



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Efecto de los ácidos grasos omega-3, como suplemento alimenticio, sobre la histología del testículo de ratas espontáneamente hipertensas, con diabetes experimental tipo 2

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

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NORMA LAURA DELGADO BUENROSTRO



TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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 de la Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro.

DEDICATORIAS

Si es que existe un Dios, agradezco que me permite vivir esta vida, en este tiempo, junto a toda esta gente. Por tener fe en algo que no veo, por todas las experiencias buenas y malas, mas por las últimas, que son las que más me han enseñado, aunque por momentos olvide lo aprendido. Por colocarme con la familia que amo. Porque cada día impones un nuevo desafío, y no olvidas colocar un rayo de esperanza con el único objetivo de disfrutar lo que llamamos vida.

A mis padres, Jesús Peralta y M^a Cleofas Romero, gracias por brindarme su amor, cariño, confianza, respaldo, consejos, sacrificios, enseñanzas, simplemente por todo. No me alcanzarían las palabras ni páginas para decirles todo lo que les quiero agradecer y sobre todo el amor que les tengo. A mi padre, simplemente por ser la persona que es, por todo lo que representa en mi vida al ser un guía en mi camino, ejemplo de dedicación, trabajo, esfuerzo, simplemente un modelo a seguir. Por dar todo a la familia sin esperar nada a cambio. A mi madre, ejemplo de perseverancia y de esfuerzo constante. Por mostrar que siempre se tiene que estar trabajando por el bien de la familia.

A mis hermanos José de Jesús y Rodrigo, pues solo puedo decir, que me ha gustado conocerlos, convivir con ustedes, que los amo mucho, ¡que no daría por ustedes! Puedo presumir que los he visto crecer, al menos más a ti Rodrigo. Recuerdo mucho de ustedes, los juegos, platicas, son mis primeros mejores amigos. Aunque suene raro, seguimos jugando juntos, espero que así sea por mucho tiempo.

A mis abuelos, Felipe Romero que en paz descanse, Longina Domínguez y Paula Trejo, gracias por enseñarme un poco de su gran experiencia. A mi abuelo Manuel Peralta, que aunque no lo conocí se que era un gran hombre, porque forjo a mi padre.

A mis tíos, Edmundo, María de Jesús, Ofelia, Rodolfo, Alberto (qepd). A mi primo Ricardo. A la familia en general sin olvidar a primos y tíos.

A mis amigos de la preparatoria, Javier, Julio Cesar, Miguel, Ernesto, Bertín, Gabriel, Polo, Rogelio, Salomón, Esther, Adriana, Pamela, Estrella y muchos más que compartieron parte de sus vidas en la preparatoria y también canchearon en varias horas de clase. Julieta, es difícil para mí describir la amistad que llevo contigo, pero es fácil para mi decir que me agrada convivir y platicar de cualquier cosa cada vez que te encuentro.

Compañeros de laboratorio, Emmanuel mi compañero de laboratorio. Carmen, gracias por las tardes de pláticas interminables. Ismael, por las discusiones, comentarios, tardes de música y lucha libre. Yesica, por escuchar tonterías y las pláticas agradables. Jaime y Martha, fue agradable conocerlos y convivir con ustedes. Dr. Ricardo Mejía, gracias por el apoyo que me brindó en la realización del trabajo, por asesorías, comentarios, y sugerencias.

A Chema, es una gran experiencia el conocer a amigos como tú, no encuentro palabras para describir mi amistad contigo, por el momento solo te puedo dar gracias por las pláticas, consejos y vivencias en general, por ser mi amigo, y acompañarme en muchos momentos buenos y malos. A Josué y Julián, gracias amigos por los gratos momentos que compartí con ustedes, me llevo mucho de las vivencias y aventuras, cosas que siempre recordare. A Rocío y Martha por su sonrisa y alegría, son unas personas muy agradables con las que deseo convivir por mucho tiempo. Anaid, que bueno que entiendes muchas cosas de las que te platico, daaaa. Adriana, qué onda mugrosa que bueno que eres mi amiga. Ximena, que bueno que conocí a una persona como tú, con una gran variedad de ideas en la cabeza que son tan opuestas entre sí, que se complementan. Patiriforme, gracias por ser un pequeño motor que inyecta vida en cualquier lugar en el que te encuentres y das tranquilidad a cualquier vaso de agua en tormenta.

A mis amigas Patricia, gracias por tu gran sinceridad, escucharme y aconsejarme, Christian, que bueno que eres mi amiga, ustedes dos son mi ejemplo de que las cosas se pueden hacer cuando uno quiere. Alejandra, por ser una buena amiga.

Isabel Reyes, fue un honor para mí convivir con una hermosa persona mucho tiempo de mi vida, durante la estancia en la escuela, gracias porque estuviste ahí, en el momento más hermoso que viví en la universidad, de mi parte, tengo toda la disposición para cumplir la promesa de seguir siendo amigos, dar toda mi amistad, sinceridad, atención y lo que sea necesario para escuchar. Y más, mucho más.

Evelia, mi mamá escolar, que bueno que estas ahí para jalarme las orejas cada vez que sea necesario, se que contare contigo por el resto de mi vida, y quiero que sepas que también estaré ahí. Quisiera decirte más, pero sé que te lo puedo decir cada vez que te vea.

Dra Norma Laura, es gracias a usted que he podido terminar esta tesis, por todo el apoyo y seguimiento que me dio durante el desarrollo del trabajo. No solo aprendí técnicas, también me enseñó a desarrollar capacidades como ser humano, que al igual que en laboratorio es necesario practicarlas para que estos aprendizajes sean útiles. Porque además también me dio enseñanzas útiles para la vida. Muchas gracias.

Asimismo no puedo terminar los agradecimientos, sin antes, decir que estoy orgulloso de ser preparatoriano y sobre todo de ser universitario. Gracias a la UNAM que me acogió en sus aulas. Por darme la oportunidad de pertenecer a la FES Iztacala.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	9
Resumen	10
I. Introducción	12
I.1. Páncreas	13
I.2. Insulina	13
I.2.1. Liberación de la insulina	14
I.2.2. Receptor de la insulina	15
I.2.3. La resistencia a la insulina	15
I.3. Diabetes	16
I.3.1. Clasificación	16
•Diabetes mellitus tipo 1	16
•Diabetes mellitus tipo 2	17
•Otros tipos específicos de Diabetes mellitus	18
•Diabetes gestacional	18
I.3.2. Diabetes experimental	18
I.3.2. Complicaciones de la diabetes	19
I.4. Hipertensión	20
I.4.1. Clasificación	21
•Hipertensión esencial o primaria	21
•Hipertensión secundaria	21
•Hipertensión sistólica aislada	21
•Pseudo-hipertensión	21
•Hipertensión de bata blanca	22
I.5. Diabetes, hipertensión arterial y ácidos grasos	22
I.6. Espermatogénesis	24
I.6.1. Espermatozoide	25
I.6.1. Capacitación y reacción acrosomal	25
II. Objetivos	27
III. Materiales y métodos	28
III.1. Reactivos	28
III.2. Inducción de la diabetes	28
III.3. Modelo experimental	28
III.4. Obtención de gónadas y conductos deferentes	29
III.5. Obtención de la muestra espermática	30

III.6. Histología	30
III.6.1. Procesamiento de la muestra para el estudio histológico.....	39
a) Inclusión en parafina	30
b) Preparación de portaobjetos para el montaje de muestras	31
c) Montaje de los cortes	31
d) Tinción con Hematoxilina-Eosina	32
III.7. Extracción y determinación de lípidos totales en el tejido testicular	32
III.7.1. Método de Folch	32
III.7.2. Procedimiento.....	33
III.7.2.1. Extracción de lípidos.....	33
III.7.2.2. Lavado de extracto	33
III.7.2.3. Transesterificación.....	33
III.7.2.4. Determinación de la composición de ácidos grasos mediante el cromatógrafo de gases.....	34
III.8. Estadístico.....	34
IV. Resultados.....	35
IV.1. Glucosa en SHR	35
IV.2. Presión en SHR	36
IV.3. Morfología espermática.....	37
IV.4. Espermatozoides con reacción acrosomal	38
IV.5. Histología del testículo	39
IV.6. Asociaciones celulares.....	41
IV.6.1. Asociaciones celulares V y VI.....	41
IV.6.2. Asociaciones celulares VII y VIII.....	43
IV.6.1. Asociaciones celulares IX y X.....	45
IV.7. Peso relativo de la gónada.....	47
IV.8. Peso corporal.....	48
IV.9. Composición de ácidos grasos en el testículo de SHR	49
IV.9.1. Composición de AG de testículos de SHR de 3 meses	49
IV.9.1. Composición de AG de testículos de SHR de 6 meses	51
IV.10. Índice de fluidez membranal en SHR	53
V. Análisis y discusión	54
Control de la glicemia e hipertensión en SHR	54
Diabetes e hipertensión en la reproducción.....	58
Daños histológicos en testículo, durante el desarrollo de la diabetes en SHR.....	61
Peso corporal y gonadal de individuos SHR diabéticos	62
Composición de ácidos grasos en el testículo de SHR diabéticas.....	62
VI. Conclusiones.....	67
VII. Glosario.....	68
VIII. Referencias	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Síntesis y secreción de la insulina.....	14
Figura 2	Receptor de insulina	15
Figura 3	Mecanismo de acción de la estreptozotocina	18
Figura 4	Metabolismo de los ácidos grasos	23
Figura 5	Espermatozoide de rata	24
Figura 6	Principales cambios en la membrana del espermatozoide durante la reacción acrosomal	26
Figura 7	Efecto de los ácidos grasos ω -3, sobre los valores de glucosa en sangre de SHR	35
Figura 8	Efecto de los ácidos grasos ω -3, sobre los valores de presión sistólica en sangre	36
Figura 9	Efecto de los ácidos grasos ω -3 como suplemento alimenticio en SHR y diabéticas de 3 y 6 meses, sobre el porcentaje de espermatozoides anormales	37
Figura 10	Efecto de los ácidos grasos ω -3 como suplemento alimenticio en SHR y diabéticas de 3 y 6 meses, sobre el porcentaje de espermatozoides capacitados, que obtuvieron RA.....	38
Figura 11	Corte histológico de testículo de SHR, con diabetes experimental inducida, tratados con ácidos grasos ω -3.....	40
Figura 12	Asociaciones V y VI	42
Figura 13	Asociaciones VII y VIII.....	44
Figura 14	Asociaciones IX y X	46
Figura 15	Efecto de los ácidos grasos, sobre el peso relativo de testículos de SHR ..	47
Figura 16	Efecto de los ácidos grasos ω -3, sobre peso de SHR.....	48
Figura 17	Índice de fluidez membranal en testículos de SHR	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Grupos experimentales y tiempos de sacrificios	29
Tabla 2	Procedimiento seguido para la tinción de los cortes histológicos, por la técnica de hematoxilina-eosina	32
Tabla 3	Composición porcentual de ácidos grasos de testículos de SHR de 3 meses tratados con ω -3	50
Tabla 4	Composición porcentual de ácidos grasos de testículos de SHR de 6 meses tratados con ω -3	52

Lista de abreviaturas:

α -LNL	alfa linolénico,
aa	Aminoácidos
AA	Ácido araquidónico
AG	Ácidos Grasos
AGPIs	Ácidos Grasos Poli-insaturados
AG- ω 3	Ácidos Grasos ω 3
ATP	Adenosin trifosfato
BF ₃	Trifluoruro de boro
CDETH	Comité para la Detección Evaluación y Tratamiento Hipertensión de los Institutos de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DR	Dominio de reconocimiento
EPA	Ácido eicosapentanoico
HTA	Hipertensión arterial
MP	Membrana plasmática
OMS	Organización Mundial de la Salud
PPAR	Por sus siglas en ingles: peroxisome proliferator activated receptor
RI	Resistencia a insulina
RPM	Revoluciones por minuto
SM	Síndrome Metabólico
SSF	Solución salina fisiológica
STZ	Estreptozotocina
TA	Tensión arterial

Resumen

La diabetes y la hipertensión son dos patologías estrechamente asociadas, ambas constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México. Es conocido que la diabetes tiene diversos efectos adversos que afectan a nivel reproductivo. En diversas investigaciones, se ha observado, que existen alteraciones en el sistema reproductor masculino. Entre las alteraciones que se han reportado se encuentran la reducción de vesícula seminal, próstata e hipogonadismo; además de daños en la espermatogénesis, como son, baja producción, disminución de la motilidad espermática, poco volumen seminal, y la pérdida total o parcial de la espermatogénesis, además se ha reportado que la deficiencia de ácidos grasos poli-insaturados (AGPIs) puede alterar la actividad de las células de Sertoli, y así provocar la degeneración de los túbulos seminíferos y disminuir la producción y motilidad espermática.

Para prevenir las alteraciones causadas por estas patologías, se ha sugerido el consumo de suplementos en la dieta, entre estos se encuentran los AGPIs, ya que estos pueden favorecer, la sensibilidad a la insulina, por medio de cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática.

Para estudiar el efecto de la diabetes y la hipertensión sobre la histología del testículo a los tres y seis meses. Se generó un modelo en SHR (ratas espontáneamente hipertensas por sus siglas en inglés). La inducción se realizó mediante una dosis única de 50 o 75 mg/kg de estreptozotocina (STZ) por vía intraperitoneal. Se realizó un seguimiento de la glucosa, peso, y presión arterial para confirmar el desarrollo de las patologías.

Al destetar, se administró un suplemento de ω -3 (aceite de linaza), 50 ml/kg de peso, 5 veces a la semana. Se realizaron sacrificios, al tercer y sexto mes de experimentación (5-6 individuos por lote), de cada individuo sacrificado, se extrajeron el conducto deferente y el testículo. Del conducto deferente se tomaron espermatozoides. Mediante un conteo, se evaluó los espermatozoides completos. Además los espermatozoides fueron capacitados en un medio mínimo capacitante durante tres horas, al terminar este lapso, se tiñeron con azul de Coomassie y se valoró el porcentaje de reacción acrosomal. Por otro lado, los testículos que fueron extraídos, uno fue tomado para realizar el estudio histopatológico, y evaluar las asociaciones celulares presentes en los cortes. El otro testículo se utilizó para evaluar la composición lipídica por cromatografía de gases.

En los lotes tratados con el suplemento de ω -3 se observó una disminución en los niveles de glucosa e hipertensión, al reducirse estos niveles, se observó también que el porcentaje de espermatozoides incompletos también disminuía. Cuando se controlaron los niveles de glicemia, el daño al tejido testicular también disminuyó. Esta disminución se reflejó en el porcentaje de asociaciones celulares presentes en los cortes, lo cual favorece, al desarrollo de la espermatogénesis. Los individuos con el tratamiento de ω -3, también presentaron un mayor porcentaje en la RA obtenida en espermatozoides capacitados.

I. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es uno de los problemas de salud pública más importantes. La frecuencia dentro de la población mexicana ha aumentado treinta veces dentro de los últimos 50 años. Tan solo en el IMSS se registran cada año cerca de 180 mil nuevos casos. De los casos reportados, es la diabetes tipo 2 la que se presenta con mayor frecuencia dentro de la población mexicana, entre el 90% y el 95% de los casos (Hernández-Ávila y Olaíz, 2002).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2), se caracteriza por la alteración de la actividad y la secreción de insulina. Tiene aspectos epidemiológicos característicos, y gran parte de la variación de su frecuencia, se debe a factores de riesgo identificados, como: factores genéticos, ambientales, obesidad, actividad física y la alimentación (Hernández-Ávila y Olaíz G, 2002).

Algunos de los factores de riesgo que pueden aumentar las probabilidades de padecer diabetes mellitus son: niveles de triglicéridos elevados en ayunas, dietas hipercalóricas, hipertensión arterial y obesidad, entre otros. La presión arterial puede ser uno de los factores determinantes, que conlleva a la incidencia de arteriopatía coronaria, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipertensión y alteraciones en los perfiles de hormonas sexuales (Le Roith y col., 2003). Además se considera que la obesidad antecede a la aparición de diabetes tipo 2, debido a que puede entorpecer la acción de la insulina (aumentan los valores de insulina plasmática, ácidos grasos libres, y niveles de glucosa en sangre) (Hernández-Ávila y Olaíz, 2002; Le Roith y col., 2003; Robbins y Stanley, 2004).

La hipertensión arterial y la diabetes mellitus son dos enfermedades, que constituyen una grave preocupación para la salud pública, ya que éstas se relacionan con las causas más frecuentes de incapacidad y muerte. La probabilidad de presentar hipertensión es mayor en una persona diabética, ya sea por alteraciones en el metabolismo de glucosa, o por el daño que causa la diabetes a nivel renal (Islas y Lifshite, 1999; Stern y Tuck, 2003). La presencia de la hipertensión agrava la resistencia a insulina, se ha observado una menor captación de glucosa en individuos hipertensos con DM2. Además se ha demostrado que la mejoría en el control de la glucemia, disminuye las complicaciones microvasculares en

individuos diabéticos (Hernández-Ávila y Olaíz, 2002; Hiriart, 2002; Le Roith y col., 2003; Robbins y Stanley, 2004; Lerman, 2005).

I.1. Páncreas

Es una glándula de secreción mixta, anexa al tubo digestivo; está ubicada en el abdomen por detrás y hacia la izquierda del estómago, adherida al intestino delgado y al bazo. Tiene un componente exocrino fundamental en la función digestiva. La cual es la responsable de la producción del jugo pancreático. Por otro lado, el componente endocrino secreta diferentes hormonas al torrente sanguíneo. Las células α producen glucagón, las células β insulina, mientras que las células δ y las F producen somatostatina, y el polipéptido pancreático respectivamente. Los cuatro diferentes tipos celulares, se agrupan entre los acinos pancreáticos, llamados islotes de Langerhans. De estas células las que más abundan, en el páncreas son las células β constituyendo un 70%, las α corresponden a un 20%, las δ entre 5 y 10%, siendo las células F las menos abundantes con tan sólo 2% del tejido pancreático (González y col. 2004). Las principales funciones de las células β pancreáticas, son la producción, almacenamiento, y secreción regulada, de insulina. En circunstancias normales, la célula β , mantiene un estado en el que siempre hay un depósito fácilmente disponible de insulina que puede secretarse con rapidez en respuesta de un estímulo como es el aumento de glucosa en sangre (LeRoith y col., 2003).

I.2. Insulina

La insulina procede de una cadena precursora con 84 aminoácidos (aa), llamada preproinsulina. Sólo después de que se han formado sus dos enlaces disulfuro, la proinsulina se convierte en la hormona activa con dos cadenas, por escisión proteolítica de un segmento de 33 aa conocido como péptido C. Es una hormona polipeptídica con 51 aa, constituida por dos cadenas polipeptídicas: una cadena A con 21 aa, y una B de 30 aa. Las cadenas quedan unidas entre sí por dos puentes disulfuro. La cadena A tiene un puente disulfuro intrínseco, que une las cisteínas de las posiciones 6 y 11 entre sí. (Voet y Voet, 1992). Con una vida media en el plasma de 5-6 minutos. La insulina suele considerarse como el regulador principal de la glucemia (concentración sanguínea de glucosa). Además hoy en día también se sabe que cumple una función primordial en el

control del metabolismo de lípidos y proteínas. (LeRoit y col. 2003). La cantidad de insulina liberada por día en un sujeto sano con una alimentación normal es de 40-50 unidades (287-358 nano-moles). La concentración en ayuno es de 10 $\mu\text{U/ml}$. Después de una comida se eleva alrededor de 100 $\mu\text{U/ml}$ (Voet y Voet, 1992; González y col., 2004).

I.2.1. Liberación de la insulina

La secreción de insulina en respuesta a la glucosa se lleva a cabo de la siguiente manera. La glucosa entra a las células β a través de un transportador GLUT 2. Al entrar a la célula β es fosforilada por la glucocinasa, para formar glucosa-6-fosfato e iniciar la glucólisis. Obteniendo ácido pirúvico, el cual entra a la cadena respiratoria en forma de acetil-CoA por medio del complejo de la piruvato-deshidrogenasa. La activación de la cadena respiratoria produce una concentración elevada de ATP en la célula y el cierre del canal de potasio dependiente de ATP, con la consecuente cascada de eventos que culminan en la liberación de insulina, la cual es secretada por las células β del páncreas (Fig. 1) (Fernández-Mejía, 1996; González y col., 2004).

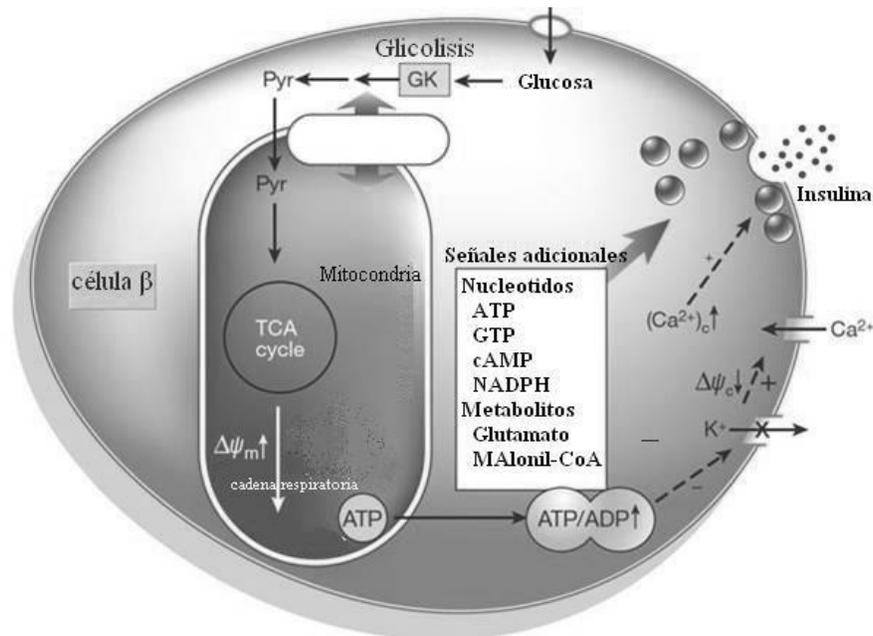


Figura 1. Síntesis y secreción de insulina. (González y col., 2004)

I.2.2. Receptor de insulina

Es una glucoproteína tetramérica transmembranal que está presente en las superficies de prácticamente todas las células de los mamíferos, con un número de copias por célula desde 102 hasta 105, dependiendo del tejido. Sin embargo la acción más importante de la insulina se lleva a cabo en el tejido muscular estriado y cardiaco, así como en adipocitos y hepatocitos (Voet y Voet, 1992). El receptor está constituido por dos unidades denominadas α localizadas en la parte externa de la membrana (719 aa), a las cuales se une la insulina, y dos subunidades β que penetran la membrana y que poseen en sí mismas actividad catalítica de tirosín-cinasa. (Fig.2) La unión de la insulina con las subunidades α desencadena una serie de autofosforilaciones de las porciones intracelulares de las cadenas β . Dichas autofosforilaciones desencadenan a su vez una cascada de fosforilaciones de tirosina cinasa de diversas proteínas citoplasmáticas, esas fosforilaciones traducen la señal de la insulina en acciones rápidas (Fernández-Mejía, 1996; Mendivil y Sierra, 2005).

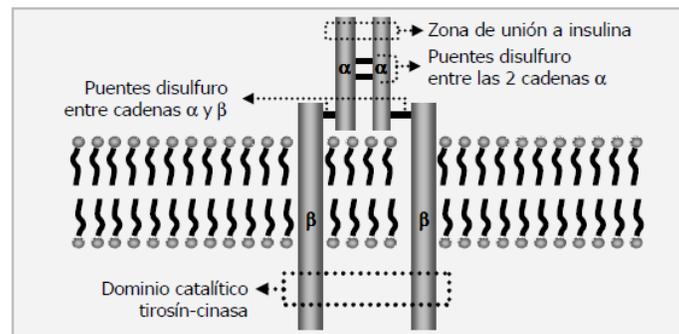


Figura 2. Receptor de insulina. (Mendivil y Sierra, 2005)

I.2.3. La resistencia a insulina (RI)

Se define como la disminución de la capacidad de la insulina para ejercer sus acciones biológicas en tejidos tales como músculo esquelético, hígado o tejido adiposo. Actualmente se considera que la RI puede ser crónica o mantenida, es la base común de numerosas enfermedades metabólicas y no metabólicas, como la DM2, la obesidad, las dislipidemias y las enfermedades cardiovasculares. La resistencia a insulina es considerada como uno de los componentes del síndrome metabólico (SM), el cual se caracteriza por la presencia simultánea o secuencial de algunas de las siguientes alteraciones: RI, hiperinsulinemia, DM2, altos niveles de triglicéridos, obesidad central,

hipertensión arterial (HTA) (Martínez y col., 2003). La actividad de la insulina, se puede ver afectada por la hipertensión arterial así como por el grado de obesidad. Otra hipótesis sobre el vínculo entre la resistencia a insulina y la hipertensión, es el efecto adverso que tiene a largo plazo la hipertensión sobre los vasos (arterias o vasos finos). Al perder la función de dichos vasos, se puede disminuir el aporte de glucosa a los tejidos, y con ello aminorar la utilización de dicho carbohidrato mediada por insulina (Le Roith y col., 2003).

I.3. Diabetes

Diabetes mellitus, comprende un grupo heterogéneo de trastornos, caracterizados por una concentración anormalmente alta de glucosa en la sangre. Las causas de la hiperglucemia son deficiencia de secreción de insulina o resistencia de las células del cuerpo, a la acción de ésta. Además, ocurren alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas, y proteínas. La diabetes es un síndrome que comprende un grupo heterogéneo de enfermedades y que tienen causas distintas, aunque sus efectos patológicos son similares una vez que comienzan. Existen diversos factores que pueden desencadenar la DM, entre ellos los factores genéticos y ambientales. Estos factores pueden ser una disminución en la secreción de insulina, un menor consumo de glucosa, y un aumento de la producción de glucosa hepática. Aunque la diabetes se caracteriza por la hiperglicemia, la etiología puede ser diversa. Algunas formas de la diabetes se caracterizan por la ausencia absoluta de insulina, mientras que otras formas tienen en común la resistencia a la insulina (Harrison, 2002; Le Roith y col., 2003).

I.3.1. Clasificación

- **Diabetes mellitus tipo 1 (DM1)**

Es la variedad más frecuente en los niños y adolescentes. Corresponde a un 5 a 10% de los casos de síndrome diabético. Es causada por la destrucción de las células β , a menudo de tipo inmunitario, originando así la pérdida de la secreción de la insulina y deficiencia insulínica. Se caracteriza, por el comienzo repentino de síntomas intensos, la necesidad de administrar insulina exógena y la tendencia a la cetosis incluso en el estado basal, todo ello producido por la deficiencia absoluta de insulina.

En el inicio de la enfermedad la hiperglucemia se manifiesta cuando grandes cantidades de insulina son requeridas para mantener la homeostásis de la glucosa. A

medida que la destrucción de las células β progresa, los niveles de insulina decrecen produciendo un aumento en la concentración de glucosa en sangre. La falta de insulina produce la disminución de la entrada de glucosa al músculo y al tejido adiposo. Por otro lado la disminución de insulina y el aumento de glucagón en el hígado, produce un aumento en la degradación del glucógeno y un aumento en la vía de gluconeogénesis, ocasionando un aumento adicional de glucosa plasmática. Este exceso sobrepasa la capacidad de absorción del riñón y como consecuencia se pierde glucosa por la orina (glucosuria), arrastrando consigo agua y sales, manifestando poliuria y polidipsia. La escasez de glucosa como fuente de energía en el interior de las células da como consecuencia la necesidad de utilización de grasas desde el tejido adiposo, y degradación de proteínas principalmente musculares para la obtención de aminoácidos, produciendo una pérdida de peso. La degradación de aminoácidos aumenta la producción de urea, y balance negativo de nitrógeno. (Fernández-Mejía, 1996)

- **Diabetes mellitus tipo 2 (DM2)**

Es la forma más común de diabetes mellitus; anteriormente conocida como diabetes no insulino dependiente. Corresponde de un 90 a 95% de los casos de diabetes. Causada por la combinación de factores genéticos y no genéticos, que en consecuencia originan resistencia a la insulina y deficiencia en la acción de la insulina. No se conocen los genes específicos, pero se les investiga de manera intensiva. Algunos de los factores no genéticos son la edad avanzada consumo excesivo de calorías, sobrepeso, vida sedentaria y bajo peso al nacer. En la mayoría de los casos este tipo de diabetes involucra un estado prediabético caracterizado por hiperinsulinemia asociado con una incapacidad del músculo y el tejido adiposo de incorporar al interior de sus células la glucosa en respuesta a las concentraciones normales de insulina, a este fenómeno se le conoce como resistencia a la insulina (Fernández-Mejía, 1996, Le Roith y col., 2003).

A diferencia de la DM1 donde la falta de insulina es evidente, el desencadenamiento de la DM2 está asociado principalmente con una resistencia a la insulina, es decir, que disminuye la respuesta biológica a la insulina a concentraciones normales, requiriendo mayor cantidad de insulina para obtener su funcionalidad. Las células β no son capaces de producir la cantidad extra de insulina para contrarrestar los efectos de la

resistencia, y es en esta etapa donde se hace evidente la elevación anormal de la glucosa, esta incapacidad es el evento crítico en el desarrollo de la DM2. Además, los pacientes presentan; altos contenidos de triglicéridos plasmáticos, presión arterial elevada y distribución del tejido adiposo en la parte superior, principalmente en la parte intra-abdominal (Fernández-Mejía, 1996).

- **Otros tipos específicos de diabetes mellitus**

Estas variedades comprenden un grupo causal heterogéneo que abarca los casos de diabetes en que las causas se establecen o se conocen parcialmente. Estas causas comprenden defectos genéticos conocidos que alteran el funcionamiento de las células β o la acción insulínica, trastornos del páncreas exocrino, endocrinopatías, cambios pancreáticos medicamentosos o químicos, enfermedades y situaciones en que la frecuencia de la diabetes se eleva en grado considerable pero aún no se ha establecido una causa precisa. Representa entre 1 y 2% de los casos de síndrome diabético (Poretsky, 2002).

- **Diabetes mellitus gestacional**

Ocasionada por resistencia insulínica y deficiencia relativa de insulina durante el embarazo, Ocurre en 3 a 5 % de los embarazos (Poretsky, 2002).

I.3.2. Diabetes experimental

La diabetes puede ser inducida de manera experimental en animales de laboratorio, utilizando sustancias químicas que alteran la función pancreática, por ejemplo: la estreptozotocina (STZ), que dependiendo de la dosis utilizada y la edad en la cual sea administrada, puede inducir la diabetes tipo I ó II. Debido a que la sustancia altera la oxidación de la glucosa y disminuye la secreción y biosíntesis de la insulina. La STZ es una droga que causa toxicidad en las células β , provoca alteraciones en el metabolismo celular y la destrucción de las células β , provocando así alteraciones en el metabolismo de glucosa y la inducción de la diabetes (Fig.3) (Hugues y Rodríguez, 2001; Skudelski, 2001).

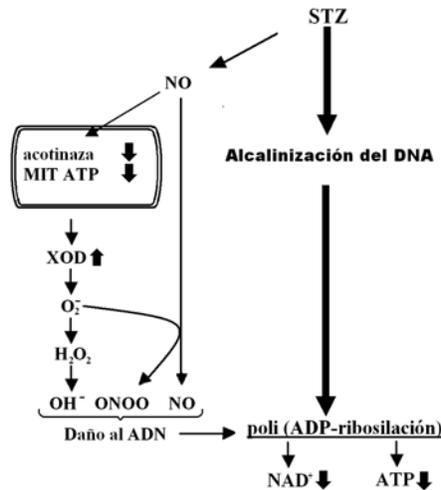


Figura 3. Mecanismo de acción de la estreptozotocina (STZ). Induce una serie de eventos tóxicos en las células β del páncreas, MIT—mitocondria; XOD— xantina oxidasa (Skudelski, 2001)

I.3.3. Complicaciones de la diabetes

Afectan primordialmente el sistema vascular y origina cifras excesivas de arteriopatía coronaria, nefropatía e insuficiencia renal, retinopatía y ceguera, enfermedad vascular periférica neuropatía y amputaciones. Estas complicaciones originan gran parte de los casos de morbilidad y exceso de mortalidad vinculados con la DM. Se ha acumulado información considerable respecto a las características epidemiológicas de la DM2, en particular desde que se adoptaron criterios internacionales para su diagnóstico (NDDG, 1979)

Por otro lado, se ha reportado que la diabetes tiene efectos adversos en las funciones reproductivas las cuales incluyen impotencia, reducción de libido y esterilidad, así como daños en la espermatogénesis (baja producción y motilidad de espermatozoides), y poco volumen de fluido seminal (Soudomani y Yuvaraj, 2005). Además, se ha observado que en ratas diabéticas, la vesícula seminal, próstata y los testículos, presentan una reducción significativa en el tamaño, así como la pérdida total o parcial de la espermatogénesis (Oksanen, 1975; Soudomani y Yuvaraj, 2005).

La diabetes puede ocasionar alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, esto implica daños en la función testicular (Zarate y col., 1989). Además, puede provocar la disminución de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que

son dos hormonas importantes para la regulación de la espermatogénesis (FSH), y funciones de las células de Leydig (LH). El decremento de las hormonas causa la disfunción sexual, la impotencia, infertilidad y eyaculación retrograda que ha sido descrita en hombres y en modelos de ratas diabéticas (Khan y col., 1992). Otras investigaciones han mostrado en ratas con diabetes una baja producción y casi nula motilidad en espermatozoides, así como la pérdida de fluidos seminales y la disminución del peso de los órganos reproductores (Hassan, y Hassouna, 1993).

Además, la fertilidad masculina es críticamente dependiente de la concentración intratesticular normal de testosterona, ya que es el soporte cualitativo y cuantitativo de la espermatogénesis (Murray, 1994).

I.4. Hipertensión

Tradicionalmente se consideraba a la hipertensión arterial como el proceso hemodinámico en el cual la resistencia al flujo sanguíneo se encuentra elevada, en la actualidad se define como la pérdida del tono de vasodilatación del sistema circulatorio (Cruz Corchado, 2001).

Siendo la hipertensión un trastorno regulado por la presión sanguínea, y al encontrarse elevada, lesiona el corazón, los vasos sanguíneos y los riñones, por lo menos en las etapas iniciales la hipertensión no causa alteraciones obvias de la función cardiovascular (Oparil y Weber, 2000).

Las cifras de tensión arterial (TA) normal están definidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Sociedad Internacional de Hipertensión y el Comité para la Detección Evaluación y Tratamiento de los Institutos de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (CDETH). Son: < 90 mmHg como diastólica y sistólica inferior a 140 mmHg (Cruz Corchado, 2001). Se considera una hipertensión arterial (HTA), cuando la arterial es mayor a 140/90 mmHg. Entre las enfermedades asociadas con HTA como: la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, insuficiencia cardiaca, e insuficiencia renal, aumenta a medida que se eleva la presión arterial sistólica y diastólica. La hipertensión sistólica, aislada de los ancianos también se asocia con un aumento de las complicaciones cardiovasculares y vasculares cerebrales (Shubhada y col., 2001; Kaplan, 1999).

Actualmente la etiología de la HTA es poco clara, sin embargo hay avances en el conocimiento de la participación del endotelio vascular y sus productos, los nexos fisiopatológicos con otras entidades como la DM, la obesidad a través de la resistencia a la insulina y el papel de los distintos cationes, en el desarrollo de la hipertensión arterial. La hipertensión es más frecuente en las personas con diabetes mellitus, que en la población en general. Es frecuente la coexistencia de dos cuadros: la hipertensión esencial y DM; ya que la DM es un factor que aumenta la prevalencia de hipertensión, ya sea por la alteración en el metabolismo de la insulina o por el daño que causa la diabetes a nivel renal (Cruz Corchado, 2001; Stern y Tuck, 2003).

I.4.1. Clasificación de la hipertensión

La hipertensión arterial se puede clasificar en:

- **Hipertensión esencial o primaria**

En esta variedad, el aumento de las cifras de presión arterial no tiene una causa identificable, representa alrededor de 80% de casos.

- **Hipertensión secundaria**

Es aquélla en la cual hay un causa identificable; esta variedad, cuando se diagnostica y se trata a tiempo, es potencialmente curable, corresponde de 10-15% de lo casos de hipertensión.

- **Hipertensión sistólica aislada**

Se define como cifras de presión arterial sistólica >140 mmHg, con cifras diastólicas normales, es común después de los 60 años de edad.

- **Seudo-hipertensión**

En algunos pacientes, las cifras registradas por el método no reflejan los valores reales, que presenta el paciente, en particular cuando la pared arterial se encuentra calcificada y no puede ser comprimida por el brazalete. Para llegar al diagnóstico en este caso, es necesario aplicar la maniobra de Osler (palpación del pulso radical para detectar inicio y fin del latido), así como fijar las cifras sistólicas en el momento en el cual se siente por primera vez el latido).

- **Hipertensión de bata blanca**

Esta variedad se da en pacientes con cifras de presión arterial mayores a las manejadas de manera ambulatoria, sin presentar de manera habitual daño a órganos blanco.

I.5. Diabetes, hipertensión arterial y ácidos grasos (AG)

Los ácidos grasos, son ácidos carboxílicos con cadenas laterales hidrocarbonadas largas. Raramente se encuentran libres en la naturaleza, más bien se hallan en forma esterificada como componentes mayoritarios de diversos lípidos. El tipo de AG que forman los fosfolípidos, la cantidad de colesterol entre otros componentes membranales, influyen en la fluidez membranal (Voet y Voet, 1992).

La mayoría de los ácidos grasos pueden ser sintetizados por el hígado, pero los humanos carecen de desaturasa necesaria para producir la serie de los ácidos grasos ω -3 y ω -6, que son los llamados ácidos grasos esenciales, los cuales deben de incorporarse a través de la dieta. (Simopoulos, 1999; Caballero y col., 2006).

Además de ser fuente energética, los AG los se incorporan a las membranas de las células donde son precursores de los eicosanoides, que modulan numerosas reacciones y fisiopatologías, tales como, reacciones inflamatorias, regulación de la presión arterial, coagulación sanguínea, trombosis, entre otras. Los eicosanoides, incluyen a las prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos, lipotoxinas y ácidos hidroxilados (Lahoz y col., 1997; Covarrubias y Ortega, 2002).

Una dieta equilibrada debe de estar constituida por el 2% de ácido linoleico y, al menos el 0,5% de ácido linolénico en el consumo calórico diario, para prevenir una deficiencia de ácidos grasos esenciales. Sin embargo, estas proporciones se han modificado de forma drástica en los países occidentales siendo de hasta una proporción de 1:30 de ácido linolénico-ácido linoleico, esto debido a la dieta “moderna” donde se consume una mayor cantidad de de AG ω -6, por la ingesta de aceites vegetales (maíz, soja y girasol), y carne de origen animal, particularmente de rumiantes (Shubhada y col., 2001).

Los ácidos grasos provenientes de la dieta se ensamblan en el enterocito en forma de lipoproteínas y éstas se unen de manera específica a través de proteínas a receptores celulares en los tejidos donde son hidrolizados, captados y transportados hasta el retículo endoplásmico donde son modificados y ensamblados en vesículas junto con proteínas y otras moléculas. La modificación continúa en el aparato de Golgi (Fig. 4) y son transportados hasta las diferentes membranas de la célula (Rodríguez-Cruz M, y col., 2005).

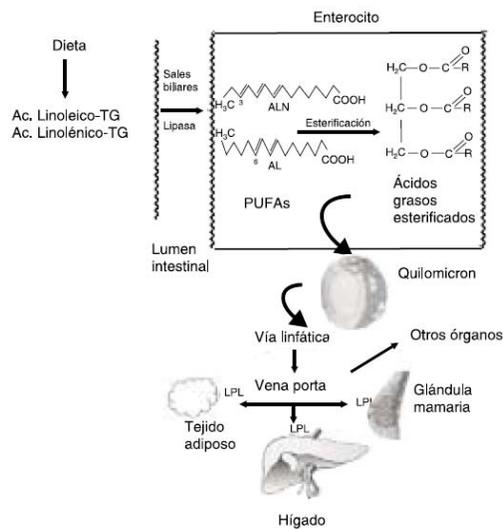


Figura 4. Metabolismo de los ácidos grasos indispensables indicando los principales destinos metabólicos de estos ácidos grasos (Rodríguez-Cruz M, y col., 2005)

Los elevados niveles circulantes de ácidos grasos libres (mayores a 20 mg/dl) aumentan la secreción de la insulina cuando la célula β es estimulada por la glucosa y parece ser que los diferentes tipos de ácidos grasos no poseen igual potencia insulínica. Se ha encontrado que los AG en presencia de glucosa aumentan la liberación de insulina. Esta respuesta fue diferencial y dependía del AG administrado; así, a mayor longitud de la cadena del AG más cantidad de insulina liberada y a mayor saturación del AG menor la cantidad de insulina liberada. Por lo tanto sugieren que las grasas saturadas pueden disminuir la sensibilidad a la insulina (Rodríguez-Cruz M, y col., 2005; Pérez E y Guerrero C, 2006).

Investigaciones previas han demostrado que una dieta deficiente de ácidos grasos esenciales en ratas macho, los testículos presentaban un tamaño reducido, e

histológicamente los túbulos seminíferos presentaban una degeneración, con pérdida progresiva de las células germinales, y con una ausencia de espermatozoides en las luces de los túbulos seminíferos y del epididimo. En cuanto a la composición de ácidos grasos se observó una reducción del araquidónico y del ácido docosapentaenoico. Concluyendo que el ácido linolénico no puede sustituir el ácido linoleico en el desarrollo de los testículos de ratas (Marzouki y Coniglio, 1982). Además, otros autores han reportado que una variación en la concentración de ácidos grasos en la dieta provoca un cambio en la composición de los mismos en muchos tipos de células entre ellas se encuentran las células de Sertoli y en las células germinales primordiales (Álvarez y col., 2001).

I.6. Espermatogénesis

Es la producción de espermatozoides desde las células germinales primordiales, y los procesos en los cuales las espermatogonias se someten a una compleja serie de divisiones para dar lugar a los espermatozoides. Este proceso se lleva a cabo en el epitelio seminífero (estructura compleja compuesta de células germinales, células de Sertoli, que nutren y protegen a las células espermáticas en desarrollo y las células de Leydig) (Gilbert, 2005).

En las ratas la espermatogénesis comienza a desarrollarse aproximadamente al cuarto día después del nacimiento. Cuando las células germinales se transforman a espermatogonias tipo A. Estas células, se dividen varias veces hasta llegar a espermatogonia tipo A_4 , teniendo tres opciones, transformarse en otra espermatogonia tipo A_4 , experimentar apoptosis, o diferenciarse en espermatogonia intermedia, comprometida así a convertirse en espermatogonia tipo B. Las espermatogonias son las precursoras de los espermatoцитos primarios y son las últimas células en la línea que experimentan mitosis. Enseguida los espermatoцитos primarios experimentan la primera división meiótica, para producir un par de espermatoцитos secundarios, y al completar la segunda división meiótica, estas células haploides reciben el nombre de espermátides. Concluido el proceso meiótico; las células entran al último proceso de diferenciación conocido como espermiogénesis (la formación de la vesícula acrosómica, rotación y condensación del núcleo, eliminación del exceso de citoplasma y formación del flagelo). Después de 45 a 50 días del nacimiento, el primer espermatozoide es producido (Jiménez-García y Merchant, 2003; Gilbert, 2005).

I.6.1. Espermatozoide

Es una célula haploide y diferenciada, especializada para la reproducción sexual. Compuesta en dos regiones principales: la cabeza y el flagelo, y a su vez esos se dividen en segmentos más específicos. La cabeza constituida principalmente por el acrosoma, la cromatina altamente condensada y rodeada por una membrana. El flagelo contiene un axonema central rodeado por fibras externas, densas que se extienden desde la cabeza hasta el extremo posterior. La parte anterior contiene mitocondrias enrolladas alrededor de las fibras densas y la parte posterior contiene una vaina fibrosa que rodea a las fibras densas externas (citoesqueleto del flagelo) Tanto el flagelo como la cabeza están cubiertos por una membrana plasmática que contiene un citoplasma escaso (Fig. 5) (Jiménez-García y Merchant, 2003).

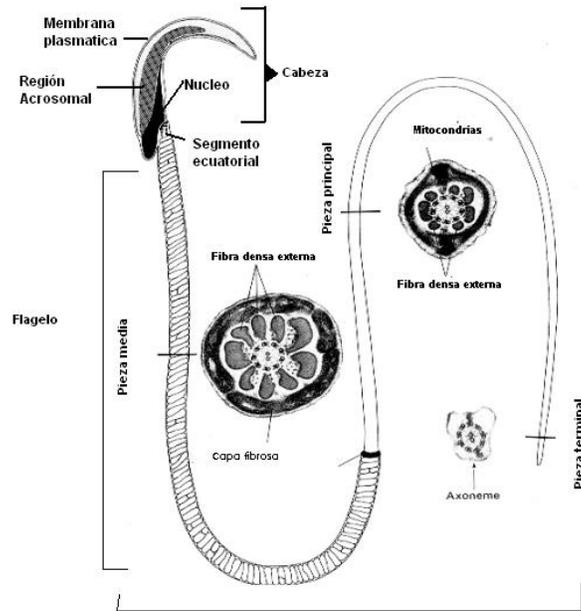


Figura 5. Espermatozoide de rata. Esquema que muestra las partes que conforman el espermatozoide de rata.

I.6.2. Capacitación y reacción acrosomal (RA)

Los espermatozoides de varias especies de mamíferos, no pueden fertilizar a los ovocitos inmediatamente después de ser eyaculados, sino que adquieren esta capacidad después de permanecer en el tracto reproductor de la hembra. Los cambios morfológicos y bioquímicos que hacen a los espermatozoides capaces de desarrollar la reacción

acrosomal (RA) y fertilizar, son llamados colectivamente “capacitación (Jiménez-García y Merchant, 2003). Durante la capacitación, los espermatozoides modifican su membrana plasmática, permeabilidad, fluidez y ocurre un arreglo o alteración de las proteínas de la superficie espermática. Además, el espermatozoide desarrolla una hiperactivación del flagelo, y un aumento en el flujo de iones calcio y HCO_3 (Baldi y col., 2000).

La RA, es un proceso de exocitosis regulada, que depende de calcio extracelular, el resultado neto, es la fusión de la membrana plasmática del espermatozoide con la membrana acrosomal externa en múltiples sitios. La fusión promueve la liberación del contenido acrosomal que está constituido de una serie de enzimas hidrolíticas, que permite al espermatozoide penetrar la granulosa y zona pelucida (Yanagimachi y Usui, 1974). Adicionalmente, la RA, genera un nuevo dominio en la MP del óvulo y se fusionan entre sí produciéndose la fertilización (Yanagimachi y Usui, 1974). Aunque la rata es uno de los animales de laboratorio más utilizados, se sabe muy poco sobre la naturaleza química de agonistas que inducen la AR en esta especie. La falta de esta información se debe principalmente al hecho de que el espermatozoide de rata tiene un acrosoma con una estructura relativamente delgada. Por lo tanto, es difícil evaluar la situación del acrosoma de esta especie. Se sabe que, la tinción con azul Coomassie, permite evaluar la situación del acrosoma del espermatozoide de esta especie por microscopía de luz (Fig. 6) (Bendahmane y col., 2002).

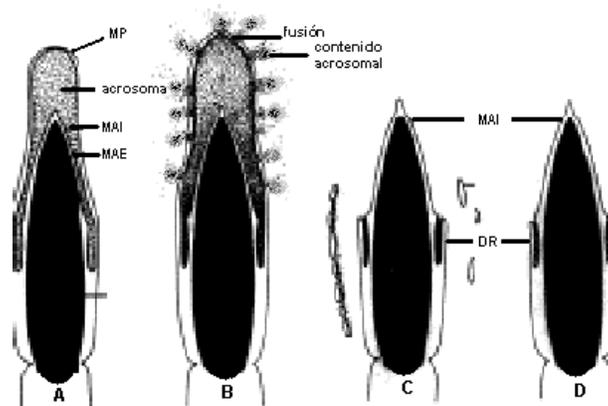


Figura 6.- Principales cambios en la membrana del espermatozoide durante la reacción acrosomal. A) cabeza de espermatozoide con acrosoma intacto, previo a la reacción acrosomal; **B)** inicio de la reacción acrosomal, se observan múltiples sitios de fusión de la membrana plasmática (MP) y la membrana acrosomal externa (MAE), que permiten la liberación del contenido acrosomal; **C)** La reacción acrosomal terminada; **D)** la membrana acrosomal interna (MAI), queda expuesta, parte de la MAE y MP que fueron fusionadas dan lugar a un nuevo dominio de reconocimiento (DR) en la región ecuatorial de la cabeza del espermatozoide (Bendahmane y col., 2002)

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Evaluar el efecto del aceite de linaza (rico en α -linolénico), como suplemento alimenticio en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), con DM2 sobre la histología del testículo y en gametos capacitados con RA.

II.2. Objetivo Particulares

- Generar DM2 en neonatos macho de ratas espontáneamente hipertensas (SHR), a través de una dosis única de 50 o 75 mg/Kg de estreptozotocina (vía IP).
- Corroborar el desarrollo de la hiperglucemia (6 meses).
- Valorar por cortes histológicos los diferentes estadios celulares en túbulos seminíferos.
- Valorar por microscopia óptica los espermatozoides completos obtenidos del conducto deferente de.
- Valorar la RA en espermatozoides capacitados de individuos SHR con DM2.
- Analizar por cromatografía de gases la composición de A.G. en gónadas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Reactivos

Los reactivos fueron de grado analítico, excepto el hexano que fue de grado HPLC. La estreptozotocina, Triton X-100, cloruro de amonio (NH_4Cl), trifluoruro de amonio (BF_3), ácido piruvico, ácido láctico, albúmina sérica de bovino (BSA), benzoato de metilo, glicerina, alcohol absoluto, alcohol etílico, y gelatina Knox, fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Dextrosa, acetona, cloroformo, xilol, cloruro de sodio (NaCl), Cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl_2), sulfato de magnesio (MgSO_4), carbonato de sodio (NaHCO_3) sulfato de cromo y potasio $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$, hexano y metanol, fueron obtenidos de J.T. Baker. El formaldehido y el paraformaldehido, fueron adquiridos con MP Biomedicals, Ing. El fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), hematoxilina de Harris, Eosina amarillenta, parafina para inclusión, entellan, fueron comprados a Merck (Darmstadt, Germany).

III.2. Inducción de la diabetes

Para generar el modelo de diabetes tipo 2 (DM2), en SHR, se ocuparon machos neonatos de 48 hrs. de vida, a los cuales se les administró una dosis única de 50 mg/kg ó 75mg/kg, de estreptozotocina (STZ) en 50 μl de amortiguador de citratos (pH 4.5) vía intraperitoneal, como lo describen Areas y colaboradores (2003). Para valorar la concentración de glucosa en sangre se utilizó un glucómetro marca Digiview y tiras reactivas. Las determinaciones fueron realizadas una vez por semana hasta el sacrificio de los individuos.

III.3. Modelo experimental (Tratamientos administrados)

Las ratas al ser destetadas, se repartieron aleatoriamente en seis lotes de doce individuos cada uno. Estos individuos fueron alojados en cajas de acrílico y mantenidas bajo las mismas condiciones, a una temperatura de 22°C, 12 h luz y 12 h oscuridad durante el tiempo que duró el proyecto, en el bioterio de la FES-I.

Cada lote recibió un tratamiento diferente; los cuales se describen a continuación: el primer lote, es el lote control de SHR; el segundo lote de SHR se le administró el suplemento de omega 3 (ω -3); al tercer lote le fue administrada una dosis de 50 mg/kg de

STZ; el cuarto grupo además de administrarle una dosis de 50 mg/kg de STZ, consumió un suplemento de ω -3; al quinto grupo se le administró una dosis de 75 mg/kg de STZ, y el sexto grupo consumió el suplemento de ω -3 además de la dosis de STZ (75 mg/kg) (Tabla 1).

Los grupos recibieron alimento (pellets) y agua *ad libitum*, además, el suplemento de ácidos grasos se suministró cinco veces por semana, durante un periodo de 6 meses (a una dosis de 120mg/Kg de peso).

Tabla 1, Grupos experimentales y tiempos que duro el tratamiento.

SHR destetadas y tratadas durante 3 y 6 meses de edad (n=6)	
Lotes Control	Lotes Tratados (ω -3)
SHR Control	SHR Control ω -3
SHR STZ-50mg/Kg	SHR STZ-50mg/Kg ω -3
SHR STZ 75mg/Kg	SHR STZ 75mg/Kg ω -3

Los sacrificios se realizaron al 3^{er} y 6^{to} mes de experimentación. En cada sacrificio se utilizaron de cinco a seis individuos por lote.

III.4. Obtención de gónadas y de conductos deferentes

Para extraer las gónadas masculinas de rata, se sacrificó el animal por medio de una sobredosis de pentobarbital 40 mg/Kg de peso corporal. Colocándolo en una posición decúbito dorsal, extendiendo las extremidades en una base metálica mediante cinta adhesiva. Se realizó una incisión ventral sobre la línea media de la piel a la altura de los genitales teniendo cuidado de no cortar o lesionar órganos. La piel se separó con los músculos subcutáneos para dejar al descubierto la mayor parte del tejido conectivo subcutáneo y estriado esquelético. Una vez hecho lo anterior fue localizado el conducto deferente y ligado con hilo de la región superior para evitar perder la muestra espermática. El testículo fue extraído junto con el conducto deferente y lavados con solución salina fisiológica (SSF) al 0.15 M a 37°C. El conducto deferente fue aislado, retirando arterias, venas y exceso de grasa para evitar contaminar las muestras con células sanguíneas y de esa manera obtener la muestra espermática. Por otro lado el testículo fue pesado en la balanza analítica. Uno de ellos fue fijado con paraformaldehído al 4% en ácido pícrico para su posterior estudio histológico. El otro testículo fue congelado

y homogeneizado para la extracción de lípidos mediante el método de Folch (1957) para analizar la concentración de ácidos grasos por cromatografía de gases.

III.5. Obtención de la muestra espermática

Los espermatozoides de rata fueron obtenidos de conducto deferente, se lavaron dos veces mediante centrifugación/resuspensión (3000rpm) en NaCl 0.154M y se ajustó la concentración a 1×10^6 células/mL, como lo describe Trejo y Mujica (1990). Para su capacitación, las células se incubaron a 37°C, durante 0, 90 y 180 minutos, en el medio mínimo de cultivo suplementado con NaCl, 119.4mM; KCl, 4.8mM; CaCl₂, 1.0mM; MgSO₄, 1.2mM; KH₂PO₄, 1.2mM; dextrosa, 5mM; ácido láctico, 21mM; ácido pirúvico, 0.25mM; y NaHCO₃, 25mM; pH 7.4. (Bendahmane y col., 2002). Al término del tiempo de incubación correspondiente, la suspensión espermática, fue fijada en formaldehído al 3% en PBS por 1 h. Los espermatozoides no capacitados, capacitados y gametos con RA fijados, fueron lavados dos veces con PBS mediante centrifugación/resuspensión (NaCl 0.14mM, KCl 2.7mM, KH₂PO₄ 1.5 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, pH 7.4). Enseguida las pastillas de células fueron resuspendidas en 1 mL, de NH₄Cl (50mM en PBS), e incubados durante 10 minutos, y lavados nuevamente por centrifugación /resuspensión en PBS, posteriormente en agua bidestilada. Esta última suspensión fue utilizada para preparar, frotis de las diferentes muestras. La cuales se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente algunas de estas laminillas fueron teñidas con azul de Coomassie y observadas al microscopio, para valorar el porcentaje de reacción acrosomal obtenida (Bendahmane y col., 2002).

III.6. HISTOLOGÍA

III.6.1. Procesamiento de la muestra para el estudio histológico

a) Inclusión en parafina

De los testículos que se obtuvieron. Uno de ellos fue fijado en una solución de paraformaldehído al 4% en ácido pícrico, durante 72 h. Transcurrido el tiempo el testículo fue lavado en alcohol al 70% durante 24 h. y después en agua destilada, para eliminar los restos de paraformaldehído (2%) y picrato (15%). Posteriormente el órgano fue deshidratado en alcoholes a diferentes concentraciones (40, 50, 60, 70, 80, 90, 96, y 100%), en intervalos de 60 minutos. Enseguida la muestra fue aclarada con una solución

de xilol-etanol (1:1) por 30 minutos, después en una solución de xilol (100%) durante 15 min. Finalmente, el órgano es infiltrado durante 24 h en parafina (a 57-60°C), Finalmente fue incluido en un bloque de parafina, con su respectiva identificación para su corte.

Los bloques solidificados fueron conservados en refrigeración a 4° C hasta su corte. Se realizaron cortes del tejido testicular con un grosor de 3-5 micras en microtomo (Leica, modelo RM2125RT) y se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados

b) Preparación de portaobjetos para el montaje de muestras

Los portaobjetos previamente lavados y desengrasados se colocaron durante 15 min. en una solución de grenetina knox, (CrKSO_4 y grenetina), transcurrido ese tiempo se dejaron escurrir por 2 h. El procedimiento se repitió 2 veces más. Finalmente se dejaron secar toda la noche.

c) Montaje de los cortes

Una vez hecho el corte, es colocado en un portaobjetos previamente gelatinizado, enseguida se añadió Ruyter (gotas) para extender el tejido y a su vez fijarlo al portaobjeto. Y se colocó en una parrilla (Leica, HI1220) a 40°C, para aumentar la adhesión del tejido al portaobjeto.

Finalmente los cortes fueron teñidos con Hematoxilina- Eosina (H-E), previamente las muestras obtenidas fueron colocadas en una canastilla y en un horno (Felisa) a 60°C durante 60 min. antes de teñirse para mejorar el pegado y retirar el exceso de parafina en los cortes.

d) Tinción con Hematoxilina-Eosina (H-E)

Se dejaron enfriar las muestras, y posteriormente fueron teñidas como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Metodología utilizada para la tinción con H-E

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

Muestra el procedimiento seguido para la tinción de los cortes histológicos, por la técnica de Hematoxilina-Eosina (Luna, 1958).

III.7. Extracción y determinación de lípidos totales del tejido testicular

III.7.1. Método de Folch

Para la extracción de lípidos se aplicó el método de Folch (1957). La mezcla cloroformo:metanol 2:1 extrae el total de lípidos. La extracción y purificación de los lípidos en el tejido animal se desarrolló en dos operaciones: 1) Extracción de lípidos con mezcla

cloroformo:metanol 2:1 del tejido previamente homogeneizado 2) para eliminar las sustancias no lipídicas localizadas en el filtrado se adicionó un volumen de 20% agua bidestilada. Un sistema bifásico fue obtenido, donde se pudo separar la fase polar de la no polar. La fase superior fue desechada y la fase inferior contenía esencialmente el total de lípidos de los tejidos.

III.7.2. Procedimiento

III.7.2.1. Extracción de los lípidos

Se tomó 1 g de tejido y fue homogeneizado con 19 ml de mezcla solvente cloroformo-metanol 2:1, durante 5 min. a 4°C. El tejido se disgregó en un homogenizador Potter-Elvehjem de vidrio por unos minutos y posteriormente se filtró en papel filtro libre de grasa.

III.7.2.2. Lavado del extracto

El volumen del extracto total fue medido y se adicionó 20% de agua bidestilada. Se mezcló y se centrifugó a 2,000 RPM durante 2 min. para obtener 2 fases. La fase superior fue retirada y la fase inferior fue lavada, con una mezcla de cloroformo-metanol-agua (3:48:49, por cada 100 ml de solución). Finalmente se colectó la fase lipídica en viales de vidrio y se evaporó el solvente con nitrógeno, almacenando los lípidos a -20°C para su posterior transesterificación.

III.7.2.3. Transesterificación

Se utilizó el trifluoruro de boro (BF_3) al 14% en metanol como lo mencionan Morrison y Smith (1964). Para resuspender los lípidos se les adicionó 1 mL de cloroformo y se tomaron 30 μl de esta solución en viales de 4 ml. Se evaporaron los solventes con gas nitrógeno. Posteriormente se le agregó 500 μl de BF_3 en metanol al 14%. Los viales fueron colocados en baño María agua a punto de ebullición durante 30min. Después de este tiempo, se agregó 1ml de Hexano y 500 μl de agua bidestilada, se agitó vigorosamente y se colectó la fase superior que contenía los lípidos. Finalmente se evaporó la muestra que contenía los lípidos con una corriente de Nitrógeno y se almacenó en viales protegiendo de la luz a -20°C.

III.7.2.4. Determinación de lípidos mediante el cromatógrafo de gases

Se reconstruyó la muestra con 20 μl de Hexano. Se tomó 1 μl , el cual se inyectó en el cromatógrafo de gases con una jeringa Hamilton®.

Se utilizó el cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin Elmer, controlado por computadora. El programa fue diseñado de la siguiente manera: inicio a 180°C por 5 minutos, posteriormente un ascenso de temperatura de 5°C/min, hasta llegar a los 220°C, donde se mantuvo la temperatura durante 18 minutos, el flujo de la columna fue de 14ml/7min. El tiempo de valoración en el cromatógrafo fue de 35min por muestra.

Se identificó a los ácidos grasos, por comparación con los tiempos de retención de metil-esteres estándares, Se calculó la cantidad de ácidos grasos utilizando como referencia el área total de cada pico en el cromatograma.

III.8. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados mediante un ANOVA simple (n=5), seguido de una prueba de Fisher con una $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

IV.1. Efecto de los ácidos grasos ω 3, como suplemento alimenticio en SHR con DM2, sobre la concentración de glucosa en sangre.

Se realizó un seguimiento semanal del progreso de la Glicemia durante los seis meses, que duró el experimento (datos no mostrados), es importante señalar que sólo se presentan los datos obtenidos previos al sacrificio de los lotes.

A los 3 meses de tratamiento, se observó que existen diferencias significativas entre el lote Control y el lote STZ 50. Los lotes tratados con el suplemento de ω -3 (Control ω -3, STZ50 ω -3 y STZ 75 ω -3), no presentaron diferencias significativas con respecto al Control (Fig. 7A).

Los lotes tratados con STZ (50 y 75), a los seis meses, mostraron diferencias significativas, con respecto al Control. Los lotes tratados con ω -3 no mostraron diferencias significativas con el lote control (Fig. 7B). Se observó claramente la disminución de la concentración de glucosa en el lote STZ75 tratado con el suplemento de ω -3, comparado solo con el lote STZ75.

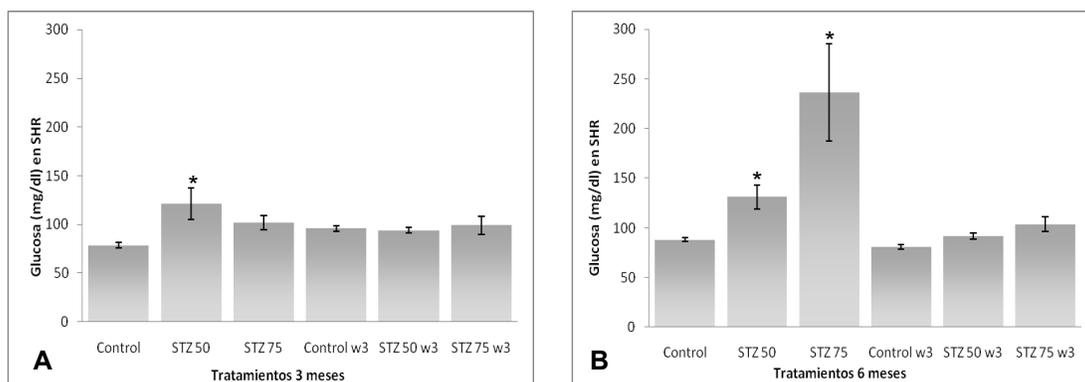


Figura 7. Efecto de los ácidos grasos ω 3, sobre los valores de glucosa en sangre de SHR. Se Muestran los valores de glucosa de SHR tratadas con STZ y un suplemento ω 3. **A y B** En los tres y seis meses de tratamiento, se observó un incremento en los niveles de glucosa. Los lotes tratados con STZ (50 y 75), comparados con el Control, sin embargo cuando se les administró el suplemento de ω -3, los niveles, se ven disminuidos. Los datos mostrados son la media aritmética \pm e.s. n=5. *Control vs p < 0.05

IV.2. Efecto de los AG ω 3, como suplemento alimenticio en SHR con DM2 sobre la presión sistólica.

Aunque existe un seguimiento de las presiones registradas semanalmente por grupo o lote (datos no mostrados). Las gráficas que se presentan a continuación, solo muestran la media de la presión sistólica determinada previa al sacrificio.

En el tercer mes, el lote STZ 75 presentó un incremento significativo comparado con el lote control. Al administrar el suplemento de ω -3, se observó, una disminución, significativa. Cabe resaltar que los lotes STZ ω -3, no presentaron diferencias significativas, comparado con el Control. (Fig. 8A)

Los lotes tratados con STZ (50 y 75) a los seis meses, presentaron un aumento significativo, con respecto al Control. Al ser tratados con el suplemento de ω -3, mostraron una disminución significativa en los niveles de presión, comparados con los STZ (50 y 75). (Fig. 8B)

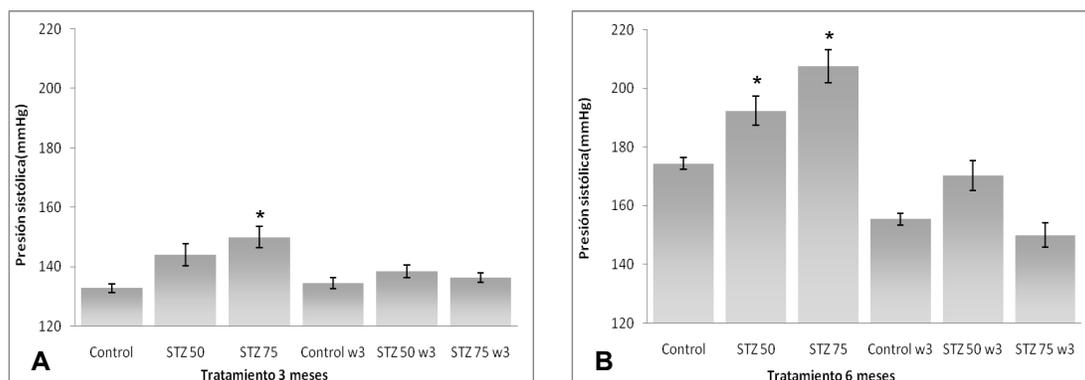


Figura 8A A los tres meses, el lote STZ 75 presentó un aumento en la presión sistólica; sin embargo cuando se le administra el suplemento, estos niveles se ven disminuidos. **8B** A los seis meses, los lotes tratados con STZ (50 y 75) mostraron un incremento, La tendencia de los lotes tratados con ω -3, fue a disminuirlos niveles de presión sistólica. Los datos mostrados son la media aritmética \pm e.s. n=5.

*Control vs p < 0.05

IV.3. Evaluación del efecto de los AG ω 3, como suplemento alimenticio en SHR diabéticas de 3 y 6 meses, sobre el porcentaje de espermatozoides incompletos.

Se consideró como un espermatozoide anormal, a los gametos tomados del conducto deferente, que carecían de flagelo.

A los tres meses, los lotes STZ (50 y 75), presentaron un aumento significativo comparado con el Control ω 3. Al administrar el suplemento de ω 3, a estos lotes, la tendencia fue a disminuir el porcentaje de espermatozoides anormales (Fig. 9). A los seis meses de tratamiento, los resultados presentados fueron similares a los anteriormente mencionados (datos no mostrados).

Estos resultados podrían indicarnos, que al administrar un suplemento de ω 3, de alguna manera podría ayudar a mantener la morfología de los espermatozoides.

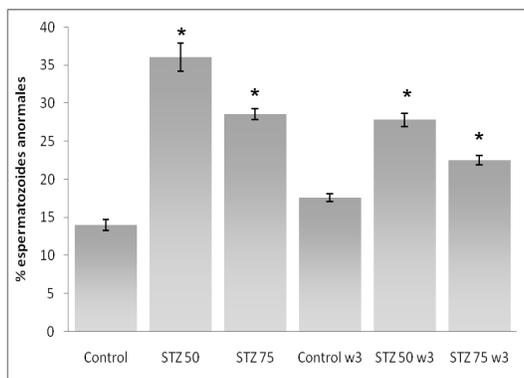


Figura 9. Efecto de los ácidos grasos ω 3 como suplemento alimenticio en SHR con DM2, sobre el porcentaje de espermatozoides anormales. A los tres y seis meses, los lotes STZ (50 y 75), presentaron un incremento en el porcentaje de espermatozoides, que carecen de flagelo. Y al administrar ω 3, su tendencia es a disminuir. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s. n=5. Por cada muestra de cada individuo se contaron por triplicado 300 células. *Control vs $p < 0.05$

IV.4. Efecto de los ácidos grasos $\omega 3$ como suplemento alimenticio en SHR y diabéticas de 3 y 6 meses, sobre el porcentaje de espermatozoides capacitados, que tuvieron RA.

Para valorar la RA, los espermatozoides fueron obtenidos del conducto deferente, y capacitados en un medio enriquecido con glucosa, ácido pirúvico y ácido láctico. Posteriormente las muestras fueron montadas en portaobjetos, y teñidos con azul de coomassie, para evaluar el estado del acrosoma (presencia o ausencia). (Fig. 10A)

Tanto a los 3 como a los 6 meses, los lotes STZ (50 y 75), mostraron una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con RA, comparados con el Control. Sin embargo, en los grupos tratados con el suplemento el porcentaje aumento significativamente (Fig. 10B).

Estos resultados sugieren que el $\omega 3$, favorece a que un mayor número de células espermáticas capacitadas de individuos SHR diabéticos puedan obtener RA.

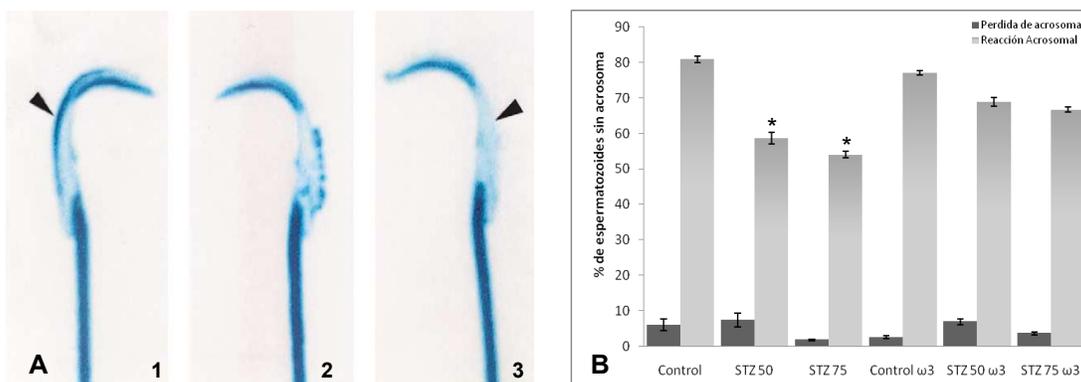


Figura 10A Patrones de tinción de acrosoma de rata. Espermatozoide, antes (1), durante (2), y después (3) de la reacción acrosomal. Los espermatozoides capacitados fueron fijados, lavados, montados en portaobjetos y finalmente teñidos con azul de coomassie. **10B Porcentaje de espermatozoides con pérdida de acrosoma por RA.** Las células espermáticas de SHR diabéticas, incubadas durante 3 hrs, en un medio mínimo capacitante, presentaron una disminución en la RA. Al administrar el suplemento de $\omega 3$, este se incrementa. Los datos mostrados son la media aritmética \pm d.s. n=5. Por cada muestra de cada individuo se contaron por triplicado 300 células. *Control vs p < 0.05

IV.5. Efecto de los ácidos grasos ω -3 como suplemento alimenticio en SHR, sobre la histología de testículo.

Los estudios histológicos mostraron que los grupos Control, con y sin suplemento, a los 3 y 6 meses, no presentaron cambios patológicos aparentes (Fig. 11A y 11B). Sin embargo los testículos de ratas diabéticas, mostraron una degeneración de túbulos seminíferos (proceso degenerativo y de necrosis observada, caracterizada por un aumento en el volumen celular cuyo citoplasma es grumoso y turbio “de vidrio esmerilado”, el núcleo conserva sus características morfológicas y tintoriales). La necrosis se observó como núcleos en picnosis, cariorexix y cariolisis, con disminución en el tamaño y número de células que conforman el túbulo seminífero. Del mismo modo se ve afectada, la cantidad y morfología de las espermátidas. Este tipo de lesión indica una alteración temprana de la homeostasis celular causando estragos en el funcionamiento metabólico, en la mitosis y en el desarrollo celular.

Al tercer mes, los cortes histológicos de testículos, de SHR diabéticas mostraron, daños de moderados a severos en los lotes tratados con STZ75 (Fig. 11C). En túbulos seminíferos del lote STZ75 ω -3, se observaron daños de leves a moderados, reducción en el tamaño, además de la disminución en el número de células, que conforman el túbulo seminífero (Fig. 11D).

Al sexto mes de tratamiento en el lote STZ75 se observan daños severos en los túbulos, cambio en el tamaño, así como menor cantidad de células germinales en el túbulo seminífero (Fig. 11E). Sin embargo, al administrar ω 3, los daños en los túbulos, no son tan severos túbulos con lesiones de severas a moderadas, y de moderados a sin cambios patológicos aparentes (Fig. 11E).

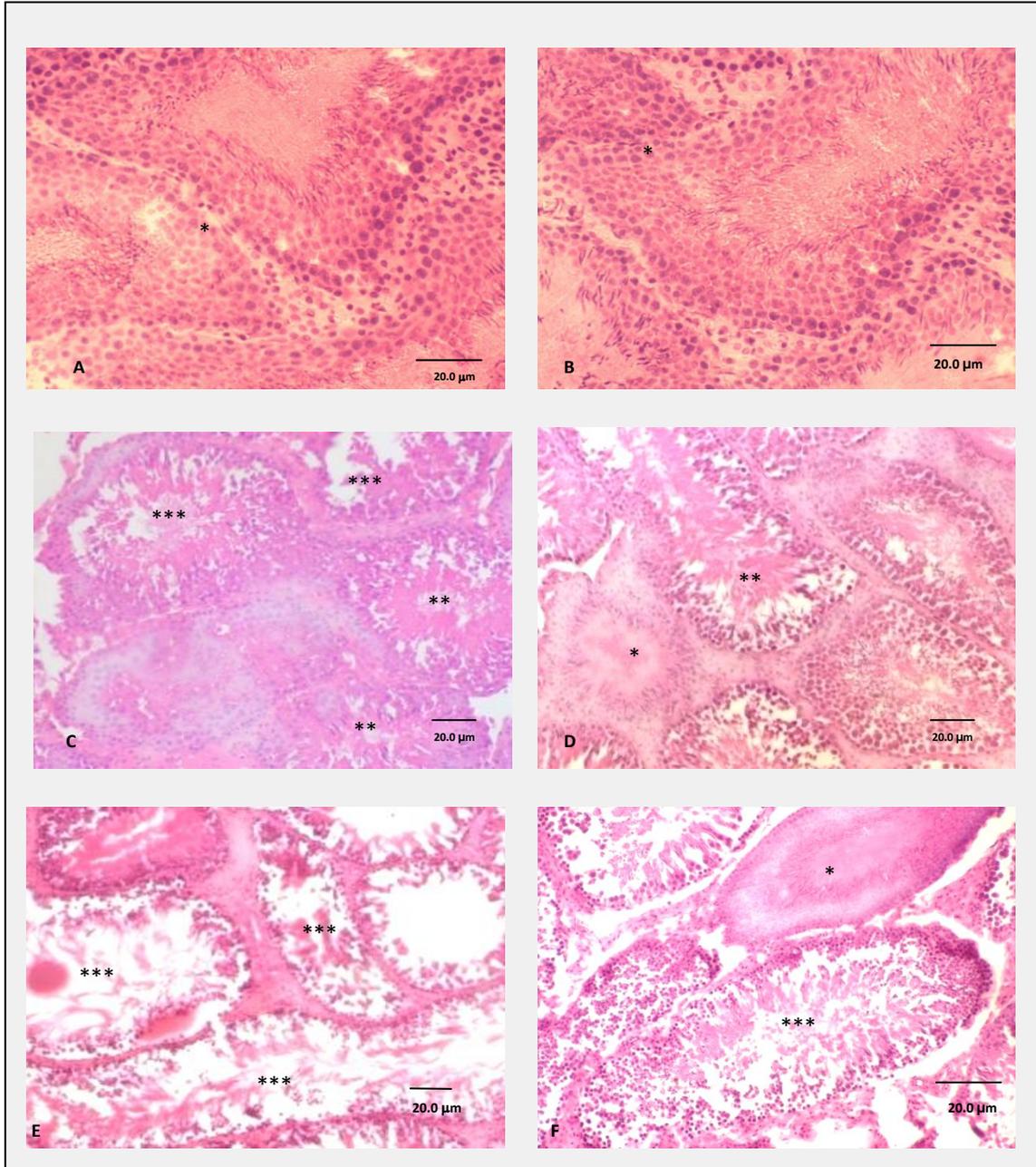


Figura 11. Corte histológico de testículo de SHR, con diabetes experimental inducida, tratados con ácidos grasos ω -3. **11A** Control. **11B** Control ω -3 **11C** STZ75, 3 meses **11D** STZ75 ω -3, 3 meses **11E** STZ75, 6 meses **11F** STZ75 ω -3, 6 meses. **A y B**, Sin cambios patológico aparentes. **C y E** Lesiones moderadas-severas a severas. **D y F**, severo a moderado, las imágenes mostradas son representativas de n=5. Tinción H-E 40x.

* sin cambios patológicos aparentes

** lesión moderada-severa

*** lesión severa

IV.6. Efecto de los AG ω 3, como suplemento alimenticio en SHR con DM2 sobre la histología de diferentes asociaciones celulares.

La espermatogénesis, es el proceso por el cual las células germinales, se dividen transforman y se diferencian, para obtener células haploides. En la rata se presentan, 19 tipos celulares, y 14 asociaciones. Estas últimas fueron valoradas, para determinar los posibles cambios en el desarrollo espermático en los túbulos seminíferos de un corte histológico de testículo de SHR a los 3 y 6 meses de edad.

IV.6.1. Asociaciones V y VI

La asociación V, presenta los siguiente tipos celulares: 1) espermatogonia A, que se caracteriza por la presencia de finos gránulos de cromatina; 2) espermatogonia tipo B, en donde se presentan las primeras divisiones meióticas, 3) espermatocitos primarios en paquitenio. 4) espermátida en proceso de espermiogénesis (formación de vesícula acrosómica). 5) espermátida, con citoplasma, ubicado en el polo flagelar (Fig. 12A).

La asociación VI, presenta: espermatogonia tipo A y B. Espermatocito primario en paquitenio. El cuarto tipo celular presente, es una espermátida, donde se aprecia la formación de la vesícula acrosómica. Y por ultimo una espermátida con un desarrollo significativo en la formación del acrosoma, y con presencia de citoplasma en el flagelo. (Fig. 12A).

Los lotes de 3 y 6 meses, que se les administró una dosis de 50 mg/kg de STZ, mostraron una pérdida en el porcentaje, de la asociación V. Al administrar el suplemento ω -3, no se presentaron cambios significativos entre los lotes (datos no mostrados).

En la asociación VI a los tres meses no presenta cambios significativos entres los diferentes lotes (Fig. 12B). Sin embargo, a los 6 meses los lotes STZ (50 y 75), mostraron una disminución en el porcentaje aunque no de manera significativa, comparados con el Control. Cuando se administra ω 3, al lote STZ75, no se presentan diferencias significativas respecto al Control. De alguna manera el comportamiento mencionado, no fue observado en el STZ50 ω 3 ya que este disminuye de manera significativa (Fig. 12C).

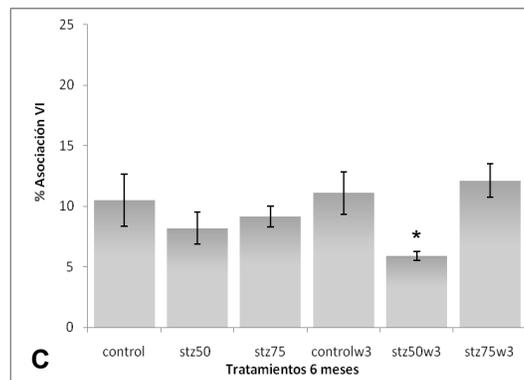
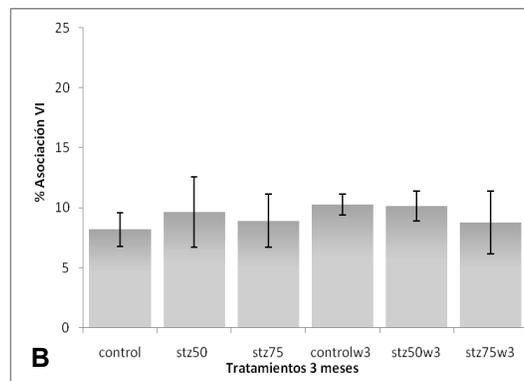
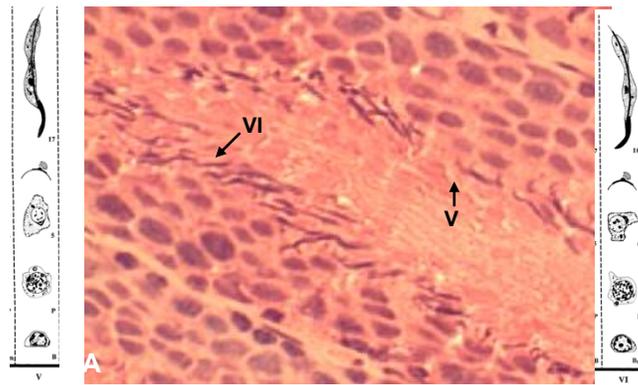


Figura 12A. Corte histológico de túbulo seminífero, donde se muestran las asociaciones V y VI (flecha). **12B y 12C** Se muestran, los porcentajes de asociaciones celulares presentes, en los túbulos seminíferos, tratados con $\omega 3$. Los datos mostrados son la media aritmética de conteos por triplicado de 15 túbulos seminíferos por laminilla, \pm e.s. n=5. * Control vs p < 0.05

IV.6.2. Asociación VII y VIII

La asociación VII presenta cinco tipos celulares: 1) espermatogonia tipo A, que presenta finos gránulos de cromatina; 2) espermatocito primario en etapa de preleptoteno, 3) espermatocito en paquiteno, 4) espermátida en diferenciación, con el acrosoma condensado y flagelo en desarrollo en la parte opuesta a la localización de la vesícula acrosómica. 5) espermátida, que presenta restos de citoplasma en la cabeza del espermatozoide (Fig. 13A).

La asociación VIII, se caracteriza por presentar: 1) espermatogonia tipo A, 2) espermatocito primario en preleptoteno, 3) espermatocito en paquiteno, 4) espermátida en espermiogénesis, en la que se produce una inversión de forma que el flagelo queda hacia la luz del túbulo seminífero 5) espermátida, con poco citoplasma y pequeños cuerpos residuales (Fig. 13A).

Se observó que a los 3 y 6 meses, con diferentes dosis de STZ, presentaron un decremento en el porcentaje de la asociación VII, esta observación fue también apreciada en los lotes tratados con ω -3 con respecto a los controles (datos no mostrados).

A los 3 meses de tratamiento, en la asociación VIII, los lotes STZ no presentaron diferencias significativas con respecto a su control. Al administrar el ω 3, mostraron una disminución significativa con respecto a los controles (Fig. 13B). A los 6 meses (Fig. 13C), los lotes STZ50 y STZ75, presentaron una disminución significativa, comparadas con el lote control. Sin embargo al administrar el suplemento de ω -3 al lote tratado con STZ75, presento un aumento significativo, comparado con el lote STZ75. De alguna manera el comportamiento mencionado, no fue observado en el STZ50 ω 3 ya que este disminuye de manera significativa (Fig. 13C).

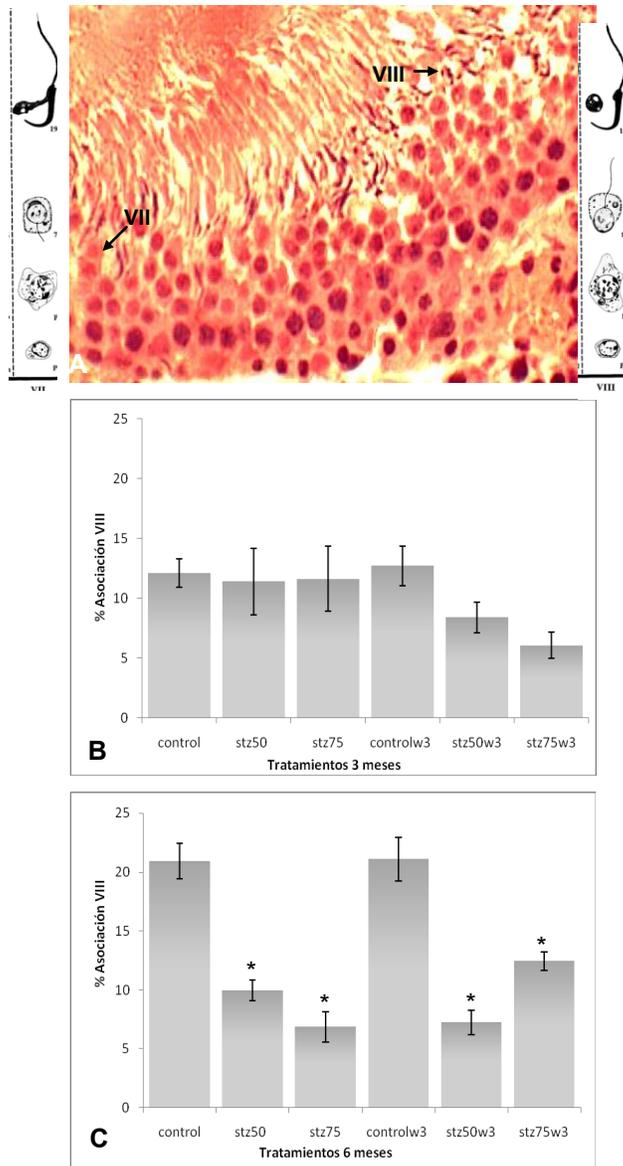


Figura 13A Corte histológico de túbulo seminífero donde se muestran las asociaciones VII y VIII (flechas). **B** y **C** se muestra el porcentaje de la asociación VIII, presente en el túbulo seminífero de SHR tratado con ω 3. Los datos mostrados son la media aritmética, del conteo por triplicado de 15 túbulos seminíferos por laminilla \pm e.s. n=5. *Control vs p < 0.05

IV.6.3. Asociación IX y X

La asociación IX, corresponde al estado en donde las espermátidas aún son inmaduras, siendo estas células redondeadas, con núcleos esféricos. Presenta cuatro tipos celulares: 1) espermatogonia tipo A, 2) espermatozoides en leptoteno. 3) espermatozoides primarios en paquíteno, y 4) espermátida inmadura redonda, con gran cantidad de citoplasma, comienzo de la formación del flagelo, y la condensación del acrosoma condensado en un polo. (Fig. 14A)

Los tipos celulares que presenta la asociación X, presentan formas similares a la asociación IX, exceptuando que en el cuarto tipo celular el acrosoma se condensa y el flagelo se alarga. (Fig. 14A)

A los 3 meses, los lotes STZ (50y 75) no mostraron diferencias significativas con respecto al control, en la asociación IX. Al administrar ω -3, se presentó una disminución pero no significativa en el porcentaje, comparado con los lotes STZ (Fig. 14B). A los seis meses los lotes STZ, presentaron un aumento significativo comparado con el control. Este comportamiento también fue observado en los lotes tratados con el suplemento (Fig. 14C).

El lote STZ75 en la asociación X a los tres meses, presentó un aumento significativo en el porcentaje, comparado con el Control, el cual al administrar el suplemento disminuyó significativamente. El lote STZ50 presentó un porcentaje significativamente menor al lote STZ75, al administrar el suplemento ω 3, no presentó ningún cambio (datos no mostrados).

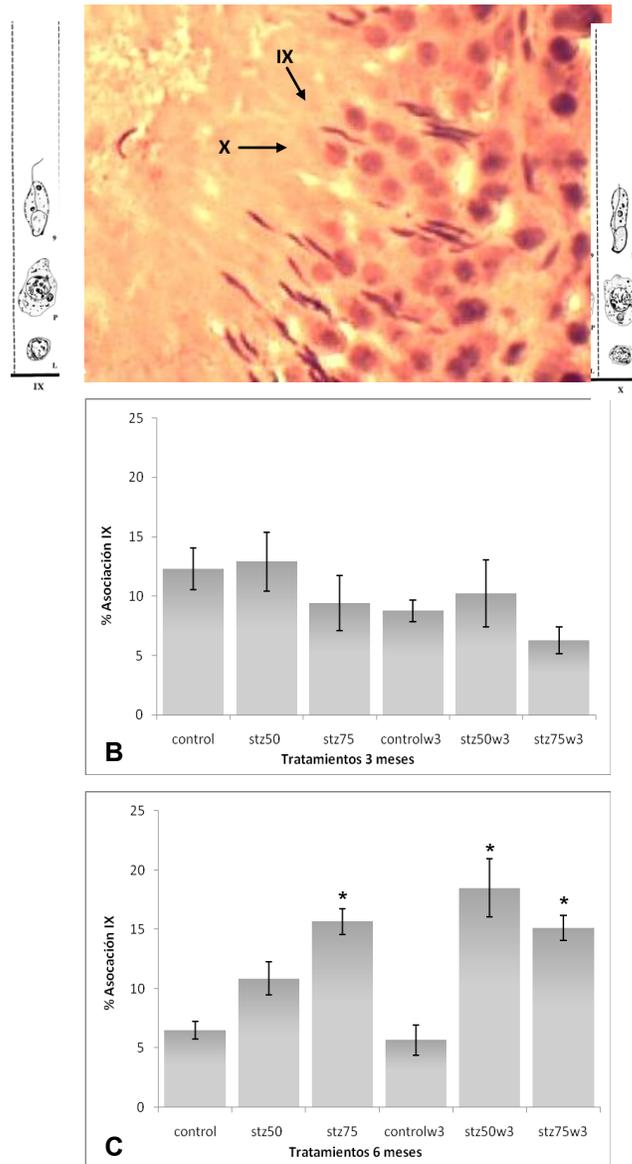


Figura 14 A Corte histológico de túbulo seminífero, donde se observan las asociaciones IX y X (flecha), **14B** y **14C** Los datos mostrados son la media aritmética del conteo por triplicado de 15 túbulos seminíferos por laminilla $n=5 \pm$ e.s. *Control vs $p < 0.05$

IV.7. Efecto de los ácidos grasos ω 3, como suplemento alimenticio en SHR con DM2, sobre el peso relativo de las gónadas.

Para identificar un cambio físico a nivel reproductivo, en las ratas tratadas con diferentes dosis de STZ, se valoró el peso relativo de los testículos de rata. El peso relativo se calculó usando la siguiente fórmula.

$$\text{peso relativo de testículo} = \frac{\text{peso de la gónada}}{\text{peso del animal}} \times 100$$

A los 3 meses de tratamiento, el lote STZ75 presentó una disminución significativa en el peso gonadal con respecto al Control. Al administrar el suplemento de ω 3, presentaron un incremento en el peso relativo, pero no mostró diferencias significativas con respecto al control (Fig. 15A).

En el sexto mes de tratamiento, los lotes STZ (50 y 75) presentaron una disminución en el porcentaje de peso gonadal comparados con el Control. Al administrar el ω -3, el lote STZ-75, presentó una mayor ganancia de peso, sin embargo el lote STZ-50 ω -3, no presentó cambios significativos (Fig. 15B).

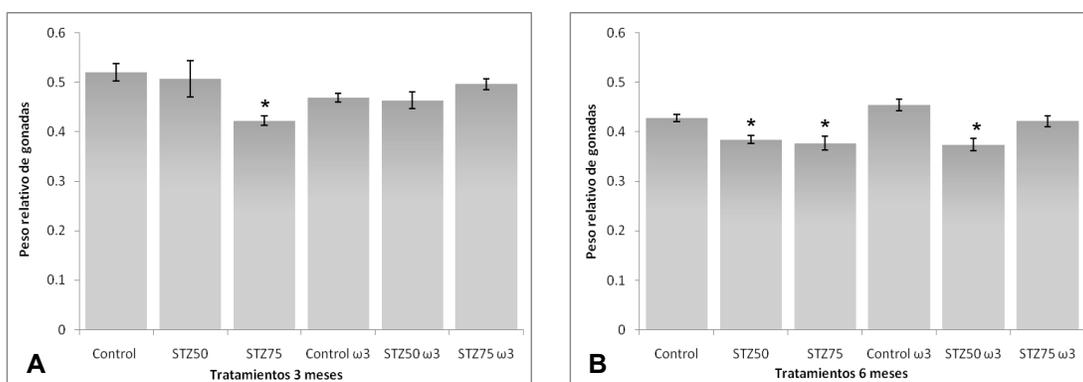


Figura 15 Efecto de los ácidos grasos ω 3, sobre el peso relativo de testículos de SHR

A El lote STZ75, presentó una disminución en el peso relativo de la gónada. **B** Los lotes tratados con STZ presentaron menor peso gonadal. Los datos mostrados son la media aritmética \pm e.s. n=5

*Control vs p < 0.05

IV.8. Efecto del los ácidos grasos ω 3, como suplemento alimenticio en SHR con DM2, sobre el peso corporal

Las ratas de los diferentes lotes (Control, STZ 50 y STZ 75) fueron destetadas a las cuatro semanas y separadas en dos grupos de forma aleatoria. Un grupo fue utilizado como control (Control, STZ 50 y STZ 75) el otro grupo fue tratado con ω 3, (Control ω 3, STZ 50 ω 3 y STZ 75 ω 3). El tratamiento de ω 3, fue administrado cinco veces por semana (50 mL de α -LNL por Kg de peso) y el seguimiento del peso se realizó una vez por semana, durante los seis meses de experimentación. Los datos mostrados en las gráficas son el promedio de los individuos sacrificados por grupo.

A los tres meses no se observaron diferencias significativas entre los lotes (STZ vs Control). Sin embargo, el lote STZ 75 ω -3, obtuvo una ganancia de peso significativamente menor comparado con el resto de los lotes, (Fig. 16A),

A los seis meses, los lotes tratados con STZ, presentaron una disminución en la ganancia de peso. Al administrar el ω -3, la ganancia de peso es mayor o igual con respecto a los lotes control.

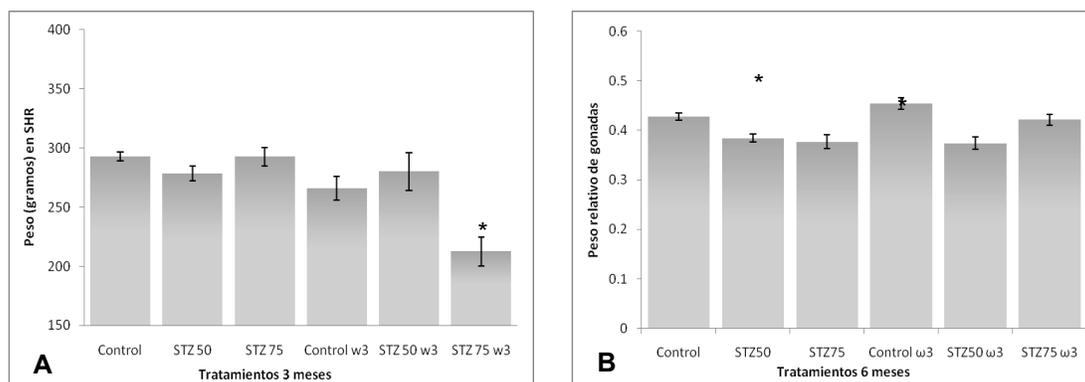


Figura 16 Efecto de los ácidos grasos ω 3, sobre el peso de SHR.

A La ganancia de peso del lote STZ-75 ω 3, es menor, que la presentada por el resto de los lotes. **B** Los lotes STZ presentan una ganancia de peso menor al lote control. Los datos mostrados son la media aritmética \pm e.s. n=5. *Control vs $p < 0.05$

IV.9. Efecto de los ácidos grasos ω -3 como suplemento alimenticio en SHR, sobre la composición de ácidos grasos en testículo.

Las gónadas de SHR, fueron procesadas, para la extracción de los lípidos, por el método de Folch (1957). Se analizó la composición de ácidos grasos, por cromatografía de gases.

IV.9.1. Composición porcentual de ácidos grasos en testículo de SHR de 3 meses, con diferentes dosis de STZ y un suplemento de ω -3.

Se observó que los lotes tratados con STZ (50 y 75 mg/kg de peso), presentaron un incremento en el porcentaje de ácido palmítico, que se incrementó de 33.5% a 38.6% (Control vs STZ-75, respectivamente). Al ser administrado el suplemento de ω -3, el porcentaje de este ácido se incrementó en el caso del lote Control, mientras que disminuyó en el lote tratado con STZ75. El lote Control al que se le administró el suplemento de ω -3, presento una disminución con respecto al Control, de 17.9% a un 13.4%. En el lote STZ50 tratado con el suplemento de ω -3, el porcentaje de ácido linoléico, se incremento comparado con el lote tratado solo con STZ50. El ácido EPA, presenta una disminución en el porcentaje, en los lotes tratados con el suplemento de ω -3. El lote Control presentó una disminución en el porcentaje de ácido DHA, al ser tratado con el suplemento de ω -3, comparado con el lote sin el suplemento. Por otro lado el los lotes STZ tratados con el suplemento de ω -3 presentaron un incremento (Tabla 3).

Tabla 3. Composición porcentual de ácidos grasos de testículos de SHR de 3 meses tratados con ω -3.

	control	STZ50	STZ75	control w3	STZ50 w3	STZ75 w3
Mirístico	0.6 ± 0.08	0.54 ± 0.012	0.76 ± 0.1	0.59 ± 0.07	0.6 ± 0.08	0.69 ± 0.077
Palmítico	33.5 ± 2.17	35.6 ± 3.4	38.7 ± 0.93	36.006 ± 1.54	35.4 ± 0.78	36.6 ± 0.76
Palmitoleico	1.61 ± 0.041	2.01 ± 0.33	2.87 ± 1.13	1.94 ± 0.4	2.12 ± 0.46	1.47 ± 0.23
Estearico	6.5 ± 0.64	6.8 ± 0.699	7.3 ± 0.28	6.7 ± 0.23	6.8 ± 0.24	7.5 ± 0.36
Oléico	17.9 ± 3.28	11.9 ± 0.96	15.1 ± 1.79	13.4 ± 0.46	13.6 ± 0.58	13.6 ± 0.47
Linoléico	8.1 ± 1.12	6.3 ± 0.98	8.5 ± 2.96	7.9 ± 1.73	9.3 ± 1.77	6.9 ± 0.73
Araquidónico	12.7 ± 1.51	13.81 ± 0.59	13.54 ± 1.51	14.0 ± 0.68	14.5 ± 0.84	14.9 ± 0.203
EPA	0.14 ± 0.06	1.37 ± 0.315	0.06 ± 0.004	0.08 ± 0.27	0.08 ± 0.008	0.04 ± 0.006
DHA	0.94 ± 0.12	0.498 ± 0.04	0.37 ± 0.06	0.45 ± 0.076	0.54 ± 0.06	0.45 ± 0.06
NI	17.6 ± 1.04	16.7 ± 1.31	12.4 ± 4.34	18.7 ± 1.28	16.5 ± 1.003	17.7 ± 0.83

Los datos mostrados son la media aritmética ± e.s. n=5

IV.9.2. Composición porcentual de ácidos grasos de testículo de SHR de 6 meses.

En el sexto mes (Tabla 4), se observó que el lote tratado con STZ75, presenta un incremento en el porcentaje de ácido Palmítico 40.28%, comparado con el 33.5% del lote Control. Por otra parte, cabe mencionar que al administrar el suplemento de ω -3, el lote Control al igual que el lote STZ50 presentaron un incremento en el porcentaje, 48.16%, y 38.07 respectivamente; mientras que el lote tratado con STZ75 disminuyó hasta un 36.62%.

Al inducir la diabetes con una dosis de STZ75, se presentó una disminución en el porcentaje de ácido palmitoleico, comparado con el lote Control. Mientras que al ser tratados con el suplemento de ω -3, los lotes Control y STZ50, reducen su porcentaje.

Los lotes Control y STZ50 al ser tratados con el suplemento de ω -3, presentaron una disminución en el porcentaje del ácido Oléico.

El lote STZ75 presentó un porcentaje de 5.22%, un decremento en el porcentaje de ácido linoleico, comparado con el lote Control, que presentó un porcentaje de 10.36%. Al administrar el suplemento de ω -3, los lotes Control y STZ50, presentaron una disminución su porcentaje de ácido linoleico.

Tabla 4. Composición porcentual de ácidos grasos de testículos de SHR de 6 meses tratados con ω -3.

	control	STZ 50	STZ75	control w3	STZ50 w3	STZ75 w3
Mirístico	0.72 ± 0.11	0.87 ± 0.06	1.18 ± 0.13	0.98 ± 0.07	0.52 ± 0.05	0.64 ± 0.07
Palmitico	33.5 ± 2.24	32.58 ± 1.62	40.28 ± 1.15	48.16 ± 4.32	38.07 ± 0.85	36.62 ± 1.07
Palmitoleico	3.19 ± 1.07	2.49 ± 0.51	1.75 ± 0.28	1.18 ± 0.26	1.2 ± 0.08	1.97 ± 0.45
Esteárico	6.55 ± 0.48	6.67 ± 0.39	9.6 ± 0.66	10.86 ± 1.34	9.05 ± 0.23	8.35 ± 0.63
Oleico	15.97 ± 1.5	17.11 ± 1.58	12.54 ± 0.87	10.37 ± 1.28	14.2 ± 0.31	12.55 ± 0.83
Linoleico	10.36 ± 3.19	10.18 ± 2.17	5.22 ± 0.26	3.95 ± 1.1	6.48 ± 0.25	5.89 ± 0.37
Araquidónico	13.52 ± 1.2	12.43 ± 1.37	14.75 ± 1.87	10.297 ± 2.21	13.61 ± 0.88	15.72 ± 0.79
EPA	0.46 ± 0.2	0.06 ± 0.01	0.105 ± 0.02	0.19 ± 0.03	0.73 ± 0.33	0.26 ± 0.07
DHA	0.62 ± 0.13	0.59 ± 0.07	0.41 ± 0.06	0.51 ± 0.16	0.28 ± 0.04	0.47 ± 0.05
NI	14.85 ± 3.58	16.86 ± 1.26	15.71 ± 2.47	12.91 ± 1.29	15.66 ± 0.81	14.49 ± 3.24.

Los datos mostrados son la media aritmética ± e.s. n=5

IV.10. Efecto de los ácidos grasos ω -3 como suplemento alimenticio en SHR, sobre el índice de fluidez membranal de testículo.

El índice de fluidez fue determinado mediante el cociente de ácidos grasos insaturados/saturados. Al tercer mes los lotes tratados con STZ no presentaron diferencias significativas entre los diferentes lotes (Fig. 17A). A los seis meses, se incrementó la proporción de AG saturados en los lotes diabéticos, presentando así una disminución en el índice de fluidez membranal. El lote STZ75, presentó una disminución significativa comparado con el Control (Fig. 17B), Sin embargo al administrar el suplemento al lote tratado con STZ75, este presentó un incremento en la proporción de AG insaturados, lo que aumento aunque no significativo en el índice de fluidez membranal comparado con el lote sin el suplemento.

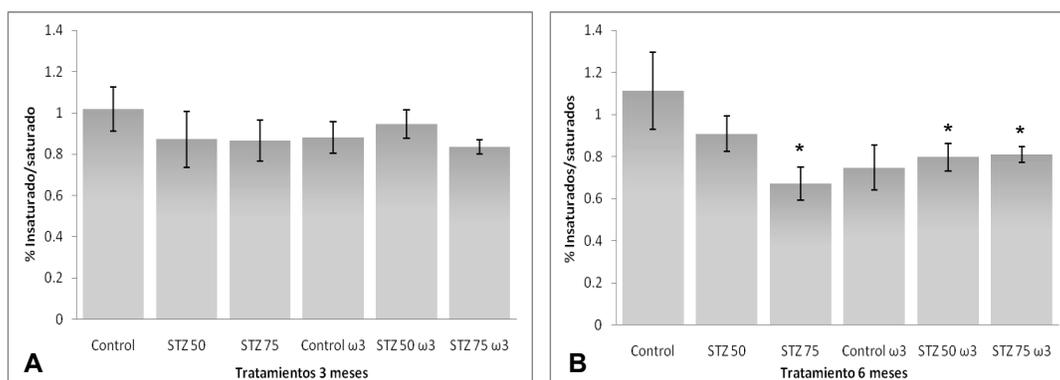


Figura 17 Índice de fluidez membranal en testículos de SHR con DM2. Se muestran los porcentajes del índice de fluidez membranal, mediante un cociente de ácidos grasos insaturados/saturados, obtenidos en gonadas de SHR diabéticas. Los datos mostrados son la media aritmética \pm e.s. n=5. *Control vs p < 0.05

V. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

La diabetes mellitus, es un trastorno metabólico caracterizado por una hiperglucemia crónica, con problemas de metabolización de carbohidratos, grasas y proteínas que resultan de defectos en la secreción de insulina, en su acción o en ambas. (Hugues y col., 2001).

En el estudio de enfermedades como, la DM2 y la hipertensión arterial, se han propuesto distintos modelos animales que nos ayudan a comprender la patología, la fisiología así como los posibles tratamientos. Entre estos se encuentra el uso de distintos fármacos, como la STZ, que dependiendo de la edad y la dosis utilizada (con dosis que van de 50-150 mg/kg de peso, por vía intraperitoneal), es una droga eficaz para la inducción de diabetes tipo I ó II en distintos modelos animales (Hugues y col., 2001; Skudelski, 2001).

La **cepa SHR**, es una cepa que se desarrollada a partir de ratas Wistar Kioto, las SHR tienen la característica de presentar presión arterial elevada, que se va incrementando con la edad. Por estas características es utilizada en diversas investigaciones de hipertensión, además ésta responde a tratamientos antihipertensivos (Okamoto y Auki, 1969; Michaelis y col., 1986).

En el presente trabajo se utilizó un modelo DM2 en SHR machos neonatos de 48 hrs. el cual se genero mediante una dosis única de 50 mg/kg ó 75 mg/kg de STZ, por vía intraperitoneal, el objetivo de este estudio fue valorar el efecto de los ácidos grasos ω 3 en SHR diabéticos, sobre la histología del testículo y en gametos capacitados y con RA

Control de la glicemia e hipertensión en SHR

Las dosis de 50 y 75 mg/kg de STZ trabajadas en individuos SHR de 3 y 6 meses de edad, presentaron diferentes valores en los niveles de la glucemia. Al tercer mes (figura 7A), se observó que los lotes tratados con STZ no presentaron diferencias significativas entre ellos. Esto puede ser debido a que la secreción de insulina es inicialmente suficiente para compensar los efectos de la resistencia, situación difícil de mantener en forma indefinida. Finalmente cuando las células β pancreáticas disminuyen su capacidad para mantener un nivel elevado de síntesis y secreción de insulina, se presentan alteraciones

en el control de la glicemia y con ello la hiperglucemia (González y col., 1999; Srinivasan y Ramarao, 2007; Pérez-Hernández, 2008; Avendaño-Flores, 2008).

Los lotes con una dosis de STZ de 75mg/kg, presentó niveles altos de glucosa, por arriba de los 240 mg/dl dos días después de la inducción, comparado con la dosis de 50mg/kg. Esto nos sugiere que a mayores dosis, mayor es la destrucción de las células β , como lo sugiere Pérez Hernández (2008).

A los tres meses de edad (figura 7A), los niveles de glucosa de los lotes tratados con STZ se mantuvieron en los niveles normales. Sin embargo en el sexto mes de tratamiento (Fig. 7B), se observó un incremento en dichos niveles, este descontrol se hace más evidente en los lotes tratados con la dosis de 75 mg/kg. El daño generado a las células β , causo una menor secreción de insulina, la cual no es suficiente para mantener los niveles normales de glucosa (Elsner y col., 2000; Hugues y col., 2001; Skudelski, 2001).

Los resultados observados, en el descontrol de los niveles de glucosa, pueden explicarse por la destrucción selectiva de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas, ocasionando así su mal funcionamiento. La STZ es un fármaco que penetra a las células β -pancreáticas, por vía del transportador transmembranal de glucosa GLUT2, una vez dentro de la célula induce un daño al ADN, mediante la alquilación del mismo, provocando así su fragmentación (ocasionado por el NO) y la consiguiente muerte celular. De esta manera la inducción de la diabetes es posible gracias a que disminuye la secreción y biosíntesis de insulina (Elsner y col., 2000; Hugues y col., 2001; Skudelski, 2001; Areas y col., 2003).

Por otro lado, las membranas celulares presentan diversas propiedades físico-químicas así como funcionales, las cuales pueden estar determinadas por la naturaleza de los ácidos grasos que la componen. Se ha propuesto que los ácidos grasos poli-insaturados (AGPIs) pueden tener un efecto benéfico sobre el desarrollo o en el control de la diabetes. Puede aumentar la fluidez de la membrana si ésta presenta una mayor proporción de AGPIs, lo cual sugiere que de esta forma, aumenta la sensibilidad a la insulina. (Pérez y Guerrero, 2006). Sin embargo estos ácidos grasos no pueden ser sintetizados por nuestro organismo, por lo cual es necesario incluirlos en la dieta. Las principales fuentes alimenticias de ácidos grasos omega-3, son los aceites de soya, canola y linaza (ricos en α -LNL) y el pescado (rico en EPA y DHA) (Rodríguez-Cruz, y col., 2005). Los AGPIs como

el ácido linoleico (ω -6) y el ácido α -linolénico (ω -3), pueden ser convertidos en ácidos de cadena larga como el ácido araquidónico (AA), el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Delachambre y col., 1998; Comte y col., 2004).

Altas concentraciones de ácidos grasos libres en sangre, provocan la acumulación de triglicéridos en distintos tejidos, como el músculo esquelético, causando un efecto de resistencia y de sensibilidad a la insulina (Frayn, 2001). El ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3) es un ácido graso n-3 derivado del ácido α linolénico. Se ha reportado que una dieta rica en DHA puede participar en la disminución de la presión arterial en SHR, así como en la reducción de los niveles de colesterol total, lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos comparados con SHR no tratados (Engler y Engler, 2000; Woodman, 2002).

Se ha observado que en individuos diabéticos, es frecuente la presencia de presión arterial elevada (Plotquin and Gullerian, 2001). Además la utilización de glucosa mediada por la insulina, puede verse disminuida en individuos hipertensos (Plotquin and Gullerian, 2001; Le Roith y col., 2003). Por otro lado, se ha reportado que al controlar los niveles de glucosa en diabéticos, la presión arterial disminuye (Ferris y col., 1985)

El modelo de diabetes (STZ 50 y 75 mg/kg), en individuos SHR, mostraron valores de presión sistólica que oscilaron de 130-150 y 170-210 mmHg, respectivamente. A los tres y seis meses de edad la presión sistólica (Fig. 8) de los lotes tratados con STZ presentaron un aumento significativo, comparados con el lote control. Este comportamiento también fue observado en los niveles de glicemia (Fig. 7), siendo más evidente al sexto mes. Comúnmente el 90% de las personas con DM2, presentan hipertensión arterial; esta prevalencia aumenta en personas mayores a 45 años (Stewart y col., 2005).

En general, la hiperglucemia y la hipertensión, pueden causar daños en órganos blancos, tal es el caso del riñón, órgano que se encarga de la excreción de los productos finales del metabolismo, controla las concentraciones de los constituyentes de los líquidos corporales, así como la presión arterial por medio del cambio en el volumen del líquido extracelular (Guyton, 1992; Eaton y Pooler, 2006).

Es conocido que las enfermedades cardiovasculares (arterial coronaria, cerebrovascular y periférica) representan la principal causa de morbilidad y mortalidad en los pacientes

diabéticos. Existe una predisposición a la hipertensión en los pacientes diabéticos, y en los hipertensos la presencia de DM2 es elevada. Las interrelaciones entre diabetes e HTA, posiblemente se deban a las lesiones que se presentan en riñones y glándulas adrenales (Pou Torelló y Rigla, 2001; Mazón y col., 2008). La frecuente asociación entre la hipertensión arterial y la DM2, se interrelaciona con la obesidad y alteraciones en el metabolismo. Como el de la glucosa, causado por la resistencia insulínica y la disfunción endotelial (Goldstein, 2002; Cordejo y col., 2005).

Al tercer y sexto mes los lotes STZ tratados con ω 3, presentaron una disminución significativa en la presión sistólica y en los niveles de glucosa, comparados con los lotes a los que no se les administró el suplemento de ω 3. Esta disminución fue más evidente al sexto mes de tratamiento. Dichos resultados son apoyados por Aguila y colaboradores (2005), quienes probaron que los ácidos grasos ω 3 (EPA y DHA), son eficientes en la prevención del desarrollo usual de la hipertensión en SHR.

Además, otras investigaciones proponen que los AGPIs actúan como ligandos activadores de PPARs (peroxisome proliferator activated receptor) que son receptores nucleares que se encargan de la regulación de genes de rutas metabólicas, como el metabolismo, catabolismo y almacenamiento de lípidos. Los PPARs se presentan en tres isoformas α , β/γ y δ , estos se pueden activar por eicosanoides derivados del AA, o por AGPIs. El consumo de ácidos grasos poli-insaturados (AGPIs), puede ser benéfico en el control de ciertas enfermedades como en la diabetes mellitus y la obesidad, en la que los AGPIs (particularmente la familia omega-3), se unen con mayor afinidad y activan a los PPAR- α , el complejo activado se une a PPER, que se encuentran involucrados en el transporte y oxidación de lípidos, disminuyendo la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática (Clarke, 2001; Rodríguez-Cruz, y col., 2005).

Se ha propuesto que los AGPIs pueden tener un efecto benéfico en el desarrollo o control de la diabetes debido a: 1) la capacidad de los AGPIs para actuar como ligandos activadores de PPAR- γ , que al activarse estimula la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos, lo que genera en esta célula un aumento en los receptores de insulina reduciendo de esta manera la resistencia a la insulina (Suresh y Das, 2003), 2) la acción de los AGPIs, en la protección de las células β pancreáticas del daño causado por el aumento en radicales libres producidos durante la diabetes (Rodríguez-Cruz, y col., 2005; Caballero y col., 2006).

Anteriormente se ha sugerido que la suplementación de aceite de pescado (rico en AGPIs omega-3), tiene un efecto cardioprotector a través de la inhibición de la respuesta inflamatoria (Rodríguez-Cruz, y col., 2005). Se sugiere que incluir ácidos grasos ω -3 en la dieta (<3 g / día), ayuda a reducir y prevenir las causas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, además disminuye los niveles de glucosa en sangre y la presión arterial en pacientes hipertensos, minimizando el riesgo de complicaciones microvasculares (Woodman, 2002; Caballero y col., 2006). Su ingesta tiene efectos antitrombóticos principalmente mediados por una reducción en la formación de tromboxano, también mantiene la sensibilidad de los receptores de insulina (Taouis y col., 2002; López y Macaya, 2006).

El consumo del EPA, ayuda a reducir el contenido de ácido araquidónico en los fosfolípidos de la membrana (de plaquetas y células endoteliales), de esta manera se reduce la concentración de sustrato necesario para la síntesis de eicosanoides (López-Farre y Macaya, 2006)

Se ha observado que en poblaciones esquimales y japonesas donde se consumen grandes cantidades de pescado (rico en AGPIs omega-3), presentan una menor incidencia de DM2 (Caballero y col., 2006).

La hiperinsulinemia provoca múltiples efectos potencialmente deletéreos, como la retención de Na^+ y el acúmulo de Ca^{++} libre intracitoplasmático, los cuales condicionan a una disfunción endotelial, hipertensión arterial (reducción de la luz en los capilares de músculo esquelético), hipertrofia y fibrosis (Lieberman y Sastre, 1980; Pollare y col., 1988).

Diabetes e hipertensión en la reproducción

Con el incremento en la incidencia de diabetes se ha observado un gran número de trastornos, entre los cuales se encuentran los que afectan el sistema reproductor masculino (disfunción eréctil, hipogonadismo, alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, impotencia, infertilidad y eyaculación retrograda entre otras) (Rodríguez, 1980; Zarate y col., 1989; Rehman y col., 2001). Además, es conocido que los niveles de testosterona, LH y FSH disminuyen en individuos diabéticos (Arreola y col., 1986; Ali y col., 1993; Dhindsa y col., 2004).

Se tomaron espermatozoides del conducto deferente de SHR, para evaluar los espermatozoides anormales es decir aquellos que carecieran de flagelo. A los tres y seis meses la morfología espermática (Fig. 9), de los lotes tratados con STZ, presentaron un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides anormales. Es conocido que en la diabetes hay un daño progresivo a los sistemas y tejidos durante el desarrollo de la enfermedad, principalmente a nivel de membrana (Stav y Katyare, 2004). También puede ocasionar un daño en el eje, hipotálamo-hipófisis-gónada (Zarate y col., 1989). Lo anteriormente mencionado podría justificar, el por qué del aumento significativo de células anormales.

Al administrar el suplemento de omega-3, su tendencia fue a disminuir el porcentaje de espermatozoides anormales (Fig. 9). Cabe mencionar que los AGPIs de cadena larga además de ser una fuente energética, son importantes para mantener y regular la flexibilidad membranal (Caballero, 2006). Esto podría explicar de alguna manera, por qué las células espermáticas fueron más resistentes, a los posibles daños por efectos mecánicos. Además, otras investigaciones sugieren que un cambio en la concentración de AG en la dieta, puede provocar cambios en la composición lipídica de las células de Sertoli que son las células de soporte en el desarrollo de la espermatogénesis (Marzouki y Coniglio, 1982; Álvarez y col., 2001). Por lo tanto, sugerimos que la ingesta de omega-3, ayuda a mantener la morfología de los espermatozoides.

La hipertensión, es un notable factor de riesgo para la disfunción sexual, se ha reportado que un 35,2% de los pacientes con hipertensión presentan disfunción eréctil, en comparación con el 14,1% de los sujetos normotensos (Oude y Lycklama, 2006; Reffelmann y Kloner, 2006; Andersen y col., 2007). Este riesgo es más alto en individuos diabéticos (Fazio y Brock, 2004). Por otro lado se ha sugerido que en SHR de 16 semanas de edad, la cantidad de células germinales se ve disminuida, debido a la hipertensión (Atanassova y col., 2009).

Por otro lado, la reacción acrosomal (RA) es una serie de pasos que preparan al espermatozoide, para adquirir la capacidad fertilizante. Un espermatozoide solo puede sufrir la RA habiendo sido capacitado previamente (Yanagimachi y Usui, 1974; Bendahmane y col., 2002; Breitbart y Spungin, 1997; Breitbart, 2002).

En los espermatozoides de ratas tratadas con STZ, se presentó una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides con RA, comparados con el lote control (comportamiento observado a los tres y seis meses, Fig. 10).

La concentración y la motilidad de las células espermáticas, se ven alteradas por la hiperglucemia, que altera la producción de energía, posiblemente a causa de un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), y que provocan cambios en los lípidos y las proteínas de las MP. La peroxidación de los AGPIs da lugar a una pérdida en las funciones e integridad de la membrana del espermatozoide (Sanocka y Kurpiz, 2004; Amaral y col., 2006).

La MP del espermatozoide tiene un alto contenido de AGPIs (en particular DHA), que son los responsables de su fluidez y su capacidad funcional. Además sus lípidos, están involucrados en procesos como la maduración espermática, espermatogénesis, capacitación, reacción acrosomal, y eventualmente en la fusión de membranas (Hinkovska y col., 1986; Ollero y col., 2000; Sanocka y Kurpiz, 2004).

Al administrar el suplemento de ω -3, a los lotes tratados con STZ, presentaron un incremento significativo en el porcentaje de células que obtuvieron RA (Fig.10). Los ácidos grasos tienen un papel importante en la estructura y función de la membrana, ellos modulan propiedades importantes tales como la fluidez y la permeabilidad, además del transporte de iones, y de modular la acción de algunas enzimas (Pérez y Guerrero, 2005). Durante la capacitación, algunos cambios en el espermatozoide son los siguientes: modificaciones en la permeabilidad y fluidez de la MP, cambios en la concentración de colesterol, rearreglo o alteración de proteínas a nivel de superficie espermática, aumento en la movilidad y un mayor influjo de iones calcio y HCO_3^- , (Baldi y col., 2000). Con base en los antecedentes mencionados sugerimos que el aumento en células que perdieron acrosoma, por RA, es debido a los cambios en la permeabilidad de la MP, por la incorporación de los AGPIs del suplemento administrado. Además, Guma (1997) sugiere que los AGPIs, pueden ser transferidos de las células de Sertoli a células germinales. Por lo tanto, la fluidez de la membrana en el espermatozoide juega un papel importante en el proceso de capacitación y RA.

Daños histológicos en las gónadas, durante el desarrollo de la diabetes en SHR

Los estudios histológicos de las SHR, con STZ (50 y 75 mg/kg), presentaron una degeneración de los túbulos seminíferos (proceso degenerativo), causando una disminución en el tamaño y número de células que conforman al túbulo seminífero. Siendo más severos con una dosis de 75 mg/Kg, y seis meses de edad. Al administrar los ω -3, los daños se ven disminuidos de severos a moderados (Fig. 11).

Cabe mencionar que en la espermatogénesis de ratas, se presentan 19 tipos celulares, y 14 asociaciones. En este trabajo se evaluaron las asociaciones V, VI, VII VIII, IX y X, por ser las asociaciones que representan el inicio y el final del desarrollo y diferenciación de la célula espermática.

Al tercer y sexto mes los lotes tratados con STZ, no presentaron cambios en el porcentaje de la asociación VI. Sin embargo al sexto mes en el lote STZ50 al que se le administró el suplemento de omega-3, se observó un decremento significativo de la asociación VI (Fig. 12).

En la asociación VIII, al sexto mes los lotes tratados con STZ, presentaron un decremento significativo en el porcentaje. Al administrar el suplemento de omega-3, el lote tratado con STZ75, presentó un incremento significativo (Fig. 13). La asociación VIII representa a las células maduras, su disminución se puede reflejar en el número de espermatozoides diferenciados listos para ser liberados del testículo y madurar en el epidídimo. Al administrar el suplemento, el daño histológico no es tan severo, por lo que el proceso de espermatogénesis, probablemente no se ve interrumpido. Esto nos puede explicar porque se incrementa el porcentaje de la asociación VIII, en el lote STZ 75mg/Kg.

Las asociaciones V y VII, no fueron descritas por sus similitudes con los tipos celulares que comprenden la asociación VI y VIII. La asociación IX, fue descrita porque en ella se observan las células en desarrollo.

En la asociación IX, se encuentran las células inmaduras. Un incremento en el porcentaje de esta, representa una disminución en la diferenciación de las células durante el proceso de la espermiogénesis. En el lote STZ 75mg/Kg, se presentó un incremento en el porcentaje de la asociación IX, sin embargo al administrar el suplemento no se observaron cambios, por lo que la tendencia fue a mantenerse (Fig.14).

El aumento en la asociación IX, y la disminución en la VIII, sugiere que el desarrollo de la diabetes y la hipertensión tienen una influencia negativa en el proceso de diferenciación espermática, por lo tanto se reflejaría en la cantidad de espermatozoides. Con la administración de omega-3, los daños en el tejido disminuyen y las células diferenciadas aumentan (asociación VIII). Esto nos sugiere que los omega-3, tienen un efecto protector (Álvarez-G y col., 2001; Hernández-Rivera, 2008).

Peso corporal y gonadal de individuos SHR diabéticos

En el lote tratado con STZ 75 a los seis meses, se observó una disminución en el peso gonadal, y el lote STZ75 con omega-3, su tendencia fue a aumentar aunque no significativamente (Fig. 15). Cabe mencionar que la alta prevalencia de hipogonadismo es un defecto común en la DM2, independientemente del control de la glucemia, la duración de la enfermedad y la obesidad (Levalle y col., 1998; Dhindsa S, Prabhakar S, *et al*, 2004).

Como anteriormente se describió el daño histológico fue más severo en el lote STZ 75, a los seis meses, posiblemente esto explique la reducción del peso relativo de la gónada. Con omega-3, al reducirse los daños, los resultados sugieren que la tendencia es a la ganancia de peso.

Además se ha reportado que la diabetes está asociada con desórdenes en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, pues se ha observado que la respuesta del eje disminuye en comparación con ratas normoglicémicas. Esta disminución puede estar relacionada con defectos en el sistema receptor de corticosteroides (Fruehwald-Schultes y col., 1999; Chan y col., 2004). Además se ha observado una disminución en el número y la función de las células de Leydig, en la producción de testosterona y en los receptores de insulina y andrógenos (FSH) en los túbulos seminíferos (Ballester y col., 2004).

Composición de ácidos grasos en el testículo de SHR diabeticas

Es sabido que las células espermáticas de mamíferos, presentan un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en su composición lipídica (Sanocka y Kurpysz, 2004), esta hipótesis apoya los resultados de Beckman y Coniglio (1983) que sugiere que la deficiencia de AGPIs, provoca la interrupción de la espermatogénesis; además se ha observado que en individuos diabéticos la atrofia testicular se produce por una deficiencia

de ácidos grasos esenciales (Peluffo y col., 1970). Estos antecedentes y nuestros resultados nos hacen sugerir, que al administrar el suplemento de omega-3, disminuyen los daños en el tejido testicular, posiblemente por su incorporación en las membranas del tejido testicular.

Los lípidos del testículo tienen un metabolismo activo, y se forman a partir de fuentes de la dieta y de procesos como la síntesis, alargamiento, desaturación, interconversión, esterificación y oxidación del tejido testicular (Guma y col., 1997) Se ha reportado que los lípidos pueden ser la principal fuente de energía para las células de Sertoli (Jutte y col., 1985).

Las células de Sertoli tienen un alto contenido de AGPIs de cadena larga. Además, son más activas que las células germinales en la síntesis de estos compuestos, estos pueden ser transferidos a través de los triglicéridos (vehículo) a las células germinales. Cabe mencionar que la cantidad de triglicéridos cambia de acuerdo a las diferentes etapas de la espermatogénesis (Guma y col., 1997).

En este trabajo se analizaron los cambios en las proporciones de la composición lipídica en testículos de SHR, con diferentes dosis de STZ, a diferentes edades (3 y 6 meses).

Palmitico

A los seis meses en el lote STZ 75, al que se le administró el suplemento, presentó un decremento significativo en el porcentaje del ácido palmítico, comparado con STZ75 al que no se le administró el suplemento (40.28-36.62) en el testículo de SHR.

Se ha reportado que el ácido palmítico como el mayor sustrato de energía de las células de Sertoli (Jutte N y col., 1985). Al existir una atrofia testicular la síntesis de los ácidos grasos disminuye (Peluffo 1970), posiblemente al disminuir los daños histológicos la síntesis aumente, y se reduzca la presencia de este ácido graso en el testículo

Linoléico

El ácido linoléico (omega-6) es un ácido graso poliinsaturado indispensable, que se obtiene a través de la dieta, y es precursor del AA, resultado de la acción de las enzimas $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas (Rodríguez-Cruz y col., 2005). La metabolización del ácido linoléico

es mayor en animales jóvenes, que en animales adultos. Se ha encontrado que su síntesis está relacionada con la presencia de las primeras etapas de desarrollo de las espermatogonias y espermatozoides. Una reducción en la síntesis del ácido linoléico en ratas diabéticas puede ser un factor etiológico en la atrofia testicular (Peluffo y col, 1970). El lote STZ 75, no presentó cambios significativos a los tres y seis meses, en el porcentaje de ácido linoléico. Esta tendencia también fue observada al administrar el suplemento.

Ácido α -linoléico

Se ha reportado la presencia del ácido α -linoléico en tejido testicular de ratas *Wistar* con DM2 (Hernandez-Rivera, 2008), a diferencia de lo que reportamos en este trabajo, donde la presencia de dicho ácido fue nula o no apreciable, sugerimos que posiblemente se deba al modelo de SHR. Esta disminución puede deberse a que este es utilizado para producir energía y es metabolizado en EPA y DHA (entre un 5-10% y 2-5% respectivamente).

Araquidónico

El AA es el precursor de los prostanoides (prostaglandinas y tromboxanos) de la serie 2 y de los leucotrienos de la serie 4, mientras que el EPA es el precursor de los prostanoides de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5 (Simopoulos, 1991). Se ha reportado que la administración del AA aparentemente es capaz de evitar la atrofia testicular (Peluffo y col, 1970).

Se ha demostrado que la hidrólisis de productos por la fosfolipasa A2, (PLA2) como el ácido AA, están involucrados en la reacción acrosomal. Además, el AA también puede ser producido mediante la estimulación de la secuencia de acción de la fosfolipasa C (PLC) y diacilglicerol lipasa (DAG) (Breitbart y Spungin, 1997).

En el análisis por cromatografía de gases, se observó que el ácido araquidónico, no tuvo cambios significativos en los lotes tratados con STZ y en los lotes STZ w-3, estos resultados son comparados con Hernández-Rivera (2008), el cual no observó cambios en la proporción del AA, en gónadas de ratas *Wistar* con DM2 experimental. En otro experimento Hurtado y Gómez (2002), reporta que hay un aumento de AA, en células de

Sertoli de Wistar de un mes, posiblemente por el incremento de linoléico como sustrato en las membranas de las células del testículo.

Eicosapentaenoico (EPA)

El EPA es el precursor de los prostanoideos de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5, que son compuestos con actividades fisiológicas sustancialmente inferiores que los derivados del AA. Además el EPA compite con el AA por su incorporación en los fosfolípidos y también por el acceso a las enzimas ($\Delta 5$ y $\Delta 6$) que participan en la síntesis de eicosanoides. (Voet y Voet, 1992; Covarrubias y Ortega, 2002). A los 3 y 6 meses en el lote STZ-75, el porcentaje de EPA, disminuyó. Sin embargo a los seis meses en STZ 75 al administrar el suplemento la tendencia fue a aumentar de manera significativa.

Docosahexanoico (DHA)

El DHA es uno de los principales productos de la familia de los omega-3, se obtiene a partir del ácido α -linolénico, por un serie de secuencias donde alternan desaturasas ($\Delta 5$ y $\Delta 6$) y elongasas (Leonard y col., 2004; Rodríguez-Cruz y col., 2005). Se ha reportado que una ingesta abundante de ácido linoleico puede reducir la capacidad del organismo para convertir el ácido α -linolénico en DHA (Caballero y col., 2006). El porcentaje de DHA en el lote STZ 75 con y sin suplemento, no presentó cambios significativos, a los tres y seis meses.

La FSH y la insulina estimulan el proceso de esterificación de lípidos en células de Sertoli, permitiendo afirmar que las dos hormonas modulan el metabolismo lipídico en ellas, éste es importante no sólo para mantener la energía de la célula en sí, sino también para el control del proceso de espermatogénesis (Guma y col., 1997).

En células de Sertoli y Leydig hay diferencias en la composición de los ácidos grasos. Una baja en la actividad de la enzima $\Delta 5$ desaturasa es la responsable de la conversión del ácido linoleico al AA. Esto ocasiona que los niveles de VLDL en plasma, la síntesis hepática de triglicéridos y VLDL disminuyan (Keith, 2001).

Se ha sugerido que el control del metabolismo de lípidos es importante no solo como fuente de energía de la célula, sino también para el control del proceso de espermatogénesis (Guma y col., 1985) El decremento en la concentración de ácidos

grasos poliinsaturados, puede explicar el arresto de las células de la espermatogénesis (Peluffo, 1970). Además, del aumento o decremento en las diferentes asociaciones celulares anteriormente descritas.

La fluidez de la membrana esta influenciada por factores como, la composición lipídica, las proteínas, y colesterol que la compone. En las gónadas existe una variedad de células, como son, espermatogonias, espermatocitos, espermatidas, espermatozoides, células de Sertoli, células de Leydig, entre otras; su composición lipídica, varía de acuerdo a la etapa de diferenciación, como es el caso del proceso de espermatogénesis, o de las funciones que desempeñe la célula en el testículo. (Jutte N y col., 1985; Guma y col., 1997; Sanocka y Kurpysz, 2004). En este trabajo de investigación la extracción de ácidos grasos, se realizo en testículos enteros, por lo que los datos mostrados son de la composición de una mezcla de diferentes tipos celulares, localizados en la gónada. Por lo que el índice de fluidez solo nos da un parámetro cercano a la fluidez de las membranas presentes en las células.

VI. CONCLUSIONES

- En individuos diabéticos se favorece el incremento en los niveles de presión sistólica
- En SHR la diabetes puede contribuir a:
 - Aumentar la cantidad de espermatozoides incompletos
 - Disminuir el porcentaje de RA de espermatozoides capacitados
 - Daño al tejido gonadal
 - Modifica el numero de asociaciones celulares presente en el tejido testicular
- El suplemento de omega-3, en ratas SHR diabéticas:
 - Reduce los niveles de glucosa en sangre
 - Reduce la presión sistólica
 - Disminuye el porcentaje de espermatozoides anormales (se vuelven menos frágiles)
 - Aumenta el porcentaje de células que presentan RA
 - Aparentemente el suplemento tiene un efecto protector ya que redujo los daños en las gónadas
 - De alguna manera favorece el proceso de espermatogénesis

VII. GLOSARIO

- **Ácido Graso.**- biomolécula con un grupo funcional carboxilo (polar $-\text{COOH}$) enlazado con una cadena hidrocarbonada (no polar).
- **Acrosoma.**- pequeño depósito situado en el extremo apical de la cabeza del espermatozoide y que contiene enzimas hidrolíticas. La misión de éstas es degradar la zona pelúcida.
- **Arteriopatía.**- enfermedad que afecta las arterias, se caracteriza por la dificultad en la circulación de la sangre a través de las arterias.
- **Capacitación espermática.**- proceso en el que los espermatozoides presentan cambios en su membrana plasmática, permeabilidad, y fluidez. Además el espermatozoide desarrolla una hiperactivación del flagelo, y un aumento en el flujo de iones calcio y HCO_3 (Baldi y col 2000)
- **Células de Leydig.**- células localizadas en el testículo, encargadas de la producción de testosterona,
- **Células de Sertoli.**- células localizadas en los túbulos seminíferos, envuelven, protegen y nutren a las células germinales, durante su diferenciación.
- **Diabetes mellitus.**- síndrome, compuesto por un conjunto de trastornos, que tienen en común, el aumento de glucosa plasmática. Entre estos síndromes se encuentran: deficiencia en la secreción de insulina, o resistencia de las células a la acción de esta hormona.
- **Dislipidemia.**- patología donde se presenta la alteración en el metabolismo de lípidos, con su consecuente cambio en las concentraciones de lípidos y lipoproteínas en la sangre.
- **Endocrinopatía.**- síndromes caracterizados por alteración en las secreciones de las glándulas.
- **Espermatozoide.**- es una célula haploide altamente diferenciada que constituye el gameto masculino. dicha célula tiene la capacidad de fecundar al óvulo.
- **Espermatogénesis.**- es el mecanismo encargado de la producción de espermatozoide; es la gametogenesis en el macho.
- **Espermiogénesis.**- proceso de maduración y diferenciación celular, de celular espermatida a espermatozoide.

- Espermátidas.- son células precursoras de los Espermatozoides. Estas células se forman cuando se reproduce el espermatocono secundario y son las que evolucionarán hasta convertirse en Espermatozoides.
- Haploide.- es aquella célula que contiene la mitad (n) del número normal de cromosomas.
- Hiperinsulinemia.- exceso de insulina en sangre. La insulina es una hormona segregada por el páncreas que regula la cantidad de glucosa en sangre y su utilización por el organismo.
- Hipertensión.- trastorno caracterizado por un incremento en la presión arterial, en valores por encima de 140/90 mm/Hg,
- Hipertrigliceridemia.- se caracteriza por el aumento de los triglicéridos plasmáticos por encima de 200 miligramos por cada decilitro de sangre.
- Hiperglucemia.- cantidad excesiva de glucosa en la sangre. etimológicamente hyper- en griego significa "demasiado"; -glyc- en griego significa "dulce"; -emia significa "de la sangre".
- Homeostasis.- proceso de regulación del medio interno de una célula mediante el cual se obtiene condiciones estables y constantes.
- Nefropatía.- daño o enfermedades en el riñón.
- Normotenso.- individuos que presentan una presión sanguínea normal,
- Reacción acrosomal.- Proceso de exocitosis regulada por calcio extracelular, en el que se fusionan, la membrana acrosomal externa, y la membrana plásmica del espermatozoide. Seguido por la formación de vesículas que permiten la liberación del contenido acrosomal.
- Resistencia a insulina.- disminución a la sensibilidad de la insulina, o falla de la acción de la insulina.
- Síndrome metabólico.- conjunto de trastornos, en los que se asocian la diabetes mellitus, intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial primaria, obesidad central, dislipidemia, hiperlipidemia, hiperfibrinogenemia, micro albuminuria, aterosclerosis y resistencia a insulina.
- Triglicéridos.- son otro tipo de lípidos en la sangre. La mayoría de la grasa del cuerpo son triglicéridos almacenados para ser convertidos en energía cuando hace falta. Los triglicéridos se obtienen de las grasas en los alimentos y son metabolizados en el hígado.

VIII. REFERENCIAS

Aguila MB, Pinheiro AR, Aquino JC, Gomes AP, Mandarim-de-Lacerda CA, 2005, Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 76:74-85.

Alexopoulou O, Jamart J, Maiter D, Hermans MP, De Hertogh R, De Nayer PH, Buysschaert M, 2001, Erectile dysfunction and lower androgenicity in type 1 diabetic patients. *Diabetes Metab*, 27:329-336.

Ali ST, Shaikh RN, Ashlagsiddigi N, Siddigi PQ, 2001, Serum and urinary levels of pituitary gonadal hormones in insulin dependent and non insulin dependent diabetic males with and without neuropathy. *Arch Androl*, 30:117-123.

Alemán G, Torres N, y Tovar AR, 2004, Los receptores activados por proleferadores de peroxisomas (PPARs) en el desarrollo de la obesidad y resistencia a insulina, *Rev Inv Clin*, 56(3):351-367.

Álvarez J, Ollero M, Freedman D, 2001, El ácido docosahexanoico corrige un defecto lipídico en células germinales y espermatozoides del epidídimo y aumenta la producción de espermatozoides en ratones *cftr*^{-/-}, *Revista iberoamericana de fertilidad*, 18(4).

Amaral S, Moreno AJ, Santos MS, Seiça, Ramalho-Santos J, 2006, Effects of hyperglycemia on sperm and testicular cells of Goto-Kakizaki and streptozotocin-treated rat models for diabetes, *Theriogenology* 66:2056–2067.

Andersen M, Martins R, Alvarenga T, Antunes I, Papale L, Tufik S, 2007, Progesterone reduces erectile dysfunction in sleep-deprived spontaneously hypertensive rats, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 5(7).

Áreas 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*, 347:45-49.

Arreola F, Paniagua R, Herrera J, Diaz-Bensussen S, Mondragon L, Bermudez J, Perez Pasten E, Villalpando S, 1986, Low plasma zinc and androgen in insulin dependent diabetes mellitus. *Arch Androl*, 16, 151-154.

Atanassova N, Lakova E, Bratchkova Y, Krasteva G, Donchev M, 2009, Expression of testicular angiotensin-converting enzyme in adult spontaneously hypertensive rats, *Folia Histochem Cytobiol*, 47(1):117-22.

Avendaño-Flores Y, 2008, Efecto de los ácidos grasos ω -3 en un modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con diabetes mellitus tipo 2, Tesis de licenciatura, Biología, UNAM FES-Iztacala.

Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G, 2000, Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction, *Front Biosci*, 1(5):110-123.

Bendahmane M, Zeng HT, Tulsiani D, 2002, Assesment of acrosomal status in rat spermatozoa: studies on carbohydrate and non-carbohydrate agonist, *Archives of biochemistry and Biophysucs*, 404:38-47.

Breitbart H, 2002, lintracellular calcium regulation in sperm capacitation and acrosomal reaction, *Molecular and cellular endocrinology*, 187:139-144.

Breitbart H, Spungin B, 1997, The biochemistry of the acrosome reaction, *Molecular Human Reproduction*, 3(3):195-202.

Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, Tamargo J, Delpón E, 2006, Farmacología de los ácidos grasos omega-3, *Revista Española de Cardiología, Supl.*, 6:3D-19D.

Chan O, Inouye K, Akirav E, Park E, Riddell M, Vranic M, Matthews S, 2004, Insulin alone increases hypothalamo-pituitary-adrenal activity, and diabetes lowers peak stress responses, *Endocrinology* 146(3):1382-1390.

Clarke SD, 2001, Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: A Molecular mechanism to improve the metabolic syndrome, *J Nutr.*, 131:1129-1132.

Comte C, Bellenger S, Bellenger J, Tessier C, Poisson JP, Narce M, 2004, Effects of streptozotocin and dietary fructose on delta-6 desaturation in spontaneously hypertensive rat liver, *Biochimie*, 80:799-806.

Cordero A, Moreno J, Alegría E, 2005, Hipertensión arterial y síndrome metabólico, *Rev Esp Cardiol Supl*, 5:38D-45D.

Covarrubias R, Ortega M, 2002, Informe de residencia: Ácidos grasos omega 3 y omega 6, Tesis, Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía, Santiago de Chile.

Cruz-Corchado M, 2001, Panorama epidemiológico de la hipertensión arterial en México, *archivos de cardiología de México*, Vol.71, Supl. 1S192-S197, Enero-Marzo.

Delachambre MC, Narce M, Asdrubal P, Poisson JP, 1998, Changes in tissue polyunsaturated fatty acids with age, in spontaneously hypertensive rats, *Lipids*, 33(8):795-801.

Dhindsa S, Prabhakar S, Sethi M, Bandyopdhyay A, 2004, Frequent Occurrence of Hypogonadotropic hypogonadism in Type 2 diabetes, *The journal of clinical & metabolism*, 89(11):5462-5468.

Eaton D, Pooler J, 2006, *Fisiología renal de vander*, Mc Graw-Hill, 6ª edición, México.

Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S, Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*, 43(12):1528-1533.

Engler MB, Engler MM, 2000, Docosaehaenoic acid--induced vasorelaxation in hypertensive rats: mechanisms of action, *Biol Res Nur*, 2(2):85-95.

Fazio L, Brock G, 2004, Erectile dysfunction: management update, *Canadian Medical Association*, *JAMC* 27 AVR, 170(9):1429-1437.

Fernández-Mejía, 1996, *Revista de endocrinología y nutrición*, 4(3) Julio-Septiembre.

Ferris J, O'Hare J, Kelleher C, 1985, Diabetic control and the renin angiotensin system, catecholamines and blood pressure, *Hypertension* 7:1158-1162.

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

Frayn K, 2001, Adipose tissue and the insulin resistance syndrome, *Proceedings of the nutrition society*, 60:375-380.

Fruehwald-Schultes B, Kern W, Bong W, Wellhoener P, Kerner W, Born J, Fehm H, Peters A, 1999, Supraphysiological hyperinsulinemia acutely increases hypothalamic-pituitary-adrenal secretory activity in humans, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(9):3041-3046.

Goldstein B, 2002, Insulin Resistance as the Core Defect in Type 2 Diabetes Mellitus, *The American journal of cardiology*, 90(5A).

González A, Alexánder E, Alvarado R, Ayub M, Camacho J, Germán E, 1999, Consenso Mexicano de Resistencia a la Insulina y Síndrome Metabólico, *Revista Mexicana de Cardiología*, 10(1):3-19.

González A, Lavalle F, Ríos J de J, 2004, Síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular, Intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 2, hipertensión arterial obesidad dislipidemia y resistencia a la insulina, Inter-sistemas S.A de C.V. México.

Gilbert SF, 2005, *Biología del Desarrollo*, 7ª edición, Interamericana, Medica Panamericana.

Guma FCR, Wagner M, Martini LH, Bernard EA, 1997, Effect of FSH and insulin on lipogenesis in cultures of Sertoli cells from immature rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30:591-597.

Guyton AC, 1992, *Fisiología y patología*, 5ª ed., Interamericana, Mc Graw Hill, México.

Harrison TR, *Principios de medicina interna*, 15ª edición, volumen I y II, Mc Graw Hill, 2002.

Hassan AA, Hassouna M.M. (1993). The effects of diabetes on sexual behavior and reproductive tract function in male rats. *The Journal of urology*. 3(10):140-142.

Hernández-Ávila M, Olaíz G, 2002, La diabetes y el mexicano: Un reto para la salud pública, *Ciencia Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, Julio-Septiembre, 53(3):8-17.

Hernández-Rivera, E, 2008, Efecto de los ácidos grasos omega-3 (ω -3) y linoléico conjugado (CLA) sobre la histología de los testículos y morfología de los espermatozoides en diferentes estados fisiológicos de ratas con Diabetes Mellitus 2 (DM2), Tesis de licenciatura, Biología, UNAM FES-Iztacala.

Hinkovska VT, Dimitrov GP, Koumanov KS, 1986, Phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram spermatozoa plasma membranes, *Int J Biochem*, 18:1115-1121.

Hiriart M, 2002, La historia natural de la diabetes, *Ciencia Revista de la Academia Mexicana de ciencias*, Julio-Septiembre, Vol. 53, Nº 3:4-7.

Hugues B, Rodríguez-González JC, Rodríguez-García JC, , Animales de laboratorio en la endocrinología: biomodelos de la diabetes mellitus tipo I, *Rev Cubana de endocrinología*, 12(3):168-177.

Hurtado de Catalfo G, Gomez N, 2002, Polyunsaturated fatty acid biosynthesis from [1- 14 C] 20:3 n-6 acid in rat cultured Sertoli cells Linoleic acid effect, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34:525–532.

Islas S, Lifshite A, 1999, *Diabetes mellitus*, 2a edición, Mc Graw-Hill.

Jiménez-García LF, Merchant H, 2003, *Biología celular y molecular*, 1ª edición, Pearson educación, México.

Jutte N, Eikvar L, Levy F, Hasson V, 1985, Metabolism of palmitate in cultured rat Sertoli cells, *Journal of reproduction and fertility*, 73:497-503.

Kaplan NM, 1999, *Hipertensión clínica*, 3ª edición, Waverly Hispánica S.A., Buenos Aires Argentina.

Khan S, Teerels K, Dorrington J, 1992, Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. *Biol Reprod.*46:335-341.

Lahoz C, Alonso R, Ordovas JM, López-Farré A, Oya M, Mata P, 1997, Effects of dietary fat saturation on eicosanoid production, platelet aggregation and blood pressure. *Eur J Clin Invest* 27:780.

Leat MF, Northrop C, Harrison FA, Cox RW, 1983, Effect of dietary linoleic and linolenic acids on testicular development in the rat, *Quarterly Journal of Experimental Physiology*, 68(2):221-231.

Le Roith D, Taylor S, Olefsky J, 2003, *Diabetes mellitus Texto básico y clínico*, 2ª edición, Mc Graw Hill, México.

Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, Huang YS, 2004, Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*, 43(1):36-54.

Lerman I, 2005, *Atención integral del paciente diabético*, 3ª ed., Mc Graw-Hill Interamericana, México.

Levalle O, Aszpis S, Nadgelberg A, Mormandi E, Otero P, 1998, Inducción de la espermatogénesis en el hipogonadotrófico. (Induction of Spermatogenesis in hypogonadotropic hypogonadism). División Endocrinología, Hospital Carlos Durand, Buenos Aires Argentina.

Lieberman J, Sastre A, 1980, Serum angiotensin-converting enzyme: elevations in diabetes mellitus. *Ann Intern Med*, 93:825-826.

López-Farre A, Macaya C, 2006, Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3, *Revista española de cardiología*, 6:31D-7D.

Luna LG, 1958, *Manual of histology, methods of armed forces, Institute of pathology*, 3ª ed, Mc Graw-Hill Co. N.Y.

Martínez MJ, Martínez MT, Serranos M, 2003, Síndrome de resistencia a la insulina y síndrome metabólico: similitudes y diferencias. Síndrome metabólico: concepto, fisiopatología y epidemiología, *Cardiovascular risk factors*, 12(2):89-95.

Marzouki ZMH, Coniglio J, 1982, Effect of essential fatty acid deficiency on lipids of rat Sertoli and germinal cells, *Biology of reproduction*, 27:312-315.

Mazón P, Bertomeu V, Quiles J, González JR, 2008, Temas de actualidad en hipertensión arterial y diabetes, *Rev Esp Cardiol*, 61(1):58-71.

Mendivil C, Sierra I, 2005, Acción insulínica y resistencia a la insulina: Aspectos moleculares, *Rev Fac Med Univ Nac Colomb*, 53(4)

Michaelis O, Patrick D, Hansen C, Canary J, Werner R, Carswell N, 1986, Animal model of human disease, insulin-independent diabetes mellitus (type II), Spontaneous hypertensive/NIH-Corpulent Rat, *Registry comparative Pathology of the Armed Forces Institute of Pathology*, 123(2)

Morrison WR, Smith LM, 1964, Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol, *J. Lipid res.* 5:600-608

Nacional Diabetes Data Group, 1979, Clasificación and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose tolerance. *Diabetes*, 28:1039

Peluffo R, Ayala S, Brenner R, 1970, Metabolism of fatty acids of the linoleic acid series in testicles of diabetic rats, *American Journal of Physiology*, 218(3):669-673

Pérez E, Guerrero C, 2005, Mecanismos moleculares por los cuales los ácidos grasos podrían influir en la captación de glucosa, *Rev Fac Med Nac Colomb*, 53(2)

Pérez E, Guerrero C, 2006, Ácidos grasos en la dieta, diabetes mellitus e insulino resistencia, *Rev Fac Med Nac Colomb*, 54(2)

Pérez-Hernández I, 2008, Cambios en lípidos durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas, Tesis de licenciatura, Biología, UNAM, FES-Iztacala.

Pollare T, Lithell H, Selinus I, Berne C, 1988, Application of prazosin is associated with an increase of insulin sensitivity in obese patients with hypertension. *Diabetologia*, 31: 415-420.

Poretzky L, 2002, Principles of diabetes mellitus, Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts, USA.

Pou Torelló JM, Rigla M, 2001, Hipertensión arterial como factor de riesgo cardiovascular en la diabetes, Cardiovascular Risk Factors, 10(5)

Okamoto K, Auki K, 1969, Development of a strain of spontaneously hypertensive rats, Jpn Circ J. 27: 282.

Oksanen A, 1975, Testicular lesions of streptozotocin diabetics rats, Horm Res, 6(3):138-144.

Ollero M, Powers RD, Alvarez JG, 2000, Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage, Mol Reprod Develop, 55:326-334.

Oparil, S, Weber M, 2000, Hipertensión El riñón de Brenner y Rector, Ed McGraw-Hill Interamericana, México.

Oude AJM, Lycklama AAB, 2006, Erectile dysfunction in patients with cardiovascular disease, Netherlands Heart Journal, 14(4).

Reaven GM, Lithell H, Landsberg L, 1996, Hypertension and associated metabolic abnormalities- the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system, N Engl J Med, 334:374-81.

Reffellmann T, Kloner R, 2006, Sexual function in hypertensive patients receiving treatment, Vascular Health and Risk Management 2(4) 447–455.

Rehman K, Beshay E, Carrier S, 2001, Diabetes and male sexual function, Sex Reproduction Med. 1(1):1-7.

Robbins MD, Stanley L, 2004, Patología humana, 7ª ed. Elsevier, Madrid España.

Rodríguez-Cruz M, Tovar A, del Prado M, Torres N, 2005, Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poli-insaturados y sus beneficios para la salud. Revista de investigación clínica 57(3):457-472.

Rodríguez LJ, 1980, Diabetes and male reproductive function, American Society of Andrology, Journal of Andrology 1(3):105-110.

Sanocka D, Kurpisz M, 2004, Reactive oxygen species and sperm cells, Reproductive biology and endocrinology, 2:12.

Satav JG, Katyare SS, 2004, Effect of streptozotocin-induced diabetes on oxidative energy metabolism in rat liver mitochondria a comparative study of early and late effects, Indian journal of clinical biochemistry, 19(2):23-31.

Shubhada N, Ahya MD, Kellie Flood M D, 2001, EL manual Washington de Terapéutica médica, 30ª edición, McGraw Hill interamericana, México.

Simopoulos AP, 1991, Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development, Am J Clin Nutr, 54:438-63.

Simopoulos AP, 1999, Essential PUFA's in health and chronic disease. AM J Clin Nutr, 70:560-569.

Skudelski T, 2001, The mechanism of Alloxan and Streptozotocin action B cells of the rat Pancreas, Department of animal physiology and biochemistry, University of Agriculture, Poznan, Poland, Physiol, Res, 50:536-546.

Soudamani S, Yuvaraj S, Malini T, Balasubramnian K, 2005, Experimental diabetes has adverse effects on the differentiation of ventral prostate during sexual maturation of rats, The anatomical record part a 287A:1281-1289.

Srinivasan K, Ramarao P, 2007, Animal models in type 2 diabetes research: an overview, Indian J Med Res, 125:451-472.

Stern, N y Tuck ML, 2003, Patogenia de la hipertensión en la diabetes mellitus, En: Le Roith D, Taylor S, Olefsky J, 2003, Diabetes mellitus Texto básico y clínico, 2ª edición, McGraw Hill, México.

Stewart J, Brown K, Kendrick D, Dyas J, 2005, Understanding of blood pressure by people with type 2 diabetes: a primary care focus group study, British Journal of General Practice, April, 55:298-304.

Suresh Y, Das UN, 2003, Long-Chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus. Effect of w-3 fatty acids. *Nutrition*, 19:213-28.

Taouis M, Dagou C, Ster C, Durand G, Pinault M, Delarue J, 2002, N-3 Polyunsaturated fatty acids prevent the defect of insulin receptor signaling in muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282:E664–E671.

Trejo R, Mújica A, 1990, Changes in calmodulin compartmentalization throughout capacitation, and acrosome reaction in guinea pig spermatozoa, *Mol Reprod Dev*, 26(4):366-376.

Voet D, Voet J, 1992, *Bioquímica*, Ediciones Omega, Barcelona, España.

Woodman R, Mori T, Burke V, Puddey I, Watts G, Beilin L, 2002, Effects of purified eicosapentanoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients whit treated hypertension, *American Society for Clinical Nutrition*, 76:1007-15.

Yanagimachi R, Usui N, 1974, Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa, *Exp Cell Res* 89(1):161-174.

Zarate A, Villalpando S, Miranda R, 1989, *Diabetes mellitus, Bases para su tratamiento*. Editorial Trillas, México.