

32

00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS
ESENCIALES EN LA RESISTENCIA A INSULINA
ASOCIADA A LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

ROSA MARÍA OLIA RT ROS

L

DIRECTORA

DRA. MARÍA EUGENIA TORRES MÁRQUEZ

CO-DIRECTORA

DRA. JESÚS OFELIA ANGULO GUERRERO

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras,

Dra. Jesús Ofelia Angulo Guerrero

Dra. María Eugenia Torres Márquez

Por todo el apoyo académico y personal brindado a lo largo de la realización de esta tesis, así como a sus respectivos laboratorios: Bioquímica de la Nutrición, del Instituto Tecnológico de Veracruz y Bioquímica, de la Facultad de Medicina de la UNAM.

A los miembros del comité tutorial,

Dr. Edmundo Chávez Cossío

Dr. Adolfo García Sáinz

Por todo el apoyo brindado, y sus valiosos y siempre positivos comentarios en los exámenes tutoriales.

Al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", por el apoyo brindado para la realización de la primera parte de este trabajo de tesis, en especial al Dr. Edmundo Chávez Cossío, la Dra. Ma. Eugenia Torres Márquez, y la Dra. Guadalupe Baños.

Al Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP), por el apoyo financiero brindado a través de los proyectos clave 3359, 3347 y 3367.

Al Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica (COSNET), por el apoyo financiero brindado, a través del proyecto UR-612.

A quienes sin su ayuda, la realización y culminación de esta tesis hubiesen sido imposibles,

Oscar Calahorra Fuertes

Marta Ros y Lorenzo Oliart

ABSTRACT

Cardiovascular diseases (CVD) are one of the most significant diet-related health problems, representing a major cause of premature death in western countries. In Mexico the incidence and prevalence of CVD has increased over the past three decades and has become one of the leading causes of morbidity and mortality in the country. In 1997, they represented the principal cause of deaths, 25 % of all deaths in Mexico.

There is a variety of metabolic disorders that are found in individuals prone to develop cardiovascular diseases, conforming a syndrome known as metabolic cardiovascular syndrome (CVS), the X syndrome or the insulin resistance syndrome. They include dyslipidemias, elevated blood pressure, elevated plasma triglyceride levels, diabetes, and resistance to the action of insulin with concomitant hyperinsulinemia.

There are a number of epidemiological studies that support that each of the metabolic risk factors of CVS can be regulated by dietary modifications, particularly by alterations in fat intake. Cholesterol intake has received most of the attention, but since Bang and Dyerberg in 1971 reported a substantially lower incidence of coronary heart disease in Greenland Eskimos compared with Danes or other western populations, it became evident that polyunsaturated fatty acids (PUFA) may have a role in cardiovascular disease prevention.

The purpose of this study was to investigate the effects of diets rich in essential PUFA (n-3 and n-6) and a essential PUFA-deficient diet on the different parameters associated with the CVS in the sucrose induced rat model. The effect of the different diets on the fatty acid composition of adipose tissue was also investigated.

Insulin resistance experimental model was achieved by the administration of 30% sucrose in drinking water in male and female Wistar rats during 13 weeks. Sucrose fed rats showed a significant increase in systolic blood pressure, and in serum levels of insulin and triglycerides.

Once the model was established, rats were randomly assigned to four different semisynthetic diets: a high n-3 PUFA diet, with the lipid source consisting in 5% fish oil (Menhaden oil, Zapata Inc.); a high n-6 PUFA diet, the lipid source being 5% corn oil (from the local market); a PUFA deficient diet, with the lipid source consisting in 5% hydrogenated coconut oil (Coconut oil Manufacturing Company, Colima, México); and a control diet, with the lipid source consisting in 5% corn and canola oil mixture (from the local market). The four groups received drinking

water with 30% sucrose. The CTR group was kept as such, receiving control diet (5% corn and canola oil mixture). All animals were maintained in the same conditions for 4 weeks more.

The fish oil diet, high in n-3 PUFA, provoked a significant reduction in the three parameters that were found significantly elevated after sucrose feeding, returning them to levels similar to those found in control rats.

The corn oil diet, high in n-6 PUFA, provoked significant reduction in triglyceride levels, and a slight, though non-statistically-significant reduction in blood pressure levels with respect to control animals. Insulin levels remained similar to those found in sucrose fed group.

The coconut oil diet elicited unexpected effects. It lowered serum levels of insulin and triglycerides significantly, and returned blood pressure values to almost those found in control rats, being almost as effective as n-3 PUFA. These results deserves further investigation.

After diet administration, we found some alterations in the fatty acid composition of the epididymal and perirenal adipose tissue membranes that reflected diet fatty acid composition.

In conclusion, we obtained an animal model for hypertension, hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia by means of sucrose administration in drinking water (30%). The effects of sucrose on blood pressure was reverted by the fish oil and the coconut oil diets. The effects on triglycerides was reverted by all three dietary oils (fish, corn and coconut), and the effects on insulin levels, by fish and coconut oil. We suggest that dietary n-3 PUFA supply may have favorably influenced the parameters analyzed by improving insulin action as a result of the membrane lipid composition modifications exerted by this diet.

The results obtained in this work highlight the importance of conducting large epidemiological studies aimed to test the efficacy of dietary fat manipulation on cardiovascular diseases.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	4
1.1.- Resistencia a la Insulina.	5
1.1.1.- Insulina.	9
1.1.1.1.- Mecanismos de acción.	11
1.2.- Modelos Experimentales del Síndrome de Resistencia a la Insulina.	13
1.2.1.- Modelos genéticamente determinados.	13
1.2.2.- Modelos inducidos experimentalmente.	15
1.2.2.1.- Modelo inducido por sacarosa.	15
1.3.- Aspectos Terapéuticos.	17
1.3.1.- Tratamientos farmacológicos.	17
1.3.1.1.- Diuréticos.	17
1.3.1.2.- Bloqueadores de β -adrenoreceptores.	18
1.3.1.3.- Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.	18
1.3.1.4.- Antagonistas de calcio.	18
1.3.1.5.- Antagonistas α -adrenérgicos.	18
1.3.2.- Tratamiento no farmacológico.	18
1.3.2.1.- Programas de ejercicio físico.	18
1.3.2.2.- Pérdida de peso.	19
1.3.2.3.- Factores dietéticos.	19
1.4.- Lípidos de la Dieta.	20
1.4.1.- Características Bioquímicas y Físicas de los Ácidos Grasos.	21
1.4.1.1.- Longitud de la cadena de los ácidos grasos.	23
1.4.1.2.- Insaturación de la cadena hidrocarbonada.	23
1.4.2.- Ácidos Grasos Poliinsaturados Esenciales.	31
1.4.2.1.- Funciones.	32
1.4.2.2.- Regulación de la composición de AGPI de las membranas celulares.	37
1.4.2.3.- Papel de los AGPI esenciales en el desarrollo de enfermedades.	38
MATERIALES Y MÉTODOS.	43
2.1.- MATERIALES.	44

2.1.1.- Reactivos.	44
2.1.2.- Equipos.	44
2.1.3.- Animales de experimentación.	45
2.2.- MÉTODOS.	45
2.2.1.- Obtención del modelo experimental.	45
2.2.1.1.- Medición de la presión caudal.	48
2.2.1.2.- Curvas de tolerancia a la glucosa.	48
2.2.1.3.- Determinaciones séricas.	48
2.2.2.- Administración de las dietas.	50
2.2.2.1.- Lote 1.	50
2.2.2.2.- Lotes 2 y 3.	51
2.2.3.- Obtención de membranas celulares del tejido adiposo.	53
2.2.3.1.- Extracción de lípidos de las membranas celulares.	54
2.2.3.2.- Separación de las clases de fosfolípidos.	56
2.2.3.3.- Composición de ácidos grasos.	57
2.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	58
RESULTADOS	59
3.1.- Obtención del modelo experimental.	60
3.1.1.- Lote 1.	60
3.1.2.- Lote 2.	60
3.1.3.- Lote 3.	65
3.2.- Administración de las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados esenciales.	67
3.2.1.- Lote 1.	67
3.2.2.- Lote 2.	70
3.2.3.- Lote 3	74
3.3.- Efecto de la administración de las diferentes dietas sobre la composición de ácidos grasos del tejido adiposo de los grupos de ratas.	81
3.3.1. Lote 1.	81
3.3.2. Lote 2.	82
3.3.3. Lote 3.	89
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA.	106
ANEXO PUBLICACIÓN DEL TRABAJO	123

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud relacionado estrechamente con la dieta que representa actualmente la principal causa de muerte en los países occidentales. En la población mexicana existe una alta prevalencia de este tipo de problemas, los cuales ocasionaron el 25% de muertes en 1997. En los individuos con predisposición a desarrollar enfermedades cardiovasculares se han encontrado una serie de desórdenes metabólicos (dislipidemias, hipertensión, hipertrigliceridemias, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia), que conforman el llamado síndrome de resistencia a la insulina. Aunque la carga genética es importante, hay factores ambientales que juegan un papel esencial en el desarrollo de la resistencia a la insulina, como la actividad física, el tabaquismo y la dieta. Recientemente se ha puesto especial atención a la composición de macronutrientes en la dieta, particularmente al contenido y tipo de grasas contenidas en ésta

El objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de los ácidos grasos poli-insaturados esenciales dietarios sobre algunos parámetros metabólicos del síndrome de resistencia a la insulina, en un modelo experimental inducido por sacarosa en ratas.

El modelo experimental del síndrome de resistencia a la insulina fue obtenido mediante la administración de una dieta rica en sacarosa (30% en el agua de beber) a ratas Wistar hembras y machos. Después de 13 semanas de administración de la dieta, las ratas presentaron elevaciones significativas en la presión arterial y en los niveles circulantes de insulina y triglicéridos, especialmente en los dos lotes de ratas macho. En ningún caso se observaron diferencias en el peso corporal ni en los niveles circulantes de glucosa.

Una vez obtenido el modelo, las ratas fueron divididas en cinco grupos. Un control que recibió la dieta control y agua natural; y cuatro que recibieron agua endulzada con sacarosa al 30% y las siguientes dietas, respectivamente: dieta control, dieta rica en ácidos grasos poli-insaturados esenciales (AGPI) n-3 (aceite de pescado), dieta rica en ácidos grasos poli-insaturados esenciales n-6 (aceite de maíz), y una dieta deficiente en ácidos grasos poli-insaturados esenciales (aceite de coco).

La administración del aceite de pescado, rico en AGPI n-3, revirtió los efectos causados por la sacarosa, ya que provocó una disminución significativa en la presión arterial y en los niveles circulantes de insulina y triglicéridos.

El aceite de maíz, rico en AGPI n-6 favoreció únicamente la disminución de los niveles de triglicéridos, no teniendo ningún efecto significativo sobre la presión arterial ni sobre la resistencia a la insulina.

La administración del aceite de coco, deficiente en AGPI y rico en ácidos grasos saturados, tuvo un efecto similar al del aceite de pescado, disminuyendo significativamente la presión arterial y los niveles circulantes de insulina y triglicéridos.

La administración de las diferentes dietas provocó cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas celulares de los adipocitos abdominales.

En este trabajo se sugiere que los AGPI n-3 ejercen un efecto favorable sobre los parámetros del síndrome de resistencia a la insulina analizados, a través del mejoramiento en la sensibilidad a la insulina, como un mecanismo alternativo o complementario para explicar los efectos benéficos del aceite de pescado sobre las enfermedades cardiovasculares.

Los resultados de este trabajo apoyan la importancia de las estrategias farmacéuticas no farmacológicas en el tratamiento de este tipo de problemas metabólicos, y coloca al aceite de pescado, y eventualmente al aceite de coco, como una alternativa de tratamiento efectiva, ya que ejerce sus efectos a nivel del agente causal del síndrome, que es la resistencia a la acción de la insulina.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son en la actualidad una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los países occidentales. En México, su incidencia ha aumentado drásticamente en las últimas tres décadas, siendo responsables del 25% de las muertes en 1999 (Secretaría de Salud, México 2000; Zamora-González, 1996).

Además de la predisposición genética, los factores de riesgo más importantes para las ECV son: el tabaquismo, la obesidad, elevados niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL), bajos niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión, y resistencia a la insulina con la consecuente hiperinsulinemia (Hjermann, 1992; Klimes, 1997).

1.1.- Resistencia a la Insulina.

Durante muchos años se pensó que estas alteraciones metabólicas eran factores de riesgo independientes para las ECV; sin embargo, en 1988 Reaven (Reaven, 1988a) reportó que la resistencia a la acción de la insulina es un fenómeno común que juega un papel central en la patogénesis y desarrollo de varias enfermedades, como la diabetes mellitus no dependiente de insulina (NIIDM), la hipertensión, las enfermedades arterioescleróticas, y sugirió el nombre de Síndrome X para la serie de variables fisiológicas que suelen presentarse en un mismo individuo, y que son de enorme importancia en la génesis de enfermedades cardiovasculares. Las alteraciones metabólicas que conforman el Síndrome X se muestran en la Tabla 1. Reaven propuso en el mismo trabajo que la anomalía básica del síndrome es la resistencia a la acción de la insulina, y que todos los demás cambios son secundarios a ella (Reaven, 1988a).

A partir de entonces, varios trabajos han confirmado la presencia de un grupo de alteraciones metabólicas asociadas con un mal funcionamiento en la acción de la insulina, añadiendo componentes al síndrome, como la obesidad abdominal, elevadas proporciones de partículas LDL densas, microalbuminuria, disminución en el metabolismo no oxidativo de la glucosa (síntesis de glucógeno), y alteraciones en la fibrinólisis y coagulación (Hjermann, 1992). Este síndrome se ha llamado también síndrome de resistencia a la insulina,

síndrome metabólico cardiovascular, y síndrome aterotrombogénico (Hjermann, 1992).

Tabla 1.- Alteraciones Metabólicas Asociadas con el Síndrome X.

Obesidad
Diabetes no dependiente de insulina
Hipertensión
Dislipidemias
Intolerancia a la glucosa
Enfermedades cardiovasculares
Hiperinsulinemia
Resistencia a la insulina

En 1998 la Organización Mundial de la Salud determinó que los componentes del Síndrome X son:

- 1.- Hipertensión, definida como elevaciones de la presión arterial (>160 mmHg sistólica; >90 mmHg diastólica).
- 2.- Dislipidemia, definida como elevaciones en los niveles plasmáticos de triglicéridos ≥ 1.7 mmol/l) y/o bajos niveles de HDL-colesterol <0.9 mmol/l en hombres, < 1.0 mmol/l en mujeres.
- 3.- Obesidad, definida como un alto índice de masa corporal (BMI) ($\geq 30\text{kg/m}^2$) y/o una proporción cintura/cadera (WHR) elevada (>0.9 en hombres, > 0.85 en mujeres).
- 4.- Microalbuminuria (velocidad de excreción de albúmina (AER) $\geq 20 \mu\text{g/min}$).

Una persona que padezca diabetes no dependiente de insulina ó curvas de tolerancia a la glucosa anormales presenta Síndrome X si cumple con dos de los criterios anteriormente mencionados. Una persona con curvas de tolerancia a la glucosa normales presenta el Síndrome X si cumple con dos de los criterios anteriores, además de ser resistente a la acción de la insulina (Isomaa, 2001).

El síndrome de resistencia a la insulina es un síndrome multifacético que se expresa de diferentes maneras, dependiendo de la carga genética de los individuos, así como de su inducción por factores externos, como la dieta, la actividad física y/o el estrés (Despres, 1996). El defecto primario que origina a este síndrome es aún motivo de debate. Algunos autores sugieren que el síndrome inicia con un defecto celular primario en la acción de la insulina, que a su vez provoca intolerancia a la glucosa, y un aumento compensatorio en la secreción de insulina (DeFronzo, 1992). Sin embargo, ha sido sugerido también que el defecto primario se encuentra a nivel del eje sistema nervioso central-páncreas, provocando inicialmente elevaciones en la secreción de insulina por las células β del páncreas, y posteriormente el desarrollo de resistencia a la insulina (McGarry, 1998).

A pesar de que la resistencia a la insulina juega un papel central en la patogénesis de la NIDDM y las ECV, aún no están bien entendidos los defectos celulares precisos responsables de su desarrollo. Una acción inadecuada de la insulina puede ser causada por la desregulación de una o varias proteínas implicadas en el mecanismo de transducción de la señal de la insulina, así como en proteínas mediadoras de las diferentes rutas activadas por la hormona, como el metabolismo de la glucosa, la antilipólisis y la activación de lipoprotein lipasas. Algunos defectos celulares que han sido reportados en diferentes casos de resistencia a insulina son una disminución en el número de receptores a insulina, en la actividad de cinasas de residuos de tirosina, en la expresión y translocación del transportador GLUT4, en la actividad de la glucógeno sintasa, la glucocinasa, la lipoprotein lipasa, en transportadores de ácidos grasos como el CD36, y una disminución en el flujo sanguíneo (Moller, 1991, Ginsberg, 2000).

Independientemente del origen celular del síndrome, la combinación de la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia ocasiona una serie de cambios metabólicos y cardiovasculares como la dislipidemia, con elevadas concentraciones de triglicéridos y bajos niveles de HDL, y la hipertensión, obesidad y arterioesclerosis (DeFronzo, 1992).

- **Dislipidemia.**

La resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia juegan un papel muy importante en el desarrollo de la dislipidemia, caracterizada por niveles elevados de triglicéridos y VLDL, y bajas concentraciones circulantes de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Laws, 1993).

Existen dos factores que determinan las concentraciones plasmáticas de VLDL, y consecuentemente, de triglicéridos: las concentraciones circulantes de insulina, y la disponibilidad de sustrato (ácidos grasos libres y glucosa). Por lo tanto, las elevadas concentraciones circulantes de insulina promueven una mayor síntesis de VLDL por el hígado. Por otro lado, el catabolismo de las partículas VLDL en la circulación está regulado por la lipoprotein lipasa, enzima que a su vez, está controlada por las concentraciones de insulina. En los estados de resistencia a insulina, la lipoprotein lipasa es resistente a la acción de la insulina. La combinación del incremento en la síntesis de VLDL por parte del hígado (secundario a la hiperinsulinemia), y la baja remoción de las VLDL (secundario a la acción disminuida de la insulina sobre la lipoprotein lipasa), provoca una elevación en las concentraciones plasmáticas de VLDL, y por consiguiente, de triglicéridos.

Por otro lado, la acción disminuida de la insulina sobre la lipoprotein lipasa contribuye también a la disminución de los niveles plasmáticos de las HDL. Las partículas maduras de HDL son formadas por la transferencia de lípidos y apoproteínas de las VLDL, cuando éstas son hidrolizadas por la lipoprotein lipasa. Por lo tanto, al encontrarse disminuida la degradación de las VLDL, la síntesis de HDL lo está también. Además, la degradación de HDL es estimulada por las elevadas concentraciones de insulina (Hjermann, 1992; DeFronzo, 1997).

• **Hipertensión.**

Estudios epidemiológicos, fisiológicos y bioquímicos (Laws, 1993; DeFronzo, 1997; Berne, 1991) demuestran una clara asociación entre la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia y el desarrollo de hipertensión en patologías como la obesidad, la NIDDM y la hipertensión esencial.

La relación de la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia con la hipertensión ha sido también demostrada en estudios con modelos animales, ya que estrategias experimentales encaminadas a obtener animales de experimentación resistentes a insulina e hiperinsulinémicos, han resultado también en elevaciones de la presión arterial (Berne, 1991). A su vez, la administración de inhibidores de la secreción de insulina en estos modelos y en humanos, ha prevenido el desarrollo de hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia y de la hipertensión, sugiriendo claramente que las elevadas concentraciones de insulina son las responsables de la elevación en la presión arterial (Laws, 1993).

Los mecanismos por medio de los cuales la hiperinsulinemia puede elevar la presión arterial son (DeFronzo, 1997):

- Retención renal de sodio, por medio de un incremento en la reabsorción de Na^+ /agua a nivel de los segmentos distales y proximales del riñón.
- Estimulación del sistema nervioso simpático, provocando un efecto vasoconstrictor en los vasos sanguíneos.
- Alteración de la composición celular de electrolitos. La insulina regula una serie de sistemas de transporte de iones a nivel de membrana (estimulación de la bomba Na^+/H^+ , y disminución de la ATPasa Na^+/K^+ y de la ATPasa de Ca^{2+} (Prichard, 1992)) que contribuyen al mantenimiento de las concentraciones intracelulares de electrolitos. Un aumento en las concentraciones intracelulares de sodio y calcio provocan un incremento en la sensibilidad de las células del músculo liso vascular a los efectos presores de la norepinefrina, la angiotensina y el cloruro de sodio aumentando de esta manera la presión arterial.
- Estimulación del crecimiento celular. La estimulación de la bomba Na^+/H^+ por la insulina provoca un incremento en la secreción de factores de crecimiento, que promueven el crecimiento y la proliferación celular, lo que a su vez disminuye el lumen vascular y resulta en un aumento en la presión sanguínea (Berne, 1991).

1.1.1.- Insulina.

El páncreas juega un papel muy importante en el control del metabolismo energético, y más específicamente, en la homeostasis de la glucosa. El mantenimiento de las concentraciones circulantes de glucosa dentro de un rango limitado resulta del balance entre su entrada al torrente sanguíneo del intestino proveniente de la dieta o de la glucogenolisis del hígado, y de su remoción para el consumo o el almacenamiento de la misma. Varios factores neurológicos y hormonales controlan este equilibrio, siendo los más importantes los producidos en los islotes del páncreas. Los islotes de Langerhans representan del 1-1.5% de la masa pancreática y contienen por lo menos 4 tipos de células endócrinas bien definidas: las células β que producen insulina, las células α que sintetizan glucagon, las células delta, que producen somatostatina, y las células PP, que producen el polipéptido pancreático (Cheatham, 1995).

La insulina y el glucagon representan las dos hormonas principales que intervienen, de forma antagonista, en el control del metabolismo de la glucosa. La secreción de insulina es estimulada por los nutrientes (glucosa y

aminoácidos) para promover su almacenamiento en los órganos blanco (hígado, músculo y tejido adiposo, principalmente), mientras que la secreción del glucagón es inhibida. En el estado de ayuno, se libera el glucagón para activar la glucogenólisis y la gluconeogénesis, se inhibe la secreción de insulina, y se mantiene una glicemia estable a pesar de la falta de glucosa exógena.

La insulina, descubierta por Banting y Best en 1922, fue la primera proteína de la que se conoció su estructura primaria detallada. Es una proteína de 6000 daltones que consiste de dos cadenas polipeptídicas cortas unidas por dos puentes disulfuro. En la mayoría de las especies la cadena A, que contiene un puente disulfuro intracadena, consta de 21 aminoácidos, y la cadena B está formada por 30 aminoácidos. Esta hormona se deriva biosintéticamente de su precursor, la proinsulina, que consiste de las cadenas A y B unidas por un péptido conector, llamado péptido C. Sin embargo, el producto inicial de la traducción del gen de la insulina es la preproinsulina, que contiene un péptido señal N-terminal, o prepéptido, de 24 aminoácidos (Steiner, 1985). La transformación de preproinsulina a proinsulina ocurre en el retículo endoplásmico rugoso, casi paralelamente con la traducción, con la remoción del péptido señal realizada por una proteasa específica. Después es transportada al aparato de Golgi en microvesículas, donde es empacada en gránulos de secreción, dentro de los cuales ocurre una continua conversión de la proinsulina a insulina, con la liberación del péptido C por la acción de las enzimas prohormona convertasas PC2 y PC3, y por la carboxipeptidasa H (Steiner, 1996).

La insulina es sintetizada y secretada en respuesta a varios estímulos, siendo la glucosa el principal secretagogo. El metabolismo de la glucosa estimula la liberación de los gránulos de secreción y actúa a varios niveles para aumentar la síntesis de la insulina, incrementando la transcripción y procesamiento del preRNAm, disminuyendo la velocidad de degradación del RNAm, y estimulando la traducción y procesamiento de la proinsulina a insulina (Sharma, 1995; Wang, 1997).

Se ha sugerido que la fosforilación de la glucosa por la glucocinasa funciona como el sensor de la glucosa en las células β , ajustando el flujo metabólico a través de la glucólisis a las concentraciones extracelulares de glucosa (Efendic, 1991). Un aumento en la relación ATP/ADP en el citoplasma, como resultado del metabolismo de la glucosa ocasiona el cierre del canal rectificador de potasio dependiente de ATP, lo que induce la despolarización de la membrana plasmática y la consecuente entrada de calcio, permitiendo así que la concentración de calcio citosólico se eleve y se estimule la fusión de las vesículas que contienen a la insulina madura que se encuentran atracasadas

cerca de la membrana celular. Esto resulta en la secreción de la insulina y el péptido C (Prentki, 1987).

1.1.1.1.- Mecanismos de acción.

Una de las principales funciones de la insulina es mantener constantes las concentraciones circulantes de glucosa, así como favorecer la conversión del exceso de glucosa a dos formas de almacenamiento: glucógeno en el hígado y el músculo, y triacilglicerol en el tejido adiposo.

Cuando las concentraciones circulantes de glucosa se elevan, la insulina estimula la absorción de la glucosa en el músculo, donde es convertida a glucosa-6-fosfato. La insulina activa también a la glucógeno sintasa e inactiva a la glucógeno fosforilasa, de manera que gran parte de la glucosa es transformada en glucógeno. Además, la insulina estimula también la oxidación de la glucosa-6-fosfato a piruvato a través de la glucólisis, y la oxidación del piruvato a acetil-CoA. La acetil-CoA que no es oxidada, se utiliza para la síntesis de ácidos grasos en el hígado, los cuales son transportados al tejido adiposo como triacilglicerol en las lipoproteínas plasmáticas de muy baja densidad (VLDL). La insulina estimula a su vez la síntesis de triacilglicerol en los adipocitos, utilizando los ácidos grasos liberados de las VLDL.

Además de sus efectos primarios en la homeostasis de la glucosa, la insulina es una hormona que participa en la regulación de otras vías metabólicas, como la regulación del transporte de iones y aminoácidos, el metabolismo de los lípidos, la síntesis de glucógeno, la transcripción de genes específicos, la síntesis y degradación proteica, y la síntesis de DNA. La insulina juega un papel clave en el almacenamiento de la energía y en el crecimiento y diferenciación celular, a través de la alteración de la actividad de enzimas preexistentes, y por modificaciones en la expresión de determinados genes (Cheatham, 1995).

La transmisión de las señales activadas por la insulina se inicia por la unión de la insulina a su receptor específico de membrana. Este receptor se expresa en casi todos los tejidos de los mamíferos, aunque su número varía dependiendo del tejido; el mayor número, de 300,000 receptores/célula, se encuentra en los principales tejidos blanco de la insulina, como el tejido adiposo y el hígado.

El receptor está compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β unidas covalentemente por puentes disulfuro, formando un $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrámero. La subunidad α es extracelular y contiene el dominio de unión a la insulina, mientras que la subunidad β está constituida por una región extracelular pequeña, una región transmembranal, y una región intracelular que posee

actividad de tirosina cinasa. La subunidad α es también una subunidad reguladora, ya que, en ausencia de insulina, la subunidad α mantiene una restricción conformacional en la subunidad β que inhibe la actividad cinasa constitutiva de la misma (Cheatham, 1995).

La unión de la insulina al receptor promueve la autofosforilación de la subunidad β y la rápida fosforilación de sustratos intracelulares, iniciando una cascada de fosforilaciones/desfosforilaciones, con diversas consecuencias fisiológicas. El principal sustrato del receptor activado es el denominado "sustrato inmediato del receptor" (IRS-1), que es una proteína citosólica de alto peso molecular (165-190 kDa) que contiene 20 sitios potenciales de fosforilación en tirosina y más de 40 sitios de fosforilación potencial en serina/treonina. No posee ninguna actividad catalítica, pero su fosforilación en tirosina induce su asociación con varias proteínas que contienen el dominio SH2, actuando como una proteína de anclaje. Hasta la fecha, se ha descrito que la proteína IRS-1 se asocia con la subunidad p85 reguladora de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PI3-cinasa), con la fosfotirosin fosfatasa SHPTP2 (Syp) y dos moléculas adaptadoras, NCK y GRB-2. Se han encontrado también otros sustratos del receptor de la insulina, que representan mecanismos alternativos, o tal vez redundantes, de la acción de la insulina. Tal es el caso de la proteína Shc, la 422(ap2), y GAP, pero sus papeles exactos en la transducción de la señal de insulina aun no están definidos (Cheatham, 1995).

La activación de GRB-2 estimula al sistema de señales p21^{ras} el cual promueve una cascada de fosforilaciones que regulan la actividad de varias cinasas (Raf-1 cinasa, MAPK cinasa (MAPKK), MAPK y pp90rks) afectando finalmente el crecimiento celular y el metabolismo. La proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) es intermediaria en la activación de la proteína fosfatasa 1, que cataliza la desfosforilación y subsecuente activación de la glucógeno sintasa y la inhibición de la fosforilasa cinasa, lo que activa a la síntesis de glucógeno (Cheatham, 1995).

La asociación de IRS-1 con la subunidad p85 reguladora de la PI 3-cinasa provoca un aumento en la actividad catalítica de la subunidad de 110 kDa de la enzima. La PI 3-cinasa activada fosforila al fosfatidilinositol produciendo fosfoinosítidos D-3-fosforilados. Se ha demostrado que PI 3-cinasa participa de manera importante en la traslocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana, en la lipogénesis, en la síntesis de DNA y el crecimiento celular, y en la activación de la ruta pp70^{S6k}, importante en el metabolismo del glucógeno (Cheatham, 1994).

La proteína Syp es una fosfatasa de residuos de tirosina, que se encuentra ampliamente distribuida en tejidos de mamíferos, y ha sido implicada en la mitogénesis inducida por insulina, a través de la activación de la proteína MAP cinasa. Nck es una proteína adaptadora de 47 kDa que juega un papel importante en la proliferación celular. El producto del protooncogene Shc es también fosforilado en residuos de tirosina en respuesta a la insulina, lo cual induce su asociación con GRB-2, activando también al sistema de señales p21ras (Cheatham, 1995).

Uno de los efectos importantes de la acción de la insulina es el de la regulación de la expresión génica, con efectos positivos y negativos en la expresión de genes específicos. De hecho, se han descrito más efectos de la insulina sobre la expresión de enzimas (más de 100 genes) que sobre su actividad. La insulina actúa a nivel de la transcripción, la estabilidad del RNAm y la traducción. Los genes regulados por la insulina poseen secuencias de DNA en cis en la región 5' adyacente al gen llamadas IRE (insulin responsive elements), que interactúan con factores trans específicos (O'Brien, 1996).

Entre los genes regulados por la insulina, se encuentran algunos de los que codifican para enzimas claves de regulación de vías metabólicas dependientes de insulina, como en la lipogénesis, a través de las enzimas acetil CoA carboxilasa y la ácido grasos sintetasa. Se encuentran también genes que codifican para factores de transcripción y hormonas, las cuales son el blanco primario por el cual la insulina estimula la transcripción de otras proteínas, como la enzima málica, la hormona de crecimiento, los receptores de estrógenos y glucocorticoides, el receptor de insulina, y el IRS-1 (O'Brien, 1996).

1.2.- Modelos Experimentales del Síndrome de Resistencia a la Insulina.

Para el estudio del síndrome de resistencia a la insulina se han utilizado diversos modelos. Algunos utilizan cepas genéticamente determinadas, mientras en otros se induce el síndrome de manera experimental.

1.2.1.- Modelos genéticamente determinados.

Entre los modelos genéticamente determinados, el más ampliamente utilizado es el de ratas hipertensas espontáneas (SHR, spontaneously hypertensive rat), donde los animales presentan hiperglicemia, intolerancia a la glucosa,

hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia y resistencia a la insulina. También se ha utilizado a las ratas hipertriglicéridémicas hereditarias (hHTg), que son además resistentes a la insulina e hipertensas (Klimes, 1997).

Otros modelos genéticos de ratas que presentan hipertensión, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia son las ratas Dahl sensibles a sal (DS) (Dahl, 1962), y la cepa de ratas hipertensas Milan (MSH), que presentan elevaciones en los niveles plasmáticos de insulina, triglicéridos y colesterol y desarrollan hipertensión por un defecto en la reabsorción renal de Na^+ (Bianchi, 1984).

La rata obesa Zucker (OZR) es un modelo de obesidad, resistencia a la insulina e hiperinsulinemia. Se distinguen por su hiperlipidemia, que incluye a todas las clases de lípidos, especialmente a las VLDL. Se ha utilizado también para estudios de hipertensión y su relación con la resistencia a la insulina, aunque los resultados no han sido muy consistentes (Klimes, 1997).

Existen también modelos experimentales de ratas diabéticas, como las ratas SHHF/Mcc-fa^{cp} (abreviado SHHF), que es un modelo genético relativamente nuevo de diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI), obesidad, hipertensión y fallo cardíaco (McCune, 1995). En este modelo, los machos obesos presentan una franca DMNDI, mientras que las hembras obesas tienen concentraciones normales de glucosa en ayuno, pero curvas de tolerancia a la glucosa anormales.

De las cepas de ratas que desarrollan espontáneamente intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, la mayoría son diabéticas dependientes de insulina, u obesas diabéticas no dependientes de insulina. Existen muy pocos modelos para el estudio de síndromes de DMNDI sin obesidad. Un ejemplo de éstos es la cepa no obesa BHE/cdb, caracterizada por intolerancia a la glucosa, hipertrigliceridemia en ayuno, y anormalidades en el metabolismo hepático, además de presentar numerosos cambios en el metabolismo de la glucosa, nefropatía diabética e hipertensión (Berdanier, 1995).

Otro modelo de ratas no obesas es el grupo de ratas con hipertrigliceridemia hereditaria (hHTg). Además de la hipertrigliceridemia, presentan intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, y presión arterial elevada (Vrána, 1990). Estudios realizados en este modelo han demostrado una correlación positiva entre la presión sanguínea y los niveles de triglicéridos, y una correlación negativa entre estos últimos y la acción de insulina *in vivo* (Kunes, 1994). Este y otros trabajos han señalado la asociación entre la resistencia a la insulina y la hipertensión en las ratas hHTg.

El modelo WOK.1W es también un modelo de ratas no obesas que presentan el síndrome de resistencia a la insulina, que fue obtenido por medio de entrecruzamiento entre cepas Wistar susceptibles a diabetes. Presentan hipertrigliceridemia en ayuno, hiperinsulinemia, tolerancia a la glucosa alterada e hipertensión moderada. En este modelo, los machos presentan desarreglos más severos en los parámetros metabólicos y en la presión arterial que las hembras (Kovács, 1997).

1.2.2.- Modelos inducidos experimentalmente.

Los modelos obtenidos experimentalmente se han generado a través de estímulos nutricionales, como incrementos en la ingesta de carbohidratos y de grasas. Se ha asociado a la ingesta de dietas ricas en grasas, particularmente de grasas saturadas (Storlien, 1993) o de ácidos grasos de la familia n-6, con el desarrollo de resistencia a la insulina, elevaciones en las concentraciones circulantes de triglicéridos, hiperinsulinemia e hipertensión (Storlien, 1991; Kaufman, 1994).

1.2.2.1.- Modelo inducido por sacarosa.

Un modelo animal de resistencia a insulina asociada con hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensión que ha sido ampliamente utilizado es el generado por la administración de fructosa o sacarosa en ratas (Ahrens, 1974; Zavaroni, 1980; Tobey, 1982; Vrána, 1983; Wright, 1983; Hwang, 1987; Storlien, 1988; Thorburn, 1989; Reaven, 1991; Klimes, 1993; Bernal, 1995; Baños, 1997; Pérez, 1999; Carvajal, 1999; El Hafidi, 2000; Bezerra, 2000; El Hafidi, 2001). La sacarosa o fructosa ha sido administrada mezclada con la dieta en proporciones que van del 32 al 66%, o adicionada al agua de beber al 30%.

En estas ratas se han reportado alteraciones metabólicas similares a las encontradas en pacientes con el síndrome de resistencia a la insulina, como la hipertensión, la dislipidemia, la hiperinsulinemia, el aumento en la grasa visceral, y la resistencia a la acción de la insulina, y han sido modificadas por las mismas manipulaciones que las llevadas a cabo en humanos, como por ejemplo, la disminución de la presión y las concentraciones plasmáticas de insulina y triglicéridos con el ejercicio o con la infusión de somatostatina (Reaven, 1991).

Debido a las similitudes entre las anormalidades encontradas en ratas alimentadas con fructosa o sacarosa y las presentes en pacientes con

resistencia a la insulina, este modelo animal ha sido considerado como representativo del Síndrome X y se ha utilizado para el estudio de la naturaleza del síndrome clínico. En diversos estudios se ha descrito que este en modelo las ratas presentan además intolerancia a la glucosa y disminución de la síntesis de glucógeno hepático (Tobey, 1982) y en la capacidad de la insulina de suprimir la producción hepática de glucosa (Thorburn, 1989), una disminución en la absorción de glucosa inducida por insulina (Wright, 1983), una sobreproducción de VLDL-TG (Bernal, 1995), disfunción endotelial en aorta y arterias mesentéricas, así como aumentos en la lipoperoxidación y en la permeabilidad de las membranas celulares (El Hafidi, 1999), alteraciones en la composición de ácidos grasos de las membranas de eritrocitos (Pérez, 1999), y del plasma (El Hafidi, 2000), y una disminución en la fosforilación del receptor de insulina, del IRS-1 y de su asociación con la PI-3-kinasa y con el SHP2 en hígado y músculo (Bezerra, 2000).

Aunque no se conocen aún los mecanismos por los cuales la alimentación con fructosa o sacarosa producen las alteraciones metabólicas mencionadas anteriormente, se ha sugerido que la hipertrigliceridemia inducida por esta alimentación es resultado de una sobreproducción de VLDL-TG, ya que la fructosa es utilizada en mayor grado para la síntesis de ácidos grasos y TG que la glucosa (Vrána, 1986), y la actividad de las principales enzimas lipogénicas, reguladas por insulina (acetil coenzima A carboxilasa y enzima málica) se encuentra elevada después de la ingesta de dietas ricas en sacarosa (Seboková, 1997).

Por otro lado, las elevaciones en la presión arterial, tanto en ratas normales como en ratas hipertensas espontáneas (Ahrens, 1974; Preuss, 1980; Fournier, 1986; Young, 1981) producidas por la alimentación con sacarosa o fructosa parece estar íntimamente relacionada con la presencia de hiperinsulinemia. Las elevaciones en la presión arterial sólo se observan cuando hay también incrementos en los niveles circulantes de insulina. La administración de ciertos compuestos, como la somatostatina, que reducen los niveles de insulina, previenen la elevación en la presión arterial provocada por la sacarosa (Reaven, 1989). Por otro lado, el ejercicio, que incrementa la sensibilidad a la insulina y reduce la hiperinsulinemia inducida por fructosa (Zavaroni, 1981), también atenúa el incremento en la presión arterial observado en ratas alimentadas con fructosa (Reaven, 1988b).

Además, debido a que la ingesta de sacarosa estimula al sistema nervioso simpático (Fournier, 1986; Young, 1977), se ha también sugerido que el incremento en la presión arterial esté provocado por efectos mediados por el

sistema nervioso simpático en diferentes tejidos, como en vasos sanguíneos, corazón, y riñones (Kopin, 1981; Krieger, 1988).

El desarrollo de la resistencia a la insulina en este modelo se ha asociado con la disminución en la capacidad de la insulina de suprimir la producción hepática y la absorción periférica de glucosa, así como con alteraciones en la actividad de enzimas que controlan el metabolismo de carbohidratos, a través posiblemente de la disminución en los niveles de fosforilación del receptor de insulina, del IRS-1 y de su asociación con la PI-3-kinasa y con el SHP2 en hígado y músculo, reduciendo así la actividad de enzimas clave en síntesis de glucógeno, glucogenolisis, y gluconeogénesis, y el transporte del acarreador de glucosa de membrana GLUT4, como lo encontrado por Bezerra y cols (2000). Estos cambios podrían asociarse con alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos, que provocan cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana y por lo tanto en la viscosidad y en la actividad de las proteínas asociadas a ellas, como lo reportado por Pérez y cols. (1999) y El Hafidi y cols.(2000).

1.3.- Aspectos Terapéuticos.

Debido a que el síndrome de resistencia a la insulina es un padecimiento íntimamente relacionado con los hábitos dietéticos y de actividad física, se han utilizado diferentes mecanismos de control no farmacológico, como el ejercicio, la disminución de peso, y la ingesta de dietas bajas en grasas y altas en carbohidratos y fibra, que han demostrado ser efectivas en el mejoramiento de la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina, y en la disminución de la presión arterial y la dislipidemia en individuos obesos, diabéticos y normales (Sharma, 1992). Se han utilizado también tratamientos farmacológicos que tienen diferentes efectos sobre la resistencia a la insulina.

1.3.1.- Tratamientos farmacológicos.

Los tratamientos farmacológicos más comúnmente utilizados son los siguientes:

1.3.1.1.- Diuréticos.

Los diuréticos, como las tiazidas, son utilizados en el tratamiento de la hipertensión, sin embargo, se ha reportado que provocan el deterioro de la tolerancia a la glucosa y un incremento en la resistencia a la insulina (Ramsay, 1992; Swislocki, 1989).

1.3.1.2.- Bloqueadores de β -adrenoreceptores.

Este tipo de drogas (propranolol, timolol, atenolol, metoprolol), administradas a pacientes hipertensos, agravan la resistencia a la insulina, y provocan un deterioro en la tolerancia a la glucosa, hiperglicemia y glicosuria (Pollare, 1989; Sawicki, 1992).

1.3.1.3.- Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

Se ha reportado que este tipo de inhibidores, como el captopril y el enalapril, incrementan la sensibilidad a la insulina en pacientes con hipertensión esencial y diabéticos hipertensos (Kodama, 1990; Donnelly, 1992).

1.3.1.4.- Antagonistas de calcio.

Estos medicamentos, como el diltiazem, la nitrendipina, la nifedipina y la nifedipina, parecen tener un efecto benéfico sobre la sensibilidad a insulina cuando son usados crónicamente (Nilsson, 1990).

1.3.1.5.- Antagonistas α -adrenérgicos.

Existen evidencias de que tanto el prazosin, como en doxazosin reducen los niveles circulantes de glucosa y mejoran la sensibilidad a la insulina (Stein, 1991).

1.3.2.- Tratamiento no farmacológico.

El tratamiento no farmacológico se ha basado en los siguientes mecanismos:

1.3.2.1.- Programas de ejercicio físico.

Ha sido demostrado en animales de experimentación y en humanos, que el ejercicio físico regular mejora la sensibilidad a la insulina, observándose también disminuciones en la presión arterial y en los niveles circulantes de triglicéridos (Prichard, 1992; Sharma, 1992). Se ha sugerido que los mecanismos celulares responsables de este efecto son un aumento en el número de receptores de insulina, un incremento en la actividad de la glucógeno sintasa, y elevaciones en los niveles del transportador de glucosa muscular dependiente de insulina (Glut4) (Pedersen, 1980; Houmard, 1991). Se ha observado también una disminución en la secreción de insulina en respuesta a la administración de glucosa, de arginina o de grasas (King, 1990). El efecto

positivo del entrenamiento físico en la sensibilidad a insulina es de corta duración, ya que se revierte cuando se suspende el ejercicio (Sharma, 1992).

1.3.2.2.- Pérdida de peso.

Diversos estudios han demostrado que la pérdida de peso mejora la tolerancia a la glucosa, y revierte la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia en individuos obesos, aunque los beneficios han sido relacionados más con la disminución en la ingesta de calorías que con la pérdida de peso resultante (Sharma, 1992). Los mecanismos responsables del mejoramiento en la sensibilidad a insulina que se han propuesto son un aumento en la disponibilidad de los receptores a insulina (Halverson, 1982), un aumento en la actividad cinasa del receptor en individuos diabéticos (Freidenberg, 1988), y reducciones tanto en la actividad del sistema nervioso simpático como en los niveles de ácidos grasos circulantes (Sowers, 1982; Hale, 1988).

1.3.2.3.- Factores dietéticos.

Existen evidencias que indican que cambios en la composición de la dieta tienen efectos significativos en la tolerancia a la glucosa y en la sensibilidad a insulina en individuos obesos, diabéticos y normales. Los factores dietarios que han sido modificados son los siguientes:

- Carbohidratos.- Se ha demostrado que un aumento en la ingesta de carbohidratos complejos tiene efectos positivos sobre la tolerancia a la glucosa en individuos diabéticos y normales, aunque ha quedado por definir si el responsable de tal efecto es el cambio en las concentraciones de otros nutrientes, como grasas o fibra, en las dietas de prueba (Chen, 1988; Fukagawa, 1990), o a la complejidad, origen y estructura de los carbohidratos utilizados (Sharma, 1992).
- Grasas.- Existen controversias en cuanto al efecto de las grasas de la dieta sobre la tolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina y la dislipidemia. Por un lado existen trabajos en donde se reporta que en ratas, la administración de dietas ricas en grasas provoca una reducción en la sensibilidad a insulina, a través de diversos mecanismos, como la regulación baja del receptor de insulina en músculo, una reducción en la expresión del transportador de glucosa Glut4 en adipocitos, y una reducción en la utilización oxidativa de la glucosa (Sharma, 1992; Storlien, 1996).

Por otro lado, también se ha reportado que la disminución de grasas de la dieta en individuos hipertensos, hipertriglicéridémicos y normales no ha tenido ningún

efecto en los niveles plasmáticos de glucosa, insulina y lípidos (Sharma, 1992; Prichard, 1992). Aparentemente, el efecto de la ingesta de grasas depende de la composición de ácidos grasos de la grasa administrada, y ello explica las diferencias encontradas en los diferentes trabajos (Storlien, 1996). Concretamente, se han encontrado diferencias en los resultados obtenidos dependiendo del tipo de ácidos grasos administrados en la dieta. Dietas ricas en ácidos grasos saturados y poliinsaturados de la familia n-6 han provocado resistencia a la insulina en animales de experimentación, mientras que la ingesta simultánea de ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 ha revertido el efecto sobre la sensibilidad a la insulina (Storlien, 1987; Storlien, 1991).

- **Fibra.-** Ha sido reportado que dietas ricas en fibra mejoran la sensibilidad a insulina y disminuyen los niveles circulantes de glucosa, de colesterol y de triglicéridos en individuos diabéticos y normales. Sin embargo, estos efectos sólo se han observado en dietas que combinan altos contenidos de fibra con altos contenidos de carbohidratos (Sharma, 1992). El efecto principal del aumento en la fibra dietaria en la tolerancia a la glucosa se debe probablemente a efectos intestinales, como un vaciado gástrico retardado, aumentos en el tiempo de tránsito intestinal, o la modificación en la secreción y acción de enzimas digestivas, que conducen finalmente a una menor velocidad de absorción de la glucosa (Sharma, 1992; Anderson, 1985).
- **Proteína.-** No existen muchos trabajos acerca del efecto de la variación en el contenido de proteína dietaria sobre la resistencia a la insulina. Sin embargo, se ha reportado que una disminución en la ingesta de proteínas aumenta la sensibilidad a insulina en individuos diabéticos y normales, debido probablemente a una disminución en los niveles de toxinas urémicas derivadas de las proteínas (Sharma, 1992; Aparicio, 1989).
- **Sales.-** Aunque no se han observado efectos sobre la sensibilidad a insulina, se ha reportado que la restricción en la ingesta de sal atenúa la respuesta a un bolo de glucosa de los niveles de glucosa e insulina, y se ha sugerido que el efecto de la sal dietaria sobre el metabolismo de carbohidratos sea a nivel de la absorción de los mismos en el intestino (Sharma, 1992; Prichard, 1992).

1.4.- Lípidos de la Dieta.

Los lípidos contenidos en los alimentos se agrupan en aceites y en grasas, de origen vegetal o animal. La diferencia entre aceites y grasas depende del punto de fusión; las primeras son fluidas a temperatura ambiente, mientras que las segundas se encuentran en estado sólido.

Los lípidos contenidos en los alimentos de origen vegetal o animal se encuentran compuestos principalmente por triacilglicéridos. Estos representan un 95% de las grasas o aceites aislados de granos, frutas o tejidos animales sin purificaciones posteriores. Después de la refinación, esta proporción puede llegar hasta el 98% o más.

Los triacilglicéridos resultan de la combinación de una molécula de glicerol y tres moléculas de ácidos grasos. Cada molécula de ácido graso ($R-COOH$) posee una función ácida ($-COOH$) que se puede esterificar con una de las tres funciones alcohol ($-OH$) del glicerol para formar un triéster (triacilglicérido) (Figura 1). Los ácidos grasos son, por lo tanto, los principales constituyentes de los lípidos alimentarios.

Los tres ácidos grasos unidos al glicerol pueden ser iguales (triglicérido simple) o pueden ser diferentes (triglicérido mezclado). El grupo hidroxilo específico al que se une el ácido graso se indica por numerando a los tres carbonos del glicerol, siendo el carbono superior el C-1 o sn-1, el carbono intermedio el C-2 o sn-2, y el carbono inferior el C-3 o sn-3.

A temperatura ambiente los triglicéridos ocurren como grasas o aceites, dependiendo de la estructura de los ácidos grasos que los componen. Los que contienen una alta proporción de ácidos grasos de cadena corta o de insaturados tienden a ser líquidos, mientras que los saturados de cadena más larga se encuentran como sólidos a temperatura ambiente.

1.4.1.- Características Bioquímicas y Físicas de los Ácidos Grasos.

Todos los ácidos grasos están constituidos por una cadena hidrocarbonada que presenta:

- Un grupo metilo ($-CH_3$) en uno de sus extremos.
- Un grupo carboxilo ($-COOH$) en el otro extremo, quien le confiere el carácter ácido al ácido graso.
- Entre los dos extremos, un número variable de átomos de carbono con enlaces saturados o no saturados, dependiendo del tipo de ácido graso (Figura 2).

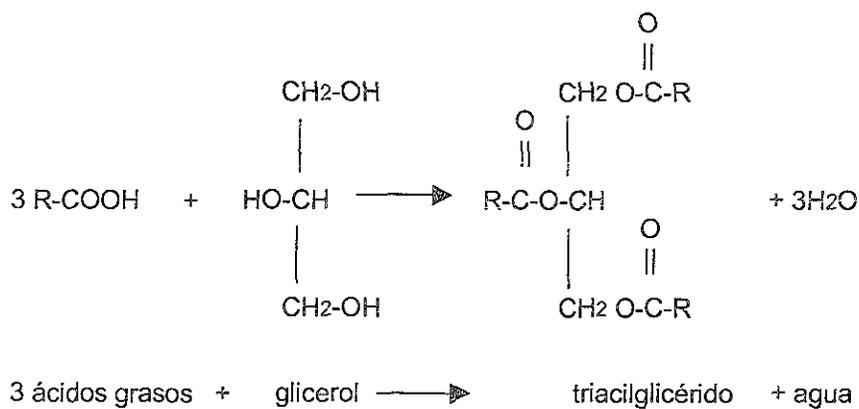


Figura 1.- Estructura Química de los Triacilglicéridos.

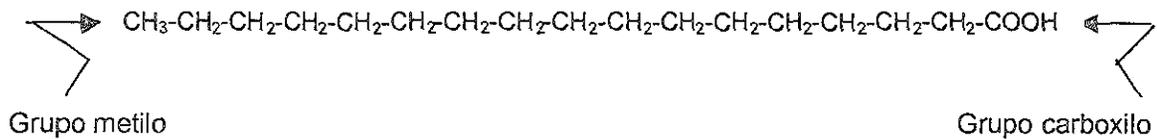


Figura 2. Ejemplo de Ácido Graso.

1.4.1.1.- Longitud de la cadena de los ácidos grasos.

Por longitud de la cadena se entiende el número total de átomos de carbono (incluyendo a los del grupo metilo y carboxilo) presentes en el ácido graso. De acuerdo a esto se clasifican en:

- ácidos grasos de cadena corta, los que poseen de 4 a 7 átomos de carbono.
- ácidos grasos de cadena mediana, los que contienen de 8 a 12 átomos de carbono.
- ácidos grasos de cadena larga, los que poseen entre 14 y 18 átomos de carbono.
- ácidos grasos de cadena muy larga, los que contienen 20 átomos de carbono o más.

Esta clasificación agrupa las diferencias concernientes a las características físicas, metabólicas y funcionales de los ácidos grasos, ya que los ácidos grasos alimentarios de cadena corta y mediana se absorben directamente a la sangre durante la digestión, mientras que los de cadena larga y muy larga pasan primero por la vía linfática. Esta segregación se debe a las diferencias de solubilidad en agua de los ácidos grasos dependiendo de la longitud de la cadena. Por otro lado, los ácidos grasos alimentarios de cadenas cortas y medianas constituyen para el organismo una fuente de energía únicamente, mientras que los de cadenas largas y muy largas tienen también un papel estructural dentro de las membranas celulares, y poseen funciones celulares específicas.

Independientemente de la longitud de la cadena, los ácidos grasos alimentarios, en su mayoría, tienen una configuración D y un número par de átomos de carbono.

1.4.1.2.- Insaturación de la cadena hidrocarbonada.

a) Ácidos grasos saturados (AGS).

En los AGS, cada átomo de carbono tiene sus cuatro valencias formando enlaces con otros átomos de carbono, de hidrógeno, o de oxígeno (en el grupo

carboxilo) (Figura 3A). Los principales ácidos grasos saturados y su nomenclatura se encuentran en la Tabla 2.

b) Ácidos grasos moninsaturados (AGMI).

En este tipo de ácidos grasos, dos átomos de carbono adyacentes en la cadena hidrocarbonada tienen una valencia libre, no saturada, de manera que los dos átomos de carbono se encuentran unidos por una doble ligadura (Figura 3B). La nomenclatura de los AGMI depende de la posición de la doble ligadura (Tabla 2). En la mayoría de los AGMI contenidos en los alimentos, tanto de origen vegetal como animal, la doble ligadura está localizada entre los carbonos 9 y 10, contados a partir del grupo carboxilo, por lo que se dice que poseen una doble ligadura en posición 9. Debido a la biohidrogenación enzimática que ocurre en el rumen de los rumiantes, o por la hidrogenación parcial no enzimática a la que se someten ciertos lípidos en la industria, la doble ligadura se desplaza de la posición 9 a los extremos metilo y carboxilo de la cadena hidrocarbonada. De esta manera, para una misma longitud de cadena se encuentran diversos ácidos grasos que difieren entre ellos por la posición de la doble ligadura (isómeros de posición).

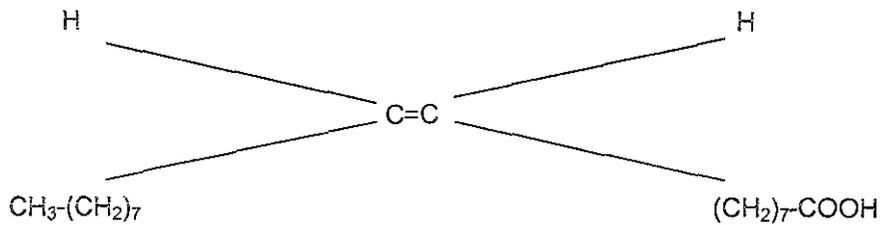
Las cadenas carbonadas situadas a ambos extremos de la doble ligadura pueden situarse en un mismo lado con respecto a la doble ligadura, o posición cis, o en planos opuestos, o posición trans (Figura 4). A excepción de los lípidos de rumiantes y de aquellos que han sido sometidos a hidrogenación parcial de origen industrial, en los lípidos alimentarios no se encuentran los isómeros trans; sólo se encuentran isómeros cis.

Tabla 2.- Nomenclatura de los Principales Ácidos Grasos.

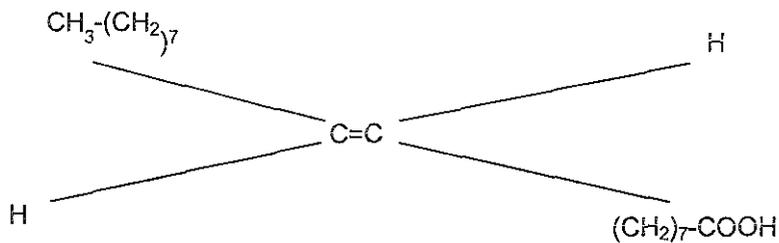
Número de átomos de C	Número de dobles ligaduras	Nombre común	Denominación química ^a	Fórmula simplificada ^b
4	0	Butírico	Butanoico	4:0
6	0	Caproico	Hexanoico	6:0
8	0	Caprílico	Octanoico	8:0
10	0	Cáprico	Decanoico	10:0
12	0	Láurico	Dodecanoico	12:0
14	0	Mirístico	Tetradecanoico	14:0
16	0	Palmitico	Hexadecanoico	16:0
16	1	Palmitoléico	9-hexadecenoico	16:1 (n-7)
18	0	Esteárico	Octadecanoico	18:0
18	1	Oléico	9-octadecanoico	18:1 (n-9)
18	2	Linoléico *	9,12-octadecadienoico	18:2 (n-6)
18	3	γ -linolénico	6,9,12-octadecatrienoico	18:3 (n-6)
18	3	α -linolénico *	9,12,15-octadecatrienoico	18:3 (n-3)
20	0	Araquídico	Eicosaenoico	20:0
20	1	Gadoléico	11-eicosenoico	20:1 (n-9)
20	3	Dihomo- γ -linolénico	8,11,14-eicosatrienoico	20:3 (n-6)
20	3		5,8,11-eicosatrienoico	20:3 (n-9)
20	4	Araquidónico	5,8,11,14-eicosatetraenoico	20:4 (n-6)
20	5		5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	20:5 (n-3)
22	0	Behénico	Docosanoico	22:0
22	1	Erúico	13-docosenoico	22:1 (n-9)
22	4		7,10,13,16-docosatetraenoico	22:4 (n-6)
22	5		4,7,10,13,16-docosapentaenoico	22:5 (n-6)
22	5		7,10,13,16,19-docosapentaenoico	22:5 (n-3)
22	6		4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico	22:6 (n-3)
24	0	Lignocérico	Tetracosanoico	24:0
24	1	Nervónico	15-tetracosenoico	24:1 (n-9)

^a Los números que aparecen dentro de la denominación química del ácido indican las posiciones de las dobles ligaduras numeradas a partir del grupo carboxilo.

^b En la fórmula simplificada, los números antes y después de los dos puntos indican, respectivamente, el número de átomos de carbono y el número de dobles ligaduras presentes en el ácido graso. Entre paréntesis se indica la posición de la primera doble ligadura a partir del grupo metilo. * Ácidos grasos esenciales.



Isómero cis



Isómero trans

Figura 4.- Isómeros de los Ácidos Grasos Monoinsaturados.

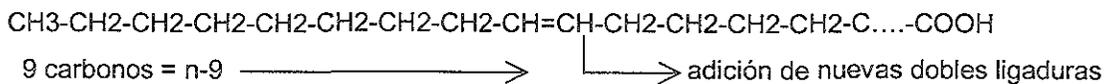
c) Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) se definen como aquellos ácidos grasos que contienen dos o más dobles ligaduras. Cada doble ligadura se encuentra separada de la siguiente doble ligadura por un grupo metilo (Figura 3C). Al igual que en los AGMI, en los lípidos alimentarios naturales, de origen animal y vegetal (a excepción de los rumiantes), todas las dobles ligaduras de los AGPI se encuentran en posición cis.

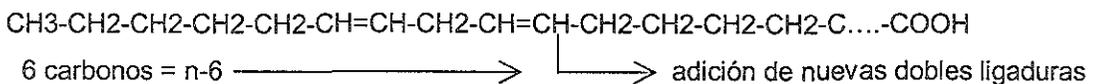
Los AGPI alimentarios de origen vegetal son los ácidos linoléico (18:2) y α -linolénico (18:3). A partir del ácido graso monoinsaturado de la misma longitud de cadena (ácido oléico 18:1), la segunda doble ligadura del ácido linoléico (18:2) y la tercera del ácido α -linolénico (18:3) son añadidas hacia el extremo metílico de la cadena. Los AGPI de origen animal derivan de tres precursores: ácido oléico, linoléico y linolénico, y se forman tres familias de AGPI que reciben el nombre de su precursor respectivo. Las dobles ligaduras siguientes son

añadidas entre la doble ligadura preexistente en posición 9 en el precursor correspondiente y el extremo carboxílico de la cadena (y no en el metílico como en los vegetales), de tal manera que la parte de la cadena comprendida entre la posición 9 y el grupo metílico no cambia. Esto permite definir 3 series o familias distintas de AGPI: la n-9, la n-6 y la n-3 (Figura 5).

Familia del oléico o serie n-9:



Familia del linoléico o serie n-6:



Familia del α-linolénico o serie n-3:

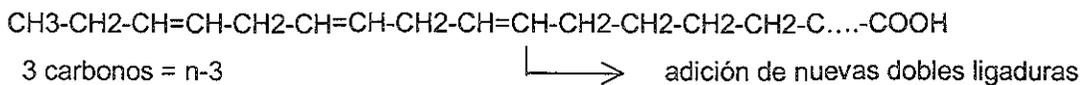


Figura 5.- Familias de Ácidos Grasos Poliinsaturados.

En los mamíferos, los AGPI se clasifican en dos grandes categorías, los esenciales y los no esenciales. Los AGPI esenciales son aquellos que deben ser ingeridos en la dieta, ya que no pueden ser sintetizados a partir de otros precursores carbonados en los sistemas celulares. A esta categoría pertenecen los ácidos grasos linoléico (18:2 n-6) y α-linolénico (18:3 n-3). A diferencia de éstos, los AGPI no esenciales son sintetizados a partir de la condensación de

unidades de acetato por la enzima ácido graso sintetasa, generando ácidos grasos saturados de 16 y 18 carbonos.

Tanto los AGPI esenciales como los no esenciales pueden dar derivados más insaturados y de cadena más larga por medio de una secuencia alternada de reacciones de desaturación ($\Delta 6$, $\Delta 5$, y $\Delta 4$ desaturasas) y de elongación (Figura 6). Para los ácidos grasos saturados de cadena larga no esenciales palmítico y esteárico (16:0 y 18:0), que pueden ser tomados de la dieta o sintetizados a partir de carbohidratos, la primer doble ligadura es introducida por la $\Delta 9$ desaturasa, estableciendo a las familias n-7 y n-9 (16:2 n-7 y 18:1 n-9 respectivamente). El siguiente paso de desaturación, llevado a cabo por la $\Delta 6$ desaturasa, puede introducir una doble ligadura en las familias n-7, n-9, n-6 y n-3 en la posición 6 a partir del grupo carboxilo de cada ácido graso. De igual manera, las $\Delta 5$ y $\Delta 4$ desaturasas permiten la inserción de dobles enlaces en las posiciones 5 y 4 a partir del grupo carboxilo de todas las familias de ácidos grasos.

La $\Delta 6$ desaturasa es la enzima limitante de la velocidad de síntesis de ácidos grasos, y se encuentra regulada por retroinhibición. En su papel regulador, la $\Delta 6$ desaturasa puede influir en la composición de AGPI de la membrana y por lo tanto, en los productos activos derivados de los ácidos grasos. Si se administran ácidos grasos altamente insaturados, como 20:4 n-6, 20:5 n-3 y 22:6 n-3, la conversión de 18:2 n-6, 18:3 n-3, 18:2 n-9 y 16:1 n-7 a ácidos grasos más insaturados es inhibida (Bruckner, 1992b).

Debido a que el mismo complejo enzimático desaturasa-elongasa actúa sobre todas las familias de ácidos grasos, si se proveen AGPI esenciales en la dieta, la síntesis de AGPI no esenciales es mínima, y sólo se encuentran trazas de ellos en lípidos de almacén y en fosfolípidos de membrana. Por otro lado, si se presenta una deficiencia de AGPI esenciales, se incrementa la síntesis de los no esenciales, alterando la homeostasis fisiológica y bioquímica de la célula, ya que los AGPI-no esenciales no pueden sustituir a los esenciales en sus funciones bioquímicas y de membrana (Bruckner, 1992b).

La competencia por el sistema desaturasa-elongasa se observa también entre las familias de AGPI esenciales, de forma que si se administran altas cantidades de ácido α -linolénico (n-3), se disminuye la conversión del linoléico a ácidos grasos n-6 de cadena más larga. Por el contrario, una alta ingesta de ácido linoléico disminuye la síntesis de ácidos n-3 de cadena larga (DHA y EPA) a partir del ácido α -linolénico (Bruckner, 1992b).

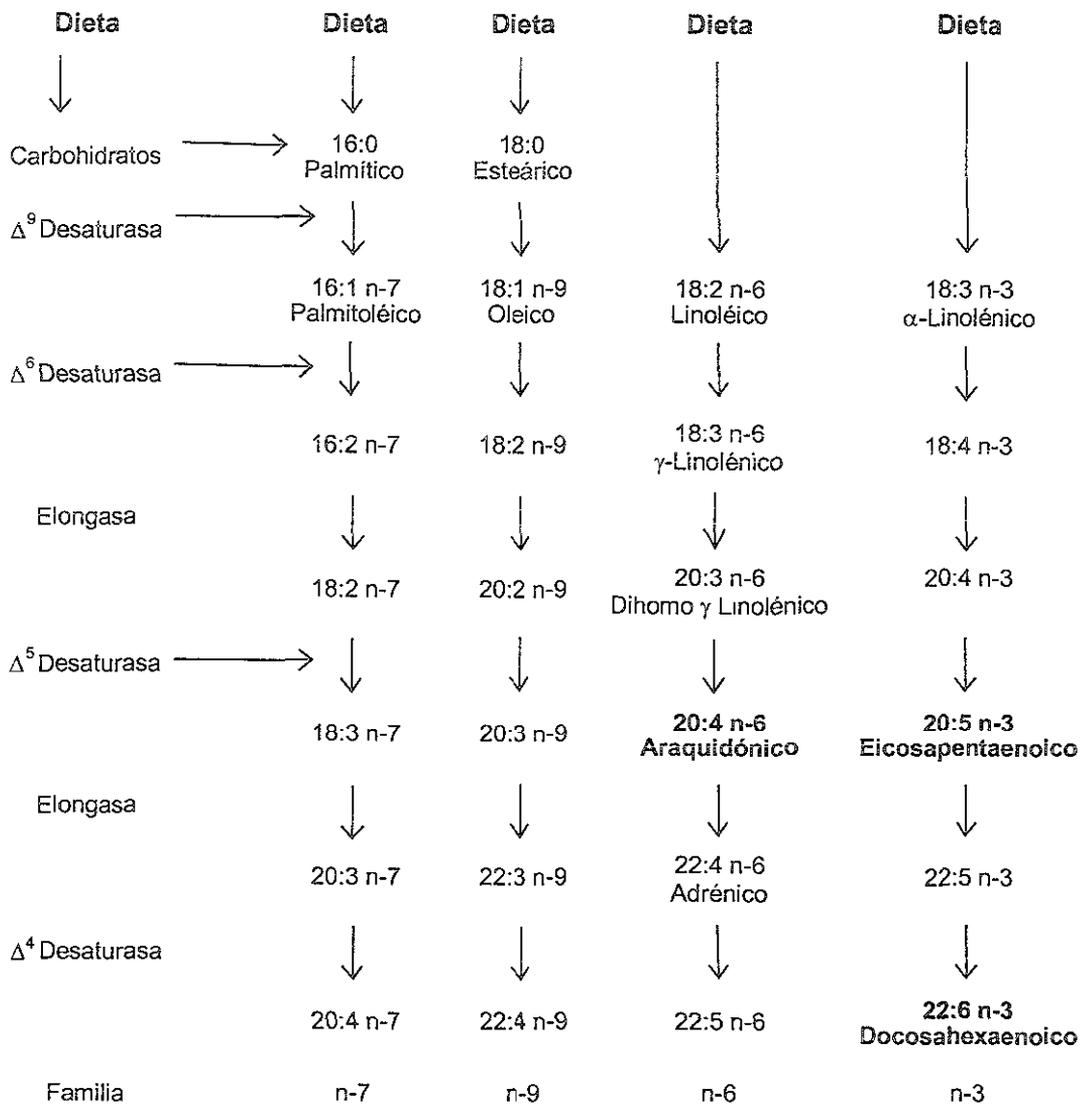


Figura 6.- Rutas de Desaturación de los Ácidos Grasos.

1.4.2.- Ácidos Grasos Poliinsaturados Esenciales.

Los ácidos grasos poliinsaturados esenciales incluyen a dos familias de ácidos grasos: la familia n-6, cuyo precursor es el ácido linoléico (18:2 n-6), y la familia n-3, en donde el precursor es el ácido α -linolénico (18:3 n-3). En los AGPI n-3, la primera doble ligadura se localiza en el tercer carbono a partir del grupo metilo terminal de la cadena hidrocarbonada, y en los n-6, se localiza en el sexto carbono (Figura 5). Estas dos familias son inconvertibles entre sí, lo que confiere a cada una un carácter y funciones específicas.

La esencialidad de los ácidos grasos fue descrita en 1929 por Burr y Burr (Burr, 1973), quienes reportaron por primera vez que el ácido linoléico (18:2n-6) y posiblemente otros ácidos grasos no eran sintetizados por el organismo. A partir de esta observación inicial se han publicado una gran cantidad de trabajos documentando el hecho de que ciertos ácidos grasos poliinsaturados no pueden ser sintetizados *de novo* a partir de precursores endógenos y son por lo tanto elementos dietarios esenciales (Bruckner, 1992a), debido a que los vertebrados carecen de la enzima Δ 15 desaturasa, necesaria para incorporar una doble ligadura antes del carbono 9.

El metabolito más importante de la familia n-6 es el ácido araquidónico (20:4 n-6), y los ácidos eicosapentaenoico (20:5 n-3) y el docosahexaenoico (22:6 n-3) son los metabolitos más importantes de la familia n-3 (Figura 6). Los ácidos grasos dietarios de la familia n-6 se encuentran principalmente en las grasas vegetales, con concentraciones importantes en los aceites de maíz, algodón, girasol, y soya; están presentes también en las carnes y pescados, pero en niveles mucho menores. Algunos aceites vegetales, como el de lino, soya, canola, contienen pequeñas cantidades de ácido α -linolénico (18:3 n-3), pero no contienen ácidos grasos n-3 de cadena larga (> de 18 átomos de carbono). El ácido α -linolénico se encuentra también en las hojas de algunos vegetales verdes. Los ácidos grasos n-3 de más de 18 carbonos son sintetizados principalmente por el fitoplancton y transferidos a través de la cadena alimenticia a los animales superiores. Los ácidos grasos n-3 de cadena larga más comunes (eicosapentaenoico EPA y docosahexaenoico DHA) se encuentran en animales marinos con altos contenidos de grasas (Simopoulos, 1986). Las concentraciones de EPA y DHA en pescado y sus productos es muy variable (Rustan, 1997).

A partir de diversos estudios sobre los efectos de la deficiencia en AGPI esenciales, en años recientes se ha visto la importancia de establecer los requerimientos mínimos de estos ácidos grasos. Los síntomas de la deficiencia de ácido linoléico son un crecimiento retardado, calvicie, esterilidad, inflamaciones epidérmicas, susceptibilidad a infecciones, disminución en la pigmentación de la piel, fragilidad y alta permeabilidad de membranas celulares, degeneración renal, entre otros. La deficiencia en ácido α -linolénico provoca serios problemas en el sistema nervioso central, actividad visual disminuida, alteraciones en electroretinogramas, y disminución en la capacidad de aprendizaje (Chapkin, 1992).

Las recomendaciones varían de acuerdo a la familia de AGPI, así como a la edad y/o estado fisiológico de la persona (infancia, embarazo, lactancia). En general, para adultos sanos se recomienda que la ingesta sea de:

18 g/día (6-7% de calorías) de AGPI, de los cuales:

- 14 g/día (4.8% de calorías) para el ácido linoléico (18:2 n-6)
- 3 g/día (1% de calorías) para el ácido α -linolénico (18:3 n-3)
- 0.8 g/día (0.27% de calorías) de EPA (20:5 n-3) + DHA (22:6 n-3)

Es especialmente importante mantener una relación adecuada de AGPI n-6/n-3, que se ha establecido que sea alrededor de 5:1 (Simopoulos, 1989).

1.4.2.1.- Funciones.

Los AGPI esenciales poseen tres papeles funcionales diferentes: como constituyentes de los fosfolípidos de las membranas celulares (principalmente el 18:2 n-6, el 20:4 n-6 y el 22:6 n-3), como fuentes de energía, y como precursores de metabolitos activos, como los eicosanoides.

a) Componentes de membrana.

Los AGPI esenciales son componentes integrales de fosfolípidos de las membranas celulares (plasmática, nuclear, mitocondrial, lisosomal, etc), encontrándose esterificados principalmente en la posición sn-2. Existe una especificidad de sustrato de las enzimas encargadas de la esterificación y desaturación de los ácidos grasos, por lo que, por ejemplo, el EPA se encuentra poco esterificado al colesterol y al diacilglicerol, y, dentro de los AGPI esenciales, hay una preferencia por incorporar ácidos grasos de la familia n-6 en la fosfatidilcolina, y los n-3 en la fosfatidiletanolamina. Cuando existe una deficiencia de AGPI esenciales, se sintetizan membranas frágiles que ocasionan que las células y los tejidos sean muy susceptibles a daños por una variedad de agentes, como luz UV, rayos X, carcinógenos, bacterias y virus (Sinclair, 1990; Rustan, 1997).

En las membranas, los AGPI juegan un papel tanto estructural como funcional. Los ácidos grasos 18:2 n-6 y 18:3 n-3, y sus metabolitos desaturados/elongados (20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3) están involucrados en el control de la viscosidad de las bicapas lipídicas de las membranas de la mayoría de las células. De esta manera, pueden regular los procesos mediados por la membrana, como la sensibilidad y afinidad de los receptores, el transporte de metabolitos, la actividad de las enzimas y de las bombas metabólicas, y los eventos de transducción de señales a través de las membranas (Bruckner, 1992b).

Cuando se ingieren grandes cantidades de ácidos grasos de cadena larga n-3, hay un aumento en la incorporación de EPA y DHA en los fosfolípidos de membrana, promoviendo alteraciones en las características físicas de las membranas. Las actividades de algunas proteínas de membrana cambian como resultado de la fluidez alterada de la membrana o por diferentes interacciones hidrofóbicas (Slater, 1996). Se ha demostrado que se incrementa notablemente la flexibilidad de las membranas de los glóbulos rojos en animales alimentados con aceite de pescado, y que se disminuye la viscosidad de la sangre (Rustan, 1997). Así mismo, se ha reportado también que la fluidez de la membrana tiene influencia sobre el transporte de fenilalanina, la actividad de la succinato oxidasa, el transporte de hexosas y la actividad de la Ca-ATPasa. No solo se han observado cambios en las actividades enzimáticas, sino también en la afinidad de receptores de membrana, con alteraciones en la composición de ácidos grasos de la dieta (Bruckner, 1992b).

En las membranas celulares, los AGPI participan también en la acilación de proteínas, que es importante en el anclaje de proteínas de membrana y crucial en el funcionamiento de las mismas (McIlhinney, 1990). Generalmente se encuentran aciladas a ácidos grasos saturados (esteárico, palmítico y mirístico), pero se ha encontrado que ciertas proteínas en las plaquetas se encuentran covalentemente unidas a ácidos grasos n-3 y n-6 (Muszbek, 1993).

b) Fuentes de energía.

Los AGPI representan también una fuente de energía, ya que pueden ser almacenados en forma de triglicéridos, y ser hidrolizados por lipasas específicas para dar ácidos grasos libres utilizables en procesos oxidativos.

Los triglicéridos son la forma de almacenaje principal de energía. La mayor parte de los triglicéridos se encuentran en el tejido adiposo, donde representan el 99% del volumen celular; sin embargo, algunos ácidos grasos se encuentran almacenados también en triglicéridos localizados en el hígado y en el músculo, donde pueden ser utilizados para obtener energía. La composición de estos lípidos de reserva refleja la composición de ácidos grasos de la dieta. Por ejemplo, si se ingiere una dieta rica en ácido linoléico se encuentran concentraciones elevadas de este ácido graso en el tejido adiposo (Bruckner, 1992b).

Las rutas de oxidación de los ácidos grasos varían para cada tipo de ácido graso. Los ácidos grasos de cadena corta (C4-C10) son transportados directamente al interior de la mitocondria para la β oxidación, mientras que los ácidos grasos C10-C20 requieren un mecanismo de transporte dependiente de carnitina. Los ácidos grasos C18-C24 necesitan acortar su cadena en los peroxisomas antes de poder ser totalmente oxidados en las mitocondrias (Bruckner, 1992b).

c) Síntesis de eicosanoides.

Los ácidos grasos araquidónico (20:4 n-6), eicosatrienoico (20:3 n-6) y eicosapentaenoico (20:5 n-3) son los prescursores de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina y leucotrienos), sintetizados por medio de las ciclooxigenasas y/o lipo-oxigenasas específicas (Figura 7). Existen cinco series de eicosanoides, que se derivan del 20:3 n-6 (serie 1), del 20:4 n-6

(serie 2), del 20:5 n-3 (serie 3), del 22:6 n-3 (serie 4) y del 22:4 n-6 (serie 5). Estos compuestos exhiben un amplio rango de acciones fisiológicas en sistemas como el cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal, renal, inmunológico, nervioso, y hematológico (presión arterial, diuresis, agregación plaquetaria, secreciones gástricas, contracción del músculo liso, motilidad de células endoteliales, crecimiento de células de músculo liso, leucocitos y células endoteliales), y la descripción de ellas ha ayudado a entender los múltiples efectos de la deficiencia de AGPI esenciales en los animales (Bruckner, 1992b).

Los ácidos grasos, liberados de los fosfolípidos de las membranas, presentan diferentes afinidades por las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas; los ácidos grasos altamente insaturados de la familia n-3 (20:5 n-3 y 22:6 n-3) son en especial inhibidores competitivos muy potentes. Por esta razón, los ácidos grasos n-3 pueden alterar la biosíntesis de eicosanoides al disminuir la cantidad de productos derivados de la familia n-6 (TxA₂, PGE-2, etc), y sirven también como sustrato de la ciclooxigenasa para formar eicosanoides de la serie 3. Los eicosanoides de la serie 2 y de la serie 3 tienen biopotencias diferentes, por lo que la diferente ingesta de AGPI n-6 y n-3 puede tener efectos importantes en la producción de estos metabolitos bioactivos (Bruckner, 1992b).

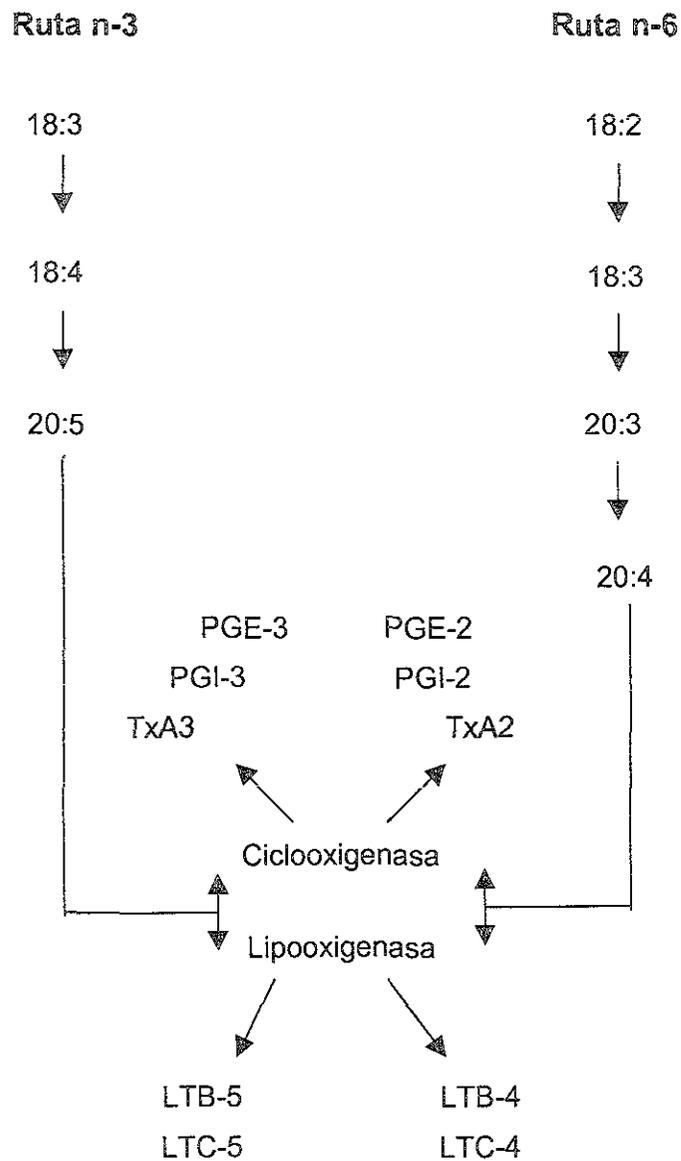


Figura 7.- Biosíntesis de Eicosanoides a Partir de Ácidos Grasos Esenciales.

Abreviaturas: PGE-2 y PGE-3 prostaglandinas E2 y E3; PGI-2 y PGI-3, prostaciclina I2 e I3; TxA2 y TxA3, tromboxanos A2 y A3; LTB-4, LTB-5, LTC-4 y LTC-5, leucotrienos B4, B5, C4 y C5, respectivamente.

d) Regulación génica.

Los AGPI, o sus metabolitos, han sido asociados también con la regulación de la expresión génica, afectando la actividad de factores de transcripción para ciertos genes (Clarke, 1994). El primer factor nuclear activado por ácidos grasos que fue reportado es PPAR (proxisome-proliferator-activated receptor) (Issemann, 1990). Actualmente se sabe que los AGPI inhiben la transcripción de varios genes lipogénicos y glicolíticos hepáticos (Clarke, 1996), y que el ácido araquidónico regula la transcripción de los genes que codifican para los transportadores de glucosa en adipocitos, disminuyendo su expresión (Long, 1996).

1.4.2.2.- Regulación de la composición de AGPI de las membranas celulares.

La composición de ácidos grasos de las membranas se encuentra muy controlada, y puede ser modificada a través de la dieta y/o por la alteración de los procesos celulares de desaturación y acilación. Cuando se administra una dieta libre de grasas ó compuesta de ácidos grasos saturados, los lípidos de los tejidos presentan pequeñas cantidades de AGPI n-3 y n-6 y acumulan AGPI de las familias n-9 y n-7 (20:3 n-9 y 20:4 n-7). Cuando se incluyen AGPI n-3 y n-6, los ácidos grasos no esenciales endógenos son rápidamente reemplazados por los esenciales en la posición n-2 de los fosfolípidos y en los lípidos de almacenamiento (Bruckner, 1992a).

Por otro lado, los AGPI esenciales que son ingeridos en la dieta son metabolizados por medio de desaturaciones y elongaciones para dar derivados de cadenas más largas y con mayores insaturaciones. Al ocurrir esto, no hay interconversiones entre las diferentes familias de ácidos grasos. La primera desaturación en los AGPI esenciales la realiza la $\Delta 6$ desaturasa, que actúa sobre el ácido linoleico (18:2 n-6) y sobre el α -linolénico (18:3 n-3). Esta enzima se encuentra regulada por retroinhibición y es sensible a la inhibición competitiva por otros AGPIs.

De esta manera, la $\Delta 6$ desaturasa puede influir en la composición de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas y de los productos bioactivos derivados de ellos. Si se administran AGPI de cadena larga en la dieta, como 20:4n-6, 20:5n-3 y 22:6n-3, la conversión de linoleico y α -linolénico a ácidos grasos más insaturados por la $\Delta 6$ desaturasa puede ser inhibida. Al mismo tiempo, existe una interacción competitiva entre las dos familias, de manera que los AGPI n-3 inhiben el metabolismo de los AGPI n-6 de forma más eficiente

que la inhibición de los AGPI n-6 sobre el metabolismo de los AGPI n-3 (Bruckner, 1992b).

Debido a que los AGPI n-3 compiten muy efectivamente por las enzimas desaturasas y acilasas con otras familias de ácidos grasos, los cambios en la composición tisular de ácidos grasos es mayor de lo que se esperaría por el porcentaje que se encuentra en la dieta. Ingestas moderadas de ácidos grasos n-3 pueden incrementar de forma importante la concentración de estos ácidos grasos en el plasma, plaquetas, eritrocitos, pulmón, riñón, hígado, corazón, tejido adiposo, cerebro, macrófagos, retina, nervios y vasos sanguíneos (Bruckner, 1992b).

Por otra parte, los AGPI n-3 reemplazan principalmente a los n-6 en los lípidos de membrana, por lo que disminuye el contenido de ácido araquidónico en ellas. La disminución en la disponibilidad de ácido araquidónico para la formación de eicosanoides, y la competencia con los n-3 por los sitios activos de las lipooxigenasas y ciclooxigenasas, resulta en una disminución en la producción de prostanooides de la serie 2 (TXA2, PGE2, derivados de los AGPI n-6), y un aumento en los de la serie 3, sintetizados a partir de los AGPI n-3. Los eicosanoides de la serie 2 y 3 tienen funciones diferentes, y en ocasiones antagónicas, por lo que se altera la homeostasis fisiológica del organismo (Bruckner, 1992b).

1.4.2.3.- Papel de los AGPI esenciales en el desarrollo de enfermedades.

Como ya se mencionó anteriormente, la ingesta de ácidos grasos modifica la composición lipídica de las membranas celulares, de los lípidos de almacenaje y altera diferentes rutas metabólicas, como la oxidación o la síntesis de metabolitos bioactivos. Además, los cambios en la composición de ácidos grasos modifica las propiedades físicas de las membranas, como la viscosidad y las actividades de las proteínas asociadas a ésta (enzimas, receptores, transportadores). Por lo tanto, la homeostasis celular puede verse perturbada, predisponiendo al organismo a diversos procesos de enfermedad (enfermedades renales, cáncer, enfermedades inmunológicas, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares).

Por ejemplo, se ha reportado que la composición de ácidos grasos de la dieta altera la composición lipídica de células inmunológicas, como macrófagos, monocitos, neutrófilos, y linfocitos, alterando la respuesta celular a varios estímulos, y dando como resultado una función inmunológica alterada, y otras patologías como asma, psoriasis, artritis, y crecimiento tumoral (Kinsella, 1990a).

Por otro lado, el inicio y desarrollo de enfermedades cardiovasculares se asocia fuertemente con el tipo de grasa ingerida en la dieta. Las grasas que han recibido la mayor atención son las saturadas y el colesterol, catalogándolas como grasas que promueven de forma importante la aparición de enfermedades cardiovasculares (Tabla 3).

Tabla 3.- Influencia de los Ácidos Grasos Dietarios Sobre Algunos Eventos Metabólicos y Cardiovasculares *.

	Aumenta	Disminuye
Enfermedad arteriocoronaria	Saturados	AGPI n-3 y monoenos
Infarto	Saturados	?
Presión arterial	Saturados	AGPI n-3
Coagulación y fibrinólisis	?	AGPI n-3 (?) y AGPI n-6 (?)
Función plaquetaria	?	AGPI n-3 y AGPI n-6 (?)
Hiperlipidemia	Saturados	AGPI n-3, AGPI n-6 y monoenos
Oxidación de LDL	omega-6 (?)	monoenos
Aterogenesis (reactividad de leucocitos, funciones inmunológicas)	saturados y monoenos (?)	AGPI n-3 y AGPI n-6
Disfunción endotelial	?	AGPI n-3 (?)
Arritmias cardíacas	Saturados	AGPI n-3 y AGPI n-6
Resistencia a la insulina	Saturados	AGPI n-3 (?)

*AGPI n-3, ácidos grasos de cadena larga n-3 (EPA y DHA); AGPI n-6, ácido linoléico principalmente (18:2, n-6); monoenos, ácido oleico (cis 18:1, n-9); saturados, ácidos mirístico y palmítico principalmente (14:0 y 16:0). (Rustan, 1997).

El interés por el estudio de la participación de los AGPI esenciales en la patogénesis y desarrollo de las enfermedades cardiovasculares surgió a partir los trabajos de Bang y Dyerberg (Bang, 1971), quienes reportaron una menor incidencia de ECV en los Esquimales de Groenlandia en comparación con los esquimales de Dinamarca. Sus estudios revelaron menores niveles de colesterol, triglicéridos, VLDL, LDL y elevaciones en HDL entre esa población, y debido a que los esquimales de Groenlandia consumen más pescado que los daneses (en promedio 500 g/d, lo que provee de 30 a 40 g de aceite rico en AGPI n-3), mientras que el consumo de AGPI n-6 es significativamente menor,

los autores propusieron que los AGPI n-3 son los responsables de la menor incidencia de ECV encontrada en esa población.

A partir de entonces, se han llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones para dilucidar los mecanismos involucrados en el efecto de los AGPI esenciales sobre las ECV, observando que existen diferencias entre los efectos producidos por los AGPI de las diferentes familias (n-6 y n-3). Se ha reportado que la ingesta de AGPI n-3 tiene efectos benéficos sobre el sistema cardiovascular, como la reducción en la viscosidad de la sangre y un aumento en el flujo sanguíneo en los capilares periféricos; el aumento en la concentración circulante de antitrombina y la disminución en los niveles de fibrinógeno, reduciendo la tendencia a la trombosis; la disminución en la producción de mediadores proinflamatorios y la reducción en los factores de crecimiento celulares responsables de la proliferación de células en las paredes arteriales que causan el estrechamiento de las arterias; la inhibición de la proliferación de los linfocitos; la prevención de taquiarritmias en animales (Rustan, 1997).

Algunos efectos de los AGPI n-3 han sido atribuidos al cambio en la composición de ácidos grasos de las membranas celulares, que conduce a variaciones en la síntesis de determinados eicosanoides, ya que los sintetizados a partir de los AGPI n-3 son en general menos potentes que los producidos a partir de los AGPI n-6, y cambios en las cantidades absolutas y relativas de estos compuestos regulan la trombosis, la presión arterial y la microcirculación periférica (Bruckner, 1992b).

En ese sentido, se ha reportado que los AGPI n-3 disminuyen la reactividad de las plaquetas y de los leucocitos (Mutanen, 1996, Kim, 1995), debido a que los AGPI n-3 pueden desplazar al ácido araquidónico (20:4 n-6) de los fosfolípidos de las plaquetas, reduciendo la disponibilidad del sustrato para la síntesis plaquetaria de eicosanoides de la serie 2, como el TXA₂, que es un agente pro agregatorio fuerte, y el PGI₂, vasodilatador. Además, el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3) puede ser convertido en las plaquetas a TXA₃ y por las células endoteliales a PGI₃. El TXA₃ es un eicosanoide pro agregatorio y vasoconstrictivo débil. Sin embargo, el PGI₃ es equipotente a PGI₂ en su función de antiagregatorio y vasodilatador. Por lo tanto, se ha sugerido que los aceites de pescado disminuyen la potencia total de los eicosanoides proagregatorios y vasoconstrictivos (TXA₂ y TXA₃) y mantienen ó incrementan los niveles de los compuestos antiagregatorios y vasodilatadores (PGI₂ y PGI₃) (Bruckner, 1992a).

Por otro lado, se ha reportado que los AGPI n-3 disminuyen la presión arterial en humanos y animales de experimentación (Knapp, 1996; Toft, 1995). Los mecanismos responsables de este efecto no se conocen aún con exactitud, pero se han relacionado también con los cambios producidos en la síntesis de eicosanoides, que participan de manera importante en la regulación de la presión arterial.

En cuanto a los AGPI n-6, ha sido reportado que este tipo de ácidos grasos, principalmente el ácido linoléico, tienen efectos positivos sobre las enfermedades cardiovasculares. En animales de experimentación se ha observado que disminuyen los niveles plasmáticos de colesterol, previenen el desarrollo de arterioesclerosis (Rudel, 1995) y poseen propiedades antiarrítmicas (McLennan, 1993). Se ha sugerido también que el ácido γ -linolénico (18:3 n-6) es útil en la prevención de enfermedades cardiovasculares (Horrobin, 1993). El efecto de los AGPI n-6 sobre la presión arterial es aún motivo de controversia, ya que se ha reportado que provocan disminuciones, aumentos, o que no tienen ningún efecto sobre la presión arterial (Howe, 1997; Bonaa, 1990; Sacks, 1989; Iacono, 1993).

Existen muy pocos datos acerca del efecto modulador de los ácidos grasos de la dieta sobre la acción de la insulina. En animales de experimentación se ha observado que la administración de dietas ricas en grasas conduce al desarrollo de resistencia a la insulina (Storlien, 1986). Sin embargo, el efecto depende del tipo de grasa ingerida, ya que si se incluyen AGPI n-3 en la dieta rica en grasas, se restituye la sensibilidad a la insulina (Storlien, 1987; Storlien, 1991). Los mecanismos responsables de este efecto no se conocen aún con exactitud, aunque se ha sugerido la participación de alteraciones en la naturaleza física de las membranas, la modulación del aporte lipídico, el control de la expresión génica, y la modulación en la producción de eicosanoides y otros productos metabólicos de los AGPI que regulan la secreción de insulina (Storlien, 1997).

En humanos, los estudios se han centrado principalmente en el tratamiento de la diabetes mellitus no dependiente de insulina (DMNDI). En este caso, se ha asociado a la ingesta de grasas, especialmente saturadas, con una mayor incidencia de resistencia a la insulina y predisposición para desarrollar intolerancia a la glucosa y DMNDI (Storlien, 1997). Aunque la mayoría de los trabajos se han enfocado a los AGPI n-3, sugiriendo que protegen contra el desarrollo de intolerancia a la glucosa, se ha sugerido también que la ingesta de AGPI n-6 es benéfica para la sensibilidad a insulina (Vessby, 1994). Sin embargo, se ha reportado un mejoramiento en el control glicémico en sujetos diabéticos al disminuir la relación n-6/n-3 (Raheja, 1993).

El síndrome de resistencia a la insulina representa una red metabólica y cardiovascular muy compleja cuyo origen se localiza en la presencia de resistencia a la acción de la insulina con la consecuente hiperinsulinemia. Las elevadas concentraciones circulantes de insulina promueven el desarrollo de los demás componentes del síndrome, como la hipertensión y la dislipidemia. Si la ingesta de AGPI n-3 tiene efectos positivos sobre la sensibilidad a la insulina, es posible suponer que la administración de AGPI n-3 mejorará los niveles de presión arterial y las concentraciones circulantes de lípidos debido a un mejoramiento en la sensibilidad a la insulina.

Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo fue analizar el efecto de dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados esenciales en los diferentes componentes del síndrome de resistencia a la insulina, en un modelo experimental inducido por sacarosa en ratas.

Los objetivos particulares fueron:

- 1) Obtención de un modelo experimental de síndrome de resistencia a la insulina, por medio de la administración de una dieta rica en sacarosa.
- 2) Análisis del efecto de dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados esenciales sobre algunos parámetros relevantes en el síndrome de resistencia a la insulina (presión arterial, tolerancia a la glucosa, niveles séricos de glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad, y lípidos totales).
- 3) Análisis del efecto de dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados esenciales sobre la composición de ácidos grasos del tejido adiposo de las ratas.

Hipótesis.

La incorporación en la dieta de ácidos grasos poliinsaturados esenciales mejorará el cuadro de síndrome de resistencia a la insulina inducido por sacarosa en ratas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

2. MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1.- MATERIALES.

2.1.1.- Reactivos.

Los reactivos químicos utilizados fueron todos de grado analítico, de los laboratorios de Sigma Chem Co., Merck y J.T.Baker. Se utilizaron los estuches de cuantificación de colesterol, glucosa, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lípidos totales de la marca Merck. El radioinmunoanálisis de insulina se llevó a cabo con el estuche de Coat-A Count (Diagnostic Products Corp, EUA).

2.1.2.- Equipos.

Los equipos utilizados fueron los siguientes:

- Espectrofotómetro UV/vis marca Beckman modelo DU650i.
- Centrifuga refrigerada marca Beckman modelo J2-Mi.
- Homogenizador de tejidos equipado con tubos de vidrio y pistilo de teflón.
- Centrifuga Eppendorf.
- Medidor de presión tipo no invasivo, de las marcas Narco Bio-Systems adaptado a un esfigomanómetro PE-300 y a un fisiógrafo marca Bio-Systems MKIV, y marca IITC Life Science Instruments Mod 59.
- Rotavapor marca Buchi modelo B-480.
- Cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 5890.
- Contador de radiactividad marca Hewlett Packard.

2.1.3.- Animales de experimentación.

Se utilizaron tres lotes de ratas Wistar, de 21 días de edad, recién destetadas. El primer lote estuvo constituido por 25 ratas hembra, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Los dos lotes siguientes estuvieron constituidos por 45 ratas macho cada uno, provenientes del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Veracruzana campus Xalapa.

2.2.- MÉTODOS.

Para analizar el efecto de las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados esenciales en el síndrome de resistencia a la insulina, se utilizó un modelo experimental de ratas hipertensas, hiperinsulinémicas e hipertriglicéridémicas, generado por una alimentación rica en sacarosa.

Los diagramas de flujo seguidos en el trabajo se muestran en las Figuras 8 y 9.

2.2.1.- Obtención del modelo experimental.

La obtención del modelo experimental del síndrome de resistencia a la insulina en ratas se llevó a cabo mediante la administración de una dieta rica en sacarosa, de la siguiente manera:

Lote 1.- En el primer lote de ratas, las 25 ratas hembras fueron divididas en dos grupos (Figura 8). El grupo control (Control_1), constituido por 5 ratas, recibió la dieta control, que contenía almidón como el carbohidrato principal. El grupo experimental (Sac_1) recibió la dieta rica en sacarosa, en la que el 50% de los carbohidratos estuvieron constituidos por sacarosa. La composición de las dietas se muestra en la Tabla 4.

Las ratas fueron mantenidas en jaulas individuales, con un ciclo de luz/obscuridad de 12/12 hrs, a 25°C. Las dietas fueron administradas *ad libitum* durante tres semanas, al cabo de las cuales se midió la presión arterial caudal, y el peso de cada una de las ratas. Se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa a tres ratas del grupo control y a ocho ratas del grupo experimental, después de un ayuno de 18 hrs.

Lotes 2 y 3.- En el segundo y tercer lote de ratas, las 45 ratas macho fueron divididas en dos grupos (Figura 9). El grupo control, compuesto por nueve ratas (Control_2 y Control_3), recibió agua purificada para beber, y el grupo experimental (Sac_2 y Sac_3), constituido por 36 ratas, recibió agua purificada endulzada con

sacarosa comercial al 30% (Baños, G., et al, 1997). Todas las ratas fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta sintética Purina comercial.

Las ratas fueron mantenidas en jaulas individuales, con un ciclo de luz/obscuridad de 12/12 hrs, a 25°C, y, al cabo de 13 semanas, se midió la presión arterial caudal, el peso corporal de cada una de las ratas, y, después de un ayuno de 18 hrs, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa a ratas control y ratas del grupo experimental.

Se obtuvo el suero de las ratas y se les determinaron las concentraciones de insulina, glucosa, triglicéridos y colesterol.

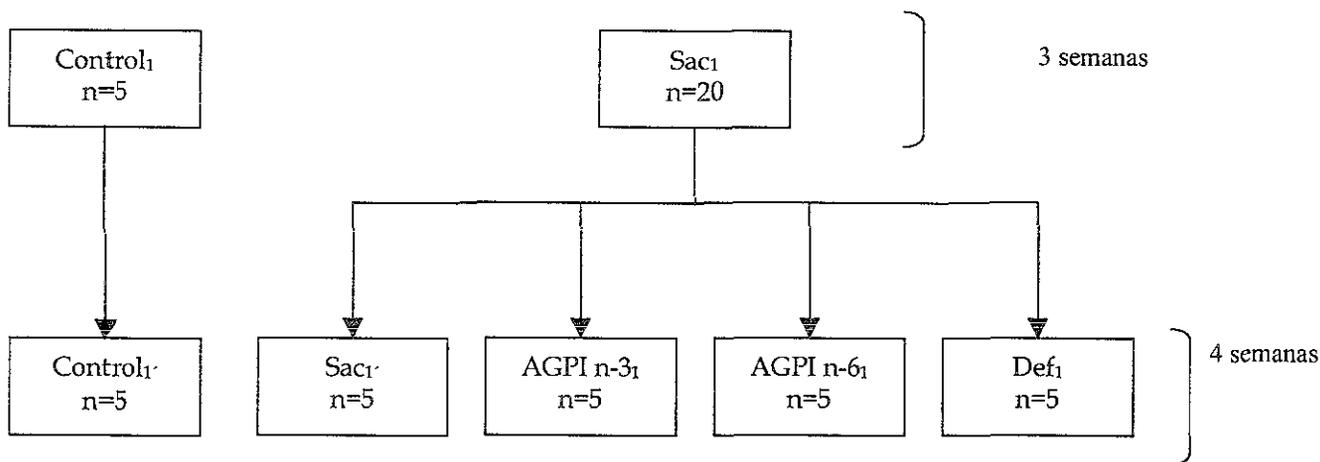


Figura 8.- Diagrama de Flujo del Proceso Experimental en el Primer Lote de Ratas (Hembras).

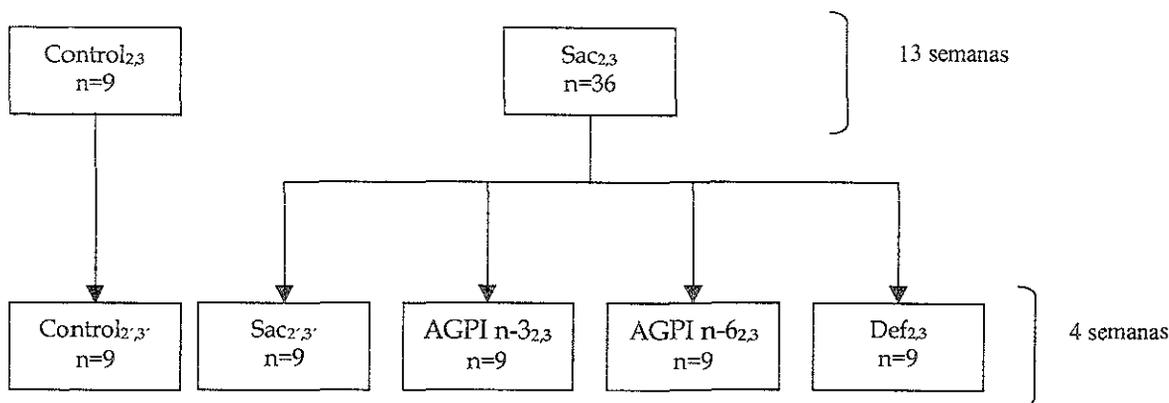


Figura 9.- Diagrama de Flujo del Proceso Experimental de los Lotes 2 y 3 de Ratas (Machos).

Tabla 4.- Composición de las Dietas Administradas al Primer Lote de Ratas (Hembras) Para la Obtención del Modelo Experimental.

Ingrediente	Control ₁ g	Sac ₁ g
Caseína	440	440
DL-metionina	3.2	3.2
Celulosa	40	40
Almidón	876.8	658
Sacarosa	440	658
Mezcla de vitaminas ^a	20	20
Mezcla de minerales ^b	80	80
Aceite de maíz	100	100

^a Mezcla de vitaminas (Harlan Teklad 40060): ácido p-aminobenzoico, ácido ascorbico, biotina, vitamina B₁₂, pantotenato de calcio, choline dihydrogen citrate, ácido folico, inositol, menadionae, niacina, piridoxina HCl, riboflavina, tiamina HCl, palmitato de vitamina A, vitamina D₃, acetato de vitamina E, almidón de maíz.

^b Mezcla de minerales (Harlan Teklad AIN-76 170915): CaHPO₄, NaCl, citrato de potasio, K₂SO₄, MgO, carbonato manganoso, citrato ferrico, carbonato de zinc, carbonato cúprico, yodato de potasio, selenita de sodio, chromium potassium sulfate, sacarosa.

2.2.1.1.- Medición de la presión caudal.

La presión caudal de cada una de las ratas fue determinada con un medidor de presión no invasivo (marca Narco Bio-Systems adaptado a un esfingomanómetro PE-300 y a un fisiógrafo marca Bio-Systems MKIV, y marca IITC Life Science Instruments Mod 59). La arteria caudal de las ratas fue calentada durante 5 min con un foco, y a continuación se realizaron cinco mediciones consecutivas de la presión arterial caudal. El valor de la presión reportado representa el promedio de esas cinco determinaciones.

2.2.1.2.- Curvas de tolerancia a la glucosa.

Después de 18 hrs de ayuno, se administró a cada rata un bolo de glucosa de 180 mg de glucosa (Sigma Chem Co.) por cada 100 g de peso del animal, por medio de una sonda intragástrica. Se tomaron muestras de 0.5 ml de sangre de la punta de la cola antes de la administración (0 min) y a los 30, 60 y 180 min después de administrado el bolo. La sangre se dejó coagular por unos minutos, y fue centrifugada para la obtención del suero a 300 rpm y 4°C. En éste se determinaron las concentraciones de glucosa e insulina, y en la muestra del tiempo 0 min, se cuantificaron también triglicéridos y colesterol.

2.2.1.3.- Determinaciones séricas.

Las determinaciones de los niveles séricos de colesterol, glucosa, triglicéridos, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lípidos totales, se llevaron a cabo por medio de estuches de cuantificación específicos de la marca Merck, como se describe a continuación:

a) Glucosa.

Los niveles de glucosa en el suero fueron cuantificados por la técnica de determinación fotométrica de glucosa, en la que la glucosa de la muestra es oxidada por la glucosa oxidasa adicionada al medio de reacción. El peróxido de hidrógeno formado se hace reaccionar con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de peroxidasa, con lo que se forma un colorante de quinonimina, cuya absorbancia y concentración es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra. La absorbancia de la muestra es comparada con la de una solución de glucosa de concentración conocida para obtener la concentración de glucosa en el suero.

b) Colesterol.

Los niveles de colesterol en suero fueron determinados por la técnica de colesterol enzimático, en el cual el colesterol es liberado de las lipoproteínas por la adición de detergentes y la enzima colesterol-esterasa, y oxidado por la acción de la colesterol oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado se hace reaccionar con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de peroxidasa, con lo que se forma un colorante de quinonimina, cuya absorbancia y concentración es directamente proporcional a la concentración de colesterol en la muestra. Para calcular la concentración de colesterol, se multiplica la absorbancia de la muestra por un factor de conversión que incluye el coeficiente de extinción molar y el factor de dilución.

c) Lipoproteínas de alta densidad.

Para la cuantificación de las HDL-colesterol, las lipoproteínas de baja densidad y de muy baja densidad (LDL y VLDL) son removidas por medio de precipitación con ácido fosfotúngstico en presencia de iones magnesio, y centrifugación. En el sobrenadante quedan las HDL-colesterol, que son cuantificadas utilizando el método de cuantificación de colesterol mencionado anteriormente.

d) Lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Para la cuantificación de las LDL, éstas son precipitadas con heparina y en el sobrenadante se cuantifica el colesterol por el método mencionado anteriormente. La concentración de las LDL se calcula por la diferencia entre la concentración de colesterol total de la muestra y la del sobrenadante.

e) Triglicéridos.

Los triglicéridos en el suero fueron determinados por el método enzimático colorimétrico. Los triglicéridos son hidrolizados por lipasas hasta glicerol y ácidos grasos libres. La reacción del glicerol con las enzimas glicerocinasa y glicerol-3-fosfato oxidasa genera peróxido de hidrógeno, el cual se hace reaccionar con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de peroxidasa, con lo que se forma un colorante de quinonimina, cuya concentración y absorbancia es directamente proporcional a la concentración de triglicéridos en la muestra. La absorbancia de la muestra es comparada con la de una solución de triglicéridos de concentración conocida para obtener la concentración de triglicéridos en el suero.

f) Lípidos totales.

Los lípidos totales del suero fueron determinados por un método colorimétrico. El suero es calentado con ácido sulfúrico concentrado y a continuación es tratado con ácido fosfórico y vainillina. El desarrollo de color es cuantificado por espectrofotometría. La concentración de lípidos totales en el suero se obtiene comparando la absorbancia de la muestra con la de un patrón.

g) Insulina.

Los niveles circulantes de insulina fueron determinados en el suero por medio de radioinmunoanálisis en fase sólida, de la siguiente manera:

Radioinmunoanálisis de insulina.- se utilizó el estuche Coat-A Count (Diagnostic Products Corp, EUA). En este sistema se utiliza insulina marcada con I^{125} que compete con la insulina de las muestras o de la curva patrón, por los sitios de unión del anticuerpo específico, que se encuentra inmovilizado en la pared de los tubos de polipropileno. Las concentraciones en el suero se calculan por comparación con una curva patrón (5-400 μ UI/ml).

2.2.2.- Administración de las dietas.

Una vez obtenido el modelo experimental de ratas hipertensas, hiperinsulinémicas e hipertrigliceridémicas, se administraron las diferentes dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados esenciales (Figuras 8 y 9). Las dietas fueron preparadas en una sola ocasión, y almacenadas con BHT 0.02% en refrigeración.

2.2.2.1.- Lote 1.

En el lote 1 de ratas (hembras), el grupo experimental (Sac_1) fue dividido en cuatro grupos de cinco ratas cada uno, y fueron denominados $Sac_{1'}$, AGPI n-3₁, AGPI n-6₁ y Def_1 .

La composición de las dietas administradas a cada uno de los grupos se muestra en la Tabla 5. El grupo $Sac_{1'}$ recibió la dieta rica en sacarosa, y los lípidos fueron aportados por una mezcla de aceite de maíz y de soya (1:1) (marca Patrona); el grupo AGPI n-3₁ recibió la dieta rica en sacarosa y en ácidos grasos poliinsaturados n-3, pues el aporte de lípidos fue dado por aceite de pescado (aceite de Menhaden, Zapata Inc.). El grupo AGPI n-6₁ recibió la dieta rica en sacarosa y en ácidos grasos poliinsaturados n-6, ya que el aporte de lípidos estuvo dado por aceite de maíz (marca Patrona). El grupo Def_1

recibió la dieta rica en sacarosa y deficiente en ácidos grasos polinsaturados, ya que el aporte lipídico fue dado por manteca vegetal parcialmente hidrogenada. El grupo control₁ recibió la dieta control, que contenía almidón como el carbohidrato principal y aceite de maíz y de soya (1:1) como aporte lipídico. La composición de ácidos grasos de las dietas administradas se muestra en la Tabla 7.

Las ratas fueron mantenidas en las mismas condiciones anteriores, y las dietas fueron administradas *ad libitum* durante un periodo de cuatro semanas.

Tabla 5.- Composición de las Dietas Administradas al Modelo Experimental de Ratas Hembras, Durante Cuatro Semanas.

Ingrediente	Control ₁	Sac ₁	AGPI n-3 ₁	AGPI n-6 ₁	Def ₁
	g	g	g	g	g
Caseína	440	440	440	440	440
DL-metionina	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2
Celulosa	40	40	40	40	40
Almidón	876.8	658	658	658	658
Sacarosa	440	658	658	658	658
Mezcla de vitaminas ^a	20	20	20	20	20
Mezcla de minerales ^b	80	80	80	80	80
Aceite de Maíz	50	50	-	100	-
Aceite de Soya	50	50	-	-	-
Aceite de Pescado	-	-	100	-	-
Manteca vegetal	-	-	-	-	100

^a Mezcla de vitaminas (Harlan Teklad 40060): ácido p-aminobenzoico, ácido ascórbico, biotina, vitamina B₁₂, pantotenato de calcio, choline dihydrogen citrate, ácido fólico, inositol, menadionae, niacina, pindoxina HCl, riboflavina, tiamina HCl, palmitato de vitamina A, vitamina D₃, acetato de vitamina E, almidón de maíz.

^b Mezcla de minerales (Harlan Teklad AIN-76 170915): CaHPO₄, NaCl, citrato de potasio, K₂SO₄, MgO, carbonato manganoso, citrato férrico, carbonato de zinc, carbonato cúprico, yodato de potasio, selenita de sodio, chromium potassium sulfate, sacarosa.

2.2.2.2.- Lotes 2 y 3.

En los lotes de ratas macho, el segundo y tercer grupo experimental (Sac₂ y Sac₃) fueron divididos en cuatro grupos de nueve ratas cada uno, y fueron

denominados Sac₂, AGPI n-3₂, AGPI n-6₂ y Def₂; y Sac₃, AGPI n-3₃, AGPI n-6₃ y Def₃.

Todos los grupos experimentales continuaron recibiendo el agua endulzada con sacarosa al 30%. La composición de las dietas administradas se muestra en las Tablas 7 y 8.

Los grupos Sac₂ y Sac₃ recibieron una dieta control, donde los lípidos fueron aportados por una mezcla de aceite de maíz y aceite de canola (1:1) (marca Patrona). Los grupos AGPI n-3₂ y AGPI n-3₃ recibieron la dieta rica en ácidos grasos polinsaturados n-3, pues el aporte de lípidos fue dado por aceite de pescado (aceite de Menhaden, Zapata Inc.). Los grupos AGPI n-6₂ y AGPI n-6₃ recibieron la dieta rica en ácidos grasos polinsaturados n-6, ya que el aporte lipídico estuvo constituido por aceite de maíz (Marca Patrona). Los grupos Def₂ y Def₃ recibieron la dieta deficiente en ácidos grasos polinsaturados, ya que el aporte lipídico fue dado por aceite de coco hidrogenado. Los grupos Control₂ y Control₃ recibieron la dieta control, y agua no endulzada con sacarosa. Las ratas se mantuvieron en las mismas condiciones, y las dietas fueron administradas *ad libitum* durante un periodo de cuatro semanas.

Al cabo de las cuatro semanas, se determinó la presión arterial caudal, el peso de cada una de las ratas y se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa, de igual forma que la vez anterior.

Finalmente, las ratas en ayuno fueron sacrificadas por decapitación, obteniéndose la sangre corporal y el tejido adiposo abdominal (en el caso de las ratas hembras) y el epididimario y perirenal (en el caso de las ratas macho). La sangre se dejó coagular por unos minutos, y fue centrifugada a 3000 rpm y 4°C para la obtención del suero, en el cual se determinaron las concentraciones de triglicéridos, colesterol, lípidos totales, lipoproteínas de alta densidad, lipoproteínas de baja densidad, insulina y glucosa.

Del tejido adiposo extraído se obtuvieron las membranas celulares y se extrajeron los lípidos; se analizó la composición de ácidos grasos de las diferentes clases de fosfolípidos y de los lípidos totales.

Tabla 6.- Composición de las Dietas Administradas a los Modelos Experimentales de los Lotes 2 y 3 de Ratas (Macho), Durante Cuatro Semanas.

Ingrediente	Control _{2,3}	Sac _{2,3}	AGPI n-3 _{2,3}	AGPI n-6 _{2,3}	Def _{2,3}
	g	g	g	g	g
Caseína	440	440	440	440	440
DL-metionina	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2
Celulosa	40	40	40	40	40
Almidón	658	658	658	658	658
Mezcla de vitaminas ^a	20	20	20	20	20
Mezcla de minerales ^b	80	80	80	80	80
Aceite de Maíz	50	50	-	100	-
Aceite de Canola	50	50	-	-	-
Aceite de Pescado	-	-	100	-	-
Aceite de Coco	-	-	-	-	100

^a Mezcla de vitaminas (Teklad 40060): ácido p-aminobenzoico, ácido ascórbico, biotina, vitamina B₁₂, pantotenato de calcio, choline dihydrogen citrate, ácido fólico, inositol, menadionae, niacina, piridoxina HCl, riboflavina, tiamina HCl, palmitato de vitamina A, vitamina D₃, acetato de vitamina E, almidón de maíz

^b Mezcla de minerales (Teklad AIN-76 170915): CaHPO₄, NaCl, citrato de potasio, K₂SO₄, MgO, carbonato manganoso, citrato férrico, carbonato de zinc, carbonato cúprico, yodato de potasio, selenita de sodio, chromium potassium sulfate, sacarosa.

2.2.3.- Obtención de membranas celulares del tejido adiposo.

El tejido adiposo extraído de las ratas fue pesado, cortado en pedazos pequeños y homogenizado en un homogenizador de vidrio con pistilo de teflón, sobre hielo, adicionando un amortiguador de Krebs-Ringer-Tris pH 7.4 (NaCl 120 mM, CaCl 1.4 mM, KCl 5.2 mM, MgSO₄ 1.4 mM, Tris 5 mM) a 4°C. El homogenado fue filtrado a través de dos capas de gasa, y centrifugado a 40 000 Xg a 4°C durante 40 min. El sobrenadante y la capa de grasa formada fueron desechados, y el precipitado fue resuspendido, con la ayuda del pistilo de teflón, en un volumen del amortiguador Krebs-Ringer-Tris pH 7.4, donde 1/4 parte del volumen en que resuspendió el tejido fue de Percoll.

La preparación fue centrifugada a 16 000 Xg durante 15 min a 4°C, y se recuperó la capa blanca de la interfase, donde se localizaban las membranas celulares. Ésta fue diluída con amortiguador de Tris-Cloruro de Magnesio pH

7.5 (Tris 50 Mm, MgCl 10 mM), y centrifugada a 16 000 Xg durante 10 min a 4°C.

El sobrenadante fue desechado, y el precipitado fue guardado a -70°C.

2.2.3.1.- Extracción de lípidos de las membranas celulares.

Los lípidos de las membranas celulares fueron extraídos por medio del método de Folch (Folch, 1957). Las membranas celulares precipitadas fueron descongeladas y resuspendidas con una mínima cantidad del amortiguador Tris-Cloruro de Magnesio pH 7.5. Se juntaron las membranas de todas las ratas pertenecientes al mismo grupo, y a 1.0 ml de la preparación de membranas se le añadieron 16 ml de la mezcla de Folch (cloroformo-metanol 2:1 v/v). Después de una agitación de 1 min en vórtex, se añadieron 3 ml de cloruro de sodio 0.73%. Se agitó vigorosamente con un vórtex durante un minuto, y se dejó separar durante 18 hrs a 4°C.

La fase superior fue desechada, y a la fase inferior, en la que se localizaban los lípidos, se le añadieron 7.5 ml de una mezcla cloroformo-metanol-NaCl 0.73% (3:48:47 v/v/v), con el fin de eliminar las trazas de proteínas. Se agitó vigorosamente con un vórtex durante un minuto y se dejó separar a 4°C durante 4 hrs. La fase superior fue desechada, y la fase inferior fue filtrada a través de sulfato de sodio anhidro, colocado en un embudo de vidrio con un papel filtro Watman, para eliminar impurezas y restos de agua. El filtrado fue recuperado en un matraz de bola, previamente llevado a peso constante, y fue evaporado al vacío en un rotavapor a 30°C, y posteriormente con flujo de nitrógeno. La diferencia entre el peso del matraz vacío y después de la evaporación se usó para calcular la cantidad de lípidos extraídos.

El extracto fue resuspendido con cloroformo (BHT 0.02%) en una proporción de 10 mg de lípidos por ml de cloroformo.

Tabla 7.- Composición de Ácidos Grasos de las Dietas Administradas a las Ratas.

Ácido Graso	Dieta Purina	Dieta Control	Dieta AGPI n-3	Dieta AGPI n-6	Dieta Deficiente 1	Dieta Deficiente 2
	%	%	%	%	%	%
Saturados						
10:0	nd	0.05	0.07	0.02	1.8	0.9
12:0	0.2	nd	nd	nd	nd	51.3
14:0	2.2	nd	14.4	nd	47.3	22.6
16:0	26.6	12.8	21.9	15.6	39.5	18.8
18:0	7.3	nd	2.3	nd	0.7	0.35
20:0	0.05	nd	6.5	5.5	nd	nd
Total	36.3	12.8	45.1	21.1	89.5	93.9
Monoinsaturados						
14:1	0.44	nd	nd	nd	nd	nd
16:1	nd	nd	9.1	nd	nd	nd
18:1	50	50.7	13.9	31.8	8.0	3.8
20:1	2.7	nd	nd	6.6	nd	nd
24:1	nd	nd	2.6	nd	nd	nd
Total	53.1	50.7	25.6	38.4	8.0	3.8
Poliinsaturados						
n-6						
18:2	8.3	32.8	1.4	40.2	2.4	1.1
20:4	nd	nd	1.1	nd	nd	nd
Total	8.3	32.8	2.5	40.2	2.4	1.1
n-3						
18:3	1.7	3.5	0.96	nd	nd	nd
18:4	nd	nd	2.05	nd	nd	nd
20:5	nd	nd	11.2	nd	nd	nd
22:6	nd	nd	11.9	nd	nd	nd
Total	1.7	3.5	26.1	nd	nd	nd
n-6/n-3	4.8	9.3	0.09	-	-	-

Control = aceite de maíz-canola; AGPI n-3 = aceite de pescado; AGPI n-6 = aceite de maíz;

Deficiente1 = manteca vegetal; Deficiente2 = aceite de coco.

% los valores están expresados como porcentaje de los ácidos grasos totales. Nd = no detectable.

2.2.3.2.- Separación de las clases de fosfolípidos.

Antes de la separación de las diferentes clases de fosfolípidos de las membranas, los fosfolípidos fueron separados de los lípidos neutros por medio de cromatografía en cartuchos de sílice de 1 ml (tubos de LC-Si Supelclean, Supelco Inc.). Los cartuchos fueron previamente acondicionados con 1 ml de metanol y 1 ml de cloroformo. La muestra de lípidos extraídos (aprox 10 mg en 200 μ l de cloroformo BHT 0.02%) fue colocada en los tubos y se dejó penetrar al sílice por gravedad. Los lípidos neutros fueron entonces eluidos con 8 ml de cloroformo, y a continuación, los fosfolípidos se eluyeron con 8 ml de metanol. Las dos fracciones obtenidas fueron evaporadas al vacío en un rotavapor a 30°C, y posteriormente con flujo de nitrógeno. Finalmente, fueron resuspendidas en 500 μ l de cloroformo BHT 0.02%, y guardadas a -20°C hasta su utilización.

El grado de pureza de las fracciones fue determinada por medio de cromatografía en capa fina, utilizando placas de sílice 60H (Merck), 10 μ l de muestra, y una mezcla de hexano:éter etílico:ácido fórmico 80:20:1 como fase móvil. La cámara fue previamente saturada con la fase móvil durante 1 hr antes de la migración de las muestras, y la cromatografía se detuvo a 1 cm del borde superior de la placa. Las placas fueron reveladas con una mezcla de ácido sulfúrico:etanol 1:1, añadida por aspersion, y calentando a 180°C hasta la aparición de las manchas.

La separación de las diferentes clases de fosfolípidos de las membranas (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol), se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina, en placas de sílice 60H (Merck) utilizando una mezcla de cloroformo:metanol:agua 65:25:4 como eluyente, y depositando toda la muestra de fosfolípidos obtenida (en 30 μ l). La cámara fue previamente saturada con la fase móvil durante 1 hr antes de la migración de las muestras, y la cromatografía se detuvo a 1 cm del borde superior de la placa. Las placas fueron reveladas con vapores de yodo.

Cada una de las manchas obtenidas fue raspada de la placa de cromatografía, y los fosfolípidos contenidos fueron extraídos colocando la sílica en 1 ml de cloroformo BHT 0.02% y agitando en vórtex durante 1 min. Posteriormente, los extractos fueron filtrados en un embudo con papel filtro Watman No.2, evaporados con flujo de nitrógeno y resuspendidos con 0.5 ml de cloroformo BHT 0.02%.

Para la identificación de los fosfolípidos se incluyeron estándares de fosfolípidos puros (Sigma), que comigraron en la misma cromatografía que las muestras. Se

utilizaron 20 µg en 10 µl de cada uno de los siguientes estándares: L-α-fosfatidil colina, L-α-fosfatidil serina, L-α-fosfatidil etanolamina y L-α-fosfatidil inositol.

2.2.3.3.- Composición de ácidos grasos.

La composición de ácidos grasos de las muestras (lípidos totales y fosfolípidos) fue analizada por medio de cromatografía de gases.

a) Metilación de ácidos grasos.

Antes de la cromatografía, los ácidos grasos contenidos en los lípidos obtenidos fueron transmetilados con trifloruro de boro, de la siguiente manera:

A 1.5 mg del extracto lipídico, evaporado con flujo de nitrógeno, se añadió 1 ml de trifloruro de boro (BF₃) al 10% en metanol. La transmetilación se llevó a cabo durante 30 min a 90°C en baño María. Finalmente se añadieron 0.5 ml de agua destilada. Los ésteres metílicos fueron extraídos de la mezcla de reacción mediante la adición de 1 ml de hexano y la agitación vigorosa en vórtex. La fase superior se separó y la inferior fue nuevamente extraída con hexano. Las dos fases superiores obtenidas fueron evaporadas con flujo de nitrógeno, y resuspendidas en 0.5 ml de cloroformo. Las muestras fueron mantenidas a -20°C hasta su utilización.

b) Cromatografía de gases.

Los ésteres metílicos fueron separados por medio de cromatografía de gases, e identificados por la comparación de sus tiempos de retención con los de estándares puros conocidos (Sigma).

Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 5890 equipado con una columna capilar tipo Carbowax y un detector de ionización de flama, bajo las siguientes condiciones:

- temperatura de inyección: 250°C
- temperatura del detector: 250°C
- gas acarreador: helio
- programación de la temperatura de la columna: de 130°C a 210°C a una velocidad de 8°C/min.
- longitud de la columna: 30 m

➤ Tiempo: 35 min.

2.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los valores obtenidos en las determinaciones realizadas en cada uno de los grupos fueron promediados y comparados por medio de análisis de varianza y prueba de comparación múltiple de Tukey's.

3. RESULTADOS

3.1.- Obtención del modelo experimental.

Como fue mencionado en la sección de Materiales y Métodos, en este trabajo se utilizó un modelo experimental de ratas hipertensas, hiperinsulinémicas e hipertriglicéridémicas, que fue obtenido por medio de la administración de una dieta rica en sacarosa.

A continuación se describen los resultados obtenidos en cada uno de los tres lotes de ratas utilizados para la obtención del modelo.

3.1.1.- Lote 1.

En la Tabla 8 se muestran los valores promedio de la presión arterial caudal y del peso corporal del grupo control (Control_1) y del grupo experimental (Sac_1), después de tres semanas de administración de la dieta con sacarosa. Las ratas del grupo Sac_1 presentaron niveles de presión arterial significativamente más elevados que las ratas del grupo Control_1 (114 ± 3.9 vs 128.8 ± 2.1 , $p < 0.005$). El peso corporal promedio y los niveles séricos de glucosa no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos.

Las curvas de tolerancia a la glucosa promedio obtenidas para los dos grupos de ratas se muestran en la Figura 10. En ambos casos, se encontró una elevación en los niveles séricos de glucosa después de la administración del bolo, pero los niveles de glucosa en las ratas del grupo Sac_1 se mantuvieron elevados por más tiempo (150 min) que las del grupo Control_1 (100 min).

3.1.2.- Lote 2.

En la Tabla 9 se muestran los valores promedio de los parámetros asociados al síndrome X que fueron analizados en las ratas controles (Control_2) y experimentales (Sac_2) después de la administración de agua endulzada con sacarosa durante trece semanas a las ratas del lote 2. Como puede observarse, las ratas del grupo Control_2 presentaron una presión arterial promedio de 120.2 ± 2.5 mmHg, y las del grupo Sac_2 , de 139.04 ± 1.6 mmHg. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.005$).

Las ratas del grupo Sac₂ presentaron niveles significativamente más elevados de insulina ($14.8 \pm 1.5 \mu\text{UI/ml}$ vs $6.6 \pm 1.5 \mu\text{UI/ml}$, $p < 0.05$), colesterol ($61.2 \pm 0.5 \text{ mg/dl}$ vs $49 \pm 0.3 \text{ mg/dl}$, $p < 0.05$), y triglicéridos (no ayuno) ($175.7 \pm 15.4 \text{ mg/dl}$ vs 94.5 ± 18.3 , $p < 0.05$) con respecto al grupo Control₂. Las concentraciones de triglicéridos (ayuno) se encontraron elevadas en el grupo Sac₂, aunque la diferencia con respecto al control no mostró significancia estadística.

En cuanto al peso corporal, tanto las ratas alimentadas con la sacarosa como las controles presentaron pesos iniciales y finales muy similares, sin diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 8.- Valores Promedio de la Presión Sistólica y del Peso Corporal de las Ratas del Lote 1, Después de la Administración de una Dieta Rica en Sacarosa Durante Tres Semanas.

Parámetro	Control 1 n=5	Sac 1 n=20
Presión arterial (mm Hg)	114 ± 3.9	$128.8 \pm 2.1^*$
Peso corporal inicial (g)	68.3 ± 4.1	55.9 ± 2.8
Peso corporal final (g)	175 ± 7.8	169.2 ± 3.5
Glucosa (mg/dl)	53.4 ± 12.4	47.1 ± 9.6

* $p < 0.005$ Control 1 = grupo control; Sac 1 = grupo alimentado con la dieta rica en sacarosa. Valores expresados como promedio \pm error estándar.

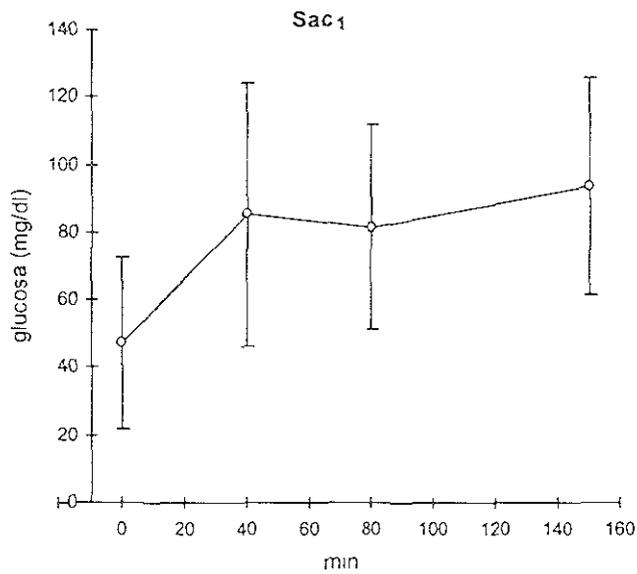
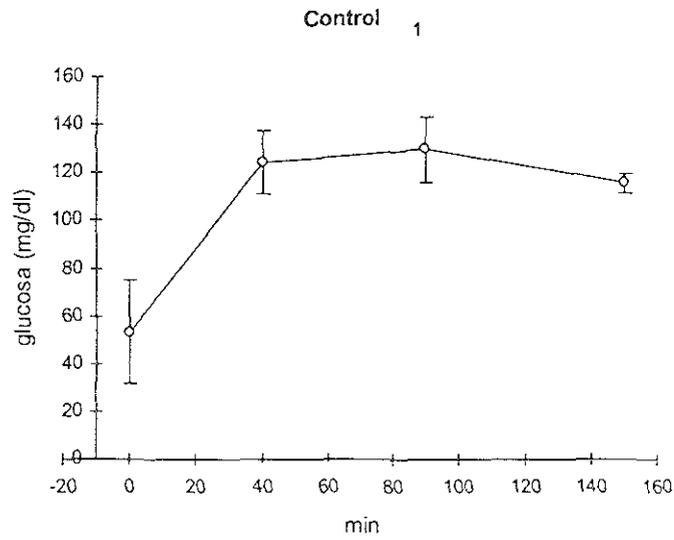


Figura 10.- Curvas de tolerancia a la glucosa de las ratas del lote 1 después de la administración de la dieta rica en sacarosa durante 4 semanas.

Tabla 9.- Valores Promedio de los Parámetros Asociados al Síndrome X, Analizados en las Ratas del Lote 2 Después de Trece Semanas de Administración de Agua Endulzada con Sacarosa al 30%.

Parámetro	Control ₂ n=9	Sac ₂ n=36
Presión sistólica (mm Hg)	120.2 ± 2.5	139.04 ± 1.6 **
Peso corporal inicial (g)	83.4 ± 6	87.1 ± 2.8
Peso corporal final (g)	346 ± 10.6	315.5 ± 7.6
Glucosa (mg/dl)	139.1 ± 6.2	135.3 ± 8.8
Insulina (μUI/ml)	6.6 ± 1.5	14.8 ± 1.5 *
Colesterol (mg/dl)	49.09 ± 0.37	61.2 ± 0.5 *
Triglicéridos ayuno (mg/dl)	81.7 ± 7.7	114.2 ± 9.4
Triglicéridos no ayuno (mg/dl)	94.5 ± 18.3	175.7 ± 15.4 *

*p<0.05; ** p<0.005. Control₂ = grupo control; Sac₂ = grupo alimentado con la dieta rica en sacarosa. Valores expresados como promedio ± error estándar.

Las curvas de tolerancia a la glucosa promedio se muestran en la Figura 11. En este lote se encontraron dos tipos de gráfica en las ratas del grupo Control₂: el tipo A, presente en cuatro ratas, en el que los valores de glucosa presentaron un pico a los 30 min de administrado el bolo de glucosa; y el tipo B, encontrado en tres ratas, en el que el pico se encontró a los 60 min.

Las ratas alimentadas con sacarosa (Sac₂) presentaron curvas de tolerancia a la glucosa similares al tipo B, es decir, con el pico de máxima glucosa a los 60 min de administrado el bolo. Los niveles de glucosa iniciales y finales promedio de ambos grupos no presentaron diferencias estadísticamente significativas (139.3 ± 5.3 mg/dl y 151.7 ± 5.2 mg/dl en las ratas Control₂; y 135.3 ± 8.4 mg/dl y 150.3 ± 6.2 mg/dl en las Sac₂); sin embargo, las concentraciones de glucosa en el pico fueron significativamente más elevadas en las ratas alimentadas con sacarosa (215 ± 8 mg/dl vs 185 ± 5 mg/dl, p<0.05).

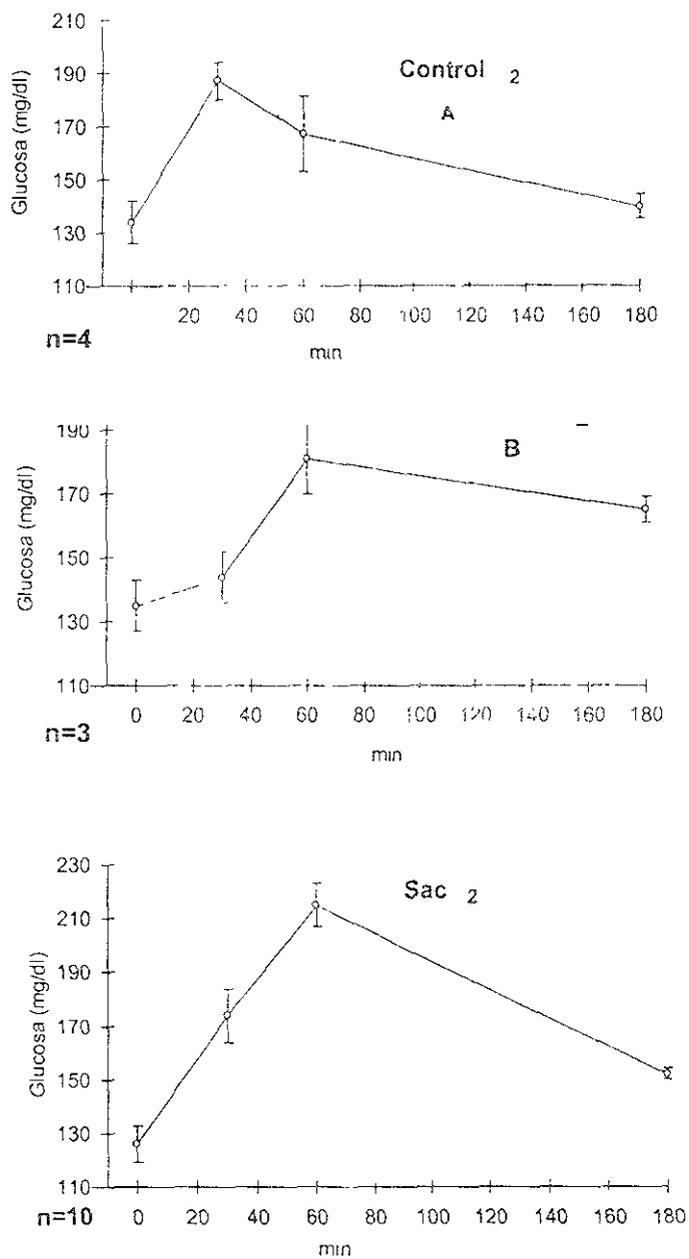


Figura 11.- Curvas de tolerancia a la glucosa de las ratas del lote 2 después de la administración de la dieta rica en sacarosa durante 13 semanas.

1.3.- Lote 3.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en el lote 3 después de trece semanas de la administración de agua endulzada con sacarosa al 30%. Nuevamente, las ratas del grupo Sac₃ presentaron una elevación estadísticamente significativa en los valores de presión arterial caudal (117.5 ± 1.9 mmHg vs 92.3 ± 6 mmHg, $p < 0.001$). Aunque los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos y colesterol se encontraron ligeramente elevados en las ratas del grupo Sac₃, las diferencias con respecto al grupo Control₃ no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 10.- Valores Promedio de los Parámetros Asociados al Síndrome X, Analizados en las Ratas del Lote 3 Después de Trece Semanas de Administración de Agua Endulzada con Sacarosa al 30%.

Parámetro	Control ₃ n=9	Sac ₃ n=36
Presión sistólica (mm Hg)	92.3 ± 6	$117.5 \pm 1.9^*$
Peso corporal inicial (g)	36.5 ± 2.5	38.3 ± 1.4
Peso corporal final (g)	272.5 ± 6.1	231.2 ± 5.5
Glucosa (mg/dl)	85.4 ± 9.8	90.7 ± 3.8
Insulina (μ U/ml)	5.55 ± 0.5	7.5 ± 0.3
Colesterol (mg/dl)	68.7 ± 3.2	77 ± 2.1
Triglicéridos ayuno (mg/dl)	88.9 ± 6.9	120 ± 7.9
Triglicéridos no ayuno (mg/dl)	148.5 ± 12.9	160.6 ± 10

* $p < 0.001$ Control₃ = grupo control; Sac₃ = grupo alimentado con la dieta rica en sacarosa
Valores expresados como promedio \pm error estándar.

Las curvas de tolerancia a la glucosa y las de insulina en respuesta al bolo de glucosa, se muestran en la Figura 12. En este lote de ratas, los dos grupos presentaron el pico de máxima glucosa a los 60 min, y el de insulina a los 30 min. Los niveles séricos de glucosa e insulina se encontraron ligeramente

elevados en el caso de las ratas del grupo Sac₃, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa en ninguno de los tiempos, con respecto al grupo Control₃.

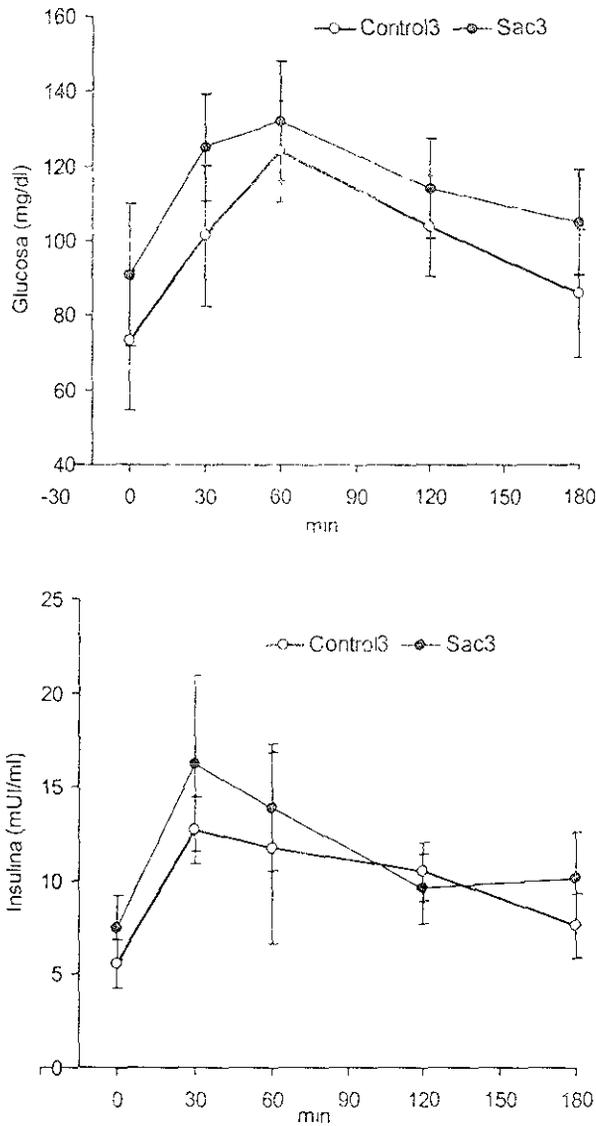


Figura 12.-Curvas de tolerancia a glucosa y de insulina en las ratas del lote 3 después de la administración de la dieta rica en sacarosa durante trece semanas.

3.2.- Administración de las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados esenciales.

Una vez obtenido el modelo experimental, se analizó el efecto de las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados esenciales sobre los parámetros asociados al síndrome X obtenidos. Se analizó también el efecto de las dietas sobre la composición de ácidos grasos de las membranas del tejido adiposo.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en cada uno de los lotes de ratas:

3.2.1.- Lote 1.

Las presiones arteriales promedio, así como los niveles séricos de insulina, glucosa, triglicéridos, colesterol, y lipoproteínas de alta y baja densidad de cada uno de los grupos de ratas, obtenidos después de cuatro semanas de administración de las diferentes dietas, se muestran en la Tabla 11. Como puede observarse, todos los grupos de ratas presentaron una presión arterial promedio de alrededor de 125 mmHg, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Los niveles circulantes de glucosa se encontraron ligeramente elevados en todos los grupos experimentales, presentando diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control₁, únicamente los grupos Sac₁ y AGPI n-6₁ (76.1 ± 6 mg/dl y 83.3 ± 13.4 mg/dl respectivamente, vs 28.8 ± 4.4 mg/dl, $p < 0.01$). Los niveles circulantes de insulina se encontraron significativamente elevados en el grupo Sac₁ (20.3 ± 1.5 μ UI/ml vs 12.4 ± 0.8 μ UI/ml, $p < 0.01$).

Los niveles circulantes de triglicéridos y LDL no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En el caso del colesterol y las HDL, todos los grupos experimentales presentaron niveles séricos ligeramente disminuidos, aunque sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control₁, en el grupo AGPI n-3₁ para el colesterol (64 ± 5.5 mg/dl vs 101.2 ± 8.2 mg/dl, $p < 0.01$), y en los grupos AGPI n-3₁, AGPI n-6₁ y Sac₁ en el caso de las HDL (33.7 ± 1.8 mg/dl, 37 ± 3.6 mg/dl, y 36.7 ± 3.9 mg/dl, vs 64 ± 7.7 mg/dl, $p < 0.01$).

Tabla 11.- Niveles promedio de los parámetros asociados al síndrome X, analizados en las ratas del lote 1 después de cuatro semanas de alimentación con las diferentes dietas.

Parámetro	Control ₁ n=5	Sac ₁ n=5	AGPI n-3 ₁ n=5	AGPI n-6 ₁ n=5	Def ₁ n=5
Presión sistólica (mm Hg)	124 ± 7.3	125 ± 2	125 ± 8.41	125 ± 6.1	125 ± 1.5
Glucosa (mg/dl)	28.8 ± 4.43	76.1 ± 6.05 *	52.5 ± 2.5	83.3 ± 13.4 *	53.1 ± 9
Insulina (μU/ml)	12.4 ± 0.8	20.35 ± 1.5 *	14.57 ± 2.3	16 ± 1.5	14.6 ± 1.1
Triglicéridos (mg/dl)	185.9 ± 2.74	179.8 ± 14.1	176.3 ± 3.5	171.9 ± 2.7	187.7 ± 2.7
Colesterol (mg/dl)	101.2 ± 8.2	77.1 ± 4.23	64 ± 5.5 *	72.2 ± 7	94.8 ± 7.2
HDL (mg/dl)	64 ± 7.7	36.7 ± 3.9 *	33.7 ± 1.8 *	37 ± 3.6 *	47.5 ± 2.5
LDL (mg/dl)	9.5 ± 1.1	7.7 ± 1.08	7.7 ± 1.3	6.7 ± 1.05	9.1 ± 1.7
Peso corporal (g)	248.8 ± 4.4	242 ± 3.7	227.7 ± 5.8	231.2 ± 12.2	242.2 ± 11.2

*p<0.01 Control₁ = grupo control; Sac₁ = grupo alimentado con la dieta rica en sacarosa; AGPI n-3₁ = grupo alimentado con el aceite de pescado; AGPI n-6₁ = grupo alimentado con aceite de maíz; Def₁ = grupo alimentado con la manteca vegetal.

Valores expresados como promedio ± error estándar.

En la Figura 13 se muestran las curvas de tolerancia a la glucosa de los cinco grupos de ratas. En todos los casos, los niveles basales de glucosa fueron menores a los obtenidos en el suero de la sangre corporal, encontrándose por debajo de 20 mg/dl. A excepción del grupo AGPI n-6₁, en todos los grupos se observó un aumento en los niveles de glucosa después de la administración del bolo, aunque únicamente se presentó una disminución en los mismos en los grupos control₁ y AGPI n-3₁ en el tiempo que duró la prueba.

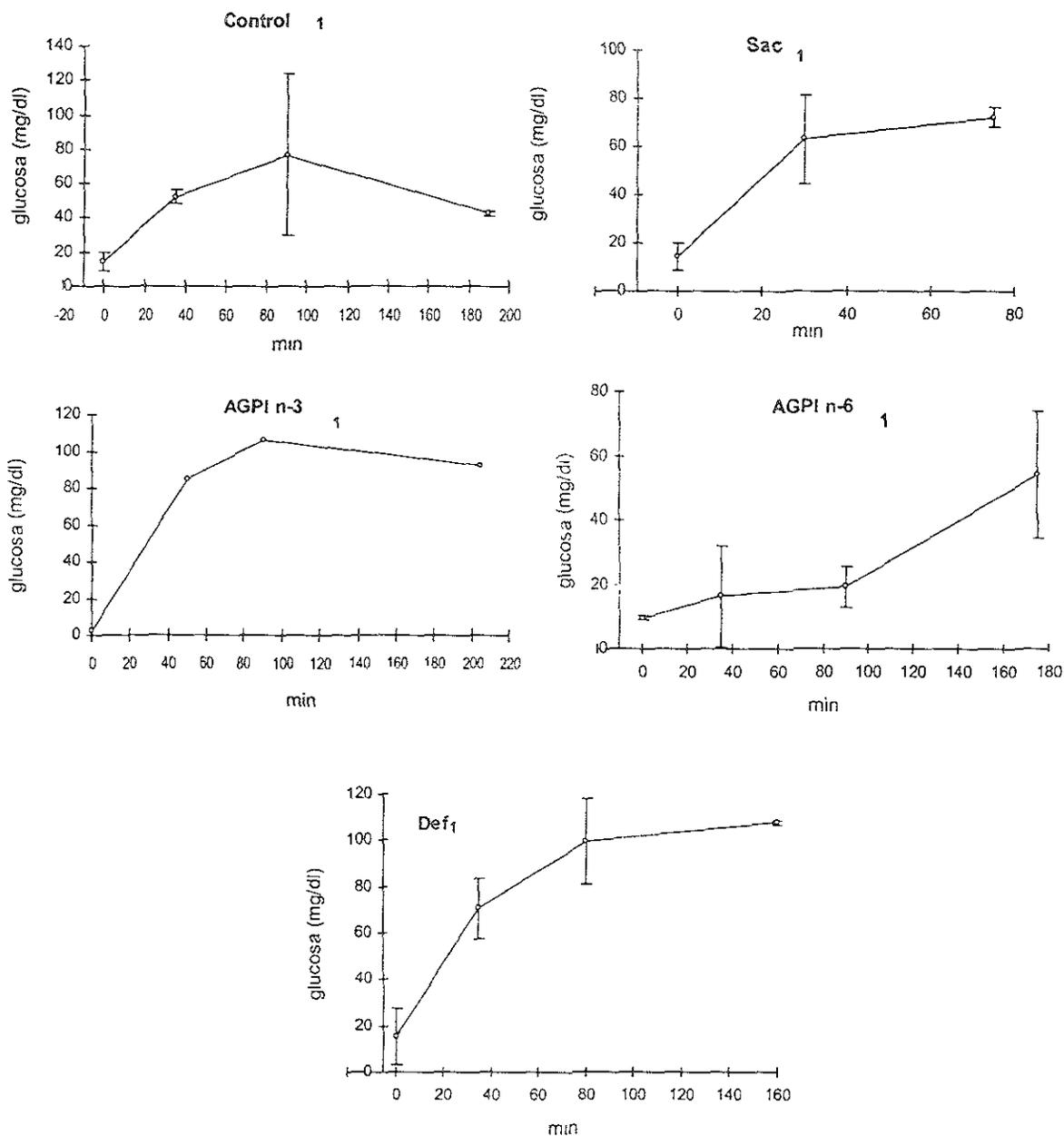


Figura 13.- Curvas de tolerancia a la glucosa de las ratas del lote 1 después de la administración de las dietas ricas en AGPI durante cuatro semanas.

3.2.2.- Lote 2.

Los valores promedio de presión sistólica y peso corporal, así como los niveles séricos de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos, HDL, LDL, y lípidos totales, se muestran en la Tabla 12. En este lote, las ratas del grupo Sac₂ mantuvieron la elevación estadísticamente significativa de la presión sistólica, con respecto al grupo control₂, encontrada en la obtención del modelo experimental (128.13 ± 2.6 mmHg vs 104.5 ± 6.5 mmHg, $p < 0.05$). Se conservó también la elevación estadísticamente significativa de los niveles circulantes de insulina (14.4 ± 0.6 μ UI/ml vs 7 ± 0.3 μ UI/ml, $p < 0.05$) y triglicéridos en ayuno (182.9 ± 16.8 mg/dl vs 65.9 ± 3.3 mg/dl, $p < 0.05$).

En el grupo AGPI n-3₂ no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de presión sistólica, insulina y triglicéridos, con respecto al grupo control₂. Los niveles séricos de insulina (9.6 ± 0.7 μ UI/ml vs 14.4 ± 0.6 μ UI/ml, $p < 0.001$) y triglicéridos en ayuno (100.1 ± 16.1 mg/dl vs 182.9 ± 16.8 mg/dl, $p < 0.001$) fueron significativamente menores a los encontrados en el grupo Sac₂.

En el grupo AGPI n-6₂ el nivel promedio de presión sistólica fue superior al encontrado en el grupo control₂ (124.1 ± 6.4 mmHg vs 104.5 ± 6.5 mmHg), aunque la diferencia no presentó significancia estadística. Los niveles circulantes de insulina, en cambio, fueron significativamente superiores a los encontrados en el grupo control₂ (14.6 ± 1.5 μ UI/ml vs 7 ± 0.3 μ UI/ml, $p < 0.05$). Aunque los niveles circulantes de triglicéridos en ayuno fueron superiores a los encontrados en el grupo control₂, no presentaron significancia estadística, pero sí fueron significativamente inferiores con respecto al grupo Sac₂ (107.5 ± 12.1 mg/dl vs 182.9 ± 16.8 mg/dl, $p < 0.001$).

El grupo Def₂ presentó niveles de presión sistólica promedio no diferentes estadísticamente con respecto al grupo control₂. Los niveles circulantes de insulina se encontraron significativamente elevados con respecto al grupo control₂ (12 ± 1.3 μ UI/ml vs 7 ± 0.3 μ UI/ml, $p < 0.05$). Los niveles circulantes de triglicéridos en ayuno se encontraron significativamente elevados con respecto al grupo control₂ (114.6 ± 10.9 mg/dl vs 65.9 ± 3.3 mg/dl, $p < 0.05$), pero significativamente disminuídos con respecto al grupo Sac₂ (114.6 ± 10.9 mg/dl vs 182.9 ± 16.8 mg/dl, $p < 0.001$).

Tabla 12.- Niveles promedio de los parámetros asociados al Síndrome X, analizados en las ratas del lote 2 después de cuatro semanas de alimentación con las diferentes dietas.

Parámetro	Control ₂ n=9	Sac ₂ n=9	AGPI n-3 ₂ n=9	AGPI n-6 ₂ n=9	Def ₂ n=9
Presión sistólica (mm Hg)	104.5 ± 6.5	128.1 ± 2.6*	115 ± 3.1	124.1 ± 6.4	114.8 ± 3.6
Glucosa (mg/dl)	79.4 ± 6.2	98.8 ± 4	91.60 ± 8.1	87.60 ± 9.9	95.40 ± 7.5
Insulina (μUI/ml)	7 ± 0.3	14.4 ± 0.6*	9.6 ± 0.7**	14.6 ± 1.5*	12. ± 1.3*
Triglicéridos no ayuno (mg/dl)	173.2 ± 17.4	237.5 ± 31	215.8 ± 31.1	188.6 ± 29.6	168.30 ± 31.8
Triglicéridos ayuno (mg/dl)	65.9 ± 3.3	182.9 ± 16.8*	100.1 ± 16.1**	107.5 ± 12.1**	114.6 ± 10.9**
Colesterol (mg/dl)	53.2 ± 3.3	54.4 ± 4.7	56.6 ± 5.5	65.1 ± 4.1	59.3 ± 4.2
HDL (mg/dl)	51.8 ± 2.8	49.9 ± 3.6	52.3 ± 3.9	60 ± 2.7	51.8 ± 2.7
LDL (mg/dl)	6.5 ± 1.4	5.4 ± 0.9	8 ± 3.6	11.3 ± 3.6	5.3 ± 1
Lípidos Totales (g/l)	2.2 ± 0.13	2.8 ± 0.26	2.5 ± 0.49	2.3 ± 0.21	2.8 ± 0.21

*p<0.05 respecto al grupo control₂. **p<0.001 respecto al grupo Sac₂ Control₂ = grupo control; Sac₂ = grupo alimentado con la dieta rica en sacarosa; AGPI n-3₂ = grupo alimentado con el aceite de pescado; AGPI n-6₂ = grupo alimentado con aceite de maíz; Def₂ = grupo alimentado con el aceite de coco. Valores expresados como promedio ± error estándar.

Los niveles séricos de glucosa, colesterol, HDL, LDL y lípidos totales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos.

En la Figura 14 se muestran las curvas de tolerancia a la glucosa promedio encontradas para cada grupo, comparando las curvas de los grupos experimentales (AGPI n-3₂, AGPI n-6₂ y Def₂), con la del grupo control₂. Aunque en general los niveles de glucosa, a los diferentes tiempos monitoreados, estuvieron ligeramente elevados en las ratas de los grupos experimentales con respecto a los de las ratas del grupo control₂, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Las ratas del grupo control₂ y AGPI n-3₂

presentaron el pico de máxima glucosa a los 120 min, mientras que en los demás grupos, éste se presentó a los 60 min.

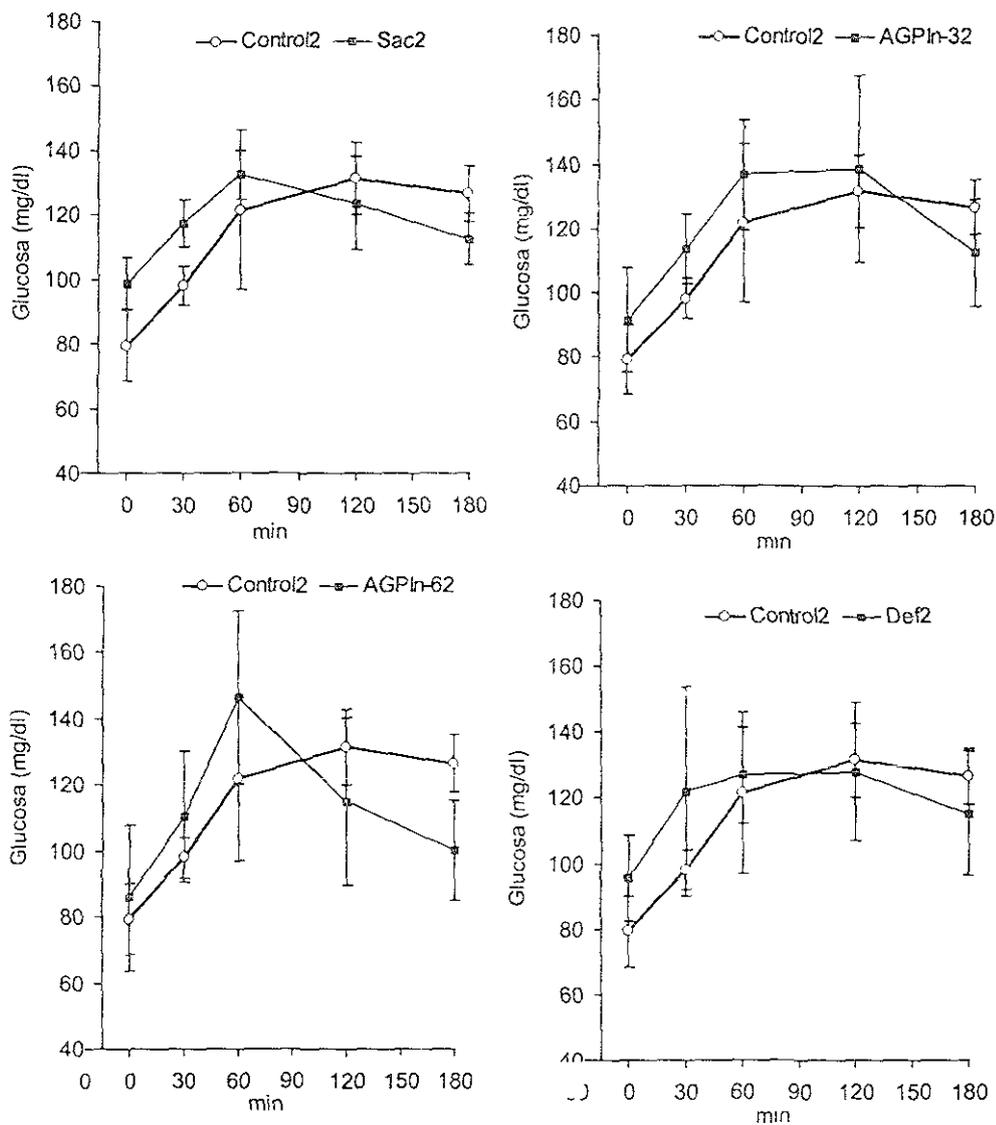


Figura 14.-Curvas de tolerancia a glucosa de las ratas del lote 2, después de la administración de las dietas ricas en AGPI durante cuatro semanas.

En la Figura 15 se muestran los niveles séricos de insulina promedio encontrados durante las pruebas de tolerancia a la glucosa. Los grupos Sac₂, AGPI n-6₂ y Def₂ presentaron concentraciones de insulina basales (tiempo 0

min) superiores a las 15 $\mu\text{UI}/\text{ml}$, y significativamente superiores a las encontradas en el grupo control₂ en los primeros puntos de la curva. En el grupo AGPI n-3₂, en cambio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control₂, con concentraciones basales por debajo de las 15 $\mu\text{UI}/\text{ml}$.

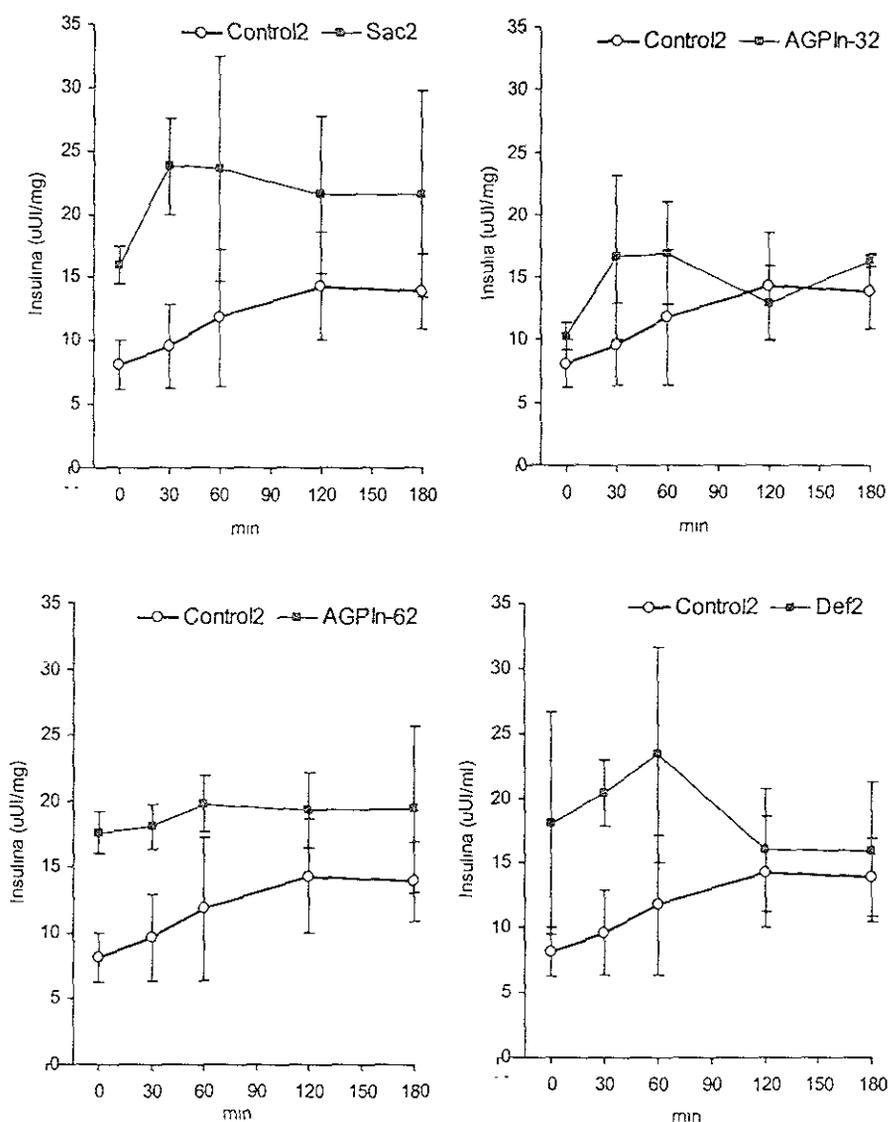


Figura 15.-Curvas de insulina en respuesta a un bolo de glucosa de las ratas del lote 2 después de la administración de las dietas ricas en AGPI durante cuatro semanas.

3.2.3 Lote 3

En la Tabla 13 se muestran los valores promedio de presión sistólica, y niveles séricos promedio de insulina, glucosa, triglicéridos, colesterol, HDL, LDL y lípidos totales, encontrados en las ratas del lote 3 después de cuatro semanas de alimentación con las diferentes dietas.

El grupo Sac₃ mantuvo la elevación estadísticamente significativa en los niveles promedio de presión sistólica, con respecto al grupo control₃, encontrado en la obtención del modelo experimental (126.3 ± 3.3 mmHg vs 109.1 ± 3.9 mmHg, $p < 0.01$). Los niveles circulantes de insulina y triglicéridos (no ayuno) se encontraron ligeramente elevados con respecto al grupo control₃, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. Los niveles séricos de triglicéridos en ayuno sí presentaron una elevación estadísticamente significativa con respecto al grupo control₃ (119.9 ± 13.5 mg/dl vs 74.2 ± 6.1 , $p < 0.01$).

En el grupo AGPI n-3₃ se encontró una disminución en los valores de presión sistólica, de manera que no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control₃, pero sí con respecto al grupo Sac₃ (111.8 ± 2.4 mmHg vs 126.5 ± 3.3 mmHg, $p < 0.01$). Los niveles séricos de triglicéridos (no ayuno) fueron significativamente menores a los encontrados en el grupo Sac₃ (108.8 ± 11.2 mg/dl vs 225.6 ± 19.3 mg/dl, $p < 0.01$), y los triglicéridos en ayuno fueron similares a los encontrados en el grupo control₃.

En el grupo AGPI n-6₃, los valores de presión sistólica se encontraron elevados con respecto al grupo control₃, aunque no presentaron significancia estadística. Sin embargo, tampoco presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo Sac₃. Los niveles circulantes de triglicéridos, con y sin ayuno, se encontraron similares a los del grupo control₃.

Tabla 13.- Niveles Promedio de los Parámetros Asociados al Síndrome X, Analizados en las Ratas del Lote 3 Después de Cuatro Semanas de Alimentación con las Diferentes Dietas.

Parámetro	Control ₃ n=9	Sac ₃ n=9	AGPI n-3 ₃ n=9	AGPI n-6 ₃ n=9	Def ₃ n=9
Presión sistólica (mm Hg)	109.1 ± 3.9	126.5 ± 3.3 *	111.8 ± 2.4**	122.7 ± 2.6	119.3 ± 5.1
Glucosa (mg/dl)	76.7 ± 5.2	88.1 ± 6.3	97.4 ± 9.5	98.1 ± 8.1	94.6 ± 2.6
Insulina (μU/ml)	8.60 ± 1.1	10.30 ± 1.5	7.34 ± 0.5	8.40 ± 1.2	7.80 ± 0.8
Triglicéridos no ayuno (mg/dl)	153.6 ± 21.6	225.6 ± 19.3	108.8 ± 11.2 **	169.1 ± 21.1	126.2 ± 9.5 **
Triglicéridos ayuno (mg/dl)	74.2 ± 6.1	119.9 ± 13.5*	84.8 ± 7.9	76.6 ± 13	110.6 ± 8.5*
Colesterol (mg/dl)	59.5 ± 3.4	55.2 ± 3.9	55.6 ± 5.8	54.7 ± 3.4	57.9 ± 3.8
HDL (mg/dl)	45.70 ± 4.3	39.20 ± 3.3	45.1 ± 4.6	35.8 ± 2.1	38.60 ± 3.2
LDL (mg/dl)	26.3 ± 3.3	27.8 ± 1.8	29.7 ± 4.2	34.7 ± 2.6	40.8 ± 1*
LT (g/l)	3.57 ± 0.31	2.91 ± 0.18	3.48 ± 0.18	2.94 ± 0.04	2.78 ± 0.18

*p<0.01 respecto al grupo control₃. **p<0.01 respecto al grupo Sac₃. Control₃ = grupo control; Sac₃ = grupo alimentado con la dieta rica en sacarosa; AGPI n-3₃ = grupo alimentado con el aceite de pescado; AGPI n-6₃ = grupo alimentado con aceite de maíz; Def₃ = grupo alimentado con el aceite de coco. Valores expresados como promedio ± error estándar.

El grupo alimentado con el aceite de coco (Def₃) únicamente presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control₃ en los valores de triglicéridos en ayuno. Los niveles séricos de triglicéridos (no ayuno) se encontraron significativamente disminuidos con respecto al grupo Sac₃.

Los niveles circulantes de glucosa, colesterol, HDL, LDL y lípidos totales no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos.

En la Figura 16 se muestran las curvas de tolerancia a la glucosa promedio obtenidas en los diferentes grupos, en comparación con la obtenida para el grupo control₃. Al igual que lo obtenido en el lote 2, los niveles de glucosa en todos los grupos experimentales se encontraron por encima de los del grupo

control₃, aunque en ningún caso se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

En la Figura 17 se muestran las respuestas en los niveles de insulina durante las pruebas de tolerancia a la glucosa. En este caso, los valores de los grupos experimentales se encontraron en general por debajo de los encontrados en el grupo control₃, aunque en ningún caso los valores presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Con el objeto de comparar los resultados obtenidos en los dos lotes de ratas macho, los parámetros en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas fueron promediados obteniéndose un sólo valor promedio para los dos lotes. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14.- Valores Promedio de Presión Sistólica, y Valores Circulantes de Insulina y Triglicéridos de los Lotes de Ratas Macho 1 y 2.

Parámetro	Control	Sac	AGPI n-3	AGPI n-6	Def
Presión sistólica (mm Hg)	109.3 ± 3.4	127.3 ± 2 *	113.4 ± 2 **	123.4 ± 3.5 *	116.7 ± 2.9
Insulina (μUI/ml)	7.8 ± 0.6	12.7 ± 0.9 *	8.7 ± 0.6 **	11.8 ± 1.3 *	9.6 ± 1
Triglicéridos ayuno (mg/dl)	70.8 ± 3.5	150.6 ± 15.3 *	90.6 ± 7.6 **	94.6 ± 9.6 **	112.9 ± 7.1 ***

* p< 0.003 respecto al grupo control ** p<0.003 respecto al grupo Sac
Valores expresados como promedio ± error estándar.

Como puede observarse, la presión sistólica se encontró significativamente elevada en los grupos Sac y AGPI n-6, con respecto al grupo control (127.3 ± 2 mmHg y 123.4 ± 3.5 mmHg vs 109.3 ± 3.4 mmHg, p<0.003). En cambio, los grupos AGPI n-3 y Def no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, y el grupo AGPI n-3 tuvo una disminución significativa en la presión sistólica, en comparación con el grupo Sac (113.4 ± 2 mmHg vs 127.3 ± 2 mmHg, p<0.003).

Los niveles circulantes de insulina se encontraron significativamente elevados en los grupos Sac y AGPI n-6 con respecto al grupo control (12.7 ± 0.9 μUI/ml y 11.8 ± 1.3 μUI/ml vs 7.8 ± 0.6 μUI/ml, p<0.003). Al igual que en el caso de la presión sistólica, los grupos AGPI n-3 y Def no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, y los niveles de

insulina en el AGPI n-3 se encontraron significativamente disminuidos con respecto al grupo Sac ($8.7 \pm 0.6 \mu\text{UI/ml}$ vs $12.7 \pm 0.9 \mu\text{UI/ml}$, $p < 0.003$).

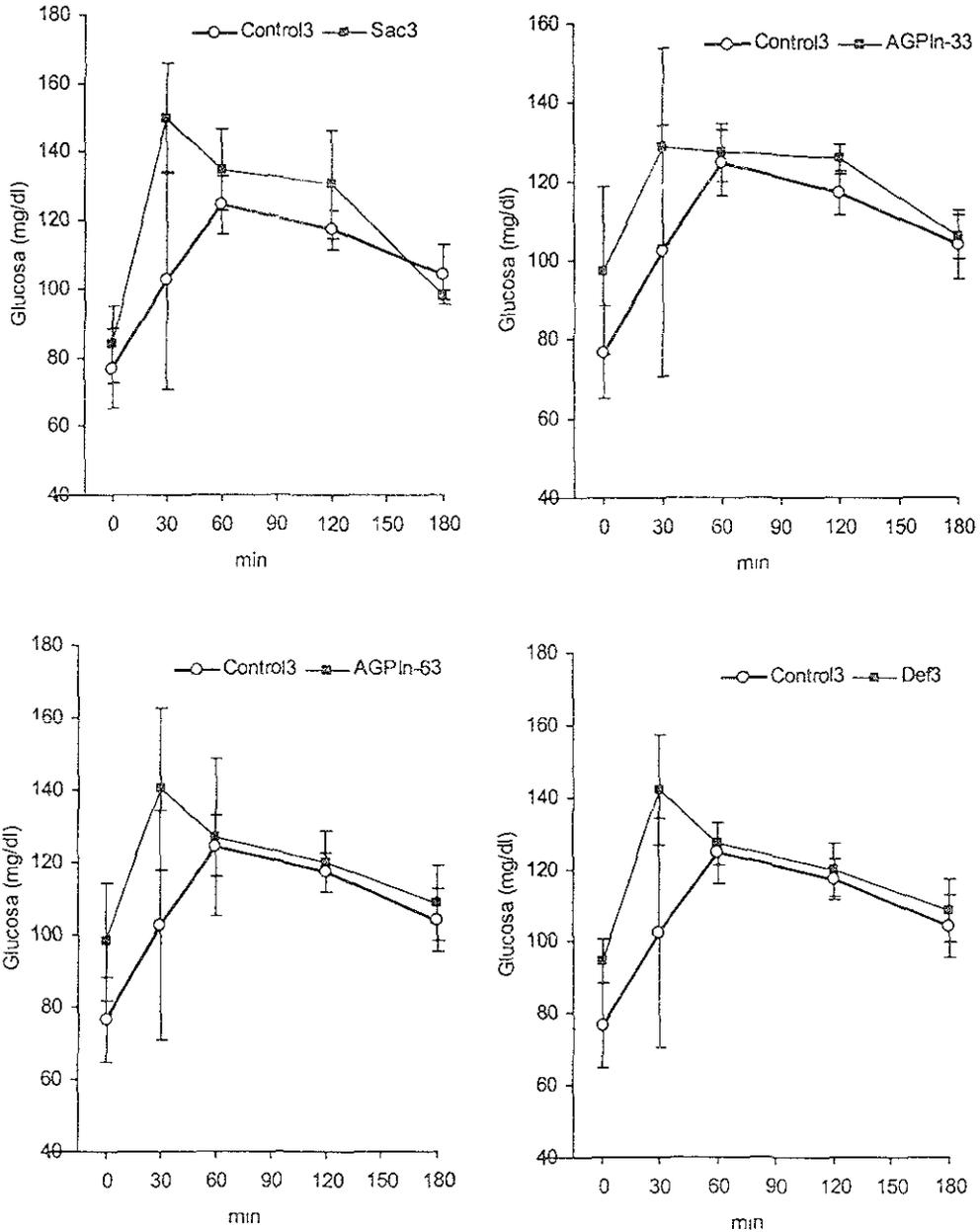


Figura 16.-Curvas de tolerancia a glucosa de las ratas del lote 3, después de la administración de las dietas ricas en AGPI durante cuatro semanas.

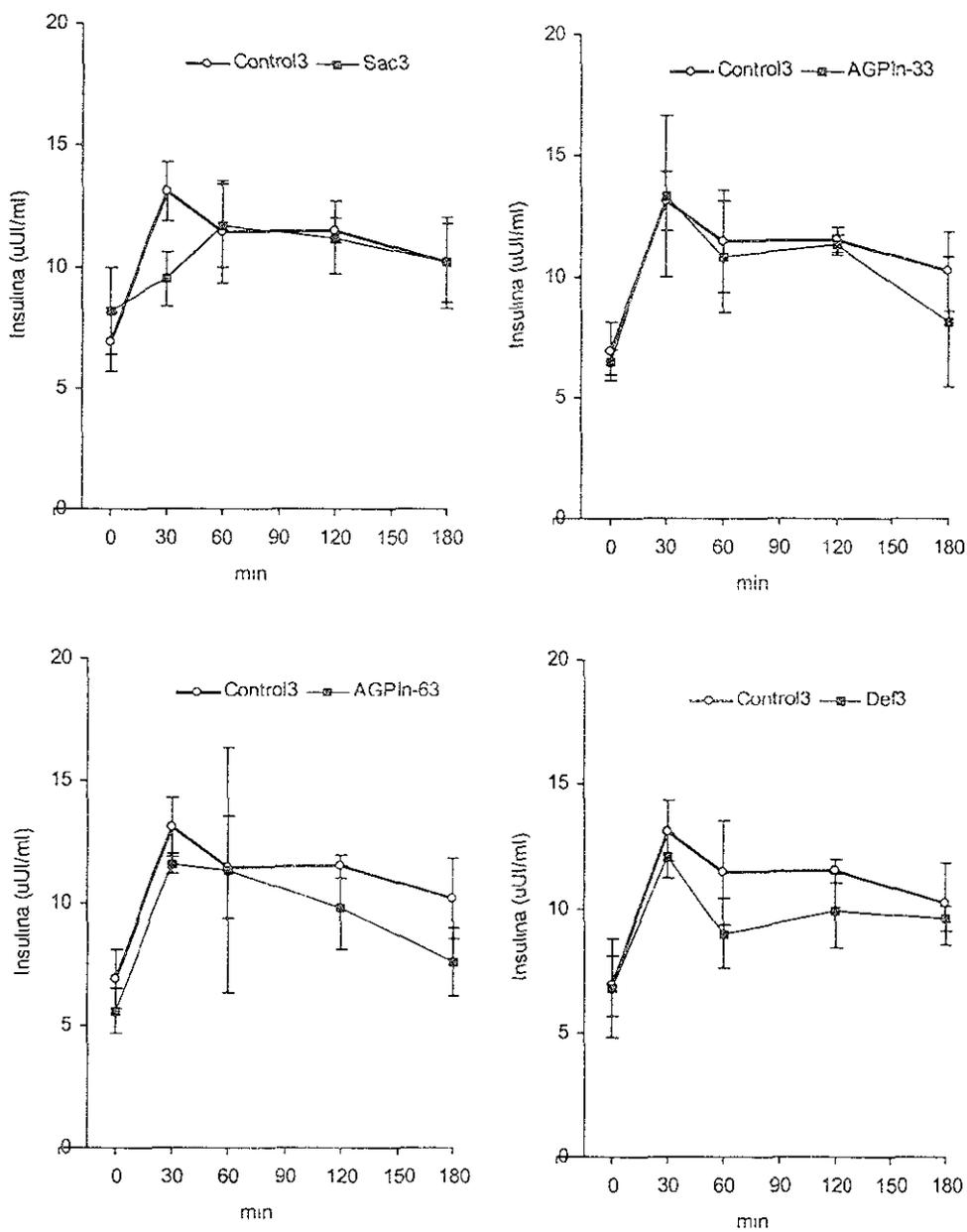


Figura 17.-Curvas de insulina en respuesta a un bolo de glucosa de las ratas del lote 3, después de la administración de las dietas ricas en AGPI durante cuatro semanas.

Los niveles circulantes de triglicéridos en ayuno se encontraron elevados significativamente con respecto al grupo control en los grupos Sac y Def (150.6 ± 15.3 mg/dl y 112.9 ± 7.1 mg/dl vs 70.8 ± 3.5 mg/dl, $p < 0.003$). Los niveles de los grupos AGPI n-3, AGPI n-6 y Def se encontraron significativamente disminuidos con respecto al grupo Sac (90.6 ± 7.6 mg/dl, 94.6 ± 9.6 mg/dl y 112.9 ± 7.1 mg/dl vs 150.6 ± 15.3 mg/dl, $p < 0.003$).

En la Figura 18 se muestra la comparación de las diferencias encontradas entre cada grupo con respecto al grupo control, de los parámetros que se encontraron alterados con la administración de las diferentes dietas. Para el caso de la presión arterial, el grupo Sac presentó un promedio de 20.5 ± 1.6 mmHg de diferencia con respecto al grupo control. El grupo AGPI n-3 presentó 4.2 ± 1 mmHg de diferencia y el grupo Def, 6.6 ± 1.3 , que resultaron ser estadísticamente diferentes a las encontradas en el grupo Sac ($p < 0.001$). La diferencia promedio entre en grupo AGPI n-6 y el control (12.9 ± 1.2) no fue estadísticamente diferente que la encontrada para el grupo Sac.

En cuanto a los niveles séricos de insulina, el grupo Sac mostró una diferencia promedio de 5 ± 0.9 μ UI/ml con respecto al grupo control. Al igual que en el caso de la presión sistólica, los grupos AGPI n-3 y Def presentaron diferencias promedio estadísticamente diferentes a las encontradas en el grupo Sac (1.4 ± 0.4 y 2.7 ± 0.7 μ UI/ml, respectivamente, $p < 0.001$). La diferencia promedio encontrada en el grupo AGPI n-6 no mostró significancia estadística con respecto al grupo Sac (4.2 ± 1.3 μ UI/ml).

Con respecto a los niveles circulantes de triglicéridos, el grupo Sac mostró una diferencia promedio con respecto al control de 81.1 ± 13.8 mg/dl. Las diferencias promedio encontradas en los otros tres grupos fueron estadísticamente diferentes con respecto al grupo Sac ($p < 0.001$), siendo de 23.8 ± 5.4 mg/dl para el grupo AGPI n-3, de 26.8 ± 7.7 mg/dl para el grupo AGPI n-6, y de 42.1 ± 5.3 mg/dl para el grupo Def.

ASIA TESIS 2011
DE LA ESCUELA

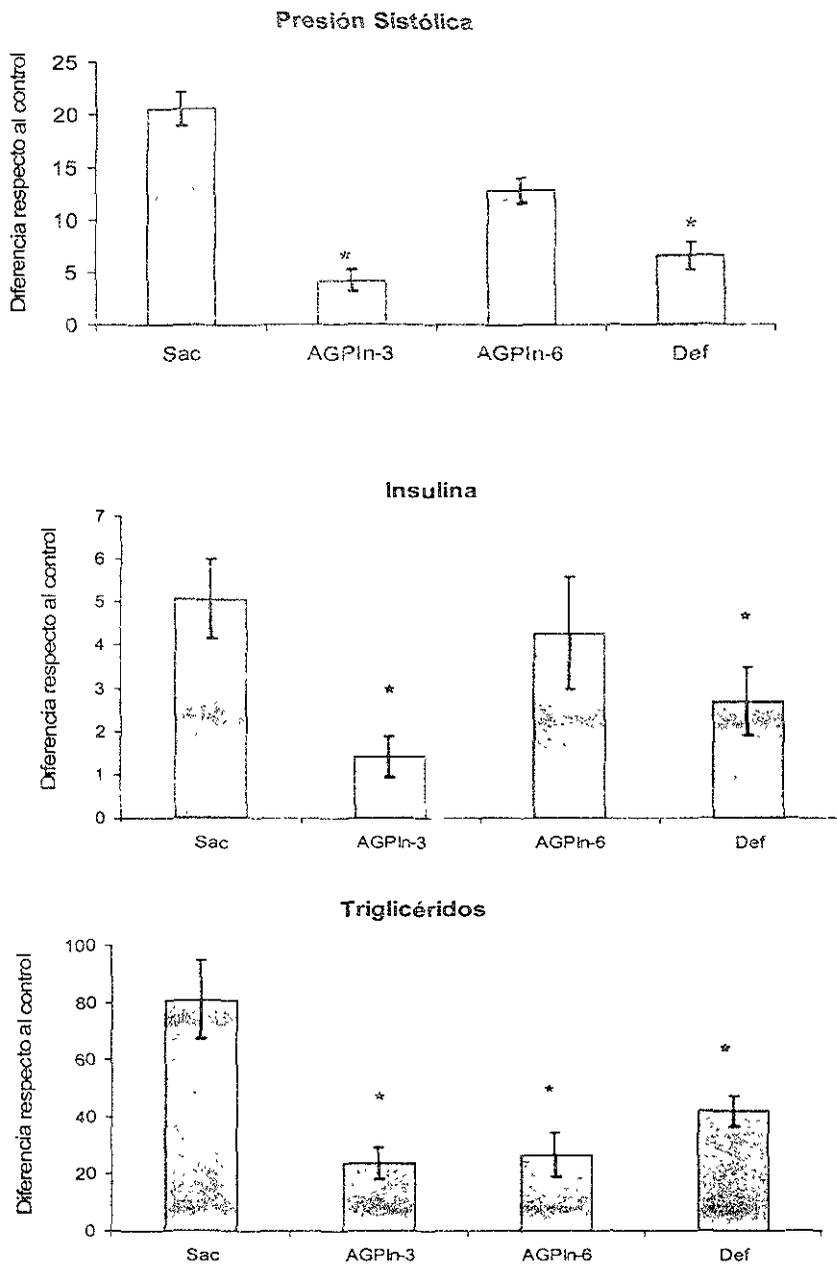


Figura 18.- Diferencias en los niveles de presión sistólica, insulina y triglicéridos de los grupos experimentales de ratas macho con respecto al grupo control. * $p < 0.005$ respecto al grupo Sac

La proporción de ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3 fue mayor en los grupos Sac₁ y AGPI n-3₁, y no fueron detectados en el grupo Def₁. Los tres tipos de ácidos grasos n-3 fueron detectados en los grupos Sac₁ y AGPI n-3₁, en especial el 22:6 n-3 en el grupo AGPI n-3₁.

En el grupo Def₁ fue posible detectar el ácido graso 20:3 de la familia n-9.

Finalmente, la relación n-6/n-3 se encontró disminuida en los grupos Sac₁ y AGPI n-3₁, en especial en éste último.

3.3.2. Lote 2.

En este grupo se analizó la composición de ácidos grasos del tejido adiposo epididimario y perirenal de las ratas del modelo experimental, y después de la administración de las diferentes dietas.

En el caso de las ratas del modelo experimental, se analizó la composición de fosfolípidos por medio de cromatografía en capa fina del grupo control₂ y Sac₂, y posteriormente, la composición de ácidos grasos de cada uno de ellos. Las clases de fosfolípidos que fueron identificados en ambos grupos fueron, en orden de abundancia, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. La abundancia de cada fosfolípido fue determinada cualitativamente, ya que la cantidad obtenida se encontró por debajo de los límites de sensibilidad de método de cuantificación de fósforo y no pudo determinarse.

En las Tablas 16-19 se muestra la composición de ácidos grasos de cada fosfolípido analizado.

Tabla 15.- Composición de Ácidos Grasos del Tejido Adiposo Abdominal de las Ratas del Lote 1, Después de Cuatro Semanas de Administración de las Dietas Ricas en Ácidos Grasos Poliinsaturados.

Ácido graso	Control ₁ %	Sac ₁ %	AGPI n-3 ₁ %	AGPI n-6 ₁ %	Def ₁ %
Saturados					
14:0	0.29	1.95	1.87	2.3	1.96
16:0	38.1	42.26	39.11	39.4	35.81
18:0	17.3	16.26	14	16.75	15.55
20:0	nd	0.21	2.71	1.38	nd
22:0	3.66	1.01	0.97	3.4	0.88
24:0	1.3	0.23	nd	1.36	3.15
Total	60.65	61.92	58.66	64.59	57.35
Monoinsaturados					
14:1	1.96	0.046	0.068	0.14	0.14
16:1	0.37	3	5.06	0.18	0.2
18:1	6.3	6.09	6.9	7.84	10.88
20:1	1.15	nd	0.662	nd	nd
22:1	nd	0.33	0.47	0.56	nd
24:1	nd	0.31	0.53	nd	1.48
Total	9.78	9.77	13.69	8.72	12.7
Poliinsaturados					
20:2	1.05	0.14	0.105	0.19	nd
20:3n-9	nd	nd	nd	nd	17.51
total n-6	1.05	0.14	0.105	0.19	17.51
18:2n-6	7.36	4.45	5.61	7.26	11.81
18:3n-6	4.6	nd	nd	2.3	nd
20:3n-6	0.88	0.14	0.167	0.3	nd
20:4n-6	11.87	15.53	nd	15.44	0.6
22:5n-6	2.8	3.64	nd	1.26	nd
Total	27.51	23.76	5.77	26.56	12.41
n-3					
18:3n-3	1.68	2.22	1.09	nd	nd
20:5n-3	1.09	0.54	0.88	0.77	nd
22:6n-3	nd	1.57	2.85	nd	nd
Total	2.77	4.33	4.82	0.77	nd
n-6/n-3	9.93	5.48	1.19	34.49	-
Total PI	31.33	28.23	10.69	27.52	29.92
AGPI C20-22	17.69	21.56	4.002	17.96	18.11
SAT/PI	1.93	2.19	5.48	2.34	1.91

En lo que se refiere a la fosfatidilcolina (Tabla 16), las ratas del grupo control₁ presentaron un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados con respecto al grupo Sac₁, lo que se vio reflejado en una mayor relación SAT/PI. Por su parte, el grupo Sac₁ presentó un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados y de cadena larga. En el grupo control₁ se encontró una mayor proporción de AGPI n-6, y no fue posible detectar ningún ácido graso de la familia n-3.

En el caso de la fosfatidiletanolamina (Tabla 17), se encontró una mayor proporción de ácidos grasos saturados que de insaturados en ambos grupos (control₂ y Sac₂), aunque en el grupo Sac₂ se encontró una menor proporción de saturados y monoinsaturados con respecto al grupo control₂. Por el contrario, la proporción de poliinsaturados fue mayor en el grupo Sac₂. Es importante señalar la mayor concentración de 20:4 n-6 y 22:5 n-6 en las ratas del grupo Control₂, y la mayor concentración de 20:5 n-3 y 22:6 n-3 en el grupo Sac₂.

Finalmente, la proporción de ácidos grasos de cadena larga fue semejante en ambos grupos, pero el índice de insaturación fue menor en las ratas del grupo Sac₂.

Para la fosfatidilserina (Tabla 18), se encontró también una mayor proporción de ácidos grasos saturados que de insaturados en ambos grupos, no encontrándose diferencias notables entre ellos. El grupo Sac₂ presentó una mayor proporción de poliinsaturados con respecto al grupo control₂, aunque la diferencia no fue tan notable como en los casos anteriores. La proporción de ácidos grasos n-6 fue muy semejante en ambos grupos, pero el grupo Sac₂ mostró un mayor porcentaje de ácidos grasos n-3. En el grupo Sac₂ se encontró también una mayor proporción de ácidos grasos de cadena larga, y el índice de insaturación fue menor con respecto al grupo control₂.

Esta situación se vio invertida en el caso del fosfatidilinositol (Tabla 19), ya que las ratas del grupo control₂ presentaron un menor índice de insaturación que las del grupo Sac₂, y el porcentaje total de ácidos grasos de cadena larga fue mayor. La proporción de ácidos grasos saturados fue mayor en las ratas del grupo Sac₂, debido principalmente a un aumento notable en la proporción del 24:0, pero el de monoinsaturados fue menor. La proporción de poliinsaturados fue muy semejante en ambos casos, aunque en el grupo Sac₂ se encontró una menor proporción de ácidos grasos n-3.

Tabla 16.- Composición de Ácidos Grasos de la Fosfatidilcolina Separada de las Membranas de los Adipocitos Epididimarios y Perirenales de las Ratas del Lote 2, Después de Administración del Agua Endulzada con Sacarosa al 30% Durante 13 Semanas.

Ácido Graso	Control2 %	Sac2 %*
Saturados		
12:0	1.81	1.14
14:0	1.22	0.95
16:0	26.16	17.98
17:0	0.09	0.37
18:0	14.94	10.24
20:0	0.28	nd
22:0	nd	1.99
24:0	9.99	13.84
Total	54.49	46.51
Monoinsaturados		
18:1	3.68	2.34
20:1	0.9	nd
22:1	18.63	13.17
Total	23.21	15.51
Poliinsaturados		
18:4	0.79	0.84
20:2	6.88	5.43
Total	7.67	6.27
n-6		
18:2 n-6	0.58	0.53
20:3n-6	1.76	1.34
20:4n-6	6.38	4.22
22:5n-6	5.91	1.49
Total	14.63	7.58
n-3		
20:5n-3	nd	3.24
22:6n-3	nd	20.9
Total	nd	24.14
ΣAGPI	22.30	37.99
AGPI C20-22	12.15	29.85
SAT/PI	2.44	1.22

Tabla 17.- Composición de Ácidos Grasos de la Fosfatidiletanolamina Separada de las Membranas de los Adipocitos Epididimarios y Perirenales de las Ratas del Lote 2, Después de Administración del Agua Endulzada con Sacarosa al 30% Durante 13 Semanas.

Ácido Graso	Control2 %	Sac2 %*
Saturados		
12:0	1.59	1.46
14:0	1.44	0.72
16:0	32.89	23.83
17:0	nd	0.46
18:0	21.26	13.58
20:0	nd	0.53
24:0	6.3	17.92
Total	63.47	58.49
Monoinsaturados		
18:1	4.73	2.8
20:1	8.63	nd
24:1	nd	3.41
Total	13.36	6.21
Poliinsaturados		
18:4	nd	0.88
20:2	nd	7.16
Total	nd	8.04
n-6		
18:2n-6	nd	0.74
20:3n-6	nd	2.20
20:4n-6	13.89	5.67
22:5n-6	8.8	nd
Total	22.69	8.61
n-3		
20:5n-3	0.47	4.16
22:6n-3	nd	14.50
Total	0.47	18.66
ΣAGPI	23.17	35.31
AGPI C20-22	23.16	24.33
SAT/PI	2.73	1.65

Tabla 18.- Composición de Ácidos Grasos de la Fosfatidilserina Separada de las Membranas de los Adipocitos Epididimarios y Perirenales de las Ratas del Lote 2, Después de Administración del Agua Endulzada con Sacarosa al 30% Durante 13 Semanas.

Ácido Graso	Control2 %	Sac2 %
Saturados		
12:0	1.31	1.39
14:0	1.22	1.27
16:0	24.45	24.54
17:0	0.40	0.45
18:0	13.59	13.60
20:0	0.90	0.48
22:0	0.47	nd
24:0	21.44	17.98
Total	63.78	59.72
Monoinsaturados		
18:1	4.69	3.18
20:1	1.57	nd
22:1	0.34	nd
24:1	nd	4.48
Total	6.6	7.66
Poliinsaturados		
18:4	1.42	0.65
20:2	7.95	5.74
Total	9.37	6.39
n-6		
18:2n-6	0.81	nd
18:3n-6	0.69	0.73
20:3n-6	1.95	2.51
20:4n-6	5.41	5.56
22:5n-6	5.56	6.17
Total	14.42	14.97
n-3		
20:5n-3	5.85	4.30
22:6n-3	nd	6.93
Total	5.85	11.23
ΣAGPI	29.6	32.61
AGPI C20-22	16.82	22.96
SAT/PI	2.15	1.83

Tabla 19.- Composición de Ácidos Grasos del Fosfatidilinositol Separado de las Membranas de los Adipocitos Epididimarios y Perirenales de las Ratas del Lote 2, Después de Administración del Agua Endulzada con Sacarosa al 30% Durante 13 Semanas.

Ácido Graso	Control2 %	Sac2 %
Saturados		
12:0	1.31	1.28
14:0	0.66	1.18
16:0	19.72	22.06
17:0	0.42	nd
18:0	11.38	11.88
20:0	nd	1.03
22:0	nd	2.10
24:0	18.18	24.86
Total	52.09	64.38
Monoinsaturados		
18:1	2.44	5.83
20:1	0.43	1.06
22:1	16.51	2.01
24:1	0.83	nd
Total	19.78	8.89
Poliinsaturados		
18:4	0.96	1.41
20:2	4.86	6.56
Total	5.82	7.97
n-6		
18:2n-6	0.58	0.57
20:3n-6	1.66	1.3
20:4n-6	4.64	4.37
22:5n-6	4.78	4.23
Total	11.66	10.47
n-3		
20:5n-3	0.03	8.27
22:6n-3	10.62	nd
Total	10.65	8.27
ΣAGPI	28.12	26.73
AGPI C20-22	20.07	16.87
SAT/PI	1.85	2.4

La composición de ácidos grasos de las membranas del tejido adiposo epididimario y perirenal de las ratas del lote 2 después de la administración de las diferentes dietas, se muestra en la Tabia 20.

En este lote, las ratas del grupo Def₂ presentaron un aumento en el porcentaje de ácidos grasos saturados totales. El ácido graso 24:0 sólo fue detectado en los grupos Sac₂ y Def₂. Se encontró un aumento en el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados en las ratas de los grupos AGPI n-3₂ y Def₂, especialmente del 18:1.

En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados, los que se encontraron en mayor abundancia fueron el 20:2 y el 18:2 n-6 en todos los grupos. En todos los grupos experimentales se encontró una mayor proporción de AGPI n-6 con respecto al grupo control₂. En el grupo Sac₂ sólo se detectaron n-6 de cadena corta (18:2 y 18:3). Es importante señalar la ausencia del 20:4 n-6 en el grupo AGPI n-3₂.

En cuanto a los AGPI n-3, se encontró un aumento importante de los mismos en el grupo AGPI n-3₂, encontrándose especialmente el 20:5 y el 22:6. Se pudieron detectar únicamente el 18:3 en los grupos control₂, AGPI n-6₂ y Def₂, y el 20:5 en el grupo Sac₂.

Los grupos AGPI n-3₂ y n-6₂ presentaron los niveles más altos de ácidos grasos de cadena larga, y el grupo Def₂ tuvo el índice de insaturación más elevado. En cuanto a la relación n-6/n-3, todos los grupos, a excepción del AGPI n-3₂ (3.9), tuvieron valores por arriba de 10. El más elevado se encontró en el grupo Def₂, con 21.4.

3.3.3. Lote 3.

En este grupo se determinó la composición de ácidos grasos de las membranas del tejido adiposo epididimario y perirenal al finalizar la administración de las diferentes dietas durante cuatro semanas. Los resultados se muestran en la Tabla 21.

En este lote no se observaron diferencias en los porcentajes de ácidos grasos saturados entre los diferentes grupos. En cambio, los monoinsaturados se encontraron elevados en los grupos experimentales con respecto al grupo control₃, en especial el 16:1 y el 18:1.

Tabla 20.- Composición de Ácidos Grasos de las Membranas de los Adipocitos Epididimarios y Perirenales de las Ratas del Lote 2, Después de Cuatro Semanas de Alimentación con las Dietas Ricas en Ácidos Grasos Poliinsaturados.

Ácido graso	Control2 %	Sac2 %	AGPI n-32 %	AGPI n-62 %	Def2 %
Saturados					
12.0	0.914	1.318	0.495	0.648	2.323
14.0	4.143	3.581	2.637	3.038	5.661
16.0	30.857	31.112	31.630	34.551	30.694
18.0	6.551	5.914	5.250	5.832	7.769
20.0	0.443	1.012	1.079	0.691	0.994
24.0	0.000	0.543	0.000	0.000	0.514
Total	42.907	43.480	41.092	44.761	47.956
Monoinsaturados					
14.1	1.209	0.951	0.617	0.935	1.576
16.1	4.315	5.889	7.071	4.492	6.886
18.1	19.951	17.141	24.586	16.032	21.848
20.1	1.570	1.677	1.339	0.566	0.564
22.1	1.570	1.677	1.339	0.224	0.564
Total	28.614	27.336	34.953	22.249	31.437
Poliinsaturados					
16.2	4.099	4.689	1.409	3.038	5.157
20.2	20.363	16.425	14.568	25.029	8.428
20.3n-9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
total	24.462	21.114	15.976	28.067	13.585
n-6					
18.2n-6	3.340	3.932	5.235	2.476	4.501
18.3n-6	0.000	3.696	0.000	0.422	0.000
20.3n-6	0.000	0.000	0.641	0.504	1.603
20.4n-6	0.408	0.000	0.000	0.387	0.604
22.5n-6	0.000	0.000	0.493	0.874	0.000
Total	3.748	7.627	6.368	4.662	6.708
n-3					
18.4n-3	0.000	0.000	0.476	0.000	0.000
18.3n-3	0.268	0.000	0.511	0.260	0.313
20.5n-3	0.000	0.443	0.336	0.000	0.000
22.6n-3	0.000	0.000	0.289	0.000	0.000
Total	0.268	0.443	1.611	0.260	0.313
n-6/n-3	13.98	17.223	3.953	17.913	21.423
Total PI	28.479	29.185	23.955	32.990	20.607
AGPI C20-22	0.408	0.443	1.117	1.261	0.604
SAT/PI	1.50	1.48	1.71	1.35	2.32

Tabla 21.- Composición de Ácidos Grasos de las Membranas de los Adipocitos Epididimarios y Perirenales de las Ratas del Lote 3, Después de Cuatro Semanas de Alimentación con las Dietas Ricas en Ácidos Grasos Poliinsaturados.

Ácido graso	Control3 %	Sac3 %	AGPI n-33 %	AGPI n-63 %	Def3 %
Saturados					
12.0	0.787	0.765	0.800	0.433	1.413
14.0	3.081	3.367	3.962	2.445	3.281
16.0	32.565	29.169	27.485	31.142	28.806
18.0	7.139	7.395	6.433	6.866	8.384
20.0	0.564	0.566	0.692	0.218	0.479
22.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.093
24.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.203
Total	44.136	41.261	39.371	41.103	42.659
Monoinsaturados					
14.1	0.810	0.456	1.234	0.358	0.307
16.1	5.984	9.170	11.682	9.829	8.374
18.1	26.306	36.651	33.778	38.135	31.073
20.1	0.815	0.562	0.383	0.451	0.512
22.1	0.000	0.000	0.000	0.122	0.233
Total	33.914	46.839	47.078	48.895	40.498
Poliinsaturados					
16.2	2.121	0.000	0.850	0.275	0.622
20.2	9.765	2.932	3.672	0.371	5.806
20.3n-9	0.000	0.000	0.000	0.000	0.309
Total	11.886	2.932	4.522	0.646	6.737
n-6					
18.2n-6	9.042	8.602	8.306	8.330	6.869
18.3n-6	0.000	0.366	0.000	0.045	0.268
20.3n-6	0.000	0.000	0.259	0.497	2.711
20.4n-6	0.596	0.000	0.000	0.000	0.175
22.5n-6	0.000	0.000	0.000	0.265	0.082
Total	9.638	8.968	8.566	9.138	10.106
n-3					
18.3n-3	0.426	0.000	0.464	0.218	0.000
20.5n-3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
22.6n-3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Total	0.426	0.000	0.464	0.218	0.000
n-6/n-3	22.628	0.000	18.455	41.956	0.000
Total PI	21.950	11.900	13.551	10.002	16.843
AGPI C20-22	0.596	0.000	0.000	0.265	0.257
SAT/PI	2.01	3.46	2.90	4.10	2.53

En cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados, los que se encontraron en una mayor proporción fueron el 20:2 y el 18:2 n-6. En general se detectó una baja concentración de ácidos grasos poliinsaturados en los grupos experimentales, en especial en los grupos Sac₃ y AGPI n-6₃, lo que provocó un aumento en el índice de insaturación de los mismos.

Los porcentajes de AGPI n-6 se encontraron más o menos constantes en todos los grupos. Los AGPI n-3 se encontraron en general en muy bajas concentraciones, y no fueron detectados en los grupos Sac₃ y Def₃. Esto provocó un aumento en la relación n-6/n-3 en los grupos control₃, AGPI n-3₃ y n-6₃. Se encontraron también pocos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en general en todos los grupos experimentales.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El objetivo del presente trabajo fue el de analizar el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales dietarios sobre algunos parámetros metabólicos del síndrome de resistencia a la insulina, en un modelo experimental inducido por sacarosa en ratas.

El modelo se obtuvo mediante la administración de sacarosa al 30% en el agua de beber durante 13 semanas. Este modelo ha sido utilizado en diversos estudios sobre hipertrigliceridemia, resistencia a la insulina e hipertensión, ya que con la ingesta de dietas ricas en sacarosa es posible obtener incrementos en los niveles circulantes de triglicéridos, de insulina y en la presión arterial en animales de experimentación y en humanos.

En el presente trabajo la administración de sacarosa en ratas provocó incrementos significativos en la presión arterial y los niveles séricos de insulina y triglicéridos, similares a los reportados en la literatura, si bien se encontró cierta variabilidad, semejante también a lo encontrado por otros autores. Para el caso de la presión arterial, se encontraron incrementos entre el 12% (en el lote 1) y el 27% (en el lote 3), que coinciden con reportes de elevaciones entre el 17% y el 30% en otros trabajos (17%, Hwang 1987; 19%, El Hafidi 1999; 30%, El Hafidi 2001).

Los incrementos encontrados en los niveles de insulina variaron entre el 19.7% (en el lote 3) y el 124% (en el lote 2), de manera semejante a lo reportado en la literatura, donde obtienen incrementos que van del 25% al 119% (25%, Wright, 1983; 41%, Tobey 1982; 51%, El Hafidi ; 70% Zavaroni ; 83%, Hwang ; 119%, Thorburn).

Los niveles de triglicéridos se encontraron aumentados entre el 35% (en el lote 3) y el 177.5% (en el lote 2). Nuevamente, los incrementos coinciden con los reportados en la literatura, que van del 50% al 162% (50%, Thorburn 1989; 71%, El Hafidi 1999; 91%, Bezerra 2000; 118%, El Hafidi 2000; 162%, Hwang 1987).

La sensibilidad a la insulina fue determinada por medio de curvas de tolerancia a la glucosa, donde se encontraron también algunas variaciones. En el caso de las ratas macho, se encontraron niveles más altos de glucosa (lotes 2 y 3) y de insulina (lote 2) a lo largo del tiempo de duración de la prueba en las ratas

alimentadas con sacarosa con respecto al grupo control, a diferencia de las ratas hembra, donde se observó que las concentraciones de glucosa permanecieron elevadas por más tiempo (lote 1). Estas alteraciones en las curvas de tolerancia a la glucosa, aunado a la hiperinsulinemia observada en los niveles séricos basales, permitieron sugerir la presencia de resistencia a la insulina en estas ratas, como lo reportado en la literatura (Storlien, 1996).

Si bien en las ratas hembras se encontraron elevaciones en la presión arterial y en los niveles séricos de insulina, los cambios fueron más evidentes en las ratas macho, por lo que se recomienda el uso de ratas macho para la obtención de este modelo experimental.

A pesar de la variabilidad en la alteración de los parámetros analizados, este modelo ha sido aceptado como representativo del síndrome de resistencia a la insulina, ya que se presentan alteraciones metabólicas similares, y de magnitud semejante, a las encontradas en los pacientes con este síndrome. Además, se han sugerido mecanismos semejantes responsables de estas alteraciones en ambos casos, como la estimulación de la expresión y actividad de enzimas lipogénicas hepáticas (acetil CoA carboxilasa y enzima málica) por la sacarosa, para explicar el incremento en los niveles de triglicéridos (Seboková, 1997); el efecto de la sacarosa en la disminución en la unión de la insulina a sus receptores de membrana en adipocitos que provoca la hiperinsulinemia, la que a su vez sobreestimula el sistema nervioso simpático (Stolba, 1992; Klimes, 1993), alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos (El Hafidi, 2000 ; Pérez, 1999) y disfunción endotelial (El Hafidi, 1999), como causantes de la elevación en la presión arterial, y una disminución en la fosforilación del receptor de insulina y del IRS1 (Bezerra, 2000), como posible responsable del desarrollo de la resistencia a la insulina.

Por otro lado, aunque el síndrome de resistencia a la insulina tiene un origen multifactorial, dependiendo de factores tanto genéticos como ambientales, resulta interesante que el incremento en la incidencia de este síndrome en los últimos años se ha asociado, entre otras cosas, con un aumento en la ingesta de carbohidratos refinados en la población de los países occidentales, sobre todo de fructosa y sacarosa, en forma de jarabes fructosados y como sustituto en programas de adelgazamiento y de tratamiento de la diabetes. Por lo tanto, se podría especular que este modelo inducido por sacarosa representa de alguna manera lo que ocurre en las poblaciones humanas.

Una vez obtenido el modelo se probó el efecto de dietas ricas y deficientes en ácidos grasos poliinsaturados esenciales sobre los parámetros del síndrome que se encontraron alterados. La dieta rica en AGPI n-3 se obtuvo mediante la

utilización de aceite de pescado (Menhaden) como única fuente de lípidos. Este tipo de aceite contiene un 26% de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la familia n-3, de los cuales un 11% corresponde al ácido eicosapentaenoico (20:5) y un 12% al ácido docosapentaenoico (22:6), y únicamente un 2.5% de AGPI de la familia n-6, representados por el ácido linoleico (18:2) y el ácido araquidónico (20:4). Para la dieta rica en AGPI n-6 se utilizó como fuente lipídica aceite de maíz, que contiene un 40% de AGPI n-6 en la forma del ácido linoleico (18:2), sin presentar ningún tipo de AGPI n-3. Como controles se utilizaron una dieta cuya fuente de lípidos consistió en una mezcla de ácidos grasos, tanto de la familia n-3 (3.5%) como de la familia n-6 (33%), estableciendo una relación n-6/n-3 similar a la consumida normalmente (9:1), que fueron aportados por el aceite de maíz y el aceite de canola (dieta control), y una dieta deficiente en AGPI, preparada con aceite de coco, el cual contiene un 94% de ácidos grasos saturados, principalmente ácido láurico (12:0) (51%). Todas las dietas fueron administradas conjuntamente con la sacarosa, a excepción de la dieta control, que fue administrada a un grupo con sacarosa (Sac) y a un grupo sin sacarosa (CTR).

En el grupo de ratas hembras, la administración del aceite de pescado revirtió de alguna manera los efectos causados por la sacarosa en la resistencia a la insulina, ya que se observó una disminución en los niveles basales de glucosa e insulina, y una normalización de las curvas de tolerancia a la glucosa. Por el contrario, las ratas alimentadas con el aceite de maíz presentaron curvas de tolerancia a la glucosa y niveles basales circulantes de glucosa elevados, de forma similar a lo observado en el grupo alimentado con la dieta control y sacarosa. Paradójicamente, el aceite de coco presentó efectos muy similares a los del aceite de pescado, ya que los niveles circulantes de glucosa e insulina no se encontraron elevados en este grupo.

En la presión arterial no se observó ningún efecto con la administración de las dietas. Las presiones arteriales no mostraron diferencias significativas entre los grupos, más bien todas estuvieron por encima del nivel encontrado para las ratas alimentadas con la dieta control y la sacarosa (Sac1). Una posible explicación a estos resultados podría ser que, por las condiciones experimentales de ese momento, las ratas alcanzaron un cierto nivel de estrés antes de la medición de la presión, llevando a una elevación de la misma en todos los grupos.

Los resultados obtenidos con los dos lotes de ratas macho fueron promediados, y los parámetros en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas se analizaron como porcentaje del grupo control.

El grupo de ratas alimentadas con la dieta control y el agua endulzada con sacarosa (grupo Sac), mantuvieron el cuadro del síndrome de resistencia a la insulina, con elevaciones estadísticamente significativas en los valores de presión arterial (16%) y los niveles circulantes de insulina (63%) y triglicéridos (113%). En cuanto a las curvas de tolerancia a la glucosa, en las ratas del lote 2 el bolo de glucosa provocó que los niveles de insulina se encontraran elevados en todos los puntos de la prueba, con respecto a las ratas control, siendo este aumento estadísticamente significativo en los dos primeros puntos, lo cual refleja resistencia a la acción de la insulina.

La dieta rica en AGPI n-3 tuvo un efecto benéfico sobre la hipertensión, la hipertrigliceridemia y la resistencia a la insulina, ya que los niveles encontrados después de la administración de la dieta no fueron estadísticamente diferentes a los encontrados en el grupo control. Los niveles de presión arterial disminuyeron en un 11% con respecto a los valores encontrados en el grupo alimentado con sacarosa, así como los niveles de triglicéridos, que disminuyeron en un 40%. El aceite de pescado presentó también un efecto benéfico sobre la sensibilidad a la insulina, ya que los niveles basales de insulina se encontraron disminuidos en un 31%, y hubo una disminución en las concentraciones de insulina durante las pruebas de tolerancia a la glucosa.

La disminución en la presión arterial coincide con lo encontrado en la literatura, en donde se reporta que los AGPI n-3 reducen la presión arterial en sujetos normotensos (Mortensen, 1983; Rogers, 1987; Bruckner, 1992a), en individuos y animales de experimentación hipertensos (Bonaa, 1990; Cobiac, 1992; Edelsteinova, 1993; Toft, 1995; Knapp, 1996; Bao, 1998; Yosefy, 1999; Engler, 1999a; Engler, 1999b; Mori, 1999), y en un grupo de ratas hipertensas inducidas con la administración de fructosa durante tres semanas (Huang, 1997), aunque en otros trabajos no se ha demostrado ningún efecto (Von Houwelingwn, 1987; Demke, 1988; Vandongen, 1993; Whelton, 1997; Prisco, 1998).

Aunque los mecanismos responsables del efecto antihipertensivo de los AGPI n-3 no se conoce con exactitud, se podrían sugerir varios efectos. Por un lado, al cambio en el tipo de ecosanoides sintetizados, ya que la ingesta de AGPI n-3 provoca una reducción en la formación de eicosanoides de la serie 2, derivados del ácido araquidónico (n-6) y que son vasoconstrictores y vasodilatadores potentes, y un aumento de los eicosanoides de la serie 3, sintetizados a partir del ácido eicosapentaenoico (n-3) y que son vasodilatadores (Kinsella, 1990b; Schmidt, 1994; Howe, 1997).

Por otro lado, el mejoramiento en la sensibilidad a la insulina con la consecuente disminución en sus niveles circulantes, podría sugerirse como un mecanismo alternativo o paralelo para la disminución en la presión arterial. Existe una serie de estudios epidemiológicos, fisiológicos y bioquímicos que demuestran una fuerte relación entre los niveles elevados de insulina (resultado de la resistencia a la insulina) y la hipertensión (Berne, 1991; DeFronzo, 1992; DeFronzo, 1997). La insulina puede provocar hipertensión a través de varios procesos, como la activación del sistema nervioso simpático, promoviendo la retención renal de sodio, alterando la composición celular de electrolitos y estimulando el crecimiento celular (DeFronzo, 1992). Evidencias indirectas apoyan esto, ya que los modelos experimentales que provocan estados de resistencia a la insulina, causan también elevaciones en la presión arterial, y ciertas intervenciones como la pérdida de peso, el ejercicio físico, o la administración de drogas, que incrementan la sensibilidad a la insulina y disminuyen los niveles séricos de insulina, también disminuyen la presión arterial (Berne, 1991; DeFronzo, 1992). Por lo tanto, una disminución en los niveles circulantes de insulina, como la observada en este trabajo después de la administración del aceite de pescado, podría ser la responsable de la disminución en la presión arterial observada.

La disminución en los niveles plasmáticos de triglicéridos después de la administración del aceite de pescado ha sido también observado en sujetos normales e hipertriglicéridémicos (Goodnight, 1982; Connor, 1993), y en dos modelos de ratas inducidos por la administración de sacarosa (Klimes, 1993; Luo, 1996). En estudios donde se utilizan cultivos celulares y animales de experimentación, se ha observado que los AGPI n-3, en especial el ácido eicosapentaenoico (EPA), inhiben la síntesis de ácidos grasos a través de la disminución en la actividad y síntesis de las enzimas lipogénicas ácido graso sintasa y acetil coenzima A carboxilasa, y de la diacilglicerol aciltransferasa (Rustan, 1988), que tiene como consecuencia una disminución en la síntesis de triglicéridos y, por lo tanto, de sus niveles plasmáticos. Además, se ha descrito también que el aceite de pescado incrementa la actividad y la expresión de la lipoprotein lipasa del músculo y corazón (Herzberg, 1989; Seboková, 1997), disminuyendo con ello la concentración de triglicéridos.

Nuevamente podría sugerirse a la disminución en las concentraciones circulantes de insulina observada después de la administración del aceite de pescado, como otro mecanismo alternativo para la disminución de los niveles de triglicéridos, considerando que la insulina es una hormona lipogénica.

El efecto benéfico de los AGPI n-3 sobre la sensibilidad a la insulina ha sido descrito en otros modelos experimentales, ya que se ha visto que la

incorporación de AGPI n-3 en la dieta previene el desarrollo de la resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasas (Storlien, 1996) y en carbohidratos (sacarosa y fructosa) (Klimes, 1993; Luo, 1996; Huang, 1997), y existen evidencias de que está asociada con un mejoramiento en la sensibilidad a la insulina (Seboková, 1997) a través de una serie de mecanismos que actúan colectivamente para este fin, como la inhibición de la secreción de insulina por el páncreas (Klimes, 1993), el aumento de la unión de insulina al receptor del tejido adiposo (Leray, 1995), el mejoramiento de la actividad tirosin cinasa estimulada por insulina en el hígado (Ficková, 1993), y el mejoramiento de la acción de la insulina sobre la utilización y/o almacenamiento de glucosa en los tejidos blanco de la insulina (Klimes, 1993).

Por otro lado, existen evidencias en humanos y animales de experimentación que demuestran una fuerte relación entre la composición de ácidos grasos de los lípidos de membrana y la acción de la insulina (Storlien, 1996). Se ha encontrado una clara asociación entre el mejoramiento en la acción de la insulina y el aumento en el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, especialmente de la familia n-3, en las membranas del músculo (Storlien, 1991; Borkman, 1993; Storlien, 1997).

En este trabajo se analizó la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas del tejido adiposo epididimario y perirenal, encontrando que ésta se vio modificada por el tipo de grasa ingerida. Las membranas de las ratas alimentadas con aceite de pescado se encontraron enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3, especialmente de cadena larga (20:5 y 22:6, reportados como constituyentes activos del aceite de pescado). Estos cambios, que influyen de manera importante en las características físicas de las membranas plasmáticas, como la fluidez, pueden alterar procesos celulares de membrana, como la transducción de señales hormonales (Clarke, 1997). Por lo tanto, el cambio en la composición de ácidos grasos de las membranas pudo tener efectos importantes en el mecanismo de transducción de señales de la insulina, afectando posiblemente la habilidad de la insulina de promover la translocación/inserción de transportadores de glucosa y/o su actividad intrínseca cuando se insertan en la membrana plasmática, como ha sido sugerido (Storlien, 1997), así como la actividad de lipasas y la síntesis de eicosanoides, afectando de esta manera la sensibilidad a la insulina, la presión arterial y la síntesis de triglicéridos (Clandinin, 1993; Leray, 1995; Behme, 1996; Storlien, 1996).

Por lo tanto, se podría sugerir que el aceite de pescado actúa a varios niveles sobre el síndrome de resistencia a la insulina: por un lado, mejorando el mecanismo de transducción de señales de la insulina debido al cambio en la

composición de ácidos grasos de las membranas celulares, y con ello contribuyendo al mejoramiento de la sensibilidad de la insulina, con la consecuente disminución en los niveles circulantes de la misma y, por lo tanto, de la presión arterial y de la síntesis de triglicéridos; por otro lado, afectando directamente la expresión y actividad de enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos, como lipasas y enzimas lipogénicas, disminuyendo con ello la síntesis de triglicéridos; y finalmente, por la sustitución de los eicosanoides de la serie 2 por los de la serie 3, con la consecuente disminución en la presión arterial.

La dieta rica en AGPI n-6 (aceite de maíz) únicamente provocó una disminución significativa en los niveles séricos de triglicéridos (reducción del 37%). Aunque los niveles de presión arterial se encontraron ligeramente disminuidos (3%), éstos se mantuvieron significativamente elevados con respecto al grupo control (13%), así como las concentraciones circulantes de insulina, que se encontraron significativamente elevadas con respecto al grupo control tanto en los niveles basales (51%), como en las curvas de tolerancia a la glucosa, de manera similar a lo encontrado en las ratas del grupo control alimentado con sacarosa.

Los reportes de trabajos en los que se analiza el efecto de los AGPI n-6 sobre la hipertensión, las dislipidemias y la resistencia a la insulina, son poco sólidos y en ocasiones contradictorios, tanto en humanos como en animales de experimentación (Beilin, 1993). En términos generales, se ha señalado que los AGPI n-6, principalmente el ácido linoleico, tienen efectos benéficos sobre las enfermedades cardiovasculares, ya que disminuyen los niveles plasmáticos de colesterol, previenen el desarrollo de la arteriosclerosis, y son antiarrítmicos.

Sin embargo, en cuanto a la presión arterial, existen controversias ya que algunos autores reportan reducciones en la presión arterial en ratas y sujetos hipertensos después de la administración de AGPI n-6, aunque de menor magnitud que las encontradas con AGPI n-3 (Iacono, 1993; Grimsgaard, 1999; Langley-Evans, 1996; Uusitupa, 1994), mientras que otros encuentran que los AGPI n-6 provocan incrementos o ningún efecto sobre la presión arterial (Howe, 1997; Zheng, 1999; Zhang, 1999; Kaufamn, 1994; Mensink, 1990). Se ha argumentado que los niveles elevados de ácido linoleico facilitan la producción de eicosanoides vasodilatadores y natriuréticos (Howe, 1997), pero, aparentemente, los efectos observados varían de acuerdo al modelo animal utilizado, a la cantidad y tipo de ácidos grasos administrada, y a la etapa de desarrollo de la hipertensión (Zheng, 1999; Zhang, 1999; Reddy, 1996).

En cuanto al hecho que el aceite de maíz no tuvo efectos sobre la sensibilidad a la insulina, los resultados de este trabajo coinciden con lo reportado en la literatura, ya que, por un lado, dietas ricas en grasas de origen vegetal, que contienen AGPI n-6 principalmente, se han utilizado para obtener modelos experimentales de ratas resistentes a la insulina (Storlien, 1987), y, por otro lado, se ha reportado que la sensibilidad a la insulina se deteriora al aumentar la relación de AGPI n-6/n-3 en la dieta (Storlien, 1996).

Existen pocos reportes en la literatura acerca de los efectos de los AGPI n-6 sobre las concentraciones circulantes de triglicéridos, presentando generalmente resultados contradictorios. Algunos autores reportan disminuciones de los niveles circulantes de triglicéridos, aunque pequeñas y siempre menores a las encontradas con AGPI n-3 (Kinsella, 1990b), mientras otros no han encontrado ningún efecto (Bruckner, 1992^a; Klimes, 1993; Bonaa, 1990).

La composición de ácidos grasos de las membranas plasmáticas de los adipocitos se vio también modificada en el grupo alimentado con el aceite de maíz. Se observó un aumento en los AGPI particularmente de la familia n-6 (18:3, 20:3, 22:5), no encontrándose prácticamente AGPI n-3 en dichas membranas. Es importante señalar que hubo un aumento en los AGPI de cadena larga, de forma similar a lo observado con el aceite de pescado. Como se mencionó anteriormente, la presencia de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga modifica las propiedades físicas de las membranas y, en consecuencia, el funcionamiento de proteínas asociadas a ésta. Sin embargo, estos resultados parecen indicar que no sólo es importante el grado de insaturación o la longitud de la cadena del ácido graso, si no que es también determinante la posición de las insaturaciones, o la familia a la que pertenece el ácido graso, ya que no se observaron los mismos efectos sobre el síndrome de resistencia a la insulina después de la administración de los dos aceites.

El grupo alimentado con el aceite de coco como única fuente lipídica mostró resultados inesperados, ya que se encontraron disminuciones en los niveles de presión arterial, insulina y triglicéridos, aunque no tan marcadas como las mostradas con el aceite de pescado. Los niveles de presión arterial disminuyeron en un 8%, no mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores del grupo control, al igual que los niveles de insulina, que disminuyeron en un 24%. Los niveles de triglicéridos disminuyeron en un 25%, aunque se mostraron estadísticamente más elevados que los del grupo control.

Generalmente se asocia al consumo de ácidos grasos saturados con una alta incidencia de enfermedades cardiovasculares, por lo que los resultados de este trabajo podrían parecer contradictorios, pero en realidad no existe un consenso en la literatura a este respecto. Algunos autores reportan que el consumo de grasas saturadas, comparado con el de grasas poliinsaturadas, incrementa significativamente los niveles de LDL, HDL y colesterol, sin afectar a los de TG (Brousseau, 1995), pero otros señalan que los resultados dependen del tipo de ácido graso consumido, ya que, por ejemplo, se ha encontrado que el ácido palmítico (16:0) no es tan trombogénico ni tan hipercolesterolémico como los ácidos grasos saturados de cadena corta 12:0 y 14:0 (Hornstra, 1989; Hayes 1990), y que incluso, los ácidos oleico, estárico y palmítico pueden disminuir los niveles de colesterol (Bruckner, 1992a). Existen también reportes donde se sugiere que el aceite de coco se comporta como "neutral" cuando es administrado en humanos, ya que no encuentran alteraciones estadísticamente significativas en los niveles de colesterol, HDL-col, LDL-col y triglicéridos (Kurup, 1995).

Actualmente existe un grupo de investigadores que sostienen que no existen evidencias reales, en trabajos experimentales ni en estudios epidemiológicos, de que se incremente la mortalidad y/o morbilidad por enfermedades cardiovasculares al consumir ácidos grasos saturados (Blackburn, 1989; Kaunitz, 1992; Kurup, 1995; Enig, 1997). Sugieren que el aceite de coco provee de importantes beneficios para la salud, especialmente en individuos con sistemas inmunológicos comprometidos, en el tratamiento y prevención de enfermedades del corazón, en individuos expuestos a aditivos de alimentos tóxicos, y para el tratamiento y prevención de infecciones virales, bacterianas y de protozoarios.

Debido a que recientemente se ha sugerido que los ateromas se desarrollan como resultado de infecciones con virus de la familia del herpes (citomegalovirus, el virus del herpes simplex 2 y el virus Coxsackie B4) (Ellis 1997), y de la bacteria *Chlamydia pneumoniae* (Saikku, 1997), Enig (1997) ha sugerido que el efecto benéfico sobre las enfermedades cardiovasculares observado con la administración de aceite de coco se debe al efecto antimicrobiano de los ácidos grasos contenidos en este aceite, principalmente del ácido láurico y su derivado monoglicérido monolaurin.

Enig (1995) sugiere que los efectos pro-colesterolémicos observados al alimentar ratas con aceite de coco hidrogenado deben atribuirse a que este aceite carece totalmente de ácidos grasos esenciales, y es más bien este hecho el que provoca los aumentos en los niveles de colesterol. Cuando se ha utilizado aceite de coco no procesado para suplementar dietas normales, con

frecuencia se ha encontrado que los niveles de colesterol disminuyen o se mantienen constantes. Por otro lado, se ha señalado que la ingesta de aceite de coco provoca incrementos en los niveles de antioxidantes, que contrarrestan el efecto dañino provocado por la oxidación en los tejidos y, por lo tanto, disminuyen el riesgo de enfermedades coronarias.

Es importante señalar que en el presente trabajo se utilizó aceite de coco sin procesar, por lo que los efectos observados pudieron deberse al contenido de ciertos fitoquímicos, del tipo de los fitosteroles y esterolinas, presentes en las plantas, principalmente en las semillas y los aceites no refinados. Recientemente ha sido sugerido que el mantenimiento de niveles séricos adecuados de estas sustancias en humanos es necesario para el funcionamiento eficiente del sistema inmune, y para disminuir el riesgo de enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares. A este respecto, ha sido reportado recientemente que la ingesta de fitosteroles disminuye los niveles de colesterol, LDL-col, y el desarrollo de arterioesclerosis (Ntanos, 2001; Mensink, 2001).

Sin embargo, es importante hacer notar que en el presente trabajo los dos aceites que tuvieron un efecto benéfico sobre el síndrome de resistencia a la insulina fueron el aceite de coco y el de pescado, que comparten la característica de contener bajas concentraciones de ácido linoleico (18:2, n-6), que como fue mencionado anteriormente, ha sido asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina. Este hecho permite resaltar, por un lado, la importancia del ácido linoleico como precursor de metabolitos que participan en el control de procesos fisiológicos, como los eicosanoides en la regulación de la presión arterial, o los segundos mensajeros en la transducción de señales hormonales. Por otro lado, fortalece las sugerencias dietarias de que no solo debe incrementarse el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, si no que debe considerarse la disminución en la relación n-6/n-3 de la misma.

En México se ha reportado una alta incidencia de padecimientos asociados con enfermedades cardiovasculares, como la diabetes mellitus, la obesidad, la hipercolesterolemia, la hiperinsulinemia, la hipertrigliceridemia, y la hipertensión (Posadas-Romero, 1994; Posadas-Romero, 1995; Zamora-González, 1996; Yamamoto-Kimura, 1996), causada tanto por cuestiones genéticas, como por un estilo de vida predominantemente sedentario, y hábitos dietarios caracterizados por ingestas elevadas de carbohidratos altamente refinados, y un desbalance en el consumo de ácidos grasos (muy alto en n-6 y muy bajo en n-3), debido a un alto consumo de aceites vegetales comestibles como el de maíz, canola, soya y girasol. El sistema de desaturación-elongación de ácidos grasos es el mismo para los precursores de las dos familias de ácidos grasos

(18:2 n-6 y 18:3 n-3), por lo que se producen más metabolitos provenientes del 18:2, especialmente cuando el consumo de 18:3 n-3 es muy bajo. Por lo tanto, es especialmente importante el desarrollo de programas de prevención de enfermedades cardiovasculares en la población mexicana, que incluyan modificaciones dietarias como el aumento en el consumo de AGPI de la familia n-3, con la consecuente disminución en la relación n-6/n-3.

Las conclusiones que se pueden derivar de este trabajo son:

- 1) Por medio de la administración de una dieta rica en sacarosa (30% en el agua de beber), es posible obtener un modelo experimental de síndrome de resistencia a la insulina en ratas. Aunque los resultados presentan ciertas variaciones, el modelo se caracteriza por elevaciones significativas en la presión arterial y en los niveles circulantes de insulina y triglicéridos.
- 2) La administración de aceite de pescado, rico en AGPI n-3, revierte los efectos causados por la sacarosa, ya que provoca una disminución significativa en la presión arterial y en los niveles circulantes de insulina y triglicéridos.
- 3) El aceite de maíz, rico en AGPI n-6 favorece únicamente la disminución de los niveles de triglicéridos, no teniendo ningún efecto significativo sobre la presión arterial ni sobre la resistencia a la insulina.
- 4) La administración de aceite de coco, deficiente en AGPI y rico en ácidos grasos saturados, tiene un efecto similar al del aceite de pescado, disminuyendo significativamente la presión arterial y los niveles circulantes de insulina y triglicéridos.
- 5) Se sugiere que los AGPI n-3 ejercen un efecto favorable sobre los parámetros del síndrome de resistencia a la insulina analizados a través del mejoramiento en la sensibilidad a la insulina, como un mecanismo alternativo o complementario para explicar los efectos benéficos del aceite de pescado sobre las enfermedades cardiovasculares.
- 6) Los resultados de este trabajo apoyan la importancia de las estrategias farmacéuticas no farmacológicas en el tratamiento de este tipo de problemas metabólicos, y coloca al aceite de pescado, y eventualmente al aceite de coco, como una alternativa de tratamiento efectiva, ya que ejerce sus efectos a nivel del agente causal del síndrome, que es la resistencia a la acción de la insulina.

5. BIBLIOGRAFÍA.

Ahrens, R.A., 1974, Sucrose, hypertension, and heart disease an historical perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* 27:403-422.

Anderson, J.W., 1985, Physiological and metabolic effects of dietary fiber. *Fed. Proc.* 44:2902-2906.

Aparicio, M., Gin, H., Potaux, L., Bouchet, J.L., Morel, D., Aubertin, J., 1989, Effect of a ketoacid diet on glucose tolerance and tissue insulin sensitivity. *Kidney Int. Suppl.* 27:S231-235.

Bang, H.O., Dyerberg, J., and Nielsen, A.B., 1971, Plasma lipid and lipoprotein patterns in Greenlandic West Coast Eskimos. *Lancet* 1, 1143-1147.

Baños, G., Carbajal, K., Cardoso, G., Zamora, J., and Franco, M., 1997, Vascular reactivity and effects of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension. *Am. J. Hypert.* 10:379-388.

Bao, D.Q., Mori, T.A., Burke, V., Puddey, I.B., Beilin, L.J., 1998, Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives. *Hypertension* 32:710-713.

Behme, M., 1996, Dietary fish oil enhances insulin sensitivity in miniature pigs. *J. Nutr.* 126:1549-1553.

Beilin, L.J., 1993, Dietary fats, fish, and blood pressure. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683:35-45.

Berdanier, C.D., 1995, *En Lessons from Animal Diabetes*, p. 231-246. Smith-Gordon. London.

Bernal, C.A., Gutman, R.A., Lombardo, Y.B., 1995, The duration of feeding on a sucrose-rich diet determines variable in vitro effects of insulin and fructose on rat liver triglyceride metabolism. *J. Nutr. Biochem.* 6:422-430.

Berne, C., 1991, Insulin resistance in hypertension- a relationship with consequences?. *J. Intern. Med.* 229 (Suppl 2):65-73.

Bezerra, R.M., Ueno, M., Silva, M.S., Tavares, D.Q., Carvalho, C.R., Saad, M.J., 2000, A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats. *J. Nutr.* 130:1531-1535.

Bianchi, G., Ferrari, P., Barber, B.R., 1984, In *Handbook of Hypertension*. Vol 4 p 328-349. Elsevier. Amsterdam/New York.

Blackburn, G.L., Kater, G., Mascioli, E.A., Kowalchuk, M., Babayan, V.K., Bistrain, B.R., 1989, A reevaluation of coconut oil's effect on serum cholesterol and atherogenesis. *J. Phil. Med. Assoc.* 65:144-152.

Bonaa, K.H., Bjerve, K.S., Straume, B., Gram, I.T., and Thelle, D., 1990, Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension. *N. Engl. J. Med.* 322:795-801.

Borkman, M., Storlien, L.H., Pan, D.A., Jenkins, A.B., Chisholm, D.J., Campbell, L.V., 1993, The relationship between insulin sensitivity and the fatty acid composition of phospholipids of skeletal muscle. *N. Engl. J. Med.* 328:238-244.

Brousseau, M.E., Ordovas, J.M., Osada, J., Fasulo, J., Robins, S.J., Nicolosi, R.J., Schaefer, E.J., 1995, Dietary monounsaturated and polyunsaturated fatty acids are comparable in their effects on hepatic apolipoprotein mRNA abundance and liver lipid concentrations when substituted for saturated fatty acids in cynomolgus monkeys. *J. Nutr.* 125:425-36.

Bruckner, G. (1992a), Fatty Acids and Cardiovascular Diseases, in *Fatty Acids In Foods and Their Health Implications* (Chow C.K Ed.), Pp. 735-752. Marcel Dekker, Inc. New York.

Bruckner, G. (1992b), Biological Effects of Polyunsaturated Fatty Acids, in *Fatty Acids In Foods and Their Health Implications* (Chow C.K Ed.), Pp. 631-639. Marcel Dekker, Inc. New York.

Buñag, R.D., Tomita, T., Sasaki, S., 1983, Chronic sucrose ingestion induced mild hypertension and tachycardia in rats. *Hypertension* 5:218-225.

Burr, G.O., Burr, M.M., 1973, Nutrition classics from *The Journal of Biological Chemistry* 82:345-67, 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Nutr. Rev.* 31:248-9.

Carvajal, K., El Hafidi, M., Baños, G., 1999, Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload. *J. Hypertens.* 17:1607-1616.

Ciandinin, M.T., Cheema, S., Field, C.J., and Baracos, V.E., 1993, Dietary lipids influence insulin action. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683:151-163.

Clarke, S.D., Baillie, R., Jump, D.B., Nakamura, M.T., 1997, Fatty acid regulation of gene expression. Its role in fuel partitioning and insulin resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 827:178-187.

Clarke, S.D., Jump, D.B., 1994, Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.* 14:83-98.

Clarke, S.D., Jump, D.B., 1996, Polyunsaturated fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Lipids* 31:S7-S11.

Cobiac, L., Nestel, P.J., Wing, M.H., and Howe, P.R.C., 1992, A low-sodium diet supplemented with fish oil lowers blood pressure in the elderly. *J. Hypertens.* 10:87-92.

Collier, G.R., and Sinclair, A.J., 1993, Role of N-6 and N-3 fatty acids in the dietary treatment of metabolic disorders. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683:322-329.

Connor, W.E., DeFrancesco, C.A., Connor, S.L., 1993, N-3 fatty acids from fish oil. Effects on plasma lipoproteins and hypertriglyceridemic patients. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683:16-34.

Chapkin R.S., 1992, Reappraisal of the Essential Fatty Acids, in *Fatty Acids In Foods and Their Health Implications* (Chow C.K Ed.), Pp. 429-436. Marcel Dekker, Inc. New York.

Cheatham, B., Kahn, C.R., 1995, Insulin action and the Insulin signaling network, *Endocrinol. Rev.* 16:117-142.

Cheatham, B., Vlahos, C., Cheatham, L., Wang, L., Blenis, J., Kahn, R., 1994, Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70S6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation, *Mol. Cell Biol.* 14:4902-4811.

Chen, M., Bergman, R.N., Porte, D.J., 1988, Insulin resistance and beta-cell dysfunction in ageing: the importance of dietary carbohydrate. *J. Clin. Endoc. Metab.* 67:951-957.

Dahl, L.K., Heine, M., Tassinari, L., 1962, *J. Exp. Med.* 115:1173-1190. Effects of chronic excess salt ingestion. Further demonstration that genetic factors influence the development of hypertension: evidence from experimental

hypertension due to cortisone and to adrenal regeneration. *J. Exp. Med.* 122:533-45.

De Fronzo, R. A., 1992, Insulin resistance, hyperinsulinemia and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20(Suppl. 11): S1-S16.

DeFronzo, R.A., 1997, Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth. J. Med.* 50:191-197.

Demke, D.M., Peters, G.R., Linet, O.I., Metzler, C.M., Klott, K.A., 1988, Effects of a fish oil concentrate in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 70:73-80.

Despres, J.P., Lamarche, B., Mauriege, P., 1996, Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N. Engl. J. Med.* 334:952-957.

Donnelly, R., 1992, Angiotensin-converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in hypertension, diabetes and heart failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20(suppl 11):S38-S44.

Edelsteinova, S., Kyselovic, J., Klimes, Y., Sebkova, E., Kovacsova, B., Kristek, F., Mitkova, A., Vrana, A., and Svec, P., 1993, Effects of marine fish oil on blood pressure and vascular reactivity in the hereditary hypertriglyceridemic rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683:353-356.

Efendic, S., Kindmark, H., Berggren, P., 1991, Mechanisms involved in the regulation of the insulin secretory process. *J. Int. Med.* 229(Suppl 2):9-22.

El Hafidi, M., Cuéllar, A., Ramírez, J., Baños, G., 2001, Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal $\Delta 9$ and $\Delta 5$ -desaturase activities. *J. Nutr. Biochem.* En prensa.

El Hafidi, M., Valdéz, R., Baños, G., 2000, Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets, and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin and Exper. Hypertension* 22:99-108.

Ellis, R.W., 1997, Infection and coronary heart disease. *J. Med. Microbiol.* 46:535-539.

Engler, M.B., Ma, Y.H., Engler, M.M., 1999, Calcium-mediated mechanisms of eicosapentaenoic acid-induced relaxation in hypertensive rat aorta. *Am. J. Hypertens.* 12:1225-1235.

Engler, M.M., Engler, M.B., Goodfriend, T.L., Ball, D.L., Yu, Z., Su, P., Kroetz, D.L., 1999, Docosahexaenoic acid is an antihypertensive nutrient that affects aldosterone production in SHR. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221:32-38.

Enig, M.G., 1997, Coconut oil: an anti-bacterial, anti-viral ingredient for food, nutrition and health. Resource Paper, in AVOC Lauric Oil Symposium pp 1-14.

Fehily, A.M., 1992, The Caerphilli ischemic heart disease study. In: *Essential Fatty Acids and Eicosanoids. Invited Papers From the Third International Congress*, 235-238.

Ficková, M., Hubert, P., Klimes, I., Staedel, C., Bohov, P., Svabová, E., Crémel, G., Macho, L., 1993, Dietary PUFAs improve liver insulin receptor tyrosine kinase activity in high sucrose-fed rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683:346-348.

Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

Fournier, R.D., Chiueh, C.C., Kopin, I.J., Knapka, J.J., DiPette, D., Preuss, H.G., 1986, Refined carbohydrate increases blood pressure and catecholamine excretion in SHR and WKY. *Am. J. Physiol.* 250(4 Pt 1):E381-5.

Fukagawa, N.K., Anderson, J.W., Hageman, G., Young, V.R., Minaker, K.L., 1990, High-carbohydrate, high-fiber diets increase peripheral insulin sensitivity in healthy young and old adults. *Arteriosclerosis* 52:524-528.

Ginsberg, H.N., 2000, Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 106:453-458.

Goodnight, S.H., Harris, W.S., Connor, W.E., Illingworth, D., 1982, Polyunsaturated fatty acids, hyperlipidemia, and thrombosis. *Arteriosclerosis* 2:87-113.

Grimsgaard, S., Bonna, K.H., Jacobsen, B.K., Bjerve, K.S., 1999, Plasma saturated and linoleic fatty acids are independently associated with blood pressure. *Hypertension* 34:478-483.

Hayes, K.C., Pronczuk, A., Lindsey, S., Dierson-Schade, D., 1990, Dietary saturated fatty acids (12:0, 14:0, 16:0) differ in their impact on plasma cholesterol and lipoproteins in nonhuman primates. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:491.

Herzberg, G.R., Rogerson, M., 1989, The effect of dietary fish oil on muscle and adipose tissue lipoprotein lipase. *Lipids* 24:352-353.

Hjermann, Y., 1992, The Metabolic Cardiovascular Syndrome: Syndrome X, Reaven's Syndrome, Insulin Resistance Syndrome, Atherothrombogenic Syndrome, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20(Suppl 8), S5-S10.

Hornstra, G., 1989, The significance of fish and fish oil enriched food for prevention of ischaemic cardiovascular disease, in *The Role of Fats in Human Nutrition*, A J. Vergroesen and M. Crawford, Eds., Academic, London.

Horrobin, D.F., 1993, Fatty acid metabolism in health and disease: the role of delta-6-desaturase. *Am. J. Clin. Nutr.* 57:736S-737S.

Houmard, J.A., Egan, P.C., Neufer, P.D., 1991, Elevated skeletal muscle glucose transporter levels in exercise-trained middle-aged men. *Am. J. Physiol.* 261:E437-443.

Howe, P., 1997, Dietary fats and hypertension. Focus on fish oil. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 827: 339-352.

Huang, Y.J., Fang, V.S., Juan, C.C., Chou, Y.C., Kwok, C.F., Ho, L.T., 1997, Amelioration of insulin resistance and hypertension in a fructose-fed rat model with fish oil supplementation. *Metabolism* 46:1252-1258.

Hunt, S.M., Groff, J.L., 1990, *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. West Publ. Co.

Hwang, I.S., Ho, H., Hoffman, B.B., Reaven, G.M., 1987, Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertens.* 10:512-516.

Iacono, J.M., and Dougherty, R.M., 1993, Effects of polyunsaturated fats on blood pressure. *Ann. Rev. Nutr.* 13:243-260.

Isomaa, B., Lahti, K., Almgren, P., Nissen, M., Tuomi, T., Taskinen, M., Forsen, B., Groop, L., 2001, Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabet. Care* 24:683-689.

Issemann, I., Green, S., 1990, Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347:645-650.

Kaufman, L.N., Peterson, M.M., Smith, S.M., 1994, Hypertensive effect of polyunsaturated dietary fat. *Metabolism* 43:1-3.

Kaunitz, H., Dayrit, C.S., 1992, Coconut oil consumption and coronary heart disease. *Philippine J. Int. Med.* 30:165-171.

Keys, A., Menotti, A., Karvonen, J., Aravanis, H., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B.S., Dontas, A.S., Fidnaza, F., Keys, M.H., Kromhout, D., Nedeljkovic, S., Punsar, S., Seccarecia, F., and Toshima, H., 1986, The diet and 15 year death rate in the Seven Countries study. *Am. J. Epidemiol.* 124:903-015.

Kim, D.N., Eastman, A., Baker, J.E., Mastrangelo, A., Sethi, S., Ross, J.S., Schmee, J., Thomas, W.A., 1995, Fish oil, atherogenesis and thrombogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 748:474-480.

King, D.S., Staten, M.A., Kohrt, W.M., Dalsky, G.P., Elahi, D., Hollosky, J.O., 1990, Insulin secretory capacity in endurance-trained and untrained young men. *Am. J. Physiol.* 259:E155-161.

Kinsella, J.E., Lokesh, B., and Stone, R.A., 1990b, Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* 52:1-28.

Kinsella, J.E., Lokesh, B., Broughton, S., Whelan, J., 1990a, Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids. Potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition (Suppl)* 6:24.

Klimes, I., Sebokova, E., 1997, Hypertension and the Insulin Resistance Syndrome of rats. Are they related?. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 827:13-34.

Klimes, I., Seboková, E., Vrána, A., Kazdová, L., 1993, Raised dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids in high sucrose-induced insulin resistance. Animal studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683:69-81.

Knapp, H.R., 1996, N-3 fatty acids and human hypertension. *Curr. Opin. Lipidol.* 7:30-33.

Kodama, J., Katayama, S., Tanaka, K., Itabashi, A., Kawasu, S., Ishii, J., 1990, Effect of captopril on glucose concentration. Possible role of augmented postprandial forearm blood flow. *Diabetes care* 13:1109-1111.

Kopin, I.J., Goldstein, D.S., Feuerstein, G.Z., 1981, *En Frontiers in Hypertension Research*, p. 283-289. Springer-Verlag. New York/Berlin.

Kovács, P., Samani, N.J., Seboková, E., Voigt, B., Gasperíková, D., Jezová, D., Kvetnansky, R., Lodwick, D., Kloting, I., Klimes, I., 1997, Phenotype and genotype comparison of hereditary hypertriglyceridemic (hHTG) and brown-Norway (BN) rats. Identification of quantitative trait loci (QTLs) for the insulin resistance syndrome. *Ann.N. Y. Acad. Sci.* 827:526-31.

Krieger, D.R., Landsberg, L., 1988, Mechanisms in obesity-related hypertension: role of insulin and catecholamines. *Am. J. Hypertens.* 1:84-90.

Kunes, J., Bin Talib, K.H., Dobesova, Z., Vrána, A., 1994, Erythrocyte ion transport alterations in hypertriglyceridaemic rats. *Clin. Sci.* 86:11-13.

Kurup, P.A., Rajmohan, T., 1995, Consumption of coconut oil and coconut kernel and the incidence of atherosclerosis. *Coconut and Coconut Oil in Human Nutrition, Proceedings. Symposium on Coconut and Coconut Oil in Human Nutrition.* March 1994. Coconut Development Board, India, pp 35-59.

Langley-Evans, S.C., Clamp, A.G., Grimble, R.F., Lackson, A.A., 1996, Influence of dietary fats upon systolic blood pressure in the rat. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 47:417-425.

Laws, A., and Reaven, G.M., 1993, Insulin resistance and risk factors for coronary heart disease. *Bailliere's Clin. Endoc. Metab.* 7:1063-1075.

Leray, C., Andriamampandry, M., Gutbier, G., Raclot, T., and Groscolas, R., 1995, Incorporation of n-3 fatty acids into phospholipids of rat liver and white and brown adipose tissues: a time-course study during fish-oil feeding. *J. Nutr. Biochem.* 6:673-680.

Long, S.D., Pekala, P.H., 1996, Regulation of GLUT4 gene expression by arachidonic acid: evidence for multiple pathways, one of which requires oxidation of prostaglandin E2. *J. Biol. Chem.* 271:1138-1144.

Luo, J., Rizkalla, S.W., Boillot, J., Alamowitch, C., Chaib, H., Bruzzo, F., Desplanque, N., Dalix, A.M., Durand, G., Slama, G., 1996, Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids improve adipocyte insulin action and glucose

metabolism in insulin-resistant rats; relation to membrane fatty acids. *Nutr* 126;1951-1958.

McCune, S.A., Radin, M.J., Jenkins, J.E., Chu, Y.Y., Park, S., Peterson, R.G., 1995, *En Lessons from Animal Diabetes*, p. 255-270. Smith-Gordon. London.

McGarry, J.D., 1998, Glucose-fatty acids interactions in health and disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:500S-504S.

McIlhinney, R.A., 1990, The fats of life: the importance and function of protein acylation. *Trends Biochem. Sci.* 15:387-391.

McLennan, P.L., 1993, Relative effects of dietary saturated, monosaturated and polyunsaturated fatty acids on cardiac arrhythmias in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 57:207-212.

Mensink, R.P., Stolwojk, A.M., Katan, M.B., 1990, Effect of a monounsaturated diet vs. a polyunsaturated fatty acid enriched diet on blood pressure in normotensive women and men. *Eur. J. Clin. Invest.* 20:463-469.

Mensink, R.P., Plat, J., 2001, Effects of dietary plant stanol esters on human cholesterol metabolism. *Memorias del 92ⁿ AOCs Annual Meeting and Expo, USA.*

Moller, D.E., Flier, J.S., 1991, Insulin resistance-mechanisms, syndromes and implications. *N. Engl. J. Med.* 325:938-48.

Mori, T.A., Bao, D.Q., Burke, V., Puddey, I.B., Beilin, L.J., 1999, Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans. *Hypertension* 34;253-260.

Mortensen, J.Z., Schmidt, E.B., Nielsen, A.H., Dyerberg, J., 1983, The effect of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on hemostasis, blood lipids and blood pressure. *Thromb. Haemost.* 50:543-546

Muszbek, L., Laposata, M., 1993, Covalent modification of proteins by arachidonate and eicosapentaenoate in platelets. *J. Biol. Chem.* 268:18243-18248.

Mutanen, M., Freese, R., 1996, Polyunsaturated fatty acids and platelet aggregation. *Curr. Opin. Lipidol.* 7:14-19.

Ntanios, F., 2001, Plant sterols and blood cholesterol: insights on efficacy and safety. *Memorias del 92n^d AOCS Annual Meeting and Expo, USA.*

Nilsson, P., Lindholm, L., Schersten, B., 1990, Hyperinsulinemia and other metabolic disturbances in well-controlled hypertensive men and women: an epidemiological study of the Dalby population. *J. Hypertens* 8:953-959.

O'Brien, R., Granner, D., 1996, Regulation of gene expression by insulin. *Phys. Rev.* 76:1109-1161.

Pedersen, O., Beck Nielsen, H., Heding, L., 1980, Increased insulin receptors after exercise in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 302:886-892.

Pérez, I., El Hafidi, M., Sánchez, C., Baños, G., 1999, Effect of sugar-induced hypertension in rats on the pattern of serum arachidonic, dihomo- γ -linoleic and linoleic acids. *Med. Sci. Res.* 27:847-849.

Pollare, T., Lithell, H., Morlín, C., Prantare, H., Hvarfner, A., Ljunghall, S., 1989, Metabolic effects of diltiazem and atenolol: results from a randomized, double-blind study with parallel groups. *J. Hypertens.* 7:551-559.

Posadas-Romero, C., Tapia-Conyer, R., Lerman-Garber, I., Zamora-González, J., Cardoso-Saldaña, G., Salvatierra-Izaba, B., Sepúlveda-Amor, J.A., 1995, Cholesterol levels and prevalence of hypercholesterolemia in a Mexican adult population. *Atherosclerosis* 118; 275-284.

Posadas-Romero, C., Yamamoto-Kimura, L., Lerman-Garber, I., Zamora-González, J., Fajardo-Gutiérrez, A., Velázquez, L., Cardoso-Saldaña, G., 1994, The prevalence of NIDDM and associated coronary risk factors in Mexico City. *Diab. Care* 17:1441-1448.

Prentki, M., Matchinsky, F.M., 1987, Ca^{2+} , cAMP and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol. Rev.* 67:1185-1248.

Preuss, M.B., Preuss, H.G., 1980, The effects of sucrose and sodium on blood pressures in various substrains of Wistar rats. *Lab. Invest.* 43(2):101-7.

Prichard, B.N.C., Smith, C.C.T., Sen, S., Betteridge, D.J., 1992, Hypertension and Insulin Resistance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20(Suppl 11): S77-S84.

- Prisco, D., Paniccia, R., Bandinelli, B., Filippini, M., Francalanci, I., Giusti, B., Giurlani, L., Gensini, G.F., Abbate, R., Neri Serneri G.G., 1998, Effect of medium-term supplementation with a moderate dose of n-3 fatty acids on blood pressure in mild hypertensive patients. *Thromb. Res.* 91:105-112.
- Raheja, B. S., Sadikot, S.M., Phatak, R.B., Rao, M.B., 1993, Significance of the n-6/n-3 ratio for insulin action in diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683:258-271.
- Ramsay, L.E., Yeo, W.W., Jackson, P.R., 1992, Influence of diuretics, calcium antagonistst, and α -blockers on insulin sensitivity and glucose tolerance in hypertensive patients. *J. Cardiovasc. Pharmacol* 20(suppl 11):S49-S54.
- Reaven, G.M., 1988a, Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 37:1595-607.
- Reaven, G.M., 1991, Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, and hypertension. Parallels between human disease and rodent models. *Diabet. Care* 14:195-202.
- Reaven, G.M., Ho, H., Hoffman, B., 1989,. Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. *Hypertension* 14:117-120.
- Reaven, G.M., Ho, H., Hoffman, B.B., 1988b, Attenuation of fructose-induced hypertension in rats by exercise training. *Hypertension* 12:129-132.
- Reddy, S.R., Kotchen, T.A., 1996, Attenuation of experimental hypertension by dietary linoleic acid is model dependent. *Am. Coll. Nutr.* 15:92-96.
- Rogers, S., James, K.S., Butland, B.K., Etherington, M.D., O'Brian, J.R., Jones, J.G., 1987, Effects of a fish oil supplement on serum lipids, blood pressure, bleeding time, haemostatic and rheological variables: a double blind randomised controlled trial in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 63:137-143.
- Rudel, L.L., Parks, J.S., Sawyer, J.K., 1995, Compared with dietary monounsaturated and saturated fat, polyunsaturated fat protects African monkeys from coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:2101-2110.
- Rustan, A.C., Neneseter, M.S., Drevon, A.C.. 1997, Omega-3 and Omega-6 fatty acids in the Insulin Resistance Syndrome. *Lipid and lipoprotein metabolism and atherosclerosis.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 827:287-301.

Rustan, A.C., Nossen, J.O., Christiansen, E.N., Drevon, C.A., 1988, Eicosapentaenoic acid reduces hepatic synthesis and secretion of triacylglycerol by decreasing the activity of acyl-coenzyme A:1,2-diacylglycerol acyltransferase. *J. Lipid Res.* 29:1417-1426.

Sacks, R.M., 1989, Dietary fats and blood pressure: a critical review of the evidence. *Nutr. Rev.* 47: 291.

Saikku, P., 1997, Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis. An update. *Scan. J. Infec. Dis. Suppl.* 104:53-56.

Sawicki, P.T., Berger, M., 1992, Effects of antihypertensive treatment with β -blockers on glucose metabolism. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20(suppl 11):S45-S49.

Schmidt, E.B. and Dyerberg, J., 1994, Omega-3 fatty acids. Current status in cardiovascular medicine. *Drugs* 47:405-424.

Seboková, E., Klimes, I., 1997, Molecular and cellular determinants of triglyceride availability. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 827:200-214.

Secretaria De Salud. Estadísticas de Mortalidad 1997. Dirección General de Estadística e Información. Mexico 1999.

Sharma, A., Fusco-DeMane, D., Henderson, E., Efrat, S., Stein, R., 1995, The role of the insulin control element and RIPE 3b1 activators in glucose-stimulated trascription of the insulin gene. *Mol. Endocrinol.* 9:1468-1476.

Sharma, A.M., 1992, Effects of nonpharmacological intervention on insulin sensitivity. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20(suppl 11):S27-S34.

Simopoulos, A.P., 1989, Resúmen ejecutivo, en *Dietary ω 3 and ω 6 Fatty Acids-Biological Effects and Nutritional Essentiality*, C. Galli y A.P. Simopoulos Eds. pp 391-404, Plenum, N.Y.

Simopoulos, A.P., Kifer, R.R., Martin, R.E., 1986, In *Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Sea Foods*, pp 453-455. Academic Press New York.

Sinclair, H.M., 1990, Essential fatty acids- An historical perspective, *Biochem. Soc. Trans.* 18:756-761.

Slater, S.J., Kelly, M., Yeager, M.D., Larkin, J., Ho, C., Stubbs, C.D., 1996, Polyunsaturation in cell membranes and lipid bilayers and its effects on membrane proteins. *Lipids* 31:S189-S192.

Stein, P.P., Black, H.R., 1991, Drug treatment of hypertension in patients with diabetes mellitus. *Diabetes care* 14: 425-448.

Steiner, D.F., Chan, S.J., Welsh, M.J., Kwok, S.C.M., 1985, Structure and evolution of the insulin gene. *Annu. Rev. Genet.* 19:463-484.

Steiner, D.F., Rouille, Y., Gong, Q., Martin, S., Carrol, R., Chan, S., 1996, The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab.* 22:94-104.

Stolba, P., Dobesova, Z., Husek, P., Opltova, H., Zicha, J., Vrana, A., Kunes, J., 1992, The hypertriglyceridemic rat as a genetic model of hypertension and diabetes, *Life Sci.* 51:733-740.

Storlien, L.H., James, D.E., Burleigh, K.M., Chisholm, D.J., Kraegen, E.W., 1986, Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats. *Am. J. Physiol.* 251:E576-E583.

Storlien, L.H., Jenkins, A.B., Chisholm, D.J., Pascoe, W.S., Khouri, S., Kraegen, E.W., 1991, Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 40:280-289.

Storlien, L.H., Kraegen, E.W., Chisholm, D.J., Ford, G.L., Bruce, D.G., Pascoe, W.S., 1987, Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats. *Science* 237:885-888.

Storlien, L.H., Kraegen, E.W., Jenkins, A.B., Chisholm, D.J., 1988, Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 47:420-427.

Storlien, L.H., Kriketos, A.D., Jenkins, A.B., Baur, L.A., Pan, D.A., Tapsell, L.C., Calvert, G.D., 1997, Does dietary fat influence insulin action?. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 827:287-301.

Storlien, L.H., Pan, D.A., Kriketos, A.D., Baur, L.A., 1993, High fat diet-induced insulin resistance. Lessons and implications from animal studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683:82-90.

Storlien, L.H., Pan, D.A., Kriketos, A.D., Connor, J.O., Caterson, I.D., Cooney, G.J., Jenkins, A.B., and Baur, L.A., 1996, Skeletal muscle membrane lipids and insulin resistance. *Lipids* 31, S262-S265.

Swislocki, A.L.M., Hoffman, B.B., Reaven, G.M., 1989, Insulin resistance, glucose intolerance and hyperinsulinemia in patients with hypertension, *Am. J. Hypertens.* 2:419-423.

Thorburn, A.W., Storlien, L.H., Jenkins, A.B., Khouri, S., Kraegen, E.W., 1989, Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 49:1155-1163.

Tobey, T.A., Mondon, C.E., Zavaroni, I., Reaven, G.M., 1982, Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. *Metab.* 31:608-612.

Toft, I., Bonnaa, K.H., Ingerbretsen, O.C., Nordoy, A., Jenssen, T., 1995, Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on glucose homeostasis and blood pressure in essential hypertension: a randomized, controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 123:911-918.

Uusitupa, M.I., Sarkkinen, E.S., Torpstrom, J., Pietinen, P., Aro, A., 1994, Long-term effects of four fat-modified diets on blood pressure. *Hum. Hypertens.* 8:209-218.

Vandongen, R., Mori, T.A., Burke, V., Beilin, L.J., Morris, J., and Ritchie, J., 1993, Effects on blood pressure of n-3 fats in subjects at increased risk of cardiovascular disease. *Hypertension* 22:371-379.

Vessby, B., Aro, A., Skarfors, E., Berglund, L., Salminen, I., Lithell, H., 1994, The risk to develop NIDDM is related to the fatty acid composition of the serum cholesterol esters. *Diabetes* 43:1353-1357.

Von Houwelingen, R., Nordoy, A., Van Der Beek, E., Houtsmuller, U., De Metz, M., Hornstra, G., 1987, Effect of a moderate fish intake on blood pressure, bleeding time, hematology, and clinical chemistry in healthy males. *Am. J. Clin. Nutr.* 46:424-436.

Vrána, A., Frábry, P., 1983, Metabolic effects of high sucrose or fructose intake. *World Rev. Nutr. Diet.* 42:55-101.

Vrána, A., Kazdová, L., 1986, Effects of dietary sucrose or fructose on carbohydrate and lipid metabolism. Animal studies. *Prog. Biochem. Pharmacol.* 21:59-73.

Vrána, A., Kazdová, L., 1990, The hereditary hypertriglyceridemic nonobese rat: an experimental model of human hypertriglyceridemia. *Transplant. Proc.* 22:2579.

Wang, J., Shen, L., Najafi, H., Kolberg, J., Matschinsky, F., Urdea, M., German, M., 1997, Regulation of insulin preRNA splicing by glucose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4360-4365.

Whelton, P.K., Kumanyika, S.K., Cook, N.R., Cutler, J.A., Borhani, N.O., Hennekens, C.H., Kuller, L.H., Langford, H., Jones, D.W., Satterfield, S., Lasser, N.L., Cohen, J.D., 1997, Efficacy of nonpharmacologic interventions in adults with high-normal blood pressure: results from phase 1 of the Trials of Hypertension Prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 65(2 Suppl):652S-660S.

Wright, D.W., Hansen, R.I., Mondon, C.E., Reaven, G.M., 1983, Sucrose-induced insulin resistance in the rat: modulation by exercise and diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 38:879-883.

Yamamoto-Kimura, L., Zamora-González, J., Huerta-Alvarado, S., Fajardo-Gutiérrez, A., Cardoso-Saldaña, G., Posadas-Romero, C., 1996, High blood pressure and cardiovascular risk factors in an adult population of Mexico City. Characteristics of the studied population. *Arch. Med. Res.* 27:1-10.

Yosefy, C., Viskoper, J.R., Laszt, A., Priluk, R., Guita, E., Varon, D., Illan, Z., Berry, E.M., Savion, N., Adan, Y., Lugassy, G., Schneider, R., Raz, A., 1999, The effect of fish oil on hypertension, plasma lipids and hemostasis in hypertensive, obese, dyslipidemic patients with and without diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61:83-87.

Young, J.B., Landsberg, L., 1977, Stimulation of the sympathetic nervous system during sucrose feeding. *Nature* 269:615-617.

Young, J.B., Landsberg, L., 1981, Effect of oral sucrose on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism* 30:421-424.

Zamora-González, J., Yamamoto-Kimura, L., Lerman-Garber, Y., Cardoso-Saldaña, G., Fajardo-Gutiérrez, A. and Posadas-Romero, C., 1996, Clustering of metabolic disorders and hyperinsulinemia in Mexico City. *Int. J. Obes.* 20, 311-318.

Zavaroni, I., Chen, Y., Mondon, C.E., Reaven, G.M., 1981, Ability of exercise to inhibit carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in rats. *Metabolism* 30:476-480.

Zavaroni, I., Sander, S., Scott, S., Reaven, G.M., 1980, Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. *Metab.* 29:970-973.

Zhang, H.Y., Reddy, S., Kotchen, T.A., 1999, A high sucrose, high linoleic acid diet potentiates hypertension. *Am. J. Hypertens.* 12(2 Pt 1):183-187.

Zheng, Z.J., Folsom, A.R., Ma, J., Arnett, D.K., McGovern, P.G., Eckfeldt, J.H., 1999, Plasma fatty acid composition and 6-year incidence of hypertension in middle-aged adults: the atherosclerosis risk in communities (AIRC) study. *Am. J. Epidemiol.* 150:492-500

ANEXO

PUBLICACIÓN DEL TRABAJO



Dietary fatty acids effects on sucrose-induced cardiovascular syndrome in rats

Rosa M. Oliart Ros^{a,*}, M. Eugenia Torres-Márquez^b, Almaquio Badillo^a,
Ofelia Angulo Guerrero^a

^aUnidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, Instituto Tecnológico de Veracruz, Apdo Postal 1420, 91860 Veracruz, Ver. Mexico

^bDepto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F.

Received 13 September 1999; received in revised form 23 August 2000; accepted 12 September 2000

Abstract

Cardiovascular disease is one of the leading causes of morbidity and mortality in Mexico. We investigated the effects of omega-3 (n-3) and omega-6 (n-6) polyunsaturated fatty acids on the metabolic syndrome associated with cardiovascular disease in a high-sucrose-fed rat model. The metabolic syndrome-induced rats showed a significant increase in systolic blood pressure, serum insulin, nonfasting serum triglyceride and serum cholesterol levels. Experimental high-sucrose-fed animals received either a n-3 or n-6 enriched diet or a control diet during 6 weeks. Animals fed the n-3 enriched diet had a significant reduction in blood pressure and serum insulin and triglyceride levels. Serum triglyceride levels were also significantly reduced in the n-6-rich diet animals. © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Polyunsaturated fatty acids. Cardiovascular diseases. Hypertension; Insulin

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) are one of the most significant diet-related health problems, representing a major cause of premature death in Western countries. In Mexico, the incidence and prevalence of CVD have increased over the past three decades and CVD have become the leading cause of morbidity and mortality in the country [1]. In 1997, CVD represented the principal cause of deaths, totaling 25% of all deaths in Mexico [2].

The metabolic disorders found in individuals prone to develop CVD, known as metabolic cardiovascular syndrome (CVS), X syndrome or insulin resistance syndrome [3,4], comprise most or all of the following: overweight or obesity with atherogenic triglyceride-rich lipoproteins, low high density lipoprotein (HDL) cholesterol and small dense low density lipoprotein (LDL), hypertension, hypertriglyceridemia, insulin resistance and glucose intolerance. Each component of the syndrome is closely related to each other, creating a reverberating loop such that a worsening of any one component will lead to deterioration of all the others.

There are a number of epidemiological studies support-

ing the dietary regulation of each of the metabolic risk factors of CVS [5–8]. Early in the 1970s, Bang et al. [9] reported a substantially lower incidence of coronary heart disease in Greenland Eskimos compared with Danes or other Western populations. It has now become evident that polyunsaturated fatty acids (PUFA) may have a role in CVD prevention.

An experimental model that resembles CVS can be induced in rats by administration of high-sucrose or high-fructose diets [10–12]. This model exhibits insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, impaired glucose tolerance and mild hypertension.

The purpose of this study was to investigate the effects of diets rich in PUFA (n-3 or n-6) on blood pressure, insulin levels and lipid metabolic parameters in a CVS-induced rat model.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All chemicals were of analytical grade, obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), Merck (Mexico City, Mexico), and JT Baker (Mexico City, Mexico). Di-

*Corresponding author. E-mail address: roliart@itver.edu.mx (R.M. Oliart Ros).

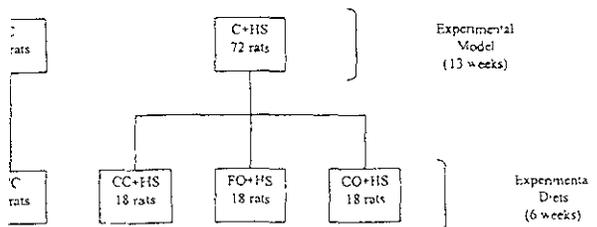


Fig. 1. Diet Protocol. Experimental model: C, chow diet plus plain water; C + HS, chow diet plus 30% sucrose in drinking water. Experimental diets: CC, corn-canola diet plus plain water; CC + HS, corn-canola diet plus 30% sucrose in drinking water; FO + HS, fish oil diet plus 30% sucrose in drinking water; CO + HS, corn oil diet plus 30% sucrose in drinking water.

... components were purchased from Harlan Teklad Inc. (Madison, WI, USA). Insulin radioimmunoassay kit was obtained from Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA, USA).

2. Experimental model

Ninety male Wistar rats were individually housed and maintained in a 12-h light/dark cycle at 25°C. Animal maintenance and handling were in accordance with the NIH *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* [13]. Weaning animals (21 days of age) were divided in two groups: the control group, which received a standard chow (purina) diet (C; n = 18); and the high-sucrose group, which received the chow diet plus 30% sucrose in drinking water (C + HS; n = 72) [14], ad libitum, during 13 weeks (Fig. 1). Body weight and blood pressure were measured every 2 weeks.

3. Experimental diets

Animals presenting serum elevation of glucose, insulin, triglyceride and cholesterol levels after being under the above diet for 13 weeks were divided into four groups receiving one of the following diets for 6 more weeks (Fig. 1). The C group received a diet containing 7.5% corn and canola oil mixture ("Patrona," from the local market) as lipid source (CC group). This group received drinking water without sucrose. Fifty-four C + HS rats were randomly assigned to three different semisynthetic diets (see Tables 1 and 2: a corn-canola oil (CC) diet (CC + HS group), with the lipid source consisting in 7.5% corn and canola oil mixture ("Patrona," from the local market); a fish oil (FO) diet (FO + HS group), using 7.5% FO (Menhaden oil, Zapata Inc.) as the sole lipid source; and a corn oil (CO) diet (CO + HS group), using 7.5% CO ("Patrona," from the local market) as the sole lipid source. These three groups received drinking water with 30% sucrose. Diets were prepared using BHT at 0.02% as antioxidant, and stored under refrigeration until the end of the study. Animals were

Table 1
Composition of diets administered to rats

Ingredient	Corn-canola oil diet (g)	Fish oil diet (g)	Corn oil diet (g)
Casein	440	440	440
DL-methionine	3.2	3.2	3.2
Cellulose	40	40	40
Starch	658	658	658
Vitamin mix ^a	20	20	20
Mineral mix ^b	80	80	80
Corn oil	50	-	100
Canola oil	50	-	-
Fish oil	-	100	-

^a Vitamin mix (Teklad 40060): p-aminobenzoic acid, ascorbic acid, biotin, vitamin B₁₂, calcium pantothenate, choline dihydrogen citrate, folic acid, inositol, menadione, niacin, pyridoxine HCl, riboflavin, thiamin HCl, dry vitamin A palmitate, dry vitamin D₃, dry vitamin E acetate, corn starch
^b Mineral mix (Teklad AIN-76 170915): CaHPO₄, NaCl, potassium citrate, K₂SO₄, MgO, manganous carbonate, ferric citrate, zinc carbonate, cupric carbonate, potassium iodate, sodium selenite, chromium potassium sulfate, sucrose

checked for body weight and blood pressure after the 6-week feeding period.

Before sacrifice, blood samples were obtained from non-fasted animal's tails for nonfasting triglyceride measurement. Then, fasted animals were killed by decapitation

Table 2
Fatty acid composition of diets administered to rats

Fatty acid	Chow diet (%)	Corn-canola oil diet (%)	Fish oil diet (%)	Corn oil diet (%)
Saturated				
10:0	nd	0.05	0.07	0.02
12:0	0.2	nd	nd	nd
14:0	2.2	nd	14.4	nd
16:0	26.6	12.8	21.9	15.6
18:0	7.3	nd	2.3	nd
20:0	0.05	nd	6.5	5.5
Total	36.3	12.8	45.1	21.1
Monounsaturated				
14:1	0.44	nd	nd	nd
16:1	nd	nd	9.1	nd
18:1	50	50.7	13.9	31.8
20:1	2.7	nd	nd	6.6
24:1	nd	nd	2.6	nd
Total	53.1	50.7	25.6	38.4
Polyunsaturated				
n-6				
18:2	8.3	32.8	1.4	40.2
20:4	nd	nd	1.1	nd
Total	8.3	32.8	2.5	40.2
n-3				
18:3	1.7	3.5	0.96	nd
18:4	nd	nd	2.05	nd
20:5	nd	nd	11.2	nd
22:6	nd	nd	11.9	nd
Total	1.7	3.5	26.1	nd
n-6/n-3	4.8	9.3	0.09	nd

Values are expressed as percentage of total fatty acids. nd, not detected

without anesthesia to avoid interference with insulin measurements). Blood samples were taken to measure serum glucose, insulin, triglyceride, cholesterol, total lipids, HDL cholesterol and LDL cholesterol.

4. Blood pressure measurement

Systolic blood pressure was estimated by a tail-cuff method (IITC Noninvasive blood pressure system, Mod 29, Life Science Instruments, CA) in conscious animals. The reported blood pressure value is the mean of five systolic measurements.

5. Biochemical measurements

Total cholesterol was measured using enzymatic reagents [15]. Serum HDL was determined after precipitation of LDL and very low density lipoprotein (VLDL) cholesterol with phosphotungstic acid in the presence of Mg²⁺ ions [16]. In a similar way, LDL cholesterol was determined after heparin precipitation of HDL and VLDL cholesterol [17]. A peroxide-coupled method for the colorimetric determination of serum triglyceride was used [18]. Serum glucose determination was done by using a color reagent under an oxidase system [19]. Total lipids (color test method), were performed according to the 3321 Merck test. Insulin levels were determined by a solid-phase ¹²⁵I radioimmunoassay (Coat-A-Count, DPC). The intra-assay variance for determining cholesterol, HDL, LDL, triglyceride, glucose and insulin were 2.2%, 2.4%, 1.6%, 1.9%, 2.1% and 1.5%, respectively.

6. Lipids isolation

Lipids were extracted from diets according to Folch et al. [20]. Fatty acids were converted to methyl esters by BF₃-catalyzed transmethylation [21], and analyzed by gas chromatography using a Hewlett Packard model 5890 Chromatograph equipped with a Carbowax capillary column and a flame ionization detector. Injection and detector temperatures were 250°C, helium was the carrier gas and the column temperature was programmed to rise from 130°C to 400°C at a rate of 8°C/min. Fatty acid methyl esters were identified by comparison with fatty acid standards (Sigma Chemical Co.).

7. Statistical analysis

Values are expressed as means ± S.E.M. Statistical significance was tested by analysis of variance procedures. A Tukey's multiple range test was used for mean comparison. Differences having *P*-values lower than .05 were considered to be statistically significant.

Table 3

Blood pressure, body weight and serum parameters in rats fed the chow (C) and chow plus high sucrose (C+HS) diets during 13 weeks

Parameters	C ^a	C+HS ^b
Systolic blood pressure (mmHg)	120.2 ± 2.5	139.0 ± 1.7**
Body weight (g)	337.2 ± 5.0	314.3 ± 1.3
Glucose (mg/dl)	139.1 ± 6.2	135.0 ± 8.8
Insulin (μU/ml)	6.6 ± 1.6	14.8 ± 1.5**
Nonfast triglyceride (mg/dl)	94.5 ± 18.3	175.7 ± 15.4*
Fast triglyceride (mg/dl)	81.7 ± 7.5	110.7 ± 9.4
Cholesterol (mg/dl)	49.1 ± 0.4	61.2 ± 0.6**

^a Values are means ± S.E.M. (*n* = 18).

^b Values are means ± S.E.M. (*n* = 72).

* *P* < .05, ** *P* < .01

3. Results

3.1. Experimental model

The model was achieved by the administration of 30% sucrose in drinking water in male Wistar rats during 13 weeks. Table 3 shows the values of blood pressure, body weight and serum concentrations of glucose, insulin, triglyceride and cholesterol in C-fed and C+HS-fed rats. Results showed that C + HS-fed rats increased systolic blood pressure levels (16%, *P* < .01) when compared with C-fed rats. Serum insulin, nonfasting serum triglyceride and serum cholesterol were also significantly increased (124%, 86% and 25%, respectively). These animals had a slight increase in fasting serum triglyceride, although not statistically significant. If fasting insulin level is used as an index of insulin resistance, as suggested recently for normoglycemic populations [22], our rat model exhibited insulin resistance. C + HS-fed rats and the C-fed rats presented similar body weight and serum levels of glucose. These results were according to our expectations and similar to those found in the literature that reported similar increases in the parameters evaluated after sucrose or fructose feeding [10–12].

3.2. Experimental diets

When the CVS-induced rat model was established, the effects of different dietary fat diets were analyzed. Table 4 reports the results observed in animals after administration of CC, FO and CO diets during 6 weeks.

Blood pressure in animals receiving the CC + HS diet was significantly higher (16%) than that of animals under the CC diet. The FO + HS group presented blood pressure levels similar to those found in the CC group, being only 3% higher than the CC group and significantly lower than the CC + HS group. The CO + HS group presented significantly higher levels (13%) of blood pressure than the CC group but similar to those found in the CC+HS group.

Similar behavior was found for serum insulin levels. Animals under the CC + HS diet showed a significant increase in insulin levels (63%) with respect to those in CC

Table 4

Blood pressure and serum insulin and triglyceride levels in rats fed the different dietary fat diets during 6 weeks

Parameters	CC	CC+HS	FO+HS	CO+HS
Systolic blood pressure (mmHg)	109.3 ± 3.4	127.3 ± 2*	113.4 ± 2**	123.4 ± 3.5*
Insulin (μU/ml)	7.8 ± 0.6	12.7 ± 0.9*	8.7 ± 0.6**	11.8 ± 1.3*
Fasting triglyceride (mg/dl)	70.8 ± 3.5	150.6 ± 15.3*	90.6 ± 7.6**	94.6 ± 9.6**

Values are means ± S.E.M. (n = 18). CC, corn-canola diet; CC + HS, corn-canola diet plus 30% sucrose in drinking water; FO + HS, fish oil diet plus 30% sucrose in drinking water; CO + HS, corn oil plus 30% sucrose in drinking water

* P < 0.1 with respect to CC, ** P < 0.1 with respect to CC + HS

Insulin levels in the FO + HS animals were 12% higher than those of the CC group, but significantly lower than the CC + HS group. The increase in insulin levels in the CO + HS animals with respect to the CC group resembled that found in the CC+HS group (51%). A significant triglyceride increase was found in the CC + HS group with respect to the triglyceride level in the CC group (112% increase). FO-fed and CO-fed rats showed significantly lower levels of triglycerides than those fed the CC + HS diet, which were statistically not different to the CC group.

Glucose levels were elevated in all experimental groups (about 20%), although not significantly different from the CC group. Serum levels of HDL, LDL, total lipids and cholesterol as well as body weight were not significantly modified by the diets (data not shown).

4. Discussion

By means of sucrose administration in drinking water (30%), a group of rats with metabolic abnormalities (hypertriglyceridemia, hyperinsulinemia and mild hypertension) similar to those found in the so-called CVS was developed. Our results are similar to those reported previously in which the administration of fructose- or sucrose-rich diets to experimental animals caused comparable degrees of hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, insulin resistance and blood pressure elevation [10-12].

The clustering of these metabolic abnormalities allowed us to use this group of rats as an integrative experimental model to analyze the effects of the high-PUFA diets on these parameters of CVS.

The FO diet, high in n-3 PUFA, provoked a significant reduction in the three parameters that were found significantly elevated after sucrose feeding, returning them to levels similar to those found in control rats.

FO and, in particular, long chain n-3 PUFA, have been shown to reduce blood pressure in normotensive [23-25] and hypertensive subjects and in experimental animals [26-35], although some studies have failed to demonstrate any such effect [36-40]. The detailed mechanisms mediating this antihypertensive effect are unknown, but they have been attributed to a shift in eicosanoid production away from the 2-series prostaglandins derived from arachidonic acid that are potent vasoconstrictors as well as dilators to the

3-series prostaglandins derived from eicosapentaenoic acid (the 20-carbon n-3 equivalent of arachidonic acid) that are either inactive or vasodilators [6,41,42]. However, there are a number of epidemiological, physiological and biochemical studies that demonstrate a strong positive relationship between elevated insulin levels (which implies underlying insulin resistance) and hypertension [43-45]. There are a number of potential mechanisms by which insulin can induce hypertension (sympathetic nervous system activation, renal sodium retention, altered cellular electrolyte composition and stimulation of cell growth) [44]. Evidence that links insulin resistance and hyperinsulinemia to the development of hypertension shows that manipulations aimed to create a state of insulin resistance in experimental animals lead to elevated blood pressure. Furthermore, interventions such as dietary weight loss manipulations, physical training or drug administration that enhance insulin sensitivity and lower plasma insulin levels also decrease blood pressure [44,45]. In our study, FO feeding caused a significant reduction in serum insulin levels in rats, so this reduction could be responsible of the lowering effect found on blood pressure.

Additionally, the alterations in the fatty acid composition of the tissue membranes after diet administration (unpublished data) could alter membrane-mediated processes such as insulin transduction signals, activity of lipases and synthesis of eicosanoids and, in this way, affect insulin sensitivity, blood pressure and triglyceride synthesis [22,46-48].

With respect to n-6 PUFA actions on blood pressure and hyperlipidemias, the literature evidence is not conclusive. In some instances, linoleic acid has been associated with increases or no effect on blood pressure levels [6,49-52], but a hypotensive effect has also been reported with high intakes of n-6 fatty acids [53-56]. It has been suggested that the effect depends on the model utilized and on the particular fatty acid being administered [49,50,57].

In our study, the CO diet (rich in linoleic acid) provoked a slight, although not statistically significant, reduction in blood pressure levels with respect to control animals. Insulin levels were similar to those found in the sucrose-fed group, in accordance with reports of insulin resistance induced by a high-fat diet (rich in n-6 PUFA) and the worsening of insulin action by increasing dietary n-6/n-3 ratio [22].

The effects of dietary n-6 PUFA on triglyceride levels

poorly investigated, and there is inconsistency in the data [26,58]. In our work, rats receiving the CO diet had 0% reduction in triglyceride levels.

It is interesting to notice that Western diets are characterized by high intakes of n-6 PUFA due to dietary habits that include high intakes of edible oils (corn, soybean, flower, canola). Because the same desaturase-elongase system works in both PUFA family precursors (18:2 and 18:3), the metabolites from 18:2 are the most prevalent, especially when 18:3 n-3 intakes are very low. This imbalance in essential fatty acids intakes (extremely high n-6 and very low n-3) in the Western population could well be related to the high incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus and cardiovascular syndrome that prevails in these countries.

In conclusion, we obtained an animal model for hyperinsulinemia, hyperinsulinemia and hypertriglyceridemia by means of sucrose administration in drinking water (30%). The effects of sucrose on blood pressure were reverted by the FO diet. The effects on triglyceride levels were reverted by both dietary oils (FO and CO), and the effects on insulin levels by FO. We suggest that dietary n-3 PUFA supply may have favorably influenced the parameters analyzed by improving insulin action, which is another possible mechanism for explaining the beneficial effects of FO on cardiovascular diseases by means of the modulation of the damaging cardiovascular effects of insulin.

The results obtained in this work highlight the importance of conducting large epidemiological studies aimed to test the efficacy of dietary fat manipulation on CVD.

Acknowledgments

The authors are grateful to Drs G. McCarthy and K. Carbajal for their comments on the rat model before its publication and their helpful discussions. This work was supported by grants UR-612 from the National Council on Technological Education (COSNET) and 3347 and 3359 from the Supporting Program for Postgraduate Studies Division (PADEP).

References

- J Zamora-González, L. Yamamoto-Kimura, Y Lerman-Garber, G. Cardoso-Saldaña, A Fajardo-Gutiérrez, C Posadas-Romero, Clustering of metabolic disorders and hyperinsulinemia in Mexico City, *Int J Obes* 20 (1996) 311–318
- Secretaría De Salud (Ministry of Health), Mortalidad 1997, Dirección General de Estadística e Información, Mexico, 1999
- Y Hjermann, The metabolic cardiovascular syndrome Syndrome X, Reaven's syndrome, insulin resistance syndrome, atherothrombotic syndrome, *J. Cardiovasc Pharmacol* 20 (Suppl. 8) (1992) S5–S10
- I. Klimes, E. Sebokova, Hypertension and the insulin resistance syndrome of rats, *Ann N.Y. Acad Sci* 827 (1997) 13–34
- A Keys, A. Menotti, J. Karvonen, H Aravanis, H. Blackburn, R Buzina, B S Djordjevic, A S. Dontas, F Fidnaza, M H Keys, D Kromhout, S Nedeljkovic, S Punsar, F Seccarecia, H. Toshima, The diet and 15 year death rate in the Seven Countries study, *Am. J. Epidemiol* 124 (1986) 903–915
- P Howe, Dietary fats and hypertension Focus on fish oil, *Ann N Y Acad Sci* 827 (1997) 339–352.
- A M Fehily, The Caerphilly ischemic heart disease study, in *Essential Fatty Acids and Eicosanoids*, Invited papers from the Third International Congress, 1992, 235–238
- G.R Collier, A J Sinclair, Role of N-6 and N-3 fatty acids in the dietary treatment of metabolic disorders, *Ann N.Y Acad Sci* 683 (1993) 322–329
- H O Bang, J Dyerberg, A B Nielsen, Plasma lipid and lipoprotein patterns in Greenlandic West Coast Eskimos, *Lancet* i (1971) 1143–1147
- R D Buñag, T Tomita, S. Sasaki, Chronic sucrose ingestion induced mild hypertension and tachycardia in rats, *Hypertension* 5 (1983) 218–225
- D W Wright, R.I. Hansen, C.E Mondon, G M Reaven, Sucrose-induced insulin resistance in the rat modulation by exercise and diet, *Am J. Clin Nutr* 38 (1983) 879–883.
- Y Hwang, H Ho, B B Hoffman, G.M Reaven, Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats, *Hypertension* 10 (1987) 512–516
- National Research Council, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Publication no 85-23 (rev), National Institute of Health, Bethesda, MD, 1985.
- G Baños, K. Carbajal, G Cardoso, J. Zamora, M Franco, Vascular reactivity and effects of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hypertension, *Am J Hypert.* 10 (1997) 379–388
- G Assman, Current diagnosis of hyperlipidemias, *Internist (Berl)* 20 (1979) 559–564.
- P R Finley, R B Schifman, R J Williams, D A Licht, Cholesterol in high-density lipoprotein use of Mg²⁺/dextran sulfate in its enzymatic measurement, *Clin Chem* 24 (1978) 931–933
- H Wieland, D. Seidel, A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins, *J Lipid Res* 24 (1983) 904–909
- M W McGowan, J D Artess, D R Strandberg, B Zak, A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglyceride, *Clin Chem* 29 (1983) 538–542
- D Barham, P Trinder, An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system, *Analyst* 97 (1972) 142–145
- J Foleh, M Lees, G H Sloane-Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J Biol. Chem* 226 (1957) 497–509
- W R Morrison, L.M. Smith, Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol, *J Lipid Res* 5 (1964) 600–608
- L H Storlien, D.A. Pan, A D Kriketos, J.O. Connor, I.D Caterson, G J Cooney, A.B. Jenkins, L A Baur, Skeletal muscle membrane lipids and insulin resistance, *Lipids* 31 (1996) S262–S265.
- G Bruckner, Fatty acids and cardiovascular diseases, in C K. Chow (Ed.), *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, Marcel Dekker Inc, New York, 1992, pp. 735–752.
- J Z. Mortensen, E B Schmidt, A H Nielsen, J. Dyerberg, The effect of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on hemostasis, blood lipids and blood pressure, *Thromb Haemost* 50 (1983) 543–546
- S Rogers, K S James, B.K Butland, M D. Etherington, J R O'Brian, J G Jones, Effects of a fish oil supplement on serum lipids, blood pressure, bleeding time, haemostatic and rheological variables A double blind randomised controlled trial in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 63 (1987) 137–143.
- K H Bonaa, K S Bjerve, B Straume, I T Gram, D Thelle, Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension, *N. Engl J. Med* 322 (1990) 795–801

- [7] L. Cobiac, P.J. Nestel, M.H. Wing, P.R.C. Howe, A low-sodium diet supplemented with fish oil lowers blood pressure in the elderly, *J Hypertens.* 10 (1992) 87–92.
- [8] S. Edelsteinova, J. Kyselovic, Y. Klimes, E. Sebokova, B. Kovacsova, F. Kristek, A. Mitkova, A. Vrana, P. Svec, Effects of marine fish oil on blood pressure and vascular reactivity in the hereditary hypertriglyceridemic rat, *Ann N.Y. Acad. Sci.* 683 (1993) 353–356.
- [9] H. Knapp, N-3 fatty acids and human hypertension, *Curr Opin Lipidol* 7 (1996) 30–33.
- [10] I. Toft, K.H. Bonna, O.C. Ingebretsen, A. Nordoy, T. Jenssen, Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on glucose homeostasis and blood pressure in essential hypertension: A randomized, controlled trial, *Ann Intern. Med.* 123 (1995) 911–918.
- [11] C. Yosefy, J.R. Viskoper, A. Laszt, R. Priluk, E. Guita, D. Varon, Z. Illan, E.M. Berry, N. Savion, Y. Adan, G. Lugassy, R. Schneider, A. Raz, The effect of fish oil on hypertension, plasma lipids and hemostasis in hypertensive, obese, dyslipidemic patients with and without diabetes mellitus, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 61 (1999) 83–87.
- [12] D.Q. Bao, T.A. Mori, V. Burke, I.B. Puddey, L.J. Beilin, Effects of dietary fish and weight reduction on ambulatory blood pressure in overweight hypertensives, *Hypertension* 32 (1998) 710–713.
- [13] M.M. Engler, M.B. Engler, T.L. Goodfriend, D.L. Ball, Z. Yu, P. Su, D.L. Kroetz, Docosahexaenoic acid is an antihypertensive nutrient that affects aldosterone production in SHR, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221 (1999) 32–38.
- [14] M.B. Engler, Y.H. Ma, M.M. Engler, Calcium-mediated mechanisms of eicosapentaenoic acid-induced relaxation in hypertensive rat aorta, *Am J Hypertens.* 12 (1999) 1225–1235.
- [15] T.A. Mori, D.Q. Bao, V. Burke, I.B. Puddey, L.J. Beilin, Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and heart rate in humans, *Hypertension* 34 (1999) 253–260.
- [16] D. Prisco, R. Paniccia, B. Bandinelli, M. Filippini, I. Francalanci, B. Giusti, L. Giurlani, G.F. Gensini, R. Abbate, G.G. Neri Serneri, Effect of medium-term supplementation with a moderate dose of n-3 fatty acids on blood pressure in mild hypertensive patients, *Thromb Res.* 91 (1998) 105–112.
- [17] R. Von Houwelingen, A. Nordoy, E. Van Der Beek, U. Houtsmuller, M. De Metz, G. Hornstra, Effect of a moderate fish intake on blood pressure, bleeding time, hematology, and clinical chemistry in healthy males, *Am J Clin Nutr* 46 (1987) 424–436.
- [18] D.M. Demke, G.R. Peters, O.I. Linet, C.M. Metzler, K.A. Klott, Effects of a fish oil concentrate in patients with hypercholesterolemia, *Atherosclerosis* 70, (1988) 73–80.
- [19] R. Vandongen, T.A. Mori, V. Burke, L.J. Beilin, J. Morris, J. Ritchie, Effects on blood pressure of n-3 fats in subjects at increased risk of cardiovascular disease, *Hypertension* 22 (1993) 371–379.
- [20] P.K. Whelton, S.K. Kumanyika, N.R. Cook, J.A. Cutler, N.O. Borhani, C.H. Henckens, L.H. Kuller, H. Langford, D.W. Jones, S. Satterfield, N.L. Lasser, J.D. Cohen, Efficacy of nonpharmacologic interventions in adults with high-normal blood pressure: Results from phase 1 of the Trials of Hypertension Prevention, *Am J Clin Nutr* 65 (Suppl 2) (1997) S652–S660.
- [41] E.B. Schmidt, J. Dyerberg, Omega-3 fatty acids. Current status in cardiovascular medicine, *Drugs* 47 (1994) 405–424.
- [42] J.E. Kinsella, B. Lokesh, R.A. Stone, Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease. Possible mechanisms, *Am. J. Clin. Nutr.* 52 (1990) 1–28.
- [43] R.A. DeFronzo, Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerosis, *Neth. J. Med.* 50 (1997) 191–197.
- [44] R.A. DeFronzo, Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: A complex metabolic web, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20 (Suppl 11) (1992) S1–S16.
- [45] C. Berne, Insulin resistance in hypertension—a relationship with consequences? *J. Int. Med.* 229 (Suppl 2) (1991) 65–73.
- [46] M.T. Clandinin, S. Cheema, C.J. Field, V.E. Baracos, Dietary lipids influence insulin action, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 683 (1993) 151–163.
- [47] M. Behme, Dietary fish oil enhances insulin sensitivity in miniature pigs, *J. Nutr.* 126 (1996) 1549–1553.
- [48] C. Leray, M. Andriamampandry, G. Gutbier, T. Raclot, R. Groscolas, Incorporation of n-3 fatty acids into phospholipids of rat liver and white and brown adipose tissues: a time-course study during fish-oil feeding, *J. Nutr. Biochem.* 6 (1995) 673–680.
- [49] Z.J. Zheng, A.R. Folsom, J. Ma, D.K. Arnett, P.G. McGovern, J.H. Eckfeldt, Plasma fatty acid composition and 6-year incidence of hypertension in middle-aged adults: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, *Am. J. Epidemiol.* 150 (1999) 492–500.
- [50] H.Y. Zhang, S. Reddy, T.A. Kotchen, A high sucrose, high linoleic acid diet potentiates hypertension, *Am. J. Hypertens.* 12 (2 Pt 1) (1999) 183–187.
- [51] L.N. Kaufmann, M.M. Peterson, S.M. Smith, Hypertensive effect of polyunsaturated fat, *Metabolism* 43 (1994) 1–3.
- [52] R.P. Mensink, A.M. Stoilwojk, M.B. Katan, Effect of a monounsaturated diet vs a polyunsaturated fatty acid enriched diet on blood pressure in normotensive women and men, *Eur. J. Clin. Invest.* 20 (1990) 463–469.
- [53] J.M. Iacono, R.M. Dougherty, Effects of polyunsaturated fats on blood pressure, *Annu. Rev. Nutr.* 13 (1993) 243–260.
- [54] S. Grimsgaard, K.H. Bonna, B.K. Jacobsen, K.S. Bjerve, Plasma saturated and linoleic fatty acids are independently associated with blood pressure, *Hypertension* 34 (1999) 478–483.
- [55] S.C. Langley-Evans, A.G. Ciamp, R.F. Grumble, A.A. Lackson, Influence of dietary fats upon systolic blood pressure in the rat, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 47 (1996) 417–425.
- [56] M.I. Uusitupa, E.S. Sarkkinen, J. Torpstrom, P. Pietinen, A. Aro, Long-term effects of four fat-modified diets on blood pressure, *Hum. Hypertens.* 8 (1994) 209–218.
- [57] S.R. Reddy, T.A. Kotchen, Attenuation of experimental hypertension by dietary linoleic acid is model dependent, *Am. Coll. Nutr.* 15 (1996) 92–96.
- [58] G. Bruckner, Biological effects of polyunsaturated fatty acids, in C.K. Chow (Ed), *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, Marcel Dekker Inc., New York, 1992, pp 631–645.