



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

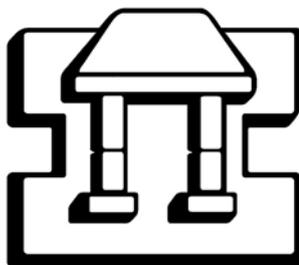
“Efecto de los ácidos grasos omega 3 (FA ω -3) y linoléico conjugado (CLA) en la Diabetes Mellitus 2 (DM2) en ratas Wistar”

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G A

PRESENTA:

RITA ISABEL OROZCO TAPIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA



TLALNEPANTLA DE BAZ, EDO. DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 7 de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, a cargo del Dr. Rafael Villalobos Molina y bajo la tutoría directa del Dr. Ricardo Mejía Zepeda.

Para la realización de este proyecto se contó con apoyo del proyecto PAPIIT No. IN223506-3 UNAM, otorgado al Dr. Ricardo Mejía Zepeda. Asimismo, hubo apoyo parcial por parte del proyecto PAPCA 2007 otorgado al Dr. Rafael Villalobos y Ricardo Mejía.

DEDICATORIAS

A mi mejor amigo, Quien me ha mostrado su maravillosa forma de ser, Quien me ha procurado y apoyado incondicionalmente, Quien me ha enseñado a amar, a perdonar, a luchar, a vivir, Quien forma la parte mas importante de mi vida, Quien ha hecho posible este logro, Quien me impulsa día con día siendo mi razón de ser, Quien me regaló una hermosa familia y unos amigos maravillosos, Quien ahora es mi fortaleza, mi amor, mi esperanza, mi vida!!! Gracias Dios mío, a Ti antes que a nadie, te dedico este pequeño logro.

A mis padres, mis primeros maestros, por quienes no solo soy una profesionista mas, gracias a ellos son quien soy, un ser humano completo en cuerpo y alma. A ustedes les debo toda una vida de agradecimiento por su paciencia, amor, sacrificios, cuidados, instrucciones y enseñanzas. Gracias por haberme enseñado a salir adelante, por haberme dado la fortaleza y el cariño en esos momentos en que me sentía agotada y agobiada por la carga, más gracias a ustedes nunca me sentí derrotada. Les dedico este pequeño triunfo que ustedes mismos fueron construyendo y espero lo sientan como suyo.

A mi hermano, mi cuñada, mi sobrina, mi abuelita, y mi familia, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida.

A mis tías María de la Paz y Teresita del niño Jesús por su apoyo y sus oraciones, Gracias!!!

A la QFB Yolanda Cortés que en paz descansa y a la madre María de Cristo por darme la oportunidad de recibir la formación académica que fue el inicio de este sueño. Gracias!!!

A mis hermanitos Malena y Luis, con quienes compartí alegrías, tristezas, preocupación y locuras. Gracias por crecer conmigo, por compartir esos momentos de felicidad y por permanecer a mi lado en los momentos de adversidad. Gracias por su apoyo incondicional todo este tiempo, gracias por permitirme aprender de sus virtudes, gracias por escuchar mis inquietudes. Como parte de mi familia, quisiera que este pequeño triunfo lo sintieran como suyo, pues entre los tres lo fuimos construyendo. Gracias por ser las maravillosas personas que son conmigo y por ser tan especiales para mi.

Al Dr. Ricardo Mejía Zepeda, quien siempre se mostró con una extraordinaria calidad como maestro, investigador y ser humano. De quien recibí una instrucción invaluable y apoyo incondicional durante todo este tiempo. Gracias colega!!! Gracias por su paciencia, su apoyo, su amistad y su enseñanza, gracias por ser el mejor maestro y colega que he tenido. Gracias por compartir conmigo su conocimiento, sus risas, sus momentos de ira contenida. Gracias! Fue un honor haber trabajado con usted y con mucho orgullo presento esta tesis porque fue dirigida por un

Gran Investigador. Me siento muy afortunada de haberlo conocido porque ahora se lo que significa ser un verdadero maestro y un verdadero investigador!. El mejor!!! Gracias Colega!!!

A la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro, ese maravilloso ser humano que me enseñó la mejor manera de triunfar y de salir adelante con la frente en alto. Gracias por enseñarme el valor de la humildad, la prudencia y la perseverancia, gracias por mostrarme con tu ejemplo que se puede tener licenciatura, maestría, doctorado y mantener la excelente calidad humana que tu tienes!!! Gracias por enseñarme que una persona no vale más por su cultura, por su grado escolar o por el cargo que pudieran tener, el inmenso valor viene de adentro, del corazón, de la belleza interior y ese valor no se adquiere en Harvard, más lo aprendí en esta universidad contigo. Gracias por todo!!! Gracias por tu apoyo y amistad durante este tiempo.

A mis grandes amigas Ligia y Tania, quienes me apoyaron en todo momento, quienes después de muchos años continúan brindándome su amistad incondicional y de quienes obtengo mucha de la fuerza que necesito para seguir adelante!!! Gracias por todo!!! Gracias por formar parte tan importante en mi vida!!!.

A mi amiga Massi, quien me ha brindado su cariño incondicional y ha procurado esta amistad durante mucho tiempo. Gracias por tus detalles amiga, que me alegran la vida!!! Ahora te invito a disfrutar este triunfo conmigo.

A mis amigas Karina, Areli, Martha, Rocio y Yola.

A mi amiga Consuelo con quien disfruté los primeros semestres de la carrera y compartí muchos momentos inolvidables. Gracias hija por ser esa hermosa personita que me transmite paz y alegría. Gracias por enseñarme a vivir con sencillez y de la forma en que solo tu sabes hacerlo. Gracias por todo!!!

A mis compañeritos de clases, Chino, Laurita, Zule, Los hobbits, Lalo, Paeasa, Paco, Yazid, Alejandro, Abraham. A mis compañeritas de servicio social, Mayra, Betza, Paloma y Keren.

A Emmanuel, gracias por tu apoyo y tu incondicionalidad, gracias por escucharme, por comprenderme y por quererme mucho. Gracias por regalarme esos momentos tan bellos e inolvidables. Gracias por mostrarme tu maravillosa forma de ser. Gracias por todo!!!

A mis compañeritos de laboratorio, Consuelo, Yeeeeesica, Ismael, Nando, Nanda, Perla, Carmen, Dra. Rita, Martha, Jaime, Vicky, gracias por hacer mucho muy ameno el trabajo.

A mi amigo Rogelio, quien me ha contagiado su entusiasmo y sobre todo me ha enseñado el valor de la vida!!! Gracias!!!

INDICE

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1 Diabetes.....	9
2.2 Clasificación.....	10
2.3 Diabetes Tipo 1.....	11
2.4 Diabetes Tipo 2.....	12
2.5 Metabolismo de Lípidos en la DM2.....	14
2.6 Modelos Experimentales de DM2.....	15
2.7 Tratamiento.....	16
3. ANTECEDENTES.....	17
4. OBJETIVOS.....	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
5.1 Diseño Experimental.....	20
5.2 Determinaciones Bioquímicas.....	23
5.3 Análisis de Ácidos Grasos.....	24
5.4 Histología.....	25
5.5 Inmunohistoquímica.....	26
5.6 Análisis Estadístico.....	27
6. RESULTADOS.....	28
6.1 Seguimiento de la Glicemia Durante la Lactancia.....	28
6.2 Peso Corporal.....	29
6.2.1 Ácidos grasos ω -3.....	29
6.2.2 Ácido linoléico conjugado.....	33
6.3 Glucosa.....	35
6.3.1 Ácidos grasos ω -3.....	35
6.3.2 Ácido linoléico conjugado.....	39

6.4 Lípidos.....	42
6.4.1 Ácidos grasos ω -3 (Suero).....	42
6.4.2 Ácido linoléico conjugado (Suero).....	45
6.4.3 Ácidos grasos ω -3 (Hígado).....	47
6.4.4 Ácido linoléico conjugado (Hígado).....	50
6.5 Composición de Ácidos Grasos.....	53
6.5.1 Dieta normal.....	53
6.5.2 Ácidos grasos ω -3 (Hígado).....	54
6.5.3 Ácido linoléico conjugado (Hígado).....	58
6.5.4 Ácidos grasos ω -3 (Riñón).....	61
6.5.5 Ácido linoléico conjugado (Riñón).....	64
6.6 Histología.....	67
6.6.1 Ácidos grasos ω -3.....	67
6.6.2 Ácido linoléico conjugado.....	69
6.7 Inmunohistoquímica.....	71
6.7.1 Ácidos grasos ω -3.....	71
6.7.2 Ácido linoléico conjugado.....	77
7. DISCUSIÓN.....	81
7.1 Glucosa.....	81
7.2 Lípidos.....	89
7.3 Composición de ácidos grasos.....	93
7.4 Histología e Inmunohistoquímica.....	96
8. CONCLUSIONES.....	100
9. APENDICE.....	102
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	104

1. RESUMEN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), se encuentra estrechamente asociada con la obesidad y se ha convertido en un problema importante de salud en todo el mundo. En México la prevalencia de esta enfermedad oscila entre 21 y 60% de la población adulta obesa. En general, este padecimiento se trata farmacológicamente, sin embargo, también se ha sugerido el uso de dietas que disminuyen los factores de riesgo. Los ácidos grasos omega 3 (ω -3) y el ácido linoleico conjugado (CLA) han suscitado gran interés por los efectos benéficos que generan en pacientes diabéticos. En este trabajo se analizó el efecto de los ácidos grasos ω -3 y CLA sobre la glicemia, metabolismo de lípidos, composición de ácidos grasos, insulina de islotes pancreáticos y daño al páncreas en un modelo de DM2. Se realizó un seguimiento de DM por mediciones de glucosa en sangre durante 18 semanas y se comprobó el desarrollo de la DM2 en ratas wistar. El grupo con DM2 presentó niveles elevados de glucosa hasta el final del tratamiento (307 mg/dl), por un lado, los grupos de ratas diabéticas suplementadas con ω -3 mostraron un marcado control de la hiperglicemia (104 mg/dl) mientras que los animales sometidos a dieta suplementada con CLA no controlaron los niveles de glucosa. En ratas diabéticas de 2 meses de edad (con 156 mg/dl de glucosa) al ser tratadas con ácidos grasos ω -3 disminuyeron los niveles de glucosa hasta niveles normales (81 mg/dl). En metabolismo de lípidos, se encontró que la diabetes induce varios cambios, por ejemplo, los triglicéridos en suero se elevaron por un aumento en el catabolismo de lípidos. Por su parte, los ácidos grasos ω -3 también aumentaron el contenido de triglicéridos en suero, probablemente a través de promover la movilización de grasas del tejido adiposo. El grupo con diabetes y alimento de ácidos grasos ω -3 mostró la mayor acumulación de colesterol en hígado. En suero, el colesterol se incrementó en los grupos diabéticos con DHC (con o sin suplemento de ω -3), así como en las ratas normales con sólo DHC, lo cual significa que independientemente de la diabetes, la DHC aumenta el colesterol en suero. Por su parte el CLA en la DM2 no mostró cambios en el metabolismo de lípidos con respecto a ratas diabéticas sin este suplemento.

En cuanto a la composición de ácidos grasos se observó una disminución en el porcentaje de ácido araquidónico de ratas diabéticas, probablemente asociado a la disminución en la actividad de la Δ -5 y Δ -6 desaturasas. Por el contrario, la DHC incrementó el porcentaje de ácido araquidónico, lo cual, podría resultar potencialmente nocivo al aumentar el sustrato para la formación de prostaglandinas y leucotrienos. Por su parte, los ácidos grasos ω -3 disminuyeron el porcentaje de ácido araquidónico en hepatocitos, el mecanismo de acción no se conoce, sin

embargo, se ha sugerido que estos ácidos grasos facilitan la incorporación de ácido araquidónico a triglicéridos plasmáticos.

El daño generado al páncreas de ratas diabéticas fue mayor en presencia de DHC, puesto que se encontró una necrosis severa de este tejido. El contenido de insulina incrementó con el suplemento de ω -3, el CLA lo aumentó hasta llegar a niveles normales más no fue condición suficiente para controlar la glicemia de ratas diabéticas. El mecanismo de acción de los ácidos grasos ω -3 va más allá del incremento en la síntesis de insulina, quizás actúan por medio de la activación de factores de transcripción que además de regular la producción de insulina, regulan la síntesis de glucotransportadores y receptores de insulina.

En conclusión, se logró el desarrollo de diabetes tipo 2 en ratas wistar, con niveles de hiperglicemia que van de moderados a severos. Se encontró que los ácidos grasos ω -3 controlan la hiperglicemia hasta niveles normales. La DM2 modifica la composición de ácidos grasos en hígado y riñón, así como la concentración de triglicéridos en suero.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 DIABETES

La diabetes mellitus (DM) comprende un grupo heterogéneo de trastornos y se caracteriza por una concentración anormalmente alta de glucosa en la sangre. Las causas de la hiperglicemia son principalmente deficiencia en la secreción de insulina o resistencia de las células del cuerpo a la acción de ésta. A menudo, además de alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, también ocurren alteraciones en el metabolismo de lípidos y proteínas (LeRoith et al., 2003).

La insulina es una hormona producida en el páncreas, particularmente en las células beta de los islotes de Langerhans. Estimula la captura de glucosa por parte de la mayoría de las células manteniendo así el nivel adecuado de glucosa en sangre. En la DM la insulina no es secretada en cantidades suficientes o bien no estimula eficientemente a sus células diana. En consecuencia, los niveles de glucosa sanguínea se elevan. Al reducirse la entrada de glucosa a las células la hidrólisis de triacilglicerol, la oxidación de los ácidos grasos, la gluconeogénesis y la formación de cuerpos cetónicos se aceleran y, en una condición conocida como cetosis, los niveles de cuerpos cetónicos en la sangre se vuelven anormalmente altos. Dado que los cuerpos cetónicos son ácidos, su elevada concentración provoca la excreción en exceso de H^+ por la orina. Esta excreción va acompañada de Na^+ , K^+ , PO_2^+ y H_2O , causando una disminución en el volumen sanguíneo y una grave deshidratación que se combina con la deshidratación resultante del efecto osmótico de la elevada concentración de glucosa en sangre; la sed excesiva es un síntoma clásico de la diabetes (Voet y Voet, 1990).

Los síntomas de la hiperglicemia crónica incluyen polidipsia, poliuria, polifagia y pérdida de peso, además de la susceptibilidad a ciertas infecciones. Las complicaciones que se generan a largo plazo incluyen retinopatía con pérdida potencial de la visión, neuropatía periférica y nefropatía diabética, llevando al paciente a un fallo renal severo. También se puede observar daño gastrointestinal, genitourinario, cardiovascular y disfunción sexual (LeRoith et al., 2003).

Los pacientes con diabetes presentan una marcada incidencia de aterosclerosis y enfermedad cerebrovascular, además de hipertensión y otras anormalidades en el metabolismo de lipoproteínas (LeRoith et al., 2003).

El número de diabéticos aumenta de manera significativa en el mundo entero por lo que se está convirtiendo en la enfermedad del siglo XXI; así mismo, es uno de los principales problemas de salud en México y su prevalencia oscila entre 21 y 60% de la población adulta obesa (Castro y Liceaga, 2002).

2.2 CLASIFICACIÓN

En 1979, el National Diabetes Data Group (NDDG), de los Institutos Nacionales de Salud, en Estados Unidos, publicó la clasificación de la diabetes mellitus y otras categorías de la intolerancia a la glucosa (Islas y Revilla, 2002).

La clasificación propuesta es la siguiente:

DIABETES MELLITUS

- Diabetes mellitus dependiente de insulina o tipo 1 (DMID)
- Diabetes mellitus no dependiente de insulina o tipo 2 (DMNID)
 - No obeso
 - Obeso
- Diabetes asociada con otras situaciones o síndromes
 - Enfermedad pancreática
 - De etiología hormonal
 - Inducido por sustancias químicas o fármacos
 - Anormalidades del receptor de insulina
 - Síndromes genéticos
- Diabetes mellitus gestacional (DMG)

La NDDG reconoció la DM como un síndrome, es decir, un grupo de enfermedades que se caracterizan por hiperglicemia e intolerancia a la glucosa basada en la investigación científica de este síndrome heterogéneo. Sin embargo, en esta época se habían descubierto muy pocos indicadores genéticos de DM, y los conocimientos sobre la base inmunitaria de muchos casos de DM tipo 1 eran rudimentarios (Maureen, 2003).

En 1996 y 1997 la American Diabetes Association creó un comité de expertos que estudió los resultados de investigación obtenidos durante los últimos 20 años y propuso algunos cambios en la clasificación de NDDG-OMS. Las características principales de los cambios en la clasificación fueron las siguientes:

- Eliminación de los términos diabetes mellitus insulino dependiente y diabetes mellitus no insulino dependiente y de sus acrónimos, IDDM y NIDDM. Sin embargo se postuló que se conservaran los términos diabetes tipo 1 y tipo 2.
- Inclusión dentro de la diabetes de tipo 1 de variedades de diabetes en que ocurre destrucción de células beta pancreáticas, como los casos con causa autoinmunitaria y los casos de causa desconocida (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997 and The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2004).

2.3 DIABETES TIPO 1

La Diabetes tipo 1 (DM1) es consecuencia de la destrucción de células beta lo que lleva a la deficiencia absoluta de insulina. Esta variedad representa el 10% de los pacientes diabéticos del mundo occidental, se puede manifestar a cualquier edad, aunque es más común en niños y adultos jóvenes (Islas y Revilla, 2002). En estas personas, la enfermedad se caracteriza por el comienzo repentino de síntomas intensos, la necesidad de administrar insulina exógena para conservar la vida y la tendencia a la cetosis, incluso en estado basal (Maureen, 2003).

Dentro de este tipo de diabetes destaca la variedad autoinmunitaria, la cual, se caracteriza por la destrucción autoinmunitaria de las células beta productoras de insulina en los islotes pancreáticos, así como la presencia de anticuerpos contra insulina

o anticuerpos contra la descarboxilasa del ácido glutámico. Algunos elementos genéticos constituyen factores de riesgo importantes y quizá algunos factores ambientales desencadenan la lesión inicial de la célula beta y después apresuran el proceso destructivo (Concannon et al., 1998).

La DM1 también comprende los casos en que no se conocen las causas de la destrucción de las células beta, pero al parecer no es regida por mecanismos inmunitarios. Esta categoría comprende un grupo muy reducido de pacientes con DM1; probablemente es hereditaria pero no está ligada a los genes de histocompatibilidad. Los pacientes experimentan diversos grados de deficiencia insulínica (Maureen, 2003).

2.4 DIABETES TIPO 2

Este tipo de diabetes comprende alrededor del 90% de los pacientes diabéticos. A diferencia de la DM1 los pacientes con DM2 no dependen de insulina exógena para su control (Maureen, 2003). En cuanto a la insulina, suele existir deficiencia en su secreción o resistencia de las células del cuerpo a la acción de esta hormona, lo que lleva a un cuadro de hiperinsulinemia e intolerancia a la glucosa (Bennett, 2003).

La evolución natural de la DM2 sigue un curso congruente con las relaciones entre los valores de insulina y glicemia. En individuos normoglicémicos con resistencia a insulina se observa inicialmente un marcado incremento de esta hormona, lo cual, es producto de una reacción compensadora al aumento de resistencia a insulina intracelular (Lillioja et al., 1998). Ello a su vez origina pequeños incrementos en las concentraciones de glucosa circulante. Conforme la resistencia a insulina se agrava, la tolerancia a la glucosa disminuye hasta que finalmente se manifiesta una intolerancia severa. Posteriormente la descompensación que culmina en diabetes se vincula con un decremento de la secreción temprana de insulina debido a un fallo en la función de las células beta (Saad et al., 1991).

Todas estas alteraciones en la DM2 resultan de una combinación de factores genéticos y no genéticos cuyas consecuencias son la resistencia a insulina y/o la deficiencia de esta. No se conocen los genes específicos, pero se les investiga de manera

intensiva. Algunos de los factores no genéticos son la edad avanzada, el consumo excesivo de calorías, sobrepeso, adiposidad central, vida sedentaria y bajo peso al nacer. Es muy probable que las causas sean factores ambientales que se añaden a la predisposición genética. Los principales factores que se sabe contribuyen al desarrollo de esta enfermedad han sido obesidad y actividad física reducida (Bennett, 2003).

La obesidad es el factor determinante en la incidencia de DM2 pues se considera que antecede a la aparición de esta enfermedad en sujetos con predisposición genética. En diferentes estudios de individuos obesos se ha encontrado una prevalencia de diabetes mellitus del 10 al 20% (Beck-Nielsen y Hother-Nielsen, 2003). Sin embargo, la importancia de la obesidad radica no sólo en su elevada prevalencia, sino en su relación con otras alteraciones metabólicas y enfermedades como diabetes mellitus, hiperlipidemia, hipertensión arterial sistémica y algunos tipos de cáncer (Islas y Revilla, 2002).

La hipersecreción de insulina es un signo temprano en obesos no diabéticos; tal fenómeno es necesario para compensar la resistencia metabólica a la insulina que resulta del consumo excesivo de alimento. La secreción de insulina puede disminuir con el tiempo en los obesos que terminan por mostrar hiperglicemia. Tal decremento en la función de las células beta podría ser de origen genético (Porte, 1991). El papel de la obesidad todavía se discute, aunque se ha incorporado como parte del síndrome metabólico (SM) y ciertamente se asocia con resistencia a la insulina (Ludvik et al., 1995).

El síndrome metabólico es una asociación de alteraciones metabólicas tales como dislipidemias (aumento de colesterol y/o triglicéridos en la sangre), obesidad, hipertensión arterial, resistencia a insulina, intolerancia a la glucosa, entre otras alteraciones y se considera como un factor de riesgo para el desarrollo de la DM2. El incremento insidioso en los elementos del SM, son los responsables de la actualmente considerada epidemia mundial de diabetes tipo 2 (Reaven, 1991).

Las personas con este tipo de diabetes, sin un control adecuado, tienen mayor riesgo de desarrollar varias complicaciones médicas, tales como enfermedades cardíacas y renales, entre ellas la hipertensión (Lifshitz, 2002). Durante estas alteraciones es

importante hacer algunas consideraciones dietéticas. Por ejemplo se debe tener como objetivo que las concentraciones de lípidos sanguíneos (colesterol y triglicéridos) sean normales. Asimismo, es importante el control de la tensión arterial, la cual está ampliamente asociada con la diabetes (Lifshitz, 2002).

2.5 METABOLISMO DE LÍPIDOS EN LA DM2

La DM causa un estado de hiperlipidemia, lo cual tiene graves consecuencias ya que contribuye al desarrollo de otras complicaciones (Anders y Sima, 2000). La alteración más común es la hipertrigliceridemia que, de manera habitual, cursa en forma conjunta con niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y con valores normales o discretamente elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Islas y Revilla, 2002). En la DM2 se estimula la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado, debido a las concentraciones elevadas de glucosa, insulina y ácidos grasos libres (FFA) en particular por depósitos abdominales con aporte directo al hígado. Además, la resistencia hepática a la insulina puede aumentar la secreción de lipoproteínas y también puede incrementarse el recambio de las partículas de VLDL plasmáticas. La consecuencia de todo lo anterior puede ser un incremento de las concentraciones de tales partículas en el plasma y disminución de las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad en dicho medio (HDL), un perfil de lipoproteínas aterógenas que tal vez contribuya a la mayor mortalidad por enfermedades cardiovasculares en obesos diabéticos (Howard et al., 1987).

2.6 MODELOS EXPERIMENTALES DE DM2

La DM2 es una enfermedad heterogénea relacionada con susceptibilidad genética y estilo de vida, lo que dificulta el establecimiento de modelos experimentales que pudieran ayudar al entendimiento de la patogénesis y al desarrollo de nuevos tratamientos (Zhang et al., 2003).

Los modelos de diabetes tipo 2 más utilizados son la pancreatectomía parcial y la destrucción química de las células beta del páncreas por medio de estreptozotocina

(STZ). Ambos métodos originan hipoinsulinemia, hiperglicemia y resistencia consecutiva a la insulina causada por un defecto en el transporte de glucosa (Shepherd y Kahn, 2003).

La STZ ingresa a las células β del páncreas a través del transportador GLUT 2. Una vez en el interior de las células se metaboliza y se libera óxido nítrico (NO), el cual es el principal responsable del efecto citotóxico de la STZ. Además del NO, se forman especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, todos ellos se encargan de inhibir el ciclo de krebs y limitar la formación de ATP, además de contribuir a la fragmentación del DNA. Estos eventos dan como resultado la inhibición en la síntesis de insulina y su secreción y posteriormente darán lugar a la muerte celular (Szkudelski, 2001).

La STZ se utiliza comúnmente para generar modelos de DM en ratas adultas. Particularmente para el desarrollo de DM2, se han estudiado varios modelos en neonatos a diferentes tiempos después del nacimiento, desde 0 hasta 4 o 5 días de nacidas y concentraciones de STZ hasta de 160 mg/Kg. Se ha demostrado que si las ratas son tratadas con STZ (100mg/kg) al día 2 de nacimiento, se genera una severa destrucción de células β . Posteriormente, los neonatos tienden a regenerar de manera parcial dichas células permitiendo así la baja producción de insulina y con ello el desarrollo de un modelo de DM2 (Areas et al., 2003).

Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la DM2 se encuentra estrechamente relacionada con obesidad, pues una de las causas de resistencia insulínica en el ser humano son las concentraciones altas de ácidos grasos libres. Asimismo en modelos animales, el consumo abundante de grasa origina obesidad lo que se vincula con una mayor resistencia a insulina. Los niveles de insulina plasmática pueden ser bajos, normales o altos, según la duración de la dieta. De la misma manera, la magnitud de la resistencia a insulina también depende de la composición de ácidos grasos (Shepherd y Kahn, 2003).

Un modelo experimental que relacione obesidad y DM2 es un sistema en el que se puede estudiar los mecanismos o los parámetros que participan en el desarrollo de la

DM2, y al mismo tiempo donde se puede probar diversos tratamientos que lleven al control de esta enfermedad.

2.7 TRATAMIENTO

En general, el tratamiento de la DM2 está basado en cuadros farmacológicos tales como antihiper glucémicos orales que disminuyen la resistencia a insulina, secretagogos que incrementan la secreción endógena de insulina o bien, análogos de insulina que sustituyen la secreción endógena por su administración exógena (LeRoith et al., 2003). Sin embargo, también se ha sugerido el uso de diferentes dietas que disminuyen los factores de riesgo tales como la obesidad, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, e hipertensión. Estas dietas suelen ser bajas en ácidos grasos (FA) saturados y ricas en poliinsaturados (PUFAs), donde estos últimos se han relacionado con una disminución en el desarrollo de la enfermedad (Voet y Voet, 1990). Se ha observado, por ejemplo, en esquimales que a pesar del consumo elevado de colesterol y grasa muestran una incidencia muy baja de enfermedades coronarias y trombosis (Voet y Voet, 1990). El consumo de animales marinos los provee de una proporción más alta de grasas insaturadas que la que le provee la dieta occidental típica. Uno de los ácidos grasos que se encuentra mayoritariamente en los peces de agua fría es el ácido eicosapentaenóico (EPA), el cual, pertenece a la familia de los ácidos grasos ω -3 (FA ω -3). Al parecer, estos ácidos grasos inhiben la formación de prostaglandinas de la serie 2, las cuales en su mayoría son potentes vasoconstrictoras y algunas estimuladoras de la agregación plaquetaria. Además disminuyen los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma (Voet, y Voet, 1990).

Debido a los efectos benéficos que se han observado, los FA ω -3 han despertado gran interés en el tratamiento de la DM2. Estudios recientes sugieren que el tratamiento de ratas diabéticas con FA ω -3 controla los niveles de glucosa y de lípidos, previene el estrés oxidativo y mejora la actividad de enzimas antioxidantes endógenas en varios tejidos (Hunkar et al., 2002). También se ha reportado que tienen efectos benéficos en la hipertensión arterial de pacientes diabéticos, disminuyendo la presión arterial sistólica, diastólica y media (Nasiff-Hadad y Meriño-Ibarra, 2003). Aunque se desconoce su mecanismo de acción, se conoce que el EPA es un precursor de leucotrienos de la serie 5, estos últimos son compuestos con actividades fisiológicas sustancialmente inferiores

que la de sus contrapartes derivadas del araquidonato. Ello sugiere que una dieta que contenga estos ácidos grasos debería disminuir la extensión de las respuestas inflamatorias mediadas por las prostaglandinas y leucotrienos (Voet y Voet, 1990).

Así como los ácidos grasos ω -3 han resultado benéficos en el tratamiento de la DM, el ácido linoléico conjugado (CLA) del que tampoco se conoce su mecanismo de acción, ha sido investigado por sus efectos potencialmente benéficos en prevención y tratamiento de enfermedades tales como, cáncer, aterosclerosis, obesidad y DM2 (Taylor y Zahradka, 2003). Existe evidencia de que en ratas no obesas el CLA puede prevenir el desarrollo de hipertensión arterial (Inoue et al., 2004). Asimismo, se ha encontrado recientemente que el CLA administrado a ratas Zucker diabéticas mejora la sensibilidad a insulina (Simončíkova et al., 2002).

3. ANTECEDENTES

Se probó el efecto del ácido eicosapentaenóico (EPA) en un modelo de insulinoresistencia e hipertensión en ratas Wistar, y se observó normalización en los niveles de insulina y glucosa sanguínea (Mori et al., 1999).

En un estudio sobre el efecto del EPA en un modelo de DM2 e hipertrigliceridemia, se observó una reducción de lípidos plasmáticos, triacilglicéridos hepáticos y depósitos de grasa abdominal, además de mejorar la intolerancia a la glucosa. Estos datos muestran que la administración de una dieta prolongada con EPA puede ser efectiva en la prevención de la insulinoresistencia (Minami et al., 2002).

En un modelo de DM2 se observó un control en la hemoglobina glucosilada asociado a una elevación de la concentración de insulina sanguínea posterior a la administración de omega-3 en la dieta, estos datos sugieren que dichos ácidos grasos modifican la secreción de insulina (Sullivan et al., 1990).

En un modelo de insulinoresistencia en ratas, se observó que al sustituir con ácidos grasos ω -3 el 10% de una dieta rica en grasas saturadas (70cal%), hubo una mejoría en la acción de la insulina y se encontró un decremento en los niveles de triglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol en hígado y músculo esquelético (Simončíkova et al., 2002).

Por otro lado, se encontró que el suplemento de EPA, ácido alfa-linolénico y ácido docosahexaenóico (DHA), previenen la DM inducida con aloxana en animales experimentales además de atenuar el estrés oxidativo que ocurre en esta enfermedad (Suresh y Das, 2003).

En humanos con DM e hipertensión arterial, el consumo de los ácidos grasos ω -3 en dosis moderadas (hasta 3 g/día) produce efectos benéficos en el estado general del individuo (Nasiff-Hadad y Meriño-Ibarra, 2003). En forma similar, estudios del efecto del CLA sobre la hiperinsulinemia y la tolerancia a glucosa en ratas zucker prediabéticas, reportan mejorías en dicho modelo. Así, se concluyó que el CLA podría ser utilizado como una terapia para la prevención y tratamiento de DM2 (Houseknecht et al., 1998).

Asimismo, la alimentación de ratas espontáneamente hipertensas con una dieta rica en CLA evitó el incremento de la presión arterial significativamente (Inoue et al., 2004). Este estudio nos lleva a pensar en la capacidad del CLA para prevenir el desarrollo de la hipertensión en la DM.

4. OBJETIVOS

4.1. General

- Investigar la participación de los ácidos grasos ω -3 y CLA en un modelo experimental de Diabetes Mellitus tipo 2.

4.2. Particulares

- En un modelo de Diabetes Mellitus tipo 2, generado por inyección intraperitoneal de STZ (100 mg/kg):
 - Administrar ácidos grasos ω -3 ó CLA como suplemento en la dieta.
 - Observar el efecto de una dieta hipercalórica con y sin suplementos de ácidos grasos ω -3 ó CLA.
 - Realizar un seguimiento de peso y glucosa.
- En ratas wistar a las 15 semanas de tratamiento:
 - Evaluar el contenido de colesterol y triglicéridos presentes en suero.
 - Evaluar la cantidad de colesterol, triglicéridos y proteínas en hígado.
 - Analizar la composición de ácidos grasos en hígado y riñón mediante cromatografía de gases.
 - Estudiar histológicamente el daño generado por la DM en páncreas.
 - Evaluar por inmunohistoquímica el contenido de insulina presente en los islotes pancreáticos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos y solventes utilizados en este trabajo fueron grado reactivo y se adquirieron de J.T. Baker, Merck y Sigma. Los reactivos para cromatografía de gases fueron grado HPLC de la marca J.T. Baker. Los estándares de metil ésteres se adquirieron de Sigma con una pureza mínima del 98%.

Las cápsulas de ácido linoleico conjugado (CLA) de 1 g/cápsula y ácidos grasos omega-3 (ω -3) de aceite de salmón (540 mg de ácido eicosapentaenoico y 360 mg de ácido docosahesahenoico/cápsula) fueron obtenidas de casas comerciales y se analizaron por cromatografía de gases.

5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevó a cabo la inducción de la DM2 en neonatos machos de rata Wistar. A las 48hrs de nacidos se les indujo DM2 por inyección intraperitoneal de estreptozotocina (100 mg/kg de peso corporal). La mortalidad en este modelo de DM fue del 60% y se obtuvieron 5 ± 2 animales por grupo. Las ratas se mantuvieron en condiciones de bioterio (12 h luz y 12 h oscuridad a aprox. 24°C) y se destetaron a las 3 semanas de edad. A partir de ese momento se les aplicaron diferentes dietas durante 15 semanas.

1.- Distribución de grupos control (n= 5 \pm 2)

- *1A. Ctrl. Inyección intraperitoneal de 50 μ l de buffer de citratos (BC) y dieta normal.*
- *1B. DHC. BC y dieta hipercalórica (13% grasas saturadas y 10% de sacarosa).*
- *1C. ω -3. BC y dieta normal con suplemento de ácidos grasos ω -3.*
- *1D. CLA. BC y dieta normal con suplemento de ácido linoléico conjugado (CLA).*

Grupo 1A "Control". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 50 μ l de buffer de citratos (pH 4.5). A partir del destete se les aplicó la dieta normal cuyo contenido fue de 18% de proteína, 5% de grasa y 5% de Fibra.

Grupo 1B "DHC". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 50 μ l de buffer de citratos (pH 4.5). A partir del destete se le dio una dieta hipercalórica (DHC) que consistió en el mismo alimento que las anteriores, pero enriquecido 13% en peso con grasas saturadas principalmente y 10% de sacarosa. Para incrementar las grasas saturadas en la dieta se utilizó manteca, la cual se calentó a 60°C, una vez que se alcanzó esta temperatura se sumergieron las croquetas durante 30 min. Para completar la DHC se incluyó 10% de sacarosa en el agua de beber. Los animales tuvieron el agua y alimentos *ad libitum*.

Grupo 1C " ω -3". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 50 μ l de buffer de citratos (pH 4.5). Se les dio una dieta normal y simultáneamente se les administró un suplemento alimenticio de ácidos grasos ω -3 a una dosis semanal de ácido eicosapentaenóico (EPA) de 360 mg/kg de peso corporal y ácido docosahexaenóico (DHA) 240 mg/kg de peso.

Grupo 1D "CLA". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 50 μ l de buffer de citratos (pH 4.5). Se les dio una dieta normal y simultáneamente se les administró un suplemento alimenticio de Ácido Linoléico Conjugado (CLA) a una concentración semanal de 1.06 g/kg de peso.

Ambos suplementos (CLA y ω -3) fueron administrados oralmente con una pipeta despachadora Eppendorf.

2. Distribución de grupos experimentales con dieta normal (n= 5 ± 2)

- *2A. DM2. Inyección intraperitoneal de 100 mg/kg de STZ y dieta normal.*
- *2B. DM2- ω -3. STZ y dieta normal con suplemento de ácidos grasos ω -3.*
- *2C. DM2-CLA. STZ y dieta normal con suplemento de CLA*

Grupo 2A "DM2". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 100 mg/kg de STZ disuelta en un buffer de citratos (pH 4.5). A partir del destete se les aplicó la dieta normal.

Grupo 2B "DM2- ω -3". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 100 mg/kg de STZ disuelta en un buffer de citratos (pH 4.5). A partir del destete se les aplicó la dieta normal con un suplemento oral de ácidos grasos ω -3 a una dosis semanal de ácido eicosapentaenóico (EPA) de 360 mg/kg de peso corporal y ácido docosahexaenóico (DHA) 240 mg/kg de peso corporal.

Grupo 2C "DM2-CLA". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 100 mg/kg de STZ disuelta en un buffer de citratos (pH 4.5). A partir del destete se les aplicó la dieta normal con un suplemento oral de Ácido Linoléico Conjugado (CLA) a una concentración semanal de 1.06 g/kg de peso corporal.

Distribución de grupos experimentales con DHC (n= 5 ± 2)

- *3A. DM2-DHC. STZ y dieta hipercalórica (13% grasas saturadas y 10% de sacarosa).*
- *3B. DM2-DHC- ω -3. STZ, dieta hipercalórica y suplemento de ácidos grasos ω -3.*
- *3C. DM2-DHC-CLA. STZ, dieta hipercalórica y suplemento de CLA*

Grupo 3A "DM2-DHC". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 100 mg/kg de STZ disuelta en un buffer de citratos (pH 4.5). A partir del destete se le dio una dieta hipercalórica (DHC) enriquecida con 13% de grasas saturadas

principalmente y 10% de sacarosa. Para la incorporación de las grasas saturadas en la dieta, se utilizó el mismo procedimiento que el descrito para el grupo 1B.

Grupo 3B "DM2-DHC- ω -3". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 100 mg/kg de STZ disuelta en un buffer de citratos (pH 4.5). A partir del destete se le dio una dieta hipercalórica (DHC) enriquecida con 13% de grasas saturadas y 10% de sacarosa. Simultáneamente se les administró un suplemento oral de ácidos grasos ω -3 a una dosis semanal de ácido eicosapentaenóico (EPA) de 360 mg/kg de peso corporal y ácido docosahexaenóico (DHA) 240 mg/kg de peso corporal.

Grupo 3C "DM2-DHC-CLA". A las 48 hrs de nacimiento, se les inyectaron por vía intraperitoneal 100 mg/kg de STZ disuelta en un buffer de citratos (pH 4.5). A partir del destete se le dio una dieta hipercalórica (DHC) enriquecida con 13% de grasas saturadas y 10% de sacarosa. Simultáneamente se les administró un suplemento oral de Ácido Linoléico Conjugado (CLA) a una concentración semanal de 1.06 g/kg de peso corporal.

Se llevó a cabo un monitoreo semanal de glucosa en sangre con un glucómetro marca AccuChek y tiras reactivas, el glucómetro funciona con el método de la glucosa oxidasa. Asimismo se realizó un monitoreo semanal de peso desde el día del nacimiento. A las 18 semanas de edad, se llevó a cabo el sacrificio de los animales por punción cardiaca para la obtención del suero, finalmente se extrajo el páncreas.

5.2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.

Lípidos en suero. La concentración de lípidos se determinó con kits enzimáticos utilizando 10 μ l de suero siguiendo las indicaciones del proveedor. El colesterol se midió enzimáticamente por los hidroperóxidos formados de la acción de una colesteryl esterasa y el desarrollo de color de una reacción acoplada. El kit fue adquirido de la marca Biosystems. Los triglicéridos se midieron por un kit de la marca Spinreact, la cual, se basa en el mismo principio de formación de hidroperóxidos y desarrollo de una reacción

colorida que el descrito para colesterol, con la diferencia de formación de gliceraldehido 3 fosfato e hidroxiacetona fosfato a partir del glicerol de los triglicéridos.

Lípidos en hígado. Se homogeneizaron 200 mg de tejido en 300µl de PBS y se preparó una dilución 1:5. Para medir triglicéridos, se tomaron 10 µl de la dilución y para colesterol 50 µl. La concentración de lípidos se determinó con los kits enzimáticos que se utilizaron para el suero. Se siguió el mismo procedimiento tomando 10 µl y 50 µl de la dilución.

Proteína en hígado. La proteína se cuantificó por el método de Bradford (1976). Se preparó la curva de proteína con albúmina (1 mg/ml) y agua bidestilada. De albúmina se tomaron 2 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl y 10 µl respectivamente completando un volumen de 200 µl con agua bidestilada. Para las muestras se homogeneizaron previamente 200 mg de tejido en 300 µl de PBS y se preparó una dilución 1:40, de esta dilución se tomaron 5 µl completando un volumen de 200 µl con agua bidestilada. Posteriormente a la curva de albúmina y a las muestras se les agregó 1 ml de reactivo de Bradford. Finalmente para determinar la concentración, se midió la absorbancia a 595 nm.

5.3. ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS.

Extracción de lípidos. Se utilizó el método de Folch et al. (1957). Se tomó 1 g de tejido (Hígado o Riñón) y se homogeneizó en 19 ml de la mezcla cloroformo-metanol 2:1. Posteriormente se filtró en papel desengrasado, una vez filtrado, se le agregó 20% de agua bidestilada. Se mezcló y se centrifugó a 2000 rpm durante 2 min. Se retiró la fase superior mientras que la fase inferior se lavó 3 veces con una mezcla de cloroformo-metanol-agua (3:48:47). Finalmente se recuperó la fase lipídica y se colectó en viales de vidrio con capacidad de 20 ml. El solvente que contenía a los lípidos fue evaporado con Nitrógeno y los lípidos fueron almacenados a -20°C.

Transesterificación. Se utilizó el método de transesterificación con trifluoruro de boro al 14% en metanol de acuerdo al procedimiento descrito por Morrison y Smith (1964).

Se resuspendieron los lípidos con 1 ml de cloroformo-metanol 2:1 y se tomaron 30 μ l de esta solución en viales de 4 ml. Se evaporaron los solventes con gas nitrógeno. Posteriormente se le agregó 500 μ l de trifluoruro de boro al 14% en metanol y se puso una atmósfera de nitrógeno. Los viales fueron colocados en baño maría a 92°C (punto de ebullición en la Cd. De México), dejándolos hervir durante 30 min. Al cabo de este tiempo, se atemperó y se agregó 1 ml de Hexano HPLC y 500 μ l de agua bidestilada, se agitó fuertemente y se colectó la fase superior que contenía los lípidos. Finalmente se evaporó la muestra con gas nitrógeno y se almacenó protegida de la luz a -20°C.

Análisis por cromatografía de gases. Los reactivos y solventes utilizados para estos análisis fueron grado HPLC. Se resuspendieron los metil ésteres de ácidos grasos con 100 μ l de hexano HPLC y se inyectó 1 μ l en el cromatógrafo de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin Elmer controlado por computadora, equipado con detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar omegawax de supelco de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y grosor de 0.25 mm. La flama se mantuvo con hidrógeno y aire, y como gas de arrastre se utilizó nitrógeno de alta pureza. El programa utilizado fue diseñado de la siguiente forma: inicio a 180°C por 5 min, luego una rampa de 5°C/min hasta 220°C y ahí se mantuvo por 18 minutos más, para un tiempo total de 35 min. El flujo de nitrógeno para la columna fue de 14 ml/min. La identidad de los ácidos grasos se obtuvo por comparación de los tiempo de retención de metil ésteres estándares. Se integró el área de cada uno de los picos detectados para obtener las proporciones porcentuales.

5.4. HISTOLOGÍA

Fijación e inclusión de páncreas. Los animales fueron anestesiados con una dosis de 40 mg/Kg de peso de pentobarbital seguido de la punción cardiaca. Los páncreas se extrajeron inmediatamente, se lavaron con solución salina fisiológica al 0.15 M y fueron

colocados en paraformaldehído al 4% en PBS durante al menos 72 hrs. Al cabo de ese tiempo, los órganos se colocaron en agua de grifo durante 30 min para retirar el fijador. Posteriormente se pasaron por diferentes concentraciones de alcohol durante 30 min en orden creciente como se muestra en el apéndice 1, con el fin de obtener la consistencia adecuada del tejido.

Una vez deshidratados los páncreas, se aclararon con xilol y se embebieron para finalmente ser incluidos.

Montaje de los cortes. Los bloques de parafina fueron cortados en microtomo, con una medida de entre 3 y 5 micras. Una vez hecho el corte se colocó en el portaobjetos previamente gelatinizado y se agregaron gotas de solución Ruyter hasta dejar extendido el corte. Posteriormente, para aumentar la adhesión, la laminilla se mantuvo en una estufa a 40°C hasta que se secó.

Se realizó la tinción de eosina-hematoxilina como se muestra en el apéndice 1.

5.5. INMUNOHISTOQUÍMICA

Las muestras de páncreas fueron cortadas a 3µm de espesor utilizando un crióstato (Marca Leica Modelo RX400) a - 20°C. Luego del corte fueron lavadas con PBS y con H₂O destilada dos veces. Posteriormente, los tejidos se rehidrataron con alcohol etílico a diferentes concentraciones (100, 90, 80 y 70%) a intervalos de 1 min. cada uno. Se lavaron dos veces con PBS y se permeabilizaron con triton X-100 0.5% en PBS por 5 min. Las muestras fueron bloqueadas con albúmina sérica bovina (BSA) 1% en PBS durante 2 hrs. y fueron lavadas con PBS-triton tres veces y dos veces más con PBS. Se incubaron con anticuerpo anti-insulina diluido (1:100) en PBS-BSA al 1% durante toda la noche (4°C). Al cabo de este tiempo se lavaron dos veces con PBS. Posteriormente se trataron con un segundo anticuerpo (cabra anti-conejo) acoplado a TRITC, diluido (1:100) en PBS-BSA al 1% y específico contra el primer anticuerpo empleado. El anticuerpo acoplado a TRITC se dejó actuar en la oscuridad durante 1.5hr a 37°C en cámara húmeda. Después de tres

lavados en PBS-triton y dos con PBS, las muestras fueron contra-teñidas con hematoxilina durante 15 seg. y alcohol ácido. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas en diferentes concentraciones de alcohol etílico (80, 90 y 100% durante 1 min.), con Xilol al 100% por 5 min., montadas con Entellan, selladas con barniz y observadas al microscopio confocal modelo DM IRB.

5.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de lípidos en suero e hígado, peso, insulina y glucosa se analizaron mediante la prueba de ANOVA simple ($n= 5 \pm 2$ $P < 0.05$) seguida de la prueba de Fisher.

6. RESULTADOS

6.1. SEGUIMIENTO DE LA GLICEMIA DURANTE LA LACTANCIA

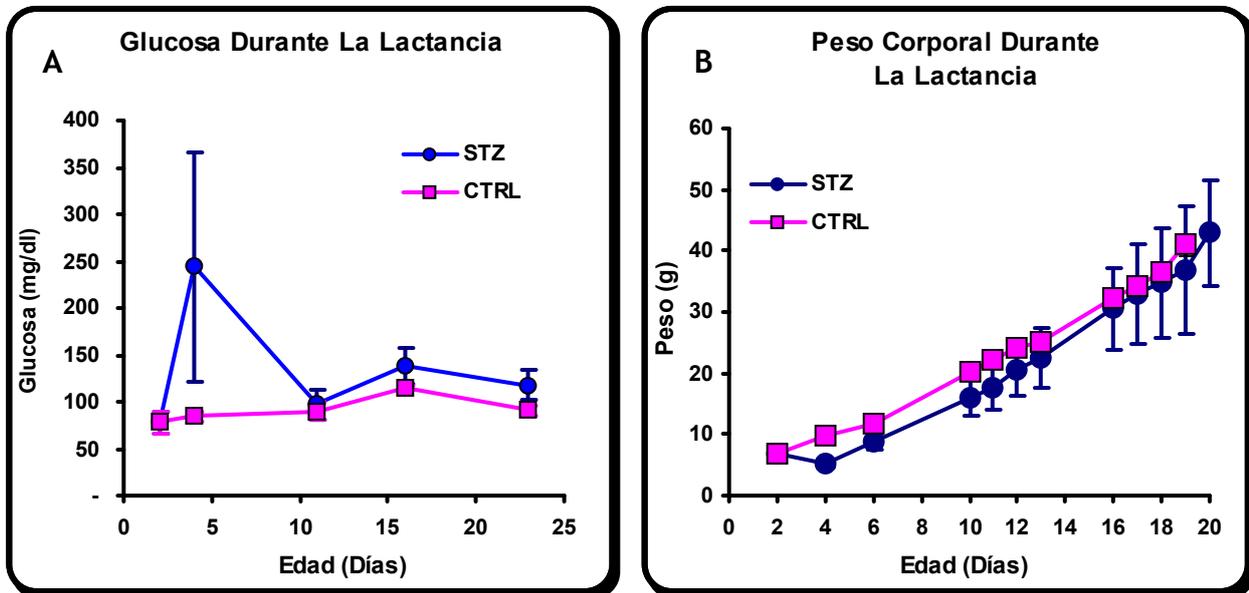


Fig. 1. Inducción de diabetes con STZ en ratas wistar de 48 h de nacidas. A). Seguimiento de la glicemia de ratas neonatas inyectadas con STZ en amortiguador de citratos e inyectadas sólo con dicho amortiguador (Grupo Control) B). Seguimiento del peso corporal de ratas inducidas con STZ y amortiguador de citratos (Control).

En la figura 1A se observa que neonatos inyectados con STZ muestran hiperglicemia dos días posteriores a la inducción, la concentración de glucosa se elevó de 77 mg/dl hasta 244 mg/dl a los cuatro días de vida (dos después de la inducción). Estos niveles disminuyen una semana después hasta alcanzar valores casi normales y se incrementan nuevamente antes del destete hasta 138 mg/dl. Esta tendencia se explica primeramente por la destrucción de células β -pancreáticas y la capacidad de regeneración que las ratas neonatas poseen durante el periodo de lactancia. Esta regeneración puede ser el resultado de dos procesos: diferenciación de las células precursoras ductales que migran al páncreas formando islotes, o bien, la proliferación de células β preexistentes (Garofano, 2000).

El grupo control presenta niveles normales de glucosa a lo largo del tiempo, lo cual es un resultado esperado ya que el buffer de citratos por si solo no genera diabetes.

En la figura 1B se observa que a los dos días de la inducción con STZ las ratas disminuyen su peso corporal de 6.77g a 5.01g, sin embargo, recuperan peso durante el periodo de lactancia hasta llegar a niveles normales al momento del destete (21 días).

6.2. PESO CORPORAL

6.2.1. Ácidos Grasos ω -3

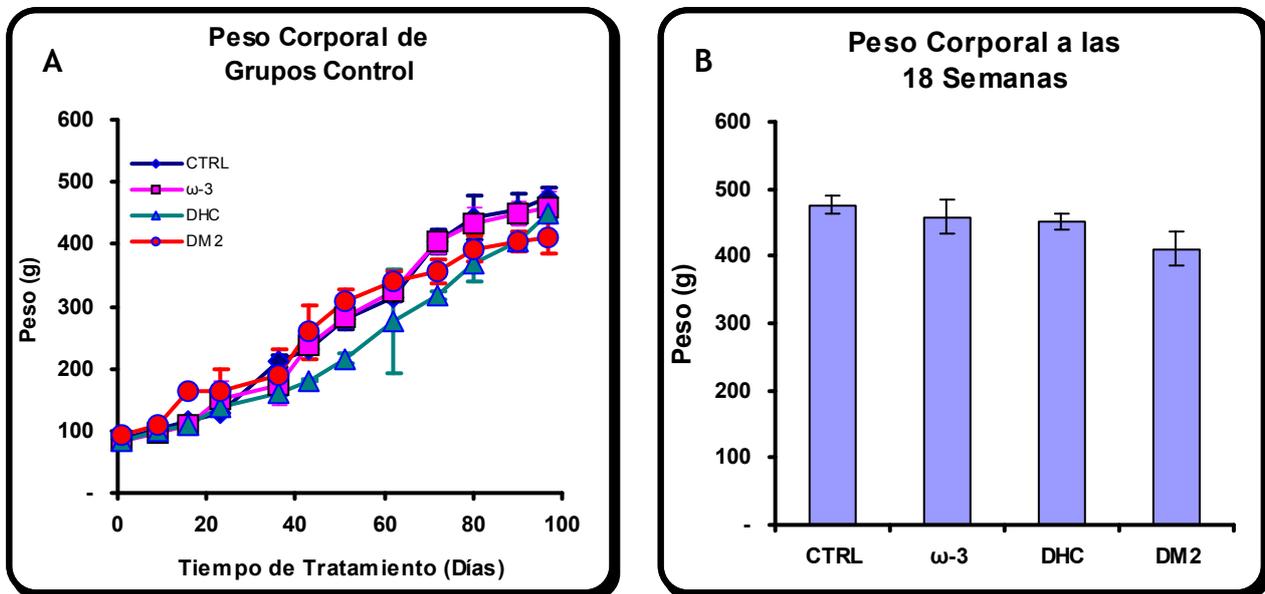


Fig. 2. Efecto de la STZ sobre el peso corporal de ratas wistar. **A)** Seguimiento del peso corporal de ratas diabéticas (inducidas con STZ) y normales (con o sin suplemento de ω -3 o DHC) por 15 semanas. **B)** Peso corporal de ratas diabéticas (inducidas con STZ) y normales (con o sin suplemento de ω -3 o DHC) al final de los tratamientos.

En la figura 2A se muestra que la diabetes aparentemente no alteró el crecimiento durante las primeras semanas de vida, posteriormente se observó una disminución en el peso corporal y al final del tratamiento (Fig. 2B) se observa esta misma tendencia (Ctrl. 475.8g VS DM2 411.3g). En general, la tasa de crecimiento de ratas diabéticas se encontró disminuida con respecto al grupo control (Ctrl. 4.5g/día/ DM2 3.5g/día). En ratas con dieta hipercalórica (DHC), la ganancia de peso se encontró disminuida a partir de la novena semana de vida (Ctrl. 4.5g/día/ DHC 3.86g/día), sin embargo, al final del tratamiento el peso se recupera y no se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control (450.64g). Cabe mencionar que aún cuando el peso de las ratas con DHC es aparentemente menor al observado en ratas diabéticas, la tasa de crecimiento de estas últimas es menor.

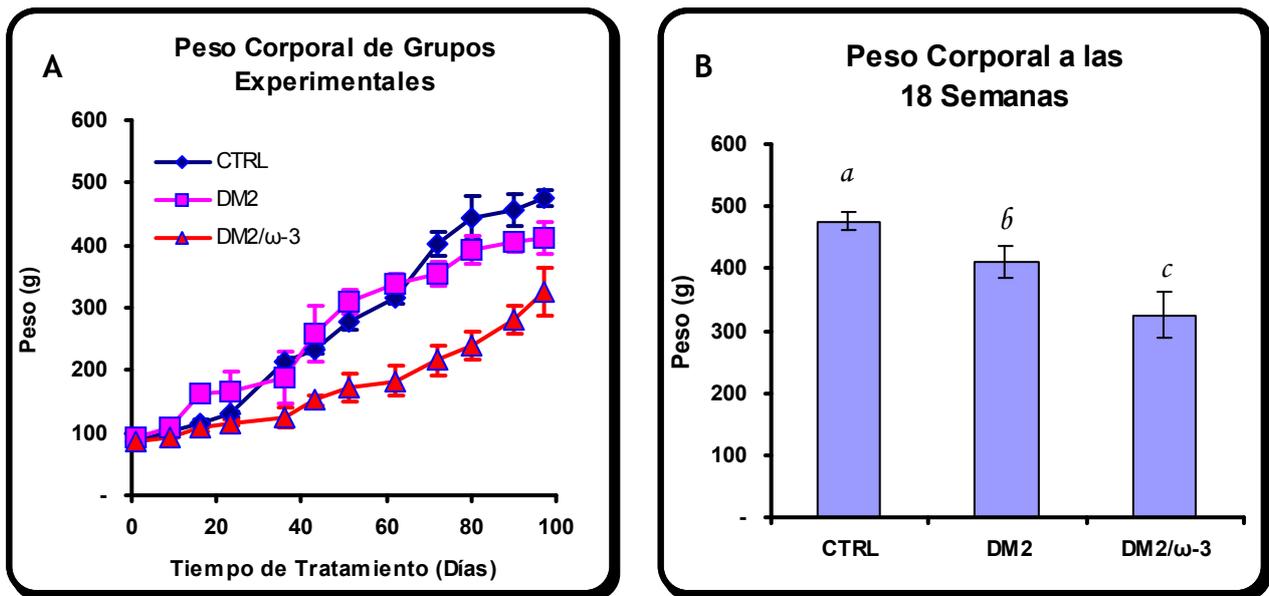


Fig. 3. Efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre el peso corporal de ratas diabéticas. **A)** Seguimiento del peso corporal a lo largo del tratamiento **B)** Peso corporal al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

En la figura 3A se observa que el suplemento de ω -3 en la diabetes disminuye de manera significativa la ganancia de peso (Ctrl. 4.5g/día, DM2- ω -3. 2.31g/día); en este grupo de ratas a partir del día 22 de tratamiento se observa una disminución significativa de peso corporal con respecto al grupo control y a su contraparte de ratas diabéticas; la misma tendencia continúa durante todo el tratamiento y al final del mismo. A las 18 semanas (Fig. 3B) el grupo con suplemento de ω -3 muestra valores de peso corporal (325.3g) estadísticamente menores al grupo control (475.8g). Este comportamiento es más evidente en ratas diabéticas con dicho suplemento, ya que aún cuando la tasa de crecimiento de ratas diabéticas es menor (3.5g/día), esta tendencia se observa de manera pronunciada con ácidos grasos ω -3.

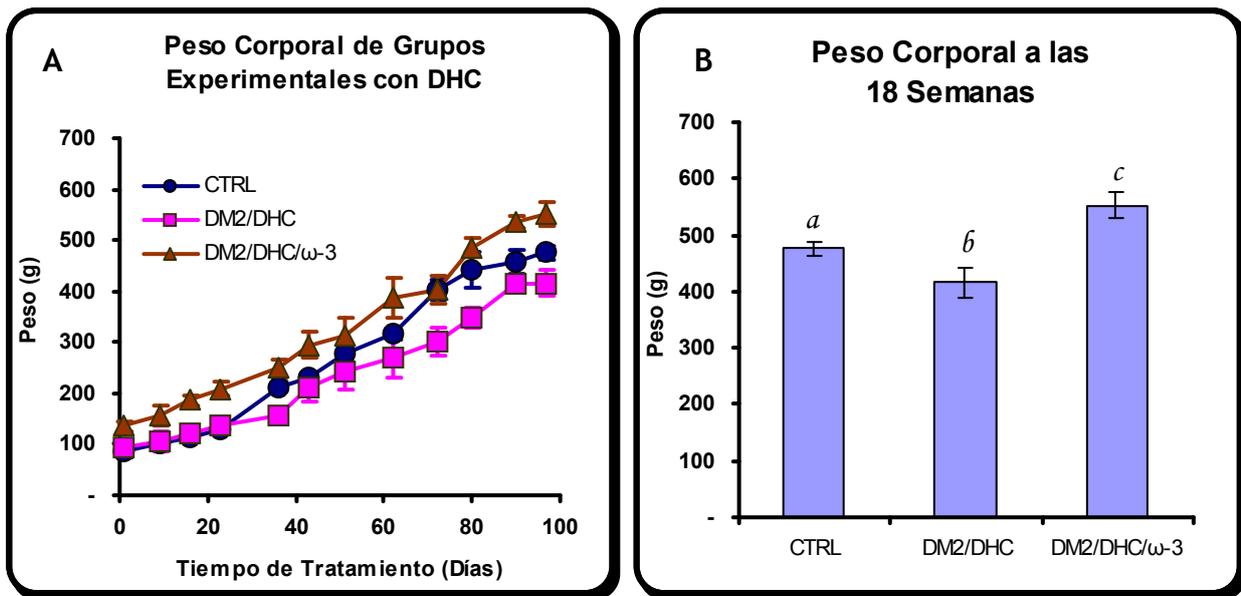


Fig 4. Efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre el peso corporal de ratas diabéticas (DM2) con dieta hipercalórica (DHC). A) Seguimiento del peso corporal a lo largo del tratamiento B) Peso corporal al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

En la figura 4, se observa que durante la mayor parte del tratamiento (Fig. 4A) y al final de este (Fig. 4B) el grupo de ratas diabéticas con DHC y suplemento de ω -3 muestra un peso corporal mayor al del grupo control (Ctrl. 475.8g/ DM2-DHC- ω -3 552.3g), sin embargo, la velocidad de crecimiento es igual (4.49g/día), sólo que al inicio del tratamiento (4 semanas de edad) el peso corporal de las ratas con suplemento de omega-3 es mayor que los demás grupos (Ctrl. 95g/ DM2-DHC- ω -3 135g), evidentemente durante el tratamiento este grupo continúa con la misma tendencia. Por su parte, el grupo de ratas diabéticas con DHC muestra una disminución en la tasa de crecimiento (3.56g/día) con respecto al grupo control (4.5g/día), asimismo, al final del tratamiento se marca dicha disminución (416g). Esta tendencia es parecida a la observada en la diabetes cuando hay dieta normal (Fig. 3A), por lo que tal efecto de disminución en la ganancia de peso de ratas con DM2 y DHC puede ser atribuido a la enfermedad más que a la DHC *per se*.

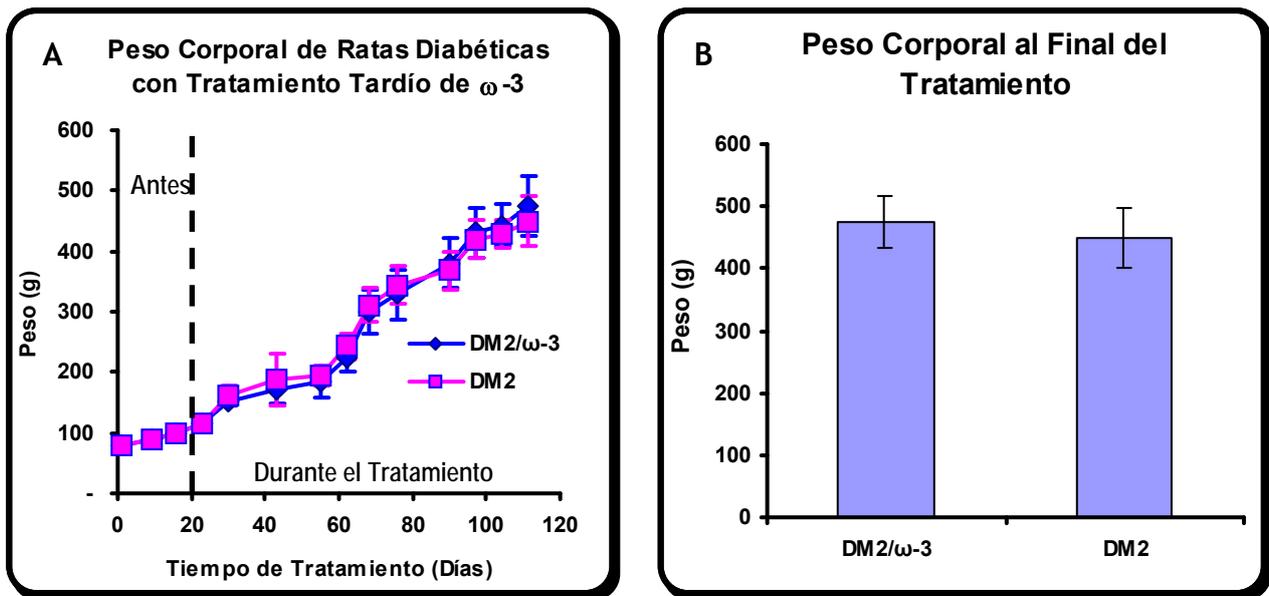


Fig. 5. Efecto de los ácidos grasos ω -3 en el peso corporal de ratas diabéticas con dos meses de hiperglicemia crónica (Tratamiento tardío con ω -3). **A**) Seguimiento del peso corporal de ratas diabéticas tratadas o no con ácidos grasos ω -3. **B**) Peso corporal al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

En experimentos anteriores (Fig. 3A), se mostró el efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre el peso corporal de ratas diabéticas de 4 semanas de edad. En este experimento se observó el efecto de los ácidos grasos ω -3 a las 8 semanas de inducida la diabetes. En la figura 5, no se observa diferencia significativa en la tasa de crecimiento de ratas diabéticas con (3.8g/día) o sin suplemento de ω -3 (3.64g/día), asimismo, no se observó diferencia estadística al final del tratamiento (DM2- ω -3 474g/ DM2 449g). Ambos grupos de ratas diabéticas con o sin suplemento redujeron la tasa de crecimiento con respecto al grupo control (4.5g/día).

Los ácidos grasos ω -3 disminuyeron la velocidad de crecimiento en ratas diabéticas con 4 semanas de edad (Fig. 3A), sin embargo, el tratamiento tardío con ω -3 no influyó de manera significativa la tasa de crecimiento de ratas diabéticas.

6.2.2. Ácido Linoléico Conjugado

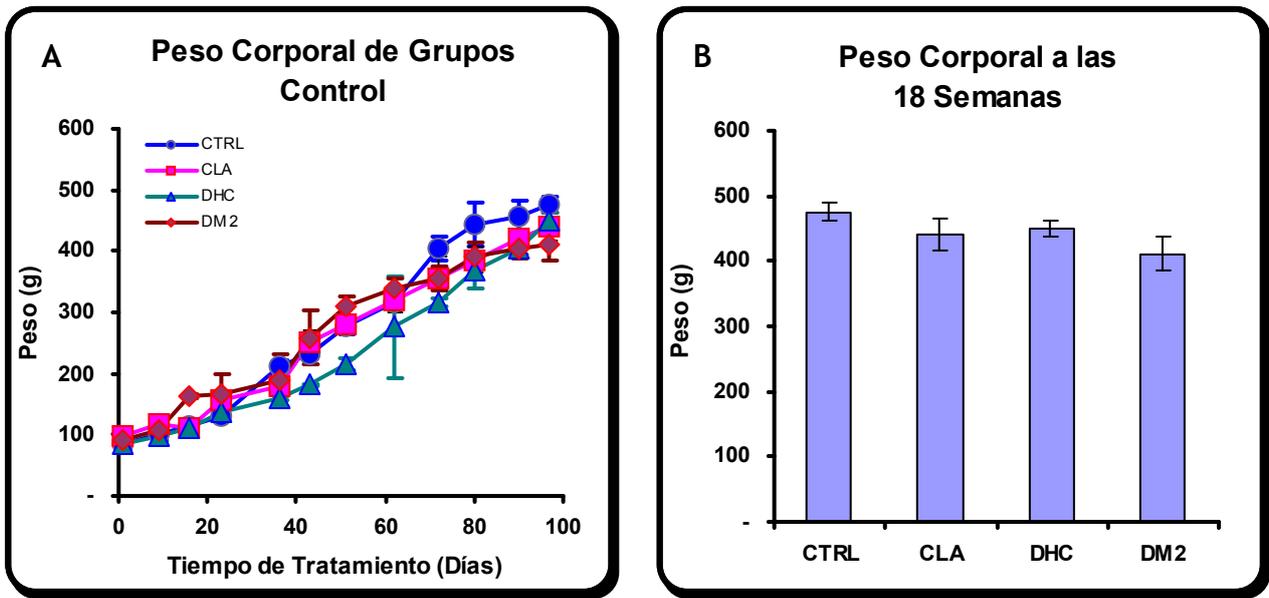


Fig. 6. Efecto del CLA sobre el peso corporal de ratas normales. A) Seguimiento del peso corporal de ratas normales tratadas o no con CLA. B) Peso corporal al final de los tratamientos. ($P < 0.05$).

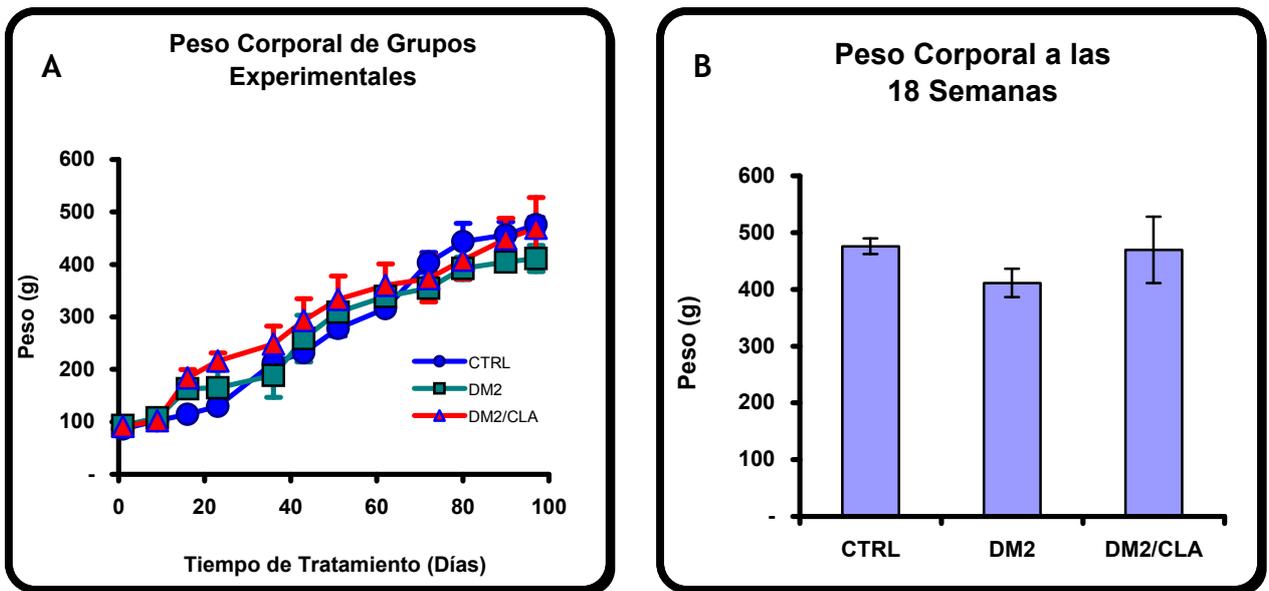


Fig. 7. Efecto del CLA sobre el peso corporal de ratas diabéticas A) Seguimiento del peso corporal de ratas diabéticas tratadas con CLA. B) Peso corporal de ratas tratadas con CLA al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

Como se muestra en la Fig. 6A, el peso de ratas con suplemento de CLA aparentemente no presentó diferencias con respecto al grupo control a lo largo del tratamiento, sin embargo, la tasa de crecimiento fue menor (CLA 3.8g/día/ Ctrl. 4.5g/día), lo que indicaría que este suplemento conlleva a una disminución en la

ganancia de peso corporal. En la figura 6B se observa que al final del tratamiento el grupo con CLA no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Ctrl 475.8g/CLA 440.8g).

Como se puede observar en la Fig. 7A, a diferencia de los ácidos grasos ω -3, el CLA no disminuyó significativamente la tasa de crecimiento de ratas diabéticas (DM2 3.5G/día/ DM2-CLA 3.87g/día). Al final del tratamiento (Fig. 7B) se observa que la tendencia del grupo con este suplemento es a recuperar el peso corporal para finalmente llegar a niveles normales (475.8g).

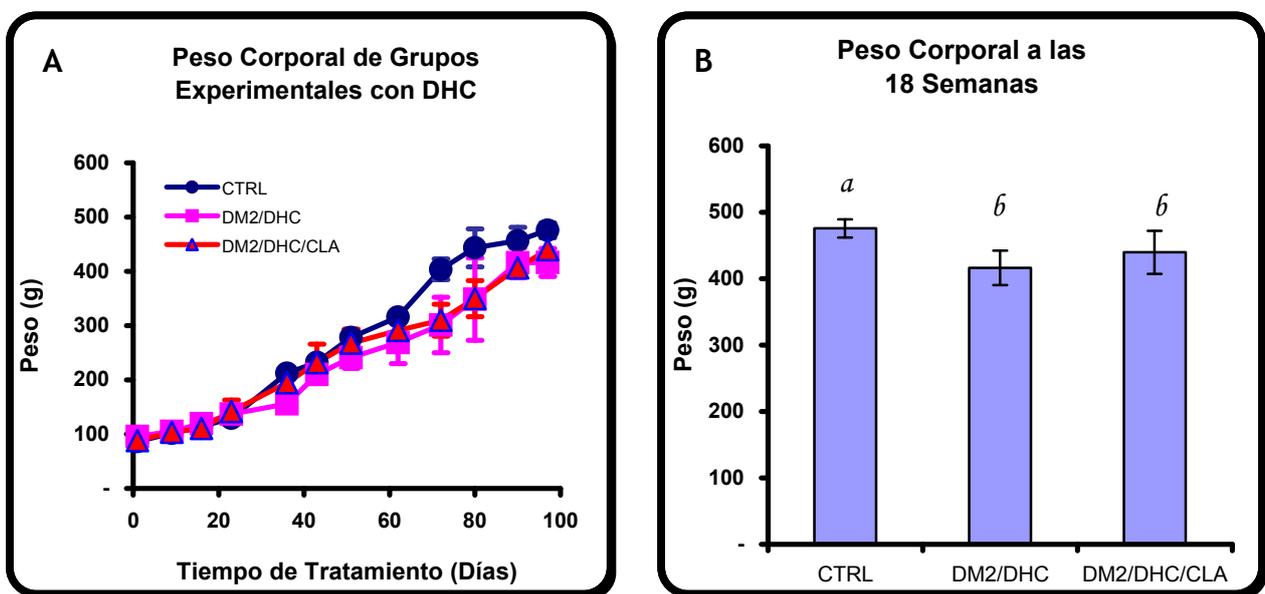


Fig. 8. Efecto del CLA sobre el peso corporal de ratas diabéticas con DHC. A) Seguimiento del peso corporal a lo largo del tratamiento B) Peso corporal al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

En la Fig. 8A se observa que durante el tratamiento las ratas diabéticas con DHC y suplemento de CLA mantienen una velocidad de crecimiento similar (3.68g/día) al grupo de ratas diabéticas sin este suplemento (3.56g/día). En estos grupos la ganancia de peso es menor al grupo control (4.5g/día) pero similar al efecto que la diabetes por si sola genera sobre la tasa de crecimiento (3.5g/día). Al final del tratamiento (Fig. 8B) el grupo de ratas diabéticas con dieta hipercalórica muestra una disminución en el peso corporal (416.4g) con respecto al grupo control (475.8g), sin embargo, este efecto puede atribuirse más que a la dieta hipercalórica, a la diabetes que por si sola provoca tal disminución (411.3g).

6.3. GLUCOSA

6.3.1. Ácidos Grasos ω -3

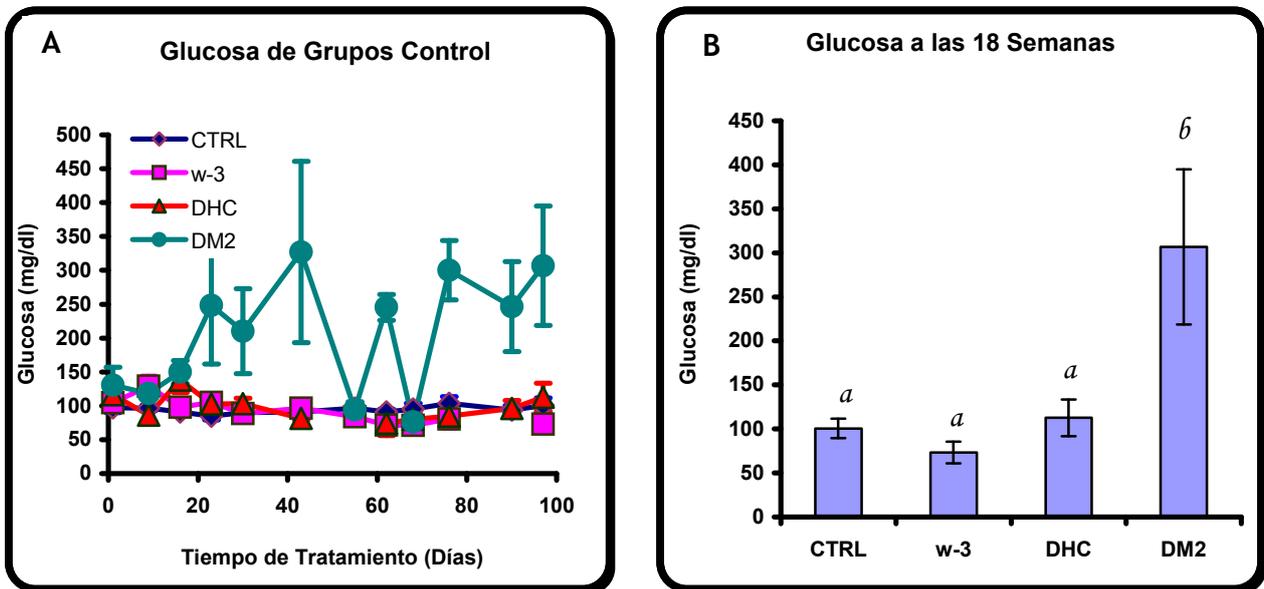


Fig. 9. Efecto de la STZ sobre la glicemia. A) Seguimiento de la glicemia de ratas diabéticas (inducidas con STZ) y normales (con o sin suplemento de ω -3 o DHC) por 15 semanas. B) Glucosa de ratas diabéticas (inducidas con STZ) y normales (con o sin suplemento de ω -3 o DHC) al final de los tratamientos. El Grupo DM2 mostró diferencias estadísticamente significativas durante la mayor parte del tratamiento y al término de éste. ($P < 0.05$).

En la Fig. 9 se muestra que hubo éxito en el desarrollo del modelo de DM2, pues se generó un descontrol de la glicemia característica de este tipo de diabetes, sin llegar a valores mayores y sostenidos de glucosa típicos del desarrollo de “diabetes experimental” similar a la DM1. En el grupo DM2 se observan niveles normales de glucosa en algunos puntos, donde es probable que las células β en algún momento de la enfermedad sean capaces de satisfacer la demanda de insulina para disminuir la glicemia, aunque en general se observa un descontrol, lo cual se ve reflejado en las desviaciones.

Por su parte, las ratas con DHC muestran al inicio del tratamiento un incremento en los niveles de glucosa no muy significativo (138mg/dl), aunque eventualmente el organismo es capaz de controlar dichos niveles. En general, ni la DHC ni el suplemento de ω -3, afectaron los niveles de glucosa en sangre de ratas normoglicémicas, lo que indica que por si solos no tienen efecto alguno sobre la misma.

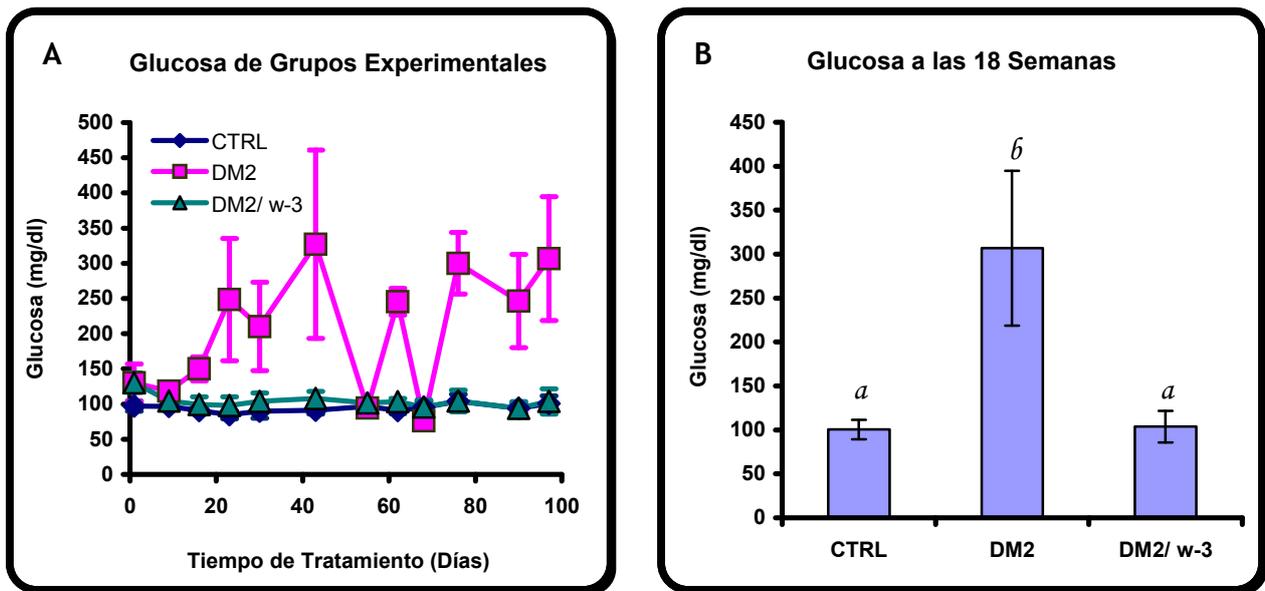


Fig. 10. Efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre la glicemia en ratas diabéticas. A) Seguimiento de la glicemia a lo largo del tratamiento B) Glicemia al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

Como se puede observar en la figura 10A, los niveles de glucosa de ratas diabéticas con ω -3 son similares a la glucosa del grupo control, lo que indica que éstos ácidos grasos fueron capaces de mantener estables dichos niveles a lo largo del tratamiento, mientras que las ratas diabéticas sin suplemento muestran un marcado descontrol de la glicemia. Además de la evidente hiperglicemia crónica que presenta el grupo de ratas diabéticas, se puede apreciar que las desviaciones dentro de este grupo son muy grandes, lo que demuestra un completo descontrol de la glicemia. Por el contrario, el grupo DM2- ω -3 presenta desviaciones muy pequeñas lo que comprueba que hubo muy buen control en los niveles de glucosa para este grupo. Al final del tratamiento (Fig. 10B), el grupo con suplemento de ω -3 mostró valores estadísticamente iguales a las ratas normoglicémicas, tendencia que se observa desde el inicio del tratamiento.

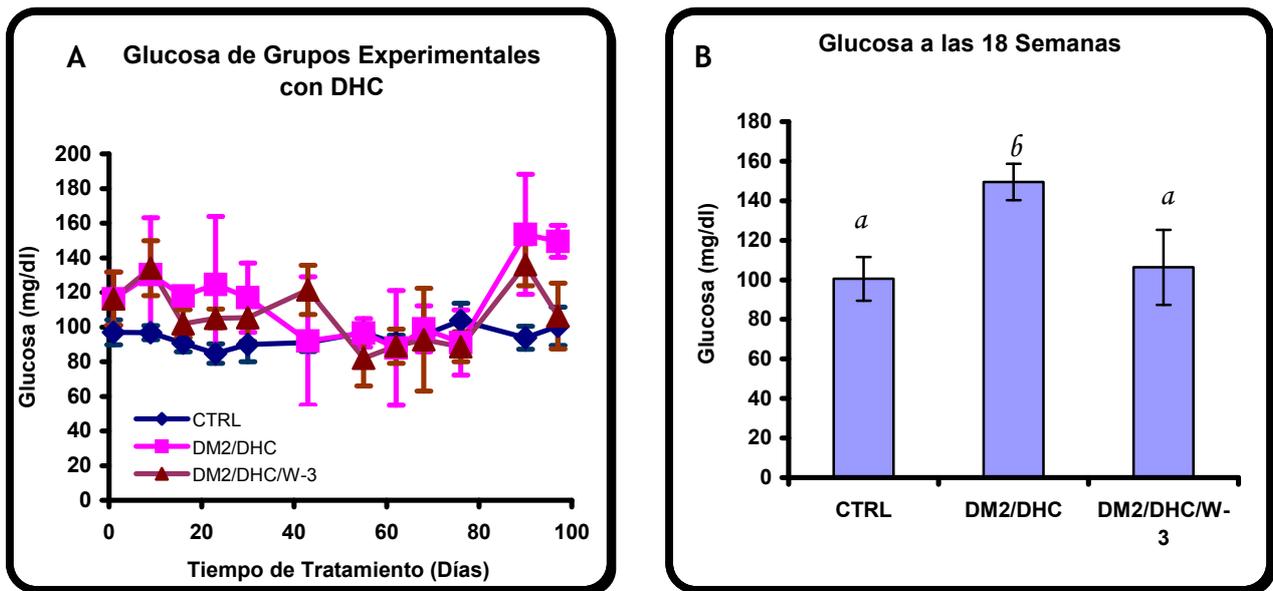


Fig. 11. Efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre la glicemia de ratas diabéticas (DM2) con dieta hipercalórica (DHC). A) Seguimiento de la glicemia a lo largo del tratamiento B) Glicemia al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

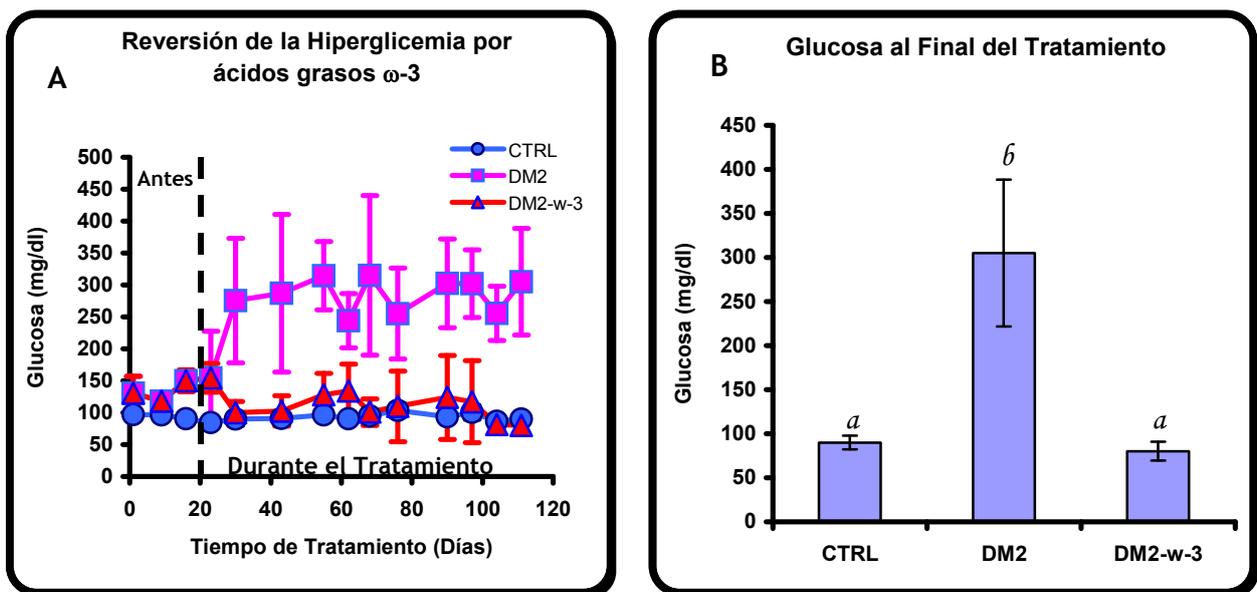


Fig. 12. Efecto de los ácidos grasos ω -3 en ratas diabéticas que ya cursaron por hiperglicemia durante 8 semanas. A) Seguimiento de la glicemia en ratas diabéticas tratadas o no con ácidos grasos ω -3. B) Glicemia al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

En la Fig. 11 se observa que durante la mayor parte del tratamiento, comparados con el nivel de glucosa de ratas diabéticas con dieta normal (> 200 mg/dl), en promedio los grupos de ratas diabéticas con DHC, con o sin suplemento de ácidos grasos ω -3, no muestran niveles de glucosa muy altos. Parece haber cierto control de la glicemia. Sin embargo, la desviación del promedio de los datos del grupo DM2-DHC es más grande que

la del grupo DM2-DHC- ω -3, lo que indica que en el primero existe un mayor descontrol de la glicemia que en el grupo tratado con ω -3. Al parecer, en presencia de una DHC, los ácidos grasos ω -3 ayudan parcialmente a mantener más constantes los niveles de glucosa, evitando así un descontrol de la hiperglicemia como el observado en las Figs. 9 y 10 en ratas diabéticas con dieta normal.

En experimentos anteriores (Fig. 10A), se demuestra que los ácidos grasos ω -3 tienen la capacidad de controlar la hiperglicemia en etapas tempranas o antes de que se desarrolle plenamente. Para probar si los ácidos grasos ω -3 tienen la capacidad de revertir la hiperglicemia una vez desarrollada, se hizo el siguiente experimento. Un mes después del destete, un grupo de ratas diabéticas se dividió en dos; a un grupo de ratas se le administró el tratamiento con ω -3, mientras al otro grupo se le mantuvo sin suplemento de ácidos grasos ω -3. En el momento de la formación de los dos grupos, ambos tenían niveles promedio de glucosa de 150 mg/dl. Como se muestra en la Fig. 12A, las ratas tratadas con ω -3, desde la primera semana disminuyeron estos niveles y controlaron la glicemia durante el resto del tratamiento. Las ratas diabéticas sin suplemento de ácidos grasos ω -3 por su parte mantuvieron un promedio de 274 mg/dl de glucosa sanguínea. Asimismo, al final del tratamiento (Fig. 12B) continúa la tendencia a disminuir los niveles de glucosa en el grupo con suplemento de omega, llegando hasta valores normales estadísticamente iguales al control normoglicémico.

Los ω -3 al parecer no sólo controlan desde el inicio los niveles de glucosa sino que aún en ratas que comienzan a mostrar hiperglicemia son capaces de disminuirla y controlarla durante el tratamiento. Las desviaciones en este grupo con suplemento de ω -3 son altas, sin embargo los niveles de glucosa se mantienen diferentes a los de su contraparte de ratas diabéticas.

6.3.2 Ácido Linoleico Conjugado (CLA).

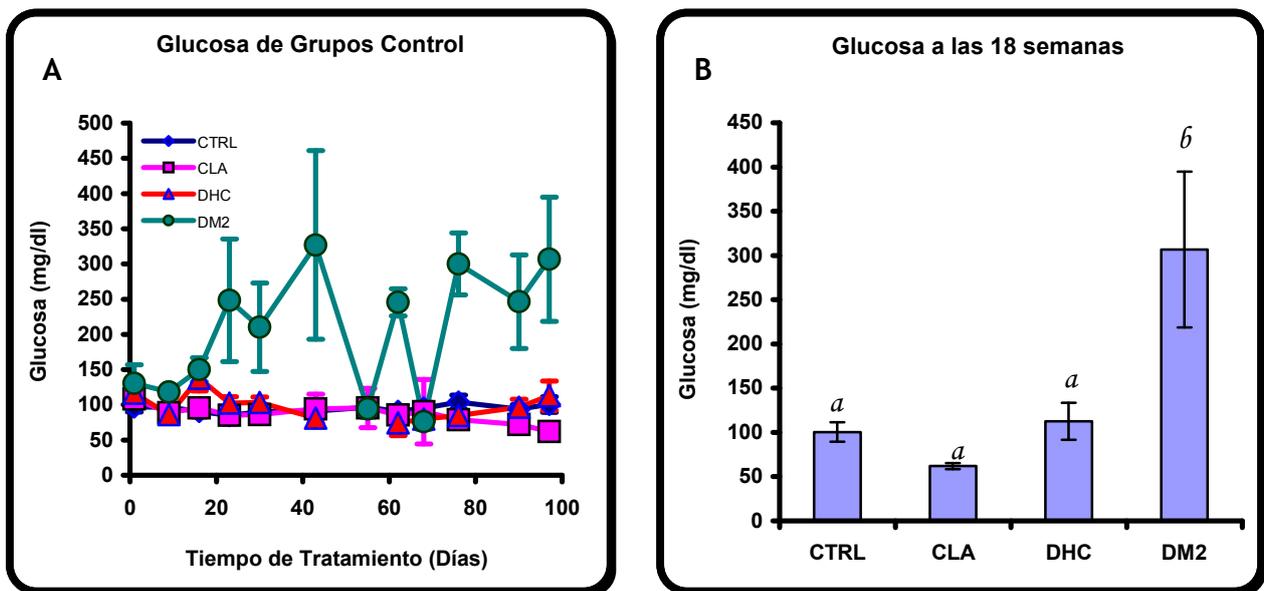


Fig. 13. Efecto del CLA sobre la glicemia de ratas normales. A) Seguimiento de la glicemia de ratas normales tratadas o no con CLA. B) Glicemia de ratas normales y diabéticas al final de los tratamientos. ($P < 0.05$).

En la Fig. 13 se presenta la glucosa de ratas control tratadas con CLA, DHC y de ratas diabéticas. En la Fig. 13A se puede observar que, al igual que en las figs. 9 y 10, se presentó descontrol de la glicemia por parte del grupo de ratas diabéticas, asimismo, se encontró que la dieta hipercalórica durante las primeras semanas elevó los niveles de glucosa a 138mg/dl, aunque eventualmente estos niveles se controlaron y se mantuvieron igual que el grupo control. Este fenómeno indica que la DHC es capaz de elevar los niveles de glucosa, aunque este aumento no es significativo y en este experimento fue un evento esporádico, quizás una dieta hipercalórica prolongada conlleve a un aumento de glucosa cada vez más frecuente, siendo este un factor que contribuya al posterior desarrollo de DM2.

Por su parte, el grupo de ratas normales con suplemento de CLA durante el tratamiento no mostró diferencias significativas en los niveles de glucosa con respecto al grupo control, sin embargo, al concluir dicho tratamiento (Fig. 13B) presentó una discreta disminución aunque no significativa con respecto a los valores normales reportados para glucosa. Estos datos demuestran que el suplemento de CLA no afecta la glicemia de ratas normales.

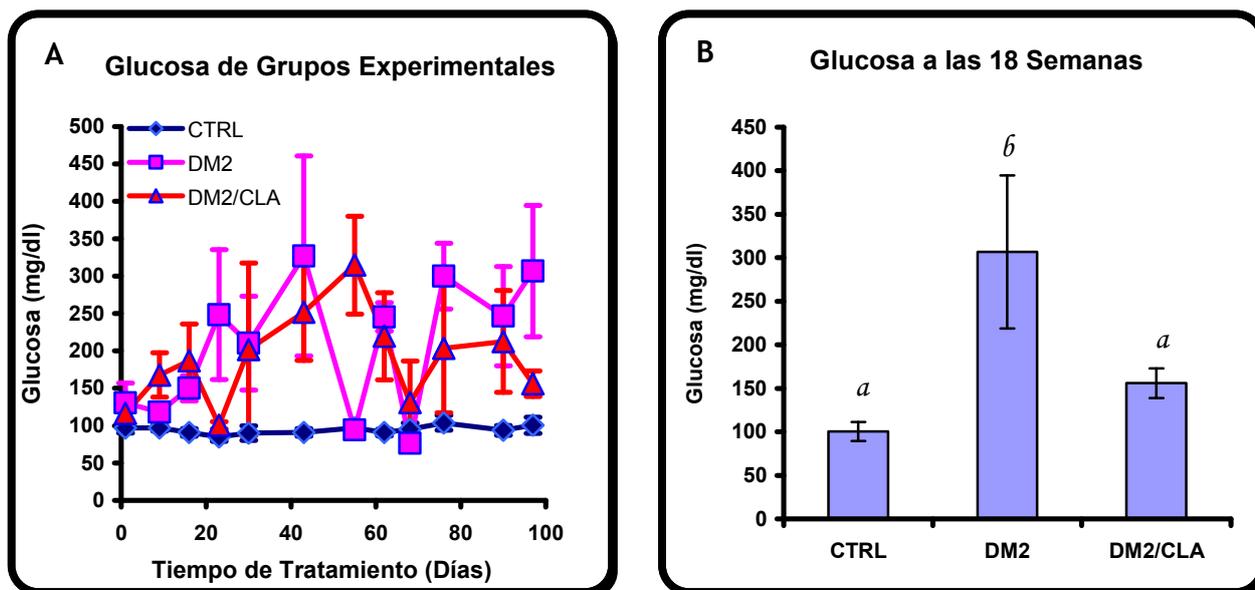


Fig. 14. Efecto del CLA sobre la glicemia de ratas diabéticas A) Seguimiento de la glicemia de ratas diabéticas tratadas con CLA. B) Glicemia de ratas tratadas con CLA al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

Como se puede observar en la Fig. 14A, los niveles de glucosa del grupo de ratas diabéticas con suplemento de CLA muestran el mismo comportamiento que el grupo de ratas diabéticas sin este suplemento, es decir, las desviaciones son muy grandes lo que indica un marcado descontrol de la glicemia, asimismo, se observan niveles de glucosa de hasta 300mg/dl y al igual que las ratas diabéticas los niveles de glucosa tienden a normalizarse de manera esporádica, mas esto es una tendencia que se observa frecuentemente en la DM2. El CLA a diferencia de los ácidos grasos ω -3 no ayudó a controlar la hiperglicemia a lo largo del tratamiento. Al final del tratamiento (después de 15 semanas), el grupo de ratas diabéticas con suplemento de CLA disminuyó significativamente los niveles de glucosa con respecto al grupo DM2 sin suplemento (Fig. 14B). Quizás el efecto que este ácido graso pudiera tener es a largo plazo, sin embargo, con base en la tendencia que las ratas diabéticas con CLA siguieron a lo largo del tratamiento, sería congruente que los niveles de glucosa volvieran a elevarse, lo que indicaría un completo descontrol de la glicemia y ningún efecto por parte de este ácido graso.

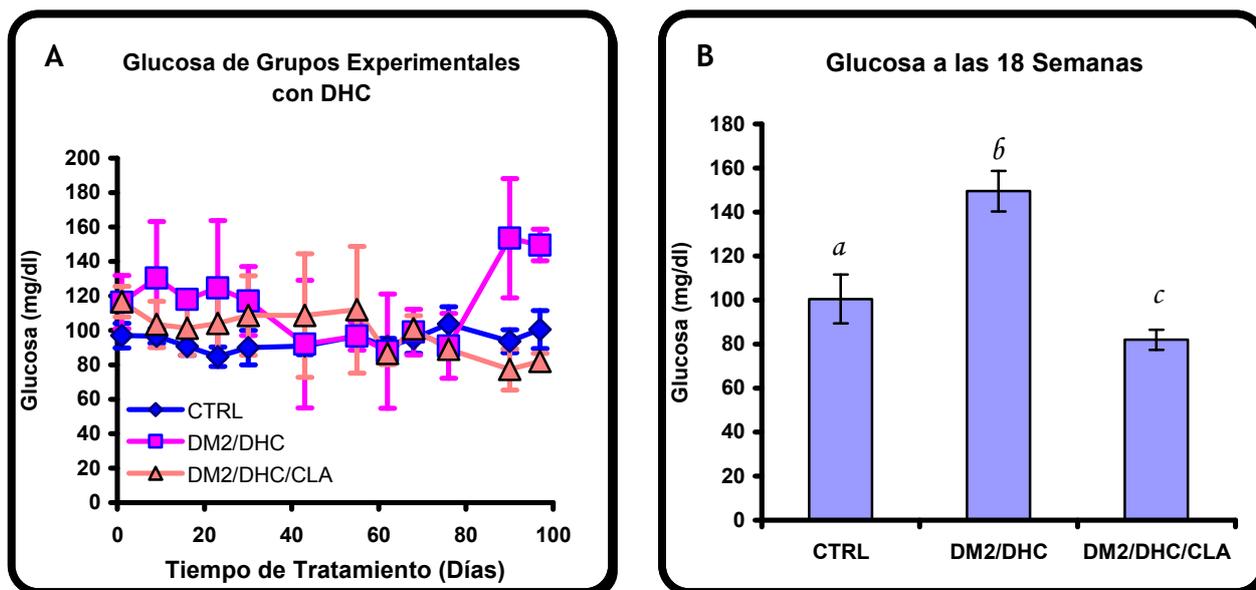


Fig. 15. Efecto del CLA sobre la glicemia de ratas diabéticas con DHC durante y al final del tratamiento. A) Seguimiento de la glicemia de ratas diabéticas con dieta hipercalórica (DHC). B) Glicemia al final del tratamiento. ($P < 0.05$).

En la Fig. 15A se observa que el grupo de ratas diabéticas con DHC y suplemento de CLA presenta niveles normales de glucosa durante el tratamiento, sin embargo, no muestra diferencias aparentes ante su contraparte de ratas diabéticas con DHC sin suplemento. Al parecer, en las primeras semanas el CLA controla la hiperglicemia de ratas diabéticas con DHC, sin embargo, las desviaciones de este grupo indican que persiste descontrol de la glicemia. Al final del tratamiento el grupo tratado con CLA mostró una disminución en los niveles de glucosa llegando a valores normales (Fig. 15B). Por su parte el grupo de ratas diabéticas con DHC sin suplemento mantiene un comportamiento similar al grupo tratado con CLA, pues durante gran parte del tratamiento presenta una glicemia aparentemente controlada, sin embargo, la desviación es grande y al final del tratamiento este grupo incrementa la concentración de glucosa. Al parecer el control de la glicemia se debe a la DHC más que al suplemento de CLA, pues en ratas sin DHC y con este suplemento los niveles de glucosa son altos durante la mayor parte del tratamiento.

6.4 LÍPIDOS

6.4.1 Ácidos Grasos ω -3

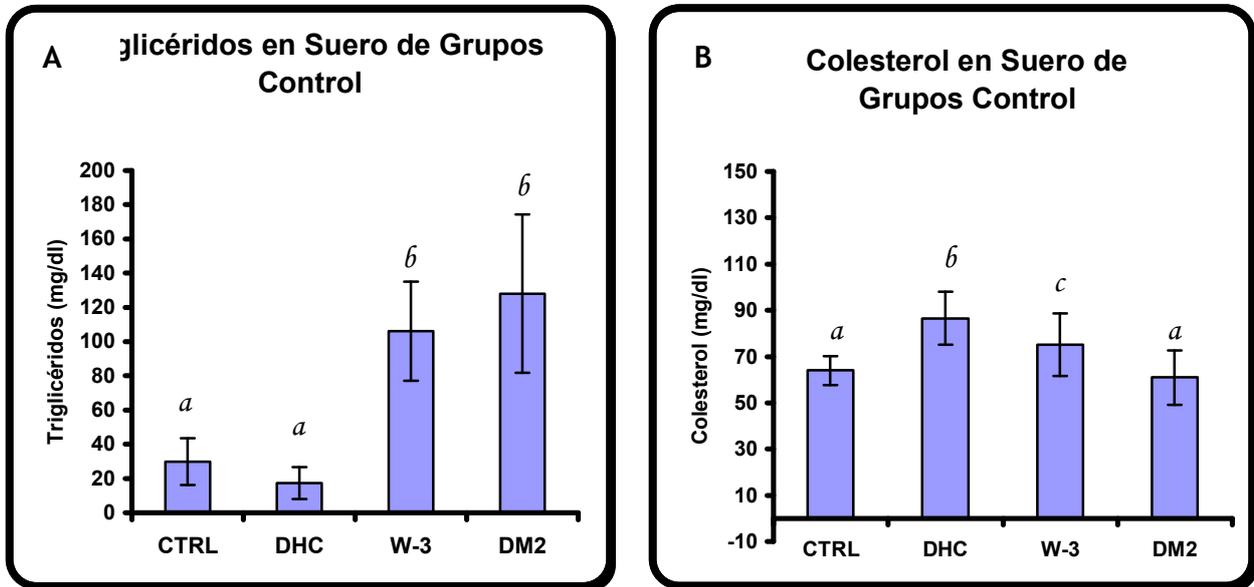


Fig. 16. Efecto de los ácidos grasos ω -3, la DHC y la DM2 sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en suero. **A)** Contenido de triglicéridos en suero de ratas normales (ctrl.), con dieta hipercalórica (DHC), con suplemento de ácidos grasos ω -3 o con diabetes. **B)** Contenido de colesterol en suero de ratas normales (ctrl.), con dieta hipercalórica (DHC), con suplemento de ácidos grasos ω -3 o con diabetes. ($P < 0.05$).

En la Fig. 16A se muestra el contenido de triglicéridos en suero y se encontró que tanto la DM2 como el suplemento de los ácidos grasos ω -3 a ratas normoglicémicas, elevan significativamente la concentración de triglicéridos hasta niveles de 128mg/dl mientras el grupo control presenta niveles de 29.87mg/dl. Por su parte, la DHC mantiene la concentración de triglicéridos similar al grupo control (17.31mg/dl), lo que indica que dicha dieta por si sola no es capaz de elevar estos lípidos en suero. En la figura 16B se observa que la DHC incrementa la concentración de colesterol en suero (86.56mg/dl) con respecto al grupo control (64.03mg/dl), este efecto a largo plazo, podría resultar potencialmente nocivo. En ratas diabéticas, no se observa diferencia estadística en cuanto a la concentración de colesterol en suero, pues los niveles en este grupo se mantienen similares al grupo control (Ctrl. 64.03mg/dl, DM2 60.93mg/dl).

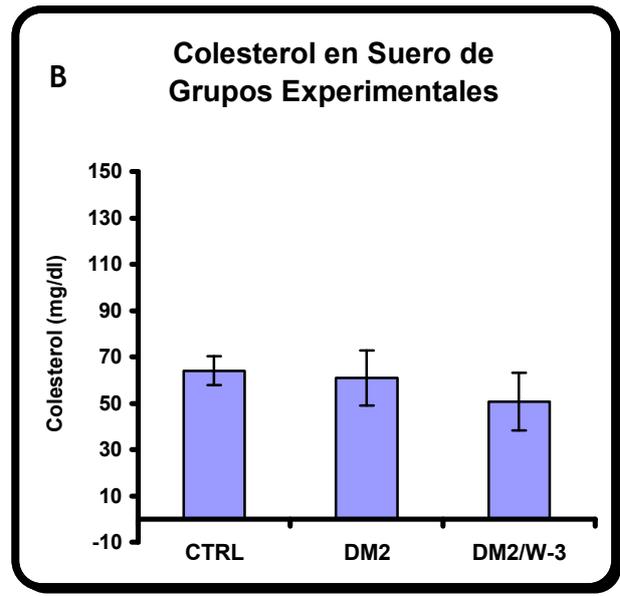
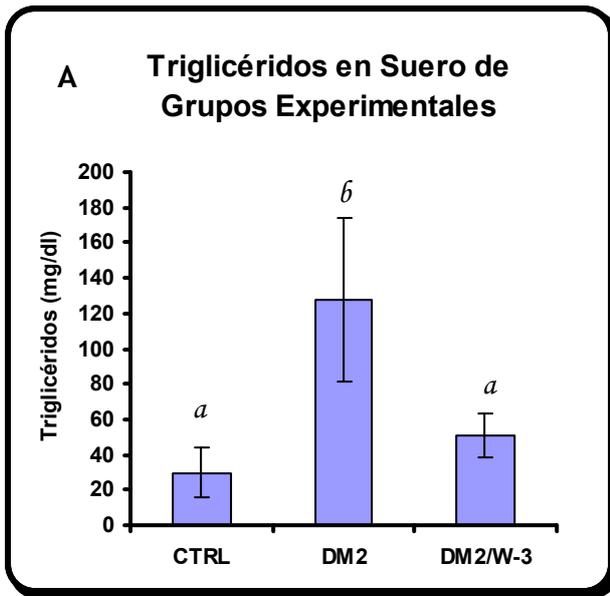


Fig. 17. Efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre en contenido de triglicéridos y colesterol en suero de ratas con diabetes (DM2). A) Contenido de triglicéridos en ratas con o sin suplemento de AG ω -3. B) Contenido de colesterol en suero de ratas con o sin suplemento de AG ω -3. (P < 0.05).

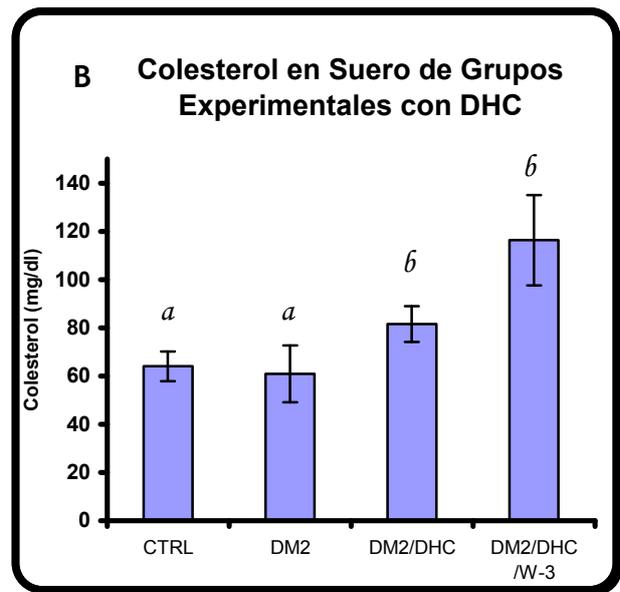
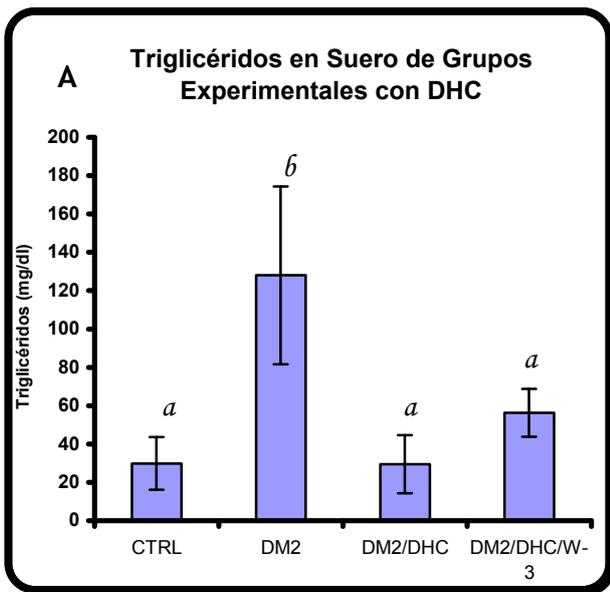


Fig. 18. Efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en suero de ratas con DM2 y DHC. A) Contenido de triglicéridos de ratas diabéticas con dieta hipercalórica y suplemento de AG ω -3. B) Contenido de colesterol de ratas diabéticas con dieta hipercalórica y suplemento de AG ω -3. (P < 0.05).

Los datos de la Fig. 17A apuntan que los ácidos grasos ω -3, aún cuando elevan por si solos los niveles de triglicéridos en animales normoglicémicos (Fig. 16A), en la DM2 son capaces de controlarlos, pues en el grupo de ratas diabéticas con ω -3 la concentración de estos lípidos fue de 51mg/dl valor que se encuentra estadísticamente por encima del control pero significativamente por debajo de la concentración de triglicéridos de ratas

diabéticas (128 mg/dl). Por otra parte, el grupo con DM2 y ω -3 mostró una tendencia a disminuir los niveles de colesterol en suero (Fig. 17B), aunque no hay diferencia estadísticamente significativa con respecto a los grupos CTRL y DM2.

En la figura 18A se muestra que en ratas diabéticas con DHC y suplemento de ω -3 la concentración de triglicéridos (56.34 mg/dl) es estadísticamente mayor al grupo control (29 mg/dl), sin embargo, estos niveles son significativamente menores al grupo de ratas diabéticas con dieta normal (128 mg/dl). Por su parte la dieta hipercalórica en la diabetes no elevó los niveles de triglicéridos en suero, como se puede observar en la figura 18A este grupo mostró una concentración similar al grupo control (29.47mg/dl). En la figura 18B, se muestra que en ratas diabéticas, la DHC eleva significativamente la concentración de colesterol con respecto al grupo control (de 64.03 a 81.6 mg/dl), sin embargo, la DHC junto con los ω -3 incrementan aún más el colesterol en suero que la DHC *per se* (hasta 116.32 mg/dl).

6.4.2 Ácido Linoléico Conjugado

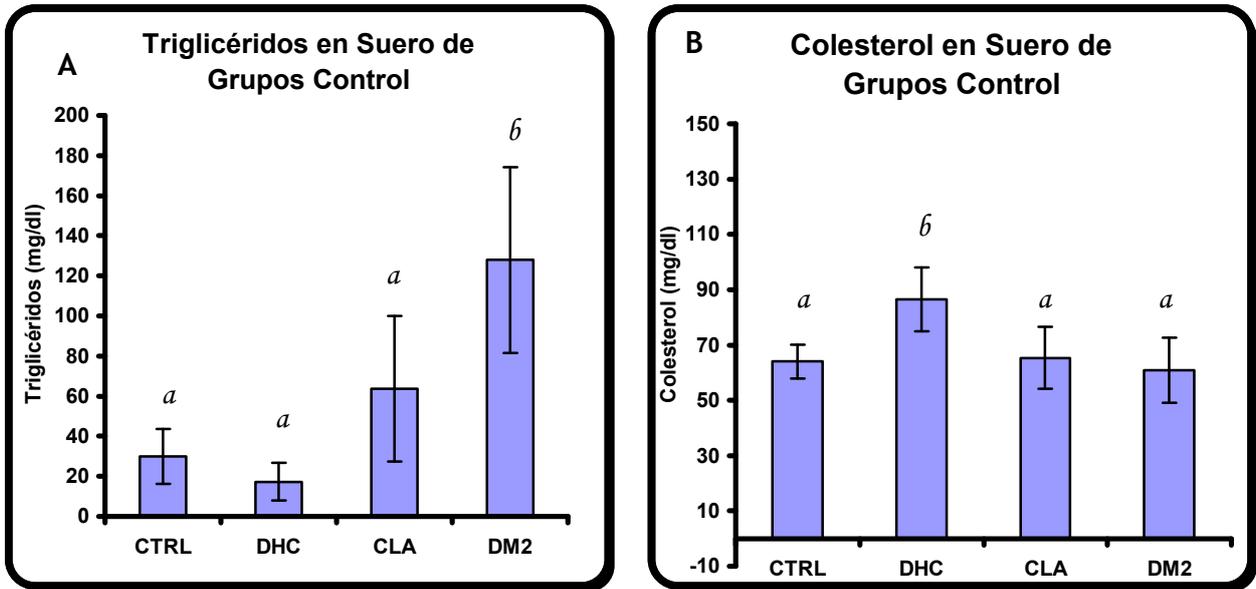


Fig. 19. Efecto del ácido linoléico conjugado (CLA), la DHC y la DM2 sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en suero. A) Contenido de triglicéridos en suero de ratas normales (ctrl.), con dieta hipercalórica (DHC), con suplemento de CLA o con diabetes. B) Contenido de colesterol en suero de ratas normales (ctrl.), con dieta hipercalórica (DHC), con suplemento de CLA o con diabetes. ($P < 0.05$).

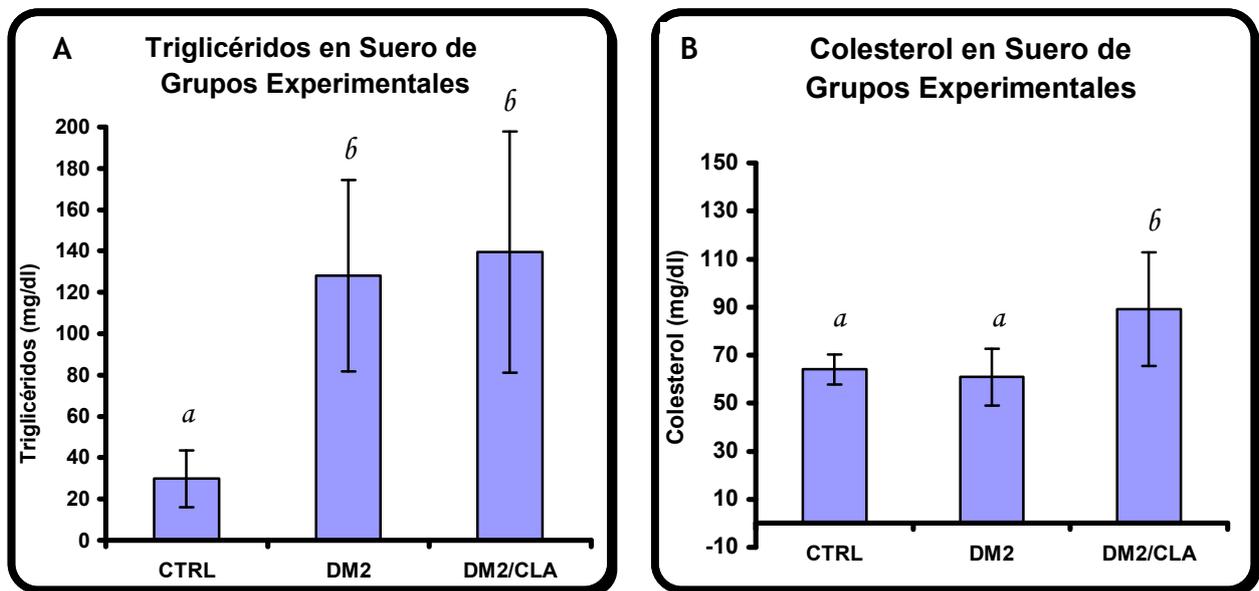


Fig. 20. Efecto del CLA sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en suero de ratas con diabetes (DM2). A) Contenido de triglicéridos en ratas diabéticas con o sin suplemento de CLA. B) Contenido de colesterol en suero de ratas diabéticas con o sin suplemento de CLA. ($P < 0.05$).

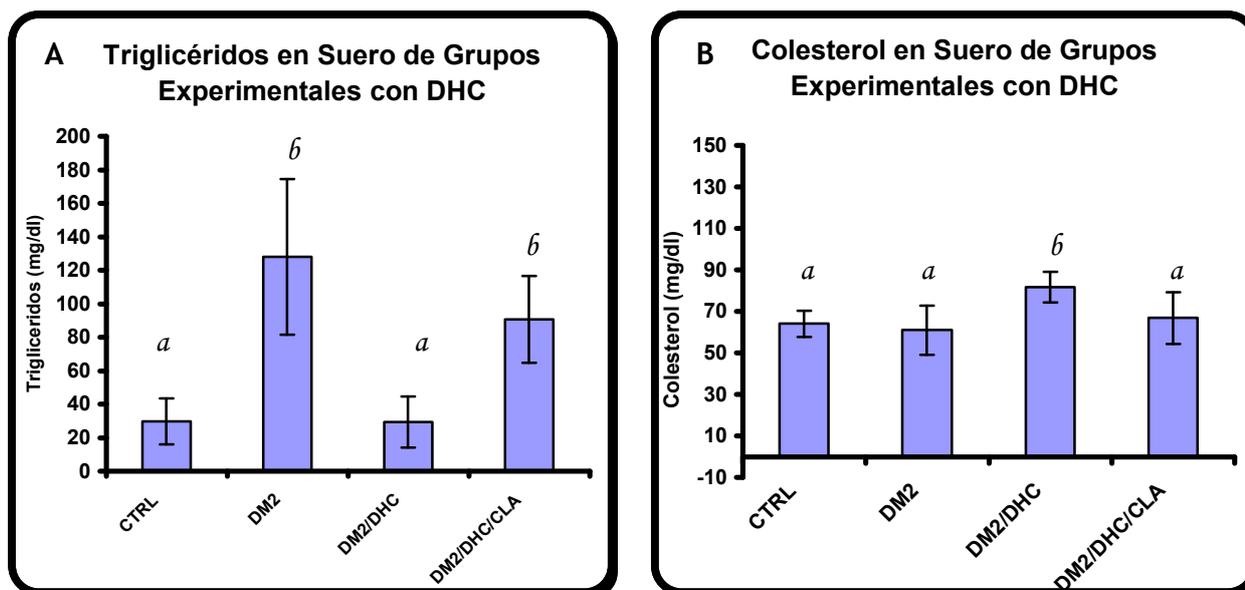


Fig. 21. Efecto del CLA sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en suero de ratas con DM2 y DHC. A) Contenido de triglicéridos de ratas diabéticas con dieta hipercalórica y suplemento de CLA. B) Contenido de colesterol de ratas diabéticas con dieta hipercalórica y suplemento de CLA. ($P < 0.05$).

En la figura 19A se observa que tanto la diabetes como el suplemento de CLA incrementan la concentración de triglicéridos en suero. Este suplemento eleva los triglicéridos hasta concentraciones de 63.68mg/dl, aún cuando no se observan diferencias estadísticamente significativas, la tendencia es a aumentar estos niveles con respecto al control (29.87mg/dl). Por su parte, la DHC no incrementa los niveles de triglicéridos pues la concentración que se observó para este grupo fue de 17.31mg/dl, valor que se encuentra estadísticamente igual al grupo control. Los datos en la figura 19B indican que la dieta hipercalórica por si sola eleva la concentración de colesterol en suero de 64.03mg/dl a 86.56mg/dl, esta tendencia no se observa ni en la diabetes ni cuando hay suplemento de CLA.

En la figura 20A se puede observar que la diabetes incrementa significativamente la concentración de triglicéridos en suero (128mg/dl) con respecto al grupo control (29.87mg/dl), asimismo, en ratas diabéticas con suplemento de CLA se muestra esta misma tendencia, los niveles de triglicéridos en este grupo fueron de 139.51mg/dl, valor que se encuentra estadísticamente igual a su contraparte de ratas diabéticas. Este fenómeno demuestra que el CLA en la diabetes no modifica la concentración de triglicéridos. En la figura 20B se muestra que la diabetes no incrementa los niveles de colesterol en suero (60.93mg/dl), por el contrario, cuando hay suplemento de CLA en esta enfermedad existe un discreto aumento (89.17mg/dl), aún cuando no hay diferencia significativa con respecto a los valores normales (64.03mg/dl), la tendencia

que se observa por parte de este suplemento es hacia un incremento en la concentración de colesterol.

En la figura 21A se muestra que el suplemento de CLA en ratas diabéticas con DHC eleva significativamente los niveles de triglicéridos en suero (90.67mg/dl) con respecto al control (29.87mg/dl), sin embargo, aunque no hay diferencia significativa entre los grupos DM2 y DM2-DHC-CLA, la diabetes por si sola es capaz de incrementar aún más los triglicéridos cuando hay una dieta normal (128mg/dl). Por su parte la DHC en la diabetes no eleva la concentración de triglicéridos (29.47mg/dl), no obstante, incrementa los niveles de colesterol (81.60mg/dl). El CLA en ratas con DHC y DM2 tiende a restituir la concentración de colesterol en suero a valores normales (66.80mg/dl).

6.4.3. Ácidos Grasos ω -3

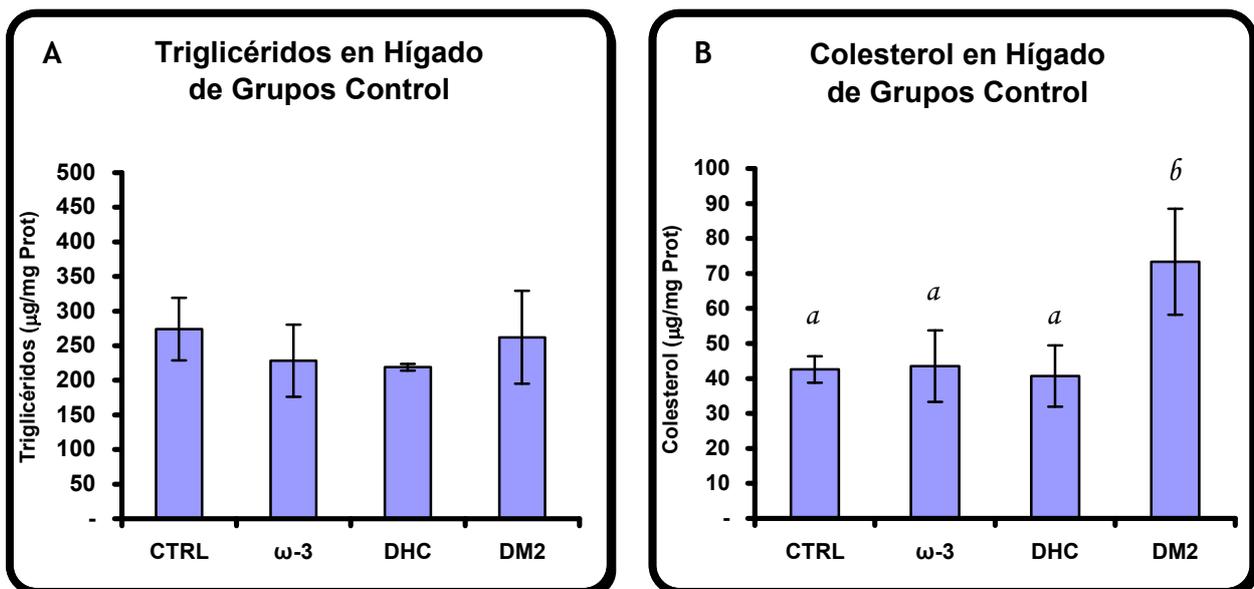


Fig.22. Efecto de los AG ω -3, la DHC y la DM2 sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en hígado. **A)** Contenido de triglicéridos en hígado de ratas normales (ctrl.), con dieta hipercalórica (DHC), con suplemento de AG ω -3 o con diabetes. **B)** Contenido de colesterol en suero de ratas normales (ctrl.), con dieta hipercalórica (DHC), con suplemento de AG ω -3 o con diabetes. ($P < 0.05$).

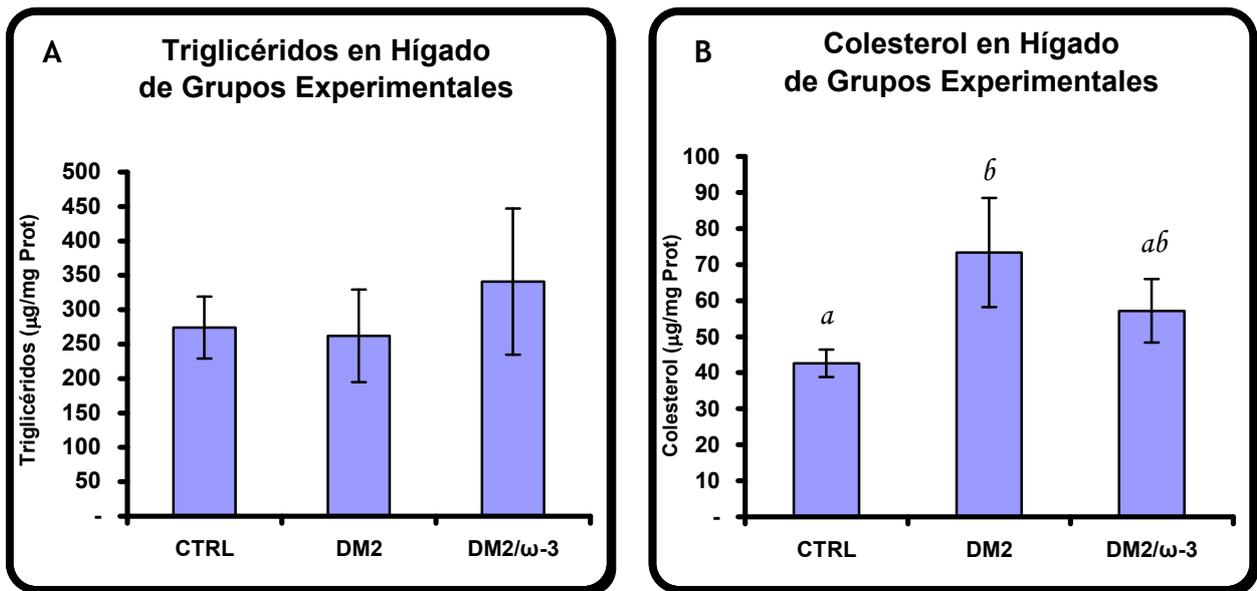


Fig. 23. Efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en hígado de ratas con diabetes (DM2). A) Contenido de triglicéridos en ratas con o sin suplemento de AG ω -3. B) Contenido de colesterol en hígado de ratas con o sin suplemento de AG ω -3. ($P < 0.05$).

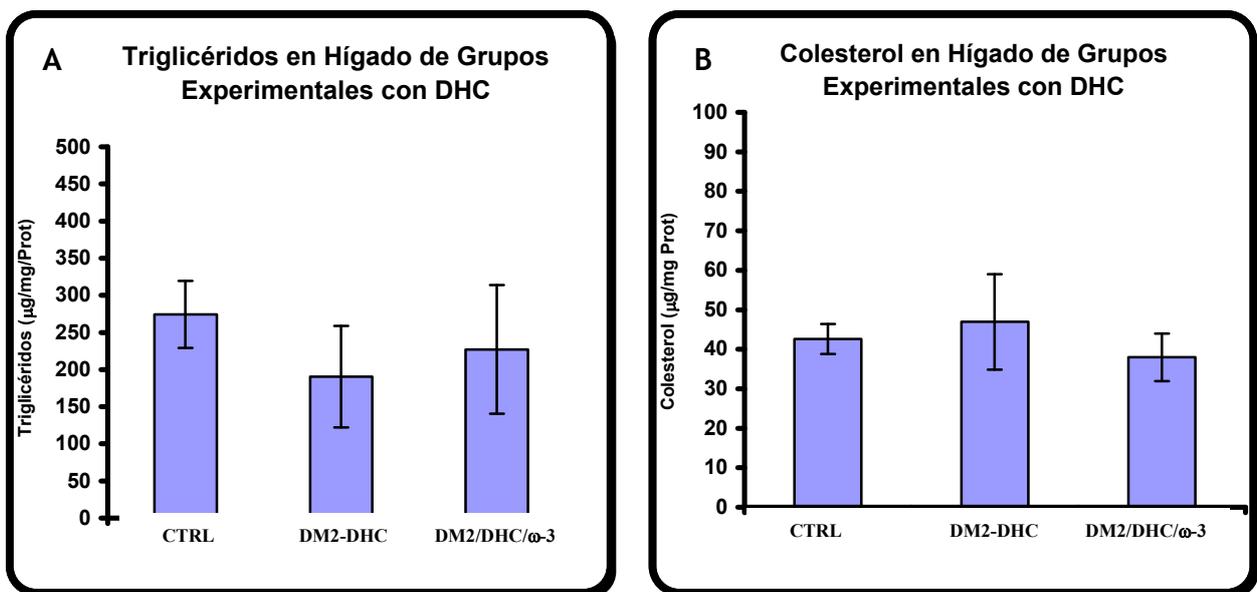


Fig. 24. Efecto de los ácidos grasos ω -3 sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en hígado de ratas con DM2 y DHC. A) Contenido de triglicéridos de ratas diabéticas con dieta hipercalórica y suplemento de AG ω -3. B) Contenido de colesterol de ratas diabéticas con dieta hipercalórica y suplemento de AG ω -3. ($P < 0.05$).

En la figura 22A se muestra que en cuanto al contenido de triglicéridos en hígado, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos, lo que indica que la diabetes no modificó el contenido de estos lípidos en hígado así como ninguno de los tratamientos. En la figura 22B se observa que la diabetes induce acumulación de

colesterol en hígado, pues el contenido de este lípido en ratas diabéticas fue de 73.35 μ g/mg proteína, valor que muestra una diferencia estadísticamente significativa con respecto al control (42.58 μ g/mg prot.). Finalmente, la DHC no incrementó el contenido de triglicéridos y colesterol en hígado.

La figura 23A muestra que no hay diferencias significativas en cuanto al contenido de triglicéridos en hígado. Si bien se observa una tendencia a aumentar discretamente estos lípidos cuando hay suplemento de ácidos grasos ω -3 (340.97 μ g/mg Prot.) estadísticamente no hay diferencias significativas con respecto a los valores normales (274.13 μ g/mg Prot.). Los datos de la figura 23B apuntan que la diabetes incrementa significativamente el contenido de colesterol en hígado (73.35 μ g/mg Prot.), sin embargo, el suplemento de ω -3 en la diabetes revierte el efecto de acúmulo de colesterol observado en esta enfermedad. El contenido de colesterol de ratas diabéticas con suplemento de ω -3 fue de 57.14 μ g/mg Prot., que aunque se encuentra por encima de lo reportado para el grupo control (42.58 μ g/mg Prot.), la acumulación no fue tan evidente como la del grupo de ratas diabéticas sin este suplemento.

La figura 24A indica que en cuanto al contenido de triglicéridos en hígado, no hay diferencias significativas entre los tratamientos. La DHC en la diabetes muestra una discreta tendencia a disminuir el contenido de estos lípidos (190.37 μ g/mgProt.), sin embargo, no se observan diferencias estadísticas con respecto a los valores normales (274.13 μ g/mgProt.). Asimismo, no se observan diferencias significativas en cuanto al contenido de colesterol (Fig 24B), no obstante, como se puede observar en la figura 23B, la diabetes promueve a un acúmulo de este lípido, si bien cuando hay una DHC de por medio no se presenta este fenómeno, por el contrario, el contenido de colesterol oscila entre los valores normales (46.94 μ g/mg Prot.). Estos datos apuntan a que la DHC en la diabetes no es capaz de elevar el contenido de colesterol en hígado.

6.4.4 Ácido Linoléico Conjugado

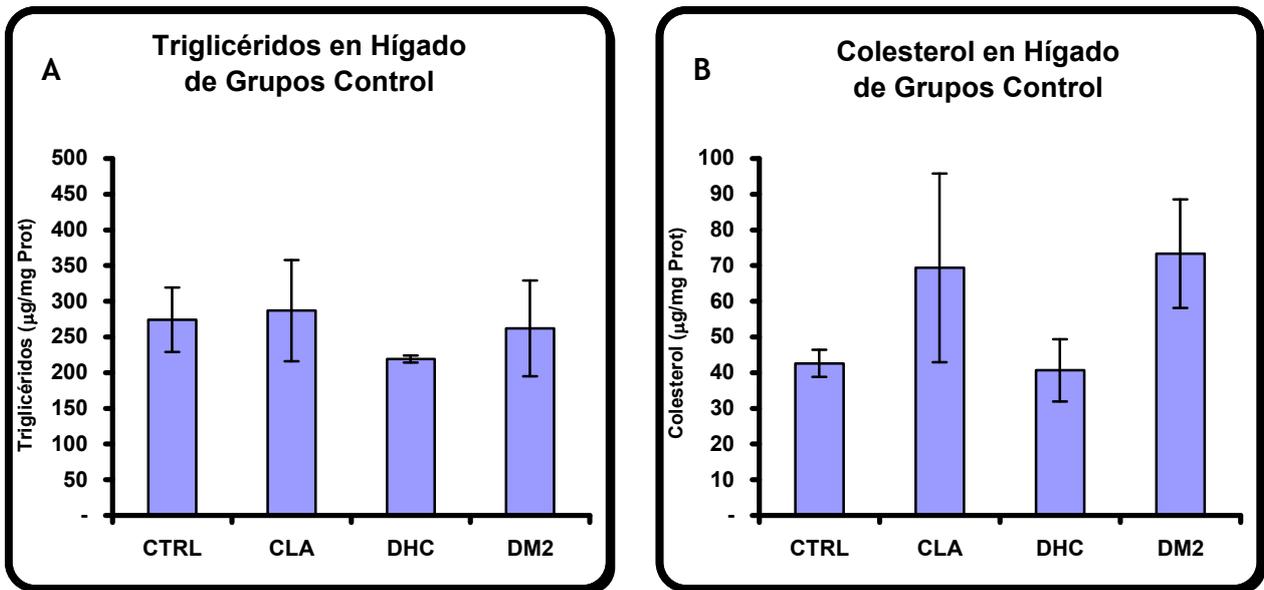


Fig. 25. Efecto del ácido linoléico conjugado (CLA), la DHC y la DM2 sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en hígado. A) Contenido de triglicéridos en hígado de ratas normales (ctrl.), con dieta hipercalórica (DHC), con suplemento de CLA o con diabetes. B) Contenido de colesterol en hígado de ratas normales (ctrl.), con dieta hipercalórica (DHC), con suplemento de CLA o con diabetes. ($P < 0.05$).

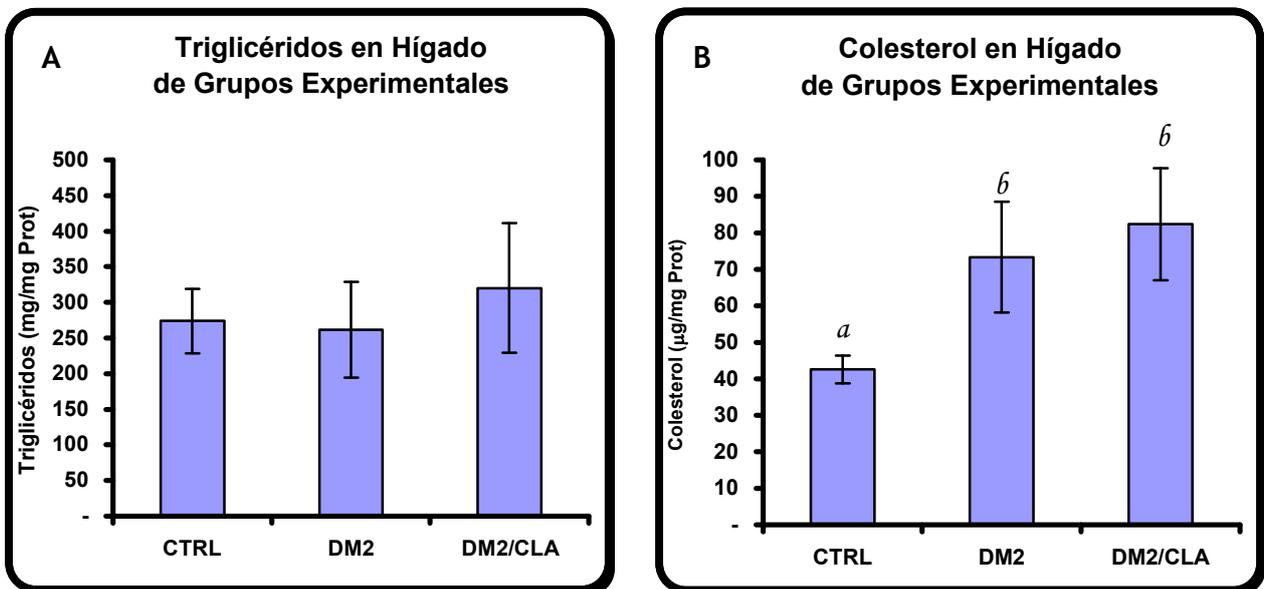


Fig. 26. Efecto del CLA sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en hígado de ratas con diabetes (DM2). A) Contenido de triglicéridos en ratas diabéticas con o sin suplemento de CLA. B) Contenido de colesterol en hígado de ratas diabéticas con o sin suplemento de CLA. ($P < 0.05$).

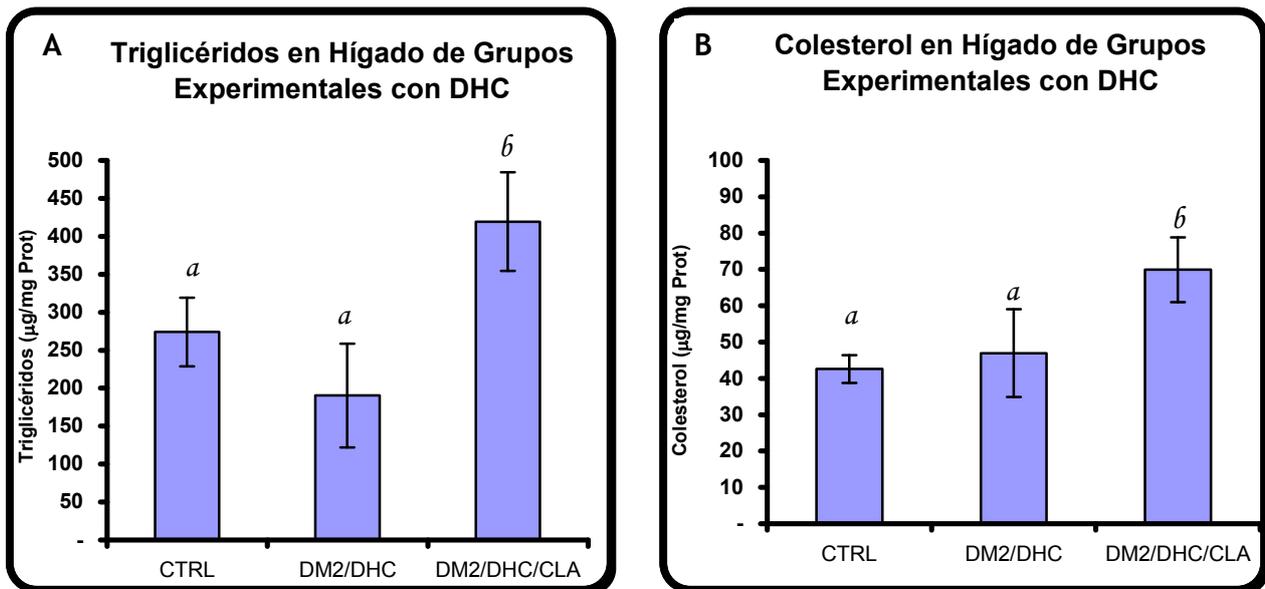


Fig. 27. Efecto del CLA sobre el contenido de triglicéridos y colesterol en hígado de ratas con DM2 y DHC. A) Contenido de triglicéridos de ratas diabéticas con dieta hipercalórica y suplemento de CLA. B) Contenido de colesterol de ratas diabéticas con dieta hipercalórica y suplemento de CLA. ($P < 0.05$).

En la figura 25A se puede observar que el contenido de triglicéridos no fue afectado por la diabetes ni por el tratamiento de CLA o la DHC. Sin embargo, en la figura 25B se observa que tanto la diabetes como el suplemento de CLA por si solos son capaces de generar acumulación de colesterol en hígado. Ratas diabéticas mostraron una concentración de colesterol de $73.35\mu\text{g}/\text{mg prot.}$, mientras que ratas normoglicémicas con suplemento de CLA presentaron valores de $69.39\mu\text{g}/\text{mg prot.}$, siguiendo una tendencia de acumulación de colesterol en este tejido. Por su parte la DHC no alteró el contenido de triglicéridos y colesterol en hígado.

La figura 26A muestra que no hay diferencias significativas en cuanto al contenido de triglicéridos, al parecer, el CLA no alteró los niveles de estos lípidos en hígados de ratas diabéticas. La figura 26B muestra que la diabetes induce acumulación de colesterol en hígado ($73.35\mu\text{g}/\text{mg Prot.}$). El CLA en la diabetes no modifica el contenido de colesterol con respecto a lo observado para esta enfermedad, pues ratas diabéticas con suplemento de CLA muestran un acúmulo similar ($82.38\mu\text{g}/\text{mg Prot.}$) al encontrado en ratas con DM2 sin este suplemento. Este fenómeno podría deberse a la diabetes *per se*, lo que indicaría que no hay efecto por parte del CLA sobre esta enfermedad, o bien, el CLA como se observa en la figura 25B incrementa por si solo la concentración de colesterol en hígado, lo que indicaría un efecto potencialmente nocivo por parte de este suplemento.

Los datos en la figura 27A apuntan que el CLA en ratas diabéticas con DHC produce incremento en el contenido de triglicéridos (419.33 μ g/mg Prot.). Este aumento es significativo con respecto al grupo control (274.13 μ g/mg Prot.). Por su parte en ratas diabéticas con DHC sin suplemento se observa el efecto contrario, existe en este grupo una tendencia a disminuir los niveles de triglicéridos en hígado (190.37 μ g/mg Prot.), no obstante, no hay diferencia significativa con respecto a los valores normales. En la figura 27B se muestra acumulación de colesterol inducida por el CLA en ratas con DM2 y DHC (69.91 μ g/mg Prot.), este fenómeno parece ser exclusivo de este suplemento, pues el contenido de colesterol de ratas diabéticas con DHC (46.94 μ g/mg Prot.) se mantiene estadísticamente igual al grupo control (42.58 μ g/mg Prot.).

6.5. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

6.5.1. Dieta Normal (alimento comercial para roedores).

Tabla 1. Contenido Porcentual de ácidos grasos de la dieta normal.

Mirístico	0.25%
Palmítico	14.55%
Palmitoléico	0.21%
Esteárico	4.33%
Oléico	15.75%
Linoléico	30.03%
Linolénico	3.11%
CLA	1.53%
Erucato	0.05%
Eicosanoato	7.27%
Araquidónico	0.38%
EPA	0.22%
DHA	0.05%
Compuestos de 20:3	14.75%
Otros	7.51%

Como se puede observar en la Tabla 1, la dieta normal contiene ácidos grasos esenciales como el linoléico (30.03%) que sirve como precursor para la formación del ácido araquidónico, un ácido graso metabólicamente activo. Esta dieta también incluye ácidos grasos ω -3 como el linolénico, eicosapentaenóico (EPA) y docosahexaenóico (DHA), aunque éstos últimos se encuentran en pequeña cantidad (EPA 0.22%, DHA 0.05%). El ácido linolénico sirve como sustrato para la formación de EPA y DHA.

Asimismo, esta dieta contiene 1.53% de ácido linoléico conjugado (CLA), aunque se desconocen las isoformas presentes.

6.5.2 Ácidos Grasos ω -3

Tabla 2. Composición porcentual de ácidos grasos de hígado de grupos control con dieta normal.

* N.D. No detectado.

	CTRL	DHC	DM2	ω -3
Mirístico	0.37% \pm 0.07	0.41% \pm 0.15	0.5% \pm 0.19	0.47% \pm 0.10
Palmítico	25.17% \pm 3.61	22.44% \pm 2.51	25.6% \pm 3.75	30.23% \pm 0.86
Palmitoléico	0.81% \pm 0.21	1.42% \pm 0.94	1.48% \pm 0.77	3.83% \pm 0.93
Esteárico	16.59% \pm 2.64	14.57% \pm 1.95	13.46% \pm 2.26	13.81% \pm 0.91
Oléico	10.74% \pm 0.69	15.41% \pm 1.08	14.82% \pm 3.68	17.14% \pm 2.09
Linoléico	22.88% \pm 1.41	19.15% \pm 1.97	23% \pm 4.90	16.31% \pm 0.32
Linolénico	0.73% \pm 0.09	0.52% \pm 0.11	0.84% \pm 0.37	0.42% \pm 0.12
Araquidónico	17.64% \pm 0.49	20.08% \pm 4.29	12.87% \pm 3.63	13.48% \pm 2.60
EPA	0.71% \pm 0.16	N.D.	0.49% \pm 0.17	0.13% \pm 0.03
DHA	3.28% \pm 0.06	3.05% \pm 0.12	3.02% \pm 0.50	1.98% \pm 0.67
A. Grasos no ident.	0.57% \pm 0.18	1.77% \pm 0.38	2.36% \pm 1.12	1.32% \pm 0.05
Compuestos de 20:3	0.52% \pm 0.01	1.18% \pm 0.51	1.56% \pm 0.71	0.88% \pm 0.34

Como se puede observar en la tabla 2, la DHC indujo alteraciones en la composición de ácidos grasos de los hepatocitos. Incrementó significativamente el porcentaje de ácido oléico de 10.74% a 15.41%, condujo a un discreto aumento del ácido araquidónico (20.08%) con respecto a los valores descritos en esta tabla como normales (Ctrl. 17.64%). También se mostró un aumento en el porcentaje de compuestos de 20:3 que va de 0.57% a 1.18%. Asimismo, esta dieta llevó a una disminución de los ácidos linolénico (0.52%) y linoléico (19.15%). La diabetes también modificó la composición lipídica en este tejido. Se observó una disminución significativa del ácido araquidónico (12.87%) con respecto a los valores normales (17.64%), cabe mencionar que este ácido graso no sólo es un componente estructural de las membranas sino que es

metabólicamente funcional y es utilizado para la síntesis de eicosanoides. Asimismo, la diabetes disminuye el contenido de ácido esteárico de 16.59% a 13.46%. Se observa también un discreto aumento del ácido oléico (14.82%) y compuestos de 20:3 (1.56%). Finalmente, el suplemento de ácidos grasos ω -3 elevó los niveles del ácido palmítico de 25.17% a 30.23%. El ácido oléico mostró un aumento significativo que va de 10.74% a 17.14%. De la misma manera, se observó un aumento significativo en el porcentaje de palmitoléico (3.83%). Se mostró también una disminución del ácido araquidónico (13.48%), lo que indica que los ω -3 por si solos son capaces de disminuir el contenido de este ácido graso, que si bien la DM2 muestra el mismo efecto, quizás los mecanismos por los que se lleva acabo esta disminución son distintos. Asimismo, este suplemento conlleva a la disminución de los ácidos esteárico (13.81%), linolénico (0.42%), DHA (1.98%) así como un decremento significativo de ácido linoléico (16.31%).

Tabla 3. Composición porcentual de ácidos grasos de hígado de grupos experimentales con dieta normal y DM2. * N.D. No detectado.

	CTRL	DM2	DM2/ ω -3
Mirístico	0.37% \pm 0.07	0.5% \pm 0.19	0.33% \pm 0.08
Palmitico	25.17% \pm 3.61	25.6% \pm 3.75	22.32% \pm 3.07
Palmitoléico	0.81% \pm 0.21	1.48% \pm 0.77	0.86% \pm 0.27
Estearico	16.59% \pm 2.64	13.46% \pm 2.26	11.42% \pm 3.17
Oléico	10.74% \pm 0.69	14.82% \pm 3.68	11.44% \pm 1.69
Linoléico	22.88% \pm 1.41	23% \pm 4.90	31.29% \pm 3.15
Linolénico	0.73% \pm 0.09	0.84% \pm 0.37	1.96% \pm 0.59
Eicosanoato	N.D.	N.D.	0.21% \pm 0.04
Araquidónico	17.64% \pm 0.49	12.87% \pm 3.63	13.81% \pm 4.27
EPA	0.71% \pm 0.16	0.49% \pm 0.17	0.95% \pm 0.20
DHA	3.28% \pm 0.06	3.02% \pm 0.50	2.6% \pm 0.82
A. Grasos no ident.	0.57% \pm 0.18	2.36% \pm 1.12	2.2% \pm 0.79
Compuestos de 20:3	0.52% \pm 0.01	1.56% \pm 0.71	0.61% \pm 0.13

En la tabla 3 se demuestra que los ácidos grasos ω -3 en la diabetes modifican la composición lipídica del hígado. Se encontró que reducen los niveles de ácido esteárico de 16.59% a 11.42%, asimismo, reducen el porcentaje de ácido araquidónico hasta 13.81% con respecto al grupo control (17.64%). Estas mismas tendencias se observan en ratas diabéticas sin suplemento, pues los niveles de esteárico (13.46%) y araquidónico (12.87%) se encuentran también disminuidos. El suplemento de ω -3 en la DM2 provocó un incremento significativo de los ácidos linoléico (31.29%), linolénico (1.96%) y EPA (0.95%). Asimismo, se restauraron los niveles de palmitoléico (0.86%), oléico (11.44%) y compuestos de 20:3 (0.61%) a niveles normales (Palmitoléico 0.81%, Oléico 10.74% y Compuestos de 20:3, 0.52%). La diabetes modificó la composición de ácidos grasos y elevó el contenido de palmitoléico, oléico y compuestos de 20:3, el suplemento de omega-3 en la dieta restituyó estos porcentajes a valores normales.

Tabla 4. Composición porcentual de ácidos grasos en hígado de ratas diabéticas con dieta hipercalórica.
* N.D. No detectado.

	CTRL	DHC	DM2	DM2/DHC	DM2/DHC/ ω -3
Mirístico	0.37% \pm 0.07	0.41% \pm 0.15	0.5% \pm 0.19		0.83% \pm 0.21
Palmitico	25.17% \pm 3.61	22.44% \pm 2.51	25.6% \pm 3.75	23,19% \pm 1,70	27.21% \pm 4.21
Palmitoléico	0.81% \pm 0.21	1.42% \pm 0.94	1.48% \pm 0.77	1.1% \pm 0,15	3.23% \pm 0.93
Esteárico	16.59% \pm 2.64	14.57% \pm 1.95	13.46% \pm 2.26	14,46% \pm 1,88	11.76% \pm 3.22
Oléico	10.74% \pm 0.69	15.41% \pm 1.08	14.82% \pm 3.68	20,37% \pm 4,40	20.84% \pm 2.33
Linoléico	22.88% \pm 1.41	19.15% \pm 1.97	23% \pm 4.90	18,13% \pm 2,93	19.55% \pm 2.09
Linolénico	0.73% \pm 0.09	0.52% \pm 0.11	0.84% \pm 0.37	N.D.	0.80% \pm 0.13
Eicosanoato	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Araquidónico	17.64% \pm 0.49	20.08% \pm 4.29	12.87% \pm 3.63	16,34% \pm 3,59	12.40% \pm 4.10
EPA	0.71% \pm 0.16	N.D.	0.49% \pm 0.17	N.D.	0.14% \pm 0.03
DHA	3.28% \pm 0.06	3.05% \pm 0.12	3.02% \pm 0.50	3.28% \pm 0.81	0.17% \pm 0.09
A. Grasos no ident.	0.57% \pm 0.18	1.77% \pm 0.38	2.36% \pm 1.12	3,11% \pm 1,55	1.64% \pm 0.34
Compuestos de 20:3	0.52% \pm 0.01	1.18% \pm 0.51	1.56% \pm 0.71	N.D.	1.44% \pm 0.47

En la tabla 4 se muestra que la DHC en la diabetes incrementa los niveles de ácido oléico (15.41%), este fenómeno probablemente conduce a la disminución del producto que en este caso es el ácido linoléico (19.15%). Asimismo, esta dieta impidió la acumulación de los ácidos mirístico, linolénico, EPA y compuestos de 20:3. El suplemento de ω -3 restauró los niveles de linolénico (0.80%) que se habían perdido con la DHC en la diabetes. Asimismo, este suplemento llevó a un incremento significativo de mirístico (0.83%) y palmitoléico (3.23%), también se observa un aumento del ácido oléico (20.84%), sin embargo, este fenómeno se presenta también en ratas con DM2 y DHC sin este suplemento, por lo que no se le atribuye tal efecto a los ω -3. De la misma manera se muestra una disminución en el porcentaje de esteárico (11.76%) y araquidónico (12.40%), no obstante, este efecto se observa también en la diabetes y con el suplemento de ω -3 (Tabla 2). Finalmente en el grupo de ratas diabéticas con DHC y ω -3 disminuye significativamente el porcentaje de los ácidos EPA (0.14%) y DHA (0.17%).

6.5.3. Ácido Linoléico Conjugado

Tabla 5. Composición porcentual de ácidos grasos de hígado de grupos control y con suplemento de CLA.
* N.D. No detectado.

	CTRL	DHC	DM2	CLA
Mirístico	0.37% ± 0.07	0.41% ± 0.15	0.5% ± 0.19	
Palmítico	25.17% ± 3.61	22.44% ± 2.51	25.6% ± 3.75	21.6% ± 0.77
Palmitoléico	0.81% ± 0.21	1.42% ± 0.94	1.48% ± 0.77	1.03% ± 0.06
Esteárico	16.59% ± 2.64	14.57% ± 1.95	13.46% ± 2.26	17.56% ± 1.42
Oléico	10.74% ± 0.69	15.41% ± 1.08	14.82% ± 3.68	14.02% ± 1.65
Linoléico	22.88% ± 1.41	19.15% ± 1.97	23% ± 4.90	18.05% ± 1.00
Linolénico	0.73% ± 0.09	0.52% ± 0.11	0.84% ± 0.37	1.16% ± 0.27
Araquidónico	17.64% ± 0.49	20.08% ± 4.29	12.87% ± 3.63	14.72% ± 1.65
EPA	0.71% ± 0.16	N.D.	0.49% ± 0.17	0.96% ± 0.11
DHA	3.28% ± 0.06	3.05% ± 0.12	3.02% ± 0.50	5.6% ± 1.47
A. Grasos no ident.	0.57% ± 0.18	1.77% ± 0.38	2.36% ± 1.12	3.92% ± 1.88
Compuestos de 20:3	0.52% ± 0.01	1.18% ± 0.51	1.56% ± 0.71	1.38% ± 0.47

En la tabla 5 se muestra el efecto del CLA sobre la composición de ácidos grasos en hígado, también se muestran los efectos de la dieta hipercalórica y la DM2, los cuales fueron previamente descritos en la tabla 2. El CLA produjo un incremento de los ácidos palmitoléico (1.03%) y oléico (14.02%), asimismo, llevó a un aumento significativo de los ácidos linolénico (1.16%), eicosapentaenóico (0.96%), docosahexaenóico (5.6%) y compuestos de 20:3 (1.38%). Estos datos apuntan a un aumento de ácidos grasos poliinsaturados, lo que podría favorecer a una mayor fluidez membranal.

Tabla 6. Composición porcentual de ácidos grasos de hígado de grupos con DM2 y suplemento de CLA.
* N.D. No detectado.

	CTRL	DM2	DM2/CLA
Mirístico	0.37% ± 0.07	0.5% ± 0.19	0.39% ± 0.18
Palmítico	25.17% ± 3.61	25.6% ± 3.75	25.03% ± 0.79
Palmitoléico	0.81% ± 0.21	1.48% ± 0.77	0.47% ± 0.27
Esteárico	16.59% ± 2.64	13.46% ± 2.26	16.26% ± 4.11
Oléico	10.74% ± 0.69	14.82% ± 3.68	15.23% ± 4.27
Linoléico	22.88% ± 1.41	23% ± 4.90	19.69% ± 3.82
Linolénico	0.73% ± 0.09	0.84% ± 0.37	0.52% ± 0.22
Eicosanoato	N.D.	N.D.	N.D.
Araquidónico	17.64% ± 0.49	12.87% ± 3.63	14.83% ± 2.66
EPA	0.71% ± 0.16	0.49% ± 0.17	0.48% ± 0.14
DHA	3.28% ± 0.06	3.02% ± 0.50	4.79% ± 1.69
A. Grasos no ident.	0.57% ± 0.18	2.36% ± 1.12	1.56% ± 0.16
Compuestos de 20:3	0.52% ± 0.01	1.56% ± 0.71	0.74% ± 0.23

La tabla 6 muestra que el suplemento de CLA en ratas diabéticas conduce a un incremento de ácido docosahexaenóico (DHA 4.79%). También se observa un discreto incremento del ácido oléico en este grupo (15.23%), sin embargo, este efecto se muestra aún en ratas diabéticas sin suplemento, por lo que este fenómeno se podría atribuir a la enfermedad más que al CLA. Asimismo, el CLA en la diabetes muestra una discreta disminución del ácido palmitoléico (0.47%) a diferencia de ratas diabéticas en donde este ácido graso se encontró aumentado (0.81%). Por su parte, el CLA restituyó los niveles de ácido esteárico (16.26%) que en la diabetes se mostraron disminuidos (13.46%). De manera similar, el ácido araquidónico que disminuyó como consecuencia de la DM2 a niveles de 12.87%, con el suplemento de CLA no se vio alterado significativamente con respecto al control (14.83%).

Tabla 7. Composición porcentual de ácidos grasos de hígado de grupos con DM2, DHC y suplemento de CLA.

* N.D. No detectado.

	CTRL	DHC	DM2	DM2/DHC	DM2/DHC/CLA
Mirístico	0.37% ± 0.07	0.41% ± 0.15	0.5% ± 0.19		0.5% ± 0.11
Palmítico	25.17% ± 3.61	22.44% ± 2.51	25.6% ± 3.75	23,19% ± 1,70	26.47% ± 1.69
Palmitoléico	0.81% ± 0.21	1.42% ± 0.94	1.48% ± 0.77	1.1% ± 0,15	1.5% ± 0.51
Estearico	16.59% ± 2.64	14.57% ± 1.95	13.46% ± 2.26	14,46% ± 1,88	9.4% ± 2.93
Oléico	10.74% ± 0.69	15.41% ± 1.08	14.82% ± 3.68	20,37% ± 4,40	28.02% ± 4.12
Linoléico	22.88% ± 1.41	19.15% ± 1.97	23% ± 4.90	18,13% ± 2,93	18.18% ± 0.82
Linolénico	0.73% ± 0.09	0.52% ± 0.11	0.84% ± 0.37	N.D.	0.51% ± 0.09
CLA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.5% ± 0.09
Eicosanoato	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.15% ± 0.06
Araquidónico	17.64% ± 0.49	20.08% ± 4.29	12.87% ± 3.63	16,34% ± 3,59	8.91% ± 2.08
EPA	0.71% ± 0.16	N.D.	0.49% ± 0.17	N.D.	0.2% ± 0.01
DHA	3.28% ± 0.06	3.05% ± 0.12	3.02% ± 0.50	3.28% ± 0.81	2.46% ± 0.46
A. Grasos no ident.	0.57% ± 0.18	1.77% ± 0.38	2.36% ± 1.12	3,11% ± 1,55	2.2% ± 0.77
Compuestos de 20:3	0.52% ± 0.01	1.18% ± 0.51	1.56% ± 0.71	N.D.	1.01% ± 0.01

En la tabla 7 se observa el comportamiento de los grupos de ratas diabéticas con DHC y suplemento de CLA. En este grupo se observó un incremento significativo de ácido oléico (28.02%), este efecto no se observa tan pronunciado ni en el grupo de ratas diabéticas con DHC ni en el grupo de ratas diabéticas con CLA (Tabla 6), por lo que probablemente es un efecto en conjunto de la DHC y el CLA. Asimismo, se observa un decremento del ácido esteárico (9.4%) que quizás se deba a una mayor degradación de este para la formación de ácido oléico, éste último, se acumula y como consecuencia se observa una disminución de su producto, el ácido linoléico (18.18%). Estos fenómenos se encuentran estrechamente asociados con el decremento del ácido araquidónico que aquí se presenta (8.91%). A diferencia del grupo de ratas diabéticas con DHC, aquellas con suplemento de CLA presentan ácido linolénico (0.51%) y EPA (0.2%) que aunque los porcentajes son pequeños y se encuentran por debajo de los valores normales (Linolénico 0.73% y EPA 0.71%) no están ausentes como en ratas sin este suplemento. Finalmente, se observa una disminución del DHA (2.46%) y una incorporación de CLA (0.5%).

6.5.4 Ácidos Grasos ω -3

Tabla 8. Composición Porcentual de ácidos grasos de riñón de grupos control y con suplemento de ω -3.
* N.D. No detectado.

	CTRL	DHC	DM2	ω -3
Mirístico	0,79% \pm 0,06	N.D.	1,08% \pm 0,54	0,83% \pm 0,26
Palmitico	22,99% \pm 2,07	25% \pm 1,61	26,6% \pm 1,68	22,73% \pm 2,47
Palmitoléico	1,44% \pm 0,33	0,88% \pm 0,08	1,39% \pm 0,40	1,31% \pm 0,42
Esteárico	14,03% \pm 1,26	15,44% \pm 2,30	14,94% \pm 2,56	13,46% \pm 1,92
Oléico	17,22% \pm 2,01	15,21% \pm 1,44	17,25% \pm 4,17	15,99% \pm 2,37
Linoléico	22,59% \pm 0,82	18,5% \pm 1,88	18,52% \pm 4,28	22,53% \pm 3,61
Linolénico	0,87% \pm 0,11	N.D.	0,44% \pm 0,15	0,84% \pm 0,38
CLA	0,15% \pm 0,04	N.D.	N.D.	N.D.
Eicosanoato	0,16% \pm 0,02	N.D.	N.D.	N.D.
Araquidónico	15,08% \pm 1,68	20,9% \pm 2,50	15,72% \pm 3,33	19,87% \pm 4,36
EPA	0,25% \pm 0,07	N.D.	0,31% \pm 0,05	N.D.
DHA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
A. Grasos no ident.	3,26% \pm 0,82	2,98% \pm 0,62	2,8% \pm 1,41	1,25% \pm 0,51
Compuestos de 20:3	1,17% \pm 0,16	1,1% \pm 0,16	0,96% \pm 0,47	1,21% \pm 0,33

En la tabla 8 se muestra que la DHC es capaz de incrementar significativamente los niveles de ácido araquidónico en riñón (20.9%). Estos datos apuntan que la dieta hipercalórica por si sola genera efectos potencialmente nocivos al incrementar el sustrato para la síntesis de eicosanoides derivados del araquidónico. Asimismo, esta dieta produce decremento de los ácidos palmitoléico (0.88%) y linoléico (18.5%), este último quizás por un aumento en su degradación para la formación del araquidónico. También se observa una pérdida en la acumulación de los ácidos mirístico, linolénico, EPA y DHA. Por su parte, la diabetes no mostró gran alteración en la composición lipídica de este tejido, únicamente indujo una disminución del ácido linolénico (0.44%). Finalmente, el suplemento de ω -3 mostró una tendencia al incremento del ácido

araquidónico (19.87%), aunque no se observó diferencia significativa con respecto al control (15.08%).

Tabla 9. Composición porcentual de ácidos grasos en riñón de grupos con DM2 y suplemento de ω -3.
* N.D. No detectado.

	CTRL	DM2	DM2/ ω -3
Mirístico	0,79% \pm 0,06	1,08% \pm 0,54	0,37% \pm 0,12
Palmítico	22,99% \pm 2,07	26,6% \pm 1,68	25,95% \pm 4,62
Palmitoléico	1,44% \pm 0,33	1,39% \pm 0,40	0,87% \pm 0,46
Estearico	14,03% \pm 1,26	14,94% \pm 2,56	17,12% \pm 2,29
Oléico	17,22% \pm 2,01	17,25% \pm 4,17	11,79% \pm 2,40
Linoléico	22,59% \pm 0,82	18,52% \pm 4,28	18,75% \pm 4,88
Linolénico	0,87% \pm 0,11	0,44% \pm 0,15	0,79% \pm 0,33
CLA	0,15% \pm 0,04	N.D.	N.D.
Eicosanoato	0,16% \pm 0,02	N.D.	N.D.
Araquidónico	15,08% \pm 1,68	15,72% \pm 3,33	20,74% \pm 4,74
EPA	0,25% \pm 0,07	0,31% \pm 0,05	0,31% \pm 0,04
DHA	N.D.	N.D.	N.D.
A. Grasos no ident.	3,26% \pm 0,82	2,8% \pm 1,41	2,57% \pm 1,59
Compuestos de 20:3	1,17% \pm 0,16	0,96% \pm 0,47	0,75% \pm 0,29

En la tabla 9 se demuestra que el suplemento de ácidos grasos ω -3 en la DM2 restituye el contenido de ácido linolénico (0.79%) que en la diabetes se encontraba disminuido (0.44%), además, conduce a un decremento del ácido mirístico (0.37%) y oléico (11.79%). En este grupo de ratas diabéticas con suplemento se observa la misma tendencia al incremento del ácido araquidónico (20.74%) que se observaba en ratas sin diabetes con suplemento (Tabla 8). Tal efecto puede atribuirse a los ω -3, pues en la DM2 el contenido de araquidónico se muestra dentro de los valores normales (15.08%). Sin embargo, a diferencia de la DHC, esto es sólo una tendencia, más no hay diferencias significativas con respecto al control.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos de riñón de grupos con DHC, DM2 y suplemento de ω -3.
* N.D. No detectado.

	CTRL	DHC	DM2	DM2/DHC	DM2/DHC/ ω -3
Mirístico	0,79% \pm 0,06		1,08% \pm 0,54	0,74% \pm 0,24	0,86% \pm 0,39
Palmitico	22,99% \pm 2,07	25% \pm 1,61	26,6% \pm 1,68	25,89% \pm 2,02	26,61% \pm 0,56
Palmitoléico	1,44% \pm 0,33	0,88% \pm 0,08	1,39% \pm 0,40	1,18% \pm 0,13	2,72% \pm 0,70
Esteárico	14,03% \pm 1,26	15,44% \pm 2,30	14,94% \pm 2,56	16,81% \pm 2,53	10,64% \pm 1,57
Oléico	17,22% \pm 2,01	15,21% \pm 1,44	17,25% \pm 4,17	18,76% \pm 1,31	26,17% \pm 3,43
Linoléico	22,59% \pm 0,82	18,5% \pm 1,88	18,52% \pm 4,28	12,67% \pm 1,84	18,2% \pm 0,43
Linolénico	0,87% \pm 0,11	N.D.	0,44% \pm 0,15	N.D.	0,68% \pm 0,13
CLA	0,15% \pm 0,04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Eicosanoato	0,16% \pm 0,02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Araquidónico	15,08% \pm 1,68	20,9% \pm 2,50	15,72% \pm 3,33	21,69% \pm 2,91	11,14% \pm 2,22
EPA	0,25% \pm 0,07	N.D.	0,31% \pm 0,05	N.D.	N.D.
DHA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0,46% \pm 0,28
A. Grasos no ident.	3,26% \pm 0,82	2,98% \pm 0,62	2,8% \pm 1,41	1,37% \pm 0,45	1,71% \pm 0,25
Compuestos de 20:3	1,17% \pm 0,16	1,1% \pm 0,16	0,96% \pm 0,47	0,88% \pm 0,38	0,8% \pm 0,40

La tabla 10 muestra que la DHC en la diabetes conduce a un incremento del ácido araquidónico (21.69%) y como consecuencia un decremento del ácido linoléico (12.67%). Este efecto es resultado de la DHC y no de la DM2 pues animales no diabéticos con esta dieta muestran el mismo comportamiento. Asimismo, la DHC en animales diabéticos y no diabéticos conduce a una pérdida de ácidos grasos ω -3. Por su parte el suplemento de omega-3 en ratas diabéticas con DHC induce a la acumulación de ácido oléico (26.17%) y consecuentemente una disminución del ácido esteárico (10.64%), el cual, funciona como sustrato que se degrada para la formación del producto, en este caso el ácido oléico. Este suplemento conlleva a la restitución del ácido linolénico (0.68%) y acumulación de DHA (0.46%).

A diferencia de los grupos anteriores con suplemento de omega, en ratas diabéticas con DHC estos ácidos grasos disminuyeron el contenido de ácido araquidónico (11.74%) incluso por debajo de los valores normales (15.08%).

6.5.5 Ácido Linoléico Conjugado

Tabla 11. Composición porcentual de ácidos grasos de riñón de grupos control y con suplemento de CLA.
* N.D. No detectado.

	CTRL	DHC	DM2	CLA
Mirístico	0,79% ± 0,06		1,08% ± 0,54	0,62% ± 0,18
Palmítico	22,99% ± 2,07	25% ± 1,61	26,6% ± 1,68	20,66% ± 1,58
Palmitoléico	1,44% ± 0,33	0,88% ± 0,08	1,39% ± 0,40	0,87% ± 0,15
Esteárico	14,03% ± 1,26	15,44% ± 2,30	14,94% ± 2,56	16,62% ± 0,68
Oléico	17,22% ± 2,01	15,21% ± 1,44	17,25% ± 4,17	17,33% ± 0,71
Linoléico	22,59% ± 0,82	18,5% ± 1,88	18,52% ± 4,28	20,32% ± 0,40
Linolénico	0,87% ± 0,11	N.D.	0,44% ± 0,15	0,9% ± 0,50
CLA	0,15% ± 0,04	N.D.	N.D.	0,83% ± 0,23
Eicosanoato	0,16% ± 0,02	N.D.	N.D.	N.D.
Araquidónico	15,08% ± 1,68	20,9% ± 2,50	15,72% ± 3,33	17,23% ± 1,56
EPA	0,25% ± 0,07	N.D.	0,31% ± 0,05	0,63% ± 0,08
DHA	N.D.	N.D.	N.D.	1,21% ± 0,11
A. Grasos no ident.	3,26% ± 0,82	2,98% ± 0,62	2,8% ± 1,41	2,96% ± 1,13
Compuestos de 20:3	1,17% ± 0,16	1,1% ± 0,16	0,96% ± 0,47	0,93% ± 0,19

En la tabla 11 se muestra el efecto del suplemento de CLA sobre la composición de ácidos grasos de riñón, también se muestran los efectos de la dieta hipercalórica y la DM2, los cuales fueron previamente descritos en la tabla 8. El CLA provocó una disminución de los ácidos palmitoleico (0.87%) y linoleico (20.32%) con respecto a los valores normales (Palmitoleico 1.44%, Linoleico 22.59%), por el contrario, se observó un incremento significativo de los ácidos esteárico (16.62%), CLA (0.83%), EPA (0.63%) y DHA (1.21%). En general, el cambio en la composición lipídica se vio reflejado hacia un incremento de ácidos grasos poliinsaturados, lo que eventualmente podría favorecer a un aumento en la fluidez membranal.

Tabla 12. Composición porcentual de ácidos grasos de riñón de grupos con DM2 y suplemento de CLA.
* N.D. No detectado.

	CTRL	DM2	DM2/CLA
Mirístico	0,79% ± 0,06	1,08% ± 0,54	0,73% ± 0,25
Palmítico	22,99% ± 2,07	26,6% ± 1,68	26,74% ± 1,30
Palmitoléico	1,44% ± 0,33	1,39% ± 0,40	1,11% ± 0,38
Estéarico	14,03% ± 1,26	14,94% ± 2,56	14,41% ± 2,19
Oléico	17,22% ± 2,01	17,25% ± 4,17	18,12% ± 3,64
Linoléico	22,59% ± 0,82	18,52% ± 4,28	18,44% ± 2,14
Linolénico	0,87% ± 0,11	0,44% ± 0,15	0,51% ± 0,09
CLA	0,15% ± 0,04	N.D.	N.D.
Eicosanoato	0,16% ± 0,02	N.D.	N.D.
Araquidónico	15,08% ± 1,68	15,72% ± 3,33	16,65% ± 3,12
EPA	0,25% ± 0,07	0,31% ± 0,05	0,42% ± 0,06
DHA	N.D.	N.D.	N.D.
A. Grasos no ident.	3,26% ± 0,82	2,8% ± 1,41	2,31% ± 0,70
Compuestos de 20:3	1,17% ± 0,16	0,96% ± 0,47	0,56% ± 0,07

En la tabla 12 se muestra que aparentemente el suplemento de CLA en la diabetes provoca una disminución de los ácidos linoléico (de 22.59 a 18.44%), linolénico (0.51%) y compuestos de 20:3 (0.56%). Asimismo, se observa un incremento del ácido palmítico (26.74%). Este mismo fenómeno se muestra en ratas con DM2 sin suplemento, por lo que más que al CLA incluido en la dieta, el cambio en la composición lipídica se le atribuye a la diabetes *per se*. Al parecer el suplemento de CLA no altera la composición de ácidos grasos de riñón en la diabetes.

Tabla 13. Composición porcentual de ácidos grasos de riñón de grupos con DM2, DHC y suplemento de CLA.
* N.D. No detectado.

	CTRL	DHC	DM2	DM2/DHC	DM2/DHC/CLA
Mirístico	0,79% ± 0,06		1,08% ± 0,54	0,74% ± 0,24	0,52% ± 0,13
Palmítico	22,99% ± 2,07	25% ± 1,61	26,6% ± 1,68	25,89% ± 2,02	26,15% ± 0,74
Palmitoléico	1,44% ± 0,33	0,88% ± 0,08	1,39% ± 0,40	1,18% ± 0,13	1,33% ± 0,60
Esteárico	14,03% ± 1,26	15,44% ± 2,30	14,94% ± 2,56	16,81% ± 2,53	12,16% ± 3,20
Oléico	17,22% ± 2,01	15,21% ± 1,44	17,25% ± 4,17	18,76% ± 1,31	24,69% ± 6,14
Linoléico	22,59% ± 0,82	18,5% ± 1,88	18,52% ± 4,28	12,67% ± 1,84	16,11% ± 1,37
Linolénico	0,87% ± 0,11	N.D.	0,44% ± 0,15	N.D.	0,36% ± 0,18
CLA	0,15% ± 0,04	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Eicosanoato	0,16% ± 0,02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Araquidónico	15,08% ± 1,68	20,9% ± 2,50	15,72% ± 3,33	21,69% ± 2,91	15,68% ± 6,09
EPA	0,25% ± 0,07	N.D.	0,31% ± 0,05	N.D.	0,22% ± 0,11
DHA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
A. Grasos no ident.	3,26% ± 0,82	2,98% ± 0,62	2,8% ± 1,41	1,37% ± 0,45	2% ± 0,25
Compuestos de 20:3	1,17% ± 0,16	1,1% ± 0,16	0,96% ± 0,47	0,88% ± 0,38	0,78% ± 0,06

En la tabla 13 se muestra la composición lipídica de riñón en grupos de ratas diabéticas con DHC y suplemento de CLA. Este grupo mostró una disminución de los ácidos mirístico (0.52%), linoleico (16.11%), linolénico (0.36%) y compuestos de 20:3 (0.78%), asimismo, se observó un aumento significativo de los ácidos palmítico (26.15%) y oléico (24.69%). A diferencia de las ratas con DHC y diabetes, el grupo con suplemento de CLA mantuvo controlados los niveles de ácido araquidónico, quizás porque parte del efecto de este suplemento fue disminuir el ácido linoleico, el cual, es precursor del araquidónico. También se observa en esta tabla que el suplemento de CLA tiende a restituir el contenido de ácido linolénico que por la DHC no se había acumulado.

6.6. HISTOLOGÍA

6.6.1. Ácidos grasos ω -3

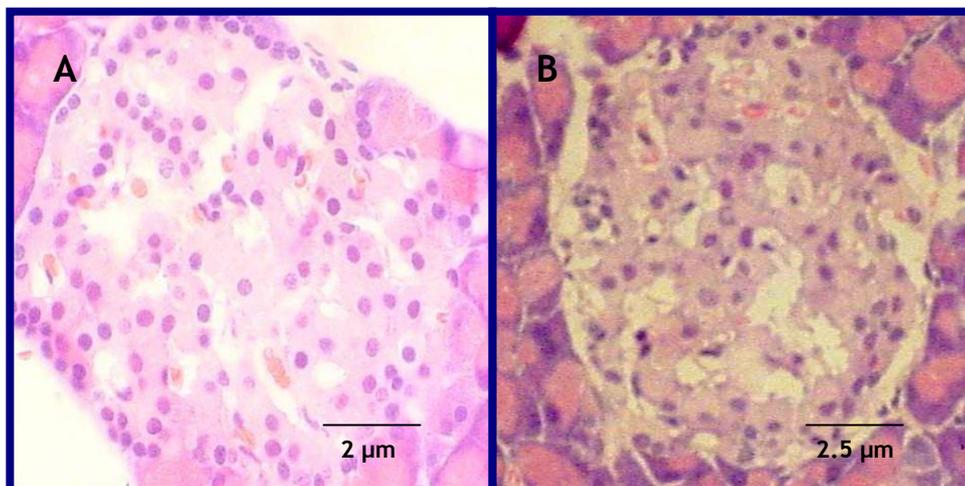


Fig. 28. Islotes pancreáticos de ratas control (40X) (A) y diabéticas (B), teñidos con eosina-hematoxilina.

En la figura 28 B se muestra el daño generado al páncreas con la DM2 y se observa una atrofia de islotes de moderada a severa.

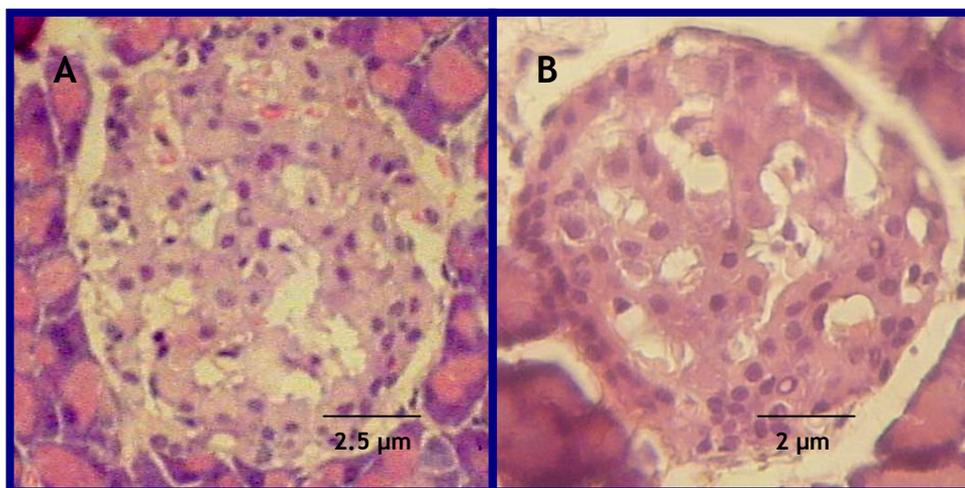


Fig. 29. Islotes pancreáticos de ratas diabéticas con o sin suplemento de ácidos grasos ω -3, teñidos con eosina-hematoxilina (40X). A) Islote de grupo con DM2 sin suplemento. B) Islote de grupo con DM2 y suplemento de ácidos grasos ω -3.

Al igual que el grupo de ratas diabéticas el grupo con DM2 y suplemento de ω -3 presentó una atrofia de islotes de moderada a severa (Fig. 29A). Estos datos muestran que el

suplemento de ácidos grasos omega-3 en la dieta no conservó la morfología del páncreas, muy probablemente la atrofia observada para este grupo se debe a la STZ, así como a la glucotoxicidad y lipotoxicidad generadas durante la lactancia.

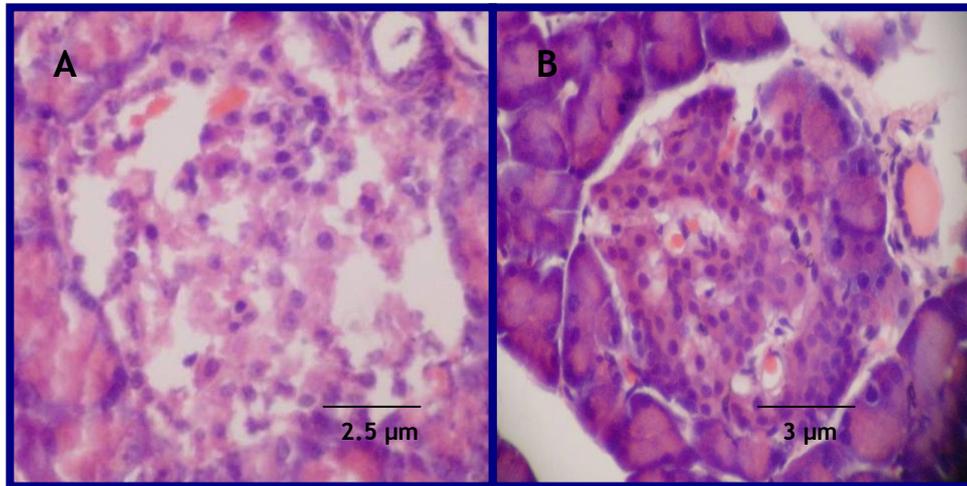


Fig. 30. Islotes pancreáticos de ratas diabéticas con DHC con o sin suplemento de ácidos grasos ω -3, teñidos con eosina-hematoxilina (40X). **A)** Islote de grupo con DM2 y DHC. **B)** Islote de grupo con DM2, DHC y suplemento de ω -3.

En la figura 30 se muestra el islote de ratas diabéticas con DHC en donde existe una necrosis severa. El daño en este grupo es aún mayor que en ratas diabéticas con dieta normal (Fig. 29 A), lo que indica que la DHC es capaz de agravar el daño generado por la DM2. Por su parte, el suplemento de ω -3 contrarrestó el daño provocado por la DHC en la diabetes, pues en este grupo se presentó solo una degeneración albuminosa leve (Fig. 30 B).

6.6.2. Ácido Linoléico Conjugado

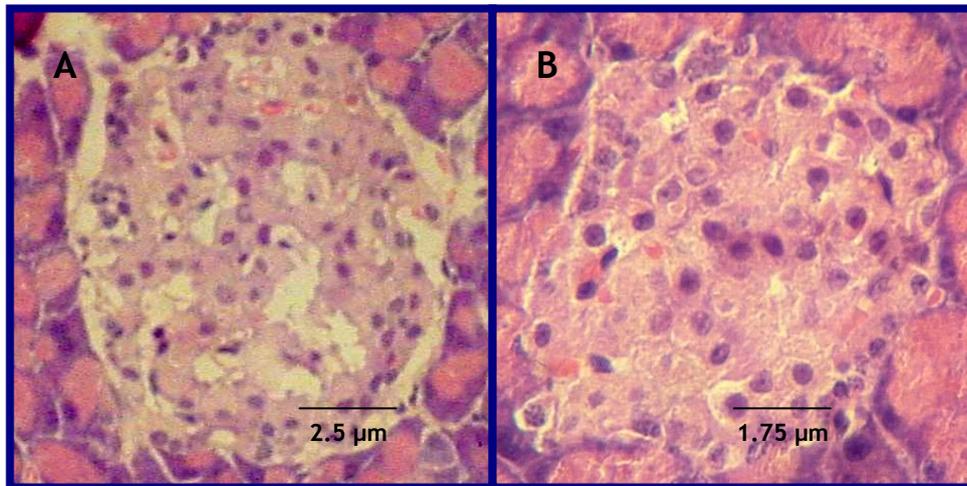


Fig. 31. Islotes pancreáticos de ratas diabéticas con o sin suplemento de CLA, teñidos con eosina-hematoxilina (40X). **A)** Islote de grupo con DM2. **B)** Islote de grupo con DM2 y suplemento de CLA.

En esta figura se muestra el islote de ratas diabéticas con suplemento de CLA, en donde se observó que dicho ácido graso fue capaz de proteger al páncreas del daño generado por la gluco y lipotoxicidad, pues no se encontraron cambios patológicos en los islotes de este grupo.

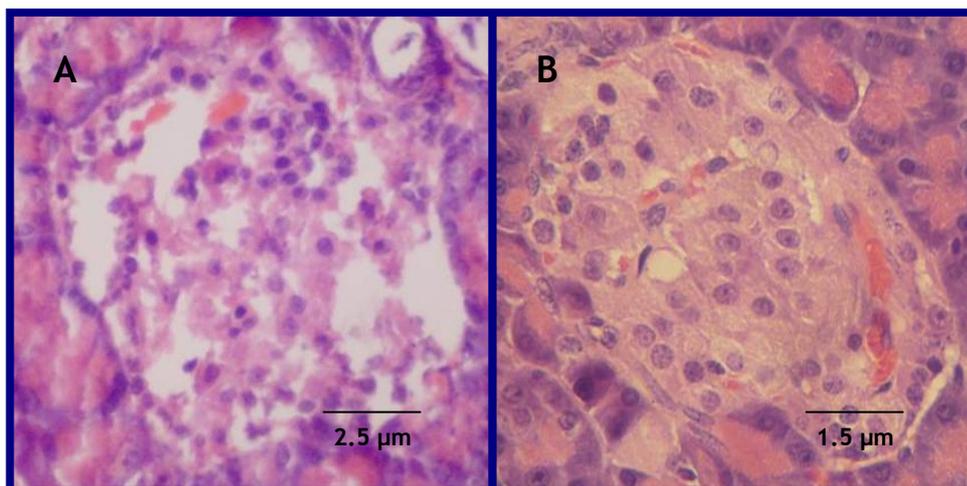


Fig. 32. Islotes pancreáticos de ratas diabéticas con DHC, con o sin suplemento de CLA, teñidos con eosina-hematoxilina (40X). **A)** Islote de grupo con DM2 y DHC. **B)** Islote de grupo con DM2, DHC y suplemento de CLA.

Los datos en la figura 32 apuntan a que la DHC es capaz de agravar el daño generado en la DM pues el páncreas del grupo con DM2 y DHC mostró necrosis severa. Por su parte, el suplemento de CLA en ratas diabéticas alimentadas con DHC (Fig. B) contrarrestó el daño provocado por dicha dieta en la DM2, pues el páncreas del grupo suplementado no mostró cambios patológicos.

6.7. INMUNOHISTOQUÍMICA

6.7.1. Ácidos grasos ω -3

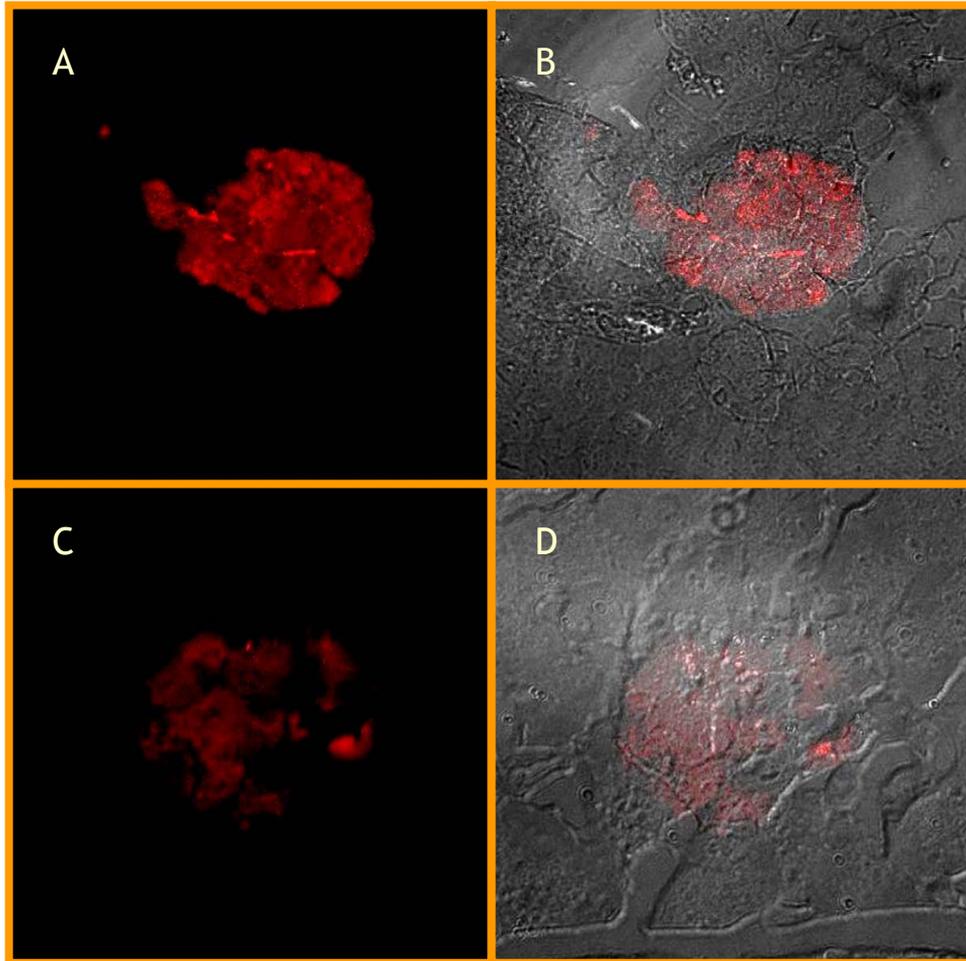


Fig. 33. Islotes pancreáticos de ratas control y diabéticas teñidos con anticuerpos contra insulina acoplados a TRITC. **A)** Islote de grupo control. **B)** Nomarsky de grupo control. **C)** Islote de grupo con DM2. **D)** Nomarsky de grupo con DM2.

En la figura 33 (C y D), se muestra que hubo éxito en la generación del modelo de DM2, pues se observa en este grupo la presencia de insulina, aunque en menores cantidades que en el grupo control. También se muestran espacios oscuros en estos islotes, lo que refleja la atrofia de algunas células β , producto de la STZ y del daño generado por la glucotoxicidad y lipotoxicidad característico de la DM2. Asimismo, la intensidad de fluorescencia es menor en este grupo, lo que indica que las células β que

continúan funcionales, probablemente son incapaces de satisfacer la demanda de insulina del organismo.

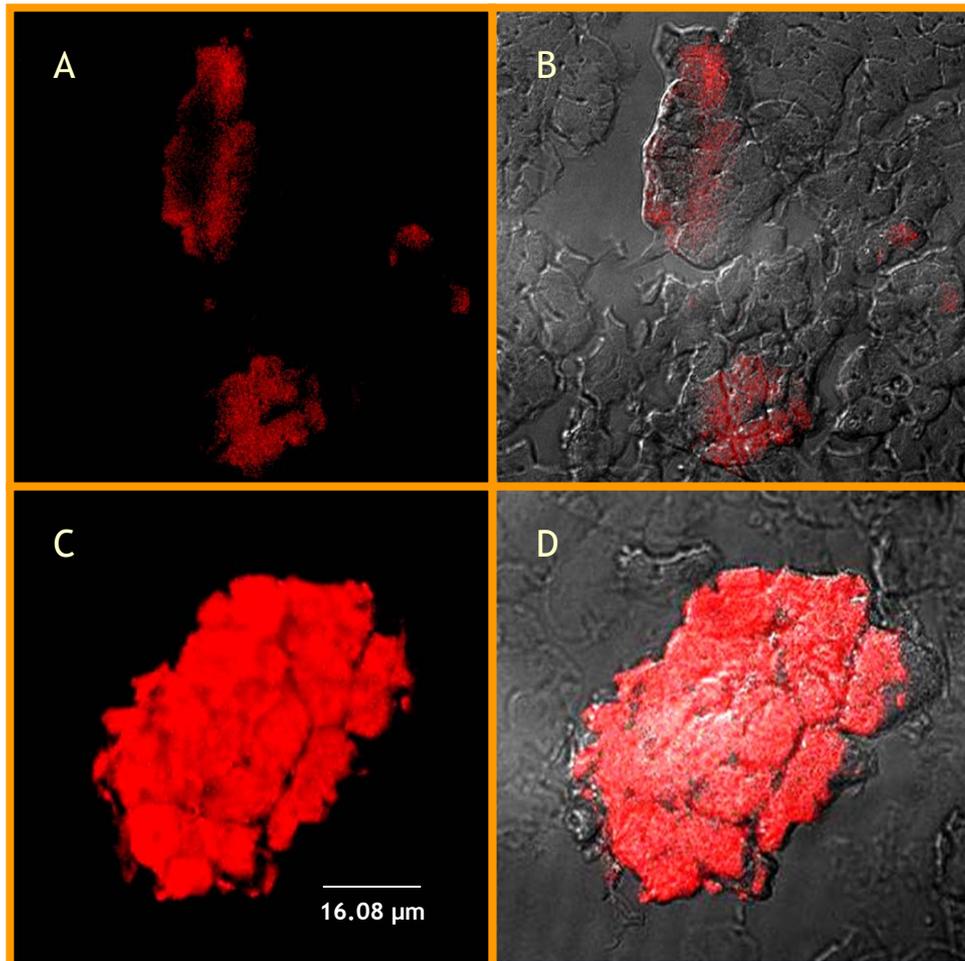


Fig. 34. Islotes pancreáticos de ratas control y diabéticas con suplemento de ácidos grasos ω -3 teñidos con anticuerpos contra insulina acoplado a TRITC. **A)** Islote de grupo con DM2 y ácidos grasos ω -3. **B)** Nomarsky de grupo con DM2 y ácidos grasos ω -3. **C)** Islote de grupo control con ácidos grasos ω -3. **D)** Nomarsky de grupo control con ácidos grasos ω -3.

Los datos de la fig. 34 (A y B) muestran que en ratas diabéticas con suplemento de ácidos grasos ω -3 hay un mayor contenido de insulina, pues la intensidad de fluorescencia es mayor que en ratas diabéticas sin suplemento (Fig. 33). Aun cuando se observan espacios oscuros como en el caso de ratas diabéticas, estos ácidos grasos estimulan a las células B restantes a incrementar el contenido de insulina lo que eventualmente conduce al control de la glicemia. En ratas control con suplemento de ω -3 (Fig. 34 C y D), se observa igualmente una mayor cantidad de insulina con respecto al grupo control, lo que indica que aún en ratas normoglicémicas, estos ácidos grasos promueven una mayor síntesis o acumulación de esta hormona. En este caso, el efecto

de los ácidos grasos omega-3 podría llegar a ser nocivo en individuos normoglicémicos, pues la hiperinsulinemia es un paso que antecede a la resistencia a insulina.

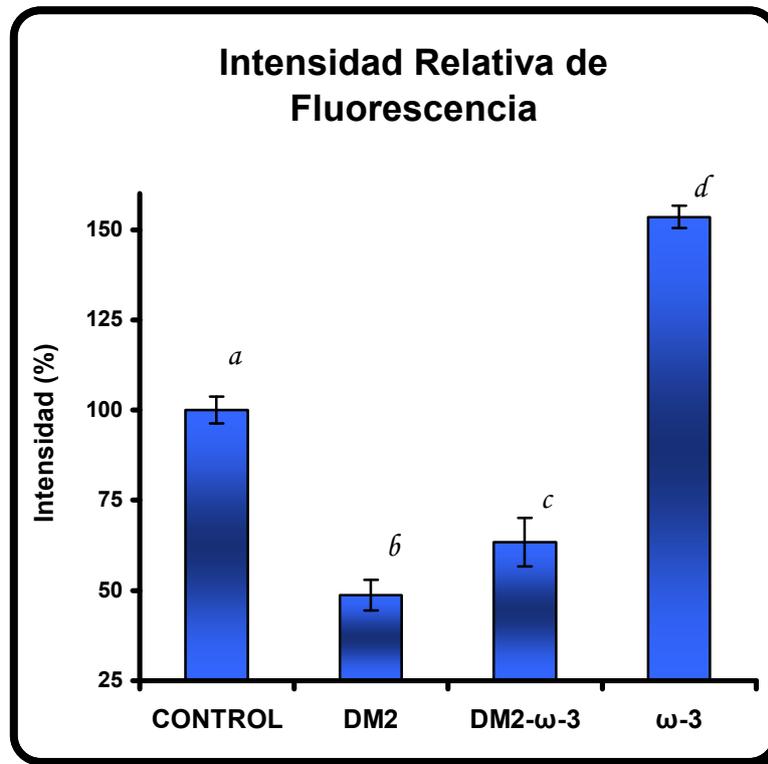


Fig. 35. Intensidad relativa de fluorescencia de islotes pancreáticos. Inmunohistoquímica con anticuerpos contra insulina acoplados a TRITC. ($P < 0.05$).

En la figura 35 se muestran las intensidades relativas de fluorescencia (IRF) del grupo control y diabéticos, con o sin suplemento de ácidos grasos ω -3. La IRF es proporcional al contenido de insulina y se obtuvo a partir de la máxima intensidad de fluorescencia. Como se puede observar, en este modelo de DM2 se provocó una disminución en el contenido de insulina de hasta un 52% con respecto al control. Al parecer, los ácidos grasos ω -3 favorecieron el incremento en el contenido de insulina en células β -pancreáticas de ratas inducidas a diabetes con STZ, observándose sólo una pérdida del 37%, mientras que ratas diabéticas sin suplemento perdieron hasta un 52%. En forma similar, se observa que en ratas normoglicémicas, los ácidos grasos ω -3 inducen a un incremento en el contenido de insulina de hasta un 54% más que el control. En general, estos ácidos grasos favorecieron el incremento de insulina de ratas diabéticas y normoglicémicas.

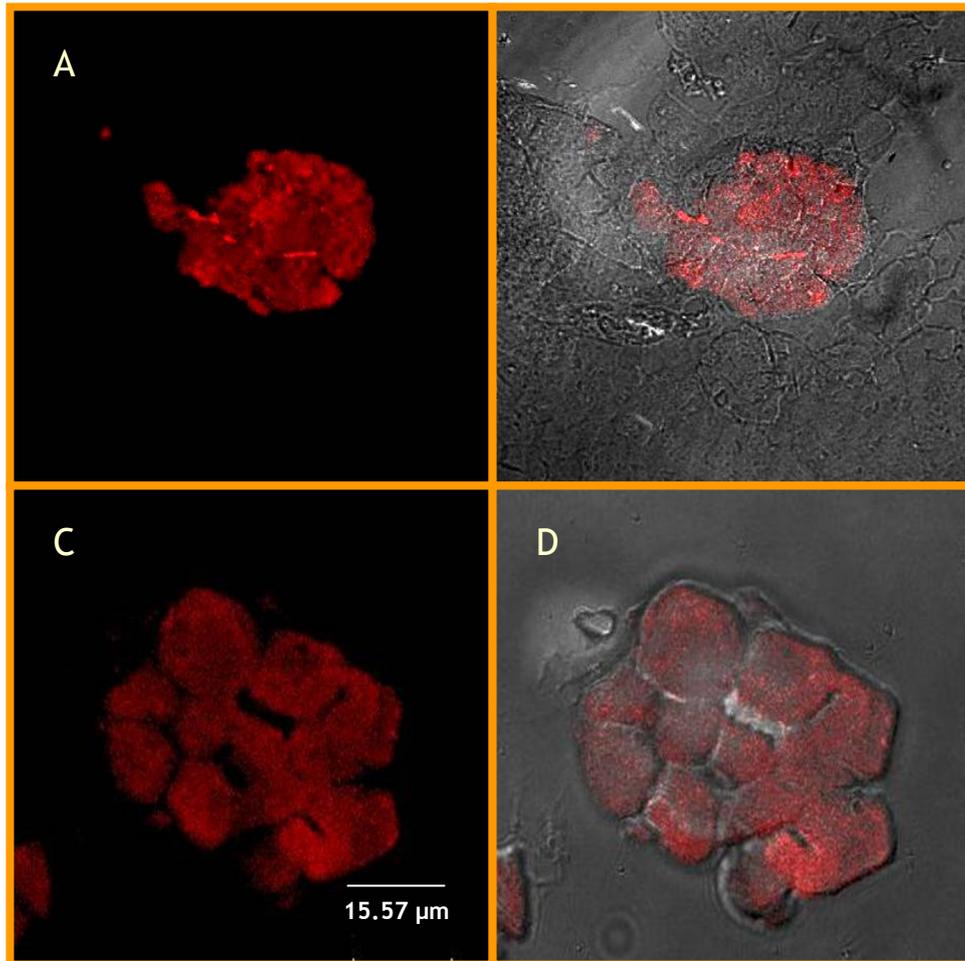


Fig. 36. Islotes pancreáticos de ratas control con y sin DHC teñidos con anticuerpos contra insulina acoplados a TRITC. **A)** Islote de grupo control. **B)** Nomarsky de grupo control. **C)** Islote de grupo control con DHC. **D)** Nomarsky de grupo control con DHC.

En la figura 36, aún cuando el páncreas de ratas con DHC muestra una aparente mayor intensidad de fluorescencia, realmente no hay diferencias entre los grupos.

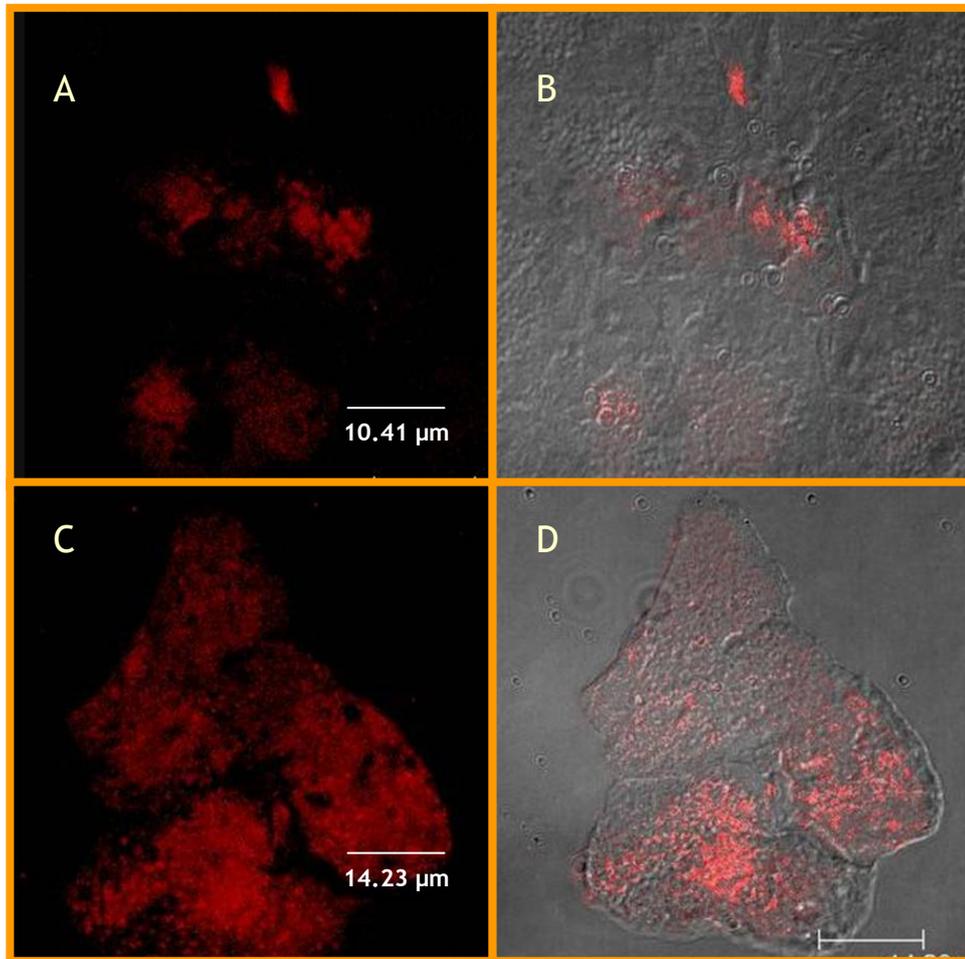


Fig. 37. Islotes pancreáticos de ratas diabéticas con DHC con o sin suplemento de ácidos grasos ω -3 teñidos con anticuerpos contra insulina acoplados a TRITC. **A)** Islote de grupo con DM2 y DHC. **B)** Nomarsky de grupo con DM2 y DHC. **C)** Islote de grupo con DM2, DHC y ω -3. **D)** Nomarsky de grupo con DM2, DHC y ω -3.

En la figura 37 (A y B), se observa que el islote de ratas diabéticas con DHC muestra grandes espacios oscuros, lo que concuerda con la histología en donde se presenta necrosis severa de este tejido (Fig. 30 A). Los espacios oscuros representan a las células no funcionales ya que no producen insulina. En ratas diabéticas con dieta normal (Fig. 33 C y D), aún cuando la producción de insulina es menor, hay un mayor número de células B trabajando, ya que no se observan espacios oscuros tan grandes como cuando hay una dieta hipercalórica. Por el contrario, en presencia de DHC, las células B son capaces de producir una mayor cantidad de insulina (Fig. 38) aunque el número de estas es menor. Por su parte, los ácidos grasos ω -3 en la DM2 aún con DHC son capaces de promover el incremento de insulina, sobrepasando incluso los niveles normales (Fig. 38).

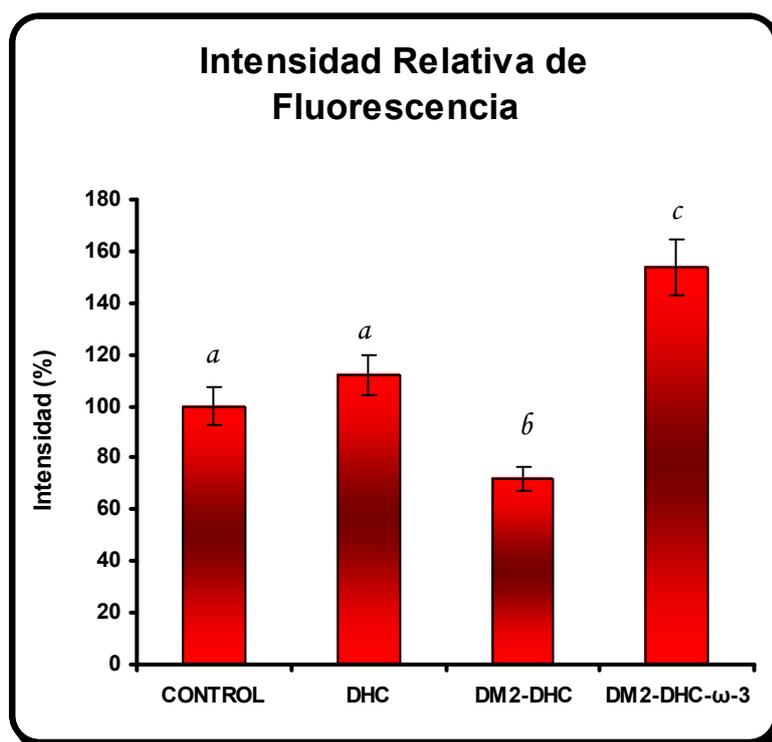


Fig. 38. Intensidad relativa de fluorescencia de islotes pancreáticos de grupos con DHC. Inmunohistoquímica con anticuerpos contra insulina acoplados a TRITC. ($P < 0.05$).

Los datos de la figura 38 muestran que la DHC en la DM2 disminuye el contenido de insulina en un 30%. La disminución no es tan marcada como en el grupo de ratas diabéticas con dieta normal (Fig. 35), quizás porque la DHC influye de alguna manera promoviendo la acumulación de insulina. Finalmente, en el grupo de ratas diabéticas con DHC y ácidos grasos ω -3 se observa un incremento en el contenido de insulina de un 53% con respecto al control.

6.7.2. Ácido Linoléico Conjugado

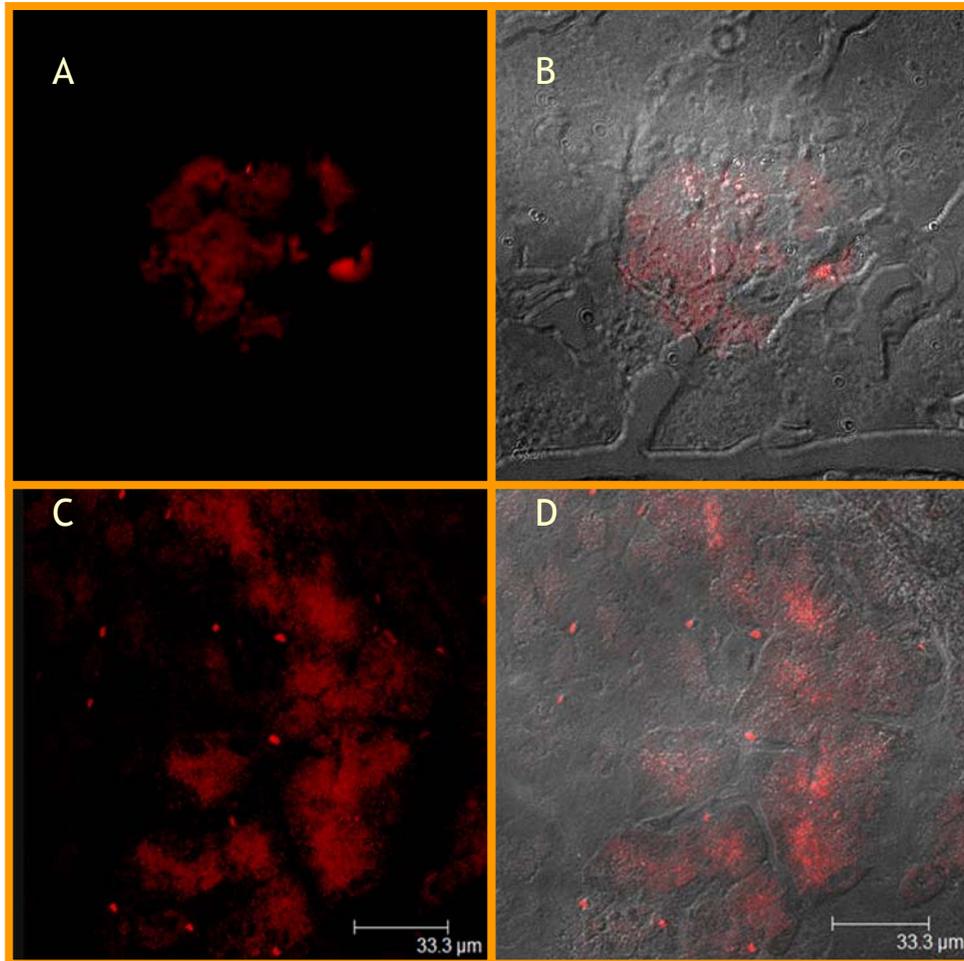


Fig. 39. Islotes pancreáticos de ratas diabéticas con o sin suplemento de CLA, teñidos con anticuerpos contra insulina acoplados a TRITC. **A)** Islote de grupo de ratas diabéticas. **B)** Nomarsky de ratas diabéticas. **C)** Islote de grupo de ratas diabéticas con suplemento de CLA. **D)** Nomarsky de grupo de ratas diabéticas con suplemento de CLA.

Los datos de la figura 39 apuntan a que el CLA es capaz de promover el incremento de insulina. Aun cuando hay espacios oscuros en los páncreas de este grupo, las células B restantes, no sólo son funcionales, sino que producen una mayor cantidad de insulina. No obstante, los datos de glicemia en este grupo muestran que no hubo control de la misma (Fig. 14).

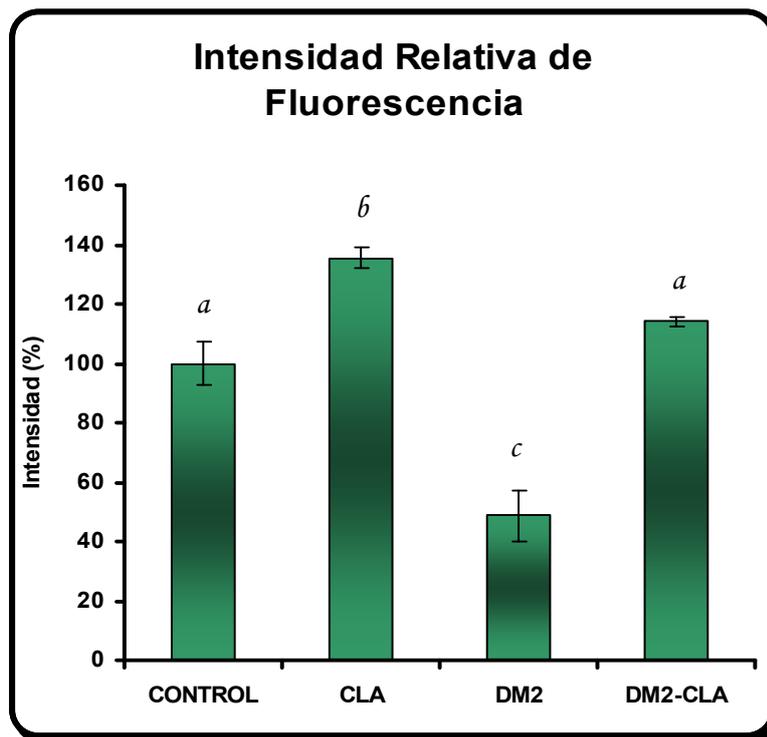


Fig. 40. Intensidad relativa de fluorescencia de islotes pancreáticos de grupos con CLA. Inmunohistoquímica con anticuerpos contra insulina acoplados a TRITC. ($P < 0.05$).

En la figura 40 se muestra que el CLA promueve el incremento de insulina de animales diabéticos y sanos. El incremento en ratas normales es 35% mayor con respecto al control. En ratas diabéticas con CLA, el incremento es 14% mayor que el control y aproximadamente 120% mayor que en ratas diabéticas. Sin embargo, la glicemia de ratas diabéticas con CLA es descontrolada al igual que el grupo con DM2 sin suplemento (Fig. 14). Al parecer, la inducción en la síntesis de insulina por el CLA, no es condición suficiente para disminuir la hiperglicemia, probablemente participan otras condiciones para el control de la misma.

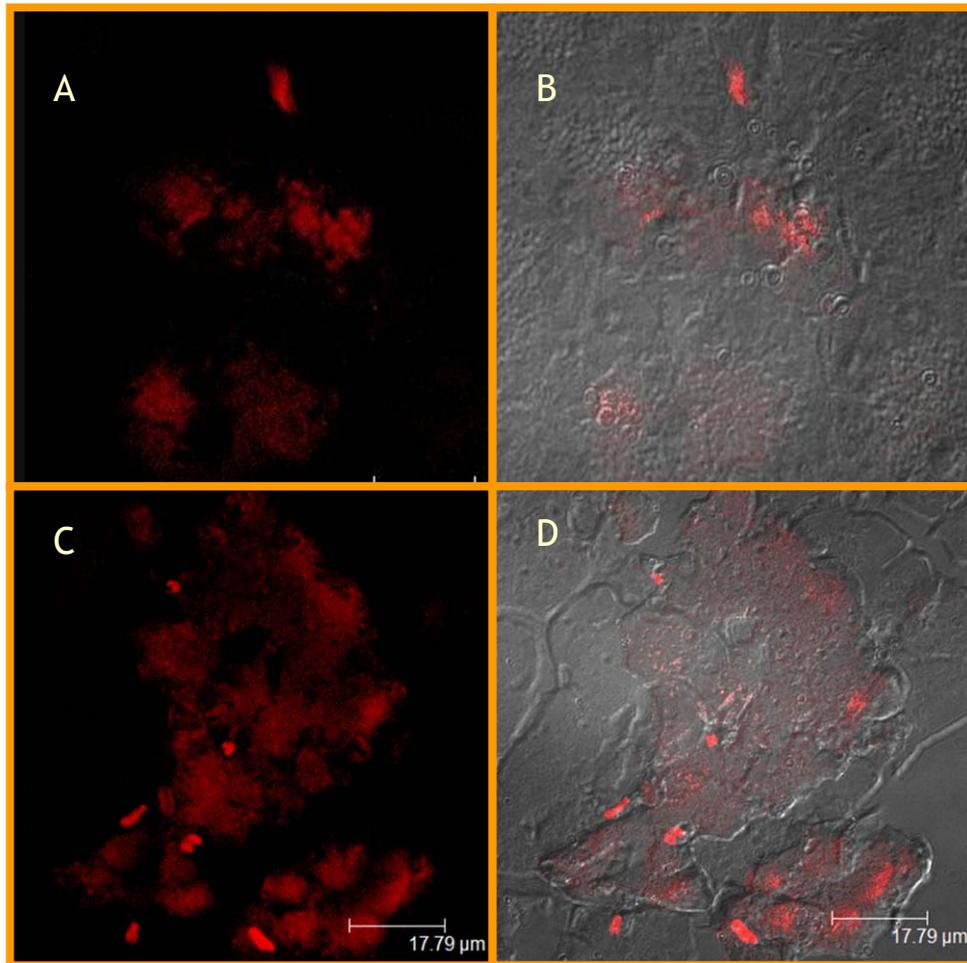


Fig. 41. Islotes pancreáticos de ratas diabéticas con DHC con o sin suplemento de CLA, teñidos con anticuerpos contra insulina acoplados a TRITC. **A)** Islote de grupo de ratas diabéticas con DHC. **B)** Nomarsky de grupo de ratas diabéticas con DHC. **C)** Islote de grupo de ratas diabéticas con DHC y suplemento de CLA. **D)** Nomarsky de grupo de ratas diabéticas con DHC y suplemento de CLA.

En la figura 41 se observa que el páncreas de ratas diabéticas con DHC y suplemento de CLA (C y D) no presenta tantos espacios oscuros como aquellos animales con DHC sin suplemento (A y B). Esto significa que el CLA protegió al páncreas de los daños generados por la glucotoxicidad y lipotoxicidad en la DM2. Asimismo, en la Fig. 37 (C y D) se observa una mayor intensidad de fluorescencia, lo que sugiere un incremento de insulina estimulado por el CLA.

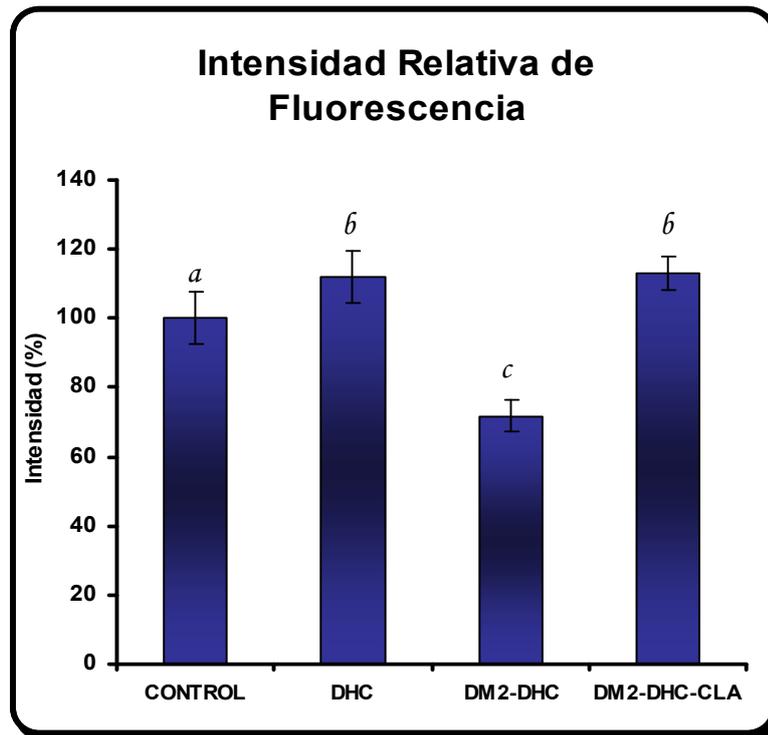


Fig. 42. Intensidad relativa de fluorescencia de islotes pancreáticos de grupos con DM2, DHC y CLA. Inmunohistoquímica con anticuerpos contra insulina acoplados a TRITC. ($P < 0.05$).

En la figura 42 se observa que el comportamiento del CLA es similar a los grupos con dieta normal (Fig. 40). En ratas diabéticas con DHC, este suplemento contribuye a un incremento en el contenido de insulina hasta alcanzar niveles normales.

7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

7.1. GLUCOSA

La inyección intraperitoneal de STZ (100 mg/kg) en neonatos al segundo día de nacimiento, generó con éxito un modelo de DM2. Como se puede observar en la figura 9 A, los niveles de glucosa en ratas diabéticas oscilaron entre 150 y 350 mg/dl, aunque esporádicamente se observaron niveles de 100 mg/dl. Esto último demuestra que existió un completo descontrol de la glicemia característico de la DM2. El comportamiento promedio de los datos es un reflejo de la glicemia de cada rata. De hecho, consideramos que las desviaciones tan altas, más que un error en los tratamientos o la selección de las poblaciones, es una señal indicativa del desarrollo de la diabetes.

Por otra parte, la DHC mostró al inicio del tratamiento un incremento discreto en los niveles de glucosa (138 mg/dl) y al final de dicho tratamiento mostró niveles promedio de 113 mg/dl. Los valores de glucosa al final del tratamiento oscilaron entre 93 y 133 mg/dl y no hay diferencia estadísticamente significativa con respecto al control, sin embargo, la tendencia de este grupo es a mantener valores ligeramente por encima de lo normal.

7.1.1. Ácidos Grasos ω -3

Los niveles de glucosa en ratas diabéticas con ω -3 fueron estadísticamente iguales al control (Fig.10 B), lo que indica que estos ácidos grasos fueron capaces de mantener estables dichos niveles a lo largo del tratamiento. Además, en este grupo se observan desviaciones muy pequeñas, lo que comprueba un buen control de la glicemia. En las ratas diabéticas sin suplemento alguno, por el contrario, se muestra una evidente hiperglicemia, además de desviaciones estándar muy grandes, lo que demuestra descontrol en los niveles de glucosa sanguínea característico de la DM2. Pese a que en animales diabéticos con suplemento de omega se observó una atrofia de islotes (Fig 29), la glicemia se mantuvo controlada, mientras que en ratas diabéticas además de la atrofia de islotes se observó un descontrol de la glicemia.

Los fenómenos observados para el grupo DM2 podrían explicarse de la siguiente manera: La STZ entra específicamente a las células pancreáticas a través de GLUT 2, y al metabolizarse dentro de la célula forma óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno las cuales son responsables de la fragmentación del DNA y la posterior destrucción de las células β (Szkudelski, 2001). Los neonatos son capaces de regenerar sólo parcialmente estas células pancreáticas y como consecuencia la secreción de insulina no es suficiente para satisfacer la demanda, generándose hiperglicemia. En las ratas que no fueron tratadas con ω -3 (Grupo DM2) los niveles de glicemia eventualmente aumentaron, esta hiperglicemia crónica provocó a su vez glucotoxicidad. Esto es, el ambiente crónico con niveles moderados o altos de glucosa promueve la unión de ésta a los amino terminales de las proteínas, fenómeno llamado glicación, esta unión química cambia la estructura de las moléculas alterando sus funciones, como la de los transportadores de glucosa, lo que lleva a una menor captación de este carbohidrato en los tejidos periféricos (Durruty y García de los Ríos, 2001). A su vez, la insuficiencia de insulina provoca en células musculares y adipocitos la disminución de GLUT 4, el cual se encuentra secuestrado intracelularmente en vesículas, pues es dependiente de la señal de insulina para migrar a la membrana plasmática (Cruz et al. 2001). Como consecuencia, cada vez es mayor la necesidad intracelular de moléculas energéticas, así que hay mayor gluconeogénesis y comienzan a elevarse los niveles de lípidos en suero, contribuyendo a la lipotoxicidad. Durruty y García de los Ríos (2001) reportan que los ácidos grasos no esterificados ó ácidos grasos libres, formados a partir de una lipólisis exacerbada, funcionan como radicales libres y se unen a los transportadores GLUT lo que provoca la disminución de su actividad. Además, estos lípidos al precipitarse bloquean los receptores de insulina.

Se ha reportado que en las células β pancreáticas, la lipotoxicidad provoca un aumento en la concentración de calcio intracelular y este aumento estimula a una mayor secreción de insulina (Zhang, 2005). Es probable que por esta razón, esporádicamente se observen niveles “normales” de glucosa en ratas con DM2 (alrededor de 100 mg/dl). Sin embargo, el aumento del calcio intracelular también se encuentra relacionado con un daño de las células β . Aunque al inicio este fenómeno incrementa la secreción de insulina, eventualmente provoca una pobre respuesta por parte de las células β a la acción de esta hormona, lo que conduce al mal funcionamiento de dichas células (Zhang, 2005).

En el grupo con DM2, la atrofia de islotes y a su vez el mal funcionamiento de las células β reflejado como hiperglicemia, son principalmente originados en respuesta al daño generado por la glucotoxicidad, lipotoxicidad y formación de radicales libres derivados que muy probablemente se generaron en este modelo de diabetes (Poitout y Robertson, 2007).

En el grupo de ratas diabéticas con suplemento de ω -3 se observó también una atrofia de islotes que eventualmente se generó durante el periodo de lactancia como resultado de la STZ, la glucotoxicidad y la lipotoxicidad, sin embargo, a partir del destete se comenzaron a administrar dichos ácidos grasos que al parecer mejoraron la funcionalidad de los islotes; esto último se vio reflejado con el control de la glicemia y con un mayor contenido de insulina en células β pancreáticas (Fig 35). El efecto de estos ácidos grasos se explica a través de los factores de transcripción PPARs. Los PPARs (Por sus siglas en inglés: proliferator peroxisome activator receptor) son receptores nucleares que pertenecen a la familia de factores de transcripción involucrados en la regulación de la homeostasis de los lípidos. Los PPARs presentan 3 isoformas (α , δ y γ) y se activan por concentraciones micromolares de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), por eicosanoides derivados del ácido araquidónico y también por medicamentos hipolipemiantes, como los fibratos y proliferadores de peroxisomas. Los PUFAs se unen con mayor afinidad a PPAR α . El PPAR α activado se une a elementos de respuesta llamados PPRE que se encuentran en genes involucrados en el transporte y oxidación de lípidos, además de la termogénesis. Los PUFAs ω -3 son más potentes que los PUFAs ω -6 como activadores de PPAR *in vivo*. Los metabolitos de los PUFAs como los eicosanoides o ácidos grasos oxidados son los más potentes activadores de PPAR debido probablemente a su elevada insaturación (Rodríguez-Cruz et al, 2005).

Tanto PPAR α como PPAR γ se expresan en el páncreas, aunque se ha encontrado que PPAR γ se localiza en células de tejido endocrino, por lo que se ha relacionado con secreción; particularmente se localiza en las células β pancreáticas donde es funcionalmente importante. La cantidad de PPAR α suele ser mayor que la de PPAR γ , sin embargo éste último se sobreexpresa en ratas ZDF (Obese Zucker Diabetic Fatty Rats), así como en ratas con diabetes inducida químicamente (Laybutt et al, 2002; Lupi et al, 2004). Se sabe que la troglitazona mejora la secreción de insulina en ratas ZDF, y se ha

encontrado que este medicamento funciona como ligando de PPAR γ . Asimismo, existen otros ligandos de este factor de transcripción como son las prostaglandinas y los PUFAs, particularmente los ω -3, que en la DM2 podrían estar estimulando la síntesis de insulina (Laybutt et al, 2002). Aunque el papel de PPAR γ no es muy conocido, se ha encontrado que retarda y detiene el desarrollo de la DM en modelos de ratón (Bergeron et al, 2006). Asimismo, la activación de ambos PPAR α y PPAR γ , se ha asociado con disminución del contenido de lípidos en hígado y músculo, además de disminuir la resistencia a insulina en la DM2 (Bergeron et al, 2006). Específicamente, se ha reportado que el tratamiento con rosiglitazona (ligando de PPAR γ) en ratas ZDF previno del desarrollo de la hiperglicemia. Las ratas tratadas con este ligando mostraron un alto contenido de insulina en páncreas y se conservó la morfología de dicho tejido.

Por otro lado, en ratones diabéticos, el tratamiento crónico con pioglitazona llevó a un incremento en el número de células β pancreáticas así como secreción de insulina (Bergeron et al, 2006). El mecanismo de acción de los PPARs en la DM se desconoce, sin embargo, una hipótesis postula que estimulan la secreción de insulina, aunque también se ha sugerido que a través de estos factores de transcripción se incrementa el número las células β pancreáticas (Bergeron, 2006).

En un estudio (Xu et al., 2006) se encontró que en células β la activación de PPAR γ depende del ligando. Una vez activado, regula la expresión de los genes GLUT2 Y CAP (Cb1-associated protein). Por lo que sugieren que PPAR γ induce la secreción de insulina por medio de la activación de la expresión de los genes GLUT2 y CAP (Xu et al., 2006). Por otro lado, se ha identificado el elemento de respuesta a PPAR, PPRE en la region +68/+89 del gen GLUT 2 en ratas. Cuando las ratas fueron tratadas con troglitazona (ligando de PPAR γ) la actividad del promotor del gen GLUT 2 y la transcripción de GLUT 2 incrementaron. Estos datos sugieren que GLUT2-PPRE es funcional y juega un papel significativo en la expresión genética de GLUT 2 en células β -pancreáticas. En este estudio, se identifica a PPRE en un gen involucrado en la homeostasis de la glucosa, ligado al efecto de troglitazona en la regulación de la secreción de insulina (Kim Hi, 2000). El efecto que los ácidos grasos ω -3 tienen sobre la DM2, probablemente es similar al efecto de la troglitazona y otros ligandos de PPAR γ . A través de este factor de transcripción los ω -3 lograron compensar la demanda de insulina

con una mayor síntesis y secreción. De esta manera se evitó la hiperglicemia crónica que a largo plazo provoca glucotoxicidad, lipotoxicidad y disfunción de las células β del páncreas.

En ratas diabéticas con DHC y ω -3 (Fig. 11 B) se observa control de la glicemia al final del tratamiento (82mg/dl) mostrándose significativamente menor al grupo de ratas diabéticas con DHC (150mg/dl). Durante casi todo el tratamiento (Fig. 11 A) se observa que el grupo de ratas diabéticas con DHC (DM2-DHC) muestra un aparente control de la hiperglicemia pues los niveles no son tan elevados como el de las ratas diabéticas con dieta normal (Grupo DM2), sin embargo, en la histología del páncreas se observó una necrosis severa y atrofia de islotes severa (Fig 30).

Éste fenómeno se explica de la siguiente manera: La Km de GLUT2 es de 17mM, lo cual significa que la glucosa contenida en el agua de beber (sacarosa al 10%) proporciona las cantidades del sustrato necesarias para activar a este receptor. Las concentraciones de glucosa y fructosa son aproximadamente de 280 mM de cada una, así que incluso considerando una dilución en el torrente sanguíneo de la rata, las concentraciones aún serían lo suficientemente grandes para estimular a los GLUT2 del páncreas y de esta manera estimular la secreción de insulina. Probablemente las concentraciones de glucosa y fructosa incluidas en la DHC fueron lo suficientemente altas como para activar a GLUT 2, como resultado, se observó una mayor secreción de insulina, aunque las grandes cantidades de glucosa que ingresan a las células β puede que las haya intoxicado.

Por otro lado, la DHC probablemente incrementó los ácidos grasos libres (FFA), los cuales, estimulan la secreción de insulina por medio de factores de transcripción. Particularmente inducen la expresión del gen de preproinsulina (PPI) y GLUT 2, lo cual contribuye al aumento en la secreción de insulina. Sin embargo, como incrementa la concentración de esta hormona aún en estado basal, los receptores de insulina pierden su sensibilidad. Algunos receptores de insulina como el IR-A y el IR-B al activarse inician una cascada de estímulo-secreción-transcripción y promueven la transcripción del gen de la PPI y del gen de la glucocinasa. En presencia de grandes cantidades de insulina en estado basal estos receptores dejan de sintetizarse para controlar la hiperinsulinemia, lo

que da como resultado disminución de la glucocinasa, resistencia a insulina y déficit en la secreción de esta hormona en presencia de un estímulo (Zhang, 2005). Todo ello trae como consecuencia que con el tiempo, las células β no sean capaces de satisfacer la demanda de insulina ante el estímulo de glucosa. Además, se ha probado que los FFA incrementan la concentración de calcio intracelular que como se mencionó anteriormente contribuye al deterioro en el funcionamiento de las células β .

La necrosis y atrofia de islotes observadas para el grupo DM2-DHC, quizás se deba principalmente a la lipotoxicidad y a un proceso de desensibilización de las células β como consecuencia de la elevada producción de insulina y las grandes cantidades de glucosa que ingresan y estimulan a estas células. Al final del tratamiento (Fig. 11 B) se observa que los niveles de glucosa comienzan a elevarse; con base en los resultados de la histología del páncreas (Fig. 30) se esperaría que en cualquier momento los niveles de glucosa incrementaran y la hiperglicemia fuese incluso más severa que la del grupo DM2, provocando una DM más grave que la del grupo de ratas diabéticas sin DHC.

Con respecto a la desviación estándar, se observa un patrón similar entre los grupos DM2-DHC y DM2, lo que indica que hay un descontrol de la glicemia, mientras que en el grupo de ratas diabéticas con DHC y ω -3 se observa una desviación menor lo que significaría un mejor control. Probablemente al igual que para el grupo DM2- ω -3 estos ácidos grasos, a través de factores de transcripción, estimularon la secreción de insulina y ayudaron a controlar la hiperglicemia, disminuyendo así problemas derivados de la glucotoxicidad. Tanto la DHC como los omega-3 disminuyeron aparentemente la glicemia, sin embargo, la DHC promueve la secreción de insulina, en tanto que los omega-3 promueven la síntesis de insulina, lo cual da como resultado que cada vez que exista estimulación de células β , en el grupo con suplemento habrá insulina suficiente para incorporar glucosa a las células del cuerpo, en tanto que en el grupo sin suplemento habrá quizás el mismo número de secreciones, pero la cantidad de insulina será menor.

Para probar si los ácidos grasos omega 3 tienen efectos correctivos y no sólo preventivos, al mes del destete (Fig. 12) un grupo de ratas diabéticas se dividió a la mitad, a unas ratas se les administró el suplemento de ω -3 (DM2- ω -3) mientras otras no

tuvieron suplemento alguno (DM2). En el grupo DM2- ω -3 se observa un evidente control de la glicemia durante todo el tratamiento, aún cuando las desviaciones son altas, los valores promedio se mantienen significativamente menores a los de su contraparte de ratas diabéticas. Al parecer estos ácidos grasos no sólo controlan o previenen el desarrollo de la hiperglicemia, sino que también la revierten, ya que se observa una disminución en los niveles de glucosa en cuanto se administra el suplemento de dichos ácidos grasos. Al disminuir inmediatamente la hiperglicemia, los ω -3 protegieron indirectamente al páncreas del daño provocado por la glucotoxicidad y lipotoxicidad, además se ha reportado que estos ácidos grasos protegen del daño generado por el aumento de radicales libres producidos durante la DM (Rodríguez-Cruz et al, 2005). El suplemento de omega en este grupo de ratas diabéticas contribuyó a aumentar la funcionalidad de las células β logrando así satisfacer la demanda de insulina lo que finalmente conlleva a un control de la glicemia.

7.1.2. Ácido Linoléico Conjugado

Como se puede observar en la figura 14, el CLA no mostró efecto sobre los niveles de glucosa de ratas diabéticas, ya que se presentó el mismo descontrol de la glicemia que el observado para el grupo de ratas diabéticas sin este suplemento. Se ha propuesto que este ácido graso funciona como ligando de PPAR- γ y a través de este factor de transcripción disminuye la resistencia a insulina además de reducir los niveles de lípidos en plasma, sin embargo, este efecto antidiabético depende del isómero de CLA que se esté utilizando. Existen alrededor de seis isómeros de CLA de acuerdo a la posición de las insaturaciones (isómeros posicionales) y/o a la conformación cis o trans (isómeros conformacionales). Los isómeros más comunes son el *cis*-9,*trans*-11 y *trans*-10,*cis*-12. Por ejemplo, las cápsulas comerciales contienen una mezcla con 40% de cada isómero aunque existen otros productos que en su mayoría contienen *cis*-9,*trans*-11 (73-93%) (Taylor y Zahradka, 2004).

En un estudio se encontró que al utilizar una mezcla de CLA en una proporción de 50:50 de cada isómero (CLA 50:50) sobre ratas Zucker Diabéticas (ZDF) durante 14 días, se revertía la intolerancia a la glucosa, se atenuaba la hiperinsulinemia y se disminuía la cantidad de ácidos grasos libres (Houseknecht et al, 1998). Estos efectos antidiabéticos se han observado con la mezcla CLA 50:50 sin embargo, el isómero *cis*-9,*trans*-11 por si

solo no provoca el mismo efecto, pues actúa reduciendo los niveles de ácidos grasos libres y triglicéridos en plasma sin manifestar cambios sobre el peso corporal, glucosa e insulina (Roche et al, 2002). Por su parte, el isómero *trans-10,cis-12* por si solo promueve la insulinoresistencia, induce hiperlipidemia y diabetes (Francis et al, 2003).

Los isómeros de CLA actúan como ligandos de diversos factores de transcripción, entre ellos PPAR α y PPAR γ . Algunos estudios han sugerido que la afinidad de CLA por PPAR α es mucho mayor que la afinidad por PPAR γ e incluso que este ácido graso inhibe la expresión de este último receptor. Asimismo, los efectos estimulatorios de PPAR γ que inducen ciertos ligandos como las tiazolidinedionas son inhibidos por el CLA por lo que se sugiere que este ácido graso funciona como antagonista de PPAR γ . Sin embargo, este efecto sólo se ha observado con el isómero *trans-10,cis-12* ya que *cis-9,trans-11* aún cuando se sugiere induce a PPAR α , no tiene el mismo efecto (Taylor y Zahradka, 2004).

El suplemento de CLA que en este trabajo se les administró a ratas diabéticas contenía aproximadamente un 30% del isómero *cis-9,trans-11*, 30% de *trans-10,cis-12* y 30% de *cis-10,cis-12*, según pudimos comprobar por cromatografía de gases. En cuanto a los dos primeros, como se mencionó anteriormente, parecen tener efectos contrarios, mientras *cis-9,trans-11* reduce los niveles de lípidos, *trans-10,cis-12* provoca hiperlipidemia, insulinoresistencia y diabetes (Taylor y Zahradka, 2004). En cuanto al isómero *cis-10,cis-12*, se desconoce el efecto que provoca en la DM. Quizás la competencia entre estos isómeros provocó que no se detectara ningún efecto benéfico en la DM2 por parte del CLA. Por otro lado, *cis-9,trans-11* funciona activando a PPAR α , el cual, tiene efecto sobre el metabolismo de lípidos mientras que PPAR γ parece tener efecto sobre la síntesis de insulina, esto explicaría por qué a diferencia de los ácidos grasos ω -3, el suplemento de CLA no controló los niveles de glucosa en ratas diabéticas. En un estudio Laybutt (2002) observó que la expresión de PPAR γ incrementaba en ratas diabéticas, sin embargo, a medida que incrementaba este factor de transcripción, disminuía PPAR α . Por el contrario, cuando se observaba predominancia de PPAR α , PPAR γ se encontraba disminuido. Quizás la relación entre ambos factores de transcripción es inversa y a medida que uno aumenta, el otro disminuye. Probablemente el suplemento de varios isómeros del CLA incrementó la expresión de PPAR α a costa de la disminución

de PPAR γ , lo que favorecería una hiperglicemia crónica por la falta de insulina y la nula estimulación de PPAR γ para una mayor síntesis de la hormona.

En ratas diabéticas con DHC (Fig. 15) el CLA pareciera tener algún efecto sobre la glicemia, sin embargo, esto no se observa en ausencia de dicha dieta, probablemente el aparente efecto que se está observando es por la DHC y no por el CLA.

7.2. LÍPIDOS

7.2.1. Ácidos Grasos ω -3

La insulina cumple una función central en la regulación del metabolismo del tejido adiposo, en el almacenamiento, la movilización y la utilización de triglicéridos (Flakoll, 2003). El modelo de DM2 aquí trabajado, se caracterizó por una escasa secreción de insulina y como consecuencia, una alteración en el metabolismo de lípidos. Como se muestra en la figura 16 A, en este modelo de DM2 se incrementó el contenido de triglicéridos en suero. Dicho fenómeno quizás se encuentre relacionado con los efectos fisiológicos de la insulina en el metabolismo de lípidos, uno de ellos es promover el almacenamiento de grasa e inhibir el catabolismo de ésta. Cuando las concentraciones de esta hormona en sangre son bajas, la grasa se moviliza de las reservas de tejido adiposo (Flakoll, 2003). La escasa secreción de insulina permite la activación de la lipasa sensible a hormona, esta enzima se encarga de activar la lipólisis, como consecuencia, se observa un aumento en el transporte de los lípidos para su posterior oxidación. El incremento de triglicéridos en este modelo de DM refleja la movilización de los lípidos como consecuencia de los niveles bajos de insulina.

Por otra parte, los ácidos grasos ω -3 también promovieron el transporte de los lípidos, como se observa en esta misma figura (16A). El grupo con dicho suplemento de ácidos grasos mostró niveles elevados de triglicéridos en suero, quizás el mecanismo de acción es diferente pues los niveles de insulina en este grupo son incluso mayores que el control (Fig. 35). Dentro de los factores de transcripción activados por PUFAs, se encuentran los PPARs, los cuales como se explicó anteriormente, están relacionados con la síntesis de insulina, sin embargo, estos receptores nucleares también regulan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos. En general los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) funcionan como ligandos de más de un isotipo de

PPARs, aunque las afinidades difieren (Alemán et al, 2002). Los ácidos grasos ω -3, aún cuando son ligandos por excelencia de PPAR γ , también podrían activar a PPAR α . Este último factor de transcripción regula genes involucrados en el transporte y oxidación de los lípidos, modula la expresión constitutiva de genes que codifican enzimas mitocondriales del catabolismo de ácidos grasos y además, regula la inducción de las enzimas de β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de ácidos grasos (Uauy et al, 2000). El aumento de triglicéridos séricos en ratas con suplemento de ácidos grasos ω -3 podría deberse al transporte de lípidos inducido por medio de la activación de PPAR α .

La dieta hipercalórica en esta misma figura (Fig. 16), muestra una concentración de triglicéridos similar al grupo control, incluso con una ligera tendencia a disminuir dichos niveles con respecto a los valores normales. Este fenómeno se explica de la siguiente manera: Entre los múltiples efectos metabólicos de la insulina, la acción más potente es la supresión de la lipólisis del tejido adiposo. Un aumento de la concentración plasmática de insulina de sólo 5 μ U/ml inhibe la lipólisis en aproximadamente un 50% respecto a los valores basales (Flakoll, 2003). Los animales con DHC mostraron una mayor producción de insulina en páncreas que el grupo control, quizás estas altas concentraciones de insulina inhibieron a la lipasa sensible a hormona que regula el efecto antilipolítico de la insulina. Esto significa que al Inhibir la acción de dicha lipasa se reduce la movilización de los lípidos y como consecuencia de ello la concentración de triglicéridos se muestra similar al control, aunque aumenta la concentración de lípidos en tejidos que son potencialmente peligrosos.

En cuanto a la concentración de colesterol (Fig. 16 B), no se observan diferencias significativas entre los grupos control (Ctrl, DHC, ω -3), sin embargo, la tendencia de este lípido cuando hay DHC es a incrementar, lo cual nos sugiere un efecto potencialmente nocivo por parte de esta dieta.

En este modelo de diabetes, se promueve un incremento en los niveles de triglicéridos (Fig. 17 A). Como se mencionó anteriormente, la escasa secreción de insulina permite la activación de la lipólisis y como consecuencia, se observa un aumento en el transporte de los lípidos para su posterior oxidación. Un mejor control de la diabetes revertiría el defecto en la actividad de la lipasa y reduciría los valores de

triglicéridos en suero (Flakoll, 2003). Así pues, cuando hay suplemento de ω -3 en la DM2 se muestra una disminución en el contenido de triglicéridos, esto se explica por un aumento en la producción de insulina que inhibe la acción de la lipasa promoviendo la lipogénesis. Los niveles de triglicéridos en este grupo nos dan una idea del control de la DM con ácidos grasos ω -3, ya que además de mantener la glicemia en niveles normales, revierten el efecto lipolítico característico de la DM2. Sin embargo, aún cuando la tendencia del grupo de ratas diabéticas con suplemento es a controlar los niveles de triglicéridos, éstos no son estadísticamente iguales al control quizás por la activación minoritaria de $PPAR\alpha$, por medio del cual, se estimula el transporte y oxidación de lípidos.

En general, los grupos con DHC (Fig. 18 A) muestran un contenido de triglicéridos similar al grupo control. Como se explicó anteriormente, una mayor producción de insulina inhibe la lipólisis y esto se refleja en concentraciones normales de triglicéridos. Por su parte, los ácidos grasos ω -3, en conjunto con una DHC en ratas con DM2, promueven un incremento de colesterol sérico (Fig. 18 B). Quizás el colesterol detectado o cuantificado, es resultante de la dieta más que de una mayor movilización derivada del efecto lipolítico de los ácidos grasos omega-3, todo esto a través de la activación de $PPAR\alpha$.

En cuanto al contenido de triglicéridos en hígado, no se encuentra diferencia significativa entre los grupos. El contenido de colesterol en este tejido se muestra mayor en ratas con DM2 (Fig. 23 B) quizás por la disminución de la insulina; se activa el catabolismo de los lípidos, en donde el hígado actúa como principal central metabólica de grasas y debe haber un aumento en los acetyl-CoA disponibles para la biosíntesis de colesterol. Con el suplemento alimenticio de ácidos grasos ω -3 se observa una tendencia a restituir los valores de colesterol en este tejido, ya que de cierta forma reprimen la lipólisis por una mayor producción de insulina.

7.2.2. Ácido Linoléico Conjugado

En ratas normales, el suplemento de CLA muestra una tendencia a incrementar los niveles de triglicéridos en suero (Fig. 19 A); se ha reportado que este ácido graso es un potente activador de PPAR α y por medio de este factor de transcripción es que se induce el transporte y oxidación de lípidos (Taylor y Zahradka, 2004). Sin embargo, en ratas con DM2 y suplemento de CLA (Fig. 20 A), se observa una exacerbada actividad lipolítica al sostener niveles elevados de triglicéridos similares al grupo de ratas diabéticas sin suplemento. Con base en los resultados de glucosa reportados en la figura 14 A, en donde no se observó control de la glicemia, se puede concluir que así como no mostró efecto sobre la glicemia, de la misma manera no mostró efecto sobre los niveles de lípidos. También cabe la posibilidad que los isómeros presentes en la dieta, tengan efectos opuestos que no permiten ver una tendencia definida. Así, es muy probable que el contenido de triglicéridos se deba a la DM2 y no al suplemento de CLA.

En hígado, el CLA por si solo promueve acumulación de colesterol (Fig. 25 B), lo que refleja la probable activación del catabolismo de lípidos y un efecto potencialmente nocivo por parte de este suplemento. Por su parte, el CLA en la DM2 muestra la misma tendencia que el grupo de ratas diabéticas en cuanto al contenido de colesterol. Sin embargo, en conjunto con la DHC el CLA en la diabetes promueve a un incremento significativo de colesterol en hígado, incrementando el daño que la DHC genera en la DM2.

7.3. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

7.3.1. Hígado

Las células de mamíferos requieren de precursores exógenos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, de modo que la composición de ácidos grasos en tejidos de animales diabéticos, se debe en parte a los suministrados en la dieta (Holman et al, 1983). Por ello, la composición de ácidos grasos varía según el modelo de diabetes y la composición lipídica del alimento administrado. En este modelo, la diabetes indujo cambios en la composición de ácidos grasos de hígado, se encontró una disminución del ácido araquidónico, lo cual, ha sido relacionado con hiperglicemia (Holman et al, 1983). Se conoce que en modelos de diabetes químicamente inducida (diabetes experimental, más parecida a la diabetes tipo 1), el contenido de ácido araquidónico disminuye, esto a sido asociado con la escasa secreción de insulina. Ramesh et al (2007) reportan que la insulina regula la actividad de la $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas durante una condición normoglicémica, sin embargo, durante condiciones de hiperglicemia la regulación de estas enzimas es deficiente. Por lo tanto, al inhibirse a la $\Delta 6$ desaturasa en la diabetes, no se permite la conversión de ácido linoléico en ácido gama linolénico, y como consecuencia se observa una disminución del ácido araquidónico. Holman et al (1983) reportan que el defecto metabólico de la diabetes inducida por estreptozotocina se limita principalmente a la inhibición de la $\Delta 5$ desaturasa. Como consecuencia, se observa una acumulación del ácido dihomo γ -linolénico (Compuesto de 20:3), a partir del cual se forma el ácido araquidónico. Como se muestra en la tabla 2, entre los cambios que indujo la diabetes se encuentra un incremento en los compuestos 20:3, lo que nos habla de un defecto en la $\Delta 5$ desaturasa, como lo mencionan Holman et al (1983). Asimismo, esta enzima es la encargada de convertir ácido α -linolénico en ácido eicosapentaenólico (EPA). Entre otros cambios, este modelo de DM2 provocó una disminución del contenido de EPA, lo que refleja una menor actividad por parte de esta desaturasa. Asimismo, en esta tabla, se observa que el contenido de ácido docosahexaenólico (DHA) no se alteró con la DM, si hubiese un error en la $\Delta 6$ desaturasa como lo menciona Ramesh (2007), no habría conversión del ácido α -linolénico en DHA, pues esta enzima participa activamente en la formación de éste último.

Por otro lado, Colman et al (1983) refieren que la deficiencia de ácido araquidónico también puede resultar en parte de una excesiva actividad de la fosfolipasa A2 y la consecuente conversión de araquidónico en prostaglandinas.

Por su parte, el suplemento de ácidos grasos ω -3 llevó a un incremento de los ácidos palmítico, palmitoléico y oleico cabe mencionar que el suplemento alimenticio además de contener en su mayoría EPA y DHA, de manera minoritaria, contenía otros ácidos grasos como palmítico y oleico. Además se observó que tanto ratas diabéticas como normoglicémicas al ser suplementadas con ω -3 disminuyeron el contenido de ácido araquidónico en hígado (Tabla 2 y 3). Garg et al (1989) reportaron que el consumo de aceite de pescado cuyos componentes principales son ácidos grasos ω -3, se encontró asociado con un cambio en el contenido de ácido araquidónico de fosfolípidos de hígado a triacilglicéridos en plasma. Sin embargo, los mecanismos de acción aún se desconocen. Recientemente, Igal et al (2001) demostraron que una sobreexpresión de la glicerol-3-fosfato acetiltransferasa, dirige la incorporación de ácidos grasos exógenos en triacilglicéridos en lugar de incorporarlos a fosfolípidos. Quizás el mecanismo de acción de los ω -3 sea a través de inducir la sobreexpresión de alguna enzima, facilitando la incorporación de los ácidos grasos en triglicéridos.

En la tabla 3 se muestra que el suplemento de ω -3 en la diabetes restauró los niveles de palmitoléico, oléico y compuestos de 20:3 a niveles normales. Se ha reportado que una terapia con insulina en la DM corrige la actividad de las desaturasas y restaura la composición de ácidos grasos con excepción del ácido araquidónico (Holman et al, 1983). El suplemento de ω -3 indujo a una mayor producción de insulina, quizás esto explique la restauración parcial en la composición de ácidos grasos de hígado de ratas diabéticas.

Se observó una acumulación de ácido linolénico en animales con DM2 y suplemento de ω -3, quizás las desaturasas y elongasas que participan en la conversión de linolénico a EPA y DHA se mantuvieron inactivas, pues no hubo necesidad de convertir el sustrato ante la administración del producto.

El suplemento de CLA en animales normoglicémicos produjo un incremento de ácidos grasos poliinsaturados, entre ellos, el ácido linolénico, eicosapentaenóico (EPA),

docosahexaenóico (DHA) y compuestos de 20:3 (Tabla 5). Estos cambios podrían ser benéficos al favorecer el incremento en la fluidez membranal, pero sería conveniente hacer dichas mediciones para corroborar la hipótesis. En ratas diabéticas, el CLA mostró algunas tendencias similares al grupo de ratas diabéticas sin este suplemento como por ejemplo, el incremento del ácido oléico, que se observó también en animales diabéticos sin suplemento (Tabla 6). No obstante, el CLA restituyó los niveles de araquidónico y esteárico que en la DM se mostraron disminuidos. Este efecto quizás esté relacionado con una menor utilización de ácidos grasos lo que se manifiesta en acumulación de los mismos, más que una influencia en la actividad de las desaturasas.

Los cambios en la composición de ácidos grasos a los que indujo el CLA resultan difíciles de explicar. Como se ha mencionado anteriormente, los diferentes isómeros de CLA inducen efectos contrarios y quizás la competencia entre ellos provoca que no se detecten efectos benéficos en la DM2.

7.3.2. Riñón

La diabetes no condujo a cambios significativos en la composición de ácidos grasos de este tejido. Por su parte la dieta hipercalórica (DHC) incrementó el contenido de ácido araquidónico tanto en hígado como en riñón (Tabla 4 y 8). Esto muestra un efecto potencialmente nocivo por parte de esta dieta al incrementar el sustrato para la síntesis de eicosanoides vasoactivos tales como leucotrienos de la serie 4, prostaglandinas y tromboxanos de la serie 2. Asimismo, esta dieta provocó una pérdida en la acumulación de los ácidos mirístico, linolénico, EPA y DHA. Quizás la incorporación de ácidos grasos saturados incluidos en la dieta compitió con la acumulación de poliinsaturados, evitando la incorporación de estos últimos. El suplemento de ácidos grasos ω -3 restituyó los niveles de ácido linolénico y docosahexaenóico (DHA) en presencia de la DHC y diabetes.

Como se muestra en la tabla 11, el CLA se incorporó en las membranas de las células del riñón, esto, eventualmente generará una competencia con el ácido linoléico evitando la formación de araquidónico y posterior síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Asimismo, este suplemento provocó un incremento significativo de EPA y DHA. Al igual que en hígado, el suplemento de CLA modificó la

composición lipídica mostrando un incremento de ácidos grasos poliinsaturados, lo que podría favorecer a un aumento en la fluidez membranal.

7.4. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA

7.4.1. Ácidos Grasos ω -3

En este modelo, la DM2 provocó una atrofia de islotes de moderada a severa en el páncreas de ratas wistar. La atrofia se caracterizó por una disminución en el tamaño celular y/o en la cantidad de islotes que conforman al tejido. En el caso de ratas diabéticas con suplemento de omega, la atrofia de islotes no reflejó disfunción de células β , pues estas fueron capaces de satisfacer la demanda de insulina con una mayor síntesis y secreción. Por su parte el grupo de ratas diabéticas sin suplemento mostró un descontrol de la glicemia, un menor contenido de insulina y atrofia de islotes, lo cual, en conjunto, refleja disfunción de las células β que como se mencionó en la primera parte de la discusión, este daño puede ser resultado de la glucotoxicidad y lipotoxicidad características de la DM2. El suplemento de ácidos grasos ω -3 en la DM protegió al páncreas del daño generado por la gluco y lipotoxicidad pues pese a la atrofia de islotes observada para este grupo, las células β restantes fueron capaces de mantener un control de la glicemia con un mayor aporte de insulina. Cabe recordar que tanto la glicemia como la exacerbada lipólisis se controlaron con la administración de este suplemento. Los resultados de inmunohistoquímica (Fig. 35) revelan una mayor producción de insulina en ratas diabéticas con suplemento de omega que aquellas diabéticas sin suplemento. Como ya se mencionó, el probable mecanismo de acción de estos ácidos grasos es a través de los factores de transcripción PPARs. Particularmente PPAR- γ está relacionado con la síntesis de insulina y probablemente a través de este factor de transcripción los ω -3 lograron compensar la demanda de esta hormona. De esta manera se evitó la hiperglicemia crónica que a largo plazo provoca glucotoxicidad, lipotoxicidad y disfunción de las células β del páncreas.

En animales con DM2 y DHC el páncreas se muestra con necrosis severa (Fig. 30), lo que sugiere que una dieta de este tipo intensifica el daño generado en la DM2. Sin embargo, la inmunohistoquímica revela que hay un mayor contenido de insulina en los

islotes de estas ratas y como consecuencia los niveles de glicemia mostraron un aparente control (Fig.11). Se ha reportado que en las células β pancreáticas, la lipotoxicidad provoca un aumento en la concentración de calcio intracelular y este aumento estimula a una mayor secreción de insulina, sin embargo, dicho incremento también se encuentra relacionado con la disfunción de las células β . Aunque al inicio este fenómeno lleve al incremento de la secreción de insulina, eventualmente provoca una pobre respuesta por parte de las células β a la acción de esta hormona, lo que conduce al mal funcionamiento de dichas células (Zhang, 2005). Esto explicaría en parte la necrosis severa generada por la DHC en la DM2 aunque no podemos descartar que el constante estímulo con glucosa en el agua de beber forzó a una mayor secreción de insulina y llevó eventualmente a una necrosis severa en islotes.

Tanto la DHC como el suplemento de ω -3 en la diabetes promovieron el incremento de insulina (Fig. 38), sin embargo, la DHC promueve sólo la secreción, en tanto que los omega estimulan la síntesis, lo cual da como resultado que cada vez que exista estimulación de células β , en el grupo con suplemento habrá insulina suficiente para incorporar glucosa a las células del cuerpo, en tanto que en el grupo sin suplemento habrá quizás el mismo número de secreciones, pero la cantidad de insulina será menor.

7.4.2. Ácido Linoléico Conjugado

Los resultados obtenidos con inmunohistoquímica revelan que el suplemento de CLA promueve un incremento en el contenido de insulina de islotes pancreáticos de ratas diabéticas con dieta normal y DHC, pero no parecen contribuir al control de la hiperglicemia. El mecanismo de acción de este ácido graso aún se desconoce y la presencia de numerosos isómeros con propiedades distintas dificultan el análisis. Como se mencionó anteriormente, existen alrededor de seis isómeros de CLA de acuerdo a la posición de las insaturaciones y/o a la conformación *cis* o *trans*. Los resultados obtenidos con la mezcla de isómeros o bien cada uno por separado difieren entre ellos incluso mostrando efectos contrarios (Taylor y Zahradka, 2004).

De los tres isómeros encontrados en las cápsulas con CLA (30% *cis*-9,*trans*-11, 30% *trans*-10,*cis*-12 y 30% *cis*-10,*cis*-12), dos de ellos parecen tener efectos contrarios, mientras *cis*-9,*trans*-11 reduce los niveles de lípidos, *trans*-10,*cis*-12 provoca hiperlipidemia, insulinoresistencia y diabetes (Taylor y Zahradka, 2004). De estos isómeros se desconoce cual de ellos llevó a cabo el efecto sobre la insulina y, aún cuando este ácido graso la incrementó hasta llegar a niveles normales, se desconoce si indujo a una mayor producción o sólo a una mayor acumulación en las células beta.

Independientemente del mecanismo por el cual se indujo un incremento de insulina, esto no fue suficiente para controlar la glicemia de ratas diabéticas. Aún cuando el contenido de insulina en los islotes de ratas diabéticas con suplemento de CLA era igual al de ratas normales, la glicemia de las primeras fue descontrolada a lo largo de todo el tratamiento. Quizás el contenido de insulina no es condición suficiente para mejorar la glicemia de animales con DM2. Cabe recordar que el hecho de que se encuentre insulina en los islotes pancreáticos, no significa necesariamente que ella se esté liberando al torrente sanguíneo, puede haber una acumulación derivada de problemas en la secreción de insulina en alguno de los pasos necesarios para su secreción; esto último se podría corroborar indirectamente midiendo la concentración de insulina en sangre. Es probable que el mecanismo de acción por el cual los ácidos grasos ω -3 llevan al control de la glicemia, va más allá de la producción de insulina; Se ha reportado que PPAR- γ , factor de transcripción estimulado por ácidos grasos ω -3, no sólo promueve la síntesis de insulina, sino que incrementa la expresión del substrato para el receptor 2 de insulina, estimula la expresión de los transportadores GLUT 4 y GLUT 2 en las células β del páncreas, además de reducir la producción hepática de glucosa (Aleman et al., 2002). Por otro lado, se ha reportado que los ácidos grasos ω -3 regulan la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos y testículos de animales diabéticos e hipertensos, en este estudio se encontró que el suplemento de omega favorece a un incremento en la fluidez membranal, misma que se encuentra disminuida en la DM2 (Hernandez, 2008 y Perez, 2008). Quizás el incremento en la fluidez membranal permita que la insulina sea más eficiente, de manera que los procesos de fusión de membranas para que los glucotransportadores se integren a la misma se lleven a cabo con facilidad y puedan funcionar correctamente. Probablemente los ω -3 no sólo

incrementan la producción de insulina, sino que la acción de esta se vuelve más eficiente, lo que contribuye al control de la glicemia.

Finalmente, el suplemento de CLA protegió al páncreas del daño provocado por la gluco y lipotoxicidad en la DM2, pues el páncreas de estos animales no mostró cambios patológicos. Cabe recordar que los ácidos grasos poliinsaturados son más susceptibles al ataque de radicales libres, así que probablemente el CLA actuó como antioxidante evitando cascadas de propagación de radicales libres del medio y de esta manera condujo a la protección del tejido.

CONCLUSIONES

- Los ácidos grasos ω -3, eicosapentaenoico y docosahexaenoico, promovieron un incremento en la síntesis de insulina en células β -pancreáticas y favorecieron el control de la glicemia en este modelo de DM2.
- El ácido linoleico conjugado, pese a que indujo un incremento en el contenido de insulina de islotes pancreáticos no controló la hiperglicemia en este modelo de DM2.
- El mecanismo de acción de los ácidos grasos ω -3 no sólo es a través del aumento en la síntesis de insulina, sino que debe haber otros mecanismos que actúan simultáneamente, como la activación de factores de transcripción que regulan la síntesis de glucotransportadores y receptores de insulina.
- El control de la glicemia se ve favorecido al incrementar el contenido de insulina en islotes pancreáticos, sin embargo, se encuentran involucrados otros mecanismos por los cuales se lleva a cabo dicho control. El incremento de insulina no es condición suficiente para controlar la glicemia en la DM2.
- El suplemento de ω -3 elevó los niveles de triglicéridos en suero de ratas normoglicémicas y con DM2.
- La DM2 incrementó los niveles de triglicéridos en suero y colesterol en hígado.
- La dieta hipercalórica elevó los niveles de colesterol en suero.
- El daño generado al páncreas de ratas diabéticas es más severo cuando reciben una dieta hipercalórica.
- En este modelo de diabetes mellitus, se indujeron alteraciones en la composición de ácidos grasos de hígado. Por otro lado, los ácidos grasos ω -3 también indujeron

cambios en la composición de los ácidos grasos que podría contribuir al control de la glicemia.

- La dieta hipercalórica modifica la composición de ácidos grasos de hígado y riñón, entre otros, un incremento significativo de ácido araquidónico en riñón.

APENDICE 1

TINCIÓN DE PÁNCREAS CON EOSINA-HEMATOXILINA

1) Deshidratación de tejidos.

Etanol %	Tiempo (min)
40	30
50	30
60	30
70	60
80	60
90	60
96	60
100	60

2) Tinción de eosina-hematoxilina I. Las laminillas se mantuvieron a 60°C por 30min antes de teñir. Posteriormente se pasaron por diferentes solventes y colorantes siguiendo el protocolo que se muestra a continuación.

Reactivo	Tiempo (min.)
Xilol I	5
Xilol II	5
Alcohol-Xilol	3
OH 100%	3
OH 90%	2

OH 80%	2
OH 70%	1
Agua Corriente	3
Hematoxilina de Harris	6
Agua Corriente (Lavado)	
Alcohol Ácido	15 segundos
Agua Corriente	1
Eosina	4
Agua Corriente (Lavado)	
OH 70%	1
OH 90%	1
OH 100%	2
OH 100%	3
Xilol I	5
Xilol II	5

9. REFERENCIAS

Alemán, G., Torres, N., Tovar, A., 2002. “Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) en el desarrollo de la obesidad y resistencia a la insulina”. Revista de Investigación Clínica. Vol. 56, Núm. 3. Pp. 351-367.

Anders A. F. Sima. 2000. “Chronic complications in diabetes, animal models and chronic complications” Ed. Harwood academic publishers. Detroit, USA.

Areas, M., Gregorio, S., Reyes, F. 2003. Evaluación de la inducción de diabetes neonatal con estreptozotocina en ratas Wistar. Alim. Revista de tecnología e higiene de los alimentos. N° 347, pags. 45-49.

Beck-Nielsen H., Hother-Nielsen O. 2003. “Obesidad en la diabetes mellitus de tipo 2”. En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. “Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp 1331.

Bennett, H. 2003. “Aspectos epidemiológicos de la diabetes mellitus de tipo 2”. En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. “Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp 1331.

Bergeron, R., Yao, J., Woods, J., Zycband, E., Liu, C., Li, Z., Adams, A., Berger J., Zhang, B., Moller, D., Doebber, T. 2006. “Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- α Agonism Prevents the Onset of Type 2 Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats: A Comparison with PPAR γ Agonism.” Endocrinology. 147(9): 4252-4262.

Castro, M., Liceaga, G. 2002. “Obesidad y Diabetes Mellitus”. En Islas, S. y Lifshitz, A. “Diabetes Mellitus”. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Pp 395-402.

Concannon P, Gogolin-Ewens KJ, Hinds DA, et al. 1998. “A second-generation screen of the human genome for susceptibility to insulindependent diabetes mellitus”. Nat. Genet.;19;292.

Cruz, M., Velasco, E., Kumate, J. 2001. "Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa". Gac. Med. Mex. México, D.F. Vol. 137(2): 135-146.

Durruty, P, García de los Ríos, M. 2001. "Glucose and lipid toxicity in the pathogenesis and evolution of type 2 diabetes". Rev. Med. Chile 129: 671-9.

Flakoll, P.J., Carlson, M.G., Cherrington, A.D. 2003. "Acción fisiológica de la insulina". En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. 2003. "Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico". Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp 1331.

Francis, G.A., Fayard, E., Picard, F., Auwerx, J. 2003. "Nuclear receptors and the control of metabolism". Annu Rev Physiol; 65: 261-311.

Garg, M.L., Wierzbicki, A. A., Thomson, A.B., Clandinin, M.T. 1989. "Omega-3 fatty acids increase the arachidonic acid content of liver cholesterol ester and plasma triacylglycerol fractions in the rat". Biochem. J. 261, 11-15.

Hernández-Rivera E. 2008. "Efecto del ácidos grasos omega - 3 (ω -3) sobre la histología de los testículos y morfología de los espermatozoides en diferentes estados fisiológicos de ratas con Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)". Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. (En proceso).

Holman, R., Johnson, S., Gerrard, J., Mauer, M., Kupcho-Sandberg, S., Brown, D. 1983. "Arachidonic acid deficiency in streptozotocin-induced diabetes" Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Medical Sciences. Vol. 80. Pp. 2375-2379.

Houseknecht , K., Vanden, J., Moya-Camarena, S., Portocarrero, C., Peck, L., Nickel, K., Belury, M. 1998. "Dietary Conjugated Linoleic Acid Normalizes Impaired Glucose Tolerance in the Zucker Diabetic Fatty *fa/fa*Rat". Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 244, pp. 678-682.

Howard BV., Abbott WG, Beltz WF., et al. 1987. "Integrated study of low density lipoprotein metabolism and very low-density lipoprotein metabolism in non-insulin-dependent diabetes". *Metabolism*; 36:870

Hunkar, T., Aktan, F., Ceylan, A., Karasu, C. 2002. "Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats". *Cell Biochem Funct.* Vol. 20(4):297-302.

Igal, R.A., Wang, S., Gonzalez-Baro, M., Coleman, R.A. 2001. "Mitochondrial glycerol phosphate acetyltransferase directs the incorporation of exogenous fatty acids into triacylglycerol". *J. Biol. Chem.* 276. 42205-42212.

Inoue, N., Nagao, K., Hirata, J., Wang, Y.M., and Yanagita, T. 2004. "Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 323, Issue 2. Pp. 679-684.

Islas, S., Revilla, C. 2002. "Diabetes Mellitus: concepto y nueva clasificación". En Islas, S. y Lifshitz, A. "Diabetes Mellitus". Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp 3-14.

Kim H., Kim J.W., Kim, S.H., Cha, J.Y., Kim, K.S., Ahn Y.H. 2000. "Identification and functional characterization of the peroxisomal proliferator response element in rat GLUT 2 promoter." *Diabetes.* 49(9): 1517-24.

Laybutt, R., Sharma, A., Sgroi, D., Gaudet, J., Bonner-Weir, S., Weir, G. 2002 "Genetic Regulation of Metabolic Pathways in β -Cells Disrupted by Hyperglycemia." *The Journal Of Biological Chemistry.* Vol. 277. No. 13. Pp. 10912-10921.

LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. 2003. "Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico". Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp 1331.

Lifshitz. A. 2002. "Hipertensión y Diabetes". En Islas, S. y Lifshitz, A. "Diabetes Mellitus". Ed. McGraw-Hill Interamericana. Pp 113-120.

Lillioja S, Mott DM, Howard Bv, et al. 1998. "Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action: longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians". *N. Engl. J. Med*; 318:1217.

Ludvik B, Nolan JJ, Baloga J, Sacks D, Olefsky J. 1995. "Effect of obesity on insulin resistance in normal subjects and patients with NIDDM". *Diabetes*; 44:1121-1125.

Lupi, R., Del Guerra, S., Marselli, L., Bugliani, M., Boggi, U., Mosca, F., Marchetti, P., Del Prato, S. 2004. "Rosiglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPAR γ 2 in the modulation of insulin secretion." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E560-E567.

Maureen I. Harris. 2003. "Definición y clasificación de la diabetes mellitus y criterios actuales para el diagnóstico". En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. "Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico". Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp 1331.

Minami A, Ishimura N, Sakamoto S, Takishita E, Mawatari K, Okada K and Nakaya Y. 2002. Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester v. oleic acid-rich safflower oil on insulin resistance in type 2 diabetic model rats with hypertriacylglycerolaemia. *British Journal of Nutrition*. 87, 157-162

Mori Y, Murakawa Y, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y, Nobukata H, Ishikawa T, Shibutani Y. 1999. "Effect of highly purified eicosapentaenoic acid ethyl ester on insulin resistance and hypertension in Dahl salt-sensitive rats". *Metabolism*, 48(9):1089-95.

Nasiff-Hadad, A., Meriño-Ibarra, E. 2003. "Ácidos grasos omega-3: pescados de carne azul y concentrados de aceites de pescado". *Rev Cubana Med*;42(2).

Pérez-Hernández, I. 2008. "Cambios en los ácidos grasos y fosfolípidos durante el desarrollo de la diabetes e hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)" Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. (En proceso).

Poitout, V., Robertson, P. 2007. "Glucolipotoxicity: Fuel Excess and β -Cell Dysfunction". Endocrine Reviews, doi:10.1210/0023.

Porte DJ. Banting Lecture. 1991. "Beta-cells in type II diabetes mellitus". Diabetes 1991;40:166.

Ramesh, B., Viswanathan, P., Viswanathan-Pugalendi, K. 2007. "Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats". European Journal of Pharmacology. 566. 231-239.

Reaven G.M. 1991. "Insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in the etiology and clinical course of hypertension". Am J Med; 90(suppl2A): 7S-12S.

Roche, H. M., Noone, E., Sewter, C., et al. 2002. "Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid. Insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXR α ". Diabetes; 51:2037-44.

Rodriguez-Cruz, M., Tovar, A., Del Prado, M., Torres, N. 2005. "Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud". Revista de Investigación Clínica. Vol. 57, Núm. 3. Pp. 457-472.

Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Charles MA, Bennett PH. 1991. "A two-step model for development of non-insulin-dependent diabetes". Am. J. Med; 90:229

Shepherd, P., Kahn, B. 2003. "Transportadores de Glucosa y Estados Fisiopatológicos". En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. "Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico". Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp 1331.

Simončíkova, P., Wein, S., Gasperikova, D., Ukropec, J., Certik, M., Klimes, I., Sebkova, E. 2002. "Comparison of the extrapancreatic action of γ -Linolenic acid and n-3 PUFAs in the high fat diet-induced insulin resistance". Endocrine Regulations, Vol. 36, 143-149.

Sullivan DR, Yue DK, Capogreco C, McLennan S, Nicks J, Cooney G, Caterson I, Turtle JR, Hensley WJ. 1990. "The effects of dietary n - 3 fatty acid in animal models of type 1 and type 2 diabetes". *Diabetes Research Clinical Pract.* 9(3):225-30

Suresh, Y., Das, UN. 2003. "Long-chain polyunsaturated fatty acids on chemically induced diabetes mellitus. Effect of omega-3 fatty acids". *Nutrition.* Vol.19(3):213-28.

Szkudelski, T. 2001. "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas". *Physiol. Res.* Vol. 50. Pp. 536-546.

Taylor, C.G., Zahradka, P. 2004. "Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models" *Am J Clin Nutr*; 79. 1164S-8S.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*: 20 (7): 1183-97.

The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. 2004. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*: 27:S5-S10.

Uauy, R., Martínez, J, Rojas, C. 2000. "Nutrición molecular, papel del sistema PPAR en el metabolismo lipídico y su importancia en la obesidad y diabetes mellitus". *Rev. Med. Chile.* Vol. 128. Núm. 4.

Voet, D., Voet, J. 1990. "Biochemistry". Ed. John Wiley & Sons, Inc. United States. Pp 1223.

Xu ZK, Chen NG, Ma CY, Meng ZX, Sun YJ, Han X. 2006. "Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in glucose-induced insulin secretion". *Biochimica et Biophysica Acta* 38 (1), 1-7.

Zhang, F., Ye, C., Li, Guo., et. al. 2003. "The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Exp. Anim.* 52(5), 401-407

Zhang Yali, Xiao Meifang, Niu Gang, Tan Huanran. 2005. "Mechanisms of oleic acid deterioration in insulin secretion: Role in the pathogenesis of type 2 diabetes". *Life Sciences* 77. 2071-2081