



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
DEPARTAMENTO DE FARMACIA**

**“Evaluación del Sistema Redox hepático en un modelo animal
con Síndrome Diabetogénico”.**

**Tesis presentada como requisito para obtener el título de
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo
PRESENTA**

p.Q.F.B. NELLY KARINA ROSAS ROJAS

**LUGAR DE REALIZACIÓN
LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO CLÍNICAS**

DIRECTOR DE TESIS

D.C. SAMUEL TREVIÑO MORA

**DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS
CLÍNICOS**

ASESOR

**D.C. ALFONSO DANIEL DÍAZ
FONSECA**

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Agradecimientos

Este proyecto no se habría realizado sin el apoyo del D.C. Samuel Treviño, a quien agradezco por darme la oportunidad de aprender en su laboratorio, por los recursos proporcionados, los conocimientos compartidos y por su amistad, sin duda he aprendido cosas muy valiosas para mi crecimiento dentro de la investigación científica, también agradezco al D.C. Alfonso y a la comisión revisora por aceptar guiarme en este proyecto y por tan acertadas observaciones para mejorar profesionalmente.

Los motivos para continuar a pesar de los tiempos difíciles son incontables, principalmente: mi fe en Dios y el apoyo incondicional de mis padres, jamás podré pagarles todo lo que han hecho por cuidarme y por enseñarme a no rendirme nunca. Gracias a mi abuelita Margarita y a mi tía Carmen por cuidar de mí y acompañarme en las buenas y en las malas.

También agradezco a mis compañeros Víctor, Diana, Stephany, Hugo e Ybis por estar, por los aprendizajes y por su amistad; a Rommel, por su paciencia y por enseñarme nuevas brechas en la ciencia.

Finalmente agradezco a todos mis profesores de la licenciatura y a mis amigos, especialmente a Kari, por formar parte de esta etapa que me deja grandes experiencias.

ÍNDICE

1. MARCO TEÓRICO.....	6
1.1 Nutrición en México	6
1.2 Enfermedades crónicas no transmisibles.....	9
1.3 Dietas hipercalóricas como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad crónica no transmisible.....	11
1.3.1 Dietas hipercalóricas	11
1.3.2 Dieta hipercalórica-hiperglúcida	12
1.4 Metabolismo celular de los macronutrientes.....	13
1.4.1 Carbohidratos	13
1.5 Cadena transportadora de electrones	14
1.6 Generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria	16
1.7 Síndrome Diabetogénico: Patogenia.....	18
1.7.1 Disglucemia	19
1.7.2 Resistencia a la insulina.....	20
1.7.3 Resistencia hepática a la insulina.....	21
1.7.4 Hiperglucemia	22
1.7.5 Dislipidemia.....	23
1.8 Complicaciones hepáticas	25
1.9 Estado redox en el síndrome diabetogénico.....	26
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	29
3. JUSTIFICACIÓN.....	30
4. OBJETIVOS.....	31
4.1 Objetivo general.....	31
4.2 Objetivos específicos.....	31
5. HIPÓTESIS.....	32
6. DIAGRAMA DE TRABAJO	33
7. MATERIAL Y MÉTODOS	34
7.1 Animales de experimentación.....	34
7.2 Dieta	35
7.3 Obtención de la muestra sanguínea.....	35
7.4 Obtención de los tejidos.....	35

7.5	Determinaciones bioquímicas:.....	36
7.5.1	Determinaciones Séricas	36
7.5.2	Determinaciones en tejido hepático.....	41
7.6	ANÁLISIS DE DATOS.....	44
8.	RESULTADOS	45
8.1	Modelo animal con Síndrome Diabetogénico.....	45
8.2	Evaluación del estado redox en hígado.....	51
8.2.1	Estado pro oxidante.	51
8.2.2	Estado anti oxidante.....	52
9.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
9.1	Características clínicas del Síndrome Diabetogénico	54
9.2	Sistema redox hepático.....	64
10.	CONCLUSIONES	68
11.	PERSPECTIVAS	69
12.	REFERENCIAS.....	70
13.	APÉNDICES	85

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviación	Significado
4-HDA	4-hidroxiálquenos
ADP	Adenosina difosfato
AGL	Ácidos grasos libres
Akt	Proteína quinasa B
apoB	Apolipoproteína B
ApoC3	Apolipoproteína C3
ATP	Adenosina trifosfato
CETP	Proteína de transferencia para ésteres de colesterol
ChREBP	Proteína de unión al elemento sensible a los carbohidratos
CO ₂	Dióxido de carbono
CoQ	Coenzima Q
CTE	Cadena transportadora de electrones
ECNT	Enfermedades crónicas no transmisibles
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavin mononucleótido
G6ASA	Glucosa 6 fosfatasa
GIP	Péptido inhibitorio gástrico
GLP-1	Péptido similar a glucagon
GLUT 4	Transportador de glucosa 4
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GT	Glutación transferasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HOMA-IR	Insulin resistance Homeostatic model assessment
HSL	hormona sensible a lipasa
IKK β	Inhibidor del factor nuclear kappa-B
IRS-2	Sustrato del receptor de insulina 2
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDN	Lipogénesis de novo
LPL	Enzima lipoproteín lipasa
MDA	Malondialdehído

MTP	Proteína microsomal transportadora de triglicéridos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NAFLD	Hígado graso no alcohólico
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NO	Óxido nítrico
NOS2	Sintasa de óxido nítrico inducible
O ₂	Oxígeno molecular
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGAs	Productos de glicación avanzada
PIP3	Fosfatidil inositol trifosfato
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa B
PPARα	Receptor activado por proliferador peroxisomal alfa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
sdLDL	Lipoproteínas de baja densidad pequeñas y densas
SOD1	Enzima superóxido dismutasa 1
SOD2	Enzima superóxido dismutasa 2
SREPB-1c	Factor 1 de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides
TGF-β-1	Factor de crecimiento tumoral β 1
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria.....	18
Figura 2. Representación esquemática de las características celulares en condiciones normal y diabetes 2.....	18
Figura 3. Mecanismo de daño hepático producido por la diabetes.....	25
Figura 4. Disglucemia y resistencia a insulina en el modelo de síndrome diabetogénico .	46
Figura 5. Determinación de índices a partir de la glucemia e insulinemia en ayunas	47
Figura 6. Dislipidemia en un modelo con síndrome diabetogénico.....	49
Figura 7. Determinación de índices lipoproteicos.....	50
Figura 8. Evaluación del estado pro oxidante.....	51
Figura 9. Evaluación del sistema antioxidante: Glutación y estimación del radio 2GSH/GSSGt	52
Figura 10. Evaluación del estado anti oxidante	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Duración de la dieta en cada grupo.....	34
Tabla 2. Composición de la dieta hipercalórica - hiperglúcida.....	35
Tabla 3. Fórmulas para calcular diversos índices a partir de la relación glucosa – insulina.	40
Tabla 4. Fórmulas para el cálculo de índice aterogénicos.....	40

RESUMEN

La conducta alimentaria ha ido modificándose para cubrir los requerimientos necesarios para la supervivencia y reproducción, en los últimos años ha incrementado el consumo de alimentos altamente procesados que contienen principalmente carbohidratos refinados. La dieta hipercalórica hiperglúcida genera una respuesta metabólica y neuro-hormonal antes, durante y después de su consumo, lo que promueve su almacenamiento en tejido adiposo como resguardo energético. La ingesta crónica de alimentos con alta densidad energética promueve el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles como la obesidad y la diabetes. Particularmente la patofisiología diabética implica involucra a la hiperglicemia, resistencia insulínica e inflamación crónica, lo que desencadena dislipidemia y complicaciones a nivel hepático como el hígado graso no alcohólico, además existe una generación excesiva de radicales libres a causa de la gran demanda energética a nivel mitocondrial, lo que también contribuye al daño celular al tejido hepático.

En este trabajo, se logró evaluar el sistema redox hepático en un modelo con síndrome diabetogénico, el cual evidenció una hiperglicemia, hiperinsulinemia y dislipidemia características de esta condición, además se determinó un estado de estrés oxidativo debido al predominio de las especies oxidantes mediante la cuantificación de los productos de la peroxidación lipídica y la producción de nitritos; por otra parte, se logró estimular la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del glutati6n, la enzima glutati6n reductasa mostr6 una baja actividad mientras que la enzima glutati6n peroxidasa mostr6 una gran actividad, lo cual es consistente con la alteraci6n en las concentraciones de glutati6n oxidado y reducido.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Nutrición en México

La nutrición en México está basada en las tradiciones propias de cada región, las cuales se heredan en el núcleo familiar y se comparten con la población, lo cual influye en el estado alimentario y, por ende, en la salud de la sociedad ([Rodríguez, Leandro., 2011](#)).

La cultura alimentaria en México se basa en alimentos cultivados desde épocas prehispánicas, como el frijol, maíz y chile, además de otros ingredientes como hortalizas y gran variedad de granos, semillas y frutas. Dichos alimentos han sido parte de una dieta equilibrada con los nutrimentos necesarios para el buen desarrollo y funcionamiento del organismo. Sin embargo, paulatinamente la dieta mexicana se ha modificado y adaptado a los cambios socio-económicos ([Gómez & Velázquez, 2019](#)).

En México, el incremento de la urbanización, la industrialización y las jornadas laborales han traído consecuencias en la forma en que la sociedad distribuye sus alimentos en el transcurso del día, los procesos industriales afectan la calidad y cantidad de nutrimentos para poder abastecer a la población, como consecuencia la calidad nutricional se ve disminuida y la proporción de macronutrientes es insuficiente e inapropiado para cubrir el requerimiento calórico de cada individuo. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la nutrición es el consumo de alimentos en relación con las necesidades energéticas del organismo, en este sentido, una mala nutrición altera el desarrollo físico y mental, disminuye la capacidad del organismo para hacer frente a las enfermedades y, por ende, disminuye la productividad del individuo ([OMS, 2019](#)).

Así mismo, en la NOM-043-SSA2-2005 se define dieta al conjunto de alimentos que se consumen durante el día, lo que constituye la unidad de la alimentación. Una dieta balanceada cumple con las siguientes características:

- *Completa*: Debe contener todos los nutrimentos, es decir, macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) y micronutrientes (vitaminas y minerales) en cada comida.
- *Equilibrada*: Las proporciones de macronutrientes y porciones de cada alimento deben ser adecuadas para cada individuo.
- *Inocua*: Que no cause daño y esté libre de microorganismos patógenos, toxinas y contaminantes.
- *Suficiente*: Debe contener todos los nutrimentos necesarios para cumplir el requerimiento calórico de cada individuo, permitiendo una buena nutrición y un desarrollo saludable.
- *Variada*: Debe estar formada por diferentes alimentos de todos los grupos.
- *Adecuada*: Debe considerar y adaptar el plan alimenticio a los gustos, cultura y economía del paciente sin que se alteren las características anteriores ([NOM-043-SSA-2012](#)).

Los principales cambios en la dieta mexicana han sido la incorporación de alimentos altamente procesados, bebidas endulzadas artificialmente, la comida rápida, el marketing masivo alusivo a la alta disponibilidad y accesibilidad de dichos alimentos; los factores reportados como barreras a la hora de alimentarse saludablemente son: la falta de conocimiento, tiempo y/o dinero para comprar, preparar y/o consumir alimentos saludables, hábitos familiares, la preferencia por consumir bebidas azucaradas y comida densa en energía, la falta de motivación y el desagrado por el sabor de las verduras ([Ensanut MC 2016](#)), dichos hábitos afectan negativamente a la salud de las personas, puesto que son factores que a largo plazo afectan la calidad de vida.

Actualmente en México se presentan problemas de salud importantes como la desnutrición y obesidad, siendo este último de gran relevancia en los últimos años debido a que las cifras continúan incrementando y la educación nutricional es nula desde la infancia, las complicaciones surgen de manera progresiva e impactan la calidad de vida durante su progresión ([Más Sarabia, et al. 2005](#)).

Por otra parte, el pensamiento dicotómico limita la elección de una gran variedad de alimentos, en este sentido, se clasifica a la comida como saludable o mala, lo cual impacta psicológicamente el comportamiento a la hora de consumir alimentos y da paso a desórdenes alimenticios, comer en exceso y no poder mantener un peso saludable ([Sohee Lee, 2018](#)). Sin embargo, una dieta flexible sin restricciones de alimentos brinda mayor saciedad y bienestar, en comparación con una dieta hipercalórica basada en alimentos hiperpalatables; estos alimentos contienen ingredientes que generan un gran impacto a nivel energético, neuronal, metabólico y hormonal. Dicha conducta se ve influenciada por señales que transmiten información nutricional desde el intestino hacia el cerebro, las cuales regulan la elección de los alimentos ([Small, et.al. 2019](#)). Recientemente, Hall y colaboradores mencionan que la exposición a alimentos procesados y densos en calorías está asociada a una alta prevalencia de obesidad y diabetes en América ([Hall, et al 2019](#); [CDC, 2019](#)).

Ante un exceso calórico proveniente de carbohidratos, el hígado y el páncreas son los principales órganos que se encargan de generar las adecuaciones para mantener niveles basales de glucosa en sangre; el páncreas es el encargado de secretar las hormonas responsables principalmente de este proceso, como la insulina, y de manera opuesta el glucagón ([Rathinam, et al. 2014](#)); el hígado también participa en la dinámica del metabolismo de carbohidratos, ya sea almacenando el exceso de estos en glucógeno (después de una comida), o transformándolos en ácidos grasos para su almacenamiento en tejido adiposo ([Rui, 2014](#)), este último ha sido de gran importancia en los últimos años, debido a que produce citocinas responsables del desarrollo de inflamación crónica a largo plazo, siendo un factor clave para el desarrollo de alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina ([Burhans, et al. 2018](#)).

A nivel neuronal, se ha estudiado que el ingreso de glucosa y lípidos al intestino produce un incremento inmediato en los niveles de dopamina extracelular ([Kasper, et al. 2018](#)). Esto ocurre mediante un mecanismo regulado por el receptor activado por proliferadores peroxisomales (PPAR α), el cual se expresa en los enterocitos duodenales y del jejunio en intestino delgado y produce señales hacia el nervio vago.

La activación de neuronas sensoriales vagales que se proyectan hacia el ganglio nudoso derecho, cerebro posterior, sustancia negra y estriado dorsal es importante para la reforzar la preferencia por ciertos alimentos y la producción de dopamina ([Ruíz, et al. 2008](#)). Como respuesta hormonal, el consumo de alimentos está relacionado con los cambios en la grasa corporal, regulado por hormonas como la leptina, la cual también ejerce sus funciones a nivel cerebral y actúa sobre los neurocircuitos que regulan la saciedad ([Klok MD., et al. 2007](#)). No se ha descartado que en sujetos obesos exista resistencia a la leptina en hipotálamo, puesto que una señalización reducida de la leptina conduce a hiperfagia y ganancia de peso ([Munzberg, H. et.al. 2004](#)). Dichos efectos conducen al desarrollo de obesidad y con ello, la progresión a enfermedades crónicas no transmisibles, como la diabetes.

1.2 Enfermedades crónicas no transmisibles

En la actualidad, las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) representan un problema de salud pública al ser las responsables del 70% de las muertes en los países en desarrollo ([Unwin N. 2006](#)). Dentro de esta clasificación se encuentran la enfermedad cardiovascular, enfermedades respiratorias crónicas, cáncer y diabetes ([GBD, 2015](#)).

La obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de patologías como la diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. Dicha afección se presenta debido a diferentes causas ([Sahoo, K. et al. 2015](#)):

- *Predisposición genética*: mutaciones en los genes que codifican para la síntesis de proteínas y receptores involucrados en vías metabólicas.
- *Factores étnicos*: distribución del tejido adiposo que se refleja en fenotipos diferentes y específicos en cada región del mundo.
- *Nutrición*: Dieta conformada por alimentos densos en calorías provenientes de azúcares y harinas refinadas, lo que conlleva a un exceso energético mayor que el gasto calórico. Este balance positivo de energía afecta e

incrementa el tamaño de los depósitos de grasa y promueve el desarrollo de resistencia a la insulina.

- *Actividad física*: Un nivel bajo de actividad física conduce a una disminución del gasto energético y un incremento de tejido adiposo.
- *Microbiota intestinal*: la microbiota intestinal de un sujeto obeso promueve la extracción y almacenamiento de energía a partir de compuestos que normalmente son desechados, además existe un incremento del lipopolisacárido en la circulación, lo cual contribuye al desarrollo de inflamación crónica de bajo grado; la producción de citocinas inflamatorias interfiere con la señalización de insulina, manteniendo un entorno favorable para el desarrollo de síndrome metabólico.

En México, la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños y adultos se ha incrementado en las últimas tres décadas. En localidades rurales dicha prevalencia aumentó 8.5%, mientras que en zonas urbanas el aumento fue de 1.8%, al categorizar por sexo, la prevalencia de obesidad abdominal en hombres es de 65.4% y de 87.7% en mujeres ([Ensanut MC 2016](#)).

Como se ha mencionado, la obesidad es un factor predisponente para el desarrollo de diabetes, la cual se caracteriza por tejidos resistentes a la acción de la insulina, incremento de glucosa plasmática y dislipidemia. La diabetes se ha convertido en un problema de salud pública en México, debido a que esta condición afecta niños, jóvenes, adultos y ancianos. Según los resultados obtenidos en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, la prevalencia de diabetes tipo 2 es del 9.4%, es decir, hay más de 6.4 millones de adultos diagnosticados ([Gutiérrez, et al. 2012](#)) y se espera que para 2030 esta cifra se eleve al 27.2% ([Gaytán, et al. 2018](#)).

1.3 Dietas hipercalóricas como factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad crónica no transmisible.

Una dieta equilibrada en cuanto a composición nutricional y valor calórico mantiene un balance energético, ambiente hormonal y un peso corporal estables. El gasto calórico diario está conformado por: calorías necesarias para la tasa metabólica basal cuando el organismo está en reposo, calorías necesarias para absorber y metabolizar los alimentos (también conocido como “efecto térmico de la comida”), y las calorías gastadas durante la actividad física ([Krupa, et al. 2004](#)). Cuando una dieta no cumple estas características, se tiende a consumir más calorías de las requeridas para realizar las actividades del día, provocando un aumento de masa corporal, de la cual un 60 a 80%, es grasa. Dichas calorías provienen de alimentos de fácil adquisición y accesibilidad por cualquier consumidor, sin embargo, su ingesta frecuente (debido a la gran palatabilidad) dentro de una dieta conlleva a un exceso de calorías ingeridas. La dieta hipercalórica es un tipo de dieta donde se consumen más calorías de las que se gastan durante el día, dichas calorías pueden ser provenientes del sobre consumo de carbohidratos o grasas, aunado a un estilo de vida sedentario ([Dam & Seidelli, 2007](#)).

1.3.1 Dietas hipercalóricas

En la actualidad, las personas se encuentran expuestas a una gran variedad de alimentos procesados, cuyo consumo está influenciado por la mercadotecnia, haciendo que estos sean consumidos de manera frecuente, incorporándolos a su alimentación diaria. Simultáneamente, la falta de educación nutricional sobre cómo manejar porciones de alimentos de manera individualizada, el desconocimiento de los beneficios de una alimentación balanceada y los efectos nocivos de una dieta alta en carbohidratos y grasas, conllevan a un sobre consumo de macronutrientes, como se ha mencionado en anteriores estudios, permitiendo el desarrollo de alteraciones metabólicas ([Pi-Sunyer, 2000](#)). Cada individuo posee un gasto calórico

diario que debe cubrirse con una alimentación equilibrada, cuando se tiende a consumir más calorías de las que se gastan, existe un excedente calórico que se almacena en tejido adiposo como resguardo energético. Una dieta hipercalórica se refiere al consumo excesivo de calorías provenientes de un consumo extra principalmente de carbohidratos o grasas. Dichos macronutrientes generan una respuesta metabólica y neuro-hormonal antes, durante y después de su consumo ([Ishizuka, et al. 1983](#)).

1.3.2 Dieta hipercalórica-hiperglúcida

La dieta hipercalórica-hiperglúcida es un tipo de dieta conformada por alimentos altos en carbohidratos como azúcares y harinas refinadas, presentes en alimentos ya sean procesados (comida rápida) o de origen natural (frutas, semillas, tubérculos, etc.). En los alimentos procesados, los azúcares son añadidos para dar sabor, color, como conservadores o para equilibrar la acidez ([Goldfein & Slavin, 2015](#)). Los principales ingredientes de los alimentos procesados altos en azúcares son: harina de trigo, jarabe de maíz de alta fructosa, jarabe de caña, jarabe de malta o de acre, o melaza, los cuales no tienen ningún beneficio nutricional a diferencia de los carbohidratos saludables como los granos enteros, frutas y verduras, que contienen vitaminas, minerales y fibra ([American Heart Association, 2018](#)).

El consumo de azúcares refinados como parte de una dieta alta en carbohidratos induce la aparición de enfermedades crónicas no transmisibles, al inicio existen compensaciones por parte del hígado y páncreas, hasta que se da inicio a alteraciones metabólicas como mecanismos de protección frente al daño de la alta ingesta energética. Existe evidencia epidemiológica donde se asocia la dieta alta en carbohidratos, diabetes y la aparición de hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) ([Yki-Jarvinen H, 2010](#)). A partir de esta correlación, se considera si la resistencia a la insulina predispone a la esteatosis hepática y con ello NAFLD o si la acumulación de lípidos en el hígado promueve la resistencia a la insulina ([Samuel VT, et al. 2010](#)).

1.4 Metabolismo celular de los macronutrientes.

El metabolismo celular es el conjunto de reacciones que se llevan dentro de la célula entre el citoplasma y los organelos, comprende reacciones de síntesis y degradación de moléculas, procesos conocidos como anabolismo y catabolismo, respectivamente. Durante el anabolismo se construyen moléculas o polímeros estructurales a partir de moléculas más pequeñas para lo cual se requiere energía, mientras que durante el catabolismo se lleva a cabo la degradación de moléculas o polímeros a moléculas más pequeñas para la obtención de energía. Ambos procesos deben estar equilibrados para el óptimo aprovechamiento de los carbohidratos, lípidos y proteínas, lo cual también está influenciado por el ambiente hormonal y ciclo circadiano ([Challet, E. 2013](#)).

1.4.1 Carbohidratos

Una vez que la glucosa se ha transportado a través de la membrana celular, se llevan a cabo reacciones químicas en diferentes sitios de la célula para producir energía ([El Bacha, et al. 2010](#)).

Inicialmente en el citosol se lleva a cabo la oxidación de glucosa o glucólisis, donde participan diez enzimas que catalizan reacciones secuenciales para producir dos moléculas de piruvato, durante este proceso se producen dos moléculas de ADP (adenosín difosfato) a partir de 2 ATP (adenosín trifosfato) durante la fase de inversión. En esta, el principal paso regulatorio es la producción de fructosa-1,6-bifosfato, siendo el sustrato de la enzima aldolasa que lo convertirá a gliceraldehído-3-fosfato, el cual puede ser transformado a 1,3-bifosfoglicerato, un acil de alta energía, o a una dihidroxi acetona fosfato, ambos productos reaccionan de forma reversible para producir finalmente dos moléculas de piruvato, dando como rendimiento un total de 2 ATPs y 2 NADH (nicotinamida adenina dinucleótido). La conexión entre el proceso anterior y el ciclo del ácido tricarboxílico es la oxidación del piruvato mediante un complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa, que se encarga de controlar la cantidad de acetil CoA. En la matriz mitocondrial se lleva a

cabo la formación de dos acetil CoA a partir de dos piruvatos produciendo 2NADH con liberación de dióxido de carbono (CO_2), el acetil CoA proporcionará el grupo acetilo para el inicio del ciclo del ácido cítrico. En un solo ciclo se liberan dos moléculas de CO_2 , se generan tres moléculas de NADH, una de FADH_2 (flavín adenín dinucleótido) y una de ATP. Dichos productos deben ser multiplicados por dos para obtener el rendimiento total de la glucosa. NADH, FADH_2 y ATP funcionan como acarreadores electrónicos durante la fosforilación oxidativa ([Berg, et al 2002](#)).

1.5 Cadena transportadora de electrones

La cadena transportadora de electrones (CTE) es el último componente de la respiración aeróbica, en la que mediante una serie de reacciones de oxidación y reducción los electrones pasan rápidamente de un elemento a otro para reducir finalmente al oxígeno, mientras que los iones de hidrógeno son transportados a través de la membrana para contribuir al gradiente durante la quimiosmosis, y de esta forma proporcionar la energía suficiente para la fosforilación de ADP a ATP. Está compuesta de cuatro complejos conformados por subunidades proteicas altamente dinámicas, embebidos en la membrana mitocondrial interna y dos acarreadores difusibles que trasladan electrones entre ellos mediante un proceso de fosforilación oxidativa en la que participan moléculas que poseen equivalentes reductores: NADH y FADH_2 son moléculas altamente energéticas, puesto que contienen un par de electrones con un gran potencial de transferencia, dichas moléculas son acarreadas a través de las membranas mitocondriales por lanzaderas de electrones de malato o glicerol-3-fosfato. La lanzadera de malato es de mayor utilidad universal debido a que se generan 3 moléculas de ATP en lugar de 2ATP por moléculas de O_2 consumido ([Berg, JM., et al. 2002](#)).

El par de electrones de NADH son transferidos al complejo I conocido como NADH-CoQ reductasa, la Coenzima Q (CoQ) contiene flavin mononucleótido (FMN) que se encarga de pasar los electrones a través de flavoproteínas (presentes en los complejos I y II) y centros de FeS (presentes en los complejos I, II y III), reduciéndose de hierro férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}). La ubiquinona funciona como

un acarreador electrónico soluble en lípidos que transfiere los electrones al complejo III (citocromo c reductasa) donde son recibidos por el citocromo c1, citocromo b y finalmente al citocromo c, que también contienen grupos hemo que son reducidos; el citocromo c (acarreador electrónico móvil) transfiere los electrones al complejo IV (citocromo c oxidasa), donde son pasados desde el centro de cobre al grupo hemo a, hemo a3 y a un segundo centro de cobre (cambia de Cu^{2+} a Cu^+) ([Engelkin, L.R. 2015](#)).

Por otra parte, el complejo II (succinil-CoQ reductasa) transfiere los electrones provenientes de FADH_2 a través de proteínas con FeS y finalmente los electrones pasan a la CoQ. El FADH_2 que entra en esta vía también es generado desde la reacción mitocondrial de succinato a fumarato o de la lanzadera de glicerol-3-fosfato, desde esta ruta hacia la CoQ se desvía la generación de ATP y sólo se puede generar 2 ATP a partir de la oxidación de fumarato ([Kumari, A. 2018](#)).

Finalmente, desde el complejo IV, los electrones son recibidos por el oxígeno molecular con formación de agua, el oxígeno es el mejor receptor de electrones puesto que posee un gran potencial estándar de reducción.

A medida que los electrones son transferidos, los protones son expulsados desde la membrana mitocondrial interna para entrar en la matriz mitocondrial y fluir a través de protrusiones (F_0 y F_1), el componente F_0 se extiende en la membrana interna formando un canal de H^+ , y el componente F_1 sobresale hacia la matriz y contiene la sintasa de ATP, donde el ADP y P_i son condensados para formar ATP. El ATP producido se mueve a través de la membrana mitocondrial mediante un antiporte ADP/ATP. Adicionalmente, las unidades de los complejos pueden interactuar unas con otras para formar respirasomas ([Letts, et al. 2017](#)), como un mecanismo a través del cual las células se pueden adaptar a fuentes variables de nutrientes y a requerimientos celulares específicos, lo cual apoya la teoría del modelo de plasticidad de la cadena de transporte de electrones mitocondrial ([Lapuente-Brun, E., et al. 2013](#)).

1.6 Generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria

La cadena transportadora de electrones es una de las principales fuentes de especies reactivas de oxígeno (ROS) como el superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxil ([Loschen et al. 1971](#)). Bajo condiciones fisiológicas son componentes de múltiples vías celulares puesto que participan en funciones metabólicas y de señalización ([Sabharwai & Schumacker, 2014](#)). Dependiendo del contexto y estímulo, su producción da lugar a múltiples respuestas celulares como adaptación a la hipoxia, diferenciación celular, autofagia, inflamación o respuesta inmune ([Dunn et al. 2015](#)), se generan durante el ciclo del ácido tricarboxílico y a través de la oxidación de intermediarios de la fosforilación oxidativa en la mitocondria.

El ciclo del ácido tricarboxílico involucra la participación de enzimas localizadas en la matriz mitocondrial que remueven electrones de los metabolitos intermediarios, como la NADH deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa, α -cetoglutarato y succinato deshidrogenasa, acil-CoA deshidrogenasa (que participa en la oxidación de ácidos grasos), las cuales contienen grupos prostéticos como FAD o FMN que las hace susceptibles a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), específicamente el grupo flavin tiene el potencial de generar superóxido. A pesar de que la mayoría de las enzimas deshidrogenasas utilizan NAD o NADP como acarreadores electrónicos, no participan directamente en la generación de ROS, puesto que los equivalentes electrónicos están unidos covalentemente, lo que previene la oxidación de un acarreador reducido por O_2 ([Sabharwai & Schumacker, 2014](#)).

El complejo I produce grandes cantidades del radical superóxido mediante dos mecanismos: cuando el ratio NADH/NAD⁺ es tan alto, que el FMN se encuentra reducido y reacciona con el O_2 , y cuando la mitocondria opera en modo 2, es decir, el suministro de electrones reduce el pool de CoQ (en presencia de un elevado potencial de membrana) lo cual lleva a los electrones en CoQH₂ hacia el complejo I, de esta manera NAD⁺ se reduce a NADH en el sitio de FMN. A este proceso se le

conoce como transporte inverso de electrones ([Hirst, J. et al. 2008](#)), en donde, el superóxido es liberado hacia la matriz mitocondrial.

El complejo III transfiere los electrones desde la CoQ al citocromo c y en este proceso también hay una producción de superóxido en concentraciones basales. CoQH₂ se une al sitio Q₀ y un electrón es transferido al centro FeS, estableciéndose una cadena de alto potencial, y se reduce el citocromo C antes de pasar al complejo IV y al oxígeno molecular. El otro electrón es transferido al sitio Q_i mediante una cadena de bajo potencial hacia el citocromo b, sin embargo, durante el ciclo de reducción de la ubiquinona puede haber acumulación de QH[•] en el sitio Q₀ con la subsecuente producción de superóxido que es liberado hacia el espacio intermembranal y a la matriz mitocondrial ([Jastroch, M. et al. 2010](#)).

Posteriormente el superóxido es dismutado a peróxido de hidrógeno mediante la enzima superóxido dismutasa 2 (SOD2) en la matriz mitocondrial y la superóxido dismutasa 1 (SOD1) en el espacio intermembranal (figura 1). Dadas las propiedades electrofílicas y el corto tiempo de vida media, el superóxido puede atravesar la membrana externa mitocondrial y participar en la transducción de señales en la célula o reaccionar el óxido nítrico para formar peroxinitrito, una molécula que puede dañar la integridad mitocondrial y celular de manera irreversible. En contraste, el peróxido de hidrógeno es electrofóbico y más estable que el superóxido, y también puede actuar como una molécula señalizadora en las células ([Li, et al. 2013](#)).

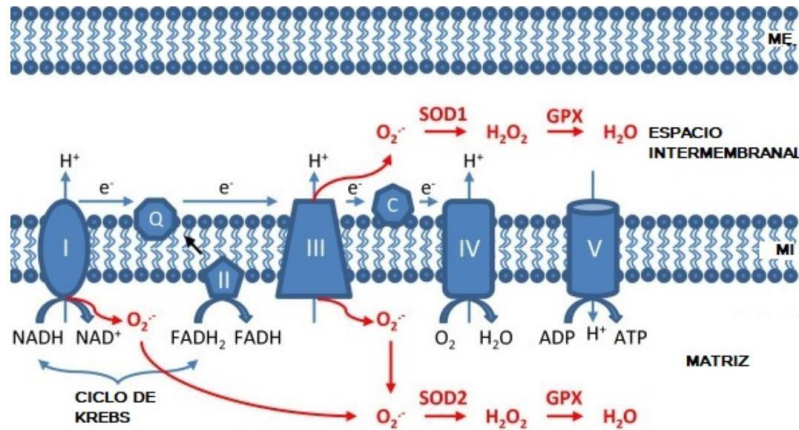


Figura 1 Producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria. Los electrones de NADH y FADH₂ pasan a través de la cadena respiratoria mediante reacciones de fosforilación oxidativa, durante este proceso en los complejos I y III se forma el radical superóxido el cual es dismutado a peróxido de hidrógeno mediante enzimas específicas (SOD1, SOD2). ME: membrana externa; MI: membrana interna. Tomado y modificado de Xinyuan, et al. 2013.

1.7 Síndrome Diabetogénico: Patogenia

El Síndrome Diabetogénico es un conjunto de alteraciones metabólicas que se presentan como consecuencia de un sobreconsumo energético crónico proveniente principalmente de los carbohidratos y/o lípidos. Dicha afección se asocia a diabetes tipo 2, en la cual coexisten desregulaciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, comprometiendo las funciones básicas para la supervivencia del organismo ([Zanella, et al. 2001](#)).

La diabetes tipo 2, está caracterizada por una producción insuficiente de insulina por parte de las células beta pancreáticas y/o una acción limitada de la hormona

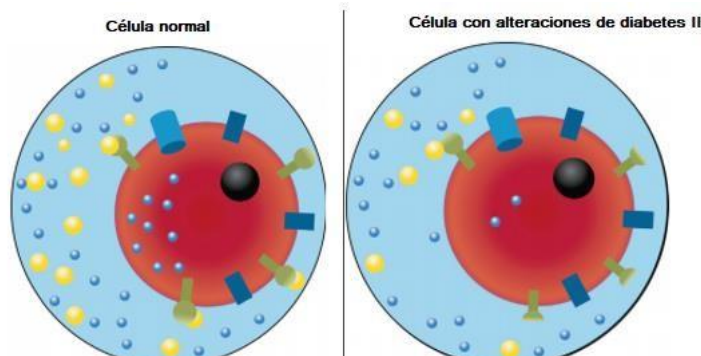


Figura 2. Representación esquemática de las características celulares en condiciones normal y diabetes 2. (Tomado y modificado de Litwack, G. 2018)

sobre tejidos periféricos, poca utilización de la glucosa, fallas en la cascada de señalización de insulina (insulino-resistencia) o en los transportadores de glucosa, provocando un estado de hiperglicemia crónico y desfavorable en el paciente o modelo de estudio (Figura 2) ([Litwack, G. 2018](#)).

1.7.1 Disglucemia

Las fluctuaciones en las concentraciones de glucosa en sangre como respuesta a la ingesta de alimentos, son completamente normales en personas que no padecen alguna alteración metabólica. Sin embargo, puede sobrepasar los niveles clínicamente normales durante el ayuno y la fase postprandial ante un fallo en la producción y/o señalización de la insulina en los tejidos insulino-dependientes ([Malone & Hansen, 2018](#)). La hiperglicemia se caracteriza por niveles altos de glucosa en sangre, lo cual puede ser causado por diversos factores, principalmente por una secreción reducida de insulina de las células de Langerhans, disminución en la captación y utilización de glucosa por los tejidos periféricos además de otros mecanismos como el incremento de la reabsorción renal de glucosa, disminución del efecto de las incretinas y el incremento de la producción de la glucosa hepática ([DeFronzo, et al. 2015](#)), dichos factores también pueden desarrollarse en individuos con sobrepeso, historia familiar de diabetes tipo 2, presencia de hiperlipidemia o hipertensión, diabetes gestacional y síndrome de ovario poliquístico ([Moury & Badireddy, 2019](#)).

A pesar de varios estudios *in vivo* e *in vitro* para elucidar los mecanismos de la diabetes mellitus, la patofisiología no está completamente elucidada, sin embargo, los procesos de hiperglucemia, resistencia a la insulina, disfunción de las células beta y apoptosis, hipoinsulinemia, inflamación, estrés oxidativo y disfunción mitocondrial están bien documentados ([Galicia, et al. 2020](#)).

La hiperglicemia crónica, resistencia a la insulina y defectos en la secreción de insulina son las principales características de la diabetes mellitus, y se desencadenan por múltiples factores, entre ellos la obesidad causada por dietas

hipercalóricas – hiperglúcidas y sedentarismo. El fenotipo diabético progresa a medida que las funciones de las células β pancreáticas declinan, dicho proceso consta de tres etapas ([Pérez, F. 2009](#)):

1. Resistencia insulínica periférica con valores normales de glicemia.
2. Resistencia insulínica periférica: se presenta en el músculo y el tejido adiposo, donde la sobreproducción de insulina no es suficiente para restaurar la glicemia postprandial a valores normales.
3. Declinación en el funcionamiento de las células β pancreáticas, donde disminuye la síntesis de insulina apareciendo la hiperglicemia en ayuno.

1.7.2 Resistencia a la insulina

La resistencia a la insulina es un estado patológico de respuesta celular inapropiada a la hormona insulina por parte de células dependientes a la insulina, como los adipocitos, miocitos y células musculares ([Yaribeygi, et al. 2018](#)). Actualmente es posible detectar dicho estadio antes de que se produzca intolerancia a la glucosa, puesto que una de las primeras manifestaciones es el fallo en la captación de glucosa por parte del músculo esquelético. La resistencia del tejido adiposo al efecto antilipolítico de la insulina, provoca un aumento en la lipólisis y, por consiguiente, la liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo y acumulación en tejido hepático, alteran la capacidad de la insulina para reprimir la producción de glucosa en el hígado. La alteración en la dinámica del metabolismo de carbohidratos y lípidos se presenta comúnmente en enfermedades como la obesidad, síndrome metabólico, hipertensión, arterioesclerosis, hígado graso no alcohólico y diabetes.

En los tejidos dependientes de insulina (músculo, adipocitos y miocardiocitos) de individuos con alteraciones en el metabolismo de la glucosa, la concentración de insulina es mayor en comparación con tejidos sensibles a las acciones insulínicas durante el ayuno, por lo tanto, el aumento progresivo, es parte de una respuesta adaptativa del páncreas para compensar el deterioro de la homeostasis de la glucosa. Cuando la concentración de glucosa es mayor a 140 mg/dL en ayuno

(en humanos), la célula β es incapaz de mantener una tasa elevada de secreción de insulina, por lo tanto, ésta decae y se inicia la producción hepática de glucosa ([DeFronzo, R. 2004](#)).

1.7.3 Resistencia hepática a la insulina

El hígado es un órgano involucrado en el mantenimiento de energía para el organismo, sin embargo, los defectos en la señalización de la insulina tienen consecuencias en el balance energético y el metabolismo en general. La resistencia hepática a insulina se refiere al incremento de la producción de glucosa en los hepatocitos debido al incremento de la actividad de enzimas gluconeogénicas. A nivel molecular, PKB (proteína quinasa B), un mediador de la señalización de la insulina, es necesario para la fosforilación de factores de transcripción Foxo ([Meshkani, et al. 2009](#)).

La resistencia a la insulina en hígado es un factor importante para el desarrollo de dislipidemia, caracterizada por el incremento de triglicéridos, lipoproteínas pequeñas de baja densidad y disminución del colesterol de alta densidad. Particularmente, el incremento de diacilglicerol en los hepatocitos causa la activación y translocación de PKC a la membrana celular, lo que resulta en la inhibición de la señalización de insulina ([Kolczynska, et al. 2020](#)); la disminución en la fosforilación del sustrato del receptor de insulina, IRS-2, desencadena la supresión de la fosforilación de la sintasa-quinasa de glucógeno lo que conlleva la disminución de la síntesis de glucógeno, además, la alteración en la actividad de Akt2 reduce la supresión de la gluconeogénesis hepática promoviendo la translocación de FOXO1 al núcleo para incrementar la expresión de enzimas como PEPCK, G6asa y PIP3 ([Gross, et al. 2008](#))

1.7.4 Hiperglucemia

La hiperglicemia es el resultado del desbalance entre la producción de glucosa hepática y el consumo de glucosa en la dieta, además del fallo de la captación de glucosa mediada por insulina en tejidos como el músculo o tejido adiposo ([Lee, et al. 2017](#)). El efecto compensatorio crónico de la hiperinsulinemia y la gran demanda de los islotes pancreáticos conlleva un agotamiento en la producción de insulina, mientras que la producción de glucagón incrementa (hiperglucagonemia) como respuesta a la demanda energética celular, es decir, la disminución del ratio insulina-glucagón causa una alta producción de glucosa por el hígado, provocando hiperglicemia basal, mientras que después de la ingesta de alimento se produce un estado de hiperglicemia postprandial debido a la disminución de la acción de la insulina plasmática, reduciendo la utilización de glucosa en tejidos periféricos ([Giugliano, et al. 2008](#)).

En el hígado se llevan a cabo los procesos de glucogenólisis y gluconeogénesis, los cuales suministran la glucosa necesaria para el funcionamiento del organismo en condiciones de ayuno y durante el proceso de resistencia a la insulina, ésta se desarrolla a partir del agotamiento de los islotes pancreáticos que secretan insulina, esta hormona no es suficiente para poder unirse a su receptor, y se alteran las vías de fosforilación y señalización celular, en consecuencia disminuye la translocación de los GLUT 4 en la membrana celular, por lo tanto, la glucosa se mantiene en altas concentraciones en circulación afectando otros tejidos. Debido a la falta de insulina, se lleva a cabo la lipólisis en tejido adiposo, incrementando el flujo de ácidos grasos hacia el hígado, lo cual también estimula la vía gluconeogénica y como resultado incrementan los niveles de glucosa ([Galicía, et al. 2020](#)).

La elevación crónica de la glucosa plasmática conlleva al desarrollo de glucotoxicidad, lo cual afecta la secreción y acción de la insulina debido al incremento de la tasa de apoptosis y estrés del retículo endoplásmico de los islotes de Langerhans ([D'Alessandris, et al. 2002](#)). No obstante, la elevación de ácidos grasos libres (AGL) en circulación, induce en tejidos un proceso llamado lipotoxicidad, se ha descrito que los AGL inhiben directamente el transporte de

glucosa debido a la acumulación de diacilglicerol y acil-CoA graso, reduciendo la señalización intracelular de la insulina ([Lupi R, et al. 2002](#)), empeorando de esta manera el incremento de la gluconeogénesis hepática.

1.7.5 Dislipidemia

La dislipidemia es un desorden metabólico que promueve el desarrollo de arterioesclerosis y problemas cardiovasculares, y se caracteriza clínicamente por el incremento en los niveles de colesterol total y las lipoproteínas LDL, disminución de las lipoproteínas HDL y aumento de los triglicéridos ([Katz & Barrett, 2019](#)). Las causas se dividen en dos grupos, primarias y secundarias:

- *Primarias*: Contempla a las mutaciones genéticas en uno o varios genes que dan como resultado la sobre producción o defectos en la depuración de triglicéridos o LDL, o en la baja producción o excesiva depuración de HDL.
- *Secundarias*: Surgen a raíz de un estilo de vida sedentario y un consumo excesivo de calorías totales en la dieta, provenientes de grasas saturadas, colesterol y grasas trans, sin embargo, no se descartan patologías pre existentes como diabetes mellitus, hipotiroidismo, cirrosis biliar hepática, enfermedad renal y alcoholismo ([Davidson, 2019](#)).

Particularmente, en la diabetes mellitus existe un metabolismo lipídico alterado que es influenciado por diversos factores como la deficiencia o resistencia a la insulina, el incremento de adipocitoquinas e hiperglicemia ([Taskinen, 2003](#)). La deficiencia o resistencia a la insulina activa a la hormona sensible a la lipasa lo que incrementa la concentración de ácidos grasos no esterificados a partir de los triglicéridos almacenados en tejido adiposo, lo que ocasiona la producción de triglicéridos hepáticos y secreción de la apolipoproteína B (apoB), sin el efecto inhibitorio de la insulina sobre la apoB, las partículas VLDL secretadas son ricas en triglicéridos ([McEneny, et al. 2000](#)).

La dislipidemia surge como consecuencia del desbalance entre el flujo, captura, oxidación, esterificación de ácidos grasos y lipólisis de los triglicéridos. Durante la resistencia a la insulina y desarrollo de diabetes, existe una esterificación y re-esterificación alterada de los ácidos grasos en el tejido adiposo, influenciada por la supresión de la acción de la lipasa sensible a hormona mediada por insulina, una enzima limitante para la movilización de triglicéridos. Además, incrementa el flujo de ácidos grasos derivados de la lipólisis de lipoproteínas plasmáticas como VLDL y quilomicrones hacia otros órganos. Particularmente, en el hígado incrementa el pool de ácidos grasos. Por otra parte, la lipogénesis de novo también incrementa y se favorece el proceso de esterificación y no el de oxidación, esta vía es estimulada por la insulina vía SREPB-1c, regulando el almacenamiento hepático de triglicéridos, y el agrandamiento de las partículas es estimulado por altos niveles de glucosa vía ChREBP, a pesar del desarrollo de insulinoresistencia ([Wang, et al. 2015](#)). Los ácidos grasos esterificados se almacenan como triglicéridos en el citosol del hepatocito o se dirigen hacia la síntesis de VLDL; una alta producción de VLDL se refleja en la concentración elevada de VLDL plasmática y quilomicrones, los cuales, al ser metabolizados generan remanentes de ácidos grasos, lo que contribuye al pool hepático lipídico, favoreciendo un ciclo patogénico ([Lewis, et al. 2002](#)). Además, en la resistencia a la insulina, el nivel de quilomicrones se eleva por la sobreproducción a nivel intestinal y a una baja actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL), lo que impacta en el catabolismo de estas partículas y la secreción incrementada de apoC3 (inhibidor de LPL) al plasma contribuye a la disminución de la lipólisis ([Hirano, 2018](#)).

Por otra parte, en el hígado se produce gran cantidad de partículas VLDL1 (abundantes en triglicéridos), lo que promueve la generación de partículas LDL pequeñas y densas (sdLDL), reduciendo los niveles de HDL. Las sdLDL son más aterogénicas debido a que por su tamaño pueden atravesar fácilmente las paredes de las arterias, tienen menos afinidad al receptor de LDL y más tiempo de vida media en plasma ([Berneis, et al. 2002](#)). En los últimos años se ha puesto atención en el metabolismo lipídico y las complicaciones hepáticas que surgen como consecuencia de la resistencia a la insulina y diabetes en sujetos obesos.

1.8 Complicaciones hepáticas

Las complicaciones hepáticas se presentan en pacientes diabéticos que no llevan un control en los niveles de glucosa durante un largo período de tiempo. Las alteraciones en las acciones de la insulina como la supresión de la producción hepática de glucosa y la glucogenólisis, el flujo y baja oxidación de lípidos y la acumulación citosólica de ácidos grasos (esteatosis) contribuyen al desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico, además de la obesidad ([Hickman, et al. 2007](#)).

El daño hepático se caracteriza por el desarrollo de necrosis celular e inflamación debido al aumento del estrés oxidativo mitocondrial, el cual también es causado por la acción de mediadores inflamatorios y las adipocinas producidos ambos por un estado inflamatorio del tejido adiposo visceral y subcutáneo, estos activan a las células estelares y producen colágeno aumentando la producción del factor de crecimiento de tejido conjuntivo y acumulación de matriz extracelular favoreciendo la fibrosis (Figura 3).

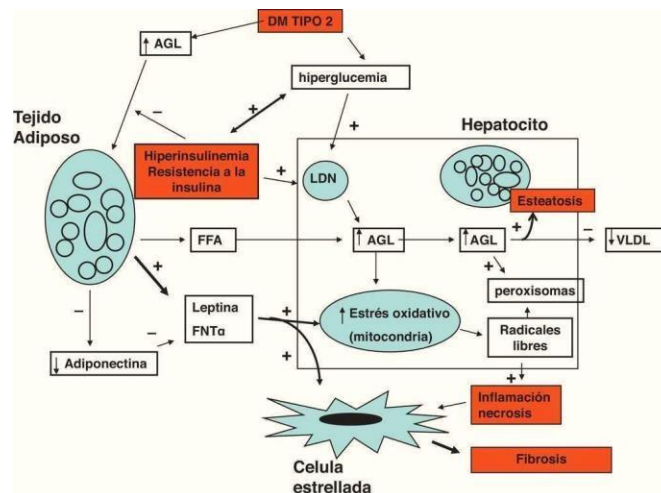


Figura 3. Mecanismo de daño hepático producido por la diabetes. La resistencia a la insulina promueve la lipólisis del tejido adiposo, los ácidos grasos libres (AGL) se acumulan en el hepatocito y entran en la ruta de la lipogénesis de novo (LDN), mientras que las partículas VLDL producen esteatosis. Debido a esta acumulación intracelular, la mitocondria no es capaz de oxidar la gran cantidad de ácidos grasos y simultáneamente las adipocinas, como la leptina y el factor de necrosis tumoral, promueven el desarrollo estrés oxidativo mitocondrial, lo que induce la inflamación y necrosis celular, las células estelares son responsables de la fibrosis. (Tomado y modificado de García, et al. 2013).

Durante la progresión del hígado graso no alcohólico, los productos de la peroxidación de lípidos provocada por los radicales libres, así como el TNF- α , promueven la disfunción mitocondrial: los productos de la lipoperoxidación y demás radicales libres pueden atacar e inactivar los complejos de la cadena respiratoria. El TNF- α actúa sobre su receptor e incrementa la permeabilidad de las membranas mitocondriales, lo que permite la salida del citocromo *c* hacia el citosol, de esta manera interrumpe el flujo de electrones del complejo III al complejo IV de la cadena ([Pessayre, et al. 2004](#)). Por otra parte, los pacientes que cursan esta enfermedad en conjunto con esteatohepatitis, presentan una disfunción mitocondrial más severa, además de presentar abultamiento de las mitocondrias, lesiones ultraestructurales e inclusiones paracristalinas, asociadas a un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa ([Tiniakos, et al. 2018](#)).

La apoptosis de los hepatocitos es iniciada por la ruptura de las membranas mitocondriales, lo que permite la salida de factores pro-apoptóticos y estimula los procesos de fibrogénesis en las células estelares, sin embargo, la alta tasa apoptótica tiene que ser compensada por un incremento en la tasa de proliferación celular, así como el daño al DNA por las especies reactivas de oxígeno, dichos eventos son factores potenciales para la generación de mutaciones genéticas ([Kanda, et al. 2018](#)).

1.9 Estado redox en el síndrome diabético

Como se ha mencionado anteriormente, la hiperglicemia es un factor importante para el desarrollo de diabetes y las altas concentraciones de glucosa no sólo tienen un impacto sobre los tejidos y órganos, sino que influyen en la activ

idad mitocondrial y la generación de especies radicalarias, lo que contribuye al desarrollo de la patología y futuras complicaciones.

Bajo condiciones hiperglicémicas, hay más flujo de glucosa hacia la vía glucolítica, lo que produce más piruvato y acetil-CoA y con ello, el exceso de NADH causa una

saturación electrónica sobre la cadena transportadora de electrones. El complejo I oxida más NADH a NAD⁺ y simultáneamente se producen más cantidades del radical superóxido, lo que en cada ciclo reduce la disponibilidad de NAD⁺ para transportar electrones hacia el oxígeno, permitiendo que el oxígeno sea reducido a superóxido por electrones que se fugan del complejo I al complejo III, dicho proceso se conoce como estrés reductivo); este radical es convertido a peróxido de hidrógeno por la enzima SOD, y este es convertido a radical hidroxil por metales iónicos, a su vez el superóxido reacciona con óxido nítrico y forma peroxinitrito. Estas especies producidas en gran cantidad agotan el sistema antioxidante y causan estrés oxidativo ([Xiao & Loscalzo, 2019](#)).

Existen cinco vías glucolíticas que bajo condiciones hiperglicémicas tienen importancia sobre la generación de especies reactivas de oxígeno ([Yan, 2014](#)., [Rosen, et al. 2001](#)):

1. Vía de la activación de la proteína cinasa C (PKC): la síntesis incrementada de diacilglicerol activa la PKC, lo que eleva los niveles de TGF- β 1, endotelina-1, NF- κ B y el factor de crecimiento endotelial-vascular, además de inducir la producción de especies reactivas de oxígeno por la NADPH oxidasa al catalizar la reducción del oxígeno molecular a superóxido, ya que la PKC induce la translocación de la subunidad p47^{phox} hacia la membrana para activar a esta oxidasa.
2. Productos de glicación avanzada (PGAs): involucra la formación de metilglioxal a partir de gliceraldehído-3-fosfato. El metilglioxal puede modificar proteínas a través de la glicación de aminoácidos, como la hemoglobina HbA1c, este proceso genera radicales libres y sobre regula la expresión de receptores de PGAs, lo que activa la vía de señalización de NF- κ B y contribuye al desarrollo de inflamación crónica.
3. Vía de la autooxidación del gliceraldehído: Durante la autooxidación del gliceraldehído, se genera peróxido de hidrógeno y α -cetoaldehídos.
4. Vía Poliol: En esta vía, la glucosa es reducida a sorbitol mediante una aldolasa, el sorbitol se convierte a fructosa por una deshidrogenasa. En este

proceso el NADPH se convierte a NADP, lo que aumenta la concentración de NADH y reduce el ratio NAD^+/NADH , sin embargo, la enzima glutatión reductasa requiere de NADPH para regenerar GSH a partir de GSSG, al no haber NADPH suficiente, los niveles de GSH también disminuyen y la capacidad antioxidante se ve comprometida.

5. Vía de la hexosamina: En esta vía se lleva a cabo la producción de glucosamina a partir de fructosa-6-fosfato mediante una amidotransferasa, GFAT, y el producto es convertido a UDP-N-acetilglucosamina, sustrato de la transferasa O-GlcNAc, la cual cataliza modificaciones postraduccionales en los residuos de serina y treonina de las proteínas. Esta vía está involucrada en la generación de estrés oxidativo y complicaciones diabéticas.

El estrés oxidativo crónico contribuye a la progresión de la diabetes y al desarrollo de complicaciones como retinopatía, neuropatía, cardiomiopatía y nefropatía.

Los pacientes diabéticos no controlados presentan un desequilibrio proteico general, es decir, el recambio proteico y las deficiencias dietarias disminuyen la disponibilidad de los aminoácidos cisteína y glicina para la síntesis de GSH, por lo tanto, los efectos del estrés oxidativo se ven promovidos por el descenso en el sistema antioxidante, sin embargo, se requieren estudios adicionales para evaluar los mecanismos de disponibilidad de aminoácidos en pacientes con diabetes ([Sekhar, et al. 2011](#)), además, se ha propuesto que el grado de hiperglicemia influye en la síntesis disminuida de glutatión, y que se ve influenciada por complicaciones microvasculares, lo cual también impacta sobre la actividad de las enzimas involucradas en ciclo redox del glutatión ([Lutchmansingh, et al. 2018](#)).

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La transformación social y económica como consecuencia de la globalización y factores culturales han modificado considerablemente la alimentación de los consumidores, propiciando hábitos alimentarios que impactan negativamente la salud de la población. Dichos efectos convergen en el desarrollo de enfermedades crónicas como la diabetes, la cual se va desarrollando a medida que las dietas hipercalóricas prevalecen en el sistema alimentario de un individuo durante gran parte de su vida.

La diabetes implica alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. Ante el excedente energético se requiere una mayor actividad mitocondrial, provocando un incremento en la producción de estrés oxidativo por encima de los niveles basales, simultáneamente la eficiencia del sistema antioxidante disminuye provocando una mayor carga de radicales libres, los cuales pueden provocar daño al DNA, peroxidación de lípidos de membrana y daño a los organelos celulares. El hígado es uno de los principales órganos afectados en el síndrome diabetogénico, debido a la gran acumulación de lípidos en los hepatocitos y en el tejido visceral que lo rodea, alterando de esta manera sus funciones metabólicas. Debido al gran impacto de este proceso, se plantea la siguiente pregunta científica:

¿El síndrome diabetogénico generado por el consumo de dietas hipercalóricas modifica el balance redox hepático?

3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles se ha incrementado con el paso del tiempo debido al consumo de dietas hipercalóricas de forma constante. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que una dieta hipercalórica – hiperglúcida favorece la aparición de resistencia a la insulina y progresión a síndrome diabetogénico en modelos animales. Los signos observados son similares a los que se presentan en el humano, siendo influenciado por diversos factores genéticos y ambientales. Los cambios metabólicos coincidentes afectan a diferentes tejidos, en particular el hígado es un órgano al cual se le ha puesto atención en los últimos años debido a que también desarrolla alteraciones metabólicas que impactan en el funcionamiento adecuado de todo el organismo.

Las alteraciones metabólicas como dislipidemia, disglucemia y resistencia a la insulina establecen un ambiente diabetogénico y favorecen la producción de radicales libres y pueden cambiar el estado redox. El hígado es un tejido con un alto umbral de soporte oxidativo ya que posee una importante batería antioxidante, sin embargo, en alteraciones metabólicas crónicas estas pueden decaer y al mismo tiempo desembocar en patologías como hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis, cirrosis, fibrosis y cáncer hepático, por lo que es imprescindible conocer cómo se afecta este balance redox en etapas tempranas de la patología.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el sistema redox hepático durante el síndrome diabetogénico en rata Wistar en etapa adulta.

4.2 Objetivos específicos

En ratas Wistar con síndrome diabetogénico:

- Valorar el estado oxidativo hepático mediante la cuantificación de malondialdehído (MDA), 4-hidroxi-alquenos (4-HDA) y nitritos (NO_2^-).
- Estimar el estatus antioxidante hepático mediante la determinación de la actividad enzimática de la glutatión peroxidasa, glutatión transferasa y glutatión reductasa.

5. HIPÓTESIS

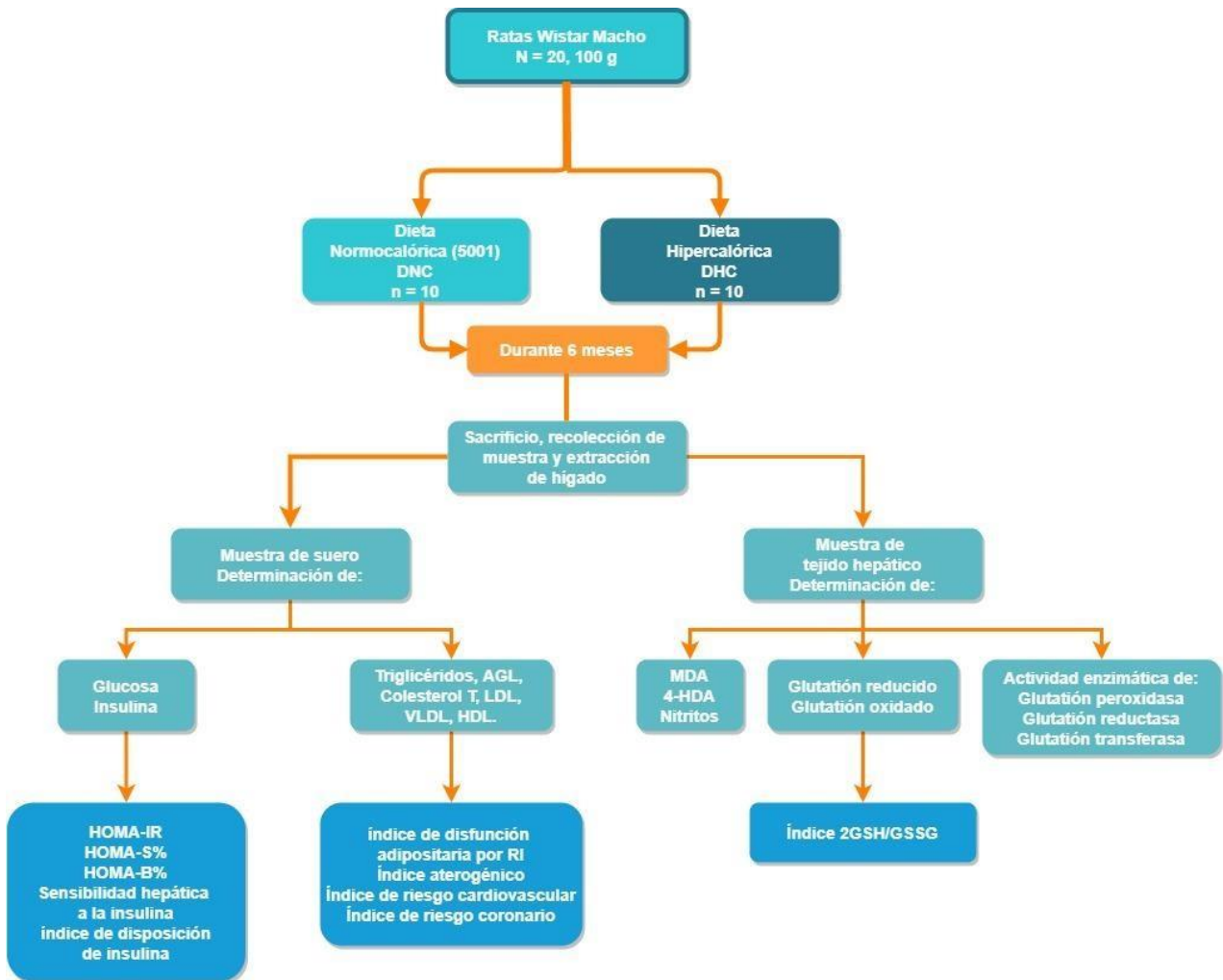
- **HIPÓTESIS NULA**

La dieta hipercalórica – hiperglúcida no favorece el desbalance del estado redox hepático en ratas con síndrome diabetogénico.

- **HIPÓTESIS ALTERNATIVA**

La dieta hipercalórica – hiperglúcida favorece el desbalance del estado redox hepático en ratas con síndrome diabetogénico.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Animales de experimentación

En este estudio se emplearon 20 ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 70 a 80 g, obtenidas del Bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. El manejo de los animales fue autorizado con el curso previo de Manejo de Animales de Laboratorio impartido por el bioterio, de acuerdo a los lineamientos del Comité para el Cuidado de los Animales de Laboratorio, el cual contempla los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana “Especificaciones técnicas para la producción, uso y cuidado de animales de laboratorio” NOM-062-ZOO-199. Los animales fueron alojados en cajas de policarbonato con serrín y mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C), humedad y ciclos de luz-oscuridad de 12 horas.

Los animales se pesaron continuamente hasta que alcanzaron los 100 g de peso, lo que equivale a 15 días de acondicionamiento. Posteriormente se dividieron en dos grupos asignados aleatoriamente a cada uno: el grupo control recibió una dieta normocalórica y el grupo problema recibió una dieta hipercalórica – hiperglúcida.

Grupo	N	Duración de la dieta
DNC	10	6 meses
DHC	10	6 meses

Tabla 1. Duración de la dieta en cada grupo. DNC: Dieta normocalórica, DHC: Dieta hipercalórica.

7.2 Dieta

La dieta del grupo con dieta hipercalórica – hiperglúcida tiene la siguiente composición:

Composición	Porcentaje calórico (kcal/g) DNC	Porcentaje calórico (kcal/g) DHC (MX/E/2013/047377)
Proteína	13.02	7.95
Grasa (extracto etéreo)	27.66	14.22
Fibra cruda	2.95	0.00
Carbohidratos	56.36	77.82
Total	99.99	99.99

Tabla 2. Composición de la dieta hipercalórica - hiperglúcida

7.3 Obtención de la muestra sanguínea

Se suspendió el alimento 4 a 5 horas antes de realizar la prueba. Tras anestésiar a las ratas (dosis de ketamina+xilazina 0.2 ml/100 g. vía intraperitoneal) se procedió a tomar muestra por punción intracardiaca y se les extrajo 700 µL de sangre (aproximadamente). Se recolectaron las muestras en un tubo eppendorf, enseguida se centrifugó la muestra a 8000 r.p.m. durante 10 minutos, se separó el suero y se resguardó a -70° C hasta su análisis.

7.4 Obtención de los tejidos

Después de la punción intracardiaca, se realizó una incisión en el abdomen de manera que queden expuestos los órganos, se realizó un corte en la arteria abdominal para el drenado sanguíneo y se colocó una cánula en la parte inferior izquierda del corazón para iniciar la perfusión con PBS hasta que los órganos no presentaron coloración rojiza. Se procedió a realizar un corte en los ligamentos del hígado (falciforme, ligamento triangular derecho e izquierdo, peritoneal, hepatoomental, hepatogástrico y hepatoduodenal) que unen los lóbulos al resto de los órganos digestivos. Cada hígado se almacenó inmediatamente en frascos de

plástico previamente etiquetados para su identificación y se mantuvieron en congelación a -70 °C.

7.5 Determinaciones bioquímicas:

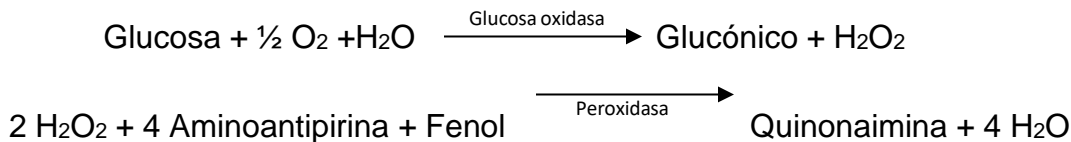
En los sueros obtenidos se procedió a la medición de: glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol, colesterol HDL, colesterol LDL, colesterol VLDL y ácidos grasos libres.

7.5.1 Determinaciones Séricas

- **Determinación de la concentración de glucosa sérica**

- a) **Fundamento**

La glucosa presente en la muestra origina un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



- **Determinación de la concentración de insulina sérica**

- a) **Fundamento**

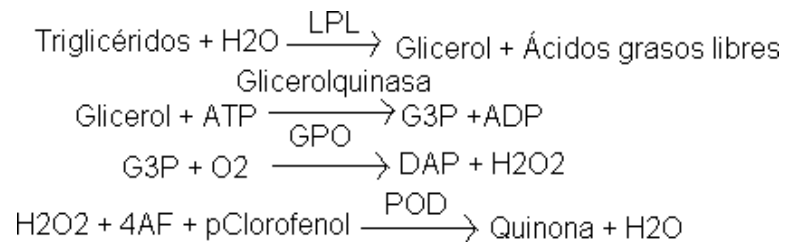
Ensayo Inmunoenzimométrico (Tipo 3): Los reactivos esenciales requeridos para un ensayo inmunoenzimométrico incluyen anticuerpos de una alta afinidad y especificidad (Ab), con epítopes de reconocimiento diferentes y distintos en exceso, enzima conjugada e inmovilizada, y antígeno nativo (Ag). En este procedimiento, la inmovilización toma lugar en la superficie del pozo en el microplato durante la interacción de streptavidina cubierto sobre el pozo y agregando exógenamente anticuerpo de insulina monoclonal biotinilado. Una vez mezclado el anticuerpo monoclonal biotinilado, el anticuerpo de enzima etiquetada y un suero que contiene el antígeno nativo, resulta una reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, para formar un complejo de sándwich soluble. Simultáneamente, el complejo es

depositado en el pozo a través de la reacción de alta afinidad de streptavidina y el anticuerpo biotinilado. Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-atado es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-limite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Utilizando diversas referencias del suero de los valores conocidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

- **Determinación de la concentración de triglicéridos.**

- a) **Fundamento**

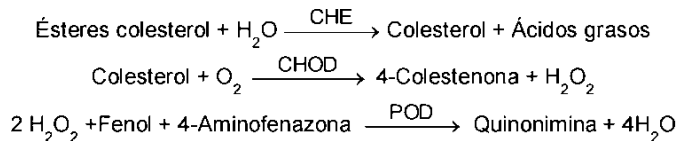
La concentración sérica de triglicéridos, se realiza por química líquida mediante reacciones acopladas que corresponden a una reacción coloreada que se evalúa por espectrofotometría, en la cual los triglicéridos se hidratan mediante una lipasa, mediante la cual se obtienen glicerol y ácidos grasos libres, el glicerol reacciona con ATP contenido en el reactivo reacción propiciada por la enzima glicerol cinasa, resultando glicerol-3-fosfato y ADP, el glicerol-3-fosfato se oxida por una reacción acoplada por una G-3-P-oxidasa dicha reacción tiene por productos dihidroxiacetona-P y peróxido de hidrógeno, este reacciona a su vez con 4-aminoantipirina y 4- clorofenol mediante una peroxidasa obteniéndose una reacción coloreada de quinonaimina que es medida a una longitud de onda de 505 nm.



- **Determinación del Colesterol**

- a) **Fundamento**

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado según la reacción siguiente:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada

- **Determinación del Colesterol HDL**

- a) **Fundamento**

El colesterol de las proteínas de baja densidad (LDL), las de muy baja densidad (VLDL) y los quilomicrones es hidrolizado por la colesterol oxidasa mediante una reacción enzimática acelerada no formadora de color. El detergente presente en el reactivo solubiliza el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de la muestra. El colesterol de HDL se cuantifica espectrofotométricamente mediante las reacciones acopladas descritas a continuación. El colesterol esterificado se hidrata mediante una colesterol esterasa, dando como resultado colesterol y ácidos grasos libres, el colesterol resultante sufre una semioxidación e hidratación por una colesterol oxidasa, dando como resultado colesteno y peróxido de hidrógeno, este se acopla a una reacción coordinada por una peroxidasa con 4-aminoantipirina y una solución buffer DSBmT obteniéndose como producto final quinonaimina, que presenta color y este es detectado por espectrofotometría a una longitud de onda de 505 nm.

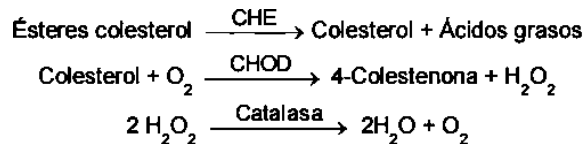
- **Determinación del Colesterol LDL**

- a) **Fundamento**

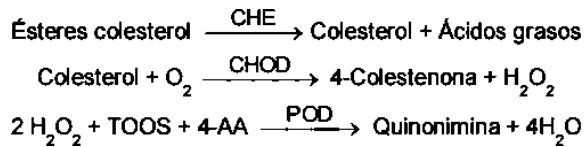
Determinación directa del LDLc (colesterol de lipoproteínas de baja densidad) sin necesidad de pre-tratamiento o centrifugado de la muestra.

La determinación se realiza en dos pasos:

1º Eliminación de lipoproteínas no-LDL



2º Medición de LDLc



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de LDLc presente en la muestra ensayada.

- **Determinación de ácidos grasos libres**

- a) **Fundamento**

El método se basa en la obra de W.C. Duncombe, el cual la extracción de los ácidos grasos libres de suero se realiza mediante el empleo de un solvente no polar como es el cloroformo, eliminando la interferencia de la bilirrubina por desarrollar el color final con ácido oxálico bis-(cyclohexylidenehidrazide), cCuprizona y midiendo la absorbancia a 620 nm, una parte del espectro dónde la bilirrubina no absorbe. (Soloni F, 1973).

- **Cálculo de índices**

Para el cálculo del índice HOMA y sus derivados se consideran los valores de las concentraciones de insulina y glucosa plasmáticas en ayunas:

Índice	Fórmula
HOMA-IR	$\frac{\text{Glucosa} \times \text{Insulina}}{2430}$
HOMA-S%	$\frac{1}{\text{HOMA} - \text{IR}} \times 100$
HOMA-B%	$\frac{\text{Insulina} \times 20}{\text{Glucosa} \times 18} - 3.5$
Índice de generación de insulina	$\frac{\text{Insulina}}{\text{Glucosa}}$
Índice de disposición de insulina	$\frac{\text{Índice de generación de insulina}}{\text{HOMA} - \text{IR}}$
Sensibilidad hepática a la insulina	$\frac{1000}{\frac{\text{Glucosa}}{18} \times \text{Insulina}}$

Tabla 3. Fórmulas para calcular diversos índices a partir de la relación glucosa – insulina.

Para el cálculo de los índices aterogénicos se consideran los valores de las concentraciones de triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL y colesterol VLDL:

Índice	Fórmula
Índice de disfunción adipocitaria	$\log \frac{\text{Triglicéridos}}{\text{Colesterol HDL}}$
Índice aterogénico	$\frac{\text{Colesterol total}}{\text{Colesterol HDL}}$
Índice de riesgo cardiovascular	$\frac{\text{Colesterol LDL}}{\text{Colesterol HDL}}$
Índice de riesgo coronario	$\frac{\text{Colesterol LDL} + \text{Colesterol VLDL}}{\text{Colesterol HDL}}$

Tabla 4. Fórmulas para el cálculo de índice aterogénicos.

7.5.2 Determinaciones en tejido hepático

- **Cuantificación de nitritos por el método de Griess (Chao et. al 1992; modificado por León Chávez, 1999)**

Fundamento: La producción de óxido nítrico fue estimada a través del contenido de ion nitrito (NO_2^-) en los sobrenadantes de tejido utilizando el método de Griess, el reactivo de Griess se compone de volúmenes iguales de dihidrocloruro de n-1-naftiletildiamino al 0.1% disuelto en agua destilada y sulfanilamida al 1.32% disuelta en ácido acético al 60%. La reacción colorimétrica fue inducida por la adición de 100 μL de reactivo de Griess a 100 μL del sobrenadante del tejido. Se ajustó la reacción a 1 mL con agua destilada. El producto de reacción fue leído en un espectrofotómetro a 540 nm. La concentración de NO_2^- fue determinada interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de NaNO_2 (0.5 a 10 μM), la cual fue determinada paralelamente en cada ensayo. La reacción de Griess se basa en la formación de un cromóforo por la reacción de sulfanilamida con nitrito en medio ácido, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas tales como el N-1-(naftil) etilendiamina dihidrocloruro. (Chao C, 1992).

- **Determinación de Malondialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alquenos (4-HDA)**

Fundamento de MDA y 4-HDA: Bajo condiciones de acidez y temperatura controlada (45 °C), el 1-metil-2-fenilindol reacciona con malondialdehído (MDA) y con 4-hidroxi-alquenos (4-HDA) formando un cromóforo estable con una absorbancia máxima a 585 nm. Usando ácido metanosulfónico, MDA y 4-HDA pueden ser medidos a 585 nm, mientras que al usar ácido clorhídrico posibilita la medición específica de MDA en presencia de 4-hidroxi-alquenos.

- **Determinación de los niveles de glutatión reducido y glutatión oxidado. (Irfan Rahman, et. Al. 2007)**

Determinación de glutatión reducido (GSH). Fundamento:

El ensayo se basa en la reacción de GSH con el reactivo de Ellman (DTNB), lo cual produce un cromóforo de TNB el cual tiene una absorbancia máxima a 412 nm y un aducto oxidado de glutatión-TNB (GS-TNB). La tasa de formación del TNB, medida a 412 nm, es proporcional a la concentración de GSH en la muestra. El producto GS-TNB es reducido por la glutatión reductasa (GR) en presencia de NADPH, reciclando el GSH para la reacción. Debido a que la GR reduce el glutatión oxidado formado en 2GSH, la cantidad de glutatión medido representa la suma del glutatión oxidado y reducido en la muestra ($[GSH]_{total} = [GSH] + 2 \times [GSSG]$). La variación en la absorbancia ($\Delta A_{412 \text{ nm min}^{-1}}$) debe ser lineal para que las mediciones sean consistentes, la linealidad es proporcional a la concentración total de GSH. La concentración de una muestra desconocida se determina calculándola con la ecuación linear o la curva de regresión lineal generada con varios estándares de GSH.

Determinación de glutatión oxidado (GSSG).

Fundamento:

El ensayo de GSSG en extractos celulares se dificulta debido a que el ratio GSH/GSSG es de 1:10, y la rápida oxidación de GSH tiende a alterar este ratio en favor del GSSG. Por lo tanto, GSSG debe ser medido inmediatamente para evitar la oxidación.

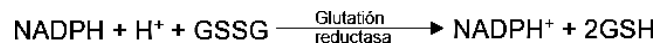
El método de reciclaje de la reductasa de glutatión oxidado es usado para la determinación de GSSG monitoreando el NADPH espectrofotométricamente mediante el método de Griffith. Los extractos celulares son tratados con 2-vinilpiridina, la cual reacciona con el glutatión reducido (GSH), el exceso de 2-vinilpiridina se neutraliza con trietanolamina.

Determinación de la actividad enzimática de Glutación Reductasa.

- **Ensayo de Glutación reductasa.**

Fundamento:

La enzima glutación reductasa es una enzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción de glutación oxidado (GSSG). El ensayo usando 5,5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) se basa en las siguientes reacciones:



Este ensayo sigue la espectrofotométricamente la disminución de la absorbancia de NADPH a 340 nm. La especificidad del ensayo permite la cuantificación de la glutación reductasa sin previa purificación.

Determinación de la actividad enzimática de Glutación peroxidasa

- **Ensayo de glutación peroxidasa. Fundamento:**

La enzima glutación peroxidasa es una selenoproteína que cataliza la siguiente reacción:



El ensayo es dependiente de la concentración de glutación reducido, por lo tanto, se añade GR para el reciclaje de GSSG, además, la azida de sodio bloquea la actividad de la enzima catalasa.

Determinación de la actividad enzimática de glutación transferasa

- **Ensayo de glutación transferasa. Fundamento:**

La enzima glutación transferasa tiene un papel fisiológico en la detoxificación de agentes alquilantes. Estas enzimas catalizan la reacción de dichos compuestos con el grupo sulfhidrilo -SH del glutación, neutralizando sus sitios electrofílicos y produciendo compuestos solubles en agua. Los conjugados de glutación son metabolizados por escisión de los residuos de glutamato y glicina, seguido de una

acetilación de los grupos amino libres del residuo cistínico, para producir finalmente ácido mercaptúrico.

7.6 ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados obtenidos en el grupo experimental se compararon con los obtenidos en el grupo control mediante la prueba “t” de Student, se consideraron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Modelo animal con Síndrome Diabetogénico

Para generar el síndrome diabetogénico, el grupo problema fue alimentado con una dieta hipercalórica – hiperglúcida durante 6 meses y posteriormente se procedió a cuantificar las concentraciones séricas de glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, LDL y VLDL para confirmar el modelo.

La concentración de glucosa e insulina en el grupo con dieta hipercalórica fue mayor que en el grupo control, dicho aumento evidenció una diferencia significativa entre ambos grupos de 77% y 429%, respectivamente (figura 4A-B). Con estos datos se estimó el índice HOMA-IR (Homeostasis model assessment for insulin resistance, por sus siglas en inglés), con la fórmula del producto de la glucosa e insulina en ayuno dividido entre la constante 2430 (propia para modelos murinos), el grupo problema evidenció un incremento respecto al grupo control, con una diferencia significativa de 828% (figura 4C). Con estos resultados el modelo presenta un comportamiento característico del proceso diabetogénico.

A partir de los resultados obtenidos de glucosa e insulina en ayunas, se calcularon los siguientes índices:

El índice HOMA-B% (figura 5A) que valora la funcionalidad de la célula β pancreática, el cual incrementó significativamente en el grupo hipercalórico un 222%, respecto al grupo control. Asimismo, el índice de generación de insulina incrementó un 191% (figura 5B) en el mismo grupo. También, se calculó el índice HOMA-S% (figura 5C), que nos permite estimar la sensibilidad a la insulina por los tejidos, y en particular para el tejido de interés se estimó el índice de sensibilidad hepática a la insulina (SHI, figura 5D), ambos índices disminuyeron significativamente un 89% respecto al grupo control, lo cual también fue consistente con la disminución del 60% del índice de disposición de insulina (figura 5E).

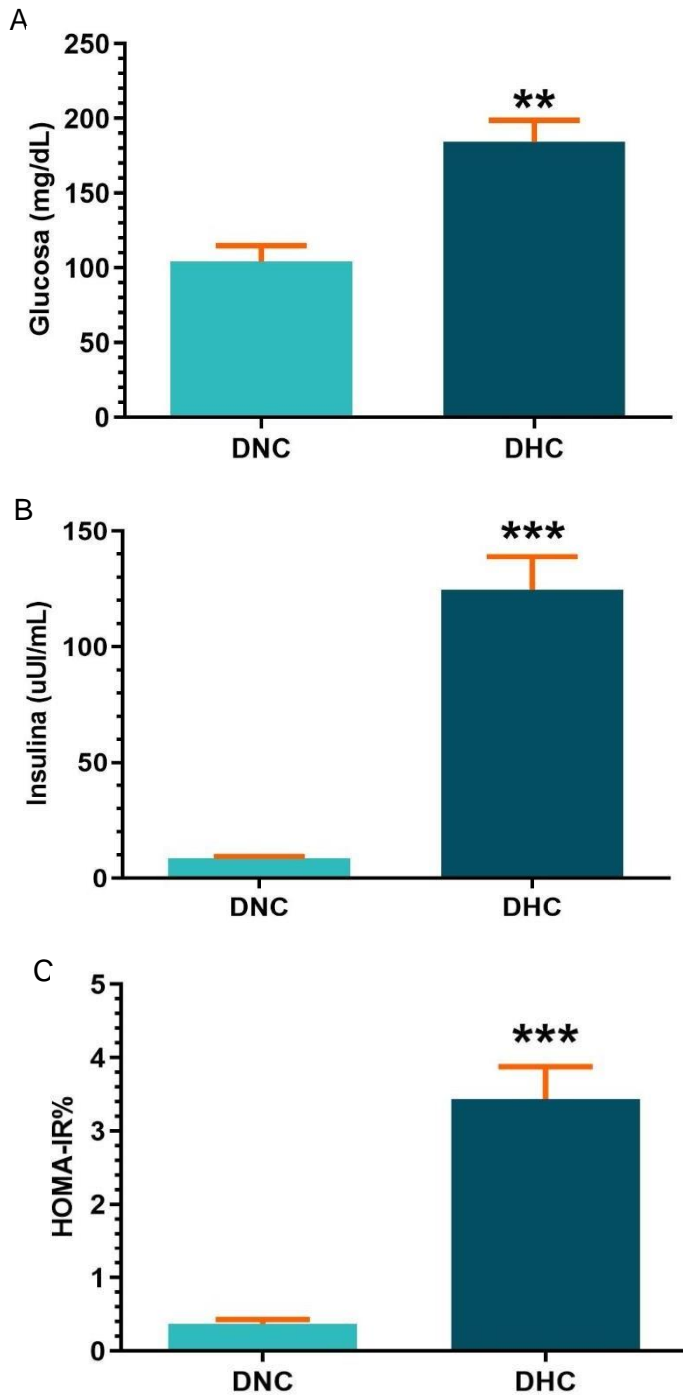


Figura 4. Disglucemia y resistencia a insulina en el modelo de síndrome diabético. Cuantificación de la concentración de glucosa (A) e insulina sérica (B) en animales de experimentación tras la exposición a una dieta hipercalórica-hiperglúcida durante 6 semanas (barra azul), y cálculo del índice HOMA-IR (C). Las barras representan la media \pm EEM de 10 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo con dieta normocalórica (barra izquierda), $p \leq 0.05$, prueba t de Student. DNC: dieta normocalórica, DHC: dieta hipercalórica

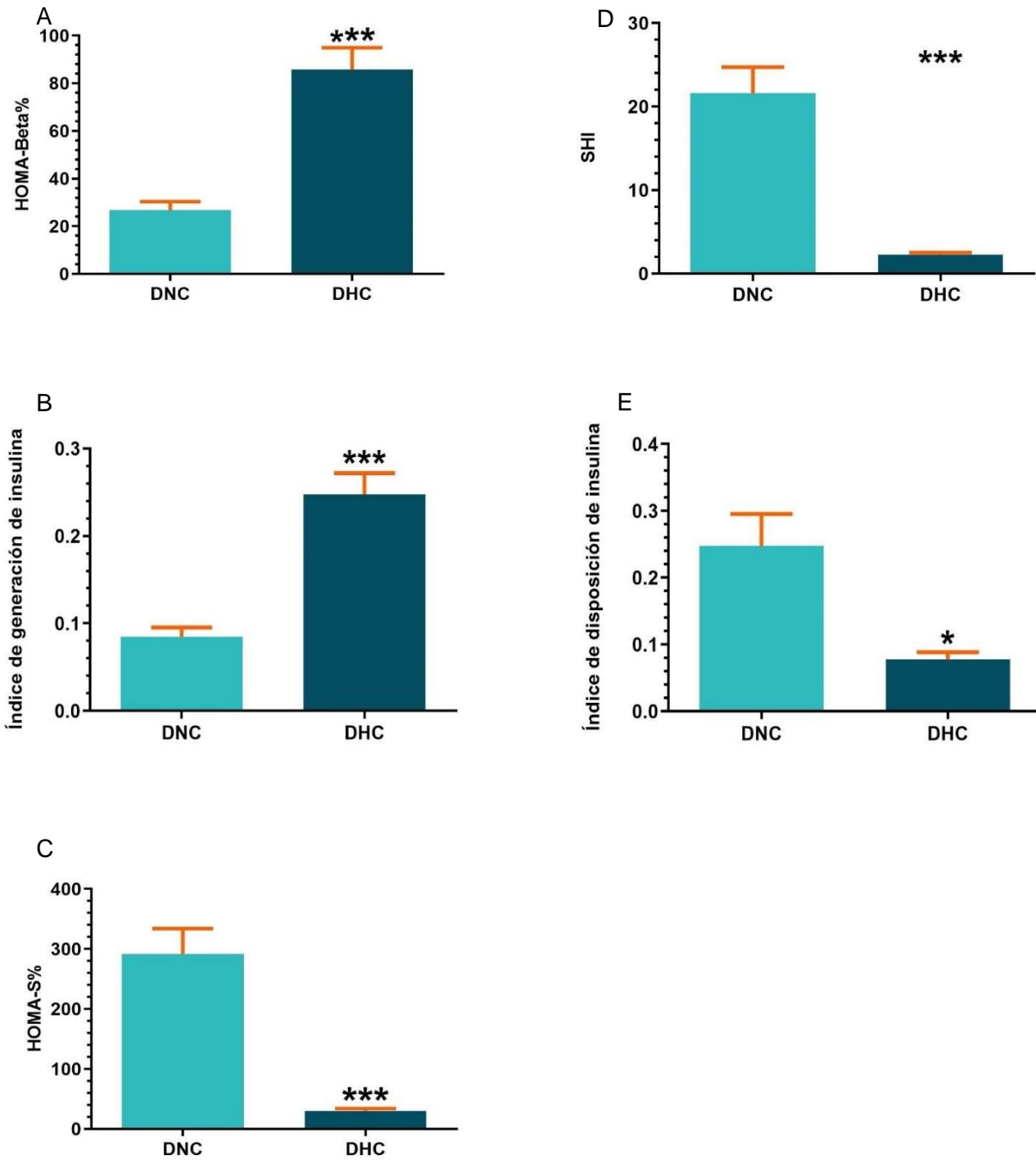


Figura 5. Determinación de índices a partir de la glucemia e insulinemia en ayunas. (A) HOMA-B, (B) Índice de generación de insulina, (C) HOMA-S, (D) Sensibilidad hepática a la insulina, (E) Índice de disposición de insulina, de animales tras la exposición a una dieta hipercalórica-hiperglúcida durante 6 semanas (barra azul). Las barras representan la media \pm EEM de 10 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo con dieta normocalórica (barra izquierda), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

Respecto a la cuantificación de lípidos, el grupo alimentado con la dieta hipercalórica incrementó en un 47% la concentración de triglicéridos y la fracción de colesterol VLDL, ambos significativos respecto al grupo control (Figura 6 A y E). Asimismo, la medición de ácidos grasos libres reflejó un incremento estadísticamente significativo de 195% en el grupo hipercalórico (Figura 6 B). Las mediciones de colesterol total y su fracción LDL del grupo DHC no mostraron diferencias entre grupos, a pesar de incrementar 6% y 25%, respectivamente (Figura 6 C y D). Por el contrario, las concentraciones de colesterol HDL disminuyeron aproximadamente 60% en este grupo, evidenciándose una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos DNC y DHC (Figura 6 F). Los datos reflejan una dislipidemia clásica del síndrome diabetogénico.

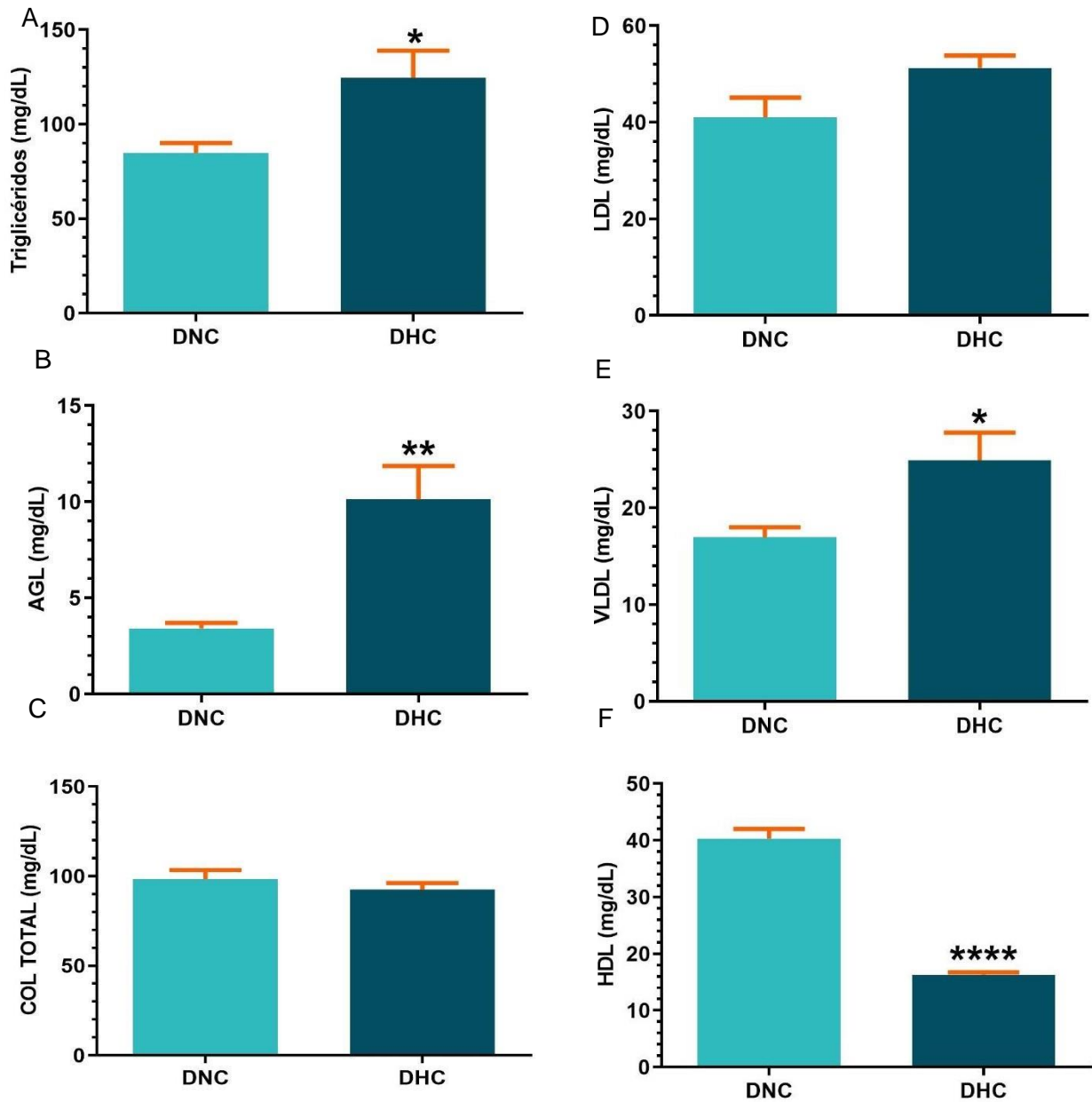


Figura 6. Dislipidemia en un modelo con síndrome diabetogénico. Cuantificación de la concentración de Triglicéridos (A), ácidos grasos libres (B), colesterol total (C) y lipoproteínas de baja, muy baja y alta densidad (D, E, F) en suero de animales de experimentación tras la exposición a una dieta hipercalórica-hiperglúcida durante 6 semanas (barra azul). Las barras representan la media \pm EEM de 10 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo con dieta normocalórica (barra izquierda), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

Por otra parte, a partir de los resultados de triglicéridos, colesterol total y lipoproteínas de alta y baja densidad se calcularon diferentes cocientes lipoproteicos; el índice de disfunción adipocitaria (figura 7A), calculado a partir de la relación logarítmica entre el valor de triglicéridos y lipoproteínas de alta densidad (HDL), el cual incrementó significativamente en el grupo con dieta hipercalórica en un 170%. Además, se sabe que las complicaciones diabetogénicas se asocian con disfunción cardiovascular, es por ello que se calculó el índice aterogénico (figura 7B), riesgo cardiovascular (figura 7C), e índice de riesgo coronario (figura 7D), los cuales se encuentran significativamente incrementados en el grupo HCD en un 133%, 213% y 226%, respectivamente, lo que refleja un desequilibrio entre los factores aterogénicos (triglicéridos, colesterol total, LDL, VLDL) y antiaterogénicos (HDL).

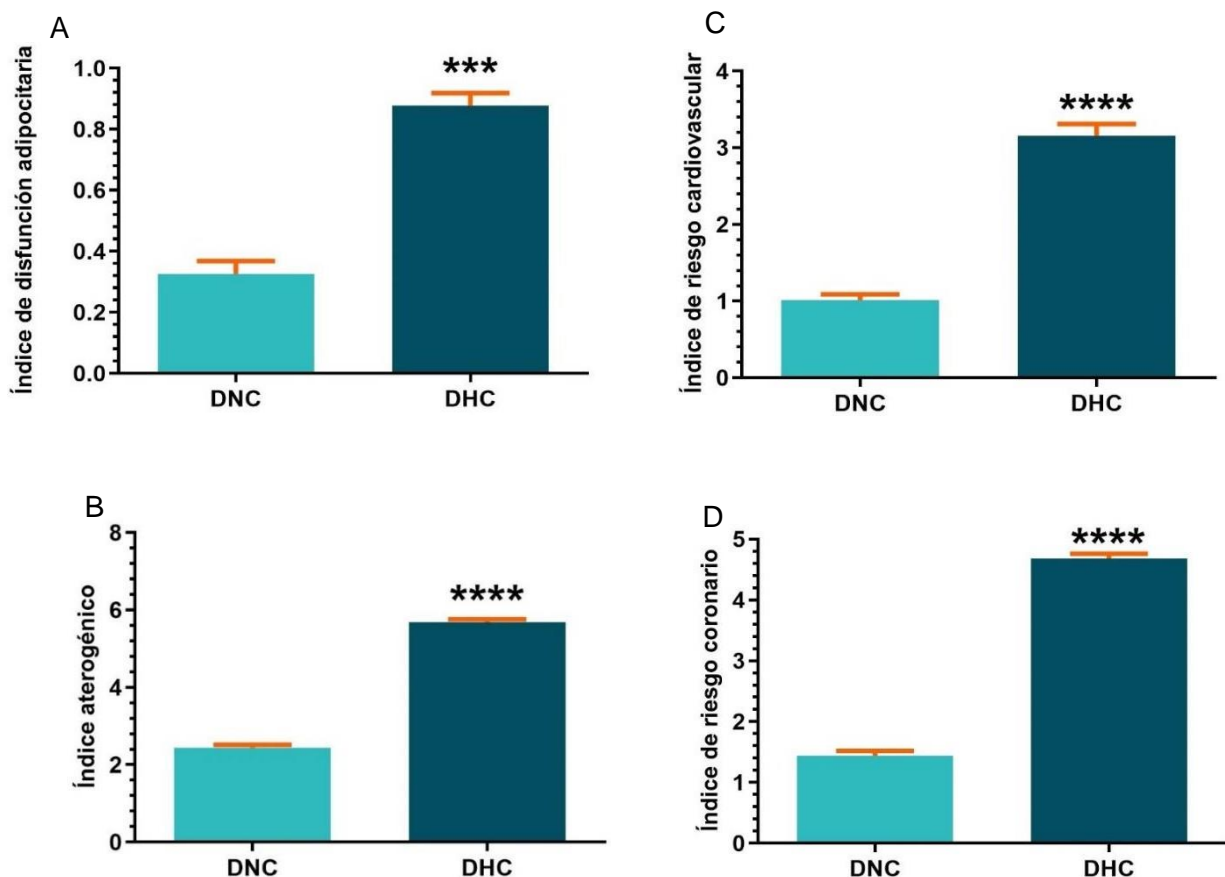


Figura 7. Determinación de índices lipoproteicos. (A) Índice de disfunción adipocitaria, (B) Índice aterogénico, (C) Índice de riesgo cardiovascular, (D) índice de riesgo coronario, de animales tras la exposición a una dieta hipercalórica-hiperglúcida durante 6 semanas (barra azul). Las barras representan la media \pm EEM de 10 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo con dieta normocalórica (barra izquierda), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

8.2 Evaluación del estado redox en hígado

8.2.1 Estado pro oxidante.

Después de caracterizar y validar el modelo diabetogénico, en biopsias de hígado se realizaron mediciones de los productos de la peroxidación de lípidos (MDA y 4HD) y producción de nitritos tanto en el grupo control como en el grupo con dieta hipercalórica.

Los resultados mostraron que después de 6 meses de dieta hipercalórica existe un incremento estadísticamente significativo en las concentraciones de malondialdehído y nitritos en muestras de hígado, en un 72% y 52% respectivamente, excepto en la cuantificación de 4-hidroxiálquenos aunque el incremento fue del 69%, en comparación con el grupo control (figura 8). Por lo que, se consideró que la dieta hipercalórica logró promover un estado oxidativo en hígado.

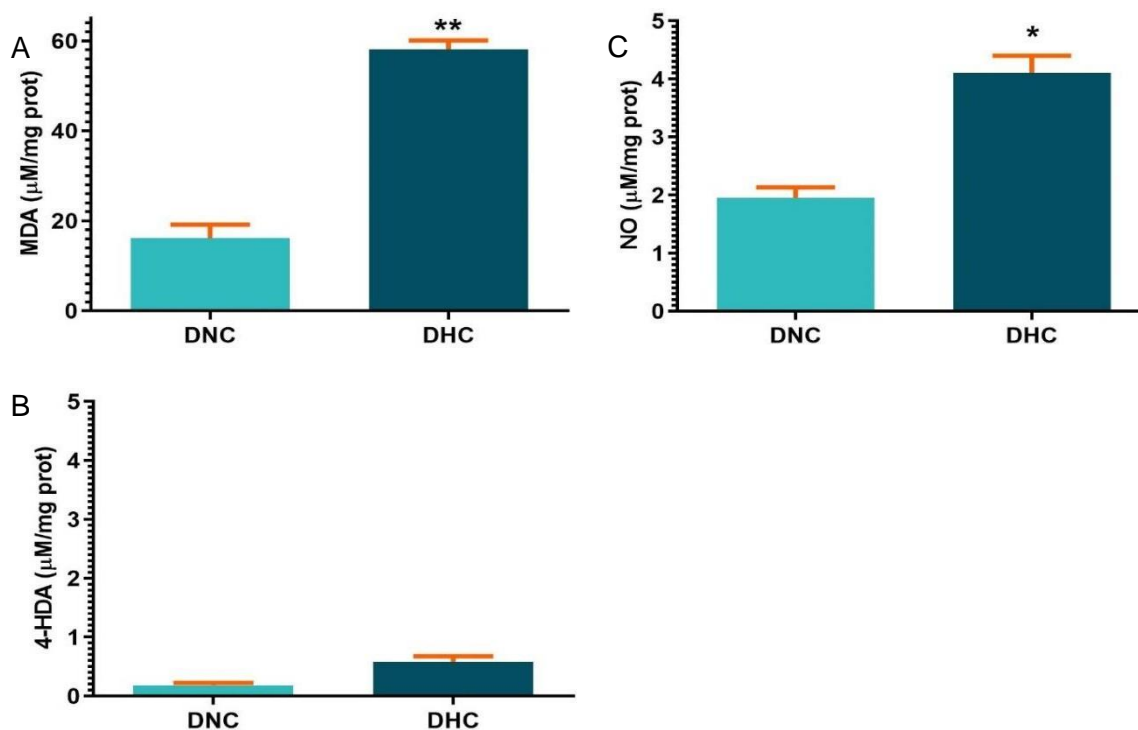


Figura 8. Evaluación del estado pro oxidante. Cuantificación de la concentración de malondialdehído (A), 4-hidroxiálquenal (B) y nitritos (C) en tejido hepático de animales de experimentación tras la exposición a una dieta hipercalórica-hiperglúcida durante 6 semanas (barra azul). Las barras representan la media \pm EEM de 10 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo con dieta normocalórica (barra izquierda), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

8.2.2 Estado anti oxidante

Para evaluar el estado anti oxidante hepático se cuantificaron los niveles de glutatión oxidado (GSSG), glutatión reducido (GSH) y se calculó el índice redox.

La concentración de GSH en el grupo problema se mantuvo en concentración similar a la del grupo control. Por el contrario, el grupo expuesto a la dieta hipercalórica incrementó significativamente su concentración de GSSG respecto al grupo control, aproximadamente de un 32%. El cálculo del índice redox que es un indicador del ambiente celular (figura 9), presentó una disminución del 46% en el grupo con dieta hipercalórica respecto al grupo control, sin embargo, en análisis estadístico no reflejó una diferencia entre grupos.

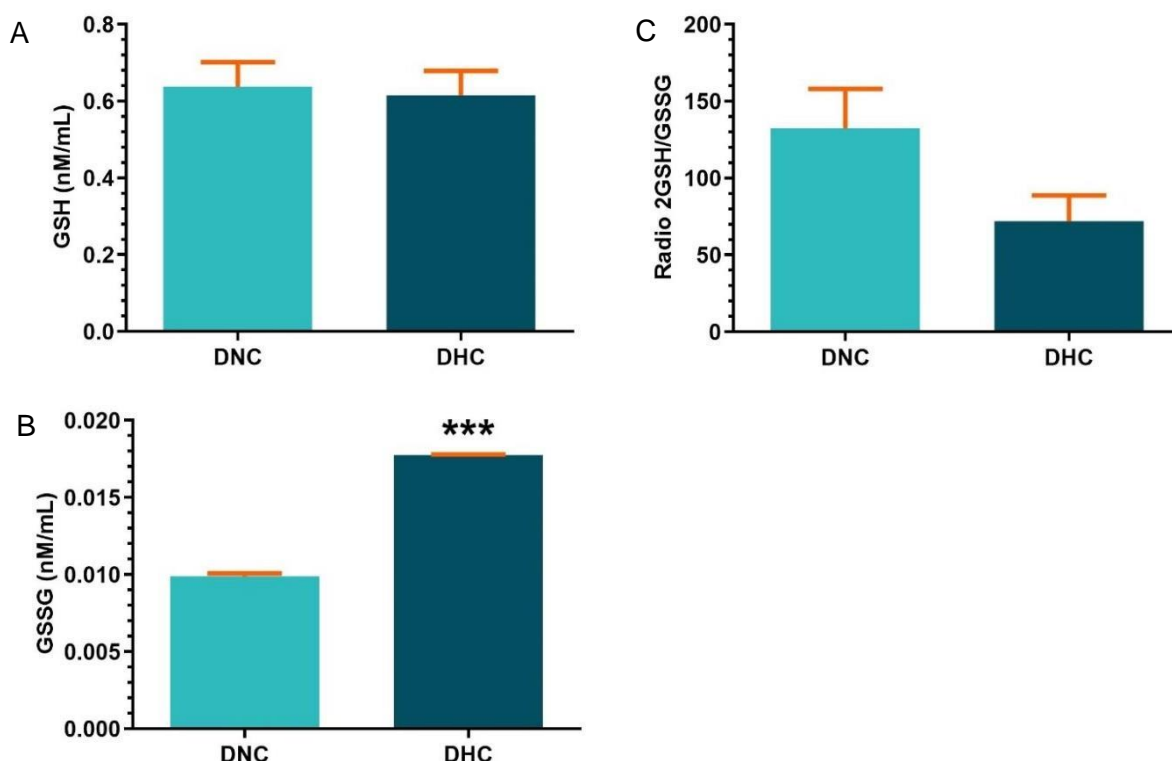


Figura 9. Evaluación del sistema antioxidante: Glutatión y estimación del radio 2GSH/GSSG. Cuantificación de la concentración de glutatión reducido GSH (A), glutatión oxidado (GSSG) y cálculo del índice 2GSH/GSSG a partir de mediciones anteriores en tejido hepático de animales de experimentación tras la exposición a una dieta hipercalórica-hiperglúcida durante 6 semanas (barra azul). Las barras representan la media \pm EEM de 10 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo con dieta normocalórica (barra izquierda), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

Para mantener un estado de baja oxidación celular, las enzimas antioxidantes juegan un papel importante en el mantenimiento de las concentraciones de GSH. Específicamente la glutatión reductasa (GR), glutatión transferasa (GT) y glutatión peroxidasa (GPx) participan en la dinámica del glutatión oxidado y reducido (figura 10A, 10B, 10C, respectivamente). En tejido hepático se evaluó la actividad de dichas enzimas para determinar su capacidad frente al estrés oxidativo.

La actividad de glutatión reductasa fue menor en el grupo con dieta hipercalórica que el grupo control, la disminución fue de aproximadamente 25%, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. La actividad de glutatión transferasa disminuyó un 11% en el grupo problema, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa. Finalmente, en el grupo problema se presentó un aumento estadísticamente significativo de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, aproximadamente un 173% respecto al grupo control.

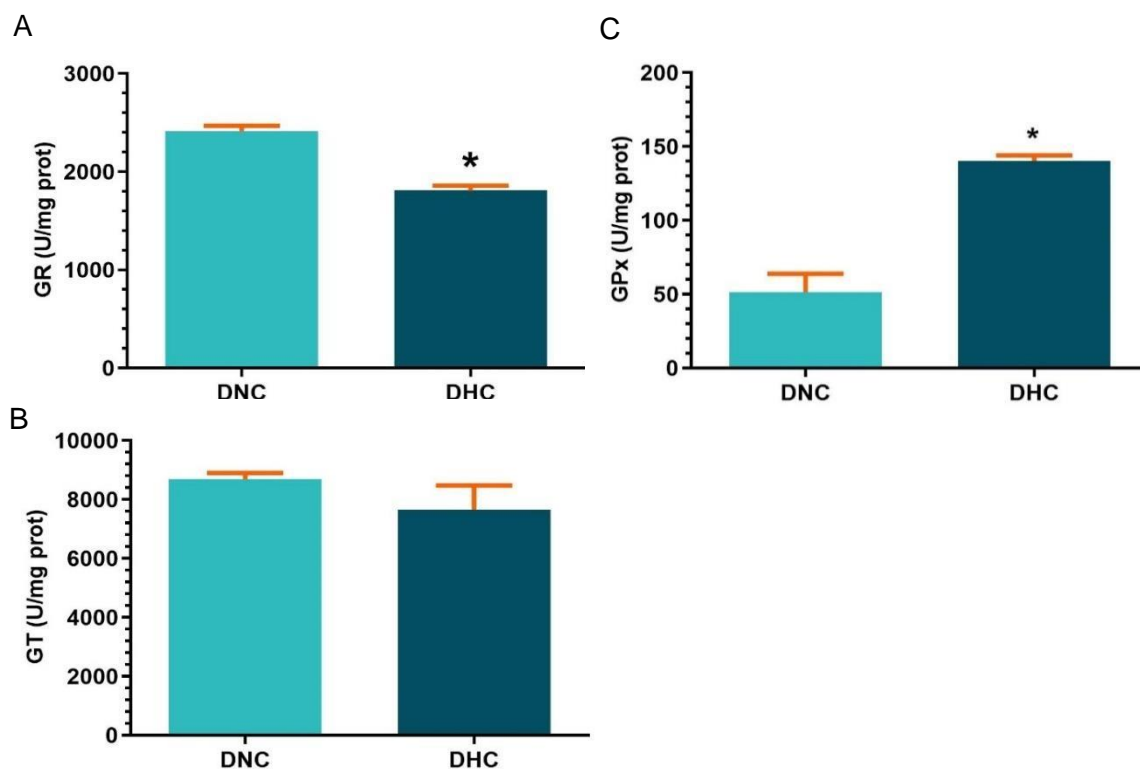


Figura 10. Evaluación del estado anti oxidante. Cuantificación de la actividad de GR (A), GT (B) y GPx (C) en tejido hepático de animales de experimentación tras la exposición a una dieta hipercalórica-hiperglúcida durante 6 semanas (barra azul). Las barras representan la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. El asterisco (*) indica diferencia significativa con respecto al grupo con dieta normocalórica (barra izquierda), $p \leq 0.05$, prueba t de Student.

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1 Características clínicas del Síndrome Diabetogénico

La diabetes tipo 2 es un problema de salud pública mundial que va en aumento en las poblaciones que consumen productos con altas cantidades en carbohidratos ultra-procesados, lo cual forma parte de su alimentación día a día. Además, el sedentarismo que es un aspecto que acompaña al riesgo de desarrollo de las enfermedades metabólicas es ocasionado por falta de educación nutricional y deportiva. Se ha estimado que para el año 2045 existirá un aumento de 693 millones de personas con diabetes en el mundo ([Cho, et al. 2018](#)). También es conocido que la diabetes, es una condición con la cual aumenta el riesgo de padecer enfermedades crónico-degenerativas, resultando en un mayor gasto en cuidados de la salud ([Baena-Díez, et al. 2016](#)). Ante un exceso calórico, es importante conocer los mecanismos por los cuales las alteraciones metabólicas a nivel de carbohidratos y lípidos pueden generar modificaciones celulares que conllevan al mal funcionamiento de los tejidos. Para ello se ha diseñado una dieta hipercalórica-hiperglúcida específicamente para murinos, de manera que se desarrolle un modelo animal con síndrome diabetogénico que pueda reproducir las características principales de la enfermedad.

La dieta LabDiet 5001 (normocalórica) se suministró al grupo control, la cual contiene 28.67 % de proteína, 13.38 % de grasa y 57.94 % de carbohidratos ([LabDiet, 2020](#)). La dieta hipercalórica (Patente: MX/E/2013/047377), compuesta por un 7.3 % de proteína, 5.8 % de grasa y 71.4% de carbohidratos, de los cuales el 80 % corresponde a glucosa y el 20 % a fructosa, fue administrada al grupo HCD. Este tipo de dieta, se ha descrito que incrementa la actividad lipogénica y por tanto la novo síntesis hepática de lípidos, asimismo, altera la síntesis de glucógeno en el órgano. En dietas similares se ha observado un incremento de la actividad de la deshidrogenasa glucosa-6-fosfato, liasa citrato adenosínatrifosfato y sintasa de ácidos grasos, lo cual puede contribuir a la hiperlipidemia asociada a la alimentación alta en carbohidratos ([Lewis, et al. 2006](#)).

El modelo animal con síndrome diabetogénico fue alimentado con dieta hipercalórica durante seis meses, al final de este período se tomaron muestras sanguíneas en ayuno y se analizaron para caracterizar los efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, en los resultados se observó una marcada hiperglucemia e hiperinsulinemia, lo cual coincide con lo anteriormente reportado por Treviño y colaboradores (Treviño, et al. [2015](#)).

Diversos grupos de investigación han experimentado con dietas altas en fructosa y altas en grasa, sin embargo, las mediciones de glucosa en ayunas no reflejan hiperglicemias similares a las que se presentan en el síndrome diabetogénico, en cambio, pueden reproducir un estadio de pre-diabetes ([Khadke, et al. 2019.](#), [Hazarika, et al. 2017.](#), [Wong, et al. 2018](#)). No obstante, no se ha estandarizado una dieta con las proporciones adecuadas de macronutrientes, así como la duración de la ingesta que puedan reproducir un modelo de diabetes, debido a que varía la especie del roedor, las condiciones a las que son sometidos y el tipo de dieta que consume la población en estudio; por lo que se considera que este modelo alimentado con dieta hipercalórica-hiperglúcida reproduce las características principales de la alteración del metabolismo de carbohidratos en el síndrome diabetogénico en la población de estudio.

La regulación de la concentración plasmática de glucosa en ayuno y durante el postprandio se lleva a cabo mediante diferentes procesos: Los mecanismos que regulan la concentración plasmática de glucosa en ayuno y durante el postprandio son diferentes: en el ayuno, la glucosa se mantiene en niveles clínicamente normales debido a que durante la noche existe un balance entre la secreción de insulina, la producción de glucosa hepática y la captura de insulina por el hígado, músculo, tejido adiposo y cerebro ([Sheehan, J.P. 2004](#)), por el contrario, el aumento en la eliminación hepática de la insulina, la disminución en la eliminación periférica de la insulina, cambios en la secreción de la hormona de crecimiento y cortisol, y la producción temprana de catecolaminas contribuyen al incremento de la producción de glucosa hepática y la disminución de la captura por tejidos periféricos, provocando hiperglicemia ([Ohashi, et al. 2018](#)). En individuos sanos, durante el

postprandio se secretan incretinas intestinales como GLP-1 (péptido similar a glucagon, por sus siglas en inglés) y GIP (péptido inhibitorio gástrico, por sus siglas en inglés) que estimulan la secreción de insulina de la célula β pancreática, cuyo efecto es inhibir la gluconeogénesis hepática y la glucogenólisis e incrementar la captura de glucosa en el músculo, además GLP-1 suprime la secreción de glucagon de las células α -pancreáticas, sin embargo, en individuos con alteraciones como el síndrome diabetogénico, los niveles de glucosa se incrementan durante el postprandio debido a la deficiencia de amilina, GIP y GLP-1, no se estimula la secreción de insulina y no se inhibe la secreción de glucagon, por lo tanto, la glucosa endógena y la ingerida entran a la circulación más rápido de lo que los órganos la pueden remover, provocando elevaciones prolongadas de la glucosa plasmática ([Abdul-Ghani., 2006](#), [Gerish, 2013.](#), [Hiyoshi, et al. 2019](#)).

Además de la hiperglucemia, la hiperinsulinemia en ayuno es una característica de la resistencia por parte de los tejidos insulino-dependientes, que se presenta en la obesidad y en desregulaciones metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2 ([Thomas, et al. 2019](#)). El consumo de una dieta diabetogénica de manera crónica genera interacciones hormonales desde el tracto gastrointestinal que de manera progresiva conllevan al desarrollo de hiperinsulinemia: el páncreas produce más insulina para compensar el incremento de glucosa debido a una falla en la señalización, la hiperinsulinemia persistente acelera la endocitosis del receptor de insulina, lo que disminuye su disponibilidad en la membrana plasmática ([Hall, et al. 2020](#)), además disminuye las proporciones de la isoforma corta (de alta afinidad a la insulina) e incrementa la isoforma larga (de baja afinidad) ([Shanik, et al. 2008](#)). Es importante considerar que la hiperinsulinemia es el principal factor que causa resistencia a la insulina en el tejido hepático bajo condiciones de exceso de nutrientes, debido a la regulación negativa de la señalización de insulina-Akt, sin embargo, en sujetos obesos con hiperinsulinemia, la conversión de glucosa a lactato en el músculo esquelético provee el sustrato para la gluconeogénesis y producción hepática de glucosa ([Czech, M.P. 2017](#))

A nivel neurológico, la alta concentración de insulina disminuye el aclaramiento de dopamina y captura mediante la vía hedónica, lo que estimula el consumo de alimento y mantiene el estado hiperinsulinémico, la insulina actúa como un antagonista de la leptina e interfiere con la transducción de señales en el hipotálamo, generando resistencia a la leptina y como consecuencia disminuye el gasto energético, incrementa el apetito y la ganancia de peso ([Lustig, R.H. 2006](#)).

La evaluación de índices que involucran las concentraciones de glucosa e insulina en ayunas nos permiten visualizar el entorno en el que se desarrollan las alteraciones metabólicas a nivel del metabolismo de carbohidratos.

El índice HOMA-IR, calculado a partir de las mediciones de glucosa plasmática e insulina en ayunas, está relacionado con el mecanismo de retroalimentación de glucosa sobre las células β -pancreáticas para estimular la secreción de insulina ([Ghosh & Collier, 2012](#)). Nuestros resultados muestran que en el grupo alimentado con dieta hipercalórica, la hiperglicemia en ayunas es la manifestación clínica de la producción incrementada de glucosa hepática en ayunas debido a una falla en la señalización de insulina ([Lee & Halter, 2017](#)), puesto que a mayor concentración de glucosa, mayor es la cantidad de insulina que tiene que secretar el páncreas para reestablecer los niveles de glucosa a la normalidad, lo que se refleja en el incremento del índice HOMA-IR. A nivel molecular, los niveles incrementados de insulina pueden aumentar la internalización de su receptor para su reciclaje o degradación, dejando un número menor de receptores en la membrana que impide que altas concentraciones de glucosa puedan ingresar a la célula ([Gutiérrez, et al. 2017](#)), limitando la síntesis y almacén de glucógeno durante el postprandio, lo que conlleva a la expresión de PEPCK para activar la vía gluconeogénica, contribuyendo así al estado hiperglicémico. Por otra parte, el hiperinsulinismo promueve la disminución de la señalización de insulina, puesto que se fosforilan residuos de serina 307 o 312 del IRS y/o del receptor, a través de la activación de cinasas de estrés como cJUN, IKK β y a su vez disminuye la fosforilación de los residuos de tirosina, reduciendo la interacción con la PI3K y la activación de Akt ([Aguirre, et al. 2001](#)).

Uno de los principales índices es el HOMA-B% que evalúa la función de la célula β pancreática. En el grupo con dieta hipercalórica se observó un incremento respecto al grupo control, lo que refleja una sobreproducción de la hormona insulina para regular los niveles de glucosa, esta respuesta se mantiene por la retroalimentación entre el páncreas endócrino hiperfuncional y el hígado, para corroborar el desbalance entre la producción de insulina en respuesta a la glucosa, se calculó el índice de generación de insulina, siendo alto en el grupo con dieta hipercalórica debido al hiperinsulinismo en respuesta a la hiperglicemia.

En diferentes estudios se recomienda evaluar y reportar tanto el HOMA-B% como el HOMA-S% para proporcionar información útil que permita visualizar el panorama del metabolismo de la glucosa ([Wallace, et al. 2004.](#), [Ghasemi, et al. 2015](#)). El índice HOMA-S% estima la sensibilidad a la insulina, el cual fue menor en el grupo experimental que en el grupo control, lo que indica que los tejidos insulino-dependientes no pueden captar la glucosa debido a la acción disminuida de la insulina, lo cual se corrobora con el índice de disposición de insulina, también reducido en el grupo experimental, es decir, que disminuye la cantidad de insulina utilizada por el hígado, músculo y tejido adiposo. Se han realizado investigaciones en ratas Wistar con síndrome metabólico y dietas altas en grasa, donde también se observa la tendencia del incremento del HOMA-B%, la disminución de HOMA-S% y la resistencia insulínica, lo que se le atribuye a las características de la dieta y al incremento del 40% de calorías ([Ehrampush, et al. 2016](#)). Sin embargo, estos índices no diferencian entre la sensibilidad a la insulina hepática o periférica, para ello se determinó el índice de sensibilidad hepática a la insulina, el cual también fue menor respecto al grupo control, cuya significancia clínica establece que a mayor producción de glucosa hepática en ayuno, mayor es la cantidad de insulina secretada, y por lo tanto, mayor es la severidad de la resistencia hepática a la insulina en este órgano.

En sujetos con resistencia insulínica se ha documentado el incremento de la producción de glucosa así como la lipogénesis: durante la progresión de este estadio la insulina no es capaz de suprimir la gluconeogénesis hepática y continúa

con la síntesis de lípidos, a su vez, los ácidos grasos libres son capturados por los hepatocitos y convertidos a acetil-CoA, la cual activa a la enzima piruvato carboxilasa de la vía gluconeogénica, de esta manera se promueve la hiperglicemia y la hipertrigliceridemia como mecanismos compensatorios, por lo cual se ha relacionado a la resistencia hepática a la insulina con el desarrollo de aterosclerosis ([Biddinger, et al. 2008](#)).

La resistencia hepática a la insulina involucra alteraciones en diferentes reacciones metabólicas. Particularmente involucra la alteración en el metabolismo lipídico, en nuestro modelo con síndrome diabetogénico se reveló una dislipidemia caracterizada por el incremento de ácidos grasos libres, debido a que la insulina no ejerce un efecto antilipolítico en tejido adiposo, por lo tanto existe un exceso de ácidos grasos libres derivados de la lipólisis, estos son capturados y oxidados por los hepatocitos para proveer energía para la producción de glucosa tanto en ayuno como en el postprandio, debido a la transcripción de enzimas gluconeogénicas. Por otra parte, la acumulación de diacilglicerol inicia una cascada de activación de proteínas cinasas responsables de la resistencia insulínica, promoviendo la síntesis y acumulación de ceramidas que también contribuyen a esta alteración a nivel de la fosforilación de Akt. Además, se ha comprobado que existe un desbalance entre la captura de los ácidos grasos en el músculo, promoviendo la acumulación de intermediarios lipídicos como diacilglicerol, ácidos grasos, acil-CoA y triacilgliceroles, lo que incrementa la concentración de NEFA (ácidos grasos no esterificados, por sus siglas en inglés) en circulación y el flujo de estos hacia el hígado ([Hegarty, et al. 2002](#)).

En el grupo con dieta hipercalórica, se evidenció un incremento en la concentración de triglicéridos respecto al grupo control, el origen de la hipertrigliceridemia comienza desde el aumento en la producción de lipoproteínas, a las cuales se les transfieren triacilgliceroles al estar incrementada la expresión de MTP ([Hogue, et al. 2007](#)) y también disminuye la actividad de la enzima LPL (lipoprotein lipasa) que se encarga del catabolismo de estas ([Laatsh, et al. 2009](#)). Durante la progresión de la resistencia a la insulina, disminuye la actividad de la enzima lipoprotein lipasa, lo

que altera el metabolismo de las lipoproteínas ricas en triglicéridos e incrementa su concentración en la circulación, haciendo susceptibles a otros tejidos con una capacidad limitada para la acumulación, como el hígado, músculo, páncreas, corazón y vasos sanguíneos.

El incremento de la concentración del colesterol VLDL en el grupo con síndrome diabetogénico reflejan la alteración del metabolismo de lipoproteínas, que pueden explicarse a partir de la reducida acción de la insulina con respecto a la formación de lipoproteínas de alta, baja y muy baja densidad, estas últimas son cruciales en el desarrollo de la dislipidemia aterogénica de la diabetes. Dichas alteraciones incluyen el aumento de la secreción de VLDL hepáticas y su mayor tiempo de eliminación sobre moléculas clave que intervienen en el proceso catabólico: durante la resistencia hepática a la insulina el incremento de ácidos grasos libres se debe, específicamente, a una disminución de la inhibición de la hormona sensible a lipasa (HSL) en el tejido adiposo, promoviendo la lipólisis de los triacilglicerolos almacenados y aumentando la secreción de NEFA hacia el torrente sanguíneo, donde viajan y vuelven a ser sintetizados en triacilglicerolos en el hígado, y son sustrato para la formación de VLDL, debido a que la insulina vía PI3K no inhibe el proceso de ensamblaje de las partículas VLDL, por el contrario, aumenta la producción de VLDL₁ ([Vergés, 2015](#)), lo cual se conoce como “paradoja de los lípidos”, debido a la señalización y lipogénesis redundante que se mantiene tanto por la cascada de la proteína de unión y regulación a esteroides (SREBP), como a la de carbohidratos (ChREBP). En condiciones de hiperglucemia, se genera el entorno ideal para la glicación de las apolipoproteínas de VLDL, lo que reduce su unión al receptor ApoB/E impidiendo su catabolismo ([Taskinen, 2003](#)).

Al estar incrementada la producción de VLDL₁, se promueve el enriquecimiento de triglicéridos de las partículas HDL mediado por CETP, lo que potencia el catabolismo de HDL y su disminución en circulación, puesto que son sustrato para la lipasa hepática, este desbalance proaterogénico - antiaterogénico se corrobora con la disminución del colesterol HDL en el grupo experimental, dichas partículas no sólo disminuyen en número, sino también en tamaño haciéndola menos

funcional, sin embargo existe una subespecie de HDL llamada HDL3 que está asociada con los niveles de triglicéridos e insulinoresistencia, por otra parte la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en las HDL induce la disociación de ApoA1, favoreciendo su filtrado y catabolismo renal ([Cuevas & Alonso, 2016](#)).

En cambio, el colesterol LDL no aumentó significativamente en el grupo experimental, aunque los niveles pueden ser normales, el tamaño de la lipoproteína puede estar reducido e incrementar el número de partículas LDL pequeñas, debido a su tamaño pueden atravesar fácilmente las paredes de las arterias, tienen menos afinidad al receptor de LDL y más tiempo de vida media en circulación, lo que les confiere su capacidad aterogénica, y por lo tanto, su cuantificación aporta más información para establecer el riesgo cardiovascular ([Hirano, T. 2018](#)). Por otra parte, también puede disminuir su catabolismo por falta de receptores LDL B/E en la superficie celular y acumularse en las paredes arteriales, donde también la ApoB puede ser glicada como consecuencia de la hiperglicemia, además, de que su contenido lipídico es susceptible a la oxidación, lo que disminuye su afinidad al receptor haciéndolas quimioatrayentes para monocitos, los cuales amplifican el proceso inflamatorio arterioesclerótico. Además, existen LDL pequeñas y densas con un potencial aterogénico mayor que las LDL grandes ([Taskinen, 2003](#)., [Mooradian, 2008](#)).

Es por ello que la dislipidemia es otra característica importante del síndrome diabetogénico. Estudios recientes mencionan que el aumento en las lipoproteínas ricas en triglicéridos así como la disminución del colesterol HDL son factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en individuos con diabetes ([Leon & Maddox, 2015](#)., [Reiner, et al. 2017](#)., [Rana, et al. 2017](#)).

Las complicaciones que surgen a medida que se prolonga la dislipidemia durante el síndrome diabetogénico, a raíz de las alteraciones en el metabolismo hepático, promueven el desarrollo de arterioesclerosis y problemas cardiovasculares. A partir de los factores lipoproteicos aterogénicos y antianterogénicos se calcularon índices que nos permiten establecer el riesgo de desarrollar complicaciones aterogénicas.

El índice de resistencia por disfunción adipositaria se calcula a partir de la relación logarítmica de los triglicéridos y el colesterol HDL, y representa el balance entre las lipoproteínas aterogénicas y protectoras; en el grupo con dieta hipercalórica se incrementó este índice respecto al grupo control, se ha propuesto que por encima de 0.5 es el punto de corte que indica riesgo aterogénico ([Dobiášová & Frohlich, 2001](#)) el origen de este desbalance es la resistencia a la insulina al estar disminuida la acción de la insulina en el tejido adiposo, lo que se refleja en la hipertrigliceridemia y disminución de colesterol HDL.

La relación entre el colesterol total y el colesterol HDL es un índice aterogénico, también llamado índice de Castelli, junto con el índice de riesgo cardiovascular (que resulta a partir de la relación de colesterol LDL entre colesterol HDL) son indicadores de riesgo vascular con alto valor predictivo ([Munoz, 2009](#)). En el grupo experimental incrementaron ambos índices, debido a que las lipoproteínas aterogénicas están enriquecidas principalmente por triglicéridos, mientras que las partículas HDL acarrean más triglicéridos y al ser hidrolizadas por la lipasa hepática, producen LDL y HDL densas y pequeñas, las cuales están asociadas al riesgo de enfermedad cardiovascular ([Jung & Choi, 2014](#)). Además, el índice de riesgo coronario (calculado a partir de la relación de la suma de LDL-C y VLDL-C, entre HDL-C) también se encuentra incrementado en el grupo experimental, haciéndolo susceptible al desarrollo de una enfermedad coronaria, ocasionada por la acumulación de placas lipídicas, las cuales son formadas por la acumulación de LDL oxidadas que atraen monocitos que penetran la íntima y maduran a macrófagos formando células espumosas, los linfocitos T amplifican la respuesta inflamatoria y promueven la formación de células de músculo liso que producen componentes de la matriz extracelular. Los resultados concuerdan con lo ya reportado por Kiyoshi ([Kiyoshi, et al. 2018](#)) en un modelo de diabetes inducida con estreptozotocina, en la que también existe el riesgo aterogénico en el que la hiperlipidemia e hiperglucemia contribuyen a la glicación del colesterol LDL haciéndolo susceptible a la oxidación en la capa subendotelial.

Por otro lado, bajo condiciones de hiperglicemia prolongada los hepatocitos perivenosos intensifican la expresión de receptores de insulina para captar la glucosa y posteriormente se llevan a cabo cinco vías derivadas de la vía glucolítica como: vía de los polioles, vía de la hexosamina, vía de la activación de la proteína cinasa C, productos de glicación avanzada y la vía de autooxidación del gliceraldehído, las cuales son fuentes de especies reactivas de oxígeno que también pueden inducir resistencia a la insulina en el tejido hepático ([Yan, 2014](#)) Además, el incremento del flujo de ácidos grasos libres al hepatocito perivenoso sobrecarga el proceso de β -oxidación lo que conlleva a la disfunción mitocondrial y también pueden ser sustratos para la generación de especies lipotóxicas ([Z. Chen, et al. 2020](#)), dichos procesos crean un entorno oxidativo que perpetúa el ciclo de resistencia insulínica y el desarrollo de hígado graso no alcohólico. No obstante, la β -catenina es un factor determinante de la plasticidad metabólica que permite la adaptación del hígado a los diferentes estados de alimentación o privación de alimento y exceso calórico ([Behari, et al. 2014](#)), lo que le confiere un papel importante en la zonación metabólica y la flexibilidad de los hepatocitos periportales o perivenosos al metabolismo de carbohidratos y lípidos ([Cook, et al. 2015](#)).

La disminución en la oxidación de glucosa después de ingerir alimentos, refleja la alteración en la señalización de la insulina como consecuencia de la inflexibilidad metabólica, la cual aparece desde el inicio de la intolerancia a la glucosa, lo que contribuye al desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina. El incremento en la tasa de oxidación de sustratos inhibe la oxidación de la glucosa y el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada y viceversa, para prevenir la congestión mitocondrial cuando el consumo de ATP es bajo, dicha alteración sucede cuando la sobrenutrición es prolongada y ocasiona una sobrecarga mitocondrial que impide la señalización, lo que causa una afluencia constante de sustratos excedentes que saturan las vías donde convergen para seguir la ruta de producción de ATP. Este tráfico mitocondrial provoca el incremento del potencial de membrana y la acumulación de electrones que se desvían hacia la producción de especies reactivas de oxígeno ([Muoio, D.M. 2014](#))

9.2 Sistema redox hepático

Usualmente las dietas para roedores contienen un 4% de sacarosa y menos de 0.5% de fructosa, sin embargo, es posible modificarla configurando la cantidad de carbohidratos para promover alteraciones metabólicas con diferentes niveles de estrés oxidativo ([Görlach, et al. 2015](#)). Una vez confirmado el modelo de síndrome diabético, se procedió a la evaluación del estado redox hepático, debido a que en la mitocondria, durante la ingesta calórica excesiva de glucosa y ácidos grasos, se promueve una hiperactividad de la fosforilación oxidativa que conlleva a la producción de superóxido y el desarrollo de estrés oxidativo ([Saha, 2017](#)).

En el grupo con dieta hipercalórica-hiperglúcida se observó un incremento de los niveles de malondialdehído (MDA), un producto de la lipoperoxidación en el lisado de tejido hepático. Este proceso se lleva a cabo cuando las especies oxidantes derivadas del oxígeno atacan a los lípidos que contienen dobles enlaces, particularmente a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular, abstrayendo un hidrógeno e insertando oxígeno con la consecuente formación de radicales peroxil o hidroperóxidos, los cuales continúan propagando reacciones en cadena debido a su inestabilidad ([Ayala, et al. 2014](#)), en comparación con la de los radicales libres, estos pueden difundir a través de las membranas y unirse mediante enlaces covalentes a cualquier proteína citoplasmática o nuclear. [Zarkovic y colaboradores \(Zarkovic, et al. 2013\)](#), han publicado un listado de las proteínas involucradas en la patofisiología de enfermedades y su relación con la peroxidación lipídica. Se ha reportado que a una tasa mediana o alta de lipoperoxidación, la extensión del daño oxidativo sobrepasa la capacidad antioxidante y reparadora, induciendo apoptosis o necrosis de la célula ([Gallelli, et al. 2018](#)). En el grupo experimental, no hubo un incremento significativo en la concentración de 4-hidroxiacetonales (4-HDA), estos también se generan a partir de la peroxidación lipídica de la membrana y el ácido araquidónico, y reaccionan con los grupos tiol y amino de la cisteína, histidina o lisina, de esta manera también pueden modificar la estructura de la insulina e influir en el desarrollo de resistencia a la insulina y diabetes ([Pillon, et al. 2011](#)). [Jaganjac y colaboradores \(2013\)](#), han descrito que

también actúan como segundos mensajeros de los radicales libres y, debido a su citotoxicidad, están involucrados en la patogénesis de la diabetes mellitus, sin embargo, otro grupo de investigación estudió un modelo animal con ingesta de una dieta alta grasas y concluye que la lipoperoxidación no es un prerrequisito para el desarrollo de obesidad, pero contribuye a la aparición de otras alteraciones como la inflamación de bajo grado ([Sohet, et al. 2009](#)), presente en las alteraciones metabólicas por insulina. Por lo tanto, el incremento de MDA y el incremento no significativo de 4-HDA son similares con lo anteriormente reportado. Los productos de la lipoperoxidación pueden inhibir la ciclooxigenasa, la proteína 2 de desacoplamiento mitocondrial y dañar las membranas mitocondriales, alterando el funcionamiento de la cadena transportadora de electrones, además, la cardiolipina es susceptible al daño oxidativo, lo cual está asociado con la desestabilización de los supercomplejos y la inducción de la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, lo que podría conducir a la apoptosis ([Masarone, et al. 2018](#))

El óxido nítrico (NO) es un regulador central del metabolismo energético así como de la composición corporal, sin embargo su biodisponibilidad puede verse afectada en modelos animales con obesidad inducida por dietas altas en grasa, como en el modelo desarrollado por Sansbury & Hill ([2014](#)). La cuantificación del óxido nítrico fue estimada con un método indirecto a partir de los nitritos presentes en la muestra, puesto que la vida media del óxido nítrico es corta y es rápidamente metabolizado ([Thomas, et al. 2001](#)). En el grupo experimental se observó un incremento del ion nitrito (NO_2^-) respecto al grupo control, se ha reportado que la hiperglicemia favorece el incremento en la expresión de sintasa de óxido nítrico inducible (NOS2) vía NF- κ B, lo que también incrementa la generación de óxido nítrico ([Manna, et al. 2010](#)) y favorece la interacción entre el NO y el superóxido, lo que produce peroxinitrito, un radical que también participa en la peroxidación lipídica, oxidación y nitración de proteínas e inactivación de metaloenzimas ([Virág, et al. 2003](#)). Por otra parte, [Fujimoto y colaboradores \(2005\)](#) han estudiado la actividad de la NOS2 en ratones diabéticos y demuestran que la sobreexpresión de esta enzima está relacionada con el desarrollo de hiperglicemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina,

debido a una alteración en la señalización de insulina en distintos niveles, desde los sustratos del receptor de insulina (IRS1-2) y Akt hasta la activación de la glucogenólisis en hígado. Además, la expresión de NOS2 *per se* incrementa el contenido de triglicéridos en el hígado y la expresión de enzimas lipogénicas ([Shinozaki, et al. 2011](#)), lo cual también podría inferirse y relacionarse clínicamente con la hiperlipidemia observada en el grupo experimental.

Para conocer el estado antioxidante se midió la concentración de glutatión reducido (GHS) y glutatión oxidado (GSSG). En el grupo con dieta hipercalórica se observó una disminución no significativa glutatión reducido, puesto que aún se mantiene la respuesta compensatoria al estrés oxidativo, lo que indica que para asegurar niveles óptimos de GSH, existen factores de transcripción como Nrf2 que está asociado a elementos de respuesta antioxidante, y que se encuentra unido a Keap1, cuyos grupos tiol pueden ser oxidados por especies reactivas de oxígeno y productos de la peroxidación lipídica, lo que conlleva a un cambio conformacional para que Nrf2 quede libre y pueda translocarse al núcleo y unirse a la región promotora de los genes de enzimas antioxidantes, principalmente glutatión reductasa (GR), glutamylcisteina sintasa (GCL), glutatión sintasa (GSS) y glutatión transferasa ([Vomhof, et al. 2012](#), [Teskey, et al. 2018](#)), sin embargo, en este modelo hubo una disminución significativa de la actividad enzimática de GR en el grupo experimental, lo que indica una disminución en la reducción de GSSG a GSH que se refleja en un incremento de GSSG en el tejido hepático del grupo con síndrome diabetogénico. El radio 2GSH/GSSG es mayor que 100 en condiciones normales, pero si incrementa la concentración hígado de GSSG, el índice tiende a ser menor, así como se observa en el grupo experimental, lo que implica un desbalance entre la reducción de GSSG y generación de GSH, siendo consistente con los resultados anteriores de los productos de la peroxidación lipídica, además, estos resultados coinciden con los reportados por Cisneros y colaboradores ([2011](#)), cuyos experimentos fueron realizados en un modelo de diabetes inducida con estreptozotocina, y con los resultados de [Calabrese y col. \(2012\)](#) en pacientes con diabetes tipo 2. Por otra parte no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la actividad de la enzima glutatión transferasa (GT) entre el grupo

control y experimental, lo que indica que la respuesta antioxidante se mantiene frente a la producción de especies reactivas de oxígeno y derivados.

Finalmente, la enzima glutatión peroxidasa (GPx) trabaja en conjunto con GSH en la descomposición del peróxido de hidrógeno u otros hidroperóxidos, utilizando como sustrato 2GSH para oxidarlos a GSSG ([Prabhakar, et al. 2005](#)), en el grupo experimental se observó un aumento en la actividad GPx y una disminución no significativa de GT, lo que se relaciona con el incremento de GSSG. Sin embargo, dicha dinámica antioxidante no se observa en ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina, puesto que en este modelo el estrés nitrosativo ejerce una dinámica agresiva sobre el sistema antioxidante del glutatión, al disminuir la actividad de GPx y depletando la concentración de GSH ([Sheweita, et al. 2016](#)). Además, el ratio 2GSH/GSSG no fue estadísticamente significativo a pesar del incremento de GSSG, lo que podría indicarnos que, a pesar del incremento de los productos de la peroxidación lipídica, el sistema antioxidante sigue generando una respuesta compensatoria para neutralizar las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

10. CONCLUSIONES

El consumo de una dieta hipercalórica alta en carbohidratos de manera crónica desarrolló Síndrome Diabetogénico en ratas Wistar, dicha condición se caracteriza clínicamente por hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y dislipidemia.

Ante la gran demanda de metabolizar los carbohidratos y reestablecer los niveles de glucemia, se genera un mecanismo compensatorio insulínico que genera hiperfunción de las células beta de los islotes de Langerhans.

El Síndrome Diabetogénico genera un ambiente hepático pro-oxidante asociado a una mayor producción de aductos de lipoperoxidación y óxido nítrico. Sin embargo, el sistema antioxidante hepático no decae, lo que establece un mecanismo de protección al tejido que evita la falla del mismo.

11. PERSPECTIVAS

1. Medir las concentraciones de los productos de la lipoperoxidación en un modelo animal con síndrome diabetogénico a los 9 meses de duración de una dieta hipercalórica – hiperglúcida
2. Realizar un análisis morfológico de los hepatocitos en este modelo a 6 y 9 meses de edad para evaluar la progresión del daño.
3. Incrementar la ingesta de los aminoácidos glicina y cisteína en la dieta de los roedores con síndrome diabetogénico durante 6 y 9 meses y medir las concentraciones de glutatión reducido y oxidado.
4. Medir la expresión del mRNA de las enzimas glutatión peroxidasa y reductasa para evaluar si se mantiene un mecanismo de protección en el tejido hepático

12. REFERENCIAS

- [1] Rodríguez Vázquez, Leandro. 2011. Prácticas, hábitos y conductas vs educación y cultura alimentarias. *Rev. Esp. Nutr Comunitaria* 2012;18(1):39-52.
- [2] Gomez Delgado, Yeniffer., Velázquez Rodríguez, Elisa B. 2019. Salud y cultura alimentaria en México. *Revista Digital Universitaria, UNAM.* 20(1):1-12.
- [3] Organización Mundial de la Salud. (1990). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. 3 de marzo 2020, de WHO Sitio web: https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_797/es/
- [4] NOM-043-SSA2, Servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación. *Diario Oficial de la Federación.* 22 de enero de 2013.
- [5] Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016.
- [6] Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública (MX), 2012
- [7] Gaytán-Hernández, D., Gutiérrez-Enríquez, S. O., Díaz-Oviedo, A., González-Acevedo, C. E., Miranda-Herrera, M., & Hernández-Ibarra, L. E. (2018). Escenario futuro de la diabetes mellitus tipo 2 estimado con un modelo de simulación dinámico predictivo [Future type 2 diabetes mellitus scenario estimated with a predictive dynamic simulation model]. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*, 41, e93. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2017.93>
- [8] Más Sarabia, Maheli., Alverti Vázquez, Lizet., Espeso Nápoles, Nelia. 2005. Estilos saludables de vida y su relevancia en la salud del individuo. *Rev Hum Med.* 5(2) Recuperado en 26 de enero de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-81202005000200006&lng=es&tIng=es.
- [9] Hall, K. D., Ayuketah, A., Brychta, R., Cai, H., Cassimatis, T., Chen, K. Y., Chung, S. T., Costa, E., Courville, A., Darcey, V., Fletcher, L. A., Forde, C. G., Gharib, A. M., Guo, J., Howard, R., Joseph, P. V., McGehee, S., Ouwkerk, R., Raising, K., Rozga, I., ... Zhou, M. (2019). Ultra-Processed Diets Cause Excess Calorie Intake and Weight Gain: An

Inpatient Randomized Controlled Trial of Ad Libitum Food Intake. *Cell metabolism*, 30(1), 67–77.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.008>

- [10] Small, D. M., & DiFeliceantonio, A. G. (2019). Processed foods and food reward. *Science (New York, N.Y.)*, 363(6425), 346–347. <https://doi.org/10.1126/science.aav0556>
- [11] Lee, S. (2018, mayo). *Dichotomous Thinking Toward Food as a Mediator Between Eating Behavior and BMI*. Arizona State University. Recuperado diciembre de 2021, de <https://keep.lib.asu.edu/items/156490>
- [12] *Healthy Eating for a Healthy Weight*. (2021b, abril). Centers for Disease Control and Prevention. Recuperado diciembre de 2021, de https://www.cdc.gov/healthyweight/healthy_eating/index.html
- [13] Rathinam, A., Pari, L., Chandramohan, R., & Sheikh, B. A. (2014). Histopathological findings of the pancreas, liver, and carbohydrate metabolizing enzymes in STZ-induced diabetic rats improved by administration of myrtenal. *Journal of physiology and biochemistry*, 70(4), 935–946. <https://doi.org/10.1007/s13105-014-0362-z>
- [14] Rui L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*, 4(1), 177–197. <https://doi.org/10.1002/cphy.c130024>
- [15] Burhans, M. S., Hagman, D. K., Kuzma, J. N., Schmidt, K. A., & Kratz, M. (2018). Contribution of Adipose Tissue Inflammation to the Development of Type 2 Diabetes Mellitus. *Comprehensive Physiology*, 9(1), 1–58. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170040>
- [16] Kasper W. ter Horst, Lammers M, Nicolette., Trinko, Richard., Opland M, Darren., Figuee, Martijn., Ackermans, Mariette T., Booij, Jan., Van den Munchhof, Pepijn., Schuurman, P. Richard., Fliers, Eric., Denys Damiaan., Dileone, Ralph J., La Fleur, Susanne E., Serlie, Mireille J. 2018. Striatal dopamine regulates systemic glucose metabolism in humans and mice. *Sci Transl Med*. 23;10(442). <https://doi.org/10.1126/scitransmed.aar3752>.
- [17] Ruiz de Eguilaz, Blanca Martínez de Morentin Aldabe, Eva Almiron-Roig,

Salomé Pérez-Diez, Rodrigo San Cristóbal Blanco, Santiago Navas-Carretero, J. Alfredo Martínez. 2008. Influencia multisensoial sobre la conducta alimentaria: ingesta hedónica. 65(2):114-125

- [18] Klok, M.D., Jakobsdottir, S. & Drent, M. L. 2007. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*, 8(1), 21-34. Recuperado el 26 de enero de 2020 en [sci-hub.tw/10.1111/j.1467-789-x.2006.00270.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-789-x.2006.00270.x).
- [19] Munzberg, H., Filier, J.S., Bjorbaek. 2004. Region-specific leptin resistance within the hypothalamus of diet-induced obese mice. *Endocrinology*. 145: 4880-4889.

- [20] Unwin, N., Alberti, KG. 2006. Chronic non-communicable diseases. *Ann Trop Med Parasitol.* 100(5-6):455-464.
- [21] GBD 2015 Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 2016; 388(10053):1659-1724.
- [22] Sahoo, K., Sahoo, B., Choudhury, A. K., Sofi, N. Y., Kumar, R., & Bhadoria, A. S. (2015). Childhood obesity: causes and consequences. *Journal of family medicine and primary care*, 4(2), 187–192. doi:10.4103/2249-4863.154628
- [23] Krupa Das, Saltzman, Edward., McCrory Megan A., George Hsu, L.K. et al. 2004. *Am Soc for Nutritional Sciences.* 134(6):1412-11416. <https://doi.10.1093/jn/134.6.1412>
- [24] Van Dam, R. M., & Seidell, J. C. (2007). Carbohydrate intake and obesity. *European Journal of Clinical Nutrition*, 61(S1), S75–S99. doi:10.1038/sj.ejcn.1602939
- [25] Pi-Sunyer, Xavier. Overnutrition and undernutrition as modifiers of metabolic processes in disease states. 2000. *Am Journ Clin Nut.* 72(2):533S-537S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.2.533S>
- [26] Ishizuka, B., Quigley ME., Yen SS. 1983. Pituitary hormone release in response to food ingestion:evidence for neuroendocrine signals from gut to brain. *J Clin Endocrinol Metab.* 57(6):1111-6. <https://doi.10.1210/jcem-57-6-1111>.
- [27] Goldfein, Kara R., Slavin Joanne L. 2015. Why Sugar Is Added to Food: Food Science 101. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015; <https://doi:10.1111/1541-4337.12151>
- [28] Sugar 101. April 17, 2018. American Heart Association Cookbooks. <https://www.heart.org/en/healthy-living/healthy-eating/eat-smart/sugar/sugar-101>
- [29] Yki-Järvinen H. Liver fat in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Dig Dis.* 2010;28(1):203-209. doi:10.1159/000282087
- [30] Samuel, V.T. 2010. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab* 2011;21:60-5- <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.10.003>.
- [31] Challet, E. (2013). Circadian Clocks, Food Intake, and Metabolism. *Chronobiology: Biological Timing in Health and Disease*, 105– 135. doi:10.1016/b978-0-12-396971-2.00005-1.

- [32] El Bacha, T., Luz, M. & Da Poian, A. (2010) Dynamic Adaptation of Nutrient Utilization in Humans, *Nature Education* 3 (9):8.
- [33] Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman; 2002. Section 16.1, Glycolysis Is an Energy-Conversion Pathway in Many Organisms. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22593/>
- [34] Engelking, L. R. (2015). Oxidative Phosphorylation. *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*, 219–224. <https://doi:10.1016/b978-0-12-391909-0.50036-0>
- [35] Kumari, A. (2018). *Electron Transport Chain. Sweet Biochemistry*, 13– 16. <https://doi:10.1016/b978-0-12-814453-4.00003-0>
- [36] Letts, J. A., & Sazanov, L. A. (2017). Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature structural & molecular biology*, 24(10), 800–808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3460>
- [37] Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., ... Enriquez, J. A. (2013). Supercomplex Assembly Determines Electron Flux in the Mitochondrial Electron Transport Chain. *Science*, 340(6140), 1567–1570. <https://doi:10.1126/science.1230381>
- [38] Loschen, G., & Flohé, L. (1971). *Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria. FEBS Letters*, 18(2), 261–264. doi:10.1016/0014-5793(71)80459-3
- [39] Sabharwal, S. S., & Schumacker, P. T. (2014). Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel? *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 709– 721. <https://doi:10.1038/nrc3803>
- [40] Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox biology*, 6, 472–485. <https://doi:10.1016/j.redox.2015.09.005>
- [41] Hirst J., King M. S., Pryde K. R. 2008. The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem. Soc.* 2008;36:976-980.
- [42] Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem.* 2010;47:53-67. doi:10.1042/bse0470053
- [43] Li, X., Fang, P., Mai, J., Choi, E. T., Wang, H., & Yang, X. F. (2013). Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *Journal of hematology & oncology*, 6, 19. doi:10.1186/1756-8722-6-19

- [44] Zanella, M. T., Kohlmann, O., & Ribeiro, A. B. 2001. Treatment of Obesity Hypertension and Diabetes Syndrome. *Hypertension*, 38(3), 705–708. doi:10.1161/01.hyp.38.3.705
- [45] Litwack, G. 2018. Insulin and Sugars. *Human Biochemistry*. 131-160. <https://doi:10.1016/b978-0-12-383864-3.00006-5>.
- [46] Malone, J. I., & Hansen, B. C. (2018). *Does Obesity Cause Type 2 Diabetes? OR Is it the Opposite? A Commentary. Pediatric Diabetes*. doi:10.1111/pedi.12787
- [47] DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., ... Weiss, R. (2015). *Type 2 diabetes mellitus. Nature Reviews Disease Primers*, 15019. doi:10.1038/nrdp.2015.19
- [48] Mouri MI, Badireddy M. Hyperglycemia. [Updated 2019 Aug 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430900/>
- [49] Pérez, Francisco. 2009. Epidemiología y fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2. *RMCLC* 20(5): 565-571.
- [50] Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E., & Sahebkar, A. (2018). Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>
- [51] Nieto Vázquez, Iria., Fernández Veledo, Sonia., García Guerra, Lucía., Vila Bedmar, Rocío., Lorenzo, Margarita. 2008. Resistencia a insulina en el músculo esquelético: conexión con la obesidad. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 74(4):1-33.
- [52] DeFronzo, Ralph A. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin N Am* 88(2004): 787-835.
- [53] Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem.* 2009;42(13-14):1331-1346. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.05.018>
- [54] Kolczynska, K., Loza-Valdes, A., Hawro, I. *et al.* Diacylglycerol-evoked activation of PKC and PKD isoforms in regulation of glucose and lipid metabolism: a review. *Lipids Health Dis* 19, 113 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01286-8>
- [55] Gross, D., van den Heuvel, A. & Birnbaum, M. The role of FoxO in the regulation of metabolism. *Oncogene* 27, 2320–2336 (2008). <https://doi.org/10.1038/onc.2008.25>

- [56] Giugliano, D., Ceriello, A., Esposito, K. Glucose metabolism and hyperglycemia, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 87, Issue 1, January 2008, Pages 217S–222S, <https://doi.org/10.1093/ajcn/87.1.217S>
- [57] Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., ... Martín, C. (2020). *Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6275. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- [58] D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A. 2002. Increases O-glycosilation of insulin signaling proteins result in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J*. 18: 959-961.
- [59] Lupi R, Dotta F, Marselli L, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes*. 2002;51(5):1437-1442. doi:10.2337/diabetes.51.5.1437
- [60] Katz, L., & Barrett, B. (2019). *Dyslipidemia and Type II Diabetes. Pediatric Type II Diabetes*, 47–53. doi:10.1016/b978-0-323-55138-0.00007-3
- [61] Davidson, Michael H. Dic 2019. Dyslipidemia. MSD MANUAL, Endocrine and Metabolic disorders.
- [62] Taskinen, M. R. (2003). Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia*, 46(6), 733-749. <https://doi.org/10.1007/s00125-003-1111-y>.
- [63] McEneny J, O’Kane MJ, Moles KW, et al. 2000. Very low density lipoprotein subfractions in type II diabetes mellitus: alterations in composition and susceptibility to oxidation. *Diabetologia*. 2000;43:485–493. doi: 10.1007/s001250051333.
- [64] Wang, Y., Viscarra, J., Kim, S.-J., & Sul, H. S. 2015. Transcriptional regulation of hepatic lipogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(11), 678–689. <https://doi.org/10.1038/nrm4074>
- [65] Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K., & Giacca, A. 2002. Disordered Fat Storage and Mobilization in the Pathogenesis of Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews*, 23(2), 201–229. <https://doi.org/10.1210/edrv.23.2.0461>
- [66] Hirano T. 2018. Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 25(9), 771–782. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17023>

- [67] Berneis, K. K., & Krauss, R. M. 2002. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *Journal of Lipid Research*, 43(9), 1363–1379. <https://doi.org/10.1194/jlr.r200004-jlr200>
- [68] Hickman, I. J., & Macdonald, G. A. 2007. Impact of Diabetes on the Severity of Liver Disease. *The American Journal of Medicine*, 120(10), 829–834. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2007.03.025>
- [69] Pessayre, D., Fromenty, B., & Mansouri, A. 2004. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 16(11), 1095–1105. <https://doi.org/10.1097/00042737-200411000-00003>
- [70] Tiniakos, D. G., Anstee, Q. M., & Burt, A. D. 2018. Fatty Liver Disease. *Macswen's Pathology of the Liver*, 308–371. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6697-9.00005-4>
- [71] Kanda, T., Matsuoka, S., Yamazaki, M., Shibata, T., Nirei, K., Takahashi, H., Kaneko, T., Fujisawa, M., Higuchi, T., Nakamura, H., Matsumoto, N., Yamagami, H., Ogawa, M., Imazu, H., Kuroda, K., & Moriyama, M. 2018. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases. *World journal of gastroenterology*, 24(25), 2661–2672. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i25.2661>
- [72] Yan, L.-J. 2014. Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/137919>
- [73] Xiao, W., & Loscalzo, J. (2019). *Metabolic Responses to Reductive Stress. Antioxidants & Redox Signaling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7803>
- [74] Rosen, P., Nawroth, P. P., King, G., Moller, W., Tritschler, H.-J., & Packer, L. 2001. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 17(3), 189–212. <https://doi.org/10.1002/dmrr.196>
- [75] Sekhar RV, McKay SV, Patel SG, et al. Glutathione synthesis is diminished in patients with uncontrolled diabetes and restored by dietary supplementation with cysteine and glycine. *Diabetes Care*. 2011;34(1):162-167. doi:10.2337/dc10-1006
- [76] Lutchmansingh FK, Hsu JW, Bennett FI, Badaloo AV, McFarlane-Anderson N, Gordon-Strachan GM, et al. (2018) Glutathione metabolism in type 2 diabetes and

its relationship with microvascular complications and glycemia. PLoS ONE 13(6): e0198626. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198626>

- [77] Cho, N. H., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., & Malanda, B. (2018). *IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. Diabetes Research and Clinical Practice, 138, 271–281.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.diabres.2018.02.023>
- [78] Baena-Díez, JM., Peñafiel, J., Subirana, I. Ramos. R., Elosua, R., Marín, A., Jesús, M., Rigo, F. Tormo-Díaz, M.J., Moreno-Iribas, C., Cabré, J.J., Segura, A., García-Lareo, M., Gómez, A., Lapetra, J., Quesada, M., Marrugat, J., Medrano, M. J., Berjón., J., Frontera, G., Gavrilá, D., Barrocarte, A., Basora, J., García, J.M., Pavone, N.C., Lora-Pablos, D., Mayoral, E., Franch, J., Mata, M., Castell, C., Frances, A, Grau, M. 2016. Risk of Cause – Specific Death in Individuals With Diabetes: A Competing Risks Analysis. *Diabetes Care* 2016;39:1987-1995. <http://dx.doi.org/10.2337/dc1-0614>
- [79] LabDiet, 2020. Laboratory Rodent Diet. St.Louis, MO. Recuperado de: https://www.labdiet.com/cs/groups/lolweb/@labdiet/documents/web_content/mdrf/mdi4/~edisp/ducum04_028021.pdf
- [80] Lewis, S. M., Ullrey, D. E., Barnard, D. E., & Knapka, J. J. (2006). Nutrition. The Laboratory Rat, 219–301. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12074903-4/50012-1>
- [81] Treviño, S., Aguilar-Alonso, P., Flores Hernandez, J. A., Brambila, E., Guevara, J., Flores, G., ... Diaz, A. (2015). A high calorie diet causes memory loss, metabolic syndrome and oxidative stress into hippocampus and temporal cortex of rats. *Synapse, 69(9), 421–433.* <http://dx.doi.org/10.1002/syn.21832>
- [82] Khadke, S.p., Kuvalekar, A.A., Harsulkar, A. M., Mantri, N. 2019. High Energy Intake Induced Overexpression of Transcription Factors and Its Regulatory Genes Involved in Acceleration of Hepatic Lipogenesis: A Rat Model for Type 2 Diabetes. *Biomedicines. 2019,7,76.* <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines7040076>.
- [83] Hazarika, A., Kalita, H., Kalita, C.M., Devi, R. 2017. Withdrawal from High-Carbohydrate High-saturated-Fat diet changes saturated-fat distribution

and improves hepatic Low-Density-Lipoprotein-receptor expression to ameliorate metabolic síndrome in rats. *Nutrition*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2017.01.005>.

- [84] Wong, S., Chin, K.-Y., Suhaimi, F., Ahmad, F., & Ima-Nirwana, S. (2017). The Effects of a Modified High-carbohydrate High-fat Diet on Metabolic Syndrome Parameters in Male Rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 126(04), 205–212. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0043-119352>
- [85] Sheehan, J. P. (2004). *Fasting Hyperglycemia: Etiology, Diagnosis, and Treatment*. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 6(4), 525–533. doi:10.1089/1520915041705910
- [86] Ohashi, K., Fujii, M., Uda, S. *et al.* Increase in hepatic and decrease in peripheral insulin clearance characterize abnormal temporal patterns of serum insulin in diabetic subjects. *npj Syst Biol Appl* 4, 14 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41540-018-0051-6>
- [87] Abdul-Ghani, M. A. (2006). Contributions of β -Cell Dysfunction and Insulin Resistance to the Pathogenesis of Impaired Glucose Tolerance and Impaired Fasting Glucose. *Diabetes Care*, 29(5), 1130–1139. <http://dx.doi.org/10.2337/diacare.2951130>
- [88] Gerich J. (2013). Pathogenesis and management of postprandial hyperglycemia: role of incretin-based therapies. *International journal of general medicine*, 6, 877–895. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S51665>
- [89] Hiyoshi, T., Fujiwara, M., & Yao, Z. (2017). Postprandial hyperglycemia and postprandial hypertriglyceridemia in type 2 diabetes. *Journal of biomedical research*, 33(1), 1–16. Advance online publication. <https://doi.org/10.7555/JBR.31.20160164>
- [90] Thomas, D. D., Corkey, B. E., Istfan, N. W., & Apovian, C. M. (2019). Hyperinsulinemia: An Early Indicator of Metabolic Dysfunction. *Journal of the Endocrine Society*, 3(9), 1727–1747. <http://dx.doi.org/10.1210/js.2019-00065>
- [91] Hall, C., Yu, H. & Choi, E. Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance. *Exp Mol Med* (2020). <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0456-3>

- [92] Shanik, M. H., Xu, Y., Skrha, J., Dankner, R., Zick, Y., & Roth, J. (2008). *Insulin Resistance and Hyperinsulinemia: Is hyperinsulinemia the cart or the horse? Diabetes Care, 31(Supplement 2), S262–S268.* doi:10.2337/dc08-s264
- [93] Czech, M. P. (2017). *Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. Nature Medicine, 23(7), 804–814.* doi:10.1038/nm.4350
- [94] Lustig, R. H. (2006). *Childhood obesity: behavioral aberration or biochemical drive? Reinterpreting the First Law of Thermodynamics. Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism, 2(8), 447–458.* doi:10.1038/ncpendmet0220
- [95] Ghosh, S., & Collier, A. (2012). *Diagnosis, classification, epidemiology and biochemistry. Churchill's Pocketbook of Diabetes, 1–49.* <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-443-10081-9.00008-7>
- [96] Lee, P.G. & Halter, J.B. 2017. The Pathophysiology of Hyperglycemia in Older Adults: Clinical Considerations. *Diabetes Care.* 2017;40:444-452. <http://dx.doi.org/10.2337/dc16-1732>.
- [97] Gutiérrez-Rodelo, C., Roura-Guiberna, A., & Olivares-Reyes, J. A. (2017). Mecanismos moleculares de la resistencia a la insulina: una actualización. *Gaceta médica de México, 153(2), 214-228.*
- [98] Aguirre, V., Werner, E. D., Giraud, J., Lee, Y. H., Shoelson, S. E., & White, M. F. (2001). Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *Journal of Biological Chemistry, 277(2), 1531–1537.* <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m101521200>
- [99] Wallace, T. M., Levy, J. C., & Matthews, D. R. (2004). *Use and Abuse of HOMA Modeling. Diabetes Care, 27(6), 1487–1495.* doi:10.2337/diacare.27.6.1487
- [100] Ghasemi, A., Tohidi, M., Derakhshan, A., Hasheminia, M., Azizi, F., & Hadaegh, F. (2015). Cut-off points of homeostasis model assessment of insulin resistance, beta-cell function, and fasting serum insulin to identify future type 2 diabetes: Tehran Lipid and Glucose Study. *Acta Diabetologica, 52(5), 905–915.* doi:10.1007/s00592-015-0730-3
- [101] Ehrampoush, E., Homayounfar, R., Davoodi, S. H., Zand, H., Askari, A., & Kouhpayeh, S. A. (2016). Ability of dairy fat in inducing metabolic syndrome in rats. *SpringerPlus, 5(1).* doi:10.1186/s40064-016-3716-x

- [102] Biddinger, S. B., Hernandez-Ono, A., Rask-Madsen, C., Haas, J. T., Alemán, J. O., Suzuki, R., ... Kahn, C. R. (2008). Hepatic Insulin Resistance Is Sufficient to Produce Dyslipidemia and Susceptibility to Atherosclerosis. *Cell Metabolism*, 7(2), 125–134. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.013
- [103] Hegarty, B. D., Cooney, G. J., Kraegen, E. W., & Furler, S. M. (2002). Increased Efficiency of Fatty Acid Uptake Contributes to Lipid Accumulation in Skeletal Muscle of High Fat-Fed Insulin-Resistant Rats. *Diabetes*, 51(5), 1477–1484. doi:10.2337/diabetes.51.5.1477 Hogue, J.-C., Lamarche, B., Tremblay, A. J., Bergeron, J., Gagné, C., & Couture, P. (2007). Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *Journal of Lipid Research*, 48(6), 1336–1342. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m600548-jlr200>
- [104] Hogue, J.-C., Lamarche, B., Tremblay, A. J., Bergeron, J., Gagné, C., & Couture, P. (2007). Evidence of increased secretion of apolipoprotein B-48-containing lipoproteins in subjects with type 2 diabetes. *Journal of Lipid Research*, 48(6), 1336–1342. <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m600548-jlr200>
- [105] Laatsch, A., Merkel, M., Talmud, P. J., Grewal, T., Beisiegel, U., & Heeren, J. (2009). Insulin stimulates hepatic low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) to increase postprandial lipoprotein clearance. *Atherosclerosis*, 204(1), 105–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.046>
- [106] Vergés, Bruno. 2015. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. 58:886-899. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-015-3525-8>.
- [107] Taskinen, M.-R. (2003). Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice*. *Diabetologia*, 46(6), 733–749. <http://dx.doi.org/10.1007/s00125-003-1111-y>
- [108] Cuevas M., A., & Alonso K, R. (2016). DISLIPIDEMIA DIABÉTICA. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 27(2), 152–159. doi:10.1016/j.rmclc.2016.04.004

- [109] Hirano T. (2018). Pathophysiology of Diabetic Dyslipidemia. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, 25(9), 771–782. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17023>
- [110] Mooradian, AD. 2008. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews Endocrinology*. 5(3):150-159. <http://doi.org/10.1038/ncpendmet1066>.
- [111] Leon, B. M., & Maddox, T. M. (2015). Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World journal of diabetes*, 6(13), 1246–1258. <http://dx.doi.org/10.4239/wjd.v6.i13.1246>
- [112] Reiner, Ž. (2017). Hypertriglyceridaemia and risk of coronary artery disease. *Nature Reviews Cardiology*, 14(7), 401–411. <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2017.31>
- [113] Rana, J. S., Liu, J. Y., Moffet, H. H., Sanchez, R. J., Khan, I., & Karter, A. J. (2019). Risk of Cardiovascular Events in Statin-Treated Patients with Type 2 Diabetes and Metabolic Dyslipidemia without Prevalent Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *The American Journal of Medicine*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.07.003>
- [114] Dobiášová, M., & Frohlich, J. (2001). The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apob-lipoprotein-depleted plasma (FERHDL). *Clinical Biochemistry*, 34(7), 583–588. doi:10.1016/s0009-9120(01)00263-6.
- [115] Munoz. (2009). Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vascular Health and Risk Management*, 757. doi:10.2147/vhrm.s6269
- [116] Jung, UJ., Choi, MS. 2014. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci*. 15:6184-223. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms15046184>.
- [117] Kiyoshi, A. K., Barbanera, P. O., Carmo, N. O. L. do, Rosa, L. R. de O., & Fernandes, A. A. H. (2018). Effect of N-Acetylcysteine on Dyslipidemia

- and Carbohydrate Metabolism in STZ-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Vascular Medicine*, 2018, 1–7. doi:10.1155/2018/6428630
- [118] Yan, L.-J. (2014). Pathogenesis of Chronic Hyperglycemia: From Reductive Stress to Oxidative Stress. *Journal of Diabetes Research*, 2014, 1–11. doi:10.1155/2014/137919
- [119] Z. Chen, R. Tian, Z. She, J. Cai, H. Li, Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease, *Free Radical Biology and Medicine* (2020), doi: [https:// doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025).
- [120] Behari, J., Li, H., Liu, S., Stefanovic-Racic, M., Alonso, L., O'Donnell, C. P., ... Liu, Q. (2014). β -Catenin Links Hepatic Metabolic Zonation with Lipid Metabolism and Diet-Induced Obesity in Mice. *The American Journal of Pathology*, 184(12), 3284–3298. doi:10.1016/j.ajpath.2014.08.022
- [121] Cook JR, Langlet F, Kido Y, Accili D. Pathogenesis of selective insulin resistance in isolated hepatocytes. *J Biol Chem*. 2015;290(22):13972-13980. doi:10.1074/jbc.M115.638197
- [122] Muoio, D. M. (2014). Metabolic Inflexibility: When Mitochondrial Indecision Leads to Metabolic Gridlock. *Cell*, 159(6), 1253–1262. doi:10.1016/j.cell.2014.11.034
- [123] Görlach A, Dimova EY, Petry A, et al. Reactive oxygen species, nutrition, hypoxia and diseases: Problems solved?. *Redox Biol*. 2015;6:372-385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.016>
- [124] Saha, S. K., Lee, S. B., Won, J., Choi, H. Y., Kim, K., Yang, G. M., Dayem, A. A., & Cho, S. G. (2017). Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1544. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms18071544>
- [125] Ayala, A., Muñoz, M.F., Arguelles, S., 2014. Lipid Peroxidation: Production , Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>
- [126] Zarkovic, N., Cipak, A., Jaganjac, M., Borovic, S., & Zarkovic, K. (2013). Pathophysiological relevance of aldehydic protein modifications. *Journal of Proteomics*, 92, 239–247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.004>

- [127] Gallelli, C., Calcagnini, S., Romano, A., Koczwara, J., de Ceglia, M., Dante, D., ... Gaetani, S. (2018). Modulation of the Oxidative Stress and Lipid Peroxidation by Endocannabinoids and Their Lipid Analogues. *Antioxidants*, 7(7), 93. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox7070093>
- [128] Pillon, N.J., Vella, R.E., Soulère, L., Becchi, M., Lagarde, M., Soulage, C.O. 2011. Structural and Functional Changes in Human Insulin Induced by the Lipid Peroxidation Byproducts 4-Hydroxy-2-nonenal and 4-Hydroxy-2-hexenal. *Chemical Research in Toxicology*. 24(5):752-762.
- [129] Jaganjac, M., Tirosh, O., Cohen, G., Sasson, S., & Zarkovic, N.(2013). Reactive aldehydes – second messengers of free radicals in diabetesmellitus. *Free Radical Research*, 47(sup1), 39–48. <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2013.789136>
- [130] Sohet, F. M., Neyrinck, A. M., Dewulf, E. M., Bindels, L. B., Portois, L., Malaisse, W. J., ... Delzenne, N. M. (2009). Lipid peroxidation is not a prerequisite for the development of obesity and diabetes in high-fat-fed mice. *British Journal of Nutrition*, 102(03), 462. <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114508191243>
- [131] Masarone, M., Rosato, V., Dallio, M., Gravina, A. G., Aglitti, A., Loguercio, C., Federico, A., & Persico, M. (2018). Role of Oxidative Stress in Pathophysiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 9547613. <https://doi.org/10.1155/2018/9547613>
- [132] Sansbury, B. E., & Hill, B. G. (2014). Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 383–399. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.016
- [133] Thomas, D. D., Liu, X., Kantrow, S. P., & Lancaster, J. R., Jr (2001). The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(1), 355–360. <https://doi.org/10.1073/pnas.011379598>
- [134] Manna, P., Das, J., Ghosh, J., & Sil, P. C. (2010). Contribution of type 1 diabetes to rat liver dysfunction and cellular damage via activation of NOS, PARP, IκBα/NF-κB, MAPKs, and mitochondria-dependent pathways: Prophylactic role of arjunolic acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 48(11), 1465–1484. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.025

- [135] Virág, L., Szabó, É., Gergely, P., & Szabó, C. (2003). Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicology Letters*, 140-141, 113–124. doi:10.1016/s0378-4274(02)00508-8
- [136] Fujimoto, M., Shimizu, N., Kunii, K., Martyn, J. A. J., Ueki, K., & Kaneki, M. (2005). A Role for iNOS in Fasting Hyperglycemia and Impaired Insulin Signaling in the Liver of Obese Diabetic Mice. *Diabetes*, 54(5), 1340–1348. doi:10.2337/diabetes.54.5.1340
- [137] Shinozaki, S., Choi, C. S., Shimizu, N., Yamada, M., Kim, M., Zhang, T., ... Kaneki, M. (2011). Liver-specific Inducible Nitric-oxide Synthase Expression Is Sufficient to Cause Hepatic Insulin Resistance and Mild Hyperglycemia in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 34959–34975. doi:10.1074/jbc.m110.187666
- [138] Vomhof-Dekrey EE, Picklo MJ Sr. The Nrf2-antioxidant response element pathway: a target for regulating energy metabolism. *J Nutr Biochem*. 2012;23(10):1201-1206. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.03.005>
- [139] Teskey G, Abraham R, Cao R, et al. Glutathione as a Marker for Human Disease. *Adv Clin Chem*. 2018;87:141-159. <http://doi.org/10.1016/bs.acc.2018.07.004>
- [140] Sheweita SA, Mashaly S, Newairy AA, Abdou HM, Eweda SM. Changes in Oxidative Stress and Antioxidant Enzyme Activities in Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus in Rats: Role of Alhagi maurorum Extracts. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5264064. <http://doi.org/10.1155/2016/5264064>
- [141] Cisneros, R., Oré, R., Arnao, I., Suarez, S. 2011. Relación de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii walp*). *Anales de la Fac. Medicina*. 2011(72):107-111. <https://doi.org/10.15381/anales.v72i2.990>
- [142] Calabrese, V., Cornelius., C., Leso, V., Trovato-Salinaro, A., Ventimiglia, B., Cavallaro, M., Scuto, M., Rizza, S., Zanolli, L., Neri, S., Castellino, P. 2012. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1822 (2012): 729-736. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.003>.
- [143] Prabhakar R, Vreven T, Morokuma K, Musaev DG. Elucidation of the mechanism of selenoprotein glutathione peroxidase (GPx)-catalyzed hydrogen

peroxide reduction by two glutathione molecules: a density functional study. Biochemistry. 2005;44(35):11864-11871. <http://doi.org/10.1021/bi050815g>.

13. APÉNDICES

Anexo A. PROCEDIMIENTOS CON SUERO.

Anexo 1. Determinación de la concentración de glucosa sérica.

Método: De Trinder, Glucosa oxidasa- Peroxidasa. Automatizado

- **Procedimiento:**

Condiciones de ensayo:

Longitud de onda: 505 nm

Temperatura: 37°C

1. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada
3. Pipetear en un tubo de ensayo:

	<i>Blanco</i>	<i>Patrón</i>	<i>Muestra</i>
<i>RT (mL)</i>	300	300	300
<i>Patrón (μL)</i>	---	3	---
<i>Muestra (μL)</i>	---	---	3

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 5 minutos a 37° C.
4. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

- **Cálculos**

$$\frac{\frac{Abs}{Muestra}}{Abs Patrón} \times 100 (\text{Concentración Patrón}) = \text{mg/dL de glucosa}$$

Anexo 2. Determinación de la concentración de insulina sérica.

Método: Inmunoensayo.

- **Procedimiento**

1. Saque los micropozos necesarios para cada suero de referencia, controles y muestras. Coloque 50 µL de los sueros de referencia, controles y muestras en los pozos correspondientes.
2. Agregue 100µL de la solución del Reactivo de la Enzima de Insulina a todos los pozos y golpear suavemente uno de los extremos de la microplaca por 20- 30 segundos para mezclar. Selle la microplaca con una cubierta de plástico.
3. Incube por 120 minutos a temperatura ambiente (20-27°C)
4. Deseche el contenido de la microplaca por decantación o aspiración.
5. Agregue 300µL de la solución de lavado. Repita dos (2) veces adicionales.
6. Agregue 0.100 mL (100µL) de la solución de substrato a todos los pozos
7. Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos.
8. Agregue 0.050 mL (50µL) de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.
9. Lea la absorbancia en cada pozo a 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector de microplacas. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de haber agregado la solución de paro.

- **Cálculos**

Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de Insulina en especímenes desconocidos.

1. Registre la absorbancia obtenida del listado del lector de microplacas.
2. Trace la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de Insulina en µIU/mL.
3. Calcule la ecuación de la línea recta para la curva de calibración.
4. Para determinar la concentración de Insulina para un desconocido, despeje x de la ecuación de la línea recta.

Anexo 3. Determinación de la concentración de colesterol total sérico.

Método: CHOD-POD, líquido. Automatizado

- **Procedimiento**

Condiciones de ensayo:

Longitud de onda: 505 nm

Temperatura: 37°C

1. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada
3. Pipetear en un tubo de ensayo:

	<i>Blanco</i>	<i>Patrón</i>	<i>Muestra</i>
<i>RT (mL)</i>	300	300	300
<i>Patrón (µL)</i>	---	3	---
<i>Muestra (µL)</i>	---	---	3

4. Agitar bien e incubar los tubos durante 10 minutos a 37° C.
5. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

- **Cálculos**

$$\frac{Abs\ Muestra}{Abs\ Patrón} \times 100 \text{ (Concentración Patrón)} = \text{mg/dL de colesterol}$$

Anexo 6. Determinación de la concentración de colesterol HDL reactivo precipitante.

Método: Reactivo precipitante.

- **Procedimiento**

1. Condiciones de ensayo: Longitud de onda: 505 nm.
2. Agregar en un tubo de ensayo:
Reactivo: 25 µL
Suero: 250 µL
3. Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
4. Centrifugar 2 min a 12 rpm
5. Recoger el sobrenadante y procesar como muestra en la determinación de colesterol total.

NOTA: Es muy importante formar el sobrenadante del menisco formado en el tubo, para ello no introducir demasiado la punta y no arrastrar las fracciones VLDL y LDL.

- **Cálculos**

Seguir las instrucciones detalladas en el inserto de colesterol:

$$\frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Patrón}} \times 100 \text{ (Concentración Patrón)} = \text{mg/dL de colesterol}$$

Anexo 7. Determinación de la concentración de colesterol LDL reactivo precipitante

Método: Reactivo precipitante

- **Procedimiento**

1. Pipetear en un tubo de ensayo:
Reactivo: 100 µL. Suero: 200 µL
2. Agitar bien y dejar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 2 min a 12,000 rpm.
4. Recoger cuidadosamente el sobrenadante y procesar como muestra en la determinación de colesterol total.

NOTA: El sobrenadante debe ser completamente claro. En caso de persistir la turbidez o de no obtener una buena sedimentación del precipitado, adicionar otros 200 µL de reactivo, mezclar bien y centrifugar de nuevo. Multiplicar el resultado obtenido por 1.3 para corregir la dilución efectuada.

- **Cálculos**

La concentración de colesterol en el sobrenadante se calcula a partir de la siguiente fórmula general:

$$\frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Patrón}} \times 100 (\text{Concentración Patrón}) \times \text{Factor de dilución} = \text{mg/dL de colesterol sobrenadante}$$

Anexo 8. Determinación de la concentración de ácidos grasos libres

Reactivos

- Cloroformo
- Reactivo de cobre: Consiste en $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 40,0 g/litro; trietanolamina 99%, 120,0 ml/litro (135,0 g/litro). Se disuelve el nitrato cúprico en 500 ml de agua destilada, agregue la trietanolamina y diluir a 1 litro con agua destilada.
- Reactivo cuprizona. Este consiste en ácido oxálico-bis (cyclohexylidenehydrazide), 0.40 g/litro de isopropanol. Disolver la cuprizona en 10 ml de cloroformo y se diluye con isopropanol para 1 litro. esta solución es estable durante al menos tres meses a temperatura ambiente.
- Reactivo amoníaco. 100 ml de una solución al 58% de NH_4OH (concentrado) se diluye hasta 1 litro con agua destilada agua.

• Procedimiento

1. Añadir 50 μL de suero en un tubo de ensayo
2. A un tubo semejante, se añaden 50 μL de estándar de ácido oleico.
3. Para otro tubo de ensayo añadir 100 μL de agua, este será el blanco de reactivo.
4. Para todos los tubos añadir 150 μL de reactivo de cobre y 1 ml de cloroformo.
5. Coloque los tubos verticalmente en un vortex y agite por 10 min.
6. Centrifugar los tubos 10 minutos a 1500 rpm.
7. Extraer las fases de cloroformo en otros tubos de ensayo cuidando el no extraer la fase acuosa de color azul.
8. De cada tubo, pipetear 500 μL de extracto de cloroformo y colocar en un nuevo tubo, la evaporación debe mantenerse a un mínimo.
9. A cada tubo, añadir 450 μL de reactivo cuprizona, tapar y agitar suavemente.
10. A cada tubo, añadir 50 μL de solución de amoníaco, tapar y agite suavemente.
11. Lea la absorbancia a 620 nm (frente a un blanco a cero de absorbancia) 10 minutos después de agitar con la solución de amoníaco.

12. Si aparece un precipitado azul, agitar la cubeta enérgicamente para redispersarlo y leer la absorbancia.

- **Cálculos**

El ácido graso libre (FFA) contenido se calcula:

$$\text{Concentración en mg/dl} = (\text{Abs muestra} / \text{Abs estándar}) \times 8.6 \text{ mg/dl}$$

Anexo 4. Determinación de la concentración de triglicéridos séricos

Método: GPO-POD, líquido. Automatizado.

- **Procedimiento**

Condiciones de ensayo:

Longitud de onda: 505 nm

Temperatura: 37°C

4. Atemperar el reactivo a temperatura ambiente.
5. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada
6. Pipetear en un tubo de ensayo:

	<i>Blanco</i>	<i>Patrón</i>	<i>Muestra</i>
<i>RT (mL)</i>	300	300	300
<i>Patrón (μL)</i>	---	3	---
<i>Muestra (μL)</i>	---	---	3

3. Agitar bien e incubar los tubos durante 5 minutos a 37° C.

4. Leer la absorbancia (A) del patrón y de la muestra a 505 nm frente al blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 60 minutos.

- **Cálculos**

$$\frac{\text{Abs Muestra}}{\text{Abs Patrón}} \times 100 (\text{Concentración Patrón}) = \text{mg/dL de triglicéridos}$$

Anexo B. PROCEDIMIENTOS CON TEJIDO HEPÁTICO

Cuantificación de nitritos por el método de Griess

Muestra: Sobrenadante de homogenizado de tejido hepático con PBS.

Reactivos:

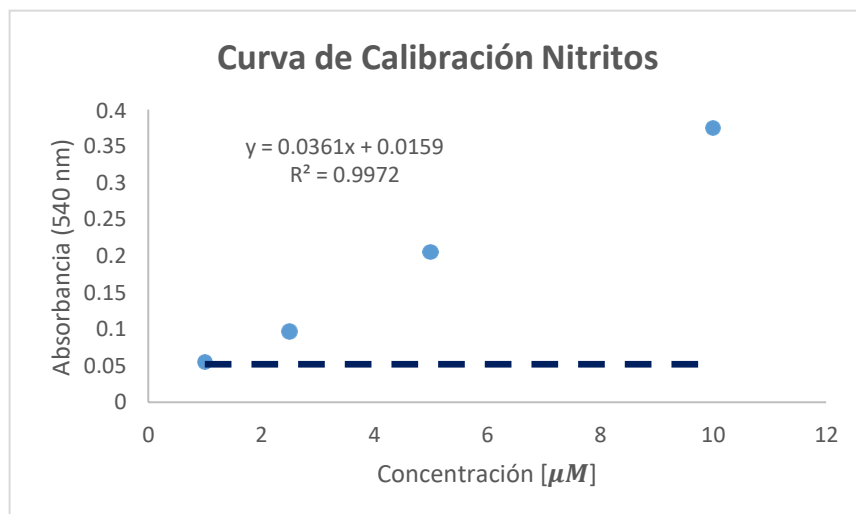
- Stock de nitritos
 - Nitritos de sodio 1M (Solución A): 0.69 g de NaNO_2 en 10 mL de H_2O destilada, para 1mM, 0.069 g en 1 mL de H_2O destilada.
 - Stock 1mM: Diluir la solución A 1:1000.
- Reactivo de Griess. Se preparan las siguientes soluciones:
 - Solución A: 1.32% de sulfanilamida en 60% de ácido acético. Mezclar 1.32 g de sulfanilamida con 60 mL de ácido acético concentrado (puede ser glacial) y 39 mL de agua destilada, almacenar a 4°C.
 - Solución B: 0.1 g de N-1-naftil-etilen diamino HCl. Mezclar 0.1 g en 100 mL de agua destilada (sensible a la luz) almacenar a 4°C.

Procedimiento:

1. Preparar la siguiente curva de calibración de nitritos

Número de tubo	Concentración [μM]	Stock de Nitritos 1Mm (μL)	H ₂ O destilada (μL)	Reactivo de Griess (μL)	H ₂ O destilada (μL)
1	Blanco	---	100.0	100	800
2	1.0	1.0	99.0	100	800
3	2.5	2.5	97.50	100	800
4	5.0	5.0	95.00	100	800
5	10.0	10.0	90.00	100	800
<i>Problema</i>	---	100 (Homogenado)	---	100	800

2. Agregar en cada pozo 100 μL de muestra.
3. Luego de adicionar el reactivo de Griess, esperar a que reaccione 10 minutos
4. Leer a 540 nm El reactivo de Griess está compuesto por volúmenes iguales de n-1-naftiletilendiamino al 0.1% disuelto en agua destilada y sulfanilamida al 1.32% disuelta en ácido acético al 60%.



Determinación de malondialdehído (MDA)

Muestra: Sobrenadante de homogenizado de tejido hepático con PBS.

Reactivos:

- Solución estándar de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (Patrón de MDA): Hacer una solución a una concentración de 10 mM de 1,1,3,3 tetrametoxipropano. Adicionar 16.5 μL de este patrón de MDA (densidad 0.997 g/mL) en 10 mL de agua destilada o solución amortiguadora en que se encuentra diluida la muestra.
- Solución de N-metil-2-fenil-indol: Disolver 38 mg de N-metil-2-fenil-indol en 18 mL de acetonitrilo, para obtener una concentración de 10.3 mM. Antes de emplear la solución, debe diluirse adicionando aprox. 6 mL de metanol hasta alcanzar un volumen final de 24 mL (Solución I diluida).

Procedimiento:

Diluya la solución estándar de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (patrón de MDA) en agua destilada o en la solución amortiguadora usada para diluir la muestra. Para ello tome 500 μL de la solución II y adiciónelos a un matraz volumétrico de 50 mL y complete hasta 50 mL. Con este procedimiento se logra una concentración de 100 μM del patrón de MDA (Solución II diluida).

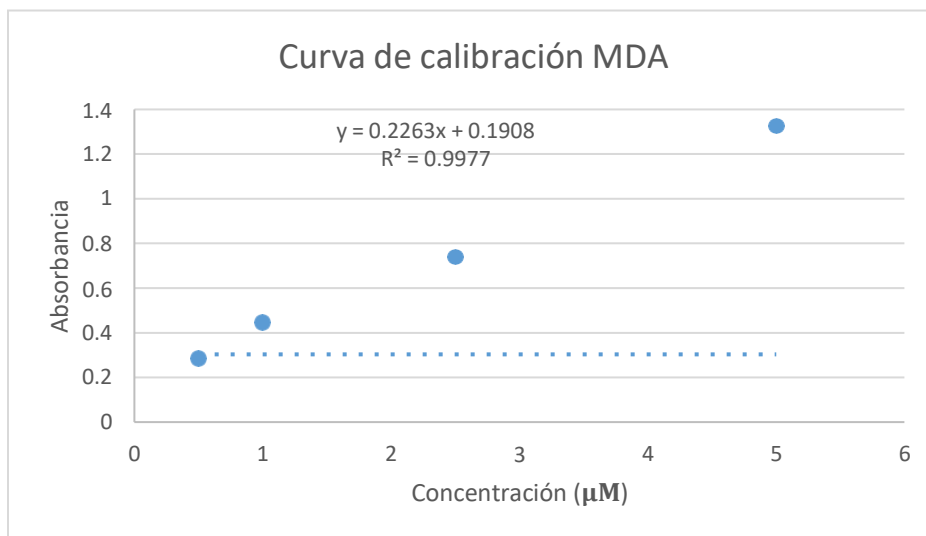
Curva estándar de MDA

Solución II Concentración Final	0 μM (Blanco)	0.5 μM	1.0 μM	2.5 μM	5.0 μM
Solución I Diluida (μL)	650	650	650	650	650
Solución II diluida (μL)	0	25	50	100	150
Agua destilada (μL)	200	195	190	175	150

Agite en vortex, adicione 150 μL de HCl 35%, agite en vortex y cierre los tubos. Incube a 45°C durante 1 hora. Enfríe a temperatura ambiente y lea la absorbancia a 585 nm contra agua destilada.

Muestras problema

1. Adicionar 650 μL de la Solución I diluida y 200 μL del homogenado de la muestra, llevar a vibroagitación 3-4 segundos.
2. Adicionar 150 μL de ácido clorhídrico al 35%
3. Mezcle vigorosamente y tape los tubos.
4. Incubar a 45°C durante 60 minutos
5. Enfriar a temperatura ambiente y centrifugar durante 15 min a 3000 rpm
6. Leer la absorbancia a 585 nm contra blanco de reactivo.



Determinación de 4-Hidroxiálquenos (4-HDA)

Muestra: Sobrenadante de homogenizado de tejido hepático con PBS

Reactivos:

- Solución estándar de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (Patrón de MDA): Hacer una solución a una concentración de 10 mM de 1,1,3,3 tetrametoxipropano. Adicionar 16.5 μL de este patrón de MDA (densidad 0.997 g/mL) en 10 mL de agua destilada o solución amortiguadora en que se encuentra diluida la muestra.
- Solución de N-metil-2-fenil-indol: Disolver 38 mg de N-metil-2-fenil-indol en 18 mL de acetonitrilo, para obtener una concentración de 10.3 mM. Antes de

emplear la solución, debe diluirse adicionando aprox. 6 mL de metanol hasta alcanzar un volumen final de 24 mL (**Solución I diluida**).

Procedimiento:

Diluya la solución estándar de 1,1,3,3 tetrametoxipropano (patrón de MDA) en agua destilada o en la solución amortiguadora usada para diluir la muestra. Para ello tome 500 μL de la solución II y adiciónelos a un matraz volumétrico de 50 mL y complete hasta 50 mL. Con este procedimiento se logra una concentración de 100 μM del patrón de MDA (**Solución II diluida**).

Curva estándar de MDA

Solución II Concentración Final	0 μM (Blanco)	0.5 μM	1.0 μM	2.5 μM	5.0 μM
Solución I Diluida (μL)	650	650	650	650	650
Solución II diluida (μL)	0	25	50	100	150
Agua destilada (μL)	200	195	190	175	150

Agite en vortex, adicione 150 μL de ácido metanosulfónico 99 %, agite en vortex y cierre los tubos. Incube a 45°C durante 1 hora. Enfríe a temperatura ambiente y lea la absorbancia a 505 nm contra agua destilada.

Muestras problema

1. Adicionar 650 μL de la Solución I diluida y 200 μL del homogenado de la muestra, llevar a vibro agitación 3-4 segundos.
2. Adicionar 150 μL de ácido metanosulfónico al 99%
3. Mezcle vigorosamente y tape los tubos.
4. Incubar a 45°C durante 60 minutos
5. Enfriar a temperatura ambiente y centrifugar durante 15 min a 3000 rpm
6. Leer la absorbancia a 505 nm contra blanco de reactivo.

NOTA: Para determinar la concentración final de 4-HDA se resta la absorbancia determinada por el método de Malondialdehído, ya que esta técnica cuantifica MDA + 4-HDA.

Determinación de glutatión reducido (GSH)

Muestra: Sobrenadante de homogenado de tejido hepático y ácido metafosfórico al 5%.

Reactivos:

- Buffer de fosfato de potasio 0.1M con KPE.
- Estándar de GSH: disolver 1 mg de GSH en KPE, diluir hasta obtener una concentración de 26.4 nM ml⁻¹, 13.2 nM ml⁻¹, 6.6 nM ml⁻¹, 3.3 nM ml⁻¹ y 0.103 nM ml⁻¹.
- Solución de DTNB: disolver 2 mg de DTNB en 3 ml de KPE.
- Solución de β-NADPH: disolver 2 mg de β-NADPH en 3 ml de KPE.
- Glutatión reductasa: mezclar 40 μl de GR (250 unidades ml⁻¹) con 3 ml de KPE.

Procedimiento:

1. Agregar 20 μl de KPE al pocillo A (blanco) y 20 μl de cada estándar a los pocillos B-H de la primera columna, agregar 20 μl de cada muestra en cada pocillo en las columnas 2 y 3.
2. Mezclar volúmenes iguales de DTNB fresco y solución de GR, agregar 120 μl a cada pocillo.
3. Dejar pasar 30 s para la conversión de GSSG a GSH y entonces agregar 60 μl de β-NADPH.
4. Leer la absorbancia a 412 nm y leer la medición cada 30 s durante 2 min (en total 5 lecturas en 120 s). Repetir dos veces para cada muestra.

Determinación de glutatión oxidado (GSSG)

Muestra: Sobrenadante de homogenado de tejido hepático y ácido metafosfórico al 5%.

Reactivos:

- Buffer de fosfato de potasio 0.1M con KPE.
- Buffer de extracción 0.1% Triton X-100 y 0.6% de ácido sulfosalicílico en KPE.
- Estándar de GSSG: disolver 2.01 mg de GSSG en KPE, diluir hasta obtener una concentración de 26.4 nM ml⁻¹, 13.2 nM ml⁻¹, 6.6 nM ml⁻¹, 3.3 nM ml⁻¹ y 0.103 nM ml⁻¹.
- Solución de 2-Vinilpiridina: diluir 1:10 con KPE.
- Solución de trietanolamina: diluir 1:6 con KPE.

Procedimiento:

1. Agregar 100 µl del extracto celular con ácido sulfosalicílico en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. A esto, añadirle 2 µl de solución de 2-vinilpiridina y mezclar bien.
2. Agregar 6 µl de solución de trietanolamina y mezclar vigorosamente. El pH final debe ser entre 6 y 7.
3. Agregar 20 µl de la mezcla del tubo Eppendorf al pocillo A (blanco) y 20 µl de cada estándar de GSSG a los pocillos B-H de la primera columna, agregar 20 µl de cada muestra en cada pocillo en las columnas 2 y 3.
4. Leer espectrofotométricamente a 412 nm

Cálculos:

La cantidad de glutatión medido representa la suma del glutatión oxidado y reducido en la muestra ($[GSH]_{total} = [GSH] + 2 \times [GSSG]$).

Determinación de la actividad enzimática de Glutatión Reductasa.

Muestra: Sobrenadante de homogenizado de tejido hepático con PBS

Reactivos:

- Buffer regulador: KH_2PO_4 139 mM y EDTA 0.76 mM en agua destilada. Ajustar pH a 7.4 con NaOH diluido o HCl diluido según sea necesario.
- Reactivo principal: 18 mL de buffer regulador y 2ml de NADPH 2.5 mM.
- Solución de FAD: disolver 1 mg de FAD en 3.85 mL de agua destilada.
- GSSG: disolver 53.9 mg de GSSG en 4 mL de buffer stock.
- Buffer stock: Fosfato de sodio monobásico 12.5 mM y EDTA disódico 6.3 mM. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH diluido en agua destilada o HCl diluido en agua destilada según sea el caso, ajustar el pH con NaOH diluido.

Procedimiento:

1. Homogenizar la muestra en PBS 50 mM y centrifugar a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C para obtener el sobrenadante.
2. Agregar 440 μl del reactivo principal, 60 μl del buffer regulador, 40 μl de muestra y 20 μl de FAD. Es importante agregarlos en ese orden.
3. Leer la absorbancia inicial a 340 nm y 37 °C y $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ durante 3 min, calcular el promedio de $\Delta\text{Abs}/\text{min}$, el valor es A en la fórmula.
4. Adicionar 20 $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ del buffer regulador y 60 $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ de GSSG.
5. Leer la absorbancia inicial a 340 nm y 37 °C y $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ durante 3 min, calcular el promedio de $\Delta\text{Abs}/\text{min}$, el valor es B en la fórmula.

Cálculos:

$[(B-A) \times 1608] \cdot 2 = \text{U/mL de Actividad de Glutación reductasa}$

$$\text{U/mg de proteína} = \frac{[(B - A) \times 1608]^2}{\text{mg de proteína/mL}}$$

Determinación de la actividad enzimática de Glutación peroxidasa

Muestra: Sobrenadante de homogenizado de tejido hepático y buffer de sucrosa.

Reactivos:

- Buffer de sucrosa: sucrosa 0.25 M en buffer de fosfatos 50 mM adicionado con 1.15 % de KCl a un pH de 7.6

- Sustrato de hidropéroxido: diluir 113.3 μL de H_2O_2 30 % (1 mM) en 1 L de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.6.

Procedimiento:

1. Homogenizar la muestra al 10% en frío en buffer de sucrosa. Centrifugar 10 – 15 min a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C.
2. Agregar 100 μL de muestra y 875 μL de reactivo de acoplamiento. Incubar 3 minutos a 37 °C.
3. Adicionar 25 μL de hidropéroxido como sustrato.
4. Leer la absorbancia inicial y luego cada minuto durante 2 min a 340 nm y 37 °C.
5. Calcular el promedio de $\Delta\text{Abs}/\text{min}$.

Cálculos:

Actividad de GPx (U/mL) = $\Delta\text{Abs}/\text{minuto} \times 161$

Actividad de GPx en U/mg de proteína = $\frac{\Delta\text{Abs}/\text{minuto} \times 161}{\text{mg de proteína/mL}}$

Determinación de la actividad enzimática de glutatión transferasa

Muestra: Sobrenadante de homogenizado de tejido hepático con PBS

Reactivos:

- Reactivo 1: Buffer de KH_2PO_4 pH 6.25. Se prepara en agua destilada.
- Reactivo 2: GSH (Glutation reducido) 30.7 mg /mL en agua destilada.
- Reactivo 3: 76.8 mg DNCB (1 cloro,2-4 dinitrobenceno) en 6 mL de etanol al 95 o 70 %.

Procedimiento:

1. Homogenizar el tejido con PBS 50 mM, centrifugar de 10000 – 15000 rpm durante 10 min a 4 °C.
2. Correr un blanco de reactivo: 912.5 μL del reactivo 1 + 50 μL del reactivo 2 + 12.5 μL del reactivo 3 + 25 μL del reactivo 1.

3. Medir ΔAbs inicial a 405 nm y luego a cada minuto durante 5 min a 37 °C.
Calcular el promedio de ΔAbs .
4. Agregar 912.5 μl del reactivo 1, 50 μl del reactivo 2, 12.5 μl del reactivo 3 y 25 μl de muestra. Es importante añadirlos en ese orden.
5. Monitorear la ΔAbs de las muestras exactamente de la misma forma que el blanco.

Cálculos:

$$U/mg \text{ de proteína} = \frac{[(\Delta Abs \text{ muestra} - \Delta Abs \text{ blanco})4166.66]2}{mg \text{ de proteína total/mL}}$$