

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Departamento de Sistemas Biológicos  
Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

## Participación de la mitocondria en los procesos de autofagia en el hígado de animales con síndrome metabólico

### Asesor interno

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez  
No. Económico 37622  
Profesor investigador titular C  
Departamento de Inmunología de la Universidad  
Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

### Asesor externo

Dra. Angélica Ruiz Ramírez  
No. Cédula 8082378  
Investigador en Ciencias Médicas "B"  
Departamento de Biomedicina Cardiovascular del INC  
Ext 25300

### Alumna

Lucero Islas Mercedes Andrea  
Matrícula: 2192031522

### Lugar de realización

Departamento de Biomedicina Cardiovascular.  
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".  
Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Delegación Tlalpan, C.P. 14080, CDMX.

**Fecha de inicio:** 07/11/2022

**Fecha de término:** 07/05/2023



## **AUTORIZACIONES PARA LA PRESENTACIÓN DEL PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL**

Después de que cada uno de los asesores firmantes ha revisado el presente Proyecto de Servicio Social, se concede la autorización para su presentación.

### **Asesor Interno**



---

Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez No. Económico  
37622  
Profesor investigador titular C  
Departamento de Inmunología de la Universidad Autónoma  
Metropolitana Unidad Xochimilco

### **Asesor Externo**



---

Dra. Angélica Ruiz Ramírez  
No. Cédula 8082378  
Investigador en Ciencias Médicas "B"  
Departamento de Biomedicina Cardiovascular del INC Ext 25300

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
DIAGRAMAS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	6
2. MARCO INSTITUCIONAL Y COMPROMISO SOCIAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA "IGNACIO CHÁVEZ" .....	7
2.1 MARCO INSTITUCIONAL.....	7
2.2 MISIÓN .....	7
3. OBJETIVOS DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.....	8
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
3.3 DESCRIPCIÓN ESPECÍFICA DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS.....	8
4. METODOLOGÍA .....	9
4.1 EXTRACCIÓN DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO Y RIÑÓN .....	9
4.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY .....	10
4.3 SEPARACIÓN DE MEMBRANAS MITOCONDRIALES.....	12
4.4 WESTERN BLOT .....	13
5. RESULTADOS Y METAS ALCANZADAS.....	14
6. CONCLUSIONES .....	15
7. RECOMENDACIONES .....	16
8. BIBLIOGRAFÍA.....	16
9. ANEXO .....	18

## **FIGURAS**

Figura 1. Expresión de ATG12, ATG 5 y la Unión de ambas proteínas como parte de la vía de la autofagia. 15

Figura 2. Expresión de Mitofusina 1 y 2 como parte de la vía de biogénesis mitocondrial..... 15

## **DIAGRAMAS**

Diagrama 1. Metodología..... 18

# ABREVIATURAS

**SM.** Síndrome Metabólico.

**HGNA.** Hígado graso no alcohólico.

**SOD.** Superóxido dismutasa.

**BSA.** Albúmina de suero bovino.

**STE.** Sacarosa-Tris-EGTA.

**ST.** Sacarosa-Tris.

**SHE.** Sacarosa-HEPES-EGTA.

**SH.** Sacarosa-HEPES.

**EGTA.** Ácido etilenglicol tetraacético.

**HEPES.** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin etanosulfónico.

**SDS.** Dodecil sulfato de sodio.

**PVDF.** Difluoruro de polivinilideno.

**TBS.** Solución salina tamponada con Tris.

**TBS-T.** Solución salina tamponada con Tris y Tween.

**DMSO.** Dimetilsulfóxido.

**MEM.** Membrana (s)

# 1. INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es una condición médica compleja que se caracteriza por la presencia de varios factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Estos factores incluyen obesidad abdominal, resistencia a la insulina, hipertensión arterial y niveles elevados de triglicéridos y colesterol LDL (Saklayen, 2018). La prevalencia de dicho síndrome varía según los estadios y regiones, sin embargo, se estima que afecta a un 25% en la población adulta global, siendo una enfermedad cada vez más común en todo el mundo. En México, según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) de 2018, aproximadamente el 36% de la población cursa con síndrome metabólico, lo que representa un grave problema de salud pública.

Agregando a lo anterior, el hígado graso no alcohólico (HGNA), el cual se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado, puede progresar a una enfermedad hepática más grave, como la esteatohepatitis no alcohólica y la cirrosis (Castro, 2012). El hígado es uno de los principales órganos que se afectan en el SM debido a que está expuesto a los lípidos que se movilizan desde el tejido adiposo, a su capacidad para acumular grasa, así como de llevar a cabo biosíntesis de *novo* de ácidos grasos (Botham *et al.*, 2016).

Aun cuando existe un sinnúmero de estudios para entender los mecanismos moleculares del desarrollo del HGNA, es tal su complejidad que aún existen muchas preguntas por responder, sobre todo de cómo se lleva a cabo la transición de la esteatosis simple a esteatohepatitis caracterizado por ser un proceso fibrótico y proliferativo. En este sentido, la mitocondria juega un papel fundamental en el estudio de la enfermedad del HGNA ya que además de ser la principal fuente de energía en la célula. Además de participar como la principal generadora de especies reactivas del oxígeno asociadas a múltiples enfermedades, también activa la vía de muerte celular por apoptosis, así como vías de rescate celular como la autofagia (Ke Pro-Yuan, 2020).

La autofagia, un proceso celular de degradación y reciclaje de proteínas y organelos que puede desempeñar un papel importante en el desarrollo del hígado graso no alcohólico. Se ha demostrado que la disminución de la autofagia está asociada con la acumulación de grasa en el hígado y el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica. Por lo tanto, el estudio de la participación de la mitocondria en la activación de la autofagia en

el HGNA presente en el SM puede proporcionar nuevas pistas sobre la prevención y el tratamiento de esta enfermedad (Ke Pro-Yuan,2020).

## **2. MARCO INSTITUCIONAL Y COMPROMISO SOCIAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA “IGNACIO CHÁVEZ”**

### **2.1 MARCO INSTITUCIONAL**

El Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" es una institución médica mexicana dedicada a la investigación, prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

### **2.2 MISIÓN**

El compromiso del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, es proporcionar atención cardiovascular de alta especialidad con calidad a la población, preferentemente a la que carece de seguridad social; asimismo, desarrolla investigación de vanguardia y forma especialistas en cardiología y ramas afines. El cumplimiento de estas funciones ha sido un instrumento de ayuda social y humana que pugna por la prevención de las cardiopatías y ayuda a la rehabilitación integral de los enfermos.

### **2.1 VISIÓN**

Continuar como una institución de liderazgo nacional en el campo de la cardiología, con respeto y presencia internacional, siendo un modelo de organización pública que canalice con oportunidad y eficiencia los recursos disponibles para garantizar el cumplimiento de los objetivos institucionales, lo que nos facilitará evolucionar al ritmo de los cambios vertiginosos del entorno internacional.

### **3. OBJETIVOS DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el papel de la autofagia/mitofagia en el desarrollo de la esteatosis hepática como posible mecanismo de protección al daño generado por el SM.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar la vía de la autofagia/mitofagia en los hígados del modelo de SM.
- Determinar la participación de la mitocondria en la activación o desregulación en los procesos de autofagia/mitofagia en el modelo de SM.

#### **3.3 DESCRIPCIÓN ESPECÍFICA DE LAS ACTIVIDADES REALIZADAS**

A través del Departamento de Biomedicina Cardiovascular perteneciente al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, se me asignó al proyecto “*Participación de la mitocondria en los procesos de autofagia en el hígado de animales con síndrome metabólico*” realizando las siguientes actividades:

1. Búsqueda bibliográfica y lectura acerca de los temas relacionados con síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico y autofagia en el hígado.
2. Generación del modelo de síndrome metabólico, mediante administración de una solución de sacarosa al 30% a los animales experimentales.
3. Realización experimentos como la extracción de fracciones mitocondriales, separaciones de membranas mitocondriales (membranas internas y externas), Western Blot para distintas proteínas de la vía de la autofagia.
4. Recolección y análisis de datos obtenidos.

#### **3.4 VINCULO DE LAS ACTIVIDADES DESARROLLADAS CON LOS OBJETIVOS DE FORMACIÓN DEL PLAN DE ESTUDIOS**

De acuerdo con el plan de estudios y perfil de egreso de la licenciatura en Química Farmacéutica Biológica por parte de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad



Xochimilco, se presentan los siguientes objetivos relacionando al Módulo 7. “Los fármacos cómo modificadores de funciones biológicas”, con las actividades que se llevaron a cabo:

- 3.4.1 Buscar, manejar e integrar la información y utilizar de manera apropiada los lenguajes formales propios de su campo de acción.
- 3.4.2 Relacionar la estructura química de los agentes terapéuticos con sus propiedades físico químicas y su comportamiento farmacológico.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 EXTRACCIÓN DE MITOCONDRIAS DE HÍGADO Y RIÑÓN

La extracción de mitocondrias permite obtener una fracción enriquecida de estos orgánulos para su posterior estudio y análisis. Este proceso de extracción se basa en series de centrifugación diferencial para su separación de otros organelos de diferente densidad. Es importante tener en cuenta que el proceso de extracción de mitocondrias requiere condiciones y parámetros específicos para preservar la integridad de los orgánulos y obtener una fracción de mitocondrias de alta calidad. Además, la optimización del protocolo de extracción depende del tipo de muestra y del objetivo del estudio.

#### Soluciones:

- **Buffer de STE:**
  - 85.6 g de Sacarosa (250 mM)
  - 1.21 g de Tris (10 mM)
  - 0.38 g de EGTA (1 mM)

Ajustar pH a 7.4 y aforar a un litro con H<sub>2</sub>O miliQ

- **Buffer de ST:**
  - 85.6 g Sacarosa (250 mM)
  - 1.21 g Tris (10 mM)

Ajustar pH a 7.4 y aforar a 1 litro con H<sub>2</sub>O miliQ

A continuación, el protocolo:

1. Se extrajo el hígado y depositó en un vaso de precipitados con buffer STEfrío.
2. El órgano se trituró y se eliminó el exceso de sangre. Se cambió el buffer las veces que fueron necesarias, cuidando no tirar el tejido.
3. A continuación, el tejido se colocó en un homogeneizador de vidrio tipo Potter y se homogenizo en frío con precaución para evitar la formación de burbujas. Este homogenizado se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
4. Se recuperó el sobrenadante pasándolo a través de una gasa y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
5. Se desechó el sobrenadante y el pellet resultante se resuspendió en 10 mL de buffer ST suplementado con un 0.1% de BSA, se dejó incubar durante 10 minutos a 4°C.
6. Pasado el tiempo, se agregó buffer ST y se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
7. El sobrenadante se desechó y el pellet se resuspendió en buffer ST.
8. Finalmente, se determinó la cantidad de proteína utilizando el método de Lowry.

#### **4.2 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY**

Este método se basa en dos reacciones químicas: reacciones de Biuret y reacciones de Folin-Ciocalteu. En la reacción de Biuret, la relación del péptido proteico reacciona con el cobre en el entorno alcalino, produciendo  $\text{Cu}^+$  que luego reacciona con reactivos de Folin. Este método es muy sensible, capaz de detectar la cantidad de proteína tan baja como 0.01 mg/ml, y es más adecuada para soluciones con una concentración en el rango de proteínas de 0.01 a 1.0 mg/ml.

##### **Soluciones:**

- **Solución A:**
  - 10 g de Carbonato de sodio.

- 2 g de NaOH

Disolver en 500 mL de H<sub>2</sub>O miliQ

- **Solución B:**

- 0.25 g de Sulfato de Cobre • 5H<sub>2</sub>O

Disolver en 25 mL de H<sub>2</sub>O miliQ

- **Solución C:**

- 0.5 g de Tartrato de NaK

Disolver en 25 mL de H<sub>2</sub>O miliQ

A continuación, el protocolo:

1. Se preparó solución de Lowry (A + B + C), esta se prepara al momento en que se va a ocupar. Por cada mL de solución A, se agregan 10 µL de solución B y de solución C (v/v).
2. Para preparar muestras en un tubo de ensaye se colocaron 990 µL de solución salina al 0.9% y 10 µL de muestra, se realizó vórtex para mezclar bien.
3. De la mezcla anterior, se tomaron 100 µL y se colocaron en otro tubo de ensaye por duplicado.
4. Se hizo una curva de calibración de 0, 10, 20, 40 y 60 µg de BSA. y se trató de la misma manera que las muestras.
5. Una vez listos los tubos con las muestras y la curva, se adicionaron 800 µL de la solución de Lowry a cada tubo de ensaye con volumen de 100 µL, comenzando por el que será el blanco de la curva (0 µL de BSA) y se dejó incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Después se agregaron 100 µL de FOLIN 1N e incubaron durante 30 minutos en la oscuridad.
7. Posteriormente se midió la absorbancia de la curva de calibración y las muestras a una longitud de onda de 750 nm.
8. Por último, se calculó la concentración (µg/mL).

### 4.3 SEPARACIÓN DE MEMBRANAS MITOCONDRIALES

La separación de membranas mitocondriales es un proceso que implica la extracción y aislamiento de mitocondrias, y posteriormente la solubilización de las membranas tanto externas como internas para su posterior separación por ultracentrifugación.

Estas membranas son ricas en proteínas y lípidos, su separación permite el estudio detallado de las diferentes funciones y componentes de las mitocondrias.

A continuación, el protocolo:

1. Una vez calculada la concentración, se agregaron 0.08 mg de digitonina/ mg proteína, disuelta en DMSO. Se mantuvieron en agitación en frío durante 15 minutos y se llevaron a 5 volúmenes con buffer ST.
2. Se centrifugaron todos los tubos a 12, 000 rpm por 10 minutos a 4°C.
3. El sobrenadante se recuperó en tubos para ultra centrifuga, se calibraron y centrifugaron a 40, 000 rpm durante 20 a 4°C.
  - 3.1 Nuevamente se recuperó el sobrenadante, dónde se encuentran las proteínas intermembranales. El pellet fue resuspendido con buffer ST y ultracentrifugado a 40, 000 rpm durante 20 a 4°C.
  - 3.2 Se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con buffer ST y se ultracentrifugó a 40, 000 rpm durante 20 a 4°C.
  - 3.3 Se desechó el sobrenadante. Se resuspendió en una mínima cantidad de buffer para obtener la máxima concentración de proteína.
4. A la par, el primer pellet del paso 2 se resuspendió en buffer ST y se centrifugó a 10, 000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
  - 4.1 El sobrenadante fue desechado, el pellet se lavó con buffer ST y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
  - 4.2 Se desechó el sobrenadante, se lavó el pellet con buffer ST y centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
  - 4.3 Por último, se desechó el sobrenadante y recuperó pellet, donde se encuentran los mitoplastos.

#### 4.4 WESTERN BLOT

El método *Western Blot* permite la identificación y cuantificación de proteínas específicas. Este método implica la separación de proteínas por electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida y la transferencia de las proteínas a una membrana hidrofóbica de PVDF. Posteriormente se utilizan anticuerpos primarios específicos para las proteínas de interés, así como los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa para que con kits comerciales de solución quimioluminisciente se transfiera esta señal de las proteínas específicas a una placa radiográfica.

A continuación, se describe el protocolo:

1. Se obtuvieron las proteínas de tejidos mediante métodos como homogeneización en buffer de lisis (*apartado 4.1.*).
2. Las proteínas se separaron por tamaño y peso molecular, utilizando una técnica de electroforesis en un gel de SDS-PAGE.
3. Procedió la transferencia electroforética de proteínas del gel a la membrana de PVDF previamente activada con metanol. La membrana se colocó en contacto con el gel y se aplicó una corriente eléctrica que permitió que las proteínas se movieran desde el gel hacia la membrana, manteniendo su patrón de separación.
4. Para evitar la unión no específica de los anticuerpos y reducir el ruido de fondo, se bloqueó la membrana sumergiéndola en solución TBS 1% Casein Blocker (BIORAD), en agitación suave durante 1 hr.
5. Transcurrido el tiempo de bloqueo, la membrana se incubó con un anticuerpo primario específico para la proteína de interés. El anticuerpo primario se diluyó en una solución buffer TBS y se colocó en contacto con la membrana durante toda la noche a 4°C en agitación suave.
6. Se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno con solución TBS-T a la membrana. Esto para eliminar los anticuerpos que no se unieron y así reducir el ruido de fondo.
7. Nuevamente, la membrana se incubó con un anticuerpo que ahora es secundario conjugado con peroxidasa, durante 2 hrs en agitación suave a temperatura ambiente. Este anticuerpo se une específicamente al anticuerpo

primario que está unido a la proteína de interés, permitiendo la detección de la proteína.

8. Se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno con solución TBS-T a la membrana.
9. Las membranas fueron incubadas con una solución comercial quimioluminiscente (LfeScience), para potenciar la actividad de la peroxidasa y detectar las bandas correspondientes a las proteínas de interés en una placa radiográfica. Por último, las placas se revelaron con soluciones comerciales (KODAK) bajo luz roja. Las bandas detectadas en la placa radiográfica fueron fotografiadas con un densitómetro (GelDOC) y las imágenes se analizaron con el software ImagenJ. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico Sigma Plot 11.

## **5. RESULTADOS Y METAS ALCANZADAS**

Los resultados muestran un aumento significativo en las proteínas de la vía de la autofagia como es ATG 5 y ATG 12 en MEM de hígados de animales con SM (Figura 1), mientras que la unión de estas proteínas solo tiende a aumentar en el SM con respecto a los controles. También se encontró un aumento significativo en la mitofusina 1 y solo una tendencia en el aumento de la mitofusina 2 en mitoplastos de animales con SM (Figura 2). Los datos están expresados como la media  $\pm$  DE. La n= 4 animales diferentes. \*p<0.05.

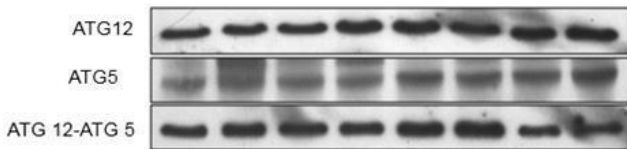
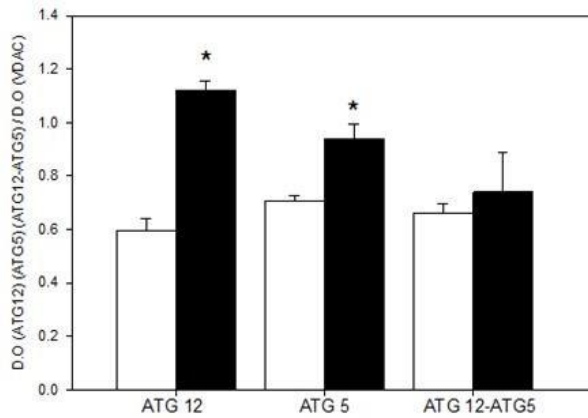


Figura 1. Expresión de ATG12, ATG 5 y la Unión de ambas proteínas como parte de la vía de la autofagia.

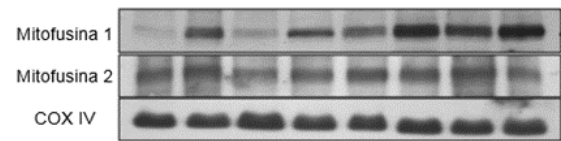
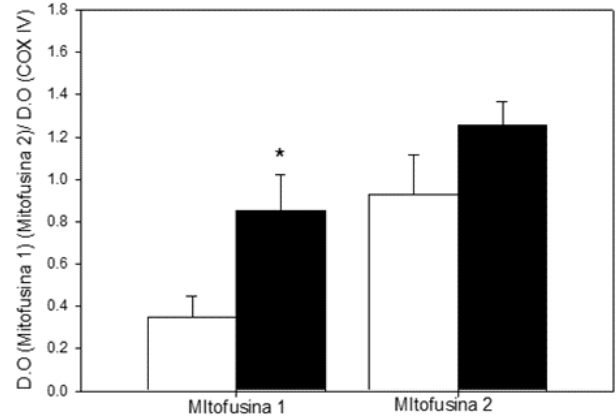


Figura 2. Expresión de Mitofusina 1 y 2 como parte de la vía de biogénesis mitocondrial.

## 6. CONCLUSIONES

La autofagia es un proceso catabólico para mantener la homeostasis celular, por lo que la alteración en ella, está asociada con distintas enfermedades incluyendo cáncer, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico.

Sin embargo, en etapas tempranas de enfermedades como el HGNA presente en el SM, podría ser una estrategia de rescate celular para amortiguar el daño generado por la enfermedad per se. Esta idea es soportada por nuestros resultados preliminares, en dónde se observa una activación de la autofagia y aumento de esta vía celular en las mitocondrias de animales con SM en comparación a los controles.

## 7. RECOMENDACIONES

Partiendo de los resultados preliminares de la investigación sobre el síndrome metabólico (SM) y el hígado graso no alcohólico (HGNA), se ha constatado que este campo de estudio es de vital importancia para abordar problemas de salud pública y mejorar la comprensión de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo 2. Sin embargo, este proyecto continuará recopilando datos y llevando a cabo estudios adicionales con el objetivo de obtener una mejor comprensión de la prevalencia del SM y el HGNA en diversas poblaciones, así como de las tendencias a lo largo del tiempo. Estos esfuerzos serán fundamentales para identificar factores de riesgo específicos y diseñar estrategias efectivas de prevención y detección temprana.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. BIO-RAD. Bulletin 6040 “A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection. [https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf)
2. Botham K.M., PhD, DSc, & Mayes P.A., PhD, DSc (2016). Biosíntesis de ácidos grasos y eicosanoides. Rodwell V.W., & Bender D.A., & Botham K.M., & Kennelly P.J., & Weil P(Eds.), Harper. Bioquímica ilustrada, 30e. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=1814&sectionid=127363289>
3. Cameron, A. J., Shaw, J. E., & Zimmet, P. Z. (2004). The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 33(2), 351–375. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2004.03.005>
4. Castro-Martínez, M. G., Banderas-Lares, D. Z., Ramírez-Martínez, J. C., & Escobedo-de la Peña, J. (2012). Prevalencia de hígado graso no alcohólico en individuos con síndrome metabólico. *Cirugía y Cirujanos*, 80(2), 128-133.
5. Engin, A. (2017). The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1–17. DOI:10.1007/978-3-319-48382-5\_1
6. Grundy, S.M. (2020). Metabolic Syndrome. In: Bonora, E., DeFronzo, R. (eds) *Diabetes Complications, Comorbidities and Related Disorders*. *Endocrinology*.



- Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-36694-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-36694-0_3)
7. Gutiérrez-Solis, A. L., Datta Banik, S., & Méndez-González, R. M. (2018). Prevalence of Metabolic Syndrome in Mexico: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. <https://doi.org/10.1089/met.2017.0157>
  8. Klionsky DJ, et. Autophagy in major human diseases. *EMBO J*. 2021 Oct 1;40(19):e108863. doi: 10.15252/embj.2021108863. Epub 2021 Aug 30. PMID: 34459017; PMCID: PMC8488577.
  9. Kurien, B. T., & Scofield, R. H. (2015). Western Blotting: An Introduction. *Western Blotting*, 17–30. doi:10.1007/978-1-4939-2694-7\_5
  10. KURIEN, B., & SCOFIELD, R. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283–293. doi:10.1016/j.ymeth.2005.11.007
  11. Pescador Tapia, M. A. (2019). Asociaciones entre el hígado graso no alcohólico, la metilación del ADN y el número de copias de ADN mitocondrial (Master's thesis, Tesis (MC)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato. Departamento de Ingeniería Genética.).
  12. Rubinsztein, D. C., Mariño, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and Aging. *Cell*, 146(5), 682–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030>
  13. Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Current Hypertension Reports*, 20(2). doi:10.1007/s11906-018-0812-z
  14. Velázquez-Paniagua, M., González-Sánchez, I., Díaz-Tamariz, A., García-Peláez, M. I., Ángeles-Aguilar, L. L., Ayala-Orta, S. X., ... & Coronel-Cruz, C. (2021). Autofagia en las células beta pancreáticas y su papel en la diabetes mellitus tipo 2. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 64(6), 9-25.
  15. Waterborg, J.H. (2009). The Lowry Method for Protein Quantitation. In: Walker, J.M. (eds) *The Protein Protocols Handbook*. Springer Protocols Handbooks. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-198-7_2)
  16. Yki-Järvinen, H. (2016). Diagnosis of non-alcoholic fatty liver disease (HGNA). *Diabetologia*, 59(6), 1104–1111. <http://doi.org/10.1007/s00125-016-3944-1>

# 9. ANEXO

## Diagrama 1. Metodología

