE), estos causan gran deterioro ya que modifican proteínas intracelulares, proteínas que son componentes de la matriz extracelular y proteínas plasmáticas, lo que promueve la producción de ERO. Además, promueven la inflamación con expresión de citocinas y factores de crecimiento (IL-1, IGF-1, TNF- α , TGF- β) cuando existe una interacción de los AGE con sus receptores. Por otro lado, la acumulación intracelular excesiva de glucosa aumenta la actividad de la vía de las hexosaminas, causando un aumento de UDP-N-acetilglucosamina, que modifica al factor de transcripción Sp-1, con aumento de TGF- α , TGF- β 1 y PAI-1. Por último, la alta concentración de glucosa provoca una elevación en las concentraciones celulares de diacilglicerol (DAG), que es un activador de la PKC. Esta activación reduce la expresión de óxido nítrico sintasa endotelial,

aumenta la expresión de factores de crecimiento, activa a NFκB y a varias NADPH oxidasas y estimula la actividad de MAP-cinasa (González, 2009).

1.6. Flujo reverso de electrones

Las ERO se producen como se mencionó con anterioridad, por algún daño en alguno de los componentes de la CTE, pero también se pueden producir mediante el flujo reverso de electrones. Este proceso se presenta cuando la relación NADH/NAD⁺ es alta, cuando el Δp de la membrana interna mitocondrial es alto y cuando hay succinato disponible para su oxidación en el complejo II y la formación de ubiquinol (Pryde y Hirst, 2011). El aumento en la relación NADH/NAD⁺ ocasiona un cambio en el potencial redox en el par NADH⁺/NAD, que disminuye la oxidación del NADH en el FMN y favorece la reducción parcial del O₂ en O₂^{•-}. Así, el exceso de succinato estimula la reducción de la coenzima Q por el complejo II, la cual a su vez es oxidada por el complejo I y los electrones son transportados hacia el O₂ vía el FMN para la formación del radical superóxido O₂^{•-}. El potencial de membrana alto provee la energía para que los electrones se transfieran de manera reversa en contra del gradiente de potencial redox de los componentes de la CTE (Hulbert *et al.*, 2007).



Esquema 4.- Flujo reverso de electrones cuando se presenta la oxidación del succinato por la succinato deshidrogenasa (SDH). La alta fuerza protonmotriz y el ubiquinol (QH₂) altamente reducido, provocan que los electrones sean empujados termodinámicamente cuesta arriba en el complejo I (transporte de electrones reverso) reduciendo NAD⁺ a NADH, ocasionando que el O₂ actúe

como aceptor de electrones, dando lugar al radical superoxido ($O_2^{\cdot-}$). Tomado y modificado de Hulbert *et al.*, 2007.

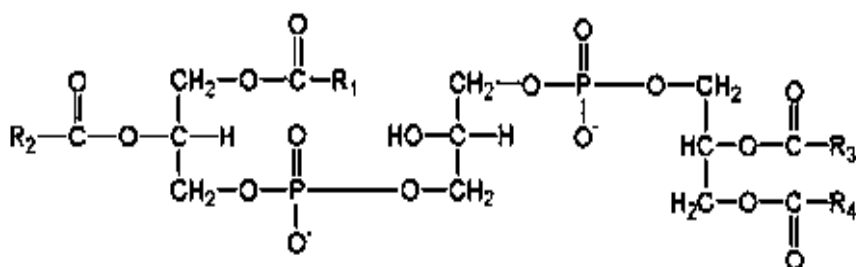
1.7. Daño oxidativo de los complejos

La generación de ERO favorece la disfunción de la mitocondria en la cadena transportadora de electrones, ocasionando diversos daños como los que se describen a continuación:

1.7.1. Daño oxidativo en lípidos

Se ha demostrado que las ERO son las causantes de la disfunción de la mitocondria, ya que causan la peroxidación de los lípidos que conforman la membrana mitocondrial. Uno de los lípidos blanco es la cardiolipina, un fosfolípido dimérico estructuralmente único, situado en la membrana mitocondrial interna donde es necesario para la función mitocondrial óptima; es rico en ácidos grasos insaturados, casi un 90% de su conformación por el ácido linoleico, por lo que debido a lo anterior y a su ubicación en la membrana mitocondrial interna, es un blanco de ataque de las ERO. En el complejo I, se ha evidenciado que la cardiolipina es indispensable para la transferencia de electrones y la disminución de su concentración en la membrana provoca que este complejo produzca $O_2^{\cdot-}$ (Hoch, 1992; Schlame *et al.*, 2000).

En ratas con isquemia/reperfusión cardíaca o con esteatosis hepática, se ha observado una disminución de la actividad del complejo I, debido a la pérdida y peroxidación de la cardiolipina (Paradies *et al.*, 2014; Petrosillo *et al.*, 2007).

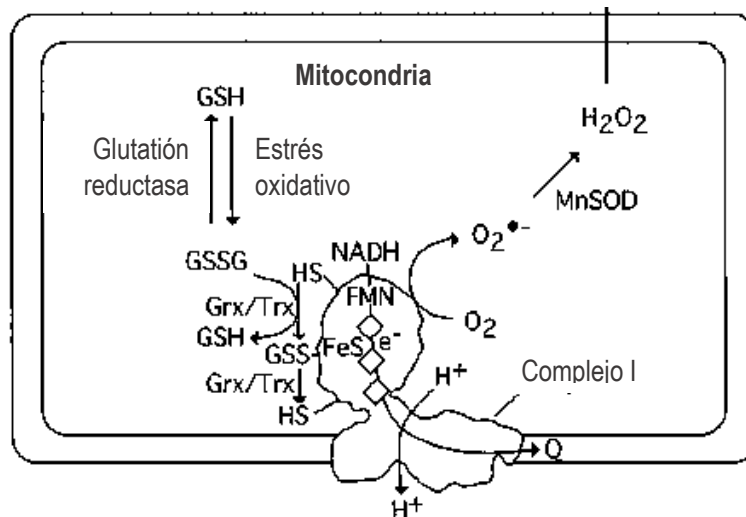


Esquema 5.- Estructura de la cardiolipina. Dos moléculas de fosfatidilglicerol se enlazan con un glicerol central. La forma dimérica se enlaza con cuatro cadenas de ácidos grasos. Generalmente, estos grupos acilo corresponden a cadenas lipídicas de 18 carbonos con 2 enlaces insaturados en cada una de ellas. Tomado de Bioquímica de T. M. Devlin.

1.7.2. Oxidación de grupos tioles

La oxidación de grupos tioles es un importante mecanismo de regulación redox en la mitocondria, ya que estas reacciones activan o desactivan proteínas en los complejos respiratorios. La formación regulada de disulfuros entre los tioles proteicos y el disulfuro de glutatión en respuesta a cambios redox del entorno actúa como un interruptor reversible de la misma manera que la fosforilación de proteínas (Schafer *et al.*, 2002).

En el proceso de la oxidación de tioles, puede suceder la formación de puentes disulfuro entre los tioles de cisteínas cercanas dentro de una proteína (Taylor *et al.*, 2003). Otra reacción sucede cuando disminuye la proporción de glutatión (GSH) a disulfuro de glutatión (GSSG) debido a un incremento en la generación de ERO, lo que provoca que los tioles de cisteínas libres de proteínas reaccionen con el GSSG, modificando así su actividad (Cassagrande *et al.*, 2002). Dentro de las mitocondrias, el $O_2^{\cdot-}$ se convierte en H_2O_2 , mediante la catalasa y después es reducido a expensas de GSH. Esto incrementa la concentración de GSSG y la posibilidad de que esta última especie reaccione con tioles de cisteínas libres de proteínas. Este mecanismo, denominado glutationilación de proteínas, contribuye a la respuesta mitocondrial a los cambios redox del entorno (Esquema 6) (Taylor, 2003). Por ejemplo, este mecanismo modula la actividad del complejo I durante el estrés oxidativo al glutationalizarse dos de sus cisteínas libres. No obstante que este proceso disminuye su actividad, se cree que es un mecanismo para evitar la inactivación irreversible del complejo ya que impide la oxidación de los grupos $-SH$ a formas altamente oxidadas como el ácido sulfínico, mientras que la glutationilación puede ser revertida por la glutarredoxina 2 o la tiorredoxina 2 a expensas de GSH (Taylor *et al.*, 2003).



Esquema 6.- Modelo de interacción del glutatión con el complejo I cuando aumenta la producción de superóxido mitocondrial. La transferencia de electrones a través del complejo I a partir de NADH a través de FMN y centros Fe-S a ubiquinona (Q) en la membrana mitocondrial interna. El estrés oxidativo desplaza el equilibrio del sistema glutatión reducido (GSH) al incrementar la cantidad de glutatión disulfuro (GSSG). El GSSG puede formar disulfuros mixtos (GSS/alfa) con tioles (HS/beta) que conducen a un aumento de la formación del radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este aumento en la formación de superóxido se revierte al romper el disulfuro mixto por la glutaredoxina (Grx) o tiorredoxina (Trx). Tomado y modificado de Taylor *et al.*, 2003.

1.8. El aceite de aguacate

El aguacate es el fruto del árbol *Persea americana*. El aguacate tuvo su origen en la parte central de México y Guatemala aproximadamente en los años 8,000-7,000 a.C. México es el principal productor de aguacate a nivel mundial, produciendo 1.2 millones de toneladas al año del cultivar Hass (Ortíz-Ávila *et al.* 2017). En cuanto al aporte nutricional, una porción de 100g de aguacate contiene 23g de lípidos mayormente ácidos grasos monoinsaturados, 2g de proteína, 1g de carbohidratos y no contiene colesterol (Morillas-Ruiz *et al.*, 2012).

Para la producción del aceite, el aguacate es cosechado y seleccionado, una vez el fruto sin piel y sin semilla recibe un tratamiento de maceración en frío, por lo que la pulpa recibe los procesos de decantación, centrifugado y filtrado para obtener un aceite de alta pureza que conserva todas las

propiedades del aguacate, éste tiene un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados y saturados, entre los que destaca el ácido oleico en mayor cantidad en su composición (Gráfico 1), éste contiene grandes beneficios para la salud ya que aumenta las HDL en sangre y disminuye las LDL, por lo que ejerce una acción beneficiosa sobre el sistema vascular y el corazón, reduciendo así, el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, además tiene efectos beneficiosos sobre la salud hepática y previene la formación de cálculos biliares (dos Santos *et al.* 2012). Por otro lado, es resistente al daño por peroxidación lipídica y por esta razón se le ha atribuido otros efectos benéficos como la mejora del índice aterogénico en pacientes con colesterol normal, con hiperlipidemia, con hipertrigliceridemia y con diabetes mellitus tipo 2 (Alvizouri *et al.*, 2009).

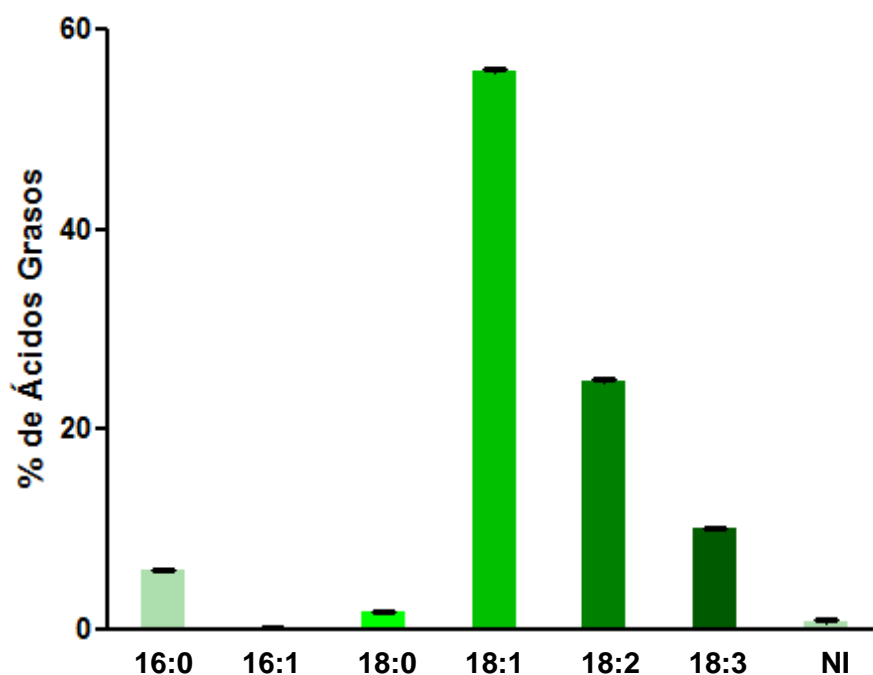


Gráfico 1.- Composición de ácidos grasos contenidos en el aceite de aguacate. Ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido linoleico (18:2), ácido linolénico (18:3), NI: no identificados. (Ashton *et al.*, 2006; Ortiz-Ávila *et al.*, 2017; Morales-Solorio, 2015, Tesis de Licenciatura).

Dentro de la composición del aceite de aguacate, se ha reportado que posee una amplia variedad de compuestos bioactivos tales como la luteína, el β -sitosterol los α y β -carotenos, la anteraxantina, la neoxantina, la zeaxantina, la violaxantina y la β -criptoxantina, así como 18 tocoferoles (alfa y gamma) y

las clorofilas a y b. El más abundante de estas moléculas antioxidantes es la luteína (Ashton *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que el aceite de aguacate tiene efectos benéficos en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas. La diabetes disminuye la actividad del complejo I de la CTE, aumenta al doble la producción de ERO y la peroxidación de lípidos y disminuye el cociente GSH/GSSG debido a un aumento en el GSSG y disminución del GSH. Además, la diabetes aumentó los niveles de triglicéridos y colesterol en sangre. Todas estas alteraciones fueron normalizadas por la administración del aceite de aguacate en la dieta (Ortíz-Ávila *et al.*, 2015). No obstante lo anterior, se desconoce si los efectos del aceite en el complejo I fueron debidos a una disminución en las alteraciones inducidas por la diabetes posiblemente en la cardiolipina o el estado redox de los tioles, ni si la diabetes induce un aumento en la producción de ERO el flujo hacia adelante o el flujo reverso de electrones.

2. JUSTIFICACIÓN

- La diabetes es un factor que desencadena la EHNA y no existen tratamientos farmacológicos contra esta complicación.
- La disfunción mitocondrial y la producción de ERO tienen un papel central en el desarrollo de la EHNA.
- El aceite de aguacate disminuye la actividad del complejo I, la producción de ERO y la peroxidación de lípidos, los cuales son eventos importantes en la teoría de los hits que explican cómo se desarrolla la EHNA.
- Sin embargo, no se conoce la naturaleza del daño oxidativo producido sobre la CTE ni el blanco mediante el cual el aceite de aguacate disminuye dicho daño ni la producción de ERO en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas

3. HIPÓTESIS

El aceite de aguacate disminuye la producción de ERO en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas al disminuir las alteraciones en la cardiolipina y el estado redox de los grupos tioles del complejo I.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Analizar la relación entre la actividad del complejo I, la producción de ERO y las alteraciones en el estado redox de los tioles y en la cardiolipina, en el efecto del aceite de aguacate en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.

4.2. Objetivos particulares

1. Determinar el papel de la cardiolipina y el estado redox de los grupos tioles de los complejos en la disminución de su actividad en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.
2. Determinar el sentido del flujo de electrones involucrado en la formación de ERO en mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.
3. Determinar el papel de la cardiolipina y el estado redox de los grupos tioles de los complejos en la producción de ERO de la CTE.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Modelo Experimental

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

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

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

5.2. Diseño Experimental

Las ratas fueron divididas en cuatro grupos de 9 ratas cada uno; Grupo 1: control, Grupo 2: diabético, Grupo 3: control + aceite de aguacate y Grupo 4: diabético + aceite de aguacate. Los grupos 3 y 4 recibieron una dosis de 1 mL/250 mg de peso de aceite de aguacate marca Ahuacatlán (Diricom, S.A de C.V.) (Ortíz-Ávila, 2015). La administración se realizó vía oral durante un periodo de 90 días, los grupos 1 y 2 recibieron únicamente agua. Durante el periodo de la administración cada quince días se pesaron los animales y se realizó la medición de los niveles de glucosa en sangre utilizando un glucómetro ACCU-CHEK® para todos los grupos. Después de 90 días de tratamiento las ratas fueron sacrificadas por decapitación.

5.3. Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias de hígado se aislaron mediante centrifugación diferencial con el método modificado por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Para obtener las mitocondrias, el hígado fue triturado y lavado con medio 1

(220 mM manitol, 70 mM sacarosa, 2 mM MOPS y 1 mM EGTA, a pH 7.4). Los fragmentos fueron homogeneizados y centrifugados a 2000 rpm y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 7500 rpm y la pastilla resultante fue lavada con medio 2 (220 mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM MOPS, a pH 7.4) y centrifugada a 9000 rpm. Finalmente, la pastilla se re-suspendió 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.

5.4. Actividad de los complejos de la CTE

Las actividades de los complejos de la CTE (II, III y IV) fueron determinadas en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV/VIS a temperatura ambiente utilizando sustratos e inhibidores específicos para cada complejo y mitocondrias solubilizadas con Tritón 10% en un buffer hipotónico; la determinación de la actividad del complejo I fue llevada a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2550 a temperatura ambiente, las mitocondrias no fueron solubilizadas.

5.4.1. Actividad de la NADH deshidrogenasa (complejo I)

Se utilizaron 0.1 mg de proteína mitocondrial/mL en un volumen de 2 mL de buffer de fosfato (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6), se incubaron durante cinco minutos con 1mM de KCN y 1µg de antimicina A. Al finalizar la incubación se agregaron 5mM de ferrocianuro de potasio el cual actúa como aceptor de electrones y se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 340nm, transcurrido un minuto se adicionó 1mM de NADH y se continuó el registro. La actividad se calculó de la pendiente obtenida después de la adición del NADH, UTILIZANDO mediante el coeficiente de extinción molar para el NADH de $6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hallberg et al., 1993)).

5.4.2. Actividad de la succinato deshidrogenasa (complejo II)

Se utilizaron 0.3 mg de proteína mitocondrial/mL en un volumen de 1mL de buffer de fosfato (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6), se incubaron durante cinco minutos con 1mM de rotenona, 1µg de antimicina A y 1mM de KCN. Al término de la incubación se agregaron 80µM de 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 continuó el trazo para medir la reducción del DCIP el cual actúa como un aceptor artificial de electrones durante cuatro minutos más. La actividad se calculó restando la pendiente obtenida previo a la adición del succinato a la pendiente obtenida después de la adición de este sustrato, utilizando el coeficiente de extinción molar del DCIP de $1.85 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hallberg et. al., 1993).

5.4.3. Actividad del succinato-citocromo c oxidorreductasa (complejo II - III)

Se utilizaron 0.1 mg de proteína mitocondrial/mL 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 continuó el trazo durante dos minutos más, durante los cuales se midió la reducción del citocromo c. La reacción se detuvo al agregar $1\mu\text{g}$ de antimicina A la cual es un inhibidor del complejo III. La reducción del citocromo c sensible a antimicina se calculó restando la pendiente del trazo en presencia de succinato a la pendiente obtenida en presencia de succinato + antimicina A. usando el coeficiente de extinción molar de citocromo c de $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Hallberg et. al., 1993).

5.4.4. Actividad citocromo c oxidasa (complejo IV)

Se utilizaron 0.1 mg de proteína mitocondrial/mL 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 $1\mu\text{g}$ de antimicina A. Al término de la incubación, se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm, transcurrido un minuto se agregó 1.5mg de citocromo c reducido con unos granos de ditionita de sodio y se continuó el trazo durante 25 segundos durante los cuales se midió la oxidación del citocromo c. La reacción se detuvo al agregar 1mM de KCN el cual es un inhibidor del complejo IV. reducción del citocromo c sensible a antimicina. La actividad se calculó restando la pendiente del trazo en presencia de citocromo c reducido a la pendiente obtenida en

presencia de KCN. Usando el coeficiente de extinción molar de citocromo c de $19.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Hallberg et. al., 1993).

5.5. Papel de la cardiolipina en la actividad del complejo I

5.5.1. Preparación de liposomas de cardiolipina

Se utilizaron 1.7 mg de cardiolipina en 1 mL de de buffer 25 mmol/L de fosfato monobásico (pH 6,7) y se llevó a sonicación bajo corriente de N_2 en un sonificador Branson (modelo 250) durante seis ciclos de 2.5 minutos a 40 W. (Paradies et. al., 2014).

5.5.2. Fusión liposoma - mitocondrias

Se adicionó 1 mL de liposomas recién sonicados en buffer de fosfato a pH 6.7 a 1 mg de mitocondrias a 30°C con agitación constante durante 40 minutos, posteriormente las mitocondrias ricas en fosfolípidos se centrifugaron a 10,700 rpm durante 20 minutos para eliminar el excedente de fosfolípidos y se procedió a un lavado con buffer de fosfato (pH 6.7). Se llevó a cabo una segunda centrifugación durante 10 minutos y el sedimento mitocondrial se lavó y se resuspendió en un medio de 250 mmol/L de sacarosa y 10 mmol/L de Tris (pH 7.4) (Paradies et al., 2014).

5.5.3. Actividad del complejo I con cardiolipina

Se llevó a cabo la determinación de la actividad del complejo I con mitocondrias enriquecidas con cardiolipina utilizando 0.1 mg/mL de proteína mitocondrial en un volumen de 2 mL de buffer de fosfato (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6) El resto del procedimiento se realizó como se describió anteriormente.

5.5.4. Reducción de los grupos tioles del complejo I

Para llevar a cabo ésta metodología se utilizó el reductor de grupos tioles β -mercaptoetanol a concentraciones de $25\mu\text{M}$ y $50\mu\text{M}$ para determinar la

actividad del complejo I. Se utilizó 0.1 mg/mL de mitocondrias en un volumen final de 2 mL con buffer de fosfato (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6), se incubaron durante 15 minutos con el reductor de grupos tioles (Cortés-Rojo, *et. al.*, 2007). Posterior a esto, la determinación de la actividad del complejo I se realizó como se describió anteriormente.

5.6. Producción de especies reactivas de oxígeno

Esta determinación se realizó evaluando la oxidación por las ERO de la sonda fluorescente 2´7´-diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCDHF-DA), la lectura de la fluorescencia se realizó a una λ de excitación de 491 nm y una λ de emisión a 518 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301. Se utilizó 0.5 mg/mL de suspensión de mitocondrias aisladas y 5 μ L de DCDHF-DA (500 mM) para obtener un volumen final de 2mL, aforando con medio 2 de aislamiento de mitocondrias y se llevó a agitación durante 20 minutos en un baño de hielo. Para determinar las ERO en tiempo real se llevó a cabo la siguiente metodología:

- **Producción de especies reactivas de oxígeno a partir del complejo I:** Una vez incubada la muestra, se inició la lectura de la fluorescencia y después de 1 min se añadió una concentración de 10 mM de glutamato/malato como sustrato del complejo I y se midió el incremento de la fluorescencia durante 19 minutos. La velocidad de generación de ERO se expresó como el cambio de unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.F.) por min^{-1} por mg proteína⁻¹.
- **Producción de especies reactivas de oxígeno en flujo reverso:** Al finalizar los 15 minutos de incubación, se comenzó la lectura de la fluorescencia y después de 1min se añadió una concentración de 10 mM de succinato, se midió el incremento de la fluorescencia por 19 minutos. La velocidad de generación de ERO se expresó como el cambio de unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.F.) por min^{-1} por mg proteína⁻¹.
- **Producción de especies reactivas de oxígeno del complejo II-III:** La incubación se llevó a cabo adicionando 2mM de rotenona durante 15

minutos, una vez finalizada se inició la lectura de la fluorescencia y después de 1min se añadió una concentración de 10 mM de succinato, se midió el incremento de la fluorescencia por 19 minutos. La velocidad de generación de ERO se expresó como el cambio de unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.F.) por min^{-1} por mg proteína $^{-1}$.

5.6.1. Producción de especies reactivas de oxígeno en el complejo I con cardiolipina y β -mercaptoetanol

Se llevó a cabo la preparación y fusión de los liposomas con las mitocondrias como se describió anteriormente, se utilizó 0.1 mg/mL de mitocondrias enriquecidas con cardiolipina y 5 μ L de DCDHF-DA (500 mM) para obtener un volumen final de 2mL aforando con medio 2 de aislamiento de mitocondrias. Posteriormente, se incubó en un baño de hielo con agitación constante durante 20 minutos, al minuto 5 se adicionó β -mercaptoetanol (30mM). Una vez terminada la incubación, se inició la lectura de la fluorescencia, ésta se realizó a una λ de excitación de 491 nm y una λ de emisión a 518 nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301, después de 1min se añadió una concentración de 10 mM de glutamato/malato y se midió el incremento de la fluorescencia durante 19 minutos. La velocidad de generación de ERO se expresó como el cambio de unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.F.) por min^{-1} por mg proteína $^{-1}$.

5.7. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de al menos 6 experimentos independientes. La significancia estadística de las diferencias entre las medias ($P < 0.05$) se determinó mediante la prueba de ANOVA de dos vías, usando el test de Bonferroni como prueba *post hoc*, con el programa estadístico Sigma Plot versión 11.

6. RESULTADOS

6.1. Parámetros fisiológicos de los animales de experimentación.

Se midieron los niveles de glucosa en sangre durante los 90 días de tratamiento y se observó en el grupo diabético que la glucosa oscilaba entre los 350 y 400 mg/dL durante el tratamiento, mientras que en los últimos 30 días se observa que la glucosa se estabilizó aproximadamente a 350 mg/dL. Por otro lado, el consumo de aceite de aguacate produjo un ligero incremento de glucosa en sangre en los últimos 15 días por arriba de los 400 mg/dL. En relación con el efecto del aceite de aguacate tampoco se observó alguna disminución sobre los niveles de glucosa en las ratas control que consumieron el aceite de aguacate (Fig. 1).

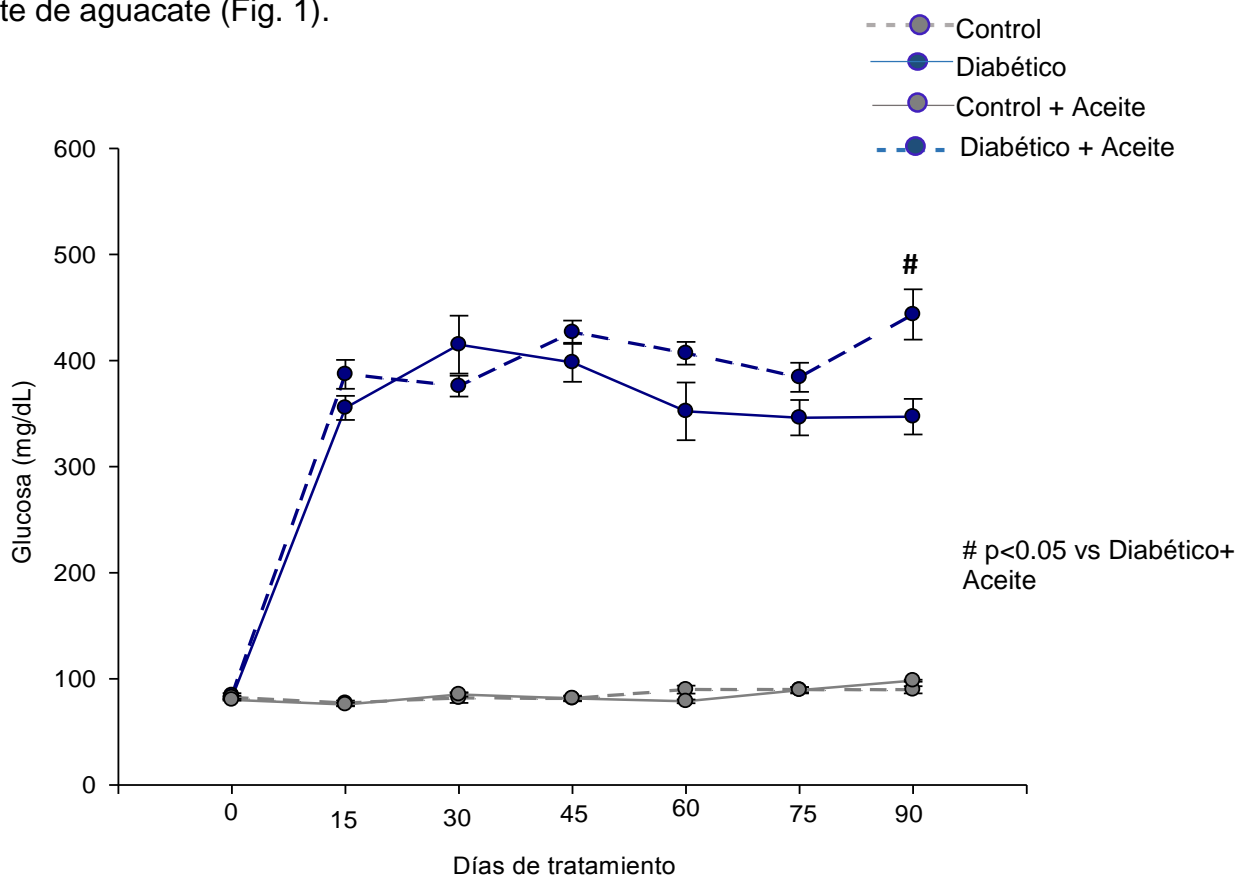


Figura 1.- Niveles de glucosa durante los 90 días de tratamiento. Se realizó la medición de glucosa cada 15 días. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de $n=8$ (ANOVA y test post hoc de Bonferroni, $P < 0.05$).

Con relación a la masa corporal de las ratas, en el grupo control hubo un incremento de peso conforme transcurrieron los días de tratamiento. En

contraste, el consumo del aceite de aguacate estabilizó el peso de las ratas a partir de los 30 días de su administración, observándose una diferencia de peso de aprox. 50 g entre los grupos Control y Control + aceite de aguacate al final del tratamiento. Respecto a las ratas diabéticas, se observó una pérdida gradual de peso conforme avanzó el estudio, observándose una disminución de alrededor de 80g al final del tratamiento. Este efecto fue disminuido por el tratamiento con el aceite de aguacate (Fig. 2).

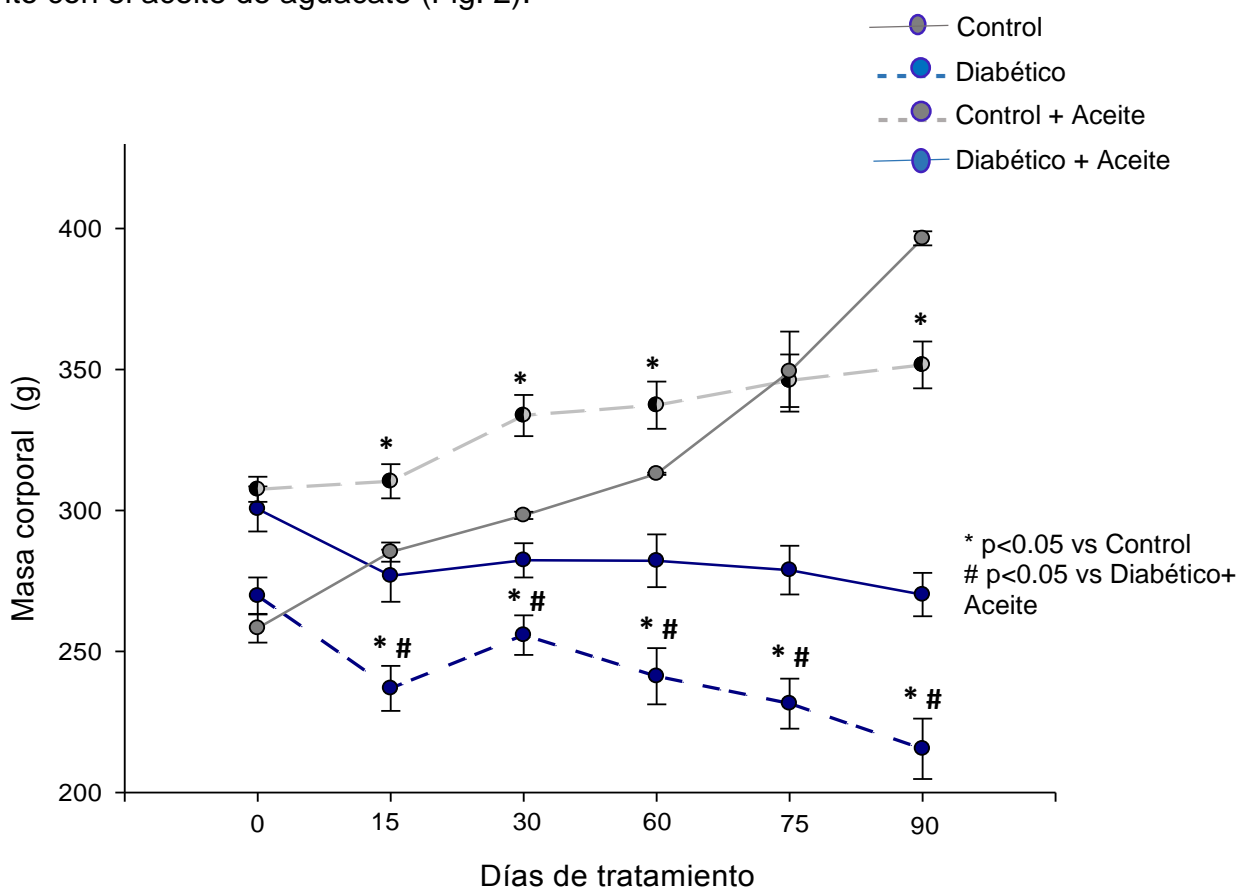


Figura 2.- Masa corporal durante los 90 días de tratamiento. Se realizó la medición de peso cada 15 días. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de $n=8$ (ANOVA y test post hoc de Bonferroni, $P<0.05$).

En cuanto al efecto del aceite de aguacate sobre la masa del hígado (Fig. 3) no se observó algún cambio significativo. Sin embargo, cabe resaltar que aunque el aceite de aguacate era un consumo extra de grasa, esto no produjo un incremento del peso del hígado en los animales control ni en los animales diabéticos.

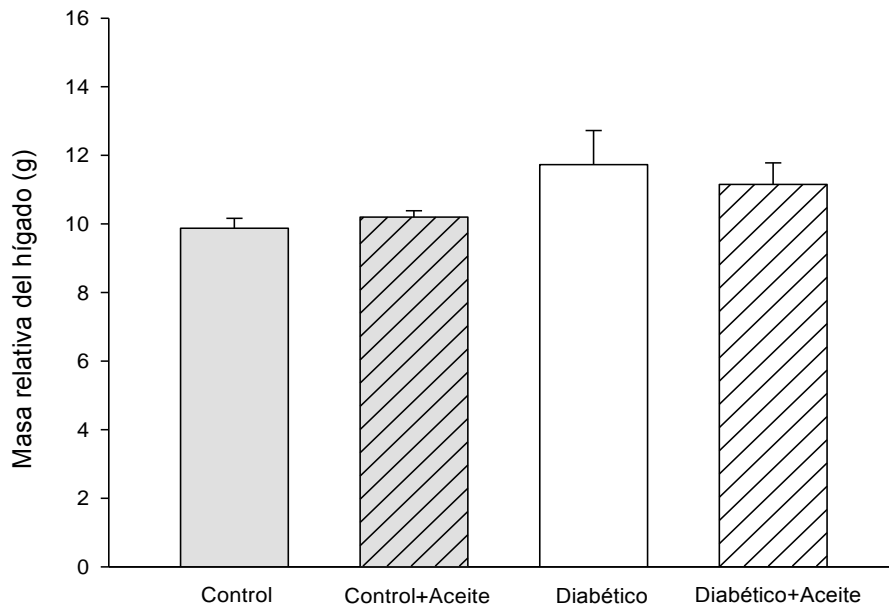


Figura 3.- Efecto del aceite de aguacate sobre la masa del hígado, el órgano se pesó al final de los 90 días, después del sacrificio. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=8 (ANOVA y test post hoc de Bonferroni, $P<0.05$).

Referente al efecto del aceite de aguacate sobre la masa relativa del hígado (hígado/masa corporal) (Fig. 4) se observó que el hígado en el grupo diabético aumentó casi el doble respecto a los animales control. En contraste, el aceite de aguacate disminuyó la masa relativa en los grupos control y diabético, siendo este efecto más prominente en las ratas diabéticas.

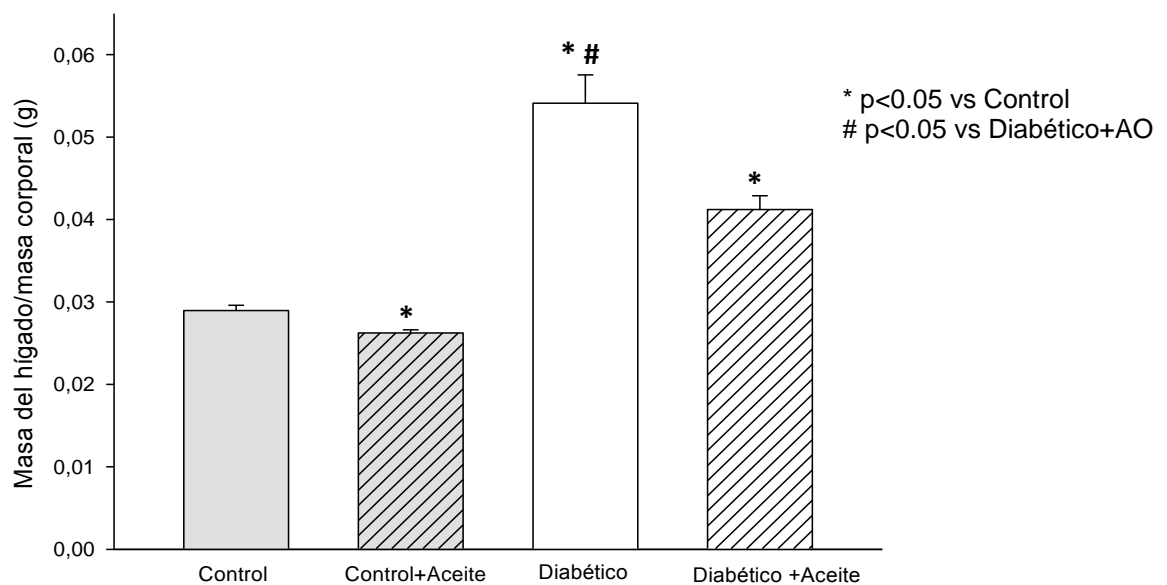


Figura 4.- Efecto del aceite de aguacate sobre la masa relativa del hígado (hígado/masa corporal) al final del estudio. Se pesó al animal antes de su

sacrificio, después de lo cual se extrajo el órgano y se pesó. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de $n=8$ (ANOVA y test post hoc de Bonferroni, $P<0.05$).

6.2. Actividad de los complejos de la CTE

Referente a la actividad del complejo I durante los 90 días de tratamiento (Fig. 5), se observó que en el grupo diabético hubo una disminución de la actividad de alrededor del 40% respecto al grupo control. El aceite de aguacate contrarrestó este efecto, observándose que la actividad de este grupo fue similar a la del grupo control. El aceite de aguacate disminuyó la actividad del grupo control a niveles del grupo diabético.

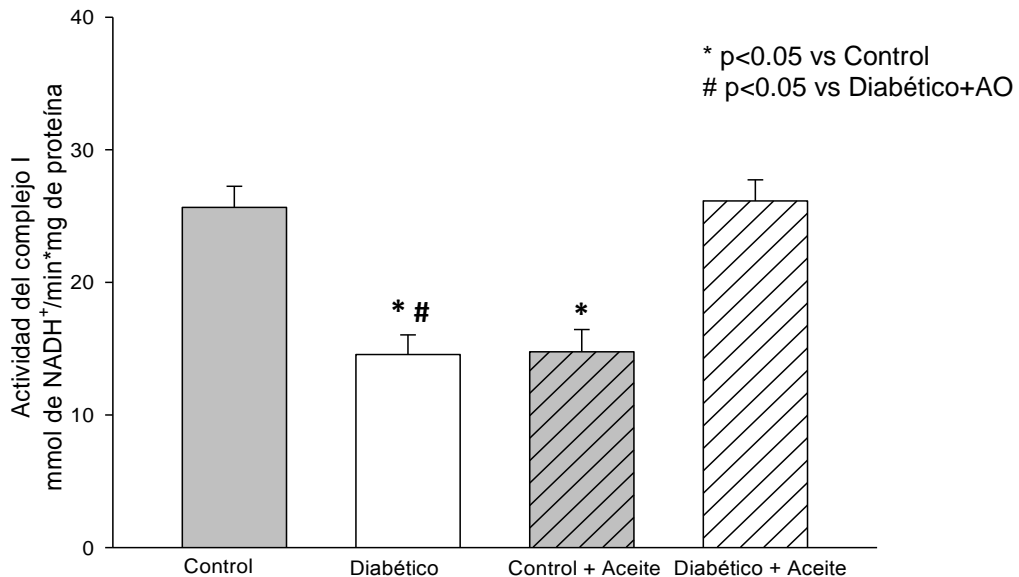


Figura 5.- Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad del complejo I (NADH deshidrogenasa), a los 90 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de $n=6$ (ANOVA y test post hoc de Bonferroni, $P<0.05$).

En relación a la actividad del resto de los complejos respiratorios, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales (Figs. 6, 7 y 8).

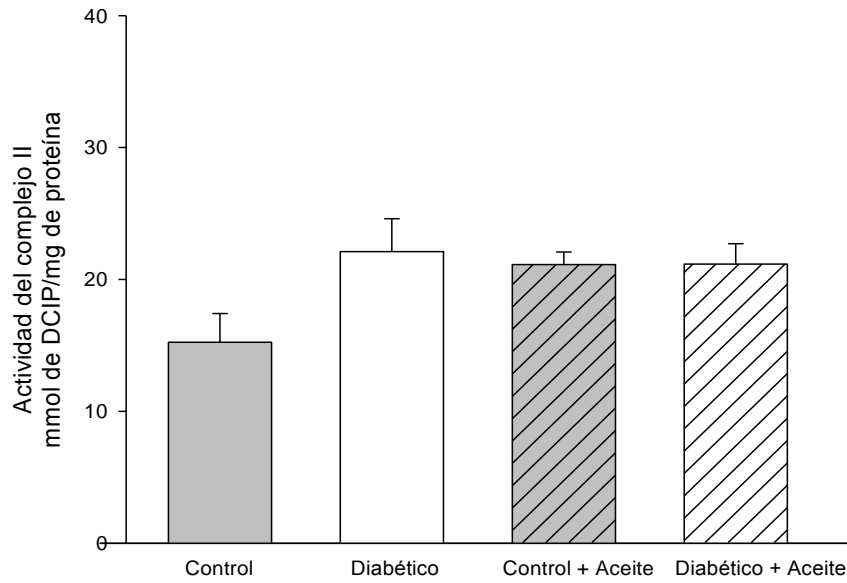


Figura 6.- Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad del complejo II (succinato deshidrogenasa), a los 90 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de $n=6$ (ANOVA y test post hoc de Bonferroni, $P<0.05$).

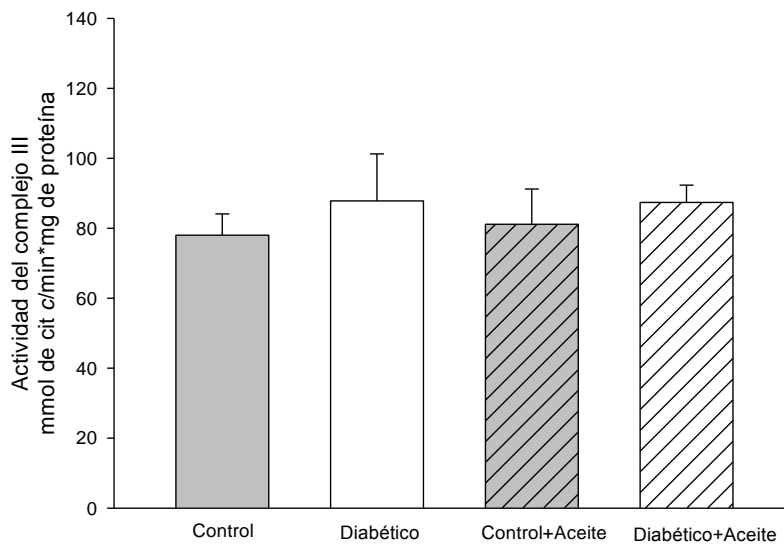


Figura 7.- Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad del complejo III (succinato-citocromo *c* oxidorreductasa), a los 90 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de $n=6$ (ANOVA y test post hoc de Bonferroni, $P<0.05$).

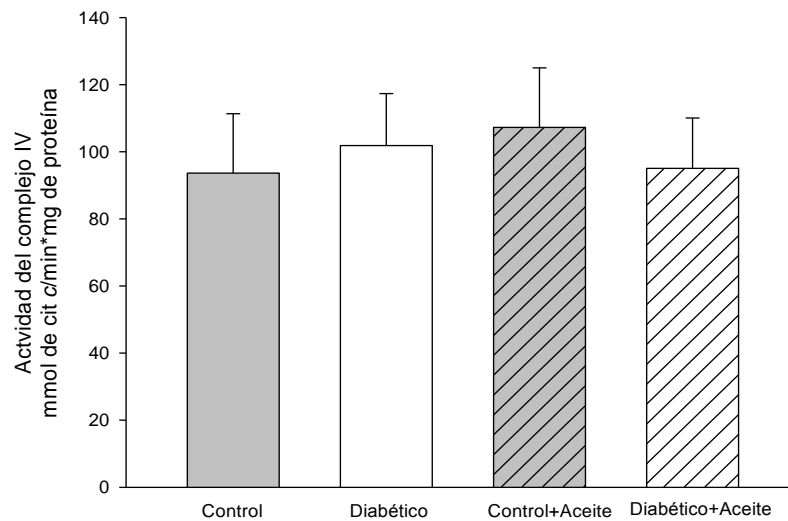


Figura 8.- Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa), a los 90 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=6 (ANOVA y test post hoc de Bonferroni, $P<0.05$).

6.3. Efectos de la cardiolipina en la actividad del complejo I

En relación a la actividad del complejo I añadiendo cardiolipina exógena (Fig. 9), se puede observar que en el grupo diabético la actividad se recuperó casi 0.7 veces respecto a la actividad sin cardiolipina, alcanzando casi el nivel de actividad del grupo sin cardiolipina. En contraste, se observó una disminución drástica de la actividad en el resto de los grupos experimentales.

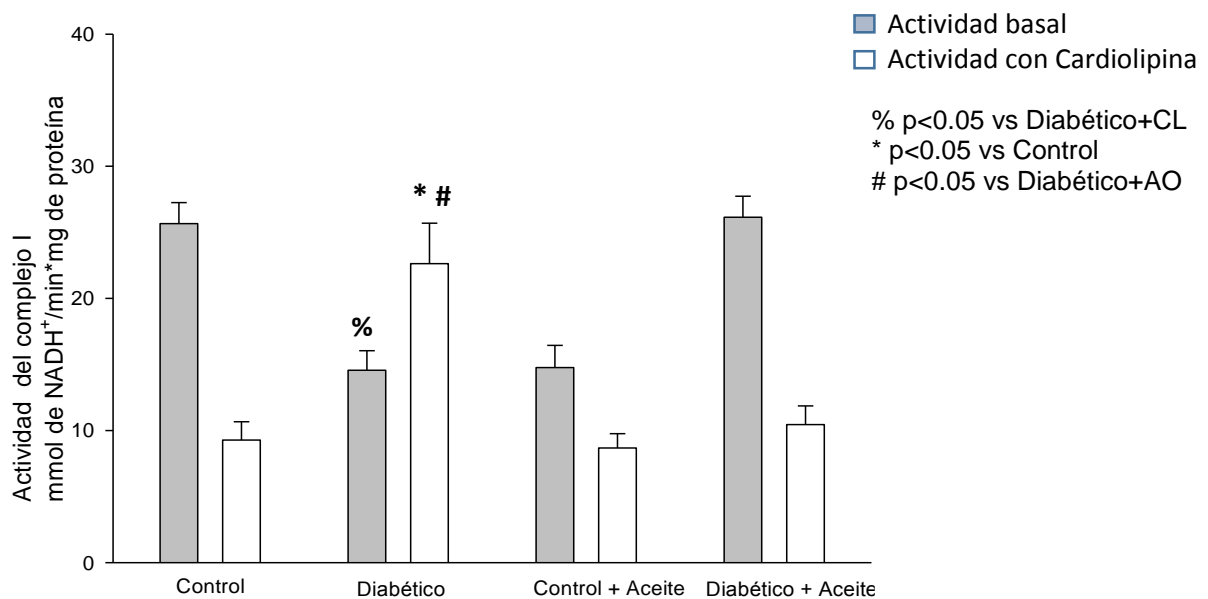


Figura 9.- Efecto de la cardiolipina en la actividad del complejo I en mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=6 (ANOVA y test post hoc de Bonferroni $P<0.05$).

6.4. Reducción de los grupos tioles del complejo I

En relación a la actividad del complejo I añadiendo un agente reductor de grupos tioles como el β -Mercaptoetanol (Fig. 10), se puede observar que a las concentraciones de 50 μ M de β -Mercaptoetanol la actividad del grupo diabético se recuperó casi 0.3 veces más con respecto a la actividad basal sin β -Mercaptoetanol en el mismo grupo, no obstante que la actividad no alcanzó los niveles del grupo control sin aceite. En relación a la actividad del grupo control con el agente reductor, esta disminuyó 0.3 veces respecto a la actividad basal del mismo grupo sin β -Mercaptoetanol. En el resto de grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

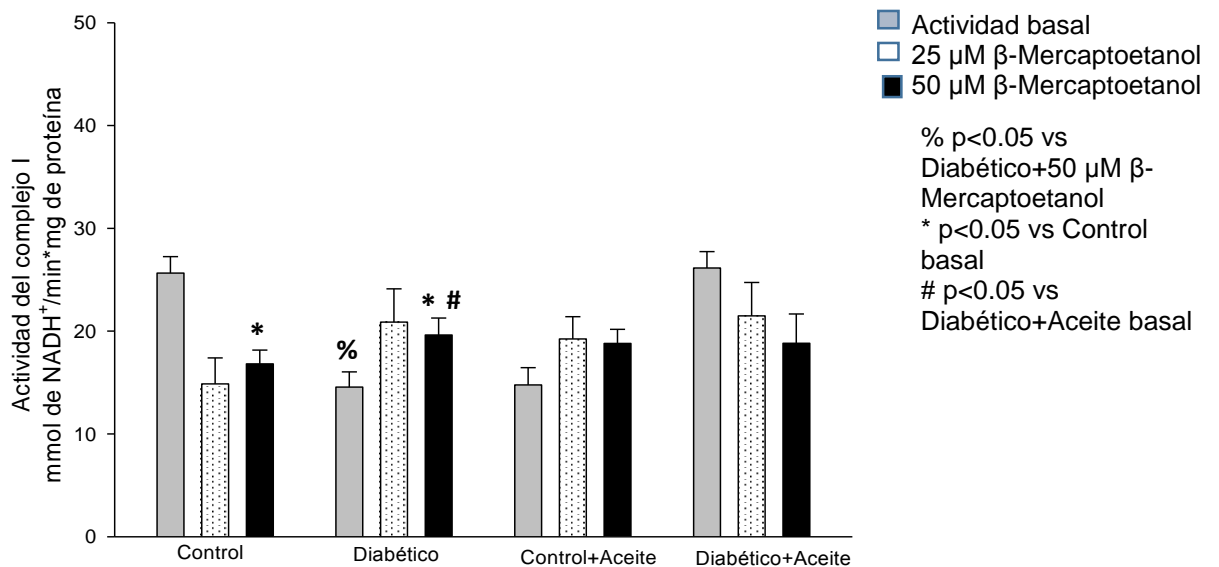


Figura 10.- Actividad del complejo I (NADH deshidrogenasa) al reducir los grupos tioles en mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=6 (ANOVA y test post hoc de Bonferroni $P<0.05$).

6.5. Efectos de la cardiolipina y el β -Mercaptoetanol en la actividad del complejo I

Referente al papel de la cardiolipina en conjunto con el reductor de grupos tioles para la actividad del complejo I (Fig. 11), se observó que la actividad se recuperó por completo en el grupo diabético + aceite de aguacate. En contraste, la actividad fue dramáticamente disminuida en el resto de los grupos experimentales.

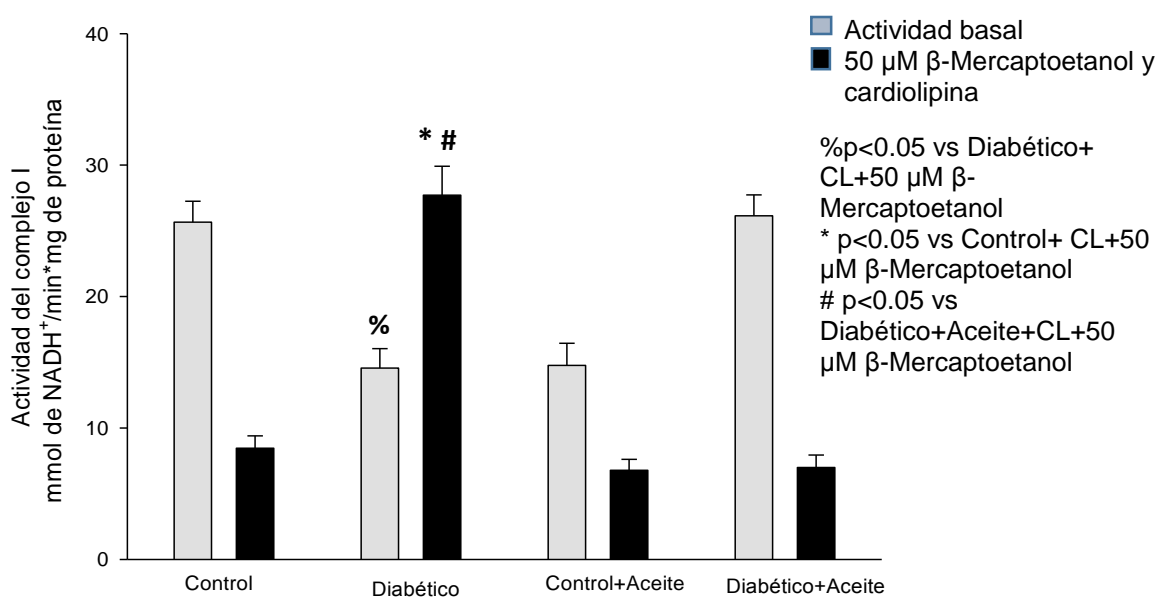


Figura 11.- Papel de la cardiolipina y el β -mercaptoetanol en la actividad del complejo I (NADH deshidrogenasa) en mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=6 (ANOVA y test post hoc de Bonferroni $P<0.05$).

6.6. Efecto del aceite de aguacate sobre la velocidad de producción de especies reactivas de oxígeno

6.6.1. Flujo de electrones hacia adelante a partir del complejo I

Se determinó la producción de ERO del complejo I en flujo hacia adelante de electrones (Fig. 12), utilizando como sustrato glutamato/malato. Se pudo apreciar que en el grupo de ratas diabéticas hubo un incremento de 0.7 en la velocidad de generación de ERO respecto al grupo control. El aceite de

aguacate disminuyó la producción de ERO en las ratas diabéticas a el nivel del grupo control.

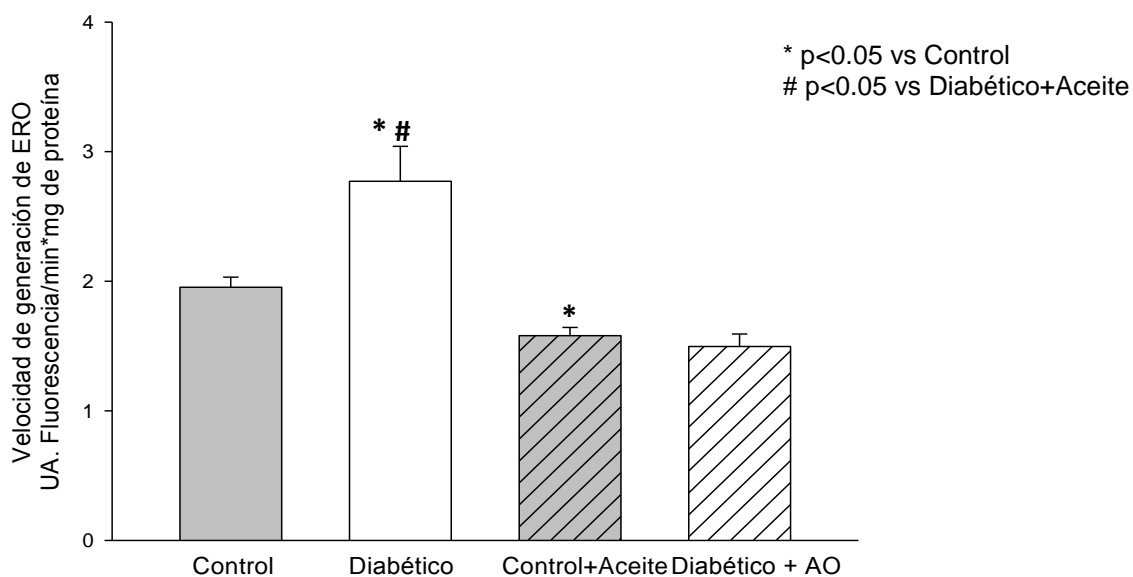


Figura 12.- Velocidad de generación de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento a partir del complejo I hacia adelante. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de $n=6$ (ANOVA y test post hoc de Bonferroni $P<0.05$).

6.6.2. Flujo reverso de electrones

Se determinó la producción de ERO en flujo reverso de electrones (Fig. 13), utilizando como sustrato succinato en ausencia de rotenona. Se pudo observar que en el grupo de ratas diabéticas no hubo diferencias en la velocidad de generación de ERO respecto al grupo control. Solo se observó una disminución en las ERO en el grupo diabético + aceite de aguacate respecto al grupo diabético.

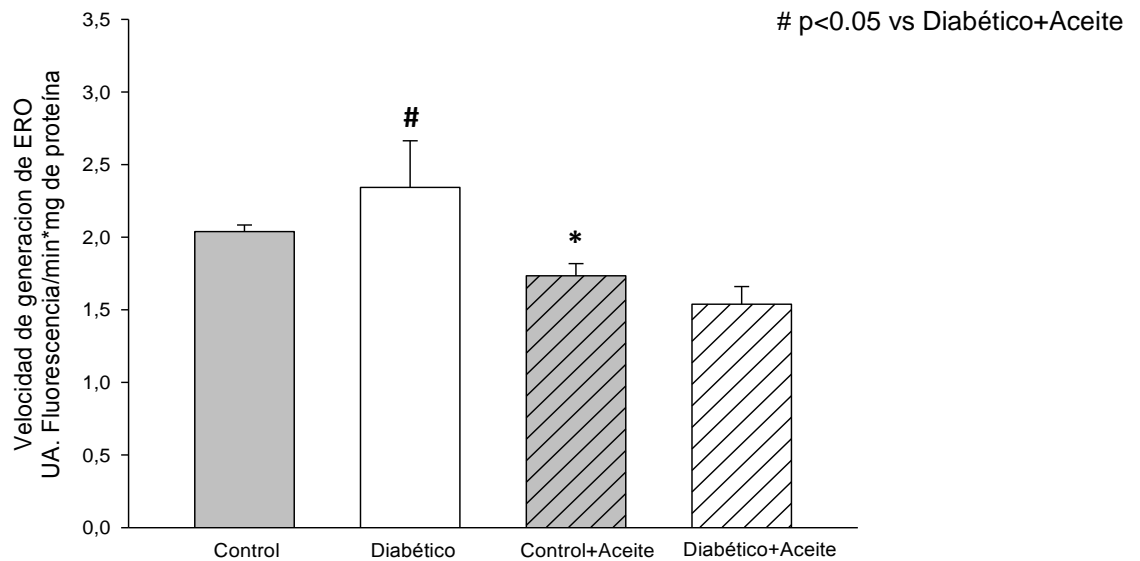


Figura 13.- Velocidad de generación de ERO en mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento en flujo reverso de electrones. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=6 (ANOVA y test post hoc de Bonferroni $P<0.05$).

6.6.3. Formación de ERO en el segmento complejo II-III de la ETC

Se determinó la producción de ERO a partir del complejo II (Fig. 14), utilizando como sustrato succinato y en presencia de rotenona como inhibidor flujo reverso de electrones al complejo I. Se pudo observar que en el grupo de ratas diabéticas no hubo una diferencia significativa respecto al control, pero en lo que respecta al grupo diabético con aceite de aguacate en comparación con el diabético se observó una disminución de casi 0.5 veces, mientras que respecto al grupo control en comparación con el grupo de animales control suministrados con aceite de aguacate no tuvo diferencia significativa.

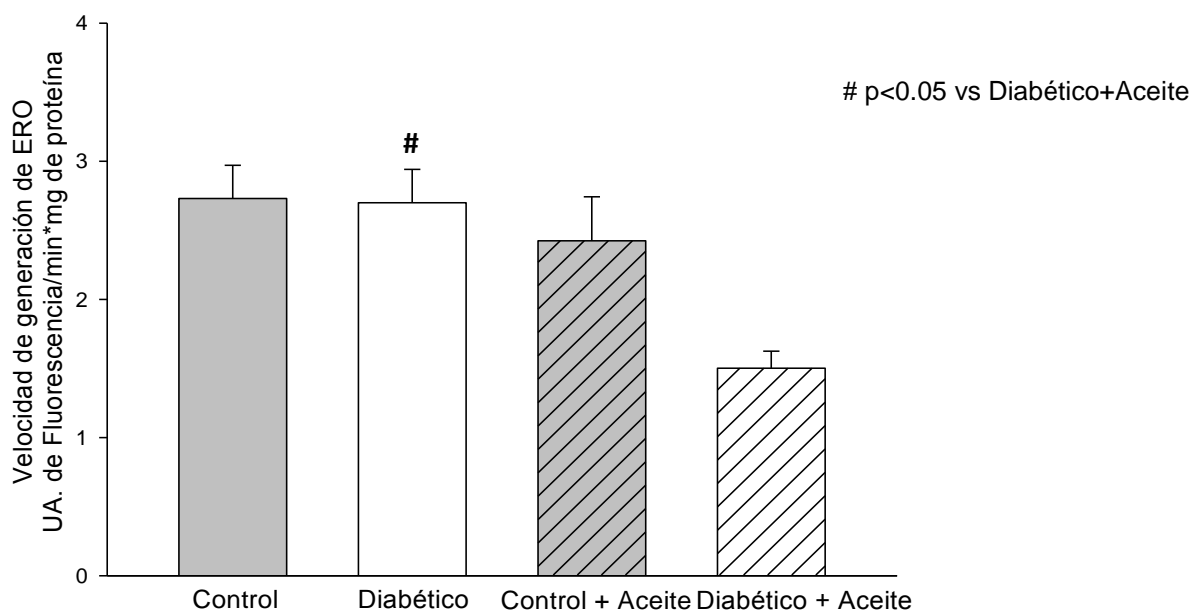


Figura 14.- Velocidad de generación de especies reactivas de oxígeno en mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento a partir del complejo II-III hacia adelante. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=6 (ANOVA y test post hoc de Bonferroni $P<0.05$).

6.6.4. Papel de la cardiolipina y el β -mercaptoetanol en la velocidad de generación de ERO a partir del complejo I

Se determinó la producción de ERO del complejo I en flujo de electrones hacia adelante (Fig. 15), utilizando como sustrato glutamato/malato. Las mitocondrias fueron incubadas con liposomas de cardiolipina y con el reductor de grupos tioles β -mercaptoetanol como se describió en materiales y métodos. Se pudo observar que en todos los grupos hubo una disminución de la velocidad de generación de ERO, pero cabe destacar que en el grupo de ratas diabéticas hubo una disminución significativa con respecto a la velocidad de generación de ERO basal del mismo grupo de casi 10 veces menos.

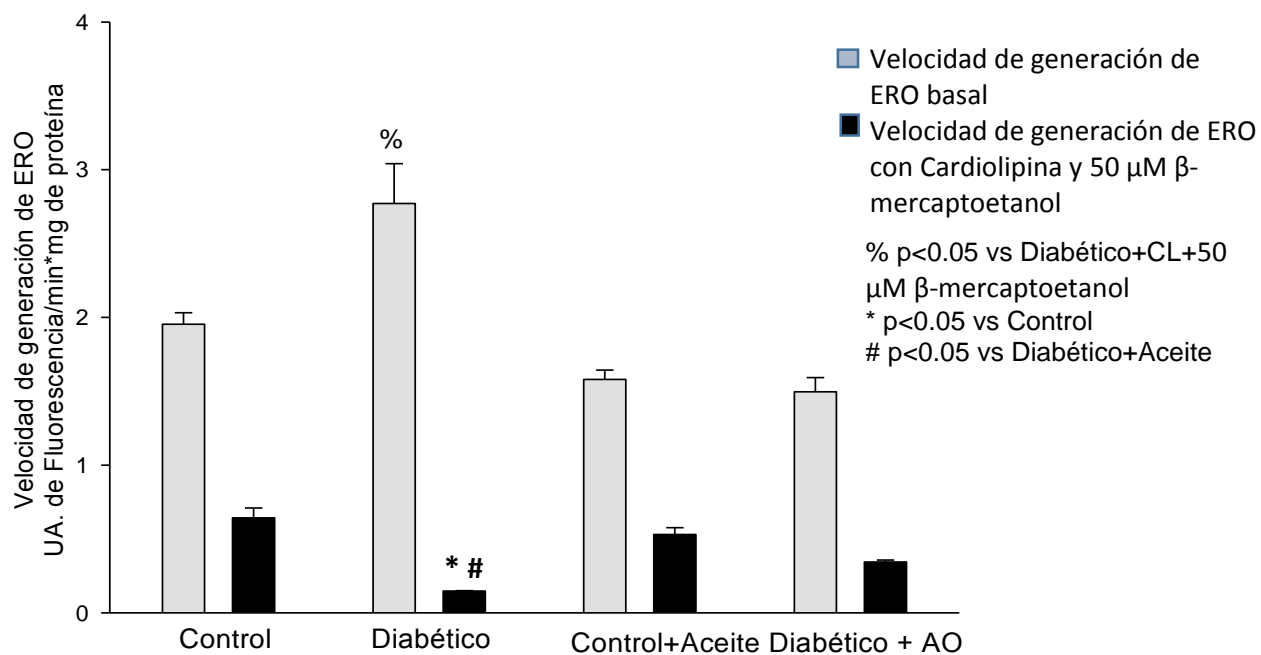


Figura 15.- Efectos de la cardiolipina y el β -mercaptoetanol en la velocidad de generación de ERO a partir del complejo I (NADH deshidrogenasa) en mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm e.e. de n=6 (ANOVA y test post hoc de Bonferroni $P < 0.05$).

7. Discusión

Los resultados del presente estudio muestran que la diabetes tipo I inducida con estreptozotocina (STZ) aumentó el peso relativo del hígado, disminuyó selectivamente la actividad del complejo I e incrementó la producción de ERO en este sitio de la cadena de transporte de electrones (CTE), lo cual se atribuyó a la oxidación de grupos tioles del complejo y a un déficit de cardiolipina. Todos estos efectos fueron disminuidos por el tratamiento durante 90 días con el aceite de aguacate, de manera independiente de los niveles de glucosa en sangre, puesto que la administración del aceite no modificó el estado de hiperglucemia en las ratas diabéticas (Fig.1). A este respecto, la estreptozotocina es un inductor de la diabetes mediante un mecanismo que involucra la alquilación del ADN e inducción de la ADP-ribosilación, lo que provoca disminución del NAD⁺ y el ATP. A su vez, el ADP formado sirve como un sustrato para la xantina oxidasa, lo que aumenta la formación de radical superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (OH^{*}), además de que la STZ induce un aumento en la producción de óxido nítrico (NO). Todo esto induce apoptosis de las células β pancreáticas y necrosis del tejido, con lo cual disminuye la síntesis de insulina y aumentan los niveles sanguíneos de glucosa (Szkudelski, 2001). Lo anterior concuerda con el efecto nulo del aceite de aguacate sobre los niveles de glucosa en ratas diabéticas, puesto que no era de esperarse que su administración revirtiera la muerte de las células β del páncreas. Por otro lado, en un trabajo previo en nuestro grupo de trabajo, se observó que el aceite de aguacate disminuye los niveles de glucosa sanguínea en ratas Goto-Kakizaki, un modelo de diabetes tipo II, lo cual fue atribuido a su alto contenido de ácido oleico (Ortiz-Avila *et al.*, 2017). Este ácido graso se ha demostrado que es capaz de disminuir los niveles de glucosa sanguínea al estimular la secreción del péptido similar a glucagon – 1 (GLP-1, del inglés *glucagon like peptide - 1*), el cual mejora la secreción y la sensibilidad a la glucosa, inhibe la secreción de glucagon y retrasa la absorción gástrica de nutrientes (Rocca *et al.* 2001). Dado que las ratas Goto-Kakizaki presentan resistencia a la insulina (Bitar *et al.* 2004), es probable que el aceite de aguacate disminuya los niveles de glucosa mediante un aumento de la sensibilidad a la insulina y la inhibición de la

secreción de glucagón. Sin embargo, es poco probable que este mecanismo opere en las ratas inducidas a diabetes con STZ, dado que estos animales no pueden producir insulina debido a lo arriba descrito.

La actividad del complejo I disminuyó en un 50% en las mitocondrias de hígado de ratas diabéticas (Fig. 5), lo cual concuerda con lo reportado previamente en nuestro grupo de trabajo (Ortiz-Avila *et al.*, 2015). La cardiolipina es esencial para el funcionamiento de los complejos de I, III y IV de la CTE, ya que este fosfolípido establece interacciones de alta afinidad con los complejos necesarios para su actividad catalítica y su conformación (Paradies *et al.* 2014). En mitocondrias de hígado, la cardiolipina contiene predominante en sus grupos acilo residuos de ácido linolénico, lo cual la hace particularmente susceptible al ataque por ERO (Hoch, 1992). La peroxidación de los lípidos de membrana se considera una de las principales causas de disfunción mitocondrial en una amplia variedad situaciones fisiopatológicas y en el envejecimiento (Cortés-Rojo y Rodríguez-Orozco 2011; Paradies *et al.*, 2014). En relación a la enfermedad hepática no alcohólica (EHNA), se ha demostrado que la actividad del complejo I disminuye debido a una pérdida de cardiolipina y a un aumento en su peroxidación, de tal modo que la restitución de la cardiolipina a través de la incubación de las mitocondrias con liposomas de cardiolipina restaura su actividad (Petrosillo *et al.*, 2007). Utilizando la misma estrategia experimental, en este estudio observamos que la adición de cardiolipina restauró la actividad del complejo I de ratas diabéticas (Fig. 9), lo cual indica que en la diabetes, el complejo I pierde su actividad debido a alteraciones en este fosfolípido. Por otro lado, se observó que el tratamiento con cardiolipina disminuyó la actividad del complejo I de ratas control. La interpretación que se le puede dar a esta observación es que, en las mitocondrias control, al no haber déficit de cardiolipina, el exceso de cardiolipina adicionada exógenamente podría estar funcionando como un detergente, induciendo alteraciones estructurales en la membrana responsables de la disminución de la actividad del complejo. En contraparte, al no suceder lo mismo en las mitocondrias de ratas diabéticas, esto apoya la idea de que las últimas son deficientes en cardiolipina y esto contribuye a la disminución de la actividad del complejo.

En contraste con lo observado en mitocondrias de ratas diabéticas, la adición de cardiolipina a las mitocondrias del grupo diabético + aceite de aguacate disminuyó la actividad del complejo I de una manera similar a lo observado en las mitocondrias del grupo control, lo cual sugiere que la administración del aceite de aguacate disminuyó la actividad del complejo I inducida por la diabetes al disminuir la pérdida o la peroxidación de la cardiolipina, por lo que también en esta condición, la cardiolipina exógena podría estar alterando la integridad del complejo al estar aumentando de manera excesiva la cantidad de este fosfolípido. Por lo tanto, se requiere de experimentos de determinación directa de las concentraciones de cardiolipina en cada grupo experimental para corroborar esta hipótesis. La noción de que la disminución de la actividad del complejo I provocada por la diabetes es debida al daño oxidativo en la cardiolipina y que el aceite de aguacate previene la pérdida de la actividad de este complejo al disminuir la peroxidación de este fosfolípido, concuerda con un hallazgo anterior donde se observó que en la diabetes aumenta alrededor de un 100% los niveles de peroxidación de lípidos en mitocondrias de hígado de rata, lo cual fue disminuido en su totalidad por la administración de aceite de aguacate (Ortiz-Avila *et al.*, 2015). En resumen, los resultados obtenidos sugieren que la diabetes disminuyó la actividad del complejo I debido a la pérdida de cardiolipina, lo cual fue disminuido por el aceite de aguacate, posiblemente al prevenir la peroxidación de este fosfolípido.

Otro mecanismo bien establecido que contribuye a la inhibición del complejo I por la producción excesiva de ERO es la oxidación de los grupos tioles localizados en las subunidades de 51 y 75 KDa (Taylor *et al.*, 2003). Cuando la producción de ERO aumenta en la matriz mitocondrial, el glutatión reducido (GSH) es convertido a glutatión oxidado (GSSG) por las glutatión peroxidasas (Gpx) para la reducción de las ERO. Si la conversión de GSSG a GSH ocurre a una tasa disminuida, el GSSG reacciona con los tioles del complejo I antes mencionados, inhibiendo de este modo su actividad y favoreciendo la producción de ERO en este complejo, lo cual puede ser revertido con agentes reductores de grupos -SH (Taylor *et al.*, 2003). Con base en lo anterior, se evaluaron los efectos del β -mercaptoetanol, un reductor de grupos -SH en la actividad del complejo I para determinar si existen cambios

redox en las cisteínas del complejo pueden estar involucrados en su disminución por la diabetes. Los resultados obtenidos de este experimento (Fig. 10), mostraron que a 50 μ M de β -mercaptoetanol, la actividad del complejo I se recuperó parcialmente, alcanzando un 70% de la actividad del grupo control, lo que sugiere que la oxidación de grupos tioles en este complejo tiene un papel parcial en la disminución de su actividad. En contraste, la actividad del complejo I de las mitocondrias de los grupos control y diabetes + aceite de aguacate disminuyó por la adición del β -mercaptoetanol. A este respecto, se ha reportado que puentes disulfuro entre subunidades del complejo I que se encuentran en localizadas en dominios membranales son importantes para su estabilidad enzimática (Zhu *et al.*, 2016). Por lo tanto, suponiendo que los grupos tioles reactivos del complejo I de las mitocondrias control se encuentran en su forma reducida, se puede proponer que el β -mercaptoetanol añadido redujo preferencialmente los puentes disulfuro mencionados anteriormente, desestabilizando de este modo la estructura cuaternaria del complejo y causando disminución en su actividad. De igual modo, en mitocondrias de ratas diabéticas tratadas con aceite de aguacate, se observó la disminución de la actividad del complejo I por la adición de una concentración de 50 μ M de β -mercaptoetanol utilizada, lo que sugiere que el aceite de aguacate mantiene los tioles reactivos del complejo en un estado reducido, lo cual concordaría con el hecho de que su actividad fue similar a la de mitocondrias control y por lo tanto, la adición de β -mercaptoetanol actuaría de manera similar en los puentes disulfuro responsables de su estabilización como en el grupo control.

En la mitocondria, la peroxidación de los grupos acilo de los fosfolípidos de membrana es contrarrestada por la actividad de la glutatión peroxidasa 4 (Gpx4), la cual reduce los peróxidos lipídicos a sus respectivos alcoholes a expensas de la oxidación del GSH (Imai *et al.*, 2003). Respecto a la oxidación de las cisteínas reactivas del complejo I por el GSSG, este proceso puede ser revertido por la glutarredoxina 2 (Grx2) en un proceso dependiente de GSH (Hurd *et al.*, 2008). Lo anterior refleja que el mantenimiento del glutatión en estado reducido es primordial para combatir el daño oxidativo al complejo I mediante la oxidación de sus cisteínas reactivas o la peroxidación de la cardiolipina. En nuestro grupo de trabajo, hemos encontrado que la diabetes disminuye la relación GSH/GSSG en mitocondrias de hígado de rata, lo cual las

hace más susceptibles al estrés oxidativo. Por el contrario, el aceite de aguacate aumenta la relación GSH/GSSG y aumenta la resistencia al estrés oxidativo (Ortiz-Avila *et al.*, 2015). Se ha hipotetizado que este efecto podría estar mediado por el β -sitosterol presente en el aceite de aguacate (Dreher y Davenport, 2013). Esta fitohormona puede unirse a receptores de estrógenos en mamíferos y aumentar la relación GSH/GSSG en células sujetas a estrés oxidativo (Vivancos y Moreno, 2005). Por lo tanto, un probable mecanismo que podría explicar el efecto protector del aceite de aguacate contra la inhibición del complejo I por la diabetes es que el β -sitosterol presente en el aceite se une a receptores de estrógenos en hepatocitos (Eisenfeld y Aten, 1987), lo cual aumenta la relación GSH/GSSG. Al aumentar los niveles de GSH, esto mejoraría la capacidad de la Gpx4 y la Grx5 para contrarrestar a nivel mitocondrial la peroxidación de lípidos y la oxidación de cisteínas libres del complejo I que regulan su actividad, respectivamente, dando como resultado una prevención de la inhibición del complejo que se produce debido al estrés oxidativo que se genera en las mitocondrias de hígado durante la diabetes. Esto se corrobora con lo observado en la Fig. 11, donde la combinación de cardiolipina y β -mercaptoetanol restableció en un 100% la actividad del complejo I, mientras que en las ratas diabéticas tratadas con aceite de aguacate, el complejo se comportó de manera similar a lo observado en los grupos control y control + aceite de aguacate. Otra posibilidad es que los antioxidantes como los carotenoides, las xantofilas o las clorofilas presentes en el aceite puedan acumularse en la matriz mitocondrial y combatir directamente el daño por ERO. Sin embargo, esto es poco probable debido a que resulta difícil la acumulación de moléculas con una masa molecular como la de estos antioxidantes debido a la impermeabilidad de la membrana interna mitocondrial a prácticamente casi cualquier molécula excepto el O₂, el CO, el cianuro y los H⁺ (Cortés-Rojo y Rodríguez-Orozco, 2011).

La diabetes se caracteriza por un aumento en la producción de ERO en la CTE de las mitocondrias de los órganos blanco de esta enfermedad (Giacco y Brownlee, 2010). De acuerdo con lo anterior, se observó que las mitocondrias del grupo diabético produjeron hasta un 1.3 veces más ERO que las mitocondrias del grupo control cuando se estimuló la respiración con un sustrato del complejo I (Fig. 12). Para discernir que segmento de la CTE fue

responsable por el aumento en la formación de ERO en mitocondrias de ratas diabéticas, se usó succinato como sustrato del complejo II y se inhibió la contribución del complejo I a la producción de ERO mediante flujo reverso de electrones mediante la adición de rotenona, un inhibidor del complejo I (Fig. 14). Dado que se observó que la producción de ERO no varió entre el grupo diabético y el grupo control bajo estas condiciones, se puede deducir que el segmento complejo II – complejo IV no fue responsable del aumento de la producción de ERO en la diabetes y que el responsable de ello fue el complejo I. Esto concuerda con el hecho de que la diabetes no indujo ninguna alteración en la actividad de los complejos II, III y IV, (Fig. 6, 7 y 8) dado que la producción de ERO aumenta en el segmento complejo II – complejo IV cuando la velocidad del flujo de electrones disminuye debido al daño principalmente en el complejo III o el complejo IV, lo que favorece el que la poza de quinonas se mantenga en un estado parcialmente reducido en los sitios redox del complejo III y estimula la producción de radical semiquinona (Q^{\bullet}), el cual reacciona con el oxígeno para formar al radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Muller et al., 2002). Por el contrario, el aumento de la producción de ERO en las ratas diabéticas con un sustrato del complejo I concuerda con la disminución de la actividad de este complejo en dichas ratas. Se ha reportado que la disminución de la actividad del complejo I por la oxidación de sus grupos tioles expuestos o por alteraciones en la cardiolipina aumenta la formación de ERO en este sitio de la CTE (Taylor et al. 2003; Paradies *et al.* 2014). Por ende, con estos argumentos, se le puede asignar al complejo I un papel primordial en la producción excesiva de ERO en la CTE de mitocondrias de hígado de ratas diabéticas.

El complejo I contiene 45 subunidades, de las cuales, 14 están involucradas en su catálisis, mientras que el resto, son consideradas subunidades accesorias. Contiene un flavin mononucleótido (FMN) el cual está involucrado en la oxidación del NADH y 8 centros hierro-azufre (2 binucleares y 6 tetranucleares) los cuales transfieren los electrones hasta el sitio de unión a ubiquinona (Wirth *et al.*, 2016). Las ERO se generan en el FMN mediante un mecanismo que involucra el flujo de electrones debido a la oxidación del NADH por el FMN (flujo hacia adelante) o desde el succinato en el complejo II hasta el FMN (flujo reverso de electrones). El flujo reverso de electrones se da cuando la relación $NAD^+/NADH$ es baja, cuando el Δp de la membrana interna

mitocondrial es alto y cuando hay succinato disponible para su oxidación en el complejo II y la formación de ubiquinol (Pryde y Hirst, 2011). Para elucidar el papel de la producción de ERO en flujo reverso, se midió la producción de ERO en presencia de succinato (Fig. 13). Los resultados obtenidos corroboran que la producción de ERO ocurrió en flujo hacia adelante y no en flujo reverso, ya que no se observaron diferencias en la producción de ERO entre los grupos control y diabético.

Estos resultados y la disminución de la actividad del complejo I en el grupo diabético, indican que el defecto inducido en la diabetes en el complejo está relacionado con alguna alteración a nivel de las reacciones que ocurren en el FMN. Esto debido a que el ferricianuro de potasio, el cual se usó como aceptor de electrones durante el ensayo, es reducido directamente por el FMN. Sin embargo, es factible proponer que el daño no se llevó a cabo directamente sobre el FMN, puesto que el mismo está localizado sobre el brazo hidrofílico del complejo y la actividad del complejo se restableció por completo con cardiolipina, lo cual se esperaría restableciera al complejo de alguna alteración en su brazo hidrofóbico. Más cercanos a esta porción del complejo se encuentran los centros Fe-S y el sitio de reducción de la ubiquinona (Wirth *et al.* 2016). Por lo tanto, es posible hipotetizar que la pérdida o la peroxidación de la cardiolipina en el complejo induce alguna alteración en dichos centros redox que alteran el flujo de electrones del FMN hacia los centros Fe-S y a la ubiquinona. Esto, por ende, favorecería el mantenimiento del FMN en un estado reducido, lo cual estimula la formación de ERO. A su vez, esto impediría el flujo reverso de electrones puesto que el mismo depende del transporte de electrones a través de dichos centros redox (Pryde y Hirst, 2011), lo cual concuerda con el resultado de la Fig. 13. El tratamiento con cardiolipina y β -mercaptoetanol disminuyó en todos los grupos la producción de ERO en presencia de glutamato – malato (flujo hacia adelante). Sin embargo, este efecto fue más acentuado en las mitocondrias de las ratas diabéticas (Fig. 15). Esto implica que el aumento de la producción de ERO en dicho grupo fue debido a la disminución de la actividad del complejo debido a alteraciones en la estructura y/o concentración de este fosfolípido y a la oxidación de las cisteínas libres del complejo I. Esto también sugiere que el aceite de aguacate podría disminuir el incremento de la producción de ERO en las ratas diabéticas al

mejorar la actividad del complejo I al disminuir las alteraciones en la cardiolipina y los tioles del complejo. Sin embargo, se observó que el tratamiento con aceite de aguacate disminuye la producción de ERO con cualquier combinación de sustratos con y sin rotenona (Figs. 12, 13 y 14). Por lo tanto, además de su probable efecto sobre el complejo, es probable que el aceite de aguacate aumente en general, la capacidad de los sistemas antioxidantes mitocondriales a un grado tal que previene el incremento en la formación de ERO más allá de los valores basales del control, lo cual, como se comentó anteriormente, podría estar mediado por un aumento en los niveles mitocondriales de GSH.

Por último, se observó que la masa relativa del hígado aumentó casi al doble en las ratas diabéticas (Fig. 4), lo que refleja una alteración en el estado de salud del hígado ya que este fenómeno ha sido relacionado con la presencia de esteatosis (Hemmerlyckx *et al.*, 2013). La relación entre los hallazgos mitocondriales y esta observación podría consistir en que la oxidación beta de ácidos grasos podría estar comprometida en el hígado de ratas diabéticas, lo cual aumentaría la concentración de lípidos en este órgano debido a una disminución de su utilización por esta vía mitocondrial. La oxidación de ácidos grasos produce altas cantidades de NADH, el cual debe ser re-oxidado a NAD⁺ para que las reacciones de reducción de este nucleótido y la vía completa no se detengan. Un factor que podría estar limitando la vía es la disminución del complejo I observado en las mitocondrias de ratas diabéticas, puesto que esta proteína puede regenerar el NAD⁺ necesario para el funcionamiento de la oxidación beta al oxidar al NADH producido en ella. Por el contrario, la disminución de la actividad del complejo I por el aceite de aguacate y por lo tanto, el aumento en la capacidad de oxidar NADH, correlaciona bien con la disminución de la masa hepática inducida por el aceite de aguacate en las ratas diabéticas (Fig. 4), lo cual sugiere que el aceite de aguacate disminuye parcialmente la acumulación de ácidos grasos al favorecer su oxidación beta mediante un aumento en las concentraciones de NAD⁺. Por lo tanto, puede proponerse que el aceite de aguacate podría ser una estrategia nutricional para disminuir las alteraciones hepáticas en el hígado diabético al mejorar el funcionamiento mitocondrial y el estrés oxidativ

8. Conclusión

Las propiedades del aceite de aguacate impiden las alteraciones de la cardiolipina, la oxidación de grupos tioles en el complejo I y la formación de ERO en flujo hacia adelante en ratas diabéticas.

9. Bibliografía

- Almon, R. R., DuBois, D. C., Lai, W., Xue, B., Nie, J., & Jusko, W. J. (2009). Gene expression analysis of hepatic roles in cause and development of diabetes in Goto-Kakizaki rats. *J Endocrinol.* 200(3), 331-346.
- Alvizouri F. & Rodríguez A. (2009). Efectos Médicos del aguacate. *Med Int Mex.* 25 (5): 379-85.
- Ashton OB, Wong M, McGhie TK, Vather R, Wang Y, Requejo-Jackman C, Ramankutty P, Woolf AB. (2006). Pigments in avocado tissue and oil. *J Agric Food Chem.* 54 (26):10151-8.
- Balijepalli, S., Annepu, J., Boyd, M. R., and Ravindranath, V. (2003). *Neurosci Lett.* 272: 203–206.
- Beraldo dos Santos S., Endres da Silva, L., do Amaral Crispim, B., Oliveira Vaini, J., Barufatti Grisolia, A., & Pires de Oliveira, K. M. (2012). Biotecnología aplicada a la alimentación y salud humana. *Rev Chilena de nutrición.* 39(3): 94-98.
- Bitar MS, Wahid S, Pilcher CW, Al-Saleh E, Al-Mulla F. (2004) Alpha-lipoic acid mitigates insulin resistance in Goto-Kakizaki rats. *Horm Metab Res.* 36(8): 542-9.
- Bulum T., Kolaric´Bm Duvnjak L. and Duvnjak M. (2011). Nonalcoholic Fatty liver Disease Markers are Associated with Insulin Resistance in Type 1 Diabetes. *Dig Dis Sci.* 56: 3655-3663.
- Bustamante Z., García R., Martínez G. and Paz C.L. (2002). Aplicación de bioinformática en el estudio del citocromo c de *Saccharomyces cerevisiae*. Facultad de Bioquímica y Farmacia-UMSS. pp. 1-11.
- Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., Salmona, M., Chang, G., Holmgren, A., and Ghezzi, P. (2002). Glutathionylation of human thioredoxin: a possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems. *Proc Natl Acad Sci.* 99(15), 9745-9749.
- CONAPRA. (2013). *Causas de mortalidad de mayor frecuencia en México.* Consejo Nacional para la Prevención Contra Accidentes. México.

- Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Ávalos, S., Uribe, S., Boldogh, I., & Saavedra-Molina, A. (2007). Electron transport chain of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria is inhibited by H₂O₂ at succinate-cytochrome c oxidoreductase level without lipid peroxidation involvement. *Free Rad Res.* 41(11): 1212-1223.
- Cortés-Rojo C, Rodríguez-Orozco AR. (2011) Importance of oxidative damage on the electron transport chain for the rational use of mitochondria-targeted antioxidants. *Mini Rev. Med. Chem.* 11(7):625-32.
- Cortés-Rojo C. (2005). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis Maestría. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. 6-20.
- Devlin T. (2006). *Bioquímica*. Cuarta ed. Editorial Reverté S.A. Barcelona. 572-577.
- Dikalov SI, Nazarewicz RR, Bikineyeva A, Hilenski L, Lassègue B, Griendling KK, Harrison DG, Dikalova AE. (2014). Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 20(2):281-94.
- Dowman J, Tomlinson J, Newsome P. (2009). Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *Q J Med.* 103:71–83.
- Dreher ML, Davenport AJ. (2013) Hass avocado composition and potential health effects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53(7):738-50.
- Eisenfeld AJ, Aten RF (1987) Estrogen receptors and androgen receptors in the mammalian liver. *J Steroid Biochem.* 27(4-6):1109-18.
- Federación Internacional de Diabetes. (2015) *Prevalencia de la diabetes a nivel mundial*. Federación Internacional de Diabetes.
- Franciscus, A., Highleyman, L., Kukka, C., & Mazoff, C. D. (2008). Daño hepático por radicales libres. *Hepatitis C Sup Proj.* 2008: 1-5.
- Giacco F, Brownlee M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 107(9):1058-70.
- González D. (2009). Hiperglucemia en diabetes mellitus, inflamación y enfermedad coronaria. Universidad Católica, Argentina.

- Gutiérrez-Vázquez I. (2006). Mortalidad por diabetes mellitus. *Salud Pública de México*. 48(6): 442-445.
- Hallberg EM, Shu Y, Hallberg RL. (1993). Lost of mitochondria hsp60 function: nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins. *Mol Cell Biol*. 13(5):3050-3051.
- Hao J, shen W, Lonng J, Sharman E, Shi X. (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.
- Hemmeryckx B, Gaekens M, Gallacher DJ, Lu HR, Lijnen HR. (2013). Effect of rosiglitazone on liver structure and function in genetically diabetic Akita mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 113(5):353-60.
- Hoch FL. (1992). Cardiolipins and biomembrane function. *Biochim Biophys Acta*. 1113(1):71-133.
- Hroudová, J. & Fišar, Z. (2013). Control mechanisms in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Neural Regen Res*. 8(4): 363.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R., Buttemer, W. A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Phys Rev*. 87(4): 1175-1213.
- Hurd TR, 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. *J Biol Chem*. 283(36):24801-15.
- Imai H, Nakagawa Y. (2003). Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*. 34(2):145-69.
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2016). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. México.
- Mckee T, Mckee JR, (2003). *Bioquímica: La base molecular de la vida*, Tercera ed. Editorial McGraw-Hill, España: Interamericana S.A. U. 300-330.

- Martínez-Sánchez G. (2008). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. Rev. Cubana Farm.
- Morales-Solorio. (2015). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis Licenciatura. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. 53-70.
- Morillas-Ruiz, J. M., & Delgado-Alarcón, J. M. (2012). Análisis nutricional de alimentos vegetales con diferentes orígenes: Evaluación de capacidad antioxidante y compuestos fenólicos totales. Nutr Clín Diet Hosp. 32(2): 8-20.
- Muller F, Crofts AR, Kramer DM. (2002). Multiple Q-cycle bypass reactions at the Qo site of the cytochrome bc1 complex. Biochem. 41(25):7866-74.
- Musso G. (2011). Interactions between gut microbiota and host metabolism predisposing to obesity and diabetes. Annual Rev of Med. 62: 361-380.
- Karp G. (2005). Biología Celular y Molecular. Cuarta ed. Editorial McGraw-Hill. 196-213.
- OMS. (2015). *Informe mundial sobre la diabetes*. México. Organización Mundial de la Salud.
- Ortiz-Ávila 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. J Bioenerg Biomembr. 1-10.
- Ortiz-Ávila O, Gallegos-Corona MA, Sánchez-Briones LA, Calderón-Cortés E, Montoya-Pérez R, Rodríguez-Orozco AR, Campos-García J, Saavedra-Molina A, Mejía-Zepeda R, Cortés-Rojo C. (2015). Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. J Bioenerg Biomembr. 47(4):337-53.

- Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, Petrosillo G. (2014). Cardiolipin and mitochondrial function in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 20(12):1925-53.
- Pardo A, Inada N, Vercesi A, Curti C. (2009). Uncoupling and oxidative stress in liver mitochondria isolated from rats with acute iron overload. *Arch Toxicol*. 83: 47–53.
- Petrosillo G, Portincasa P, Grattagliano I, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM, Ferri D, Paradies G. (2007) Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver Involvement of complex I, reactive oxygen species and cardiolipin. *Biochim Biophys Acta*. 1767(10):1260-7.
- Pryde KR, Hirst J (2011) Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J Biol Chem*. 286(20):18056-65.
- Quiroz-Gómez S., Guzmán-Moreno M., Pérez-Gutiérrez L. (2017). Estilos de vida y factores sociodemográficos asociados en pacientes con Diabetes Mellitus. *Multidisciplinary health research*, 1(2): 5-12.
- Rocca A, LaGreca J, Kalitsky J, Brubaker P. (2001). Monounsaturated fatty acid diets improve glycemic tolerance through increased secretion of glucagon-like peptide-1. *Endocrinology*. 142(3):1148-55.
- Saavedra-Molina A. & Devlin T. (1997). Effect of extra and intramitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids*. 12: 293–298.
- Schafer F. & Buettner, G. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med*. 30(11): 1191-1212.
- Schlame M, Rua D, Greenberg ML. (2000). La biosíntesis y el papel funcional de cardiolipina. *Prog Lipid Res*. 39: 257 -288.
- Szkudelski T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 50(6):537-46.
- Taylor E, Hurrell F, Shannon R, Lin T, Hirst J, Murphy M. (2003). Reversible glutathionylation of complex I increases mitochondrial superoxide formation. *J Biol Chem*. 278(22):19603-10.

- Trumpower B. (1990). Cytochrome bc1 complexes of microorganisms. *Microbiol Rev.* 54: 101-129.
- Vasudevan D, Sreekumari S, Vaidyanathan K. (2011). *Texto de Bioquímica*, sexta ed. Editorial Cuéllar Ayala. México. 229.
- Vivancos M. & Moreno J. (2005). β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med.* 39(1):91-7.
- Voet D, Voet J. (2006). *Bioquímica* tercera ed. Editorial Panamericana. Buenos Aires.823.
- Wikibooks.org. (2014).
- World Health Organization. (2015). Definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes.
- Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. (2016). Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochim Biophys Acta.* 1857(7):902-14.
- Zhu J, Vinothkumar K, Hirst J. (2016). Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature.* 536(7616):354-8.