



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Maestría en Ciencias en Biología Experimental



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ACEITE DE AGUACATE SOBRE LAS ALTERACIONES EN EL
TRANSPORTE MITOCONDRIAL DE ELECTRONES Y LA RESISTENCIA AL ESTRÉS OXIDATIVO
DURANTE LA DIABETES**

TESIS

Que presenta:

QFB. OMAR ORTÍZ AVILA

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

ASESORES DE TESIS:

D.C. ALFREDO SAAVEDRA MOLINA

D.C. CHRISTIAN CORTÉS ROJO

Morelia, Michoacán

Diciembre, 2012.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La diabetes mellitus.....	1
1.2. Complicaciones durante la DM	1
1.2.1. La dislipidemia durante la diabetes	2
1.2.2. El daño hepático durante la diabetes	2
1.3. Las alteraciones mitocondriales durante la DM.....	3
1.4. Tratamientos antioxidantes durante la diabetes	5
1.5. El grado de insaturación de los ácidos grasos y su relación con la lipoperoxidación.	7
1.6. El aceite de aguacate: características y propiedades.....	9
2. JUSTIFICACIÓN	11
3. HIPÓTESIS	11
4. OBJETIVOS	12
4.1. Objetivo General	12
4.2. Objetivos Específicos.....	12
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
6. RESULTADOS	18
6.1. Efectos fisiológicos del aceite de aguacate en ratas diabéticas.....	18
6.2. Efecto del aceite de aguacate sobre los cambios en la CTE inducidos por la diabetes.	22
6.2.1. Respiración mitocondrial	22
6.2.2. Actividad de los complejos de la CTE	23
6.3. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de lipoperoxidación.....	26
6.4. Efecto del aceite de aguacate sobre el perfil de ácidos grasos mitocondriales.....	26
6.5. Efecto del aceite de aguacate sobre la resistencia al estrés oxidativo en la lipoperoxidación y la actividad de los complejos respiratorios durante la diabetes.....	30
6.6. Efecto del aceite de aguacate sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria.	34
7. DISCUSIÓN	36
8. CONCLUSIÓN	42
9. PERSPECTIVAS	42
10. BIBLIOGRAFÍA	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que se presenta cuando el páncreas no produce suficiente insulina, o cuando el cuerpo no puede usar efectivamente la insulina que produce. La hiperglucemia, o el incremento de los niveles de glucosa en sangre, es un efecto común de la diabetes incontrolada y con el tiempo esto ocasiona un serio daño a muchos de los sistemas del cuerpo, especialmente el sistema nervioso y los vasos sanguíneos. Hay dos formas básicas de diabetes, DM tipo 1: las personas con este tipo de diabetes producen muy poca o nada de insulina. DM tipo 2: las personas con este tipo de diabetes no pueden usar la insulina de manera eficiente. La mayoría de las personas padece diabetes tipo 2. Un tercer tipo de diabetes, la DM gestacional, se desarrolla en algunos casos durante el embarazo pero normalmente desaparece después del mismo. Los síntomas comunes de la DM tipo 1 incluyen: polidipsia, polifagia, poliuria, pérdida de peso sin alguna razón, dificultad para respirar, cambios en la visión y debilidad. Estos síntomas pueden aparecer repentinamente. Las personas con DM tipo 2 pueden tener síntomas similares pero menos evidentes. Puede que no presenten síntomas y sean diagnosticados muchos años después de que comience la enfermedad. Como consecuencia, casi la mitad de las personas con DM tipo 2 no se dan cuenta de su condición (World Health Organization).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de 347 millones de personas en todo el mundo padecen diabetes. Este número podría aumentar a más del doble para el 2030. En el 2005, un estimado de 1.1 millones de personas murió a causa de la diabetes. En México, la DM es la primera causa de muerte desde el año 2000. Aparentemente, la mortalidad en México es más alta en mujeres mayores de 55 años, aunque hay reportes de tasas superiores en el sexo masculino. Se estima que en México existen 34 millones de personas con DM, aunque muchos aún no saben que la padecen (Gutiérrez-Vázquez et al., 2006). En Michoacán la DM es la primera causa de muerte y va en aumento cada año, la incidencia en 2004-2005 fue de nueve mil personas con este padecimiento; en el 2007-2008 doce mil pacientes y en la actualidad unos 25 mil y de esta cifra el 60% presenta diversas complicaciones (Alonso-Cruz, 2009).

1.2. Complicaciones durante la DM

Las complicaciones de la DM son potencialmente devastadoras y a menudo son una amenaza para la vida. Con el paso del tiempo, la DM puede conllevar a la aparición de una gran diversidad de padecimientos como la enfermedad coronaria cardiaca, la enfermedad

vascular periférica, la nefropatía y la retinopatía diabética, el pie diabético, la neuropatía diabética así como el daño en el cerebro y el hígado (Giacco *et al.*, 2010; Raza *et al.*, 2011).

1.2.1. La dislipidemia durante la diabetes

Las dislipidemias constituyen una alteración común durante la diabetes, debido a ello se ha observado un incremento progresivo de la patología cardiovascular hasta constituirse en la primera causa de muerte en estos pacientes. La dislipidemia implica un aumento en la concentración de cualquier constituyente lipídico del plasma, que con fines prácticos suele limitarse al colesterol, a los triglicéridos o a ambos. De acuerdo a la clasificación de la OMS de las hiperlipoproteinemias familiares y patrones lipoproteicos anormales, la más frecuente es la dislipidemia inducida por carbohidratos o dislipidemia endógena, la cual es debida a un trastorno en el metabolismo de los carbohidratos o su ingestión excesiva (Davidson y Henry, 1978).

La dislipidemia en pacientes diabéticos se caracteriza por niveles elevados de triglicéridos y LDL; así como niveles reducidos de HDL. Los pacientes diabéticos pueden presentar niveles elevados de colesterol no-HDL (LDL + VLDL). Aún cuando los niveles de LDL no estén significativamente aumentados, la tendencia a desarrollar partículas de LDL más densas y pequeñas se ha relacionado con un aumento en la aterogenicidad de las mismas. Según la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos (AACE), la característica más común de la dislipidemia diabética es la hipertrigliceridemia (Schwinghammer, 2004).

1.2.2. El daño hepático durante la diabetes

El hígado es un órgano que se afecta gravemente durante la DM. La excesiva gluconeogénesis en el hígado contribuye al constante estado de hiperglucemia, y este incremento crónico de los niveles de glucosa tiene un gran impacto sobre el mismo hígado. Se han encontrado en el hígado de pacientes diabéticos depósitos excesivos de glucógeno, así como una acumulación excesiva de grasa en el hígado, conocida como esteatosis (Hao *et al.* 2011). Esto está relacionado con alteraciones en el metabolismo de lípidos, encontradas en un análisis de funcionalidad de genes hepáticos en ratas Goto-Kakizaki realizado por Almon *et al.* en el 2009.

La esteatosis hepática no alcohólica, también llamada anteriormente “hepatitis diabética”, se refiere a un gran espectro de desordenes que van desde la esteatosis hepática simple hasta manifestaciones más severas que incluyen la esteatohepatitis no alcohólica, la cual puede progresar a fibrosis, cirrosis y falla hepática. La esteatosis hepática no alcohólica

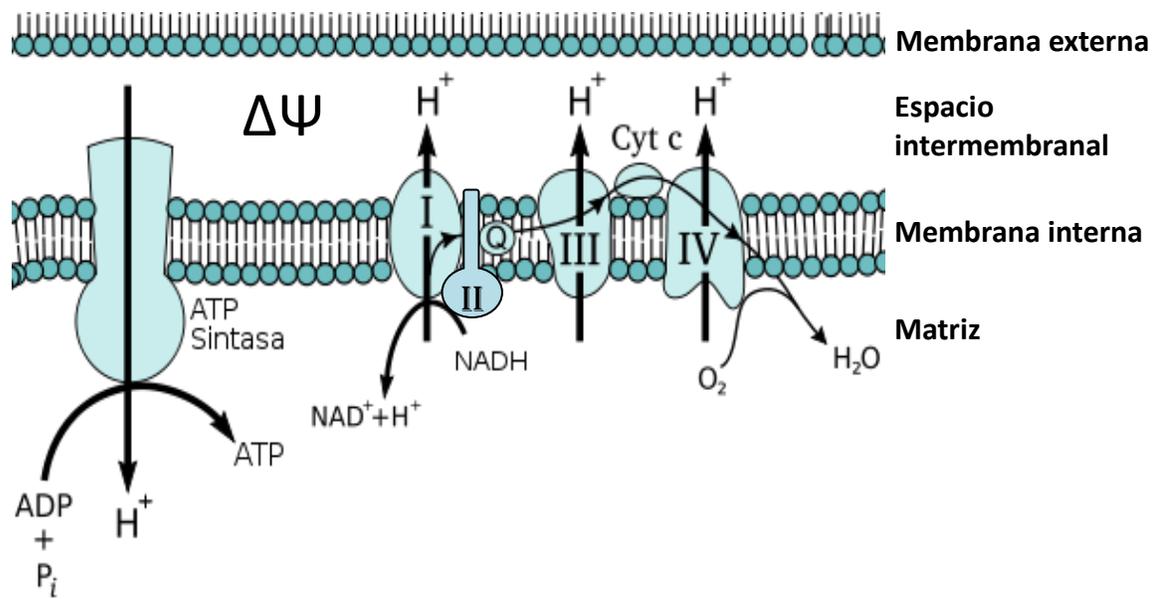
está fuertemente relacionada con la resistencia a la insulina en el hígado y en el tejido adiposo, así como con una reducción en la sensibilidad a la insulina en todo el organismo. La resistencia a la insulina hepática, asociada con la obesidad y la dislipidemia, es la principal condición metabólica que favorece la aparición de la esteatosis hepática no alcohólica, esto mediante un aumento del flujo de ácidos grasos libres en el hígado debido a una inhibición de la lipólisis y también por un incremento en la lipogénesis *de novo* (Bulum *et al.*, 2011).

Estas complicaciones son producidas por un incremento en el estrés oxidativo debido al constante estado de hiperglucemia que se presenta durante la diabetes. Se ha comprobado que la DM es una enfermedad en la cual se producen una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO); esto comienza en etapas muy tempranas de la enfermedad y aumenta con el avance de ésta (Wiernsperger, 2003).

1.3. Las alteraciones mitocondriales durante la DM

Debido a que la mitocondria es la principal fuente de ERO a nivel celular, existen muchas evidencias de que la mayoría de los procesos relacionados con el incremento del estrés oxidativo durante la diabetes son desencadenados debido a la sobreproducción de ERO mitocondriales (Giacco *et al.*, 2010).

La mitocondria es un orgánulo celular de gran importancia ya que es la principal fuente productora de ATP. La energía necesaria para la producción de ATP es generada por la cadena transportadora de electrones (CTE), la cual está conformada por cuatro complejos enzimáticos que cruzan la membrana interna mitocondrial. Dos componentes de la CTE, el citocromo *c* y la ubiquinona, no son parte de ninguno de los cuatro complejos, sin embargo, se mueven dentro o a lo largo de la membrana interna y transportan electrones a los complejos enzimáticos. La energía disponible, liberada cuando los electrones pasan por los complejos I, III y IV, se conserva mediante la translocación de protones de la matriz a través de la membrana interna hacia el espacio intermembranal (Figura 1). Estos tres complejos se conocen como bombas de protones. La translocación de protones por estos complejos de la CTE establece un gradiente de protones (potencial electroquímico, $\Delta\Psi$), el cual impulsa a la ATPasa para generar ATP a partir de ADP y P_i . La energía necesaria para llevar a cabo este proceso es obtenida de sustratos provenientes del metabolismo como el NADH y el $FADH_2$, mientras que el aceptor final de electrones es el O_2 , el cual se reduce para formar H_2O (Karp, 2005).



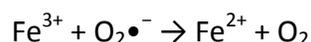
Esquema 1.- Complejos de la cadena transportadora de electrones y la ATP sintasa. Complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo II (Succinato deshidrogenasa), Complejo III (Citocromo c oxidorreductasa) y Complejo IV (Citocromo c oxidasa).

No obstante, durante este proceso se generan ERO no completamente reducidas como el anión superóxido. Bajo condiciones fisiológicas normales, los sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) neutralizan los radicales libres y preservan la integridad mitocondrial. (Giacco *et al.*, 2010). Cambios en el ΔpH y el $\Delta\Psi$ pueden modular la generación de ERO mitocondriales. En mitocondrias aisladas, la disipación del potencial de membrana mediante desacoplantes químicos, ácidos grasos libres o la adición de ADP disminuye la generación de ERO. (Rolo *et al.*, 2006). Sin embargo, en mitocondrias de hígado aisladas de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina (STZ), mostraron una disminución en la actividad de la CTE, caracterizada por una disminución en el potencial de membrana y en el cociente respiratorio (Ferreira *et al.*, 2003). Como resultado, durante la diabetes, la producción de ERO se incrementa debido a la inhibición parcial del transporte de electrones en el complejo III, lo cual resulta en una acumulación de electrones en la coenzima Q, que dona los electrones de uno en uno al oxígeno molecular, generando así el anión superóxido (Nishikawa *et al.*, 2000).

En la actualidad se ha descubierto que el aumento en la producción de anión superóxido mitocondrial durante la diabetes, es el suceso que enciende distintas vías que están relacionadas con el incremento del estrés oxidativo durante la diabetes como lo son, un incremento en la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), un incremento en la actividad de la vía de los polioles, una disminución de los sistemas

antioxidantes, aumento en la activación de PKC y un incremento en la formación de ERO mitocondriales (Rolo *et al.*, 2006).

Este incremento en la producción de ERO durante la diabetes así como la alta concentración de hierro (Fe) unido a proteínas, además de los complejos de nucleótidos-Fe y ácidos carboxílicos-Fe presentes en la mitocondria, pueden participar en la reacción de Haber-Weiss, en la cual se genera el radical hidroxilo (OH•) y las membranas mitocondriales son el blanco principal del daño producido por este radical induciendo lipoperoxidación (Santos *et al.*, 2001).



El gran contenido de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas mitocondriales aumenta la susceptibilidad mitocondrial a la lipoperoxidación, lo que conduce a una disfunción de la membrana y alteraciones en la integridad estructural y funcional de la misma, que a su vez puede generar estrés oxidativo adicional en las células (Rice-Evans y Gordon, 1993).

1.4. Tratamientos antioxidantes durante la diabetes

Debido a que el daño oxidativo es parte muy importante de la patofisiología de la diabetes, existe el interés en determinar cómo los antioxidantes podrían ayudar a disminuir este daño.

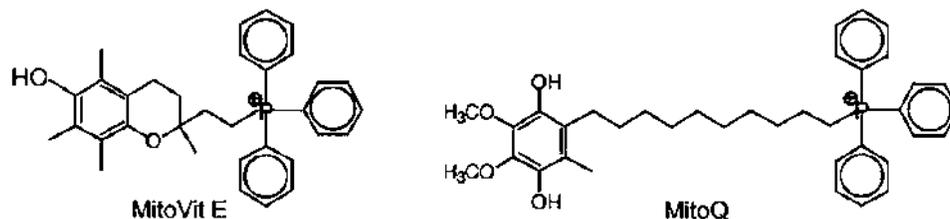
Se ha visto que la hiperglucemia puede reducir el potencial antioxidante de la célula. El estrés oxidativo interviene en la transducción de señales, vía nF-kB, afectando la expresión de genes. De esta manera, se puede reducir la expresión de enzimas antioxidantes. Aparte, la hiperglucemia puede inactivar a las enzimas ya existentes simplemente mediante glucosilación de estas proteínas; por ejemplo, la glucosilación de la superóxido dismutasa (SOD) también conduce al rompimiento del ADN. Estos hallazgos sugieren que la aparición del estrés oxidativo es debida a la actividad insuficiente de los sistemas antioxidantes, incluso si la producción de ERO se encuentra dentro de los rangos normales.

Sin embargo, los estudios realizados utilizando antioxidantes naturales han mostrado resultados ambiguos, ya que en la mayoría de los ensayos *in vitro* los tratamientos con antioxidantes han revelado un efecto protector contra el incremento en el estrés oxidativo durante la diabetes, no obstante, en los estudios *in vivo* la terapia con antioxidantes no ha probado tener un efecto benéfico sobre el daño producido por el

estrés oxidativo durante la diabetes, debido a que la distribución hacia los tejidos de los antioxidantes naturales hidrofobicos (coenzima Q , vitamina E, etc.) ingeridos, es muy poca y solo una proporción muy pequeña llega hasta la mitocondria, donde se genera la mayoría del daño oxidativo asociado con la hiperglucemia (Green *et al.*, 2004). Un ejemplo de esto es lo reportado por Darko *et al.* en 2002 donde se muestra la falta de efecto de la vitamina c, al no mejorar los niveles de hiperglucemia, presión arterial, estrés oxidativo y la función endotelial en pacientes con diabetes tipo 2.

Existe también una preocupación debido a la controversia sobre las dosis, que generalmente son muy altas, ya que la mayoría de los antioxidantes, incluida la vitamina E, se pueden comportar como prooxidantes a dosis elevadas. Por otra parte, la mayoría de las células han aprendido a sobrevivir con las ERO y las han incorporado a su bioquímica celular. De hecho, las especies reactivas son moduladores en vías de señalización celular, en las cuales tienen un efecto fisiológico positivo, por ejemplo: la fagocitosis, la señalización por insulina y la vasodilatación. Esto nos podría indicar entonces que dosis altas de antioxidantes pudieran interferir en los procesos fisiológicos y disminuir los efectos benéficos de estas sustancias (Wiemsperger, 2003).

Debido a que se piensa que el daño oxidativo mitocondrial es crítico en la patofisiología de la diabetes, los antioxidantes que se puedan acumular en la mitocondria (mitocondria dirigidos) podrían ofrecer más protección que los antioxidantes naturales. Para crear estos antioxidantes se les une covalentemente el catión trifenilfosfonio a través de una cadena alquílica (Fig. 2). La carga positiva deslocalizada de estos cationes lipofílicos les permite ser fácilmente permeables a las bicapas lipídicas y acumularse varios cientos de veces dentro de la mitocondria, debido a su alto potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$; -150 a -170 mV en el interior de la mitocondria). El potencial de membrana plasmático ($\Delta\Psi_p$; -30 a -40 mV), también permite la acumulación de estos antioxidantes del fluido extracelular hacia la célula, donde se concentran dentro de la mitocondria (Green *et al.*, 2004).



Esquema 2.- Estructura de los antioxidantes mitocondria-dirigidos. Vitamina E y coenzima Q unidos covalentemente a un catión trifenilfosfonio mediante una cadena alquilo.

1.5. El grado de insaturación de los ácidos grasos y su relación con la lipoperoxidación

Las ERO pueden dañar una gran cantidad de moléculas en la célula. Además del daño a las proteínas y al ADN, es muy importante el daño a las membranas lipídicas. La susceptibilidad de las membranas lipídicas al daño oxidativo está relacionado con dos aspectos. El primero es que tanto el oxígeno, así como muchas ERO, son varias veces más solubles en las bicapas lipídicas de las membranas que en solución acuosa. La segunda propiedad se relaciona con el hecho de que no todos los ácidos grasos son igualmente susceptibles al daño por ERO. Es esta segunda propiedad la clave para relacionar la composición de una membrana y el daño por estrés oxidativo. Los átomos de carbono de un ácido graso que son más susceptibles al ataque de un radical, son aquellos que se encuentran entre dos carbonos con un doble enlace en la cadena acíclica. Los átomos de hidrógeno unidos a este carbono son llamados hidrógenos bis-alílicos. Esto quiere decir que los ácidos grasos saturados (SFA) y monoinsaturados (MUFA) son esencialmente resistentes a la lipoperoxidación, mientras que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) si son susceptibles. Además, cuanto mayor sea el grado de poliinsaturación de los ácidos grasos poliinsaturados, serán más propensos al daño peroxidativo. Holman en 1954 realizó un experimento para determinar el índice de peroxidación de los ácidos grasos y observó que el ácido decosahexanóico (DHA; C22:6), el cual tiene seis dobles enlaces, es muy susceptible a la lipoperoxidación, ocho veces más que el ácido linoleico (C18:2), el cual tiene solamente dos dobles enlaces. También observó que el DHA es 320 veces más susceptible a la peroxidación que el monoinsaturado ácido oleico (C18:1). Entonces, con la combinación de las distintas susceptibilidades relativas de los ácidos grasos y la composición de los ácidos grasos de una membrana es posible calcular su índice de peroxidación (una medida aproximada de la susceptibilidad a la peroxidación) (Hulbert *et al.*, 2007).

Las radicales libres pueden remover el átomo de hidrógeno bis-alílico de la cadena de los PUFA, y el carbono del cual se sustrajo el hidrógeno ahora tiene un electrón desapareado (entonces se convierte también en un radical). Cuando tales radicales C- se generan en el interior hidrofóbico de las membranas, un destino probable es la combinación con el oxígeno disuelto en la membrana. El radical peróxido resultante es muy reactivo: se puede atacar a las proteínas de membrana y también puede oxidar las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados adyacentes. Así, la reacción inicial se repite, y una reacción de cadena de radicales libres se propaga. A menos que sea inactivada por los antioxidantes, la peroxidación lipídica es un proceso autocatalítico autopropagable produciendo varias ERO potentes. También puede generar hidroperóxidos lipídicos, que son más hidrofóbicos que los ácidos grasos sin peroxidar, por lo que éstos pueden alterar la estructura de la membrana, alterando la fluidez y otras propiedades funcionales de las membranas.

Los hidroperóxidos y endoperóxidos, generados por la lipoperoxidación, pueden someterse a fragmentación para producir una amplia gama de productos intermedios reactivos, tales como alcanos, alquenos, hidroxialquenos, glioxal, y malondialdehído (MDA). Estos compuestos carbonílicos tienen propiedades únicas en contraste con los radicales libres. Por ejemplo, en comparación con las ERO, los aldehídos reactivos tienen una vida media mucho más larga (es decir, minutos en lugar de los nanosegundos o microsegundos, característicos de la mayoría de los radicales libres). Además, la estructura no cargada de aldehídos les permite migrar con relativa facilidad a través de las membranas hidrofóbicas y también a través del citosol (hidrofílico), extendiendo así la distancia de migración lejos del sitio de producción. Con estas características por sí solas, estos compuestos carbonilo pueden ser más dañinos que los radicales libres y pueden tener importantes efectos perjudiciales en los sitios de acción dentro y fuera de las membranas. La lipoperoxidación, por lo tanto, no debe considerarse un escenario donde únicamente se genera daño a los lípidos, sino también debe ser considerada como una importante fuente endógena de daño a otras macromoléculas celulares, tales como proteínas y ADN. En relación a esto, se ha descubierto que debido a la gran proporción de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas mitocondriales las vuelve más susceptibles al estrés oxidativo (Santos *et al.*, 2001). Un ejemplo de este daño mitocondrial puede ser al lipoperoxidarse la cardiolipina (un fosfolípido de gran importancia en la membrana mitocondrial, con un gran contenido de ácidos grasos poliinsaturados) puede inactivar la citocromo *c* oxidasa por mecanismos similares al peróxido de hidrógeno y también mecanismos únicos para hidroperóxidos orgánicos. Este efecto podría ser muy perjudicial si resulta en una reducción de otros productos intermedios de la cadena respiratoria y un aumento en la producción de anión superóxido (Hulbert *et al.*, 2007).

Entonces, una alternativa al uso de antioxidantes vía oral puede ser el incorporar una mayor cantidad de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en las membranas celulares, con lo cual disminuiría el grado de insaturación y se incrementaría la resistencia al daño provocado por el estrés oxidativo. Prueba de esto son los resultados obtenidos al comparar mitocondrias de levaduras *S. cerevisiae*, las cuales sólo poseen ácidos grasos saturados y monoinsaturados (C16:0, C16:1, C18:0 y C18:1), con otras mitocondrias a las cuales se les incorporó como ácido graso principal el ácido linolénico (+C18:3) un ácido graso poliinsaturado, las mitocondrias nativas (-C18:3) mostraron resistencia al daño por lipoperoxidación, una mayor actividad de la CTE, así como una disminución en la formación de ERO en comparación con las levaduras con ácido linolénico (+C18:3) (Cortés-Rojo *et al.*, 2009).

Por consiguiente, al disminuir el daño debido a las ERO a nivel mitocondrial durante la diabetes se podría prevenir el aumento del estrés oxidativo, el cual es el causante de las distintas complicaciones que presentan estos pacientes.

1.6. El aceite de aguacate: características y propiedades

Un alimento con un alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados y saturados es el aceite de aguacate, tiene como componente principal el ácido oleico 61.62% (Tabla 1), el cual además de ser resistente al daño por peroxidación lipídica, se le han atribuido otros efectos benéficos como en el estudio de López *et al.* en 1996, donde reportan el efecto de una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados, administrada mediante aguacate en pacientes con colesterol normal, con hiperlipidemia, con hipertrigliceridemia y con diabetes mellitus no insulino-dependiente, en donde en todos los grupos estudiados, a los siete días, se observó descenso del colesterol total, del LDL y de triglicéridos, con aumento de HDL y mejoría del índice aterogénico (Alvizouri *et al.*, 2009).

Ácidos grasos	Aceite de aguacate
Mirístico C14:0	0.25%
Palmítico C16:0	17.68%
Palmitoléico C16:1	7.23%
Esteárico C18:0	1.11%
Oleico C18:1	61.62%
Linoleico C18:2	12.09%

Tabla 1.- Contenido de ácidos grasos del aceite de aguacate. (Tomada y modificada de Alvarezouri *et al.* 2009).

Para la producción del aceite, el aguacate que es el fruto del árbol, *Persea Americana* (también clasificado como *Persea gratissima*) y es un miembro de la familia Lauraceae, es

cosechado y seleccionado, y el fruto sin piel y sin semilla recibe un tratamiento natural de maceración en frío. De la decantación, centrifugado y filtrado de la pulpa se obtiene un aceite de alta pureza que conserva todas las propiedades del aguacate. El aguacate es originario de las regiones tropicales de México y América Central. La pulpa del aguacate, dependiendo de la variedad y madurez del fruto, puede alcanzar hasta un contenido graso de 25%, en promedio 15 a 19%, que permiten extraer alrededor de un 10% de la fruta fresca. Este aceite, tiene un alto nivel de ácidos grasos monoinsaturados. Las cualidades de este aceite lo convierten en una gran opción para el uso culinario: Alto punto de humo (hasta 260°C), mayor nivel de ácidos grasos benéficos que otros aceites, gran contenido de proteínas, vitaminas y antioxidantes, bajo en sodio, sabor neutro y color atractivo (Aceite Ahuacatlán, 2012).

Además del alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados, también posee una gran cantidad de antioxidantes como son los carotenoides (luteína, α y β -caroteno, anteraxantina, neoxantina, zeaxantina, violaxantina y β -criptoxantina), los tocoferoles (alfa y gamma) y las clorofilas a y b. El más abundante de estas moléculas antioxidantes es la luteína (Ashton *et al.*, 2006).

Las frutas y las verduras contienen múltiples fitoquímicos anticancerígenos, que han sido ampliamente estudiados como un enfoque de la prevención del cáncer. En estudios se ha demostrado que los extractos del fruto de aguacate pueden exhibir efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer. Por ejemplo, se demostró que un extracto de aguacate tiene potencial de actividad anticancerígena y esto es debido a una combinación de acetogeninas alifáticas específicas (D'Ambrosio *et al.*, 2011).

También se han determinado los efectos antiproliferativos de un extracto lipídico de aguacate en células de cáncer de próstata *in vitro* para evaluar de manera preliminar los posibles efectos quimiopreventivos de las sustancias bioactivas solubles en lípidos en el aguacate, y se observó que aunque la luteína era el principal componente, al ser administrado en forma pura no produjo los efectos inhibitorios sobre el crecimiento de las células cancerígenas que mostró el extracto completo. Entonces, el efecto puede ser debido a la combinación de las sustancias bioactivas contenidas en el medio lipofílico proporcionado por el extracto de aguacate (Lu *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la diabetes mellitus existe un aumento en el daño oxidativo y que los tratamientos antioxidantes utilizados no han sido eficaces contra dicho daño, el empleo del aceite de aguacate puede ser una alternativa para reducir el daño producido por las especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial.

3. HIPÓTESIS

El aceite de aguacate aumenta la resistencia de los complejos respiratorios al estrés oxidativo y reduce la formación de ERO al disminuir la sensibilidad mitocondrial a la lipoperoxidación durante la diabetes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar si el aceite de aguacate disminuye la sensibilidad de la cadena de transporte de electrones al estrés oxidativo, así como la formación de especies reactivas de oxígeno y los niveles de lipoperoxidación durante la diabetes.

4.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto del aceite de aguacate sobre los cambios en la CTE inducidos por la diabetes.
2. Analizar el efecto del aceite de aguacate sobre la sensibilidad a la lipoperoxidación mitocondrial durante la diabetes.
3. Verificar los cambios en los ácidos grasos de las membranas mitocondriales producidos por el aceite de aguacate durante la diabetes.
4. Evaluar el efecto del aceite de aguacate sobre la resistencia de los complejos respiratorios y la lipoperoxidación mitocondrial al estrés oxidativo durante la diabetes.
5. Analizar el efecto del aceite de aguacate sobre la producción de ERO a nivel mitocondrial durante la diabetes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratas Wistar macho, entre 300-350 g, las cuales fueron mantenidas en un bioterio bajo condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Fueron alimentadas con una dieta especial para roedores y agua *ad libitum*. Para el manejo de los animales se siguieron las recomendaciones de la norma para el uso de animales expedido por la Secretaría de Agricultura en el párrafo de Regulaciones Federales para el Uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación también fue aprobada por el Comité Institucional para el Uso de Animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La diabetes fue inducida mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (45 mg/Kg), en ratas sometidas a un ayuno previo de 12 horas. Cinco días después de la inducción de la diabetes, se realizó la medición de los niveles de glucosa, los animales con niveles de glucosa mayores de 300 mg/dL fueron usados para conformar los grupos diabéticos.

Diseño experimental

Para el estudio las ratas fueron divididas al azar en cuatro grupos, de ocho ratas cada uno. Grupo 1: control, Grupo 2: control + aceite de aguacate, Grupo 3: diabético y Grupo 4: diabético + aceite de aguacate. Los grupos 2 y 4 recibían una dosis de aceite de aguacate equivalente a 1.6 g de ácido oleico y los grupos 1 y 3 recibían solamente agua. La administración se realizó vía oral diariamente durante un periodo de 90 días.

Se llevó el registro diario de la cantidad de agua y alimento de cada grupo durante los 90 días. Cada quince días se pesaron los animales y se realizó la medición de los niveles de glucosa en sangre utilizando un glucómetro ACCU-CHEK[®]. Después de los 90 días de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas por decapitación con un ayuno de 12 hrs, se obtuvo suero para la determinación de colesterol total y triglicéridos. Además, se aislaron mitocondrias de riñón mediante centrifugaciones diferenciales con el método modificado descrito por Saavedra-Molina y Devlin en 1997. Para obtener las mitocondrias, los riñones fueron triturados y lavados con medio 1 (220 mM manitol, 70 mM sacarosa, 2 mM MOPS y 1 mM EGTA, a pH de 7.4). Los fragmentos fueron homogenados y centrifugados a 2000 rpm y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 7500 rpm y la pastilla resultante fue lavada con medio 2 (220 mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM MOPS, a pH de 7.4) y centrifugada a 9000 rpm. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 500µl de medio 2. Todas las centrifugaciones se realizaron durante 10 minutos a 4°C. La concentración de proteína mitocondrial fue determinada mediante el método de Biuret.

Química sanguínea

La medición de los parámetros bioquímicos se realizó en un espectrofotómetro para leer las muestras. A continuación, se presentan las reacciones de cada uno de los parámetros medidos en la química sanguínea:

Determinación de glucosa sérica

La glucosa presente en la muestra se determinó por el método acoplado de glucosa oxidasa/peroxidasa, el cual da lugar a la formación de un complejo coloreado, la quinonaimina, mediante las reacciones acopladas descritas a continuación.

Determinación de triglicéridos séricos

La cuantificación de triglicéridos se llevó a cabo empleando un kit enzimático de BioSystems S.A. El método para la determinación de triglicéridos está basado en la esterificación de los triglicéridos presentes en la muestra por acción de la lipasa, liberando una molécula de glicerol que en presencia de ATP y de la enzima glicerol cinasa produce glicerol-3-fosfato. Éste se oxida por la glicerol-3-fosfato oxidasa liberando peróxido de hidrógeno que al reaccionar con 4-aminoantipirina y 4-clorofenol produce quinonaimina, un compuesto coloreado cuya absorbencia se mide a 500 nm. La cantidad de color es proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra.

Determinación de colesterol sérico

La cuantificación de colesterol total se llevó a cabo empleando un kit enzimático de BioSystems S.A. El método para la determinación de colesterol total está basado en la liberación del colesterol esterificado mediante la enzima colesterol esterasa y la posterior oxidación de éste y el colesterol libre por la colesterol oxidasa. Esta reacción libera peróxido de hidrógeno que al reaccionar con la 4-aminoantipirina y fenol produce quinonaimina, un compuesto coloreado cuya absorbencia se mide a 500 nm, la cantidad de color es proporcional a la concentración de colesterol total presente en la muestra.

Medición del consumo de oxígeno

Las mitocondrias recién aisladas fueron resuspendidas en un volumen final de 2ml de buffer para medir consumo de oxígeno (HEPES 10mM, KCl 100mM, KH_2PO_4 3mM y MgCl_2 3mM a pH de 7.4) en una cámara de vidrio sellada y la velocidad de consumo de oxígeno fue determinada a temperatura ambiente usando un electrodo tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno YSI 5300 y a un graficador. La respiración basal (estado 4) fue inducida mediante la adición de 10 mM de glutamato/malato como sustrato respiratorio y comienza la medición. A los cinco minutos se adicionan 10 μl de ADP (100 mM) que abate el potencial de membrana generado a través de la membrana interna mitocondrial debido al bombeo de protones hacia el espacio intermembranal por los complejos de la CTE al incrementar la fosforilación oxidativa. Esto causa que la actividad de la CTE se estimule para tratar de restablecer el potencial transmembranal; a esta condición se denomina

estado 4. La respiración fue inhibida primero con 1 µg de antimicina A y en su totalidad con la adición de 1 mM de KCN, esto nos permite descartar el consumo de oxígeno ajeno a la CTE.

Inducción de estrés oxidativo en las mitocondrias

Se produjo estrés oxidativo en las mitocondrias aisladas incubándolas en buffer de fosfatos (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6), adicionando concentraciones de 25, 50 y 100 µM de Fe^{2+} e incubándolas durante 30 minutos a 4°C en agitación constante.

Actividad de los complejos de la cadena transportadora de electrones

Las actividades de los complejos mitocondriales fueron determinadas en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis a temperatura ambiente utilizando sustratos e inhibidores específicos y mitocondrias solubilizadas con Triton 10% en un buffer hipotónico.

Actividad de la succinato deshidrogenasa (complejo II)

Una concentración de 0.1 mg/ml de mitocondrias fue resuspendida en un volumen final de 1 ml de buffer de fosfatos (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6) se incubaron cinco minutos con [?] de rotenona, 1 µg de antimicina A y 1 mM de KCN. Al término de la incubación se agregaron 80 µM de DCIP y se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, transcurrido un minuto se agregó succinato 10 mM y se continuó el trazo durante cuatro minutos más, durante los cuales se midió la reducción del DCIP el cual actúa como un aceptor artificial de electrones.

Actividad de succinato-citocromo c oxidorreductasa (complejo III)

Una concentración de 0.1 mg/ml de proteína mitocondrial fue resuspendida en un volumen final de 1 ml de buffer de fosfatos (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6) se incubaron cinco minutos con [?] de rotenona y 1 mM de KCN. Al término de la incubación se agregaron 1.5 mg de citocromo c y se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm, transcurrido un minuto se agregó succinato 10 mM y se continuó el trazo durante dos minutos más, durante los cuales se midió la reducción del citocromo c; la reacción se detuvo al agregar 1 µg de antimicina A, la cual es un inhibidor del complejo III. La reducción del citocromo c sensible a antimicina se calculó restando a la actividad en presencia de succinato, sóloamente la actividad en presencia de antimicina A.

Actividad citocromo c oxidasa (complejo IV)

Una concentración de 0.1 mg/ml de mitocondrias fue resuspendida en un volumen final de 1 ml de buffer de fosfatos (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6) se incubaron cinco minutos con [?] de rotenona y 1 µg de antimicina A. Al término de la incubación, se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm, transcurrido un minuto se agregó 1.5 mg de citocromo c reducido y se continuó el trazo durante 25 segundos

durante los cuales se midió la oxidación del citocromo c, la reacción se detuvo al agregar 1 mM de KCN, el cual es un inhibidor del complejo IV.

Niveles de lipoperoxidación

Los niveles de lipoperoxidación se midieron utilizando el método de las especies reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS). Una concentración de 0.1 mg/ml de mitocondrias fue resuspendida en un volumen final de 1 ml de buffer de fosfatos (50 mM KH_2PO_4 , pH 7.6), posteriormente, a cada muestra se le agregaron 2 ml de la solución ácida compuesta por ácido tricloroacético 15%, ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% y HCl 0.25N. Posteriormente, las muestras se calentaron a baño María durante 15 minutos y después fueron enfriadas en hielo y centrifugadas a 7500rpm/5 minutos/4°C. Finalmente, se extrajeron 2 ml del sobrenadante y se leyeron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis a 532 nm.

Perfil de ácidos grasos mitocondriales

Los lípidos de las membranas mitocondriales fueron extraídos de acuerdo al procedimiento reportado por Bligh y Dyer (1959). Se tomaron 200 μl de mitocondrias y se depositaron en un homogenizador, se adicionó una mezcla de metanol-cloroformo-agua (2:1:0.8) y se homogenizó por dos minutos. Cabe mencionar que el volumen de agua se tomó como el volumen procedente de las mitocondrias. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 2500 rpm a 10°C durante 5 minutos. Se descartó la fase hidrofílica y se separó la fase hidrofóbica. El cloroformo se evaporó con una corriente de nitrógeno. Los ácidos grasos fueron derivatizados utilizando el método de Morrison y Smith (1964) utilizando 500 μl de trifluoruro de boro (BF_3) en una solución de metanol 14% y calentado a baño María durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionó hexano y agua en una relación 2:1, se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta que se formaron dos fases y se separó la fase hidrofóbica (hexano). El hexano se evaporó con nitrógeno y los ácidos grasos ya derivatizados se guardaron a 4°C y protegidos de la luz. Para inyectarse en el cromatografo, las muestras fueron resuspendidas en 30 μl de n-hexano (HPLC) 95% y se inyectó 1 μl en el cromatógrafo.

Para realizar la cromatografía, se utilizó u cromatografo de gases Clarus® 500 de PerkinElmer, el cual posee una columna capilar Omegawax, un inyector capilar “split/splitless” y un detector de ionización de flama (FID). Se utilizó nitrógeno como gas de acarreo. La composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales se determinó por comparación de los tiempos de retención con estándares de metil-esteres de ácidos grasos y se cuantificó mediante el análisis de las áreas bajo los picos.

Producción de especies reactivas de oxígeno

Esta determinación se realizó utilizando una sonda fluorescente, la 2'7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCDHF-DA), que reacciona con las ERO. En la celda, se añadió 1 mg/ml de suspensión de mitocondrias aisladas y 5 μl de DCDHF-DA (500 mM) para

obtener un volumen final de 2 ml utilizando Medio 2 de aislamiento de mitocondrias, la lectura de la fluorescencia se realizó a una λ de excitación de 485 nm y de emisión a 520 nm en un espectrofotómetro de fluorescencia, después de 1 min se añadió una concentración de 10 mM de glutamato/malato y se midió el incremento en la fluorescencia. Los resultados fueron presentados como unidades arbitrarias de fluorescencia.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de al menos 5 experimentos. Los niveles de significancia se determinaron mediante una prueba *t* de Student con el programa estadístico Sigma Plot versión 11, los valores $p < 0.05$ representan diferencias significativas.

6. RESULTADOS

6.1. Efectos fisiológicos del aceite de aguacate en ratas diabéticas

Se realizó una cuantificación del contenido de ácidos grasos presentes en el aceite de aguacate y en el alimento que consumieron las ratas durante el tratamiento (Fig. 1).

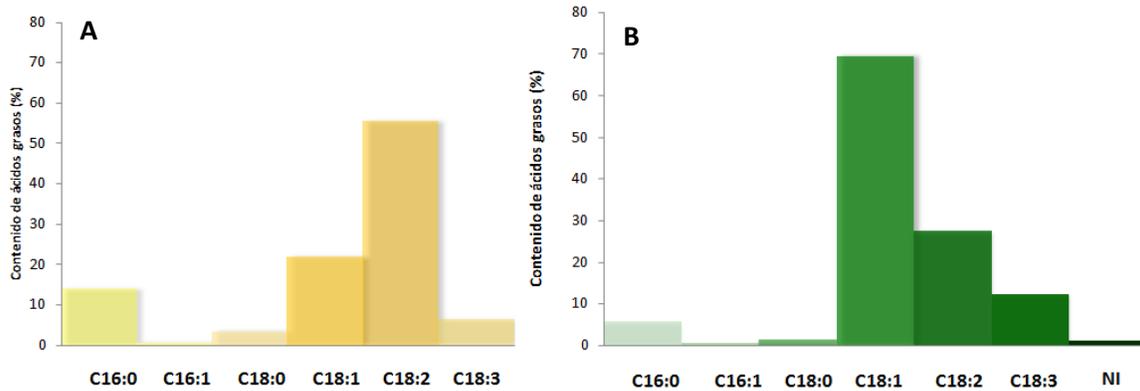


Figura 1.- Composición de ácidos grasos del alimento que consumieron las ratas (panel A) y del aceite de aguacate (panel B). Se extrajeron los lípidos presentes tanto en el alimento como en el aceite de aguacate y se analizaron como se describe en Materiales y métodos.

En el alimento se encontró como ácido graso principal el ácido linoleico (C18:2) 57%, seguido del ácido oleico (C18:1) 23% y el palmítico (C16:0) 14%. En el aceite de aguacate el principal ácido graso fue el ácido oleico (C18:1) 68% seguido del linoléico (C18:2) 28% y el linolénico (C18:3) 12%.

Ya que la polidipsia y la polifagia son síntomas de la diabetes, se llevó un registro del consumo de agua y alimento que consumieron las ratas durante los 90 días de tratamiento (Figs. 2 y 3).

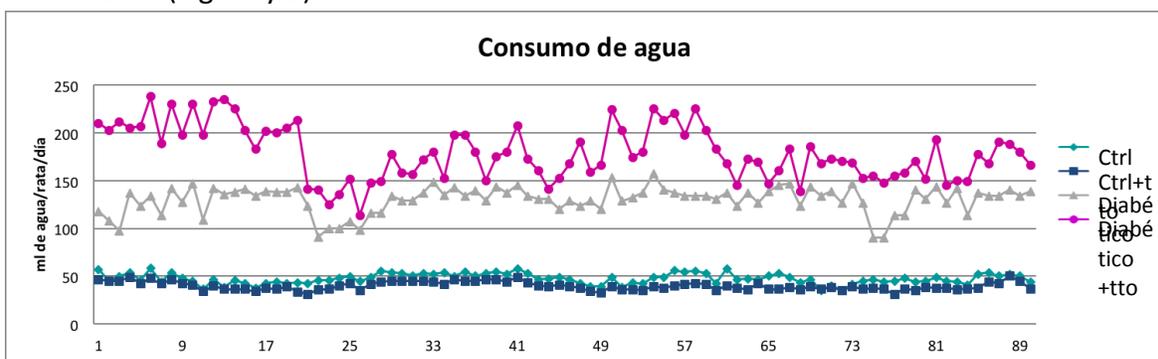


Figura 2.- Registro del consumo de agua durante los 90 días de tratamiento.

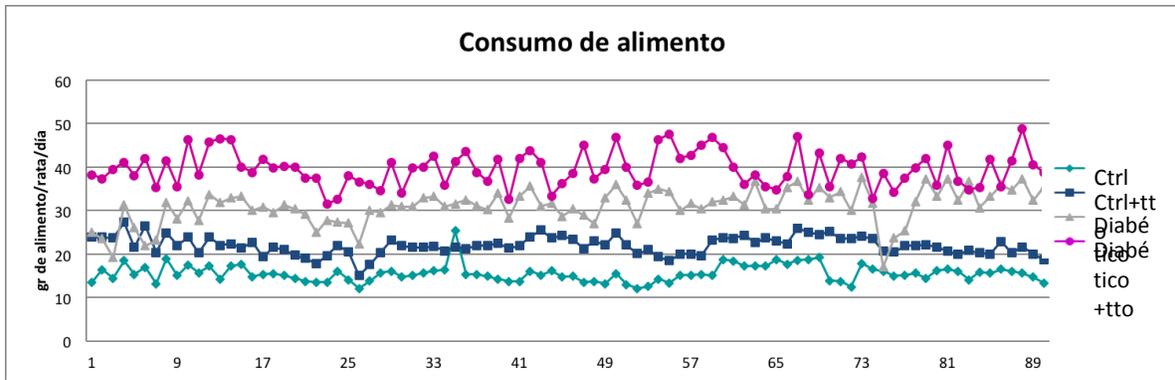


Figura 3.- Registro del consumo de alimento durante los 90 días de tratamiento.

En ambas gráficas se observan dos tendencias, las de los grupos diabéticos y los grupos normales. Los grupos diabéticos tuvieron un mayor consumo tanto de agua como de alimento, en comparación con el grupo control, sin embargo, el consumo del aceite de aguacate no modificó esta tendencia y tampoco tuvo efecto alguno sobre estos parámetros al ser consumido por las ratas normales.

También se llevó un control de los niveles de glucosa durante los 90 días de tratamiento y se observó en el grupo diabético un incremento en los niveles de glucosa por encima de los 400 mg/dl durante todo el tratamiento y el consumo del aceite de aguacate no mostró efecto hipoglucemiante en este modelo de diabetes mellitus. Tampoco se observó efecto alguno sobre los niveles de glucosa en las ratas normales que consumieron el aceite de aguacate (Fig. 4). Por lo que los efectos que se mostrarán más adelante no son debido a una disminución en los niveles de glucosa.

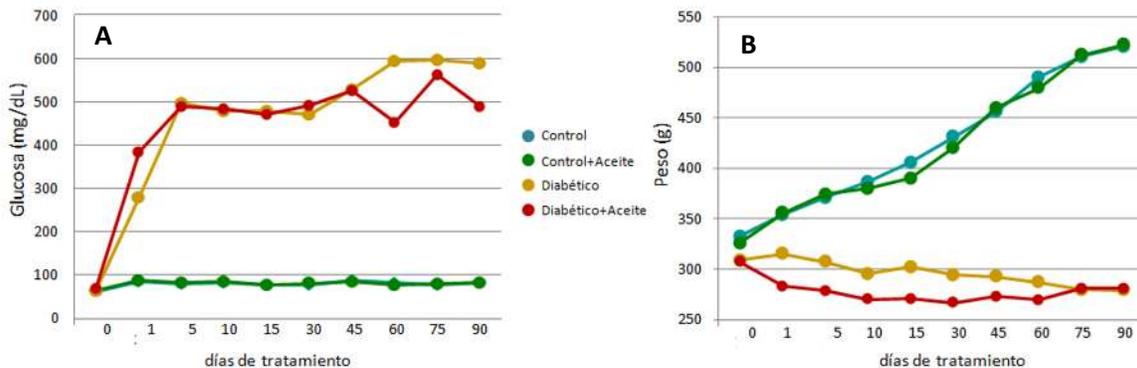


Figura 4.- Niveles de glucosa (panel A) y peso (panel B) durante los 90 días de tratamiento. Se realizó la medición de glucosa y peso cada cinco días durante los primeros quince días de tratamiento y cada quince días a partir de este punto. Los datos se presentan como la media de una n=5-8.

En cuanto al peso de los animales, las ratas control tuvieron un incremento en el peso conforme transcurrieron los días de tratamiento y el consumo del aceite de aguacate no mostró efecto alguno sobre este parámetro. Cabe resaltar que aunque el aceite de aguacate era un consumo extra de grasa, esto no produjo un incremento de peso en los animales control ni en los animales diabéticos.

Al término del tratamiento, los animales fueron sacrificados con un ayuno previo de 12 horas y se obtuvo suero para realizar la determinación de glucosa, colesterol total y triglicéridos.

Los niveles de glucosa al término del tratamiento, tanto a los 15 como a los 90 días de tratamiento, mostraron dos tendencias, las de los grupos control, los cuales se mantuvieron por debajo de los 100 mg/dl y las de los grupos diabéticos, los cuales estuvieron por encima de los 200 mg/dl ($p < 0.001$) (Fig. 5). El consumo del aceite de aguacate, por lo tanto, no modificó estos parámetros.

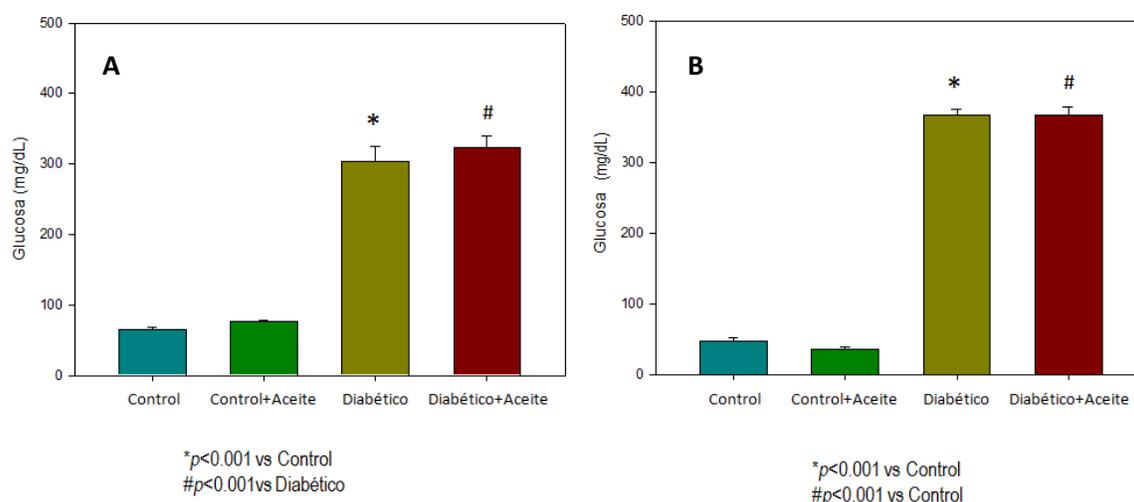


Figura 5.- Niveles de glucosa al término del tratamiento. Panel A 15 días de tratamiento, panel B 90 días de tratamiento. Se colectó sangre y se separó el suero, en el cual se realizó esta determinación. Los datos se presentan como la media±EE de una n=5-8.

En cuanto a los niveles de colesterol total a los 15 días de tratamiento, el grupo diabético fue el que mostró los mayores niveles (120 mg/dl, $p < 0.001$), seguido del grupo control que recibió el aceite de aguacate (94 mg/dl, $p < 0.001$), mientras que el grupo diabético presentó valores muy parecidos al control, 69.7 y 70.2 mg/dl, respectivamente (Fig. 6). A los 90 días de tratamiento el único grupo que mostró un incremento en los niveles de colesterol total fue el grupo diabético (94.2 mg/dl, $p < 0.001$) en comparación con el grupo control (70.5 mg/dl) (Fig.6).

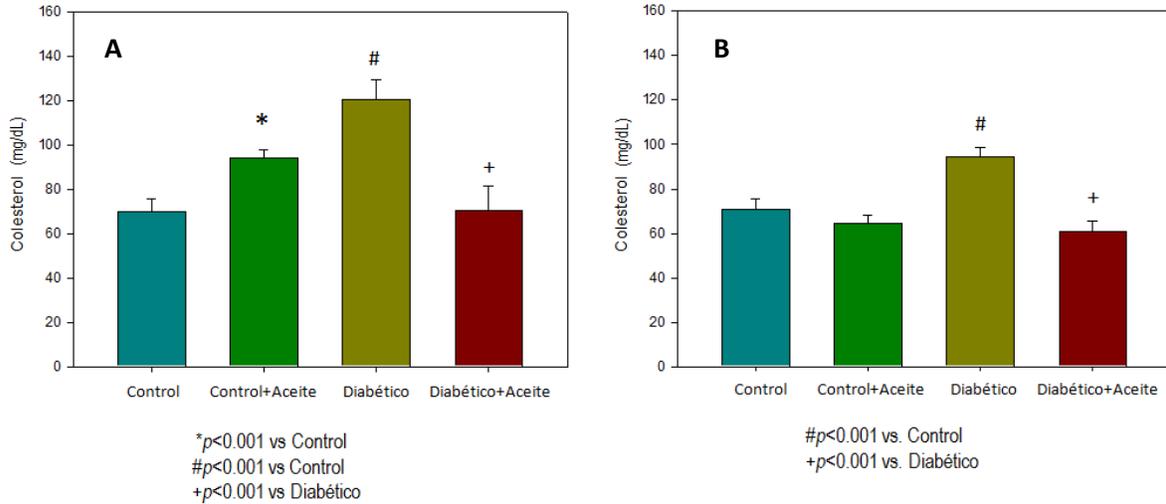


Figura 6.- Niveles de colesterol al término del tratamiento. Panel A 15 días de tratamiento, panel B 90 días de tratamiento. Se colectó sangre y se separó el suero, en el cual se realizó esta determinación. Los datos se presentan como la media \pm EE de una n=5-8.

Respecto a los niveles de triglicéridos, a los 15 días de tratamiento, se observó un incremento solamente en el grupo diabético que recibió el aceite de aguacate (281 mg/dl, $p < 0.05$), sin embargo, este incremento se normalizó a los 90 días, a los cuales el grupo diabético fue el único que mostró un incremento (396.5 mg/dl, $p < 0.001$) de más de cuatro veces, con respecto al control (89.8 mg/dl) (Fig. 7).

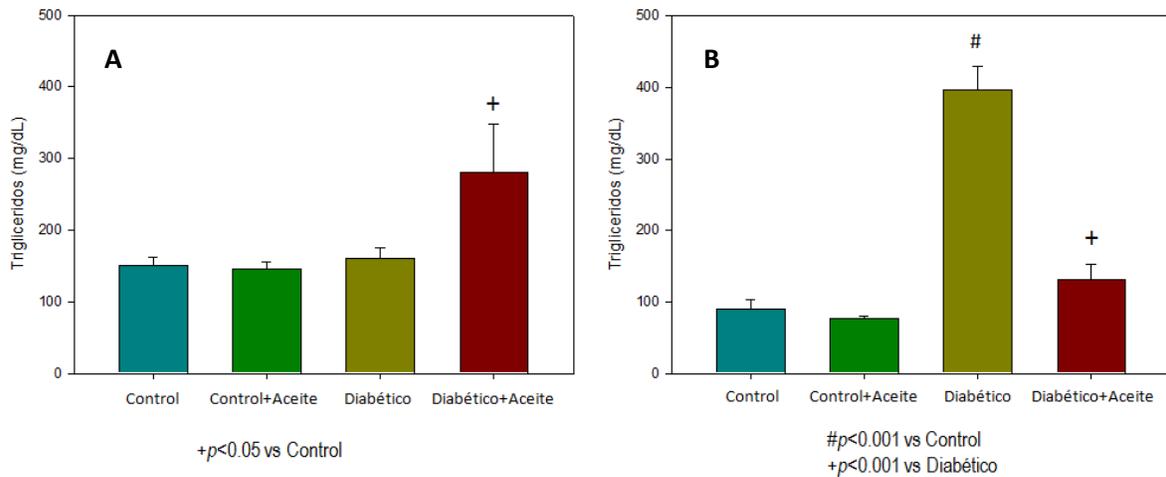


Figura 7.- Niveles de triglicéridos al término del tratamiento. Panel A 15 días de tratamiento, panel B 90 días de tratamiento. Se colectó sangre y se separó el suero, en el cual se realizó esta determinación. Los datos se presentan como la media \pm EE de una n=5-8.

6.2. Efecto del aceite de aguacate sobre los cambios en la CTE inducidos por la diabetes

6.2.1. Respiración mitocondrial

En la figura 8, en el panel A, se presentan los cocientes respiratorios (CR) de las mitocondrias de hígado a los 15 días de tratamiento de los cuatro grupos, los cuales fueron superiores a 4 y no hubo diferencias entre ellos, esto quiere decir que las mitocondrias eran funcionales y tenían acoplada la fosforilación oxidativa al transporte de electrones en la CTE. Sin embargo, al graficar por separado los niveles de consumo de oxígeno mitocondriales de los estados respiratorios (estado 4 y estado 3) se observó una disminución en la tasa de consumo de oxígeno en el grupo diabético en ambos estados, 2.3 veces menor que el control en el estado 4 ($p < 0.05$) y 2.5 veces menor que el control en el estado 3 ($p < 0.001$). No obstante, el aceite de aguacate produjo una recuperación de la respiración mitocondrial en las ratas diabéticas, la cual es 1.4 veces mayor en el estado 4 y 3 (Fig. 8).

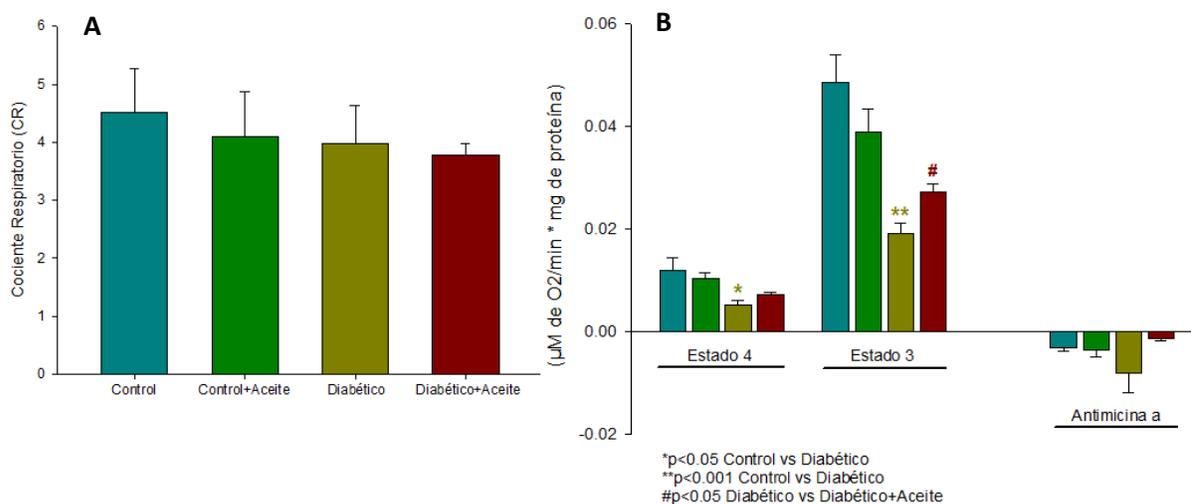


Figura 8.- En el panel A se muestran los cocientes respiratorios y en el panel B se muestran los niveles de consumo de oxígeno de las mitocondrias de hígado, de los distintos grupos a los 15 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm EE de una n=5.

Los incrementos en los niveles de oxígeno al adicionar antimicina A también se graficaron y se observó que el grupo diabético fue el que presentó la mayor producción de oxígeno, 2.4 veces más que el control (Fig. 8).

En la figura 9 en el panel A se presenta los CR de las mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento, en el cual se muestra que el grupo control fue el que presentó el mayor CR de 7.6 y el grupo control que recibió el aceite de aguacate fue el que obtuvo el valor más bajo 1.3 ($p < 0.01$).

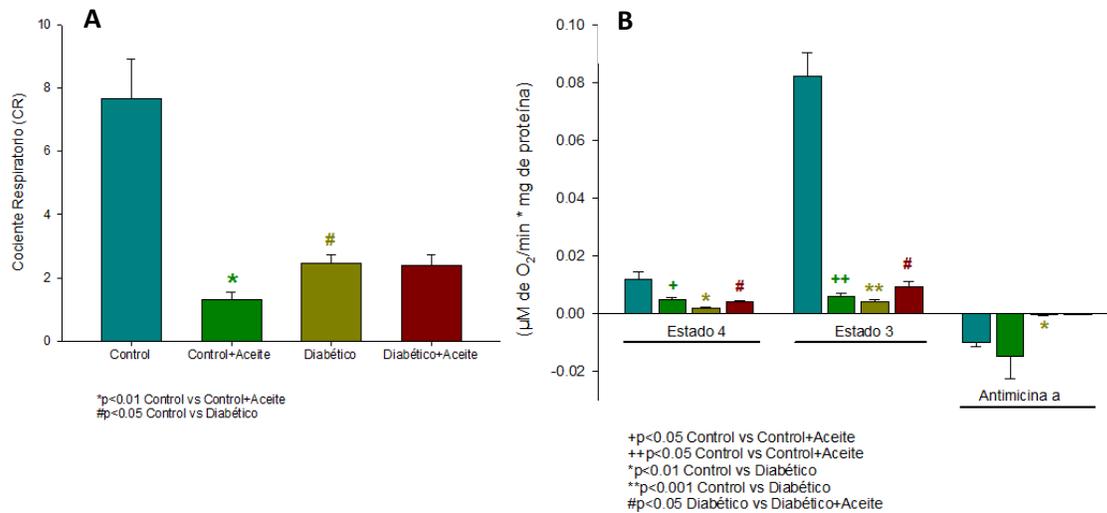


Figura 9.- En el panel A se muestran los cocientes respiratorios y en el panel B se muestran los niveles de consumo de oxígeno de las mitocondrias de hígado, de los distintos grupos a los 90 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media±EE de una n=5.

Al graficar el estado 4 y el estado 3 (Fig. 9, panel B) se observa que el grupo diabético es el que presentó los valores más bajos de consumo de oxígeno, en el estado 4, 14.16% con respecto al control ($p<0.01$) y en el estado 3, 4.7% también con respecto al control ($p<0.001$). El consumo del aceite de aguacate durante la diabetes recuperó los valores de consumo de oxígeno en al estado 4 y en el estado 3, teniendo valores de 32.8% y 11.4% ($p<0.05$), respectivamente, con respecto a su control. También se observó una disminución en el consumo de oxígeno en el grupo control que recibió el aceite de aguacate. En el estado 4 se obtuvo solamente un 39.6% del consumo de oxígeno que presentó el control ($p<0.05$). En este caso, este grupo también fue el que presentó la mayor producción de oxígeno al adicionar antimicina A, 41.5% más que el control. En cambio los grupos diabético y diabético más el aceite de aguacate, produjeron la menor cantidad de oxígeno 95% ($p<0.01$) y 97% menos que el control a los 90 días de tratamiento, respectivamente.

6.2.2. Actividad de los complejos de la CTE

La actividad de los complejos II, III y IV de la CTE se midió por separado utilizando inhibidores y sustratos específicos para cada complejo como se describió en Materiales y métodos.

En el panel A de la figura 10, se muestran los resultados de la actividad del complejo II de las mitocondrias de hígado a los 15 días de tratamiento. Podemos observar que la actividad de este complejo no se ve disminuida por la diabetes, sin embargo, el grupo diabético al que se le administró el aceite de aguacate, mostró un incremento en la actividad de este complejo 8.3 veces más que el control ($p < .001$). También se observa una disminución de 43.6% ($p < 0.01$) en el grupo control que recibió el aceite de aguacate con respecto al control.

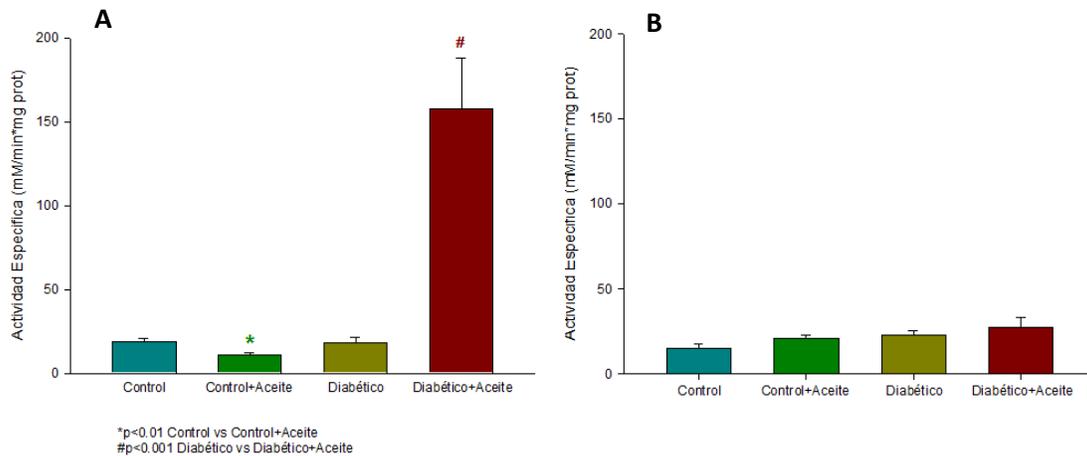


Figura 10.- Actividad del complejo II mitocondrial (succinato deshidrogenasa), a los 15 días de tratamiento (panel A, $n=6$) y a los 90 días de tratamiento (panel B, $n=3$). Los datos se presentan como la media \pm EE.

En el panel B de la figura 10 se muestran los resultados de la actividad del complejo II de las mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento, y se observa que no hay diferencias significativas de las actividades entre los distintos grupos.

En el caso del complejo III, podemos ver en el panel A de la figura 11 los resultados de la actividad de este complejo en las mitocondrias de hígado a los 15 días de tratamiento. Se observa que el grupo diabético muestra un descenso en la actividad de este complejo, 58% menos que el control ($p < 0.05$). Sin embargo, el consumo del aceite de aguacate durante la diabetes recupera la actividad de este complejo, llegando a 83.2% de la actividad del control.

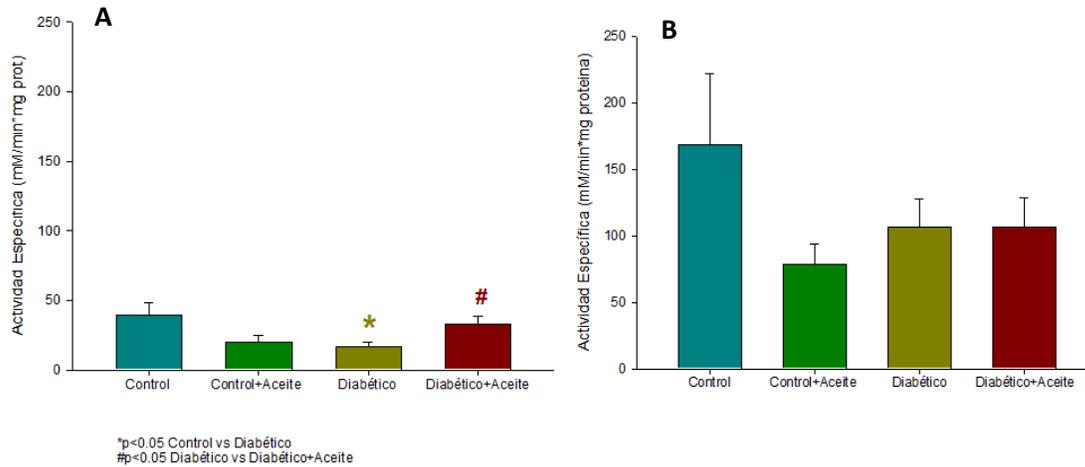


Figura 11.- Actividad del complejo III (succinato-citocromo c oxidorreductasa) de mitocondrias de hígado, a los 15 días de tratamiento (panel A, n=6) y a los 90 días de tratamiento (panel B, n=3). Los datos se presentan como la media±EE.

En el panel B de la figura 11 se muestran los resultados de la actividad del complejo III a los 90 días de tratamiento donde se observó que hubo una tendencia a disminuir la actividad de este complejo en todos los grupos, con respecto al control, sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa.

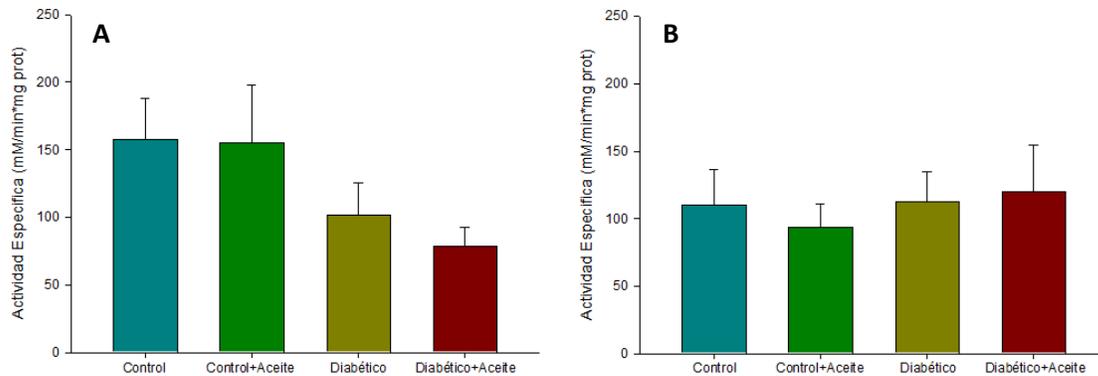


Figura 12.- Actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) de mitocondrias de hígado, a los 15 días de tratamiento (panel A, n=6) y a los 90 días de tratamiento (panel B, n=3). Los datos se presentan como la media±EE.

Respecto a la actividad del complejo IV, podemos ver en el panel A de la figura 12 los resultados de este ensayo en las mitocondrias de hígado a los 15 días de tratamiento. Se observó que el grupo diabético y diabético que consumió el aceite de aguacate muestran un descenso en la actividad de este complejo 35.5 y 50% menos que le control, respectivamente, pero esta disminución en la actividad no fue estadísticamente

significativa. En el panel B de la figura 12 podemos apreciar que no existen diferencias en la actividad del complejo IV de las mitocondrias de hígado entre los distintos grupos a los 90 días de tratamiento.

6.3. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de liperoxidación

Se determinaron los niveles de liperoxidación en las muestras de mitocondrias de hígado a los 15 y 90 días de tratamiento midiendo las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), los resultados se muestran en la figura 13.

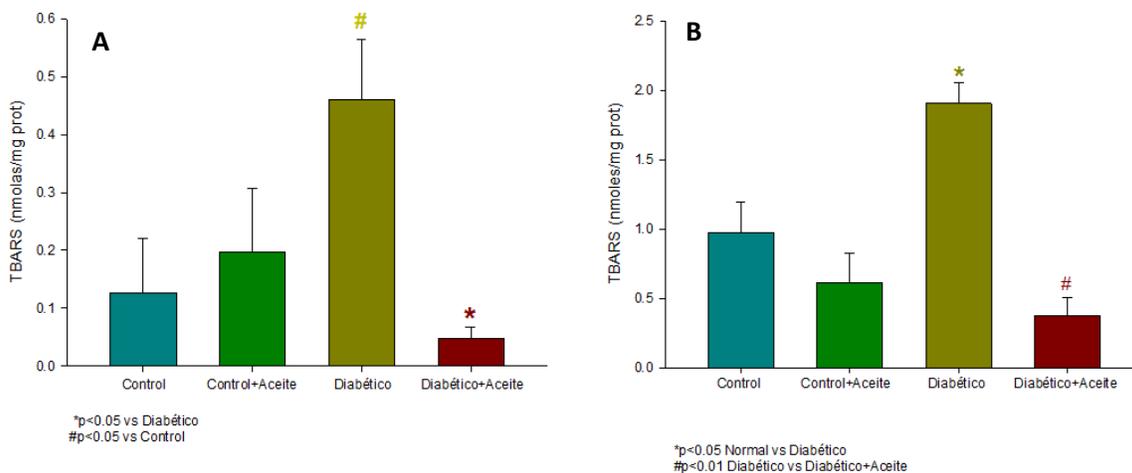


Figura 13.- Niveles de liperoxidación en mitocondrias de hígado, a los 15 días de tratamiento (panel A, n=6) y a los 90 días de tratamiento (panel B, n=3). Los datos se presentan como la media±EE.

En el panel A de la figura 13, podemos observar que a los 15 días en la mitocondrias de hígado durante la diabetes existe un incremento de los niveles de liperoxidacion de un 266% (p<0.05) en comparación con el control, sin embargo, el consumo de aceite de aguacate durante la diabetes produjo una disminución en los niveles de liperoxidación de las mitocondrias de hígado 328.5% (p<0.05) menos que el grupo diabético.

En el caso del tratamiento de 90 días, en el panel B de la figura 13, se puede observar los niveles de liperoxidacion de las mitocondrias de hígado los cuales se ven incrementados durante la diabetes un 95% (p<0.05) más que el control. El grupo diabético que se le administró el aceite de aguacate, en cambio, no mostró incremento en los niveles de liperoxidación mostrando valores 156.3% (p<0.01) más bajos que el grupo diabético.

6.4. Efecto del aceite de aguacate sobre el perfil de ácidos grasos mitocondriales

En la tabla 2 se muestran los porcentajes de ácidos grasos presentes en los distintos grupos a los 15 días de tratamiento. Durante la diabetes se observó una disminución en algunos ácidos grasos presentes en las mitocondrias, por ejemplo el ácido palmitoléico

(C16:1) disminuyó un 75% y el ácido oleico (C18:1) un 18.8% ($p < 0.05$). También se observó un incremento en el DHA (C22:6) un 36.6% ($p < 0.05$).

Tabla 2.- Perfil de ácidos grasos de las mitocondrias de hígado a los 15 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm EE de una $n=5$, * $p < 0.05$ respecto al control.

	% de ácidos grasos mitocondrias de hígado 15 días de tratamiento			
	Control	Control +Aceite	Diabético	Diabético +Aceite
Palmitico (16:0)	16.4 \pm 7.3	18.6 \pm 0.7	17.7 \pm 0.5	19.2 \pm 0.8
Palmitoleico (16:01)	0.8 \pm 0.0	0.7 \pm 0.1	0.2 \pm 0.0*	0.4 \pm 0.0*
Esteárico (18:0)	19.0 \pm 1.2	18.9 \pm 0.5	20.2 \pm 1.0	20.3 \pm 0.9
Oleico (18:1)	9.0 \pm 0.9	9.26 \pm 0.4	7.3 \pm 0.7*	7.8 \pm 0.4
Linoleico (18:2)	19.5 \pm 0.9	20.2 \pm 0.4	22.1 \pm 1.3	19.9 \pm 1.7
γ -Linolénico (18:3)	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0
Linolénico (18:3)	0.5 \pm 0.2	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1
Araquidónico (20:0)	20.0 \pm 1.7	22.1 \pm 1.0	19.4 \pm 0.9	19.2 \pm 0.5
EPA (20:5)	0.5 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1
Erucato (22:1)	0.3 \pm 0.3	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	1.3 \pm 0.6*
DHA (22:6)	6.0 \pm 0.8	5.6 \pm 0.2	8.2 \pm 1.3*	6.9 \pm 1.2

En el grupo diabético también se muestra una disminución en el contenido de ácido palmitoléico (C16:1) un 50% ($p < 0.05$) con respecto al control, y un incremento en los niveles de erucato (22:1) un 333.3% más que el control ($p < 0.05$).

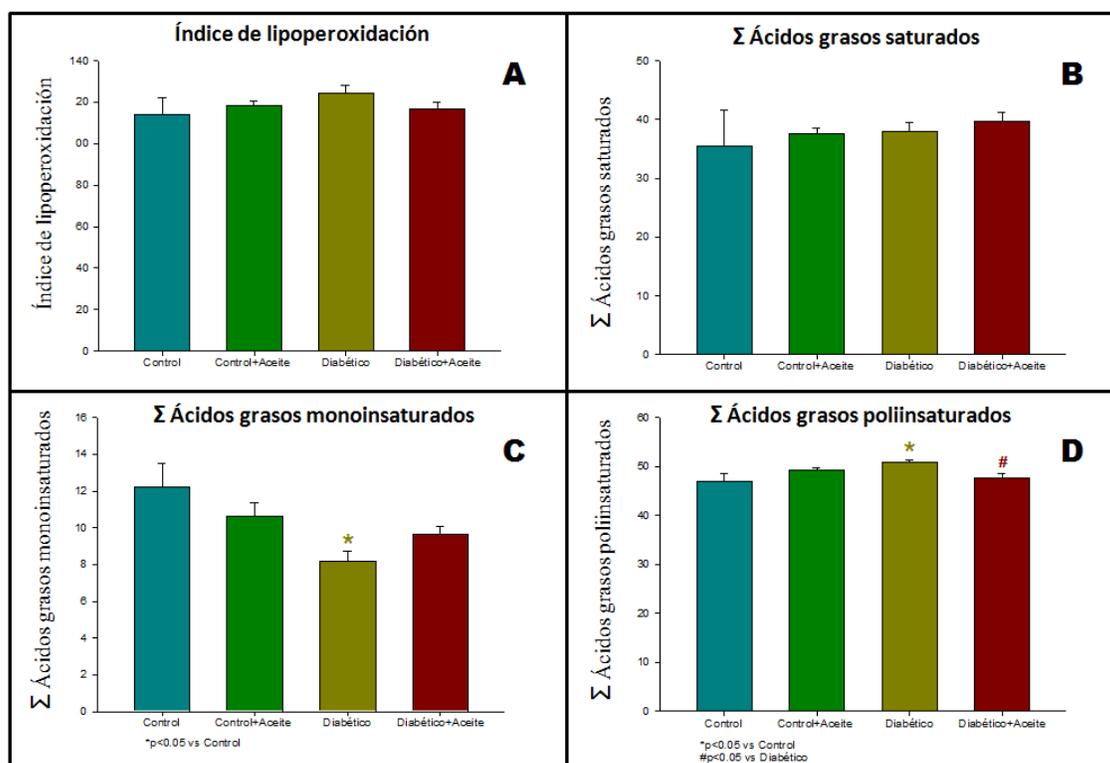


Figura 14.- Índice de lipoperoxidación (A) y sumatoria de los ácidos grasos saturados (B), monoinsaturados (C) y poliinsaturados (D) de mitocondrias de hígado a los 15 días de tratamiento. Los cálculos fueron realizados en base a los valores del perfil de ácidos grasos de las mitocondrias de hígado. Los datos se presentan como la media±EE de una n=5.

Utilizando los datos obtenidos del perfil de ácidos grasos de las mitocondrias se procedió a determinar el índice de lipoperoxidación (IP) de estas mitocondrias (figura 14, panel A) empleando la formula reportada por Scislowski *et al.*, en el 2005:

$$\begin{aligned}
 \text{IP} = & (\% \text{ dienoico} \times 1) + (\% \text{ trienoico} \times 2) \\
 & + (\% \text{ tetraenoico} \times 3) + (\% \text{ pentaenoico} \times 4) \\
 & + (\% \text{ hexaenoico} \times 5)
 \end{aligned}$$

Los resultados no mostraron diferencias entre los distintos grupos en el IP de las mitocondrias de hígado a los quince días de tratamiento. También se realizó la sumatoria de todos los ácidos grasos saturados presentes en estas mitocondrias y tampoco se observaron diferencias en los resultados obtenidos entre los distintos grupos (figura 14, panel B). Sin embargo, al realizar la sumatoria de los ácidos grasos monoinsaturados, en el panel C de la figura 14, se observó que el grupo diabético presentó una disminución de un 33% ($p < 0.05$) menos que el control. Al sumar el total de ácidos grasos poliinsaturados de las muestras de mitocondrias a los 15 días de tratamiento, panel D de la figura 14, en

donde se observó un incremento de 8.2% ($p<0.05$) en el grupo diabético en comparación con el grupo control, por el contrario, el grupo que consumió el aceite de aguacate durante la diabetes no presentó este incremento.

Tabla 3.- Perfil de ácidos grasos de las mitocondrias de hígado a los 15 días de tratamiento. Los datos se presentan como la media \pm EE de una $n=5$, * $p<0.05$ respecto al control.

	% de ácidos grasos mitocondrias de hígado 90 días de tratamiento			
	Control	Control +Aceite	Diabético	Diabético +Aceite
Palmitico (16:0)	21.1 \pm 0.4	19.7 \pm 0.5	19.1 \pm 0.5	19.1 \pm 0.1
Palmitoleico (16:01)	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0*	0.1 \pm 0.0*
Esteárico (18:0)	15.3 \pm 0.4	15.4 \pm 1.2	20.5 \pm 0.7*	20.6 \pm 0.5*
Oleico (18:1)	9.8 \pm 0.2	11.4 \pm 0.8	5.9 \pm 0.1*	6.2 \pm 0.1*
Linoleico (18:2)	25.2 \pm 0.2	23.5 \pm 1.0	22.8 \pm 1.8	22.2 \pm 1.0
γ -Linolénico (18:3)	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
Linolénico (18:3)	0.9 \pm 0.0	0.9 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1*	0.4 \pm 0.0*
Araquidónico (20:0)	18.7 \pm 0.4	20.0 \pm 1.3	18.0 \pm 0.7	17.5 \pm 0.7
EPA (20:5)	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.1 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0
Erucato (22:1)	0.2 \pm 0.1	0.7 \pm 0.4	0.4 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1
DHA (22:6)	4.5 \pm 0.1	4.7 \pm 0.2	9.2 \pm 1.1*	10.3 \pm 0.3*

En la tabla 3 se muestran los porcentajes de ácidos grasos presentes en los distintos grupos a los 90 días de tratamiento. Durante la diabetes se observa una disminución en algunos ácidos grasos presentes en las mitocondrias, el ácido palmitoleico (C16:1) disminuyó un 87.5%, el ácido oleico (C18:1) 39.7% y el ácido linolénico (C18:3) 44.4% con respecto al control ($p<0.05$). También se observó un incremento en el ácido esteárico (C18:0) 34% y el DHA (C22:6) 104.4% con respecto al control ($p<0.05$). El grupo diabético que consumió el aceite de aguacate mostró resultados muy similares al grupo diabético, una disminución en el ácido palmitoleico (C16:1) 87.5%, el ácido oleico (C18:1) 36.7% y el ácido linolénico (C18:3) 55.5% con respecto al control ($p<0.05$). También se observó un incremento en el ácido esteárico (C18:0) 34.6% y el DHA (C22:6) 128.8% con respecto al control ($p<0.05$).

En el panel A de la figura 15, se muestran los resultados del cálculo del índice de lipoperoxidación de las mitocondrias de los distintos grupos a los 90 días de tratamiento y se puede observar un incremento en el IP en los grupos diabéticos, un 15.7% ($p<0.01$) en el grupo diabético y un 18.5% ($p<0.001$) en el grupo diabético que consumió el aceite de aguacate, con respecto al control. En el panel B de la figura 15 se muestran los resultados de la sumatoria de los ácidos grasos saturados en donde se observó un incremento en el

grupo diabético de un 8.8% ($p < 0.05$) y en el grupo diabético que recibió el aceite de aguacate de un 9.1% ($p < 0.01$) con respecto al control. En la sumatoria de los ácidos grasos monoinsaturados que se muestran en el panel C de la figura 15 podemos observar que existe también una disminución en el contenidos de estos ácidos grasos, tanto en el grupo diabético, como en el grupo diabético que recibió el aceite de aguacate, 41.5% y 39.8%, respectivamente, en comparación con el control ($p < 0.001$).

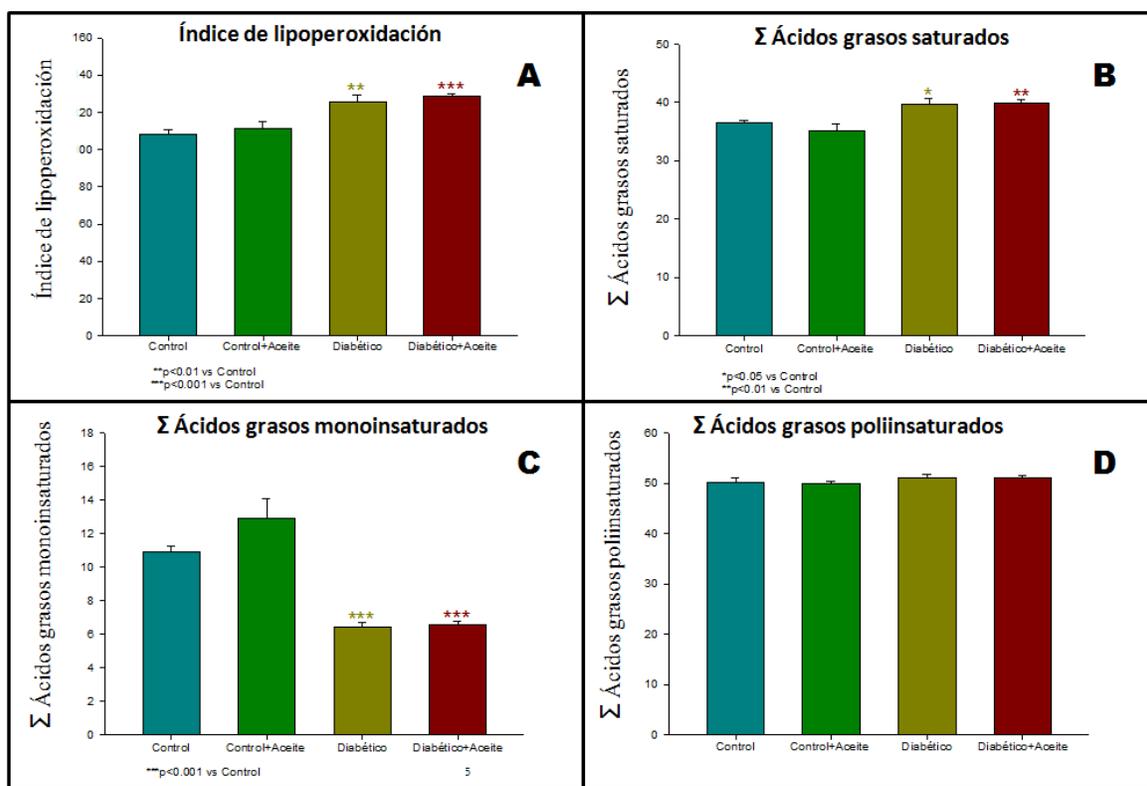


Figura 15.- Índice de lipoperoxidación (A) y sumatoria de los ácidos grasos saturados (B), monoinsaturados (C) y poliinsaturados (D) de mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento. Los cálculos fueron realizados en base a los valores del perfil de ácidos grasos de las mitocondrias de hígado. Los datos se presentan como la media \pm EE de una n=5.

En el panel D de la figura 15 se presentan los valores de la sumatoria de los ácidos grasos poliinsaturados en donde no se presentaron cambios entre los distintos grupos de tratamiento.

6.5. Efecto del aceite de aguacate sobre la resistencia al estrés oxidativo en la lipoperoxidación y la actividad de los complejos respiratorios durante la diabetes

Al tratar las muestras con Fe^{2+} se propicia el estrés oxidativo al generar el radical hidroxilo ($OH\cdot$) mediante la reacción de Fenton produciendo daño en las estructuras mitocondriales. Después de tratar las mitocondrias con distintas concentraciones de Fe^{2+} (25, 50 y 100

μM), se determinaron los niveles de lipoperoxidación y la actividad de los complejos II, III y IV de la CTE.

En la figura 16 en el panel A se muestran los niveles de lipoperoxidación de las mitocondrias a los 15 días de tratamiento a las distintas concentraciones de Fe²⁺, los resultados muestran que el grupo diabético que recibió el aceite de aguacate es el que presenta los niveles más bajos de lipoperoxidación a las distintas concentraciones de Fe²⁺, 98.2% a 25 μM (p<0.05), 92.2% a 50 μM (p<0.01) y 91.8% a 100 μM (p<0.01), en relación al control. El grupo control fue el que mostró más susceptibilidad al estrés con Fe²⁺ seguido del grupo control que recibió el aceite de aguacate y en tercer lugar el grupo diabético.

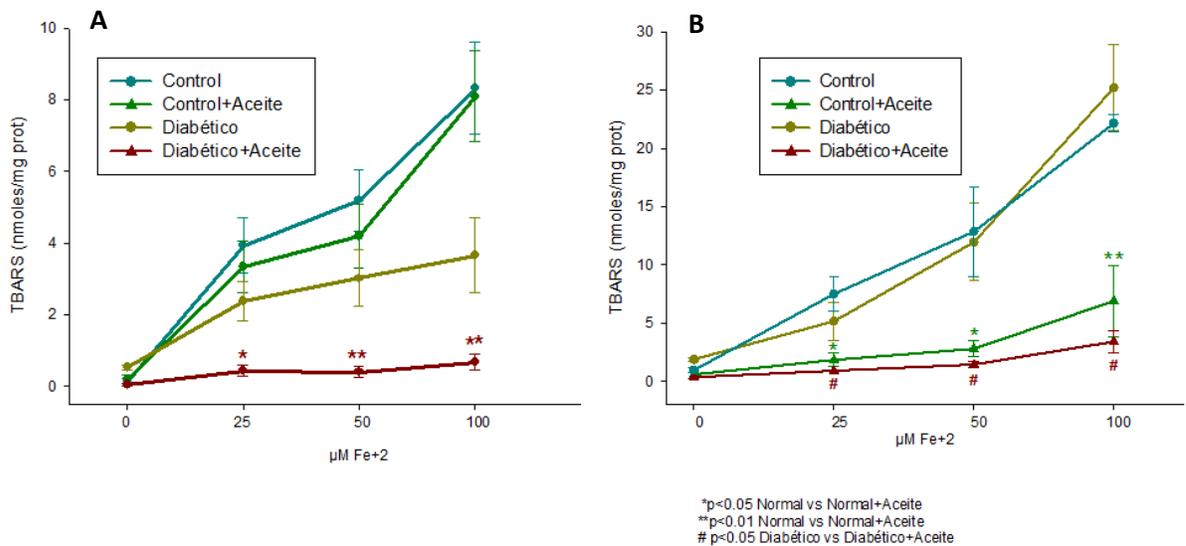


Figura 16.- Efecto del Fe²⁺ sobre los niveles de lipoperoxidación en las mitocondrias de hígado. Panel A los 15 días de tratamiento, n=6. Panel B a los 90 días de tratamiento, n=3. Las mitocondrias fueron incubadas previo a la determinación con las distintas concentraciones de Fe²⁺ durante 30 minutos a 4°C. Los datos se presentan como la media±EE.

En el panel B de la figura 16 se muestran los niveles de lipoperoxidación de las mitocondrias a los 90 días de tratamiento a las distintas concentraciones de Fe²⁺, en este caso los grupos que recibieron el tratamiento con aceite de aguacate. Tanto el grupo control como el diabético, fueron los que mostraron mayor resistencia a la lipoperoxidación inducida por el Fe²⁺. El grupo control que recibió el aceite de aguacate mostró niveles 75.1% a 25 μM (p<0.05), 78.1% a 50 μM (p<0.05) y 68.8% a 100 μM (p<0.01) más bajos que el control y un 87.6% menos a 25 μM (p<0.05), 88.5% a 50 μM (p<0.05) y 84.4% a 100 μM (p<0.05) más bajos con respecto al control, en el caso del

grupo diabético que recibió el aceite de aguacate. El grupo control y el grupo diabético fueron los que mostraron los niveles más altos de lipoperoxidación en respuesta al estrés producido por el Fe^{2+} .

Se evaluó la actividad de los complejos II, III y IV de la cadena transportadora de electrones ante el incremento en el estrés oxidativo producido por la adición de las distintas concentraciones de Fe^{2+} . En el caso del complejo II en las mitocondrias de hígado a los 15 días de tratamiento, figura 17 panel A, se observó que el grupo control y el grupo diabético fueron los que mostraron una mayor sensibilidad al daño producido por el Fe^{2+} a todas las concentraciones; por otra parte, el grupo diabético y el grupo control que consumió el aceite de aguacate fueron los que mostraron una mayor resistencia a disminuir su actividad ante el estrés oxidativo. A la concentración de 25 μM de Fe^{2+} , obtuvieron incremento de un 51.78% y un 20.1%, respectivamente, en relación con el control ($p < 0.05$) y también hubo un incremento en la resistencia al estrés oxidativo de un 38.6% y un 31.6% a las concentración de 50 μM Fe^{2+} y de 29% y 23.6% a la concentración de 100 μM Fe^{2+} con respecto al control ($p < 0.05$).

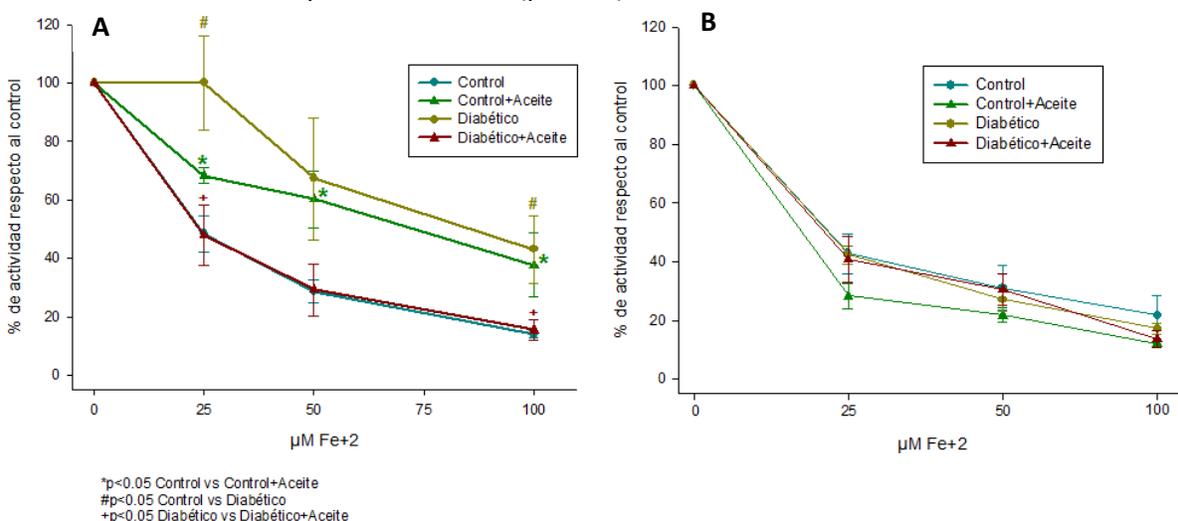


Figura 17.- Actividad del complejo II (succinato deshidrogenasa) en mitocondrias de hígado. Panel A a los 15 días de tratamiento, $n=6$ y panel B a los 90 días de tratamiento, $n=3$. Las mitocondrias fueron incubadas previo a la determinación con las distintas concentraciones de Fe^{2+} durante 30 minutos a $4^{\circ}C$. Los datos se presentan como la media \pm EE.

En el panel B de la figura 17 se puede apreciar que no existen diferencias en las actividades enzimáticas entre los distintos grupos a las distintas concentraciones de Fe^{2+} a en las mitocondrias de hígado a los 90 días de tratamiento.

En cuanto a la actividad del complejo III podemos observar en el panel A de la figura 18 que a los 15 días de tratamiento las mitocondrias de hígado del grupo diabético fueron las que mostraron una mayor sensibilidad a la inhibición producida por el Fe^{2+} , mostrando una disminución en la actividad de un 98.3, 92.3 y 95.8% a las concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{M Fe}^{2+}$, con respecto al control. Sin embargo, las mitocondrias del grupo diabético que consumió el aceite de aguacate mostraron una mayor resistencia, incrementando la actividad del complejo III 63, 28.7 y 24.1% a las concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ con respecto al grupo diabético ($p < 0.05$).

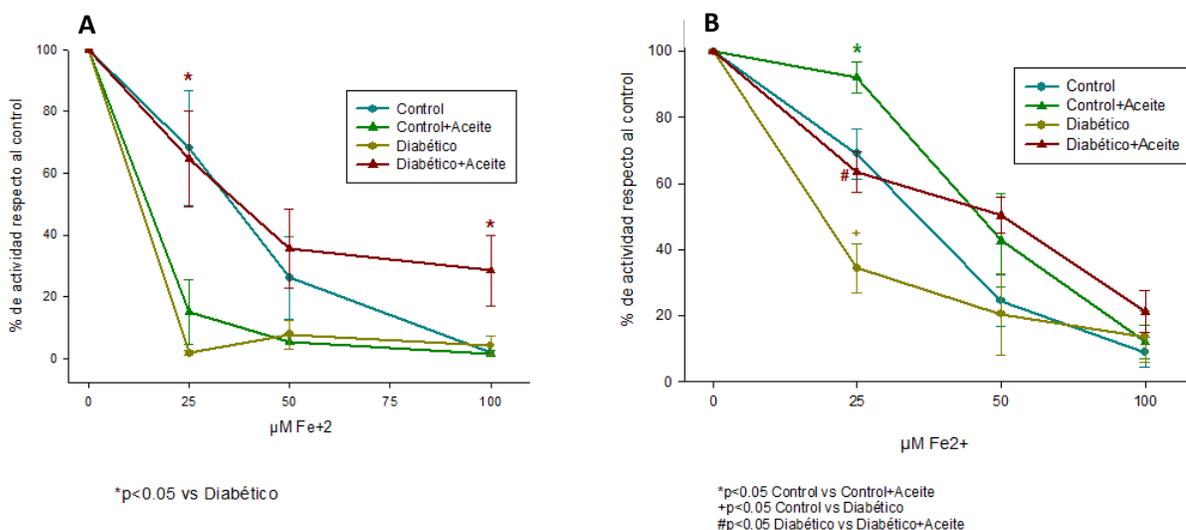


Figura 18.- Actividad del complejo III (succinato-citocromo c oxidorreductasa) en mitocondrias de hígado. Panel A a los 15 días de tratamiento, $n=6$ y panel B a los 90 días de tratamiento, $n=3$. Las mitocondrias fueron incubadas previo a la determinación con las distintas concentraciones de Fe^{2+} durante 30 minutos a 4°C . Los datos se presentan como la media \pm EE.

A los 90 días de tratamiento (figura 18, panel B), nuevamente las mitocondrias de hígado del grupo diabético fueron las que mostraron la mayor susceptibilidad al Fe^{2+} disminuyendo la actividad del complejo III un 65.6, 79.6 y 86.4% a las concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{M Fe}^{2+}$, con respecto al control. De igual manera que a los 15 días de tratamiento, el consumo de aceite de aguacate durante la diabetes incrementó la resistencia a la inhibición por Fe^{2+} aumentando la actividad del complejo III un 29.1% a la concentración de 25 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ($p < 0.05$) y un 29.9% y 7.6% a las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{M Fe}^{2+}$, comparado con el grupo diabético. El grupo control que consumió el aceite de aguacate fue el que presentó la mayor resistencia a la concentración de 25 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ presentando valores de actividad 23.2% mayores que el control ($p < 0.05$).

Los resultados de la actividad del complejo IV se presentan en la figura 19 en donde se muestra en el panel A los resultados de las mitocondrias de hígado a los 15 días de tratamiento, se observó que el grupo diabético que consumió el aceite de aguacate fue el que presentó la mayor resistencia al estrés con Fe^{2+} presentando valores de actividad 19.9, 31.8 y 27.5% mayores que el grupo diabético a las concentraciones de 25, 50 y 100 $\mu\text{M Fe}^{2+}$ ($p < 0.05$).

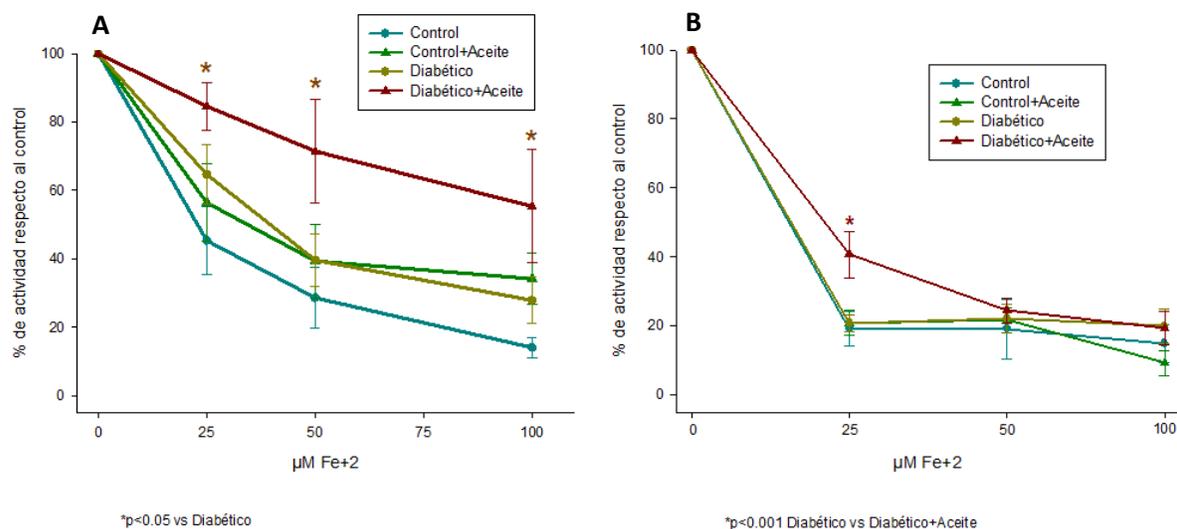


Figura 19.- Actividad del complejo IV (citocromo c oxidasa) en mitocondrias de hígado. Panel A a los 15 días de tratamiento, $n=6$ y panel B a los 90 días de tratamiento, $n=3$. Las mitocondrias fueron incubadas previo a la determinación con las distintas concentraciones de Fe^{2+} durante 30 minutos a 4°C . Los datos se presentan como la media \pm EE.

A los 90 días de tratamiento la actividad del complejo IV, sólo se incrementó la resistencia al Fe^{2+} en las mitocondrias de hígado del grupo diabético que consumió el aceite de aguacate, presentando un incremento de la actividad de un 21.5% ($p < 0.001$) en comparación con el control a la concentración de 25 $\mu\text{M Fe}^{2+}$. Los otros grupos y en las demás concentraciones de Fe^{2+} no hubo diferencias en la actividad del complejo IV.

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

Se determinó la producción de ERO mitocondriales utilizando una sonda fluorescente y glutamato/malato como sustrato mitocondrial. En la figura 20 se muestran los resultados de este experimento. En el panel A se muestran los resultados de la producción de ERO a los 15 días de tratamiento en las mitocondrias de hígado, donde se puede observar que en condiciones basales no existen diferencias entre los distintos grupos en la producción de ERO, sin embargo, en las muestras tratadas con 25 $\mu\text{M Fe}^{2+}$, el grupo diabético fue el que

produjo una mayor cantidad de ERO 98.3% más que el control y el grupo diabético que consumió el aceite de aguacate redujo la producción de ERO un 42.2% ($p < 0.05$) en comparación con el grupo diabético.

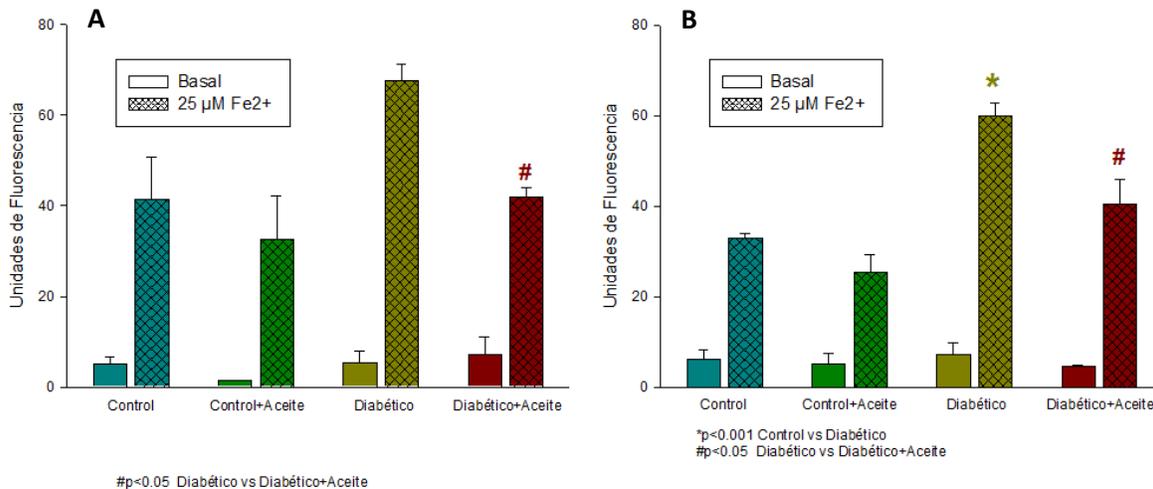


Figura 20.- Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en mitocondrias de hígado. Panel A 15 días de tratamiento y panel B 90 días de tratamiento. Las mitocondrias fueron incubadas previo a la determinación con 25 μM de Fe^{2+} durante 30 minutos a 4°C. Los datos se presentan como la media \pm EE de una $n=3$.

A los 90 días de tratamiento (figura 20, panel B) la producción de ERO de las mitocondrias de hígado fue muy parecida a los resultados de los 15 días en donde en condiciones basales no existen diferencias entre los distintos grupos, pero al incubarlas con 25 μM de Fe^{2+} , el grupo diabético fue el que produjo la mayor cantidad de ERO 81.8% ($p < 0.001$) más que el control y el grupo que consumió el aceite de aguacate disminuyó esta producción en un 32.3% ($p < 0.05$) en comparación con el grupo diabético.

7. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es un desorden metabólico complejo de múltiple etiología con gran prevalencia a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud existen 347 millones de diabéticos en todo el mundo, los cuales son propensos a padecer un gran número de complicaciones tanto a nivel renal (nefropatía), visual (retinopatía), nervioso (neuropatía), en el hígado, en el metabolismo de lípidos, así como una variedad de padecimientos cardiovasculares. El tratamiento de todas estas complicaciones conllevan un gasto muy grande para los sistemas de salud y más importante aún, estas complicaciones son la causa del fallecimiento de la mayoría de estos pacientes (World Health Organization, año??). Debido a esto es de suma importancia buscar tratamientos que puedan reducir la incidencia de las complicaciones producidas por el estado de hiperglucemia crónico que presentan estos pacientes.

Se ha comprobado que la diabetes es una enfermedad en la cual se producen una gran cantidad de ERO, éste comienza en etapas muy tempranas de la enfermedad y aumenta con el avance de la enfermedad (Wiernsperger, 2003). Se ha descrito cómo este aumento de las ERO está relacionado con el desarrollo de las complicaciones propias de esta enfermedad y también se ha observado que este estrés oxidativo se presenta debido a diversas alteraciones a nivel mitocondrial, tales como el aumento en la producción de ERO mitocondriales (O_2^-), peroxidación de lípidos y la disminución de las defensas antioxidantes (GSH, SOD, CoQ, etc.) (Raza *et al.*, 2011). Debido a la gran proporción de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas mitocondriales, esto las vuelve más susceptibles al estrés oxidativo, sin embargo, se ha reportado que un mayor contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados a nivel mitocondrial produce un incremento en la resistencia al daño provocado por el estrés oxidativo (Cortes-Rojo *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2001). Debido a que el ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado, es el principal ácido graso presente en el aceite de aguacate, puede presentar efectos benéficos tanto en la regulación del metabolismo de lípidos (Grundy, 1989), así como en enfermedades relacionadas con el aumento en el estrés oxidativo, como es el caso de la diabetes (Terés *et al.*, 2008). Por lo tanto, es factible proponer que el consumo de aceite de aguacate ayude a controlar la dislipidemia presente durante la diabetes, así como aumentar la resistencia mitocondrial al estrés oxidativo.

Al realizar la cuantificación de los ácidos grasos del alimento que consumieron las ratas durante el periodo que duró el tratamiento (Fig. 1A) se obtuvo como ácido graso mayoritario al ácido linoléico (C18:2), el cual es un ácido graso poliinsaturado, sin embargo, como los cuatro grupos de ratas se les suministró el mismo alimento, esto no fue una variante a considerar, la única diferencia entonces en la dieta de los grupos

tratados fue la administración del aceite de aguacate, el cual contiene como ácido graso mayoritario el ácido oleico (C18:1, 68%) (Fig. 1B).

También se observó, que el consumo del aceite de aguacate no tiene efecto sobre la polidipsia y la polifagia, características de la diabetes (Figs. 2 y 3), ni tubo efecto alguno en los hábitos alimenticios de las ratas controles. Al llevar el registro de los niveles de glucosa durante el tratamiento (Fig. 4A) se observaron dos tendencias distintas: la de los grupos controles en donde los niveles de glucosa se mantuvieron por debajo de los 100 mg/dl y los de los grupos diabéticos en donde después de la inducción con STZ presentaron niveles por encima de los 400mg/dl. En cuanto a la hiperglucemia, el aceite de aguacate no produjo algún tipo de regulación contrario a lo ya reportado por Lerman *et al.* en 1994 donde pacientes con diabetes tipo 2 a los cuales se les proporciona una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados mediante la ingesta de aguacate presentaron un adecuado control glucémico. La falta de efecto hipoglucemiante en nuestro experimento puede ser debido al modelo experimental utilizado, ya que las ratas diabéticas inducidas con STZ (diabetes tipo 1) presentan valores de glucosa muy elevados en comparación con los pacientes diabéticos tipo 2. Sin embargo, podemos resaltar entonces que los efectos producidos por el aceite de aguacate no están relacionados con un efecto hipoglucemiante (Lerman *et al.*, 1994).

También en los registros del peso de los animales (Fig. 4B) se observaron dos tendencias: una de los grupos normales en los cuales se observó una ganancia de peso conforme transcurren los días de tratamiento y por otro lado los grupos diabéticos, los cuales en lugar de ganar peso lo llegan a perder con el paso del tiempo. El consumo de aceite de aguacate tampoco influyó sobre esta característica en el grupos diabético ni en el grupo control. Esto resulta interesante ya que el aceite de aguacate es una fuente extra de lípidos, sin embargo, esto no produce un incremento en el peso de los animales, lo cual es una característica favorable, ya que entonces se puede concluir que no contribuye al desarrollo de obesidad.

Se realizó la determinación de glucosa al término del tratamiento con 12 hrs de ayuno y se obtuvieron valores menores de glucosa que cuando las ratas no se encontraban en ayuno, pero en este caso, el consumo de aceite de aguacate tampoco mostró efecto hipoglucemiante a los 15 ni a los 90 días de tratamiento.

Debido a que en los pacientes diabéticos es muy frecuente la aparición de dislipidemias debido a alteraciones en el metabolismo de lípidos, se determinaron los niveles de triglicéridos y colesterol al término de los dos periodos de tratamiento. En el caso del grupo diabético, se presentó un incremento en los niveles de colesterol, tanto a los 15 como a los 90 días, y de triglicéridos solamente hasta los 90 días (Figs. 6 y 7). Esta

dislipidemia que se presenta durante la diabetes es producto de una disminución en la expresión de los receptores de las LDL. El grupo diabético que consumió el aceite de aguacate tuvo valores normales de triglicéridos y colesterol al término del tratamiento. Esto puede explicarse debido a que se ha reportado que el ácido oleico juega un papel muy importante en la regulación de la dislipidemia aumentando la expresión de los receptores para LDL y con ello se disminuyen el colesterol y los triglicéridos en circulación (Grundy, 1989), los cuales al incrementar su concentración en el plasma son un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis. Otro mecanismo por el cual el ácido oleico previene la aterosclerosis es que al ser incorporado en las LDL, éstas se vuelven más resistentes a la oxidación y por tanto, no se propicia la formación de placas ateroscleróticas (Reaven *et al.* 1993; Carranza-Madrigal *et al.*, 2008). Entonces, el aceite de aguacate puede regular los niveles de lípidos en sangre durante la diabetes y prevenir la aparición de complicaciones cardiovasculares y aterosclerosis.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Alvizouri-Muñoz *et al.* en el 2009 en donde se observó una disminución en los niveles de colesterol total y triglicéridos y un incremento en el HDL lo cual conllevó a una mejora en el índice aterogénico de pacientes diabéticos a los cuales se les administró una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados en forma del fruto de aguacate.

En los resultados, también se muestra que existen alteraciones en la función mitocondrial en el hígado durante la diabetes. Esto se puede observar en la disminución de la respiración mitocondrial en el estado 3 y 4 además de una disminución en la actividad del complejo III y IV, mientras que la actividad del complejo II no sufrió cambios. A los 15 días de tratamiento en las mitocondrias no se observan diferencias en el cociente respiratorio entre los distintos grupos (Fig. 8A), pero al graficar el estado 4 y el estado 3 por separado se observó que el grupo diabético fue el que mostró los valores más bajos de consumo de oxígeno (Fig. 8B). La disminución en la velocidad de consumo de oxígeno durante la diabetes puede relacionarse con un incremento en los niveles de lipoperoxidación en las membranas mitocondriales, lo cual produce alteraciones en la permeabilidad de la membrana y en la función de las enzimas acopladas a ella (Chen y Yu, 1994), debido a un aumento en el estrés oxidativo, producto del estado de hiperglucemia constante en el cual se encuentran los pacientes diabéticos.

El consumo del aceite de aguacate incrementó la velocidad del consumo de oxígeno, posiblemente al reducir la formación y el daño producido por las ERO. Al normalizar el flujo de electrones en la CTE, se disminuye entonces la posibilidad de fuga de electrones, que al reaccionar con el oxígeno producen el anión superóxido, una ERO que puede producir estrés oxidativo. Entonces, si se previene el daño en los ácidos grasos

poliinsaturados de las membranas mitocondriales, esto permite que las enzimas acopladas a la membrana trabajen de forma eficiente (Lukivskaya *et al.*, 2007).

Al adicionar antimicina A se observó un incremento en los niveles de oxígeno, los cuales se presume corresponde al oxígeno, producto de la neutralización de las especies reactivas de oxígeno por acción de las defensas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión y catalasa). El grupo diabético fue el que presentó los mayores niveles de producción de oxígeno al agregar la antimicina A, lo cual concuerda con la idea de que durante la diabetes se incrementa la producción de ERO.

A los 90 días de tratamiento se presentaron diferencias en los cocientes respiratorios de las mitocondrias (Fig. 9A), en donde todos los grupos presentaron valores menores que el control. Sin embargo, al graficar los valores del estado 4 y el estado 3 por separado (Fig. 9B), al igual que a los 15 días, el grupo diabético fue el que presentó los valores más bajos de consumo de oxígeno y nuevamente el consumo de aceite de aguacate durante la diabetes incrementó la velocidad de respiración.

Al medir la actividad de los complejos respiratorios por separado, los resultados muestran que no existe diferencia en la actividad del complejo II en las mitocondrias de hígado en el grupo diabético comparado con el control (Fig. 10). El consumo de aceite de aguacate durante la diabetes produjo un incremento en la actividad de este complejo a los 15 días de tratamiento únicamente. Existen reportes en donde se observa que la actividad del complejo II no disminuye durante la diabetes, por el contrario en algunos casos se observa un aumento en la actividad de este complejo (Ferreira *et al.*, 2003; Hao *et al.*, 2011; Raza *et al.*, 2011).

El complejo III, sin embargo, sí presentó una disminución de su actividad durante la diabetes (Fig. 11); esto nos indica que probablemente sea una de las enzimas afectadas debido al incremento del estrés oxidativo. Sin embargo, también se conoce que el complejo III es una de las principales fuentes productoras de ERO. Este complejo se encuentra regulado por diversos factores, como son el estado biológico del tejido, el consumo de oxígeno, el flujo reverso de electrones, el potencial intermembranal, la oxidación del glutatión mitocondrial y modificaciones post-traduccionales del complejo (Raza *et al.*, 2011). Esta producción de ERO por parte del complejo III promueve un ciclo de daño en la mitocondria en donde el daño en los ácidos grasos genera una falla en el funcionamiento del complejo III que a su vez produce una mayor cantidad de ERO. El consumo del aceite de aguacate durante la diabetes produce un aumento en la actividad del complejo III en comparación con el grupo diabético, al eficientizar entonces el transporte de electrones en el complejo III se disminuye el riesgo de una fuga y la posterior formación de ERO, por lo tanto, se reduce el estrés oxidativo.

Por su parte el complejo IV mostró también una tendencia a disminuir su actividad durante la diabetes. Esta disminución ya ha sido reportada también y aunado a la disminución de la actividad del complejo III y que el complejo II no se afecte, esto propicia el flujo reverso de electrones lo que produce también un incremento en las ERO durante la diabetes (Hao *et al.*, 2011; Raza *et al.*, 2011).

Al medir los niveles de lipoperoxidación en las mitocondrias de hígado (Fig. 13) se observó un incremento en el grupo diabético, lo cual ya ha sido reportado con anterioridad (Hamden *et al.*, 2008; Lukivskaya *et al.*, 2007), lo cual es prueba del incremento en el estrés oxidativo durante la diabetes. El consumo de aceite de aguacate durante la diabetes disminuye los niveles de lipoperoxidación en las mitocondrias, entonces, mediante este mecanismo es probable que el aceite de aguacate recupere la actividad de los complejos de la CTE y aumente la tasa de consumo de oxígeno de las mitocondrias. Sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre no está del todo claro ya que al realizar la determinación del perfil de ácidos grasos de las membranas mitocondriales no se vio un incremento en el contenido de ácido oleico como se esperaba (Tabla 2 y 3). Entonces, un mecanismo alternativo mediante el cual el aceite de aguacate disminuye los niveles de lipoperoxidación es incrementando la cantidad de antioxidantes a nivel mitocondrial. Se ha reportado que los niveles de lipoperoxidación pueden disminuir al incrementarse los niveles de α -tocoferol en mitocondrias de hígado (Santos *et al.*, 2001) y como el aceite de aguacate es un alimento rico en α -tocoferol, además, de una gran diversidad de antioxidantes como carotenoides (luteína, α y β -caroteno, anteraxantina, neoxantina, zeaxantina, violaxantina y β -criptoxantina), γ -tocoferol y clorofilas a y b (Ashton *et al.*, 2006), es posible que de esta forma ayude a reducir los niveles de lipoperoxidación. Sin embargo, existe una gran controversia en si al consumir antioxidantes estos pueden llegar hasta el sitio en donde se producen las ERO que es la mitocondria principalmente (Green *et al.*, 2004). Sin embargo, se ha observado que existe una mayor oportunidad de que los antioxidantes actúen en el sitio donde son requeridos cuando se encuentran en un medio lipofílico como el que proporciona el aceite de aguacate (Lu *et al.*, 2005).

Ya que no hubo una mayor incorporación de ácido oleico en las membranas mitocondriales, se realizó la suma de todos los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, así como el cálculo del índice de lipoperoxidación en base en el perfil de ácidos grasos de las mitocondrias de hígado para evaluar si el aceite de aguacate produjo algún cambio. A los 15 días no se encontraron cambios entre los distintos grupos en el índice de lipoperoxidación y la suma de ácidos grasos saturados (Fig. 14), pero si se observó una disminución en la sumatoria de los ácidos grasos monoinsaturados y un aumento en la suma de ácidos grasos poliinsaturados en el grupo diabético. Esto pudiera también ayudar a explicar los resultados de la lipoperoxidación, ya que al incrementarse

los ácidos grasos poliinsaturados, hay una mayor probabilidad de que se lleve a cabo el daño por lipoperoxidación ya que este tipo de ácidos grasos son susceptibles a la lipoperoxidación (Hulbert *et al.*, 2007). El consumo de aceite de aguacate durante la diabetes evita que estos cambios ocurran. A los 90 días de tratamiento (Fig. 15) los resultados muestran un incremento en el índice de lipoperoxidación en los grupos diabéticos y también una disminución en la suma de ácidos grasos monoinsaturados. La falta de correlación del cálculo del índice de lipoperoxidación con los resultados obtenidos en el experimento pueden deberse a que el índice de lipoperoxidación solo toma en cuenta la composición de ácidos grasos de las membranas y puede que el efecto observado no sea debido a la composición de ácidos grasos solamente, sino también a la participación de los antioxidantes.

En la prueba de resistencia al estrés oxidativo las mitocondrias del grupo diabético que consumió el aceite de aguacate fueron las que presentan los niveles más bajos de lipoperoxidación (Fig. 16) y presentaron la mayor resistencia a la inhibición producida por el Fe^{2+} en el complejo III y IV (Fig. 18 y 19), con lo cual se pudo comprobar que el consumo del aceite de aguacate confiere resistencia al estrés oxidativo durante la diabetes incluso en rangos muy superiores a los fisiológicos. En el caso del complejo II a los 15 días (Fig. 17) se observó que el grupo diabético fue el que mostró la mayor resistencia al estrés oxidativo lo cual concuerda con lo reportado en la literatura donde en la diabetes se observó un incremento en la actividad de este complejo, probablemente debido al aumento en las concentraciones de CoQ (Ferreira *et al.*, 2003) y en la expresión de este complejo (Raza *et al.*, 2011) en las mitocondrias de hígado durante la diabetes.

Al medir la producción de ERO el grupo diabético mostró un incremento en comparación con el grupo control (Fig. 20). Esto era de esperarse, debido a todas las alteraciones que se habían observado en las mitocondrias; también esto demuestra que dichas alteraciones son producto del incremento en la producción de ERO durante la diabetes. Un aumento en la producción de ERO es característico de muchas patologías en donde existen alteraciones en la CTE. Los niveles altos de glucosa inducen una sobreproducción de ERO a través de la CTE durante la respiración mitocondrial. Cada vez existe más evidencia de la relación entre la hiperglucemia, el estrés oxidativo y el desarrollo de complicaciones durante la diabetes (Raza *et al.*, 2011), por lo tanto, el consumo del aceite de aguacate durante la diabetes puede disminuir la formación de ERO, lo que conlleva muchos beneficios en el tratamiento de esta enfermedad.

8. CONCLUSIÓN

El aceite de aguacate protege del daño mitocondrial que se produce durante la diabetes al aumentar la resistencia de los complejos respiratorios al estrés oxidativo y reduce la formación de ERO al disminuir la sensibilidad mitocondrial a la lipoperoxidación.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar la cantidad de antioxidantes tanto en el aceite de aguacate como en las mitocondrias de las ratas que consumen con el aceite de aguacate.
- Elucidar el mecanismo mediante el cual el aceite de aguacate protege del daño por el estrés oxidativo durante la diabetes.

10. BIBLIOGRAFÍA

Aceite Ahuacatlán. Un producto de Diricom, S.A. de C.V. © 2012.

<http://www.ahuacatlan.com.mx/aceite.htm>

Alonso-Cruz C. 2009. Con diabetes 25 mil michoacanos. Cambio de Michoacán.

Alvizouri F., Rodriguez A. Efectos médicos del aguacate. Med Int Mex 2009;25(5):379-85

Ashton OB, Wong M, McGhie TK, Vather R, Wang Y, Requejo-Jackman C, Ramankutty P, Woolf AB. 2006. Pigments in avocado tissue and oil. J Agric Food Chem. 27;54(26):10151-8.

Bulum T., Kolaric´ B., Duvnjak L. and Duvnjak M. 2011. Nonalcoholic Fatty Liver Disease Markers Are Associated with Insulin Resistance in Type 1 Diabetes. Dig Dis Sci. 56:3655–3663.

Carranza-Madrigal J, Alvarez Muñoz M, Herrera Abarca JE, Chávez Carbajal F. 2008. Efectos del aguacate como fuente de ácidos grasos monoinsaturados en lípidos séricos,

metabolismo de la glucosa y reología en pacientes con diabetes tipo 2. *Med Int Mex*; 24(4):267-72.

Chen, J.J., Yu, B.P., 1994. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Rad Biol Med* 17, 411–418.

Cortés-Rojo C, Calderón-Cortés E, Clemente-Guerrero M, Estrada-Villagómez M, Manzo-Avalos S, Mejía-Zepeda R, Boldogh I, Saavedra-Molina A. 2009. Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *J Bioenerg Biomembr*. 41(1), 15-28.

D'Ambrosio SM, Han C, Pan L, Kinghorn AD, Ding H. 2011. Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 10;409(3):465-9.

Darko D, Dornhorst A, Kelly FJ, Ritter JM, Chowienczyk PJ. 2002. Lack of effect of oral vitamin C on blood pressure, oxidative stress and endothelial function in Type II diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 103(4), 339-44.

Davidson I, Henry JB. *Diagnostico clínico por el laboratorio*. 6a Edición. Barcelona España. Editorial Salvat. 1978. p 107-108, 606-645.

Ferreira FM, Palmeira CM, Seíça R, Moreno AJ, Santos MS. 2003. Diabetes and mitochondrial bioenergetics: alterations with age. *J Biochem Mol Toxicol*;17(4):214-22.

Ferreira FM, Seíça R, Oliveira PJ, Coxito PM, Moreno AJ, Palmeira CM, Santos MS. 2003. Diabetes induces metabolic adaptations in rat liver mitochondria: role of coenzyme Q and cardiolipin contents. *Biochim Biophys Acta*; 1639(2):113-20.

Ferreira F.M., Moreno A.J., Seíça R., Santos M.S., Palmeira C.M. 2003. Diabetes and mitochondrial bioenergetics: alterations with age. *J. Biochem. Mol. Toxicol*. 17, 214–222.

Giacco F. and Brownlee M. 2010. Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circ. Res*. 107;1058-1070.

Green K, Brand MD, Murphy MP. 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 53 Suppl 1:S110-8.

Grundty SM. 1989. Monounsaturated fatty acids and cholesterol metabolism: implications for dietary recommendations. *J Nutr* ;119(4):529-33.

- Gutiérrez-Vázquez I, Burgurte-Cabañas T, Zacarías-Castillo R. 2006. Mortalidad por diabetes mellitus. Experiencia de 11 años en un hospital de segundo nivel. *Salud Pública Méx*; 48(6):445-445.
- Hamden K, Carreau S, Boujbiha MA, Lajmi S, Aloulou D, Kchaou D, Elfeki A. 2008. Hyperglycaemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver: protective effect of 17 beta-estradiol. *Steroids*. 2008 May;73(5):495-501.
- Hao J, Shen W, Sun L, Long J, Sharman E, Shi X, Liu J. . 2011. Mitochondrial dysfunction in the liver of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats: improvement by a combination of nutrients. *Br J Nutr*; 106(5):648-55.
- Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. 2007. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev*. 87(4):1175-213.
- Karp G. 2005. *Biología Celular y Molecular*. Cuarta edición. Editorial McGraw-Hill. 196-213
- Lerman I, Ichazo S, Zamora J. 1994. Effect of a high monounsaturated fatty diet enriched with avocado in NIDDM patients. *Diabetes Care*;17:311-15.
- Lu QY, Arteaga JR, Zhang Q, Huerta S, Go VL, Heber D. 2005. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. *J Nutr Biochem*. 16(1):23-30.
- Lukivskaya O, Patsenker E, Buko VU. 2007. Protective effect of ursodeoxycholic acid on liver mitochondrial function in rats with alloxan-induced diabetes: link with oxidative stress. *Life Sci* ;80(26):2397-402.
- Nishikawa T., Edelstein D., Brownlee M. 2000. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int*. 58, S26–S30.
- Raza H, Prabu SK, John A, Avadhani NG. 2011. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci*;12(5):3133-47.
- Reaven P, Grasse BJ, Miller E, Steinberg D, Witzum JL. 1993. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. *J Clin Invest*; 91(2):668-76.
- Rice-Evans C., Gordon R. 1993. Free radical–lipid interactions and their pathological consequences. *Free Radic Biol Med*. 32: 71–110.

Rolo AP, Palmeira CM. 2006. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.*;212(2):167-78.

Schwinghammer TL. 2004. Hiperlipidemia: Manejo en el paciente diabético. *Boletín Informativo del Seguro de Salud del Estado Libre Asociado de Puerto Rico.* 9: 1-4

Santos M.S., Santos D.L., Palmeira C.M., Seica R., Moreno A.J., Oliveira C.R. 2001. Brain and liver mitochondria isolated from diabetic Goto-Kakizaki rats show different susceptibility to induced oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev.* 17(3):223-30.

Terés S, Barceló-Coblijn G, Benet M, Alvarez R, Bressani R, Halver JE, Escribá PV. 2008. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proc Natl Acad Sci U S A* ;105(37):13811-6.

Wiernsperger N.F. 2003. Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes Metab.* Dec;29(6):579-85.

World Health Organization. Prevalencia de diabetes.