



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Uso de ácidos grasos omega contra el desarrollo de la diabetes

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**Mónica Rivera Valencia**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Ricardo Mejía Zepeda  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

COMITÉ TUTOR: Dra. María Margarita Canales Martínez  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Dr. Juan Carlos Del Río García  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 4 de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ricardo Mejía Zepeda**

**Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN-216314-3 Titulado: “Efecto de los ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) sobre el metabolismo de lípidos, fluidez membranal y estrés oxidativo, durante el desarrollo de la diabetes”.**

**Beca CONACyT número 371041.**

**Beca otorgada por COMECyT Folio 15BTM0125.**

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

### **A los miembros del Comité Tutorial**

Dra. María Margarita Canales Martínez

Dr. Juan Carlos Del Río García

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

### **A los miembros del Jurado**

Dra. Sara Del Carmen Caballero Chacón

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Dra. Lorena Sofía Orozco Orozco

Dra. María del Consuelo Figueroa García

Dra. Raquel Guinzberg Perrusquia

Por sus valiosos comentarios en mejora del presente trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Gracias por el tiempo dedicado a mi aprendizaje y crecimiento profesional; por los consejos y pláticas entre cuates. Ricardo, siempre serás un ejemplo a seguir!

Gracias amiga (Dra. Figueroa) porque sin ti esto no hubiera sido posible desde el principio, por las clases de fisio, estadística y todo el entrenamiento para trabajar con las ratas. Por tus palabras de aliento y por siempre estar al pendiente de mí.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio que hicieron muy agradables mis días en “el lab”, en especial a Ismael por transmitirme su sabiduría.

El agradecimiento eterno a mi familia que me apoyo cuando inicie este proyecto, que me apoyo mientras me volvía loca y que no soltó mi mano y cuidó de mí en los momentos más difíciles. Por el amor incondicional que hay entre nosotros, con amor para: mis Padres, Hermanos, sobrinos y mis cuñis.

Gracias a las mejores amigas que puedo tener: Ibet, Yazmín y Rocío

Y finalmente no puedo estar más loca de amor por ustedes dos:

León, compañero de vida, gracias por motivarme a ser mejor cada día, tienes un enorme corazón y muchísima paciencia, eres un gran ser humano te amo y deseo envejecer a tu lado. Gracias por apoyarme a iniciar y concluir este proyecto, por acompañarme en los desvelos, por ir conmigo a CU a las 5 am y porque en las buenas, en las malas y en las peores sigues aquí a mi lado. Gracias por compartir con amor lo más valioso que tenemos, por enseñarme a ver la vida de otra manera, por respetarme y amarme. Por nosotros y para nosotros.

Samuel, cuando te vi y apretaste mi dedo por primera vez, supe que esa fuerza sería la que me mantendría en pie para siempre.

*Educar es más difícil que enseñar, porque para enseñar usted precisa saber, pero para educar usted precisa ser.*

*Autor desconocido.*



## ÍNDICE

<b>I.</b>	<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>II.</b>	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	2
<b>III.</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	4
<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b>	6
<b>1.</b>	<b>ABSTRACT</b>	8
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	10
2.1	Diabetes Mellitus	10
2.2	Clasificación de los diferentes tipos de Diabetes Mellitus	10
2.3	Síntesis y secreción de insulina	12
2.4	Transporte de glucosa y resistencia a la insulina	13
2.5	Ácidos grasos membranales	15
2.6	Ácidos grasos omega 3, 6 y 9	17
<b>3.</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	20
<b>4.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	22
<b>5.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	23
<b>6.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	24
6.1	Objetivo general	24
6.2	Objetivos particulares	24
<b>7.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	25
7.1	Determinación de parámetros metabólicos	26
7.2	Obtención de las muestras para su análisis	26
7.3	Análisis del suero	27
7.3.1	Cuantificación de proteína en suero	27
7.3.2	Cuantificación de colesterol en suero	27
7.3.3	Cuantificación de triglicéridos en suero	28
7.3.4	Cuantificación de insulina	28
7.4	Obtención de fantasmas de eritrocitos	28
7.5	Cuantificación de proteína total por el método de Schacterle y Pollack modificado por Pugsley y Schnaitman (1978)	29
7.6	Cuantificación de fosfolípidos en membranas de eritrocitos por la técnica de fósforo inorgánico	29
7.7	Análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases	30
7.7.1	Extracción de lípidos por el método de Folch y colaboradores (1957) del alimento de las ratas	30
7.7.2	Transesterificación de fantasmas de eritrocitos y suplementos de ácidos grasos omega 3, 6 y 9	30
7.8	Espectrometría de masas	31
7.9	Formación de liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina e incorporación de monitores	32
7.10	Monitores de fluidez membranal en liposomas de DPPC/colesterol	32
7.11	Incorporación de monitores fluorescentes en fantasmas de eritrocitos	33
7.12	Análisis estadístico	34
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS</b>	35

8.1	Parámetros fisiológicos	35
8.1.1	Primera etapa: Lactancia	35
8.1.2	Segunda etapa: de las 4 a las 24 semanas de edad	36
i)	Peso corporal	36
ii)	Glucosa sanguínea	40
iii)	Curva de ayuno	44
iv)	Curva de tolerancia a la glucosa	45
v)	Insulina	48
8.2	Metabolismo de lípidos	52
8.2.1	Colesterol	52
8.2.2	Triglicéridos	53
8.3	Análisis del suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos	55
8.3.1	Cuantificación de proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos	55
8.3.2	Cuantificación de proteína, colesterol y triglicéridos en suero	56
8.4	Composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos	58
8.5	Fluidez membranal (liposomas de DPPC como modelo de membranas)	64
8.6	Cinética de incorporación DPiP en fantasmas de eritrocitos	67
8.7	Fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos	68
<b>9.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	72
9.1	Desarrollo del modelo experimental	72
9.1.1	Caracterización del modelo (grupos control)	72
9.2	Etapa de lactancia	72
9.3	Etapa de crecimiento	73
9.4	Metabolismo de carbohidratos durante la etapa de crecimiento con tratamiento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9	78
9.5	Fantasmas de eritrocitos	82
9.5.1	Composición de ácidos grasos	82
<b>10.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	87
<b>11.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	89
<b>12.</b>	<b>ANEXO</b>	98

**I. ABREVIATURAS**

1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenil-1,3,5-hexatrieno	TMA-DPH
1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno	DPH
Ácido Alfa-Linolénico	ALA
Ácido Docosaheptaenoico	DHA
Ácido Eicosapentaenoico	EPA
Ácidos Grasos Omega 3	$\omega$ -3
Ácidos Grasos Omega 6	$\omega$ -6
Ácidos Grasos Omega 9	$\omega$ -9
Ácidos grasos poliinsaturados	(AGPIs)
Albúmina Sérica Bovina	BSA
Alloxana	Alx
Diabetes Mellitus	DM
Diabetes Mellitus Tipo 1	DMT1
Diabetes Mellitus Tipo 2	DMT2
Diabetes Mellitus Gestacional	DMG
Dipalmitoilfosfatidilcolina	DPPC
Dipirenil Propano	DPiP
Estreptozotocina	STZ
Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$	TNF- $\alpha$
Federación Internacional de Diabetes	FID
Ácidos Grasos Monoinsaturados	MUFAs
Glucotransportador 2	GLUT2
Glucotransportador 4	GLUT4
Organización Mundial de la Salud	OMS
Receptor de Insulina	IR
Trifluoruro de Boro	BF <sub>3</sub>

**II. ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1.	Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo control y diabéticos de 1 mes de edad	56
Tabla 2.	Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo control suplementado y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) de 3 meses de edad	56
Tabla 3.	Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo diabético suplementado y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) de 3 meses de edad	57
Tabla 4.	Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo control suplementado y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) de 6 meses de edad	57
Tabla 5.	Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo diabético suplementado y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) de 6 meses de edad	57
Tabla 6.	Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 1 mes de edad. Grupos control y diabéticos (STZ)	58
Tabla 7.	Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 meses de edad. Grupos control suplementados y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9)	60
Tabla 8.	Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 meses de edad. Grupos inducidos con STZ suplementados y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9)	61
Tabla 9.	Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 6 meses de edad. Grupos control suplementados y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9)	62
Tabla 10.	Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 6 meses de edad. Grupos inducidos con STZ suplementados y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9)	63
Tabla 11.	Energías de activación en membranas de fantasmas de eritrocitos de ratas de 1, 3 y 6 meses de edad, controles y diabéticas (STZ), sin ningún tratamiento de ácidos grasos omega, con diferentes monitores	68

---

Tabla 12.	Energías de activación en membranas de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 y 6 meses de edad, controles e inducidas con STZ, suplementadas con ácidos grasos omega 3. Con diferentes monitores	69
Tabla 13.	Energías de activación en membranas de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 y 6 meses de edad suplementadas con ácidos grasos omega 6. Con diferentes monitores	70
Tabla 14.	Energías de activación en membranas de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 y 6 meses de edad suplementadas con ácidos grasos omega 9. Con diferentes monitores	71

**III. ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.	Mecanismo de secreción de la insulina estimulada por glucosa	13
Figura 2.	Regulación del transporte de glucosa por la insulina	14
Figura 3.	Vía de elongación y desaturación de los ácidos grasos omega 3 y omega 6	18
Figura 4.	Grupos experimentales	25
Figura 5.	Esquema de la localización preferencial del DPH, DPiP y el TMA-DPH en las membranas biológicas	32
Figura 6.	Concentración de glucosa sanguínea y ganancia de peso de ratas inducidas a diabetes (STZ 125 mg/Kg de peso) y grupo control durante la lactancia	35
Figura 7.	Ganancia de peso semanal de ratas diabéticas tipo 2 (STZ) y su control	36
Figura 8.	Ganancia de peso semanal de ratas control con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9	37
Figura 9.	Ganancia de peso semanal de ratas diabéticas inducidas con STZ con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9	37
Figura 10.	Peso mensual de ratas diabéticas y controles	39
Figura 11.	Concentración promedio de glucosa sanguínea por semana de ratas control con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9	40
Figura 12.	Concentración promedio de glucosa sanguínea por semana de ratas diabéticas (STZ), con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9	41
Figura 13.	Comparación de la glucosa sanguínea por semana de ratas diabéticas (STZ), y su control con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9	43
Figura 14.	Concentración de glucosa (mg/dl) durante un ayuno de 5 horas. Grupo control vs grupo con diabetes mellitus tipo 2 (STZ) a las 4 semanas de edad	44
Figura 15.	Curva de tolerancia a la glucosa grupo control vs grupo con diabetes mellitus tipo 2 (STZ) a las 4 semanas de edad	45
Figura 16.	Curva de tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas y sus controles a diferentes edades: 2, 3 y 4 meses	47

---

Figura 17.	Curva de tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas y sus controles a diferentes edades: 5 y 6 meses	48
Figura 18.	Concentración de insulina en suero de ratas diabéticas y controles	49
Figura 19.	Concentración de insulina en ratas control y diabéticas a los 3 meses de edad con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9	50
Figura 20.	Concentración de insulina en ratas control y diabéticas a los 6 meses de edad con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9	51
Figura 21.	Concentración de colesterol en sangre de ratas de los grupos control de 1 a los 6 meses de edad	52
Figura 22.	Concentración de colesterol en sangre de ratas de los grupos diabéticos (STZ) de 1 a los 6 meses de edad	53
Figura 23.	Concentración de triglicéridos en sangre de ratas de los grupos control de 1 a los 6 meses de edad	54
Figura 24.	Concentración de triglicéridos en sangre de ratas de los grupos diabéticos (STZ) de 1 a los 6 meses de edad	55
Figura 25.	Fluidez membranal de liposomas de DPPC con el monitor DPiP en presencia y ausencia de colesterol	64
Figura 26.	Fluidez membranal de liposomas de DPPC con el monitor DPH en presencia y ausencia de colesterol	65
Figura 27.	Fluidez membranal de liposomas de DPPC con el monitor TMA-DPH en presencia y ausencia de colesterol	66
Figura 28.	Cinética de incorporación de DPiP en membranas de fantasmas de eritrocitos	67

## 1. RESUMEN

La diabetes es un grupo de enfermedades crónico degenerativas de origen multifactorial que día a día aumenta la tasa de incidencia, prevalencia y defunción. Los lípidos están estrechamente relacionados con el desarrollo de la diabetes; por ejemplo, se conoce que la cantidad y calidad de los ácidos grasos de la dieta modula la acción de la insulina. Se ha reportado que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), como los omega 3, los omega 6 y el aceite de aguacate rico en ácido omega 9, producen cambios asociados a efectos benéficos en contra de la diabetes. En esta tesis nos planteamos como objetivo principal: analizar el efecto del suplemento de ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) sobre el desarrollo de la diabetes, considerando parámetros fisiológicos como la concentración de glucosa, insulina, colesterol, triglicéridos y peso corporal, así como los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las membranas de eritrocitos tales como la composición de ácidos grasos y fluidez membranal. Para ello; se generó Diabetes Tipo 2 en ratas Wistar (machos) de 48 horas de edad, con estreptozotocina (dosis única 125 mg/kg peso); al destete, se suplementó a los animales con fuentes ricas en ácidos grasos omega 3 (linaza), 6 (prímula) ó 9 (aguacate), de lunes a viernes (dosis de 125 mg/kg de peso corporal).

Durante el tiempo de tratamiento se midió semanalmente la concentración de glucosa y el peso corporal; mensualmente se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa; colesterol y triglicéridos se midieron con tiras reactivas. Al final de los tratamientos (1, 3 y 6 meses) los animales fueron anestesiados con pentobarbital (40 mg/Kg peso) y se obtuvo, sangre por punción cardíaca de la cual una parte se reservó para obtener suero, a una parte se le agregó inhibidor de proteasas (Complete MINI Roche®) para cuantificar la concentración de insulina y el resto se utilizó para cuantificar colesterol y triglicéridos por métodos enzimáticos. Posteriormente de la muestra de sangre se obtuvieron fantasmas de eritrocitos y se analizó su composición de ácidos grasos por cromatografía de gases, equipo Clarus 500 de Perkin Elmer controlado por computadora, con detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar omegawax de Supelco. Para medir fluidez membrana se implementó el uso de varios monitores fluorescentes.

El modelo de diabetes utilizado en este proyecto se estableció como DMT2, la concentración de glucosa en todos los grupos oscilaron durante todo el tiempo experimental, teniendo un comportamiento similar a los grupos control y esto es debido a que la hiperglicemia

generada fue ligera, este modelo parece reflejar lo que ocurre en etapas tempranas de la diabetes en donde no hay cuidados sobre la concentración de la glucosa sanguínea por desconocimiento del paciente sobre este padecimiento. Sin embargo, aunque las concentraciones de glucosa oscilaban  $124 \pm 6$  mg/dl, las curvas de tolerancia a la glucosa mostraron que los grupos diabéticos no regulan la concentración de glucosa con o sin suplementos de ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) manteniéndose alta (600 mg/dl) por más de dos horas, hacemos hincapié en la importancia de las curvas de tolerancia a la glucosa ya que sería el método más adecuado para determinar si se tiene control sobre la glicemia principalmente en los individuos con DMT2. Al analizar la concentración de colesterol, triglicéridos, proteína en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos no se encontraron diferencias significativas entre grupos.

Con relación a la composición de ácidos grasos se observó que, considerando los valores del cociente de ácidos grasos insaturados/saturados (I/S) como indicador de fluidez membranal, el grupo control no cambió durante todo el tiempo experimental (1, 3 y 6 meses), mientras que al mes de edad el grupo inducido a diabetes con estreptozotocina (STZ) mostró un cociente menor que el grupo control, sin embargo, a los tres meses el cociente I/S indicó que el grupo STZ incrementó la fluidez, en respuesta a los cambios ocurridos durante el desarrollo de la DMT2. Los suplementos de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9 juegan un papel crucial en cuanto a la composición de AG de las membranas de eritrocitos y las diferencias observadas durante el tiempo experimental entre los grupos control y STZ suplementados, que parecieran notarse cuando la DMT2 está más avanzada, mostrando que las membranas de los grupos STZ son menos fluidas que los controles a los 6 meses de edad.

Se utilizó en un modelo de liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) tres diferentes monitores de fluidez membranal (DPiP, DPH y TMA-DPH), los cuales aportaron a este trabajo información precisa de su comportamiento dentro de un modelo membranal en presencia y ausencia de colesterol, así como la ubicación en la que se ubican preferencialmente para brindar información acerca de las características termotrópicas de las membranas. De igual modo, fueron incorporados en las membranas de los fantasmas de eritrocitos, donde se pudo observar que el DPiP es el monitor que brinda información más detallada sobre los cambios ocurridos en las membranas durante el desarrollo de DMT2.

## 1. ABSTRACT

Diabetes is a group of degenerative diseases with a multifactorial origin which increases day by day its incidence rate, prevalence and mortality. It has been shown that lipids are closely related to the development of diabetes, *e.g.* the quality and quantity of fatty acids in the diet modulate the action of the insulin. It has been reported that consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as omega 3, omega 6 and omega 9 found in avocado benefit the body protecting against diabetes. The aim of this thesis was to analyze the effect of omega 3, omega 6 and omega 9 on the development of diabetes and to test blood glucose concentration, insulin, cholesterol, triglycerides and body weight. As well as looking for changes on the physicochemical properties of the erythrocyte membrane such as fatty acids composition and membrane fluidity. To carry out our research, type 2 diabetes was induced in 48 hour-old male Wistar rats with streptozotocin (STZ) (125 mg/kg). At weaning, male Wistar rats were administered with sources rich in omega 3 (linseed), omega 6 (primula) and omega 9 (avocado) from Monday to Friday (125 mg/kg body weight/dose).

During the treatment, the levels of glucose and body weight were weekly recorded. To analyze our data, glucose tolerance curves were performed monthly. To measure the concentration of cholesterol and triglycerides test strips were used. At the end of the treatments (1, 3 or 6 months), Wistar rats were anesthetized with a dose of pentobarbital (40 mg/kg body weight) and blood samples were collected from their heart by puncture for serum separation. Serum concentrations of insulin, cholesterol and triglycerides were determined from those blood samples. The erythrocyte ghosts were obtained from that blood sample as well. To analyze fatty acid composition of erythrocyte ghosts we used gas chromatography lipid analysis. Gas chromatography analysis was carried out in a Pekin Elmer Clarus 500 controlled by computer, equipped with a split/splitless capillary injector and a flame ionization detector. For measurements of the membrane fluidity of the erythrocyte ghosts fluorescence indicators were used.

Our results suggest that the biological model that we used is a DMT2 model. The glucose concentration in the treatment groups oscillated during the experimental time similar to the control group reflecting a slight state of hyperglycemia. This biological model seems to show

what happen in the early phases is diabetic where blood sugar is raised beyond the normal but it is not so high that the patient realizes that has diabetes. From our results, we observed that glucose concentration oscillated  $124 \pm 6$  mg/dl, while that glucose tolerance curves showed that diabetic group does not regulate glucose concentration with or without fatty acids omega (3, 6 or 9). However, the diabetic group showed high glucose concentration by 2 hours after feeding (600 mg/dl). We want to remark that glucose tolerance curve is a good method to determine if there is control over glycemia mainly to the DMT2 group. Regarding cholesterol, triglycerides, serum protein and membrane protein of the erythrocytes ghosts, we have observed no significant difference between groups.

With reference to fatty acids composition, we observed that the unsaturated/saturated ratio (I/S), as an indicator membrane fluidity, the control group did not change during the experimental time (1, 3 and 6 months). Quite the opposite, the streptozotocin (STZ) group showed a lower I/S ratio respect to the control group. However, after 3 months the I/S ratio showed that membrane fluidity increased in the STZ group. These results suggest that membrane fluidity changed during the DMT2 development. In conclusion, our results suggest that consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as omega 3, omega 6 and omega 9 play a key role on the fatty acids composition of the erythrocytes membranes. After six months, the membranes of the STZ groups were less fluid than the control group, at the time where the diabetes is in an advance stage.

On the other hand, we used in a dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) liposome model different monitors such as DPiP, DPH and TMA-DPH to measure membrane fluidity. These monitors allowed us to know their behavior inside the membrane model in presence or absence of cholesterol as well as their location. In particular, we could get information about the thermotropic characteristics of membranes from these monitors. In addition, those monitors were incorporated to the membranes of the erythrocytes. From these experiments, we observed that DPiP monitor offered detailed information about the changes occurring during diabetes development.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Diabetes Mellitus

En las últimas décadas la Diabetes Mellitus (DM) se ha convertido rápidamente en la epidemia del siglo XXI y en un reto de salud global. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que a nivel mundial, de 1995 a la fecha casi se ha triplicado el número de personas que viven con diabetes, con cifra actual estimada en más de 347 millones de personas con diabetes (Danaei et al., 2011). De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (FID), China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son (en ese orden) los países con mayor número de diabéticos (International Diabetes Federation, 2014).

En su etapa inicial la DM es silenciosa, no produce síntomas y cuando se detecta tardíamente o no se trata adecuadamente ocasiona complicaciones de salud graves como infarto al miocardio, ceguera, insuficiencia renal, amputación de las extremidades inferiores y muerte prematura (DeFronzo, 2004). Se ha estimado que la esperanza de vida de individuos con diabetes se reduce entre 5 y 10 años (Donnelly et al., 2000), (Diabetes UK, 2010). Con base en la información recolectada por la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012), reportan que en México la edad promedio de las personas que murieron por diabetes en 2010 fue de 66.7 años, lo que sugiere una reducción de esperanza de vida de 10 años (Hernández-Ávila et al., 2013).

La DM es una enfermedad metabólica caracterizada principalmente por concentraciones elevadas de glucosa en sangre, en parte debido a que la respuesta secretora de insulina es insuficiente o ineficiente, debida a la interacción de factores genéticos (por ejemplo, mutaciones monogénicas y poligénicas) y factores ambientales (por ejemplo, el sobrepeso, la obesidad y la inactividad física) (Prabhakar and Doble, 2009; Mohler et al., 2009).

### 2.2 Clasificación de los diferentes tipos de Diabetes Mellitus

#### Diabetes Tipo 1

La diabetes tipo 1 (DMT1) es una enfermedad autoinmune, en la que el sistema de defensas del organismo ataca a las células  $\beta$ -pancreáticas (encargadas de la síntesis de insulina). Como resultado, el organismo deja de producir insulina afectando el control de la glicemia. La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero suele aparecer en niños o jóvenes adultos. Las personas con este tipo de diabetes necesitan de la administración exógena de insulina

a diario con el fin de controlar la concentración de glucosa sanguínea (International Diabetes Federation, 2015).

### **Diabetes Tipo 2**

La Diabetes Tipo 2 (DMT2) es el tipo más común de diabetes, suele aparecer en adultos pero cada vez hay más casos de niños y adolescentes. En este tipo de diabetes el organismo puede producir insulina pero no la suficiente o los tejidos blanco son resistentes a ella provocando una acumulación de glucosa en la sangre. Las personas con diabetes tipo 2 podrían pasar mucho tiempo sin saber de su enfermedad debido a que los síntomas podrían tardar años en aparecer o en reconocerse, tiempo durante el cual el organismo se va deteriorando debido al exceso de glucosa en sangre (International Diabetes Federation, 2015).

### **Diabetes gestacional**

Durante el embarazo se pueden presentar estados de hiperglucemia crónica que aparecen generalmente en el último trimestre del embarazo como consecuencia de la condición diabetogénica del mismo (Febres Balestrini et al., 2000; Baird, 1986). La Diabetes Mellitus Gestacional (DMG) se define como la alteración del metabolismo de los hidratos de carbono, de severidad variable, que comienza o se reconoce por primera vez durante el embarazo. Esta condición por ser generalmente asintomática, puede pasar con frecuencia desapercibida. Este tipo de diabetes desaparece al término del embarazo, pero está asociada a un incremento significativo de la morbilidad materna, fetal y neonatal (Goldman et al., 1991).

### **Diabetes inducida farmacológicamente**

Los modelos animales son usados para buscar posibles soluciones a las enfermedades en humanos. El uso de los animales como modelos de experimentación en el estudio de la fisiopatología de la diabetes ha permitido entender algunas de las causas y consecuencias, además de obtener avances en el tratamiento y control de este síndrome, aun cuando los signos y alteraciones no se reproducen con exactitud. En la literatura se encuentran modelos animales experimentales de diabetes en diferentes especies como son: perro, gato, conejo, cerdo, borrego, ratón y rata. En animales de laboratorio, específicamente rata, la diabetes se puede presentar de forma espontánea o ser inducida experimentalmente por distintos métodos (Ramos y Domingo,

1994; Fleitas Estévez et al., 2000; Fernández et al., 2006). Para la inducción experimental de diabetes se utilizan sustancias químicas que destruyen en forma selectiva las células  $\beta$  del páncreas como son la alloxana (Alx) y la estreptozotocina (STZ). La inducción de DMT1 se realiza en animales adultos con dosis de 40 mg de Alx /kg de peso corporal (Szkudelski, 2001) o de 50-60 mg de STZ / kg de peso (Hugues et al., 2001). Para el desarrollo de la DMT2, se pueden utilizar neonatos de 48 horas de vida tratados con una dosis de STZ entre 100 y 200 mg / kg de peso corporal (González, 2002; Mendez y Ramos, 1994).

Existe abundante información acerca de las características y datos clínicos de DMT1 en ratas de laboratorio (Ramos y Domingo, 1994; Fernández et al., 2006; Fleitas Estévez et al., 2000); por otra parte, existe menor información de modelos experimentales en animales para DMT2.

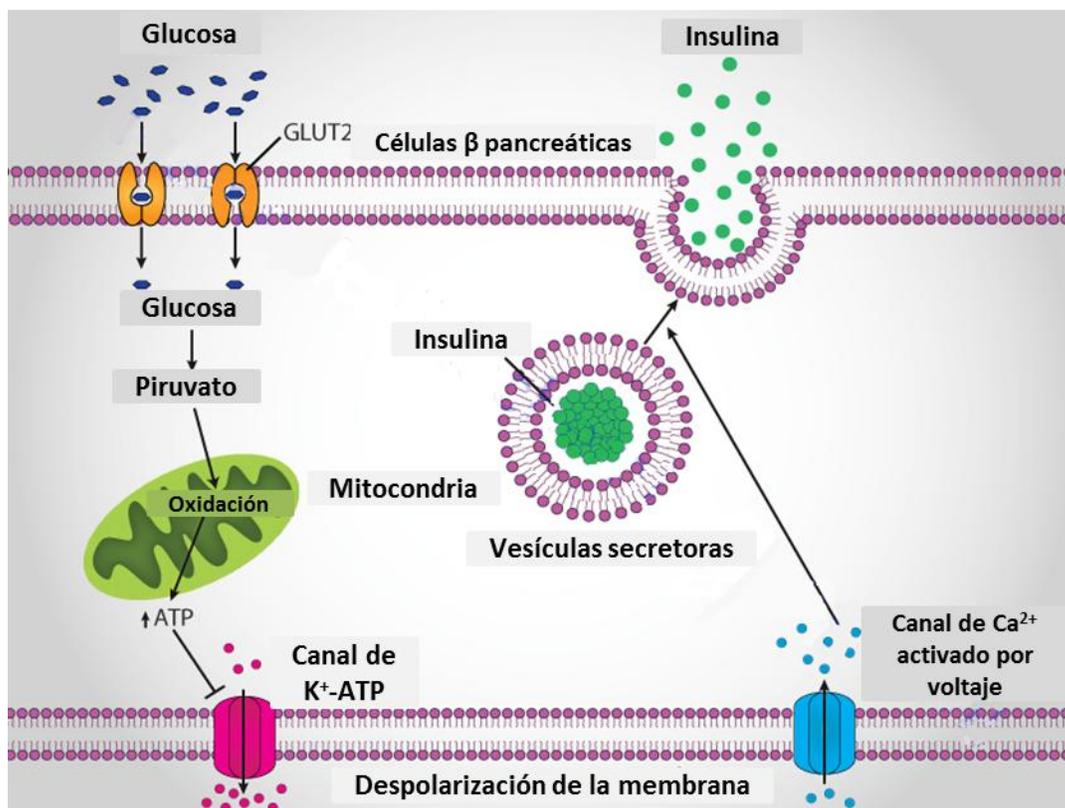
### 2.3 Síntesis y secreción de insulina

El apropiado almacenamiento y liberación de energía durante los estados de alimentación y ayuno son esenciales para la sobrevivencia y son controlados principalmente por la acción de la insulina. La insulina es una hormona secretada por las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a concentraciones elevadas de glucosa en sangre. Su principal función es la de mantener la concentración de glucosa en sangre en un rango normal, entre 80-105 mg/dl favoreciendo la entrada y almacenamiento de este nutriente en músculo, en tejido adiposo e hígado se favorece como glucógeno y se inhibe su producción y exportación al torrente sanguíneo. Además, regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos (Saltiel y Kahn, 2001; Avruch, 1998).

La síntesis y secreción de la insulina se lleva a cabo a partir de diferentes señales bioquímicas. El glucotransportador 2 (GLUT2) se expresa predominantemente en los hepatocitos, sin embargo, también es expresado por las células del túbulo contorneado proximal del riñón, células de absorción intestinales y pancreáticas (células  $\beta$ ) (Kellett et al., 2008; Cramer et al., 1992). Esta isoforma de glucotransportador está implicado en la detección de glucosa en las células  $\beta$ -pancreáticas, hígado e hipotálamo, así como la activación de la cascada de secreción de insulina mediada por la glucosa (Figura 1) (Burcelin et al., 2000; Dupuis et al., 2010; García et al., 2003; Mounien et al., 2010).

## 2.4 Transporte de glucosa y resistencia a la insulina

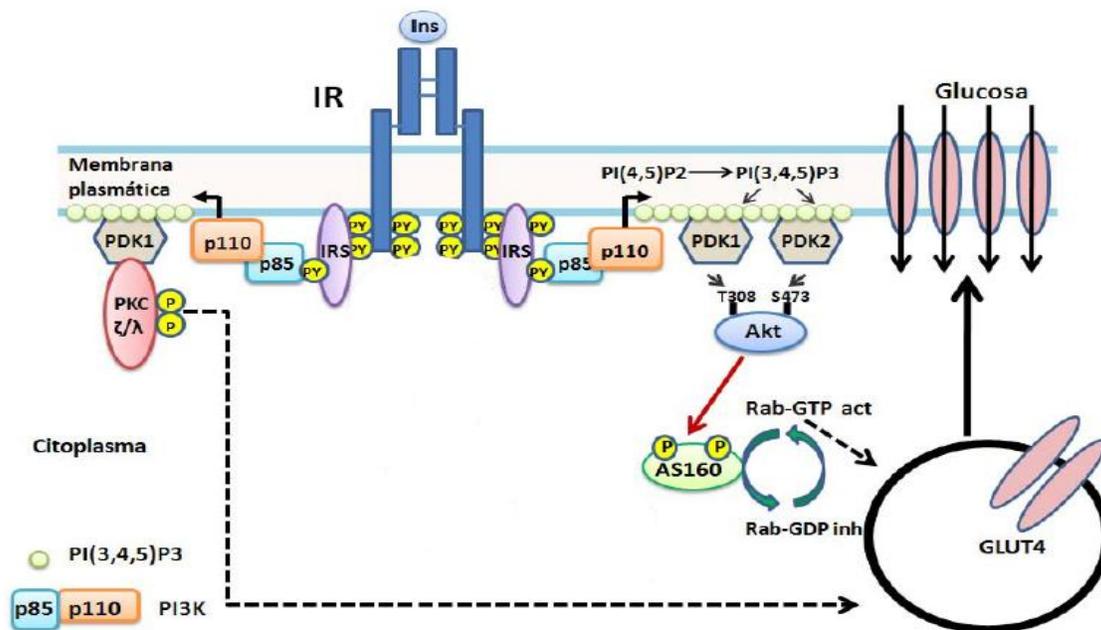
Quizás uno de los mecanismos de acción de la insulina más estudiado y aún poco comprendido es el relacionado a la regulación del transporte de glucosa en células adiposas y



**Figura 1. Mecanismo de secreción de la insulina estimulada por glucosa.** El aumento de glucosa en sangre es captado por las células  $\beta$ -pancreáticas a través GLUT-2. La glucosa se oxida a piruvato mediante la glucólisis. El piruvato se oxida por el PDHc y de la acetil-CoA resultante se oxida en el ciclo TCA. El NADH y FADH<sub>2</sub> resultante se oxidan a través de la maquinaria de la fosforilación oxidativa que resulta en un aumento de los niveles de ATP. El aumento del ATP inhibe el canal de K<sup>+</sup>-ATP que resulta en despolarización de la membrana que conduce a una afluencia de iones de Ca<sup>2+</sup> de activación migración de vesícula que contiene insulina a la membrana plasmática liberando la insulina a la sangre. Modificado de Michael W King, PhD | © 1996–2014 themedicalbiochemistrypage.org.

musculares. En este tipo de células la insulina promueve la translocación del glucotransportador 4 (GLUT4) desde los compartimentos intracelulares a la membrana plasmática (Figura 2) (McCarthy and Elmendorf, 2007). El músculo esquelético es el tejido responsable del ~ 80% del metabolismo de la glucosa en presencia de insulina; además desempeña un papel clave en el desarrollo de resistencia a la insulina y DMT2. La captura de glucosa inducida por insulina es un mecanismo complejo iniciado por la unión de insulina con su receptor de insulina (IR) para que así inicie la cascada de señalización de la insulina (Sala et al., 2014).

La resistencia a la insulina es un estado patológico en el que las células que ordinariamente responden a la insulina dejan de hacerlo. Los individuos con resistencia a la insulina están predispuestos al desarrollo de DM2, además de asociárseles frecuentemente con un número importante de desórdenes de salud entre los que se encuentran: la obesidad, la hipertensión, infección crónica y enfermedades de tipo cardiovascular. Por lo anterior, entender los mecanismos que favorecen el desarrollo de la resistencia a la insulina con el fin de entender



**Figura 2. Regulación del transporte de glucosa por la insulina.** La insulina promueve la translocación del transportador GLUT4 de compartimentos intracelulares a la membrana plasmática. La proteína AS160 en su estado no fosforilado y activo regula negativamente a las proteínas G pequeñas Rab, las cuales participan en el tráfico vesicular de GLUT4. AS160 estimula la hidrólisis del GTP unido a las Rab (generando Rab-GDP, inactivo) e inhibiendo el tráfico vesicular. Cuando AS160 es fosforilado por Akt se inhibe, por lo que se incrementa el tráfico-dependiente de Rab-GTP (activo) de GLUT4 a la membrana plasmática. Por otra parte, PDK1 induce también la fosforilación de sitios críticos en el asa de activación de dos formas atípicas de la PKC (PKC $\zeta/\lambda$ ), que contribuyen de manera significativa a la translocación de GLUT4 inducida por la insulina. Modificado de (Olivares Reyes and Arellano Plancarte, 2008).

su fisiopatología y encontrar blancos terapéuticos potenciales para el tratamiento de esta condición, ha sido y seguirá siendo tarea de muchos grupos de investigación. De manera general, la resistencia a la insulina se manifiesta por una disminución en el transporte de glucosa en adipocitos y músculo esquelético, así como un aumento de la producción de glucosa hepática y alteraciones en el metabolismo de lípidos en tejido adiposo y hepático (Le Roith et al., 2003; Sesti, 2006; Bhattacharya et al., 2007). Varios agentes y condiciones metabólicas se han implicado como inductores de la resistencia a la insulina. Los más comunes son los ácidos grasos libres y sus metabolitos; el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y otras citocinas; hormonas catabólicas como la epinefrina, el glucagón, la angiotensina II y hormonas secretadas por el tejido

adiposo como la resistina. De esta forma parece que la resistencia a la insulina es consecuencia de la acción de una multitud de inductores. Por ejemplo, el incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres se encuentra asociado con muchos estados de resistencia a la insulina, incluyendo obesidad y DMT2. En humanos, el contenido y composición de triglicéridos y fosfolípidos en músculo correlaciona directamente con la presencia de resistencia a la insulina. Inicialmente, el incremento en la concentración plasmática de ácidos grasos libres, induce resistencia a la insulina por la inhibición del transporte de glucosa, que es seguido por una reducción en la síntesis de glucógeno en músculo y la oxidación de la glucosa (Unger y Orci, 2010).

Estudios a nivel molecular han determinado que el incremento en la concentración de ácidos grasos libres puede llevar a cambios en la expresión del IR y alterar, tanto la unión de la insulina con el receptor como el estado de fosforilación de su dominio de cinasa. Así mismo, pueden inhibir la activación de la enzima PI3K dependiente de sustrato del receptor de insulina-1 (IRS-1). La inhibición de la PI3K por los ácidos grasos libres ha sido asociada a un aumento en la fosforilación en residuos de Ser/Thr del IRS-1. Recientemente se ha descrito que los ácidos grasos libres también pueden alterar la activación de Akt debido a un aumento en la cantidad de ceramida y diacilglicerol en células musculares en cultivo (Bhattacharya et al., 2007).

Entre los estados patológicos que pertenecen al síndrome metabólico, existe una correlación entre la obesidad y la DMT2 (Kopelman, 2000). Esta estrecha relación refleja varios mecanismos, incluyendo: 1) el deterioro de la señalización de la insulina en el músculo y otros tejidos debido a la acumulación intracelular excesiva de lípidos (lipotoxicidad); 2) modificaciones intracelulares y extracelulares anormales, de proteínas (tales como la hemoglobina glicosilada, HbA1c) causada por niveles elevados de glucosa (glucotoxicidad) y 3) aumento en la producción de adipoquinas proinflamatorias en las células adiposas y acciones endocrinas y parácrinas de estas moléculas (Flachs et al., 2014).

### **2.5 Ácidos grasos membranales**

Los lípidos, constituyen aproximadamente del 20 al 80% de la masa de la mayoría de las membranas (dependiendo del tipo de célula) y casi todo el resto es proteína (Blume, 2004). Los lípidos de membrana más abundantes son los fosfolípidos; tienen una cabeza polar y dos colas hidrocarbonadas. Las colas suelen ser ácidos grasos y pueden tener diferente longitud (normalmente contienen de 14 a 24 átomos de carbono). En general, una de las dos colas presenta

uno o más dobles enlaces *cis* (insaturada) mientras que la otra normalmente no tiene dobles enlaces (saturada) (Alberts et al., 2008).

Existe una creciente evidencia experimental sobre la importancia de los lípidos de membrana en las diferentes funciones vitales de la célula. A pesar de que tienen diferentes funciones, todas las membranas biológicas comparten una estructura básica común: una bicapa constituida de fosfolípidos, proteínas (integrales y periféricas), glicoproteínas y colesterol, son estructuras dinámicas, fluidas (Mouritsen, 2005). Otra característica importante de las membranas celulares es la fluidez, que es crucial para muchas funciones de membrana y tiene que ser regulada con precisión.

La fluidez de una membrana depende tanto de su composición como de su temperatura, como ha sido demostrado por estudios en bicapas sintéticas. Una bicapa sintética, producida a partir de un único tipo de fosfolípido, pasa de un estado líquido a un estado gel en un punto de transición característico, este cambio de estado recibe el nombre de transición de fase. La temperatura a la que se produce la transición de fase en los ácidos grasos de cadenas cortas o insaturados es más baja, debido a que las cadenas de ácidos grasos cortas reduce la tendencia de las colas a interaccionar entre sí y los ácidos grasos insaturados producen pliegues en las cadenas que dificultan su empaquetamiento, de forma que las membranas permanecen fluidas a temperaturas más bajas. Sin embargo, la bicapa lipídica de muchas membranas no sólo está compuesta de fosfolípidos, sino que habitualmente contiene colesterol. Las membranas plasmáticas eucariotas contienen cantidades elevadas de colesterol, hasta una proporción de una molécula de colesterol por cada molécula de fosfolípido. El colesterol es una molécula que refuerza la barrera permeable de la bicapa lipídica orientando sus grupos hidroxilo hacia las cabezas polares de los fosfolípidos, en esta posición sus anillos esteroideos, planos y rígidos interactúan con las regiones de las cadenas de los ácidos grasos que están más próximas a los grupos polares de la cabeza, disminuyendo la movilidad de los primeros grupos CH<sub>2</sub> de las cadenas de los ácidos grasos, haciendo que la bicapa lipídica sea más rígida en esa región y se reduzca su permeabilidad a pequeñas moléculas solubles. El colesterol tiende a hacer menos fluidas a las membranas (generando un estado fluido intermedio) más rígido hacia la interfase y más fluido hacia el núcleo de la bicapa; pero a las elevadas concentraciones a las que se encuentra en las membranas plasmáticas de las células eucariotas también impide que las cadenas

de los ácidos grasos se junten y cristalicen. Así pues, el colesterol inhibe posibles transiciones de fase (Alberts et al., 2008).

Los lípidos juegan un papel muy importante en diferentes procesos biológicos, por ejemplo: sirven como reserva energética, proveen de aislamiento térmico y eléctrico, son moléculas señalizadoras y forman segundos mensajeros, son sustrato para la síntesis de eicosanoides los cuales regulan muchas funciones biológicas, participan como ligandos para factores de transcripción de receptores nucleares, es decir, que también modulan la expresión genética y forman parte de las moléculas estructurales de las membranas biológicas. A todo lo anterior le podemos sumar que la composición de ácidos grasos regula, a través de las propiedades fisicoquímicas de sus componentes, las propiedades de las membranas biológicas, tales como la fluidez membranal (Alberts et al., 2008). Se ha propuesto que la fluidez membranal debe mantenerse dentro de ciertos límites para conservarse funcional, ya que se ha encontrado que en algunas patologías tales como el cáncer, hay un aumento en la fluidez, mientras que en otras patologías como la hipertensión y la diabetes parece haber un descenso en la fluidez (Pérez-Hernández et al., 2010).

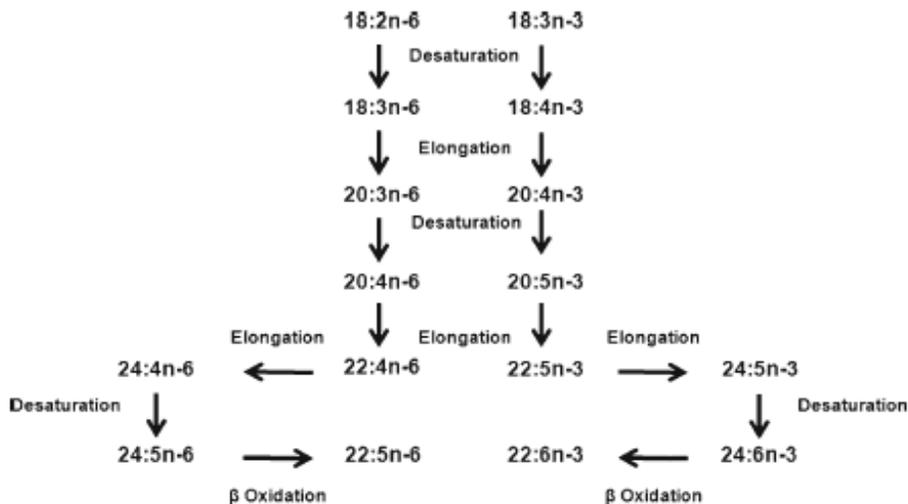
### **2.6 Ácidos grasos omega 3, 6 y 9**

Algunos experimentos con animales documentan el efecto benéfico de los ácidos grasos omega 3 ( $\omega$ -3) sobre el metabolismo de la glucosa y sobre la sensibilidad a la insulina, incluso en condiciones de obesidad y resistencia a la insulina ya establecidas (Brady et al., 2004; Delarue et al., 2004; Dangardt et al., 2012). Se sabe que el uso de ácidos grasos omega 3 reduce el riesgo de desarrollar diabetes; así mismo, algunos estudios, también demuestran mejora en la homeostasis de la glucosa en individuos prediabéticos (Jeppesen et al., 2013; Kaushik y Mozaffarian, 2009). Por otra parte, los resultados de la mayoría de los ensayos clínicos en pacientes con DMT2 sugieren que los omega 3, no tienen ningún efecto sobre el control metabólico al tiempo que reduce de manera efectiva la hipertrigliceridemia en estos pacientes (Flachs et al., 2014).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) omega 3 ( $\omega$ -3) y omega 6 ( $\omega$ -6) pertenecen a la familia de los ácidos grasos esenciales, esto quiere decir que no son sintetizados por el organismo humano, por lo tanto, tienen que ser ingeridos en la dieta. Los omega 3 y 6 tienen la misma ruta metabólica y compiten por las mismas enzimas (figura 3). En humanos, los ácidos grasos eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA) son sintetizados a partir del ácido alfa-linolénico (ALA) o son consumidos en la dieta. Del mismo modo, el ácido linoleico

pertenece a los ácidos grasos omega 6 y a partir de él se pueden sintetizar ácidos grasos de cadena larga o más insaturados omega 6, como por ejemplo el ácido araquidónico considerado como el más importante de los omega 6 (Jeppesen et al., 2013). Los AGPIs  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, además de ser una fuente de energía, se incorporan a las membranas celulares, donde son precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), que intervienen en numerosos procesos fisiológicos (Carrero et al., 2005a).

Los ácidos grasos omega 3 se encuentran principalmente en pescado, mariscos y mamíferos marinos, donde el DHA y el EPA son abundantes. Además, algunos ácidos grasos  $\omega$ -3, especialmente el alfa-linolénico (ALA), se encuentra en aceites de plantas y ciertas verduras (Thorseng et al., 2009). También se encuentran en aceite usado en la cocina, como el aceite de colza (o canola), aceite de soja, responsables de hasta el 10% de los ácidos grasos totales. Algunas semillas por ejemplo linaza (flaxseed) y las nueces (nueces de castilla) son particularmente ricos en ALA (Burdge y Calder, 2005).



**Figura 3. Vía de elongación y desaturación de los ácidos grasos omega 3 y omega 6.** Tomado de (Jeppesen et al., 2013).

Los ácidos grasos omega 9 ( $\omega$ -9) pertenecen a la familia de las grasas monoinsaturadas (MUFAs) que se encuentra en los alimentos de origen animal y de origen vegetal. A diferencia de los  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, el  $\omega$ -9 no es un ácido graso esencial, ya que nuestro cuerpo puede sintetizarlo. Los MUFAs representan una herramienta útil en el diseño de regímenes dietéticos para la obesidad,

las enfermedades cardiovasculares y DMT2 (Schwingshackl et al., 2011b; a). En la naturaleza encontramos 3 tipos de ácidos grasos omega 9, principalmente: 1) ácido gadoleico con 20 átomos de carbono, lo encontramos por ejemplo en la mostaza blanca, piñones, semillas de amapola y centeno; 2) ácido erúxico con 22 átomos de carbono, es un tipo de grasa tóxica, los aceites ricos en este componente no se consideran aptos para el consumo humano y 3) ácido oleico con 18 átomos de carbono, se puede encontrar en el aceite de argán, semillas de chía, aceitunas, aguacate, etc. Los ácidos grasos omega 9 han tenido un papel destacado en la investigación sobre la prevención de algunas enfermedades cardiovasculares, Parkinson, Alzheimer y cáncer (Sofi et al., 2008) a raíz de los beneficios que ha demostrado su consumo en la alimentación, como es el caso del aceite de oliva extra virgen, principal fuente de grasa en la dieta Mediterránea (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2016).

### 3 ANTECEDENTES

Estudios epidemiológicos y nutricionales indican que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) omega 3 de cadena larga, producen cambios asociados a efectos benéficos para la salud (Carrero et al., 2005b). Pérez-Hernández reportó que el suministro de ácidos grasos omega 3 en la dieta a ratas diabéticas mejora varios parámetros tales como la glicemia, la presión arterial, triglicéridos y colesterol (Pérez-Hernández, 2008, 2011; Orozco, 2008), pero a la fecha se desconoce el mecanismo por el cual llevan a cabo dicho efecto los ácidos grasos omega-3. Asimismo, usando el monitor fluorescente dipirenil propano (DPiP) que proporciona información acerca de unos de los parámetros fisicoquímicos de las membranas, como lo es la fluidez, se reportó que durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión, hay cambios importantes en la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos (Pérez-Hernández et al., 2010) y microsomas de hígado y riñón. Para comprender mejor las características de las membranas conforme se desarrolla la diabetes, sería útil el uso de monitores de fluidez que se localicen a diferentes niveles de profundidad dentro de las membranas.

Se ha propuesto que las modificaciones en la composición de ácidos grasos y en el cociente entre  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 en la membrana, puede afectar la función en la regulación de diferentes procesos bioquímicos que en ésta se realizan, de tal suerte que se generan anomalías en la célula. Asimismo, se ha encontrado que el grado de insaturación de los ácidos grasos podría tener efectos benéficos o nocivos, de suerte que ha sido reportado que el aceite de aguacate, rico en ácido oleico (un  $\omega$ -9), parece tener efectos benéficos en contra de la diabetes (Ortiz-Avila et al., 2013). Todos estos cambios y factores, en algún momento pueden contribuir al desarrollo de diferentes trastornos metabólicos. Es posible que durante el desarrollo de la diabetes ocurran cambios en la composición de la membrana, lo que contribuye a las complicaciones de esta enfermedad conforme progresa.

Se han realizado varias investigaciones utilizando la STZ para generar un modelo de diabetes tipo 2. Hemmings *et al* en el 2000 trabajaron con ratas Fisher para obtener un modelo de DMT2, utilizaron diferentes dosis de STZ a distintos tiempos y tuvieron resultados óptimos con una dosis de 80 mg/Kg de peso corporal a las 36 h de vida. Con esta dosis fue como lograron inducir un modelo de diabetes mellitus tipo 2 (Hemmings y Spafford, 2000). En el mismo año Straczkowsky *et al* utilizaron una dosis de 45 mg/kg en neonatos de 48 hrs de vida (Straczkowski et al., 2000). Por otro lado, Cuman *et al* reportaron la inducción de diabetes en neonatos de ratas

Wistar de 48 h de vida con una dosis de 160 mg/kg de peso (Cuman et al., 2001). Por su parte Murali *et al* usaron una dosis de 70 mg/Kg en neonatos Wistar de 5 días de vida. En neonatos, dosis altas de STZ al parecer pueden generar un daño casi total de células  $\beta$ -pancreáticas, dependiendo de la dosis empleada; sin embargo, a esta edad y con estas dosis los neonatos tienen la capacidad de regenerar o diferenciar células del páncreas en células  $\beta$ , de tal manera que hay recuperación parcial de dicha población celular, dando como resultado una secreción deficiente de insulina (Murali and Goyal, 2001; Szkudelski, 2001).

---

#### 4 JUSTIFICACIÓN

Los ácidos grasos tienen múltiples funciones en el metabolismo celular, pero una de las funciones menos estudiadas es su participación en la regulación de procesos membranales por modificación de la fluidez; este fenómeno es de vital importancia en cuanto a los procesos de señalización y transporte celular se refiere. Así mismo, se ha señalado el efecto benéfico de los ácidos grasos omega 3, 6 y 9 durante el desarrollo y la progresión de la diabetes a través de mecanismos que posiblemente modifican la composición de los ácidos grasos y la fluidez de las membranas. Por lo anterior, es importante dilucidar los efectos que tienen la suplementación de ácidos grasos omega 3, 6 y 9 en la composición de ácidos grasos y la fluidez de membranas biológicas. Para este estudio se propone el uso de fantasmas de eritrocitos como el modelo de membranas biológicas para analizar los efectos de la progresión de la diabetes.

## 5 HIPÓTESIS

Si los ácidos grasos omega (3, 6 o 9) tienen efectos benéficos en contra de la diabetes, tal vez sea por modificación en la síntesis de insulina y también a través de otros mecanismos tales como cambios en las propiedades fisicoquímicas de las membranas.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General

Conocer el efecto de los ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) durante el desarrollo de la diabetes tipo 2 a través de la composición de los ácidos grasos y la fluidez de la membrana de eritrocitos.

### 6.2 Objetivos Particulares

Para cumplir con el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

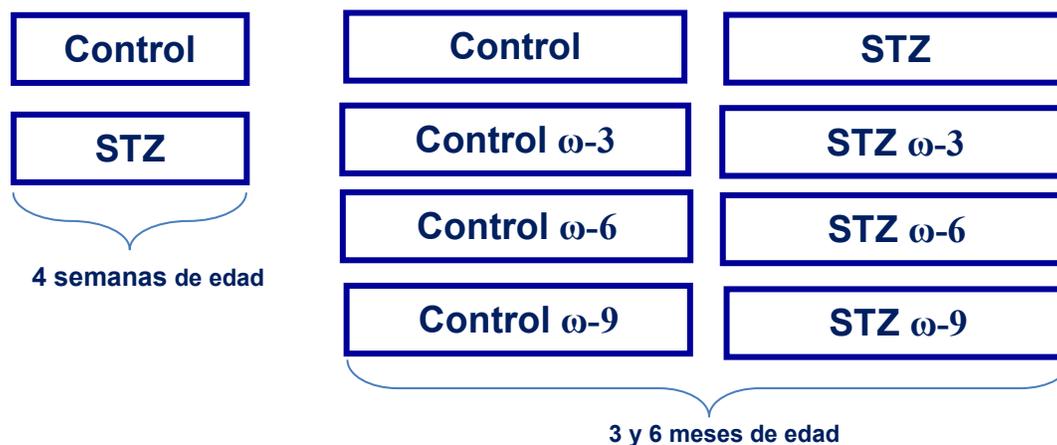
- Generar y estandarizar un modelo de diabetes tipo 2 en ratas.
- Suplementar ácidos grasos omega: 3, 6 ó 9 a ratas Wistar inducidas a diabetes tipo 2, y su control normoglicémico.
- Hacer semanalmente mediciones de la concentración de glucosa sanguínea y peso corporal.
- Hacer mensualmente mediciones de colesterol y triglicéridos en sangre.
- Obtener la composición de ácidos grasos de las membranas de fantasmas de eritrocitos.
- Medir la fluidez de los fantasmas de eritrocitos utilizando tres monitores fluorescentes: dipirenilpropano (DPiP), 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH).

## 7 MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos y solventes utilizados en este trabajo fueron grado reactivo y se adquirieron de J.T Baker, Merck y Sigma. Los reactivos para la cromatografía de gases fueron grado HPLC de la marca J.T Baker. Los estándares de los metil ésteres se adquirieron de Sigma-Aldrich con una pureza mínima del 98%. Los monitores utilizados para medir la fluidez membranal fueron: dipirenilpropano (DPiP), 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH), todos de MOLECULAR PROBES

Se utilizaron ratas Wistar machos, neonatos de 48 horas, fueron inducidas a Diabetes Mellitus Tipo 2 mediante la administración de estreptozotocina (125 mg/kg de peso corporal; dosis única) en amortiguador de citratos pH 4.5, vía intraperitoneal. A los animales del grupo control se les administró únicamente el amortiguador de citratos. Los animales de estudio se mantuvieron con la madre hasta el destete (4 semanas de edad). A las cuatro semanas de edad las ratas fueron separadas de forma completamente aleatoria en grupos de 4 individuos y se mantuvieron en cajas de polisulfonato con microambiente y fotoperiodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad a 22 °C en promedio, con alimento (nutricubos/2040 de Harlan ®) y agua *ad libitum*. Protocolo aprobado por SICUAE proyecto MC-2014-35 y como lo marca la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999)

**Suplementación de los ácidos grasos:** Los ácidos grasos omega 3, 6 y 9 fueron administrados a razón de 125 mg/kg, vía oral, cinco días a la semana (lunes a viernes) (Figura 4).



**Figura 4. Grupos experimentales.** Los grupos fueron suplementados con 125mg/Kg de peso corporal con los diferentes ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) respectivamente, durante tres y seis meses de edad.

### **7.1 Determinación de parámetros metabólicos**

La determinación de la concentración de la glucosa sanguínea se realizó a partir de la inducción con STZ (48 horas de nacidos) cada tercer día hasta el destete (cuatro semanas de edad) incluyendo los grupos control, a partir de ese momento una vez por semana hasta el momento del sacrificio, con equipo de determinación instantánea Accucheck® Active de Roche.

La determinación de la concentración de colesterol y triglicéridos se realizó una vez al mes hasta el momento del sacrificio con equipo de determinación instantánea Accutrend® de Roche.

La curva de tolerancia a la glucosa se realizó una vez al mes mediante la administración oral (con sonda esofágica) de 3 g de dextrosa/kg de peso en 3 mL de agua; previa medición de las concentraciones basales de glucosa sanguínea. Posterior a la administración de la dextrosa, se realizaron mediciones de las concentraciones de glucosa sanguínea, cada 30 minutos hasta 120 minutos, utilizando tiras reactivas y un glucómetro marca Acuccheck® Active.

La obtención de la muestra para la determinación de la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre se realizó mediante punción con lanceta en la punta de la cola del animal.

Las mediciones de peso se realizaron a partir de la inducción con STZ (48 horas de nacidos) cada tercer día hasta el destete (cuatro semanas de edad) incluyendo los grupos control, a partir de ese momento una vez por semana hasta el momento del sacrificio. Se realizó con balanza digital.

### **7.2 Obtención de las muestras de sangre para su análisis**

Al final del tratamiento los animales fueron anestesiados con una dosis de pentobarbital sódico de 40 mg/Kg de peso, vía intraperitoneal. La toma de las muestras de sangre se realizó por punción cardíaca (en tubos Vacutainer® con y sin EDTA), hasta exanguinar completamente al animal.

La muestra de sangre fue centrifugada a 1500 rpm durante 10 minutos para la obtención de suero en una centrifuga marca Sorvall ST16R de Thermo Scientific con un rotor fiberlite F15-

6x100y. El suero obtenido fue dividido en dos porciones en tubos eppendorf, a uno de los tubos se le adicionó inhibidores de proteasas (Complete MINI Roche®), con la finalidad de prevenir la degradación de la insulina. Las muestras fueron congeladas a -20°C para su posterior uso.

### **7.3 Análisis del suero**

#### **7.3.1 Cuantificación de proteína en suero**

La proteína se cuantificó por el método de micro-Bradford (Bradford, 1976). Como proteína de referencia se utilizó albúmina sérica bovina (BSA) disuelta a una concentración de 1 mg/ml. La curva de referencia se realizó de 0 a 10 µg en intervalos de 2 µg. Se tomó el volumen correspondiente de BSA y se completó a 200 µl con agua bidestilada. Para las muestras de suero, se tomaron diferentes volúmenes en diluciones de 1:10, 1:50 y 1:100, y se completó el volumen a 200 µl. Se adicionó 1 ml del reactivo de Bradford, tanto a muestras de suero como a la curva de referencia, se mezcló la reacción, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 de Thermo Scientific.

#### **7.3.2 Cuantificación de colesterol en suero**

Para determinar la concentración de colesterol total en suero se utilizó un kit enzimático de cuantificación de colesterol marca SpinReact. Se desarrolló una curva con estándar de colesterol en el intervalo de 0 a 20 µg/ml. Se tomó (por duplicado), 10 µl de suero y se adicionó 1 ml de reactivo para determinación de colesterol de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se permitió el desarrollo de color por incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia, tanto de la curva como de las muestras, a una longitud de onda de 505 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 de Thermo Scientific.

La cuantificación de colesterol por esta técnica es posible debido a una colesterol esterasa que libera el colesterol de ácidos grasos esterificados y luego actúa una colesterol oxidasa que produce 4-colestenona + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, junto con fenol + 4-aminofenazona, es catalizada por una peroxidasa que da lugar a un compuesto colorido.

### **7.3.3 Cuantificación de Triglicéridos en suero**

Para determinar la concentración de triacilgliceroles en suero se utilizó un kit de cuantificación de triglicéridos marca SpinReact. Se desarrolló una curva con estándar de triglicéridos en el intervalo de 0 a 20  $\mu\text{g/ml}$ . Se tomó (por duplicado), 10  $\mu\text{l}$  de suero y se adicionó 1 ml de reactivo para determinación de triglicéridos de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se permitió el desarrollo de color por incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia, tanto de la curva como de las muestras, a una longitud de onda de 505 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 de Thermo Scientific.

Fundamento de la técnica: Se basa en el mismo principio de formación de hidroperóxidos y desarrollo de una reacción colorida que el descrito para colesterol, con la diferencia de formación de gliceraldehido 3 fosfato e hidroxiacetona fosfato a partir del glicerol de los triglicéridos.

### **7.3.4 Cuantificación de insulina**

La determinación de insulina en suero con inhibidor de proteasas se realizó con un kit de ELISA marca ALPCO IMMUNOASSAYS® siguiendo las instrucciones del fabricante (el detalle de la técnica se describe en el apartado de anexo 1).

## **7.4 Obtención de fantasmas de eritrocitos**

La muestra de sangre se obtuvo por punción cardiaca en tubos vacutainer de 5 ml con solución de EDTA los cuales se agitaron suavemente para evitar la formación de coágulos. Los fantasmas de eritrocitos se obtuvieron mediante la técnica descrita por (Quinn et al., 2005). Desarrollo de la técnica: las muestras de sangre fueron decantadas en tubos Falcon de 50 ml con 20 ml de solución isotónica de fosfatos y centrifugadas a 1500 g durante 10 minutos (tres veces) en una centrifuga marca Sorvall ST 16R de Thermo Scientific con rotor F15-6x100y. Al paquete celular obtenido se le adicionaron 30 ml de solución hipotónica de fosfatos 5 mM y se centrifugaron 3 veces a una velocidad de 11500 rpm hasta eliminar la hemoglobina. Una vez obtenidos los fantasmas de eritrocitos fueron resuspendidos en amortiguador de fosfatos y almacenados en tubos eppendorf a una temperatura de 4°C para su uso posterior.

### **7.5 Cuantificación de proteína total por el método de Schacterle y Pollack modificado por Pugsley y Schnaitman (1978)**

Las muestras de membranas (de menos de 10 µl) se resuspendieron en 2.0 ml de solución acuosa de SDS al 5%, se agitó vigorosamente y se dejó en incubación a temperatura ambiente de 10 a 15 minutos, para permitir la solubilización de las membranas. Transcurrido este tiempo, se adicionó 1 ml de reactivo alcalino (solución de NaOH 2%, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10%, KNaC<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1% CuSO<sub>4</sub> 0.078%) y finalmente 0.25 ml del reactivo de fenol Folin Ciocalteau 2 N (Sigma). El desarrollo de color de esta reacción se llevó a cabo por incubación de las muestras a 56-57 °C por 5 minutos en baño María. Se midió la absorbancia de las muestras a 650 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 de Thermo Scientific.

Simultáneamente al procesamiento de las muestras se desarrolló una curva de calibración de BSA en el rango de 0 a 40 µg a intervalos de 5 µg, para la cual se emplean los mismos reactivos y procedimientos que para las muestras de las membranas (Pugsley and Schnaitman, 1978).

### **7.6 Cuantificación de fosfolípidos en membranas de eritrocitos por la técnica del fósforo inorgánico**

Para determinar la cantidad de fosfolípidos contenidos en las membranas de los fantasmas de eritrocitos se procedió a la determinación de fósforo por el método de Bartlett, (Bartlett, 1959) como se describe a continuación: se tomaron 20 µl de fantasmas de eritrocitos y se depositaron en tubos de ensayo. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se agregaron 0.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N por tubo con membranas. En cada experimento también se incluyeron blancos de mineralización (solamente H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Se calentaron los tubos a 150-160 °C durante 4 horas. Se quitaron de la parrilla y una vez que estuvieron a temperatura ambiente, se adicionaron 100 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Posteriormente se continuó el calentamiento por otras 2 horas a la misma temperatura. A continuación se dejaron enfriar y se adicionaron 4.4 ml de H<sub>2</sub>O + 0.2 ml de heptamolibdato de amonio al 5% + 0.2 ml del reactivo de Fiske-Subbarow el cual se preparó por la adición de 500 mg de ácido 1-amino 2-naftol 4-sulfónico a 200 ml de una solución de bisulfito de sodio anhidro al 15% (NaHSO<sub>3</sub>) bajo agitación mecánica, seguido por la adición de 1 g de sulfito de sodio anhidro (NaSO<sub>3</sub>). La solución se filtró y almacenó en frasco ámbar a temperatura

ambiente. Este reactivo se preparó cada que se utilizaba. Para desarrollar el color, las muestras se calentaron en baño de agua hirviendo durante 7 minutos. Se enfriaron y se leyeron en un espectrofotómetro a 830 nm. Paralelamente al desarrollo de color en las muestras de membranas se realizó una curva estándar con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en el intervalo de 0 a 4  $\mu\text{g}$  de fósforo con incrementos de 0.5  $\mu\text{g}$ . Los fosfolípidos de las membranas se cuantificaron a partir del contenido de fósforo.

## 7.7 Análisis de la composición de ácidos grasos por cromatografía de gases

### 7.7.1 Extracción de lípidos por el método de Folch y colaboradores (1957) del alimento de las ratas

Se homogenizó en frío 1 g de nutricubos en 19 ml de solución de cloroformo:metanol (2:1) con homogenizador Potter-Elvehjem y pistilo de vidrio durante un par de minutos. Después el homogenizado se filtró en un papel filtro libre de grasas, se adicionó 0.2 de su volumen de agua bidestilada, se separaron 2 fases por centrifugación y se recolectó la fase clorofórmica.(Folch et al., 1957) (Folch et al., 1957; Morrison and Smith, 1964)

### 7.7.2 Transesterificación de lípidos en fantasmas de eritrocitos y ácidos grasos omega 3, 6 y 9.

Se realizó una transesterificación directa (sin extracción de lípidos) para las muestras de fantasmas de eritrocitos (200  $\mu\text{g}$ ) y para los suplementos de ácidos grasos omega 3, 6 y 9 (100  $\mu\text{l}$ ) para la obtención de los metil ésteres correspondientes.

Se utilizaron 0.5 ml de trifloruro de boro ( $\text{BF}_3$ ) al 14% en metanol y se pusieron bajo una atmósfera de nitrógeno. Los viales se colocaron en baño María a 92°C (punto de ebullición en la Cd. de México), dejándolos hervir durante 30 minutos. Al cabo de ese tiempo se enfriaron a temperatura ambiente y se agregaron 1000  $\mu\text{l}$  de hexano HPLC y 500  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada, se agitaron fuertemente y se centrifugaron a 2500 rpm durante 2 minutos en una centrifuga Sorvall ST 16R de Thermo Scientific con rotor F15-6x100y con la finalidad de obtener dos fases, se colectó la fase hexánica que contiene los metil ésteres. Finalmente se evaporó la muestra con gas nitrógeno y se almacenó protegida de la luz a -20°C (Morrison and Smith, 1964).

Los reactivos y solventes utilizados para este análisis fueron de grado HPLC. Las muestras transesterificadas (metil ésteres de ácidos grasos) se resuspendieron en 30  $\mu$ l de hexano HPLC y se inyectaron 5  $\mu$ l en el cromatógrafo de gases, para los metil ésteres estándar se realizaron curvas de calibración a diferentes concentraciones inyectando 1  $\mu$ l de muestra. El análisis de la composición de ácidos se realizó en un cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin Elmer con detector de ionización de flama (FID) controlado por computadora, y una columna capilar omegawax de Supelco de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y recubrimiento de 0.25 mm de grosor. La flama se mantiene con hidrógeno y aire, y como gas de arrastre se utilizó nitrógeno de alta pureza. El programa que se utilizó está diseñado de la siguiente forma: inicio a 180 °C por 5 minutos, con una rampa de 5°C/minuto hasta 240°C y es mantenido durante 18 minutos, para un tiempo total de 35 minutos. El flujo de nitrógeno para columna fue de 14 mL/minuto.

Se determinaron los tiempos de retención de cada uno de los estándares de metil ésteres de ácidos grasos y se hicieron curvas de calibración para cada uno de ellos. La composición de ácidos grasos de las muestras se determinó por comparación de los tiempos de retención y para el análisis se integró el área de cada uno de los picos detectados para obtener las proporciones molares porcentuales.

### 7.8 Espectrometría de masas

Se analizó el contenido neto de los suplementos de los ácidos grasos omega 3, 6 y 9, transesterificados y no transesterificados, por medio de espectrometría de masas. Se utilizó un espectrómetro de masas marca Finnigan. El programa que se utilizó está diseñado de la siguiente forma: inicio a 200 °C por 5 minutos, con una primer rampa de 8°C/minuto hasta 250°C y es mantenido durante 10 minutos, y una segunda rampa de 18°C/minuto hasta 290°C y es mantenido durante 15 minutos para un tiempo total de 30 minutos.

**Fundamento:** La espectrometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa; una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo a su relación masa/carga de cada uno de ellos. Los procesos que tienen lugar en un espectrómetro de masas, son de naturaleza química; en consecuencia, la presencia y la abundancia de un espectro de determinados tipos de iones, identificables a partir de su masa, será en función de la estructura química de cada compuesto.

Nota: el análisis del contenido de los suplementos de los ácidos grasos omega (3, 6 y 9) por espectrometría de masas no reveló más información de lo que se reporta con la metodología de cromatografía de gases.

### 7.9 Formación de liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina e incorporación de monitores

Los fosfolípidos de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) se utilizaron a diferentes concentraciones según el monitor que se emplearía para medir la fluidez, para el caso de DPiP se utilizó a una concentración de 0.4 mM, 0.1 mM para el uso de DPH y TMA-DPH; el colesterol se utilizó a una concentración 25 mol% en todos los casos. Los fosfolípidos y el colesterol fueron suspendidos en cloroformo y colocados en viales de vidrio de 4 ml, se evaporó el cloroformo y posteriormente se agregó (por separado) los monitores fluorescentes (DPiP [0.15μM], DPH y TMA-DPH [2 μM]) para su incorporación. Se agregaron 3 ml de amortiguador de fosfatos 5 mM y fueron sonicados durante 5 minutos con un sonicador Branson Sonifier con micropunta de titanio, para finalmente medir la fluidez por espectrofluorometría.

### 7.10 Monitores de fluidez membranal en liposomas de DPPC/colesterol

El análisis de la fluidez de fantasmas de eritrocitos y liposomas de DPPC se realizó con tres monitores de fluorescencia: DPiP, DPH y TMA-DPH.

**Fundamento:** El microambiente que percibe un monitor, puede ser diferente al que percibe otro. Los monitores estudiados se insertan en diferentes zonas de las membranas es así que el DPiP, se ubica preferencialmente en la región intermedia de la monocapa de lípidos, DPH se localiza preferencialmente en el núcleo de la bicapa y el TMA-DPH está más cercano a la región polar; como se ejemplifica en la figura 5.

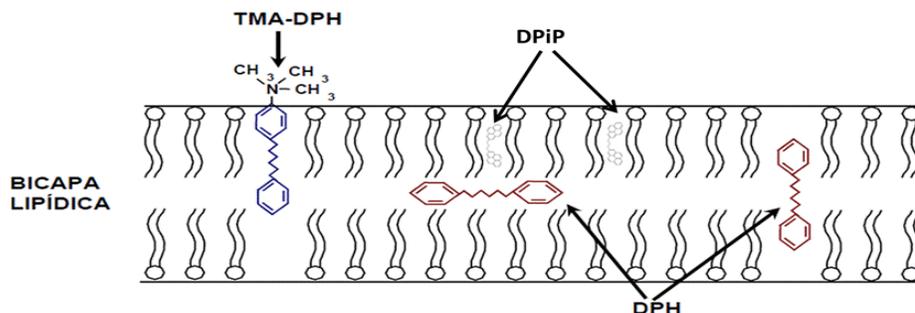


Figura 5. Esquema de la localización preferencial del DPH, DPiP y el TMA-DPH en las membranas biológicas. Modificado de (Mataix et al., 2005).

### 7.11 Incorporación de monitores fluorescentes en fantasmas de eritrocitos

**DPiP:** A 500  $\mu\text{L}$  de una solución de membranas de fantasmas de eritrocitos en amortiguador de fosfatos ( $> 0.37\text{mM}$  de fosfolípidos) se le adicionó el volumen apropiado de DPiP 76  $\mu\text{M}$  en etanol. Las muestras fueron incubadas en cuarto frío ( $4^{\circ}\text{C}$ ) con agitación continua durante 24 horas. Posteriormente, las membranas fueron diluidas en un volumen final de 3 ml en amortiguador de fosfatos y sonicadas en baño durante 5 minutos. La concentración final de DPiP fue de 0.074  $\mu\text{M}$  y con una relación molar de fluoróforo/fosfolípido no menor de 1:5000. La fluorescencia del DPiP incorporado en las membranas fue medida en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS55 controlado por computadora. El fluoróforo fue excitado a 337 nm y las intensidades de fluorescencia de monómero y excímero se leyeron a 385 y 480 nm respectivamente.

**DPH y TMA-DPH:** A 500  $\mu\text{l}$  de una solución de membranas de fantasmas de eritrocitos en amortiguador de fosfatos (1 mM de fosfolípidos) se le adicionó el volumen apropiado de DPH o TMA-DPH 1 mM en etanol. Las membranas fueron incubadas en cuarto frío con agitación continua durante 30 minutos. A continuación las membranas fueron diluidas en un volumen final de 3 ml en amortiguador de fosfatos y sonicadas en baño durante 5 minutos. La concentración final de DPH y TMA-DPH fue de 2  $\mu\text{M}$  y una relación molar de fluoróforo/fosfolípido no menor de 1:500. La polarización de fluorescencia del DPH y TMA-DPH incorporado en las membranas fue medida en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS55 controlado por computadora.

El fluoróforo fue excitado a 365 nm y se leyó la polarización a 430 nm de emisión para DPH y 365 nm de excitación y 425 nm de emisión para TMA-DPH.

## 7.12 Análisis estadístico

Las variables en estudio fueron analizadas mediante ANOVA con prueba de Tukey completamente aleatorizado para diferencia de medias, con 5 repeticiones por tratamiento. También se realizó análisis de correlación múltiple de Pearson para las variables glucosa, colesterol, triglicéridos e insulina en suero. Así como ANOVA de un factor con mediciones repetidas para las variables: concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre y ganancia de peso.

Los valores se expresarán como el promedio  $\pm$  desviación estándar (DE).  $p < 0.05$  se consideró significativa.

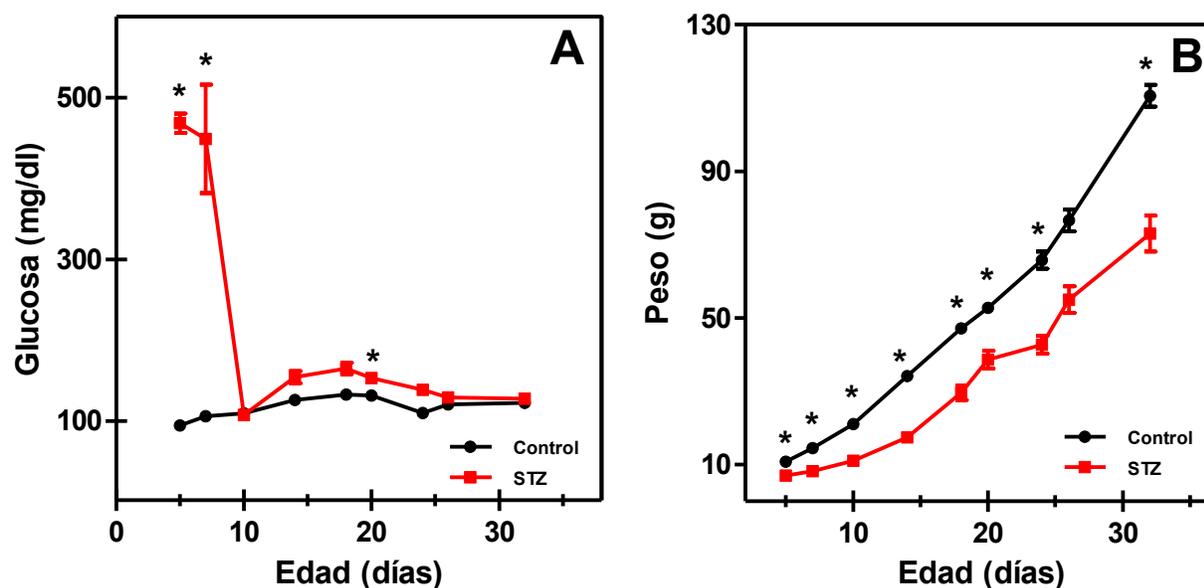
## 8 RESULTADOS

### 8.1 Parámetros fisiológicos

#### 8.1.1 Primera etapa: Lactancia

**Glucosa sanguínea:** Se observó que la concentración de glucosa sanguínea incrementó hasta los 500 mg/dl en los animales recién inducidos a diabetes; 5 veces más que el grupo no inducido. Sin embargo, esta concentración sólo se mantuvo por un periodo menor a diez días y se mantuvo relativamente baja (144 mg/dl) en un rango de 4 semanas durante el periodo de lactancia. Mientras que los animales del grupo no inducido presentaron concentraciones de 100 mg/dl durante toda la lactancia (figura 6A).

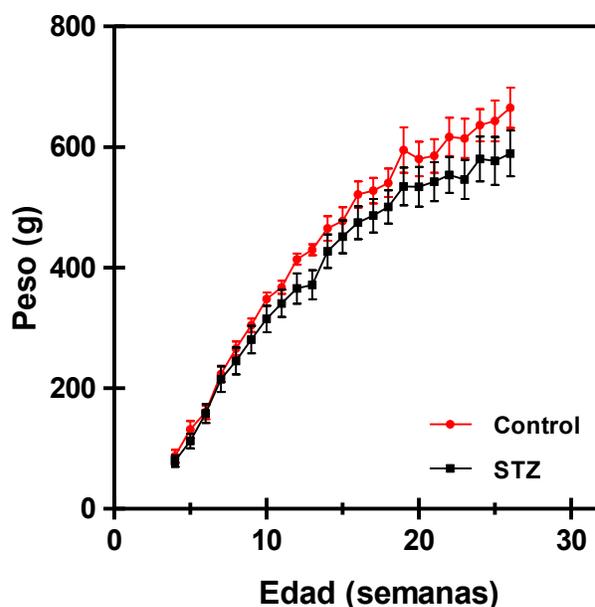
**Peso corporal:** En la figura 6B se observó cómo el incremento de peso de los animales del grupo control fue mayor que el de los animales inducidos a diabetes a lo largo de la etapa de lactancia.



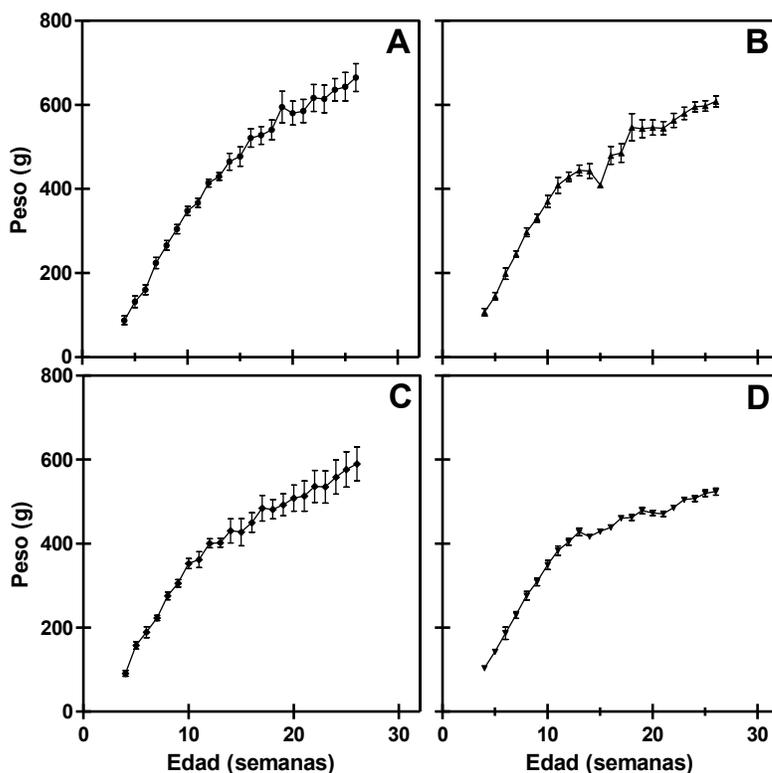
**Figura 6.** Concentración de glucosa sanguínea y ganancia de peso de ratas inducidas a diabetes (STZ 125 mg/Kg de peso) y grupo control durante la lactancia. Control n= 5, STZ n= 3. \* ( $p < 0.05$ ) con respecto al grupo control.

### 8.1.2 Segunda etapa: de las 4 a las 26 semanas de edad

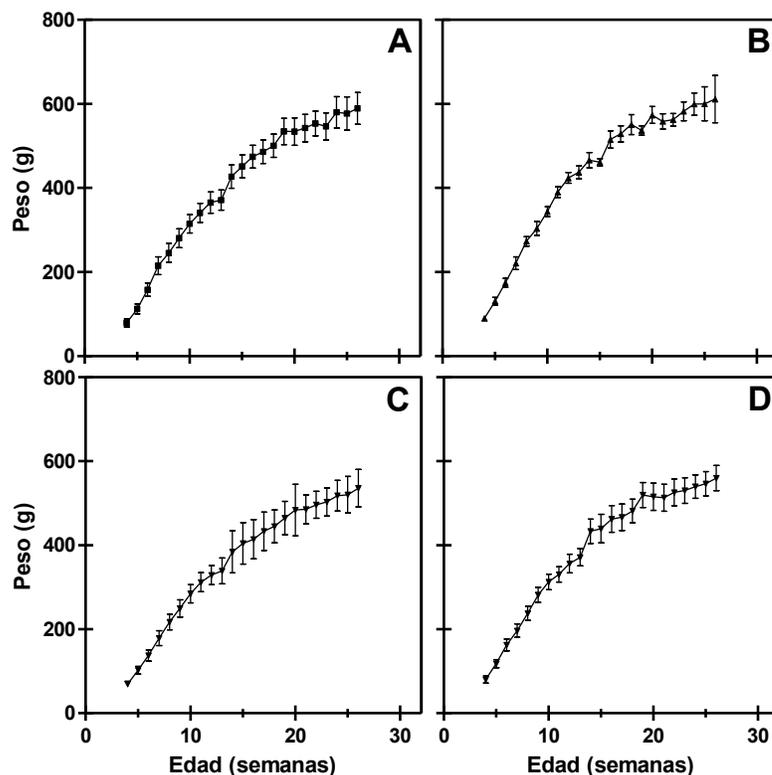
i) **Peso corporal:** En la figura 7 se observó una menor ganancia de peso del grupo inducido a diabetes tipo 2 (STZ) con respecto al grupo control, pero esa diferencia fue más evidente conforme iban creciendo, aunque las desviaciones no permiten decir que lo sean significativas. Esto nos demostró que la diabetes tipo 2 generada en este modelo, fue moderada y no causó daños severos a los sujetos de estudio. Al analizar los datos en forma aislada (figura 8) se observó que la ganancia de peso semanal presentó una distribución homogénea de los datos en los grupos control y grupos control con suplementos de ácidos grasos omega (3, 6 ó 9, mientras que en los animales de los grupos diabéticos y grupos diabéticos con suplementos de ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) (figura 9) la dispersión de los datos incrementó conforme incrementaba la edad.



**Figura 7.** Ganancia de peso semanal de ratas diabéticas tipo 2 (STZ) y su control. n = 7 de las 4 a las 13 semanas. n = 3 de las 14 a las 26 semanas



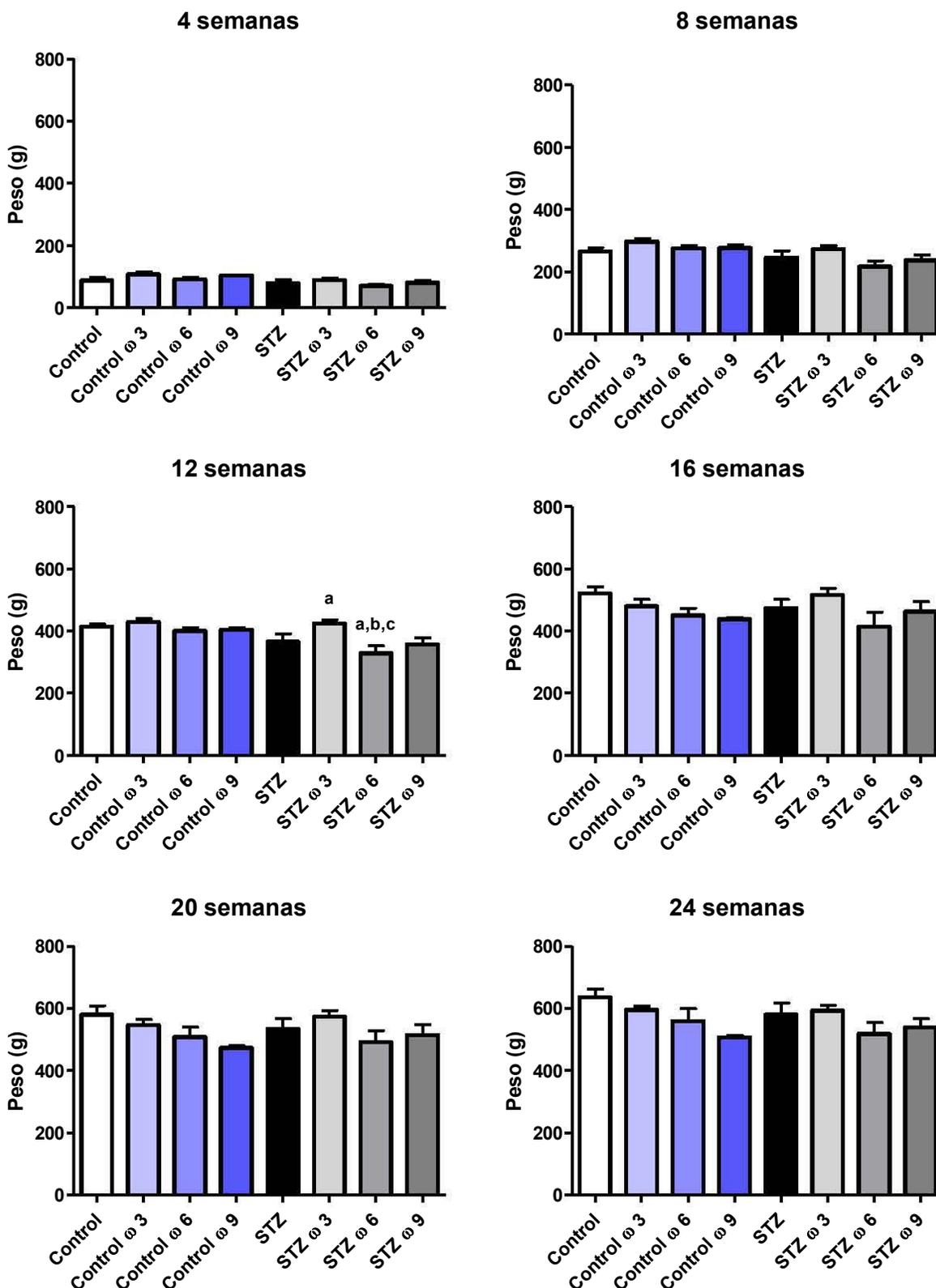
**Figura 8.** Ganancia de peso semanal de ratas control sin (A) y con suplemento de ácidos grasos omega 3 (B), 6 (C) y 9 (D). n = 7 de las 4 a las 13 semanas. n = 3 de las 14 a las 26 semanas



**Figura 9.** Ganancia de peso semanal de ratas diabéticas inducidas con STZ sin (A) y con suplemento de ácidos grasos omega 3 (B), 6 (C) y 9 (D). n = 7 de las 4 a las 13 semanas. n = 3 de las 14 a las 26 semanas

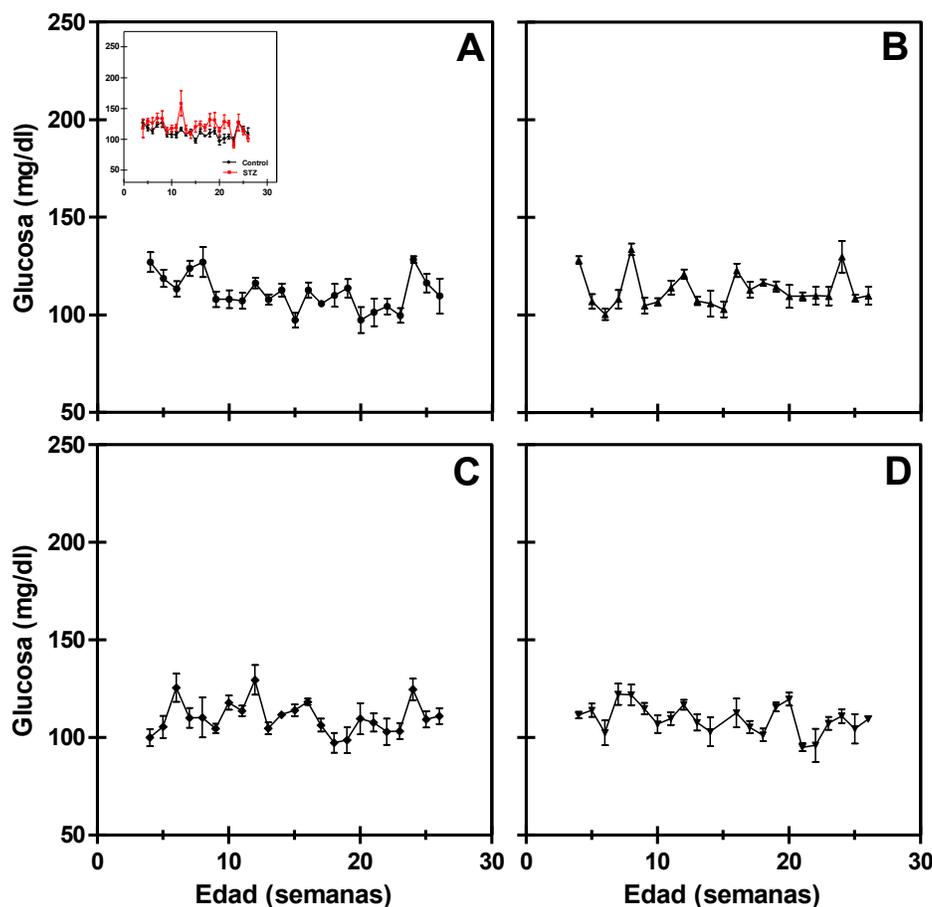
No se observó diferencia estadísticamente significativa sobre la ganancia de peso de los grupos de estudio durante las primeras 8 semanas de edad (figuras 8 y 9). A partir de la semana once se observaron diferencias entre algunos de los grupos en estudio. En la semana 12 se observó un incremento del 2.5 % del peso corporal en los animales del grupo diabético con tratamiento de ácidos grasos  $\omega 3$  respecto al grupo control; sin embargo, el grupo diabético que recibió tratamiento con ácidos grasos  $\omega 6$  tuvo una menor ganancia de peso (20.5%) comparado con el grupo control. Los animales del grupo control y diabético con tratamiento con ácidos grasos  $\omega 3$  incrementaron hasta 23.24 % su peso, en comparación con el grupo de animales diabéticos con adición de ácidos grasos  $\omega 6$ . A la semana 16, los grupos diabéticos con adición de ácidos grasos  $\omega 3$  y  $\omega 6$  presentaron una menor ganancia de peso (7.5 y 20.5 respectivamente) comparados con el grupo control. En las semanas 20 y 24 se observó una menor ganancia de peso del grupo control con ácidos grasos  $\omega 9$  (hasta 18%) comparados con el grupo control. En la figura 10 se muestra el resultado del análisis estadístico, comparando todos los grupos control y diabéticos, así como con sus respectivos grupos suplementados con los diferentes ácidos grasos omega 3,6 ó 9. A las 12 semanas de edad el grupo diabético suplementado con ácidos grasos  $\omega 3$  (STZ  $\omega 3$ ) fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control. El grupo diabético suplementado con los ácidos grasos  $\omega 6$  (STZ  $\omega 6$ ) fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control, control suplementado con  $\omega 3$  y diabético suplementado con  $\omega 3$  (STZ  $\omega 3$ ).

En resumen, en la figura 10 se puede observar que la hiperglicemia generada en estas ratas, no es tan alta (en promedio 121 mg/dl para el grupo control y 128 mg/dl para el grupo inducido con STZ) como para que haya efectos significativos sobre el crecimiento de los animales. Así, este modelo parece reflejar lo que ocurre en etapas tempranas de la diabetes en donde no hay cuidados de la concentración de glucosa sanguínea por desconocimiento del padecimiento. Además, nos muestra que los ácidos grasos omega (3, 6 y 9), no tuvieron efectos adversos o benéficos significativos sobre la tasa de crecimiento.



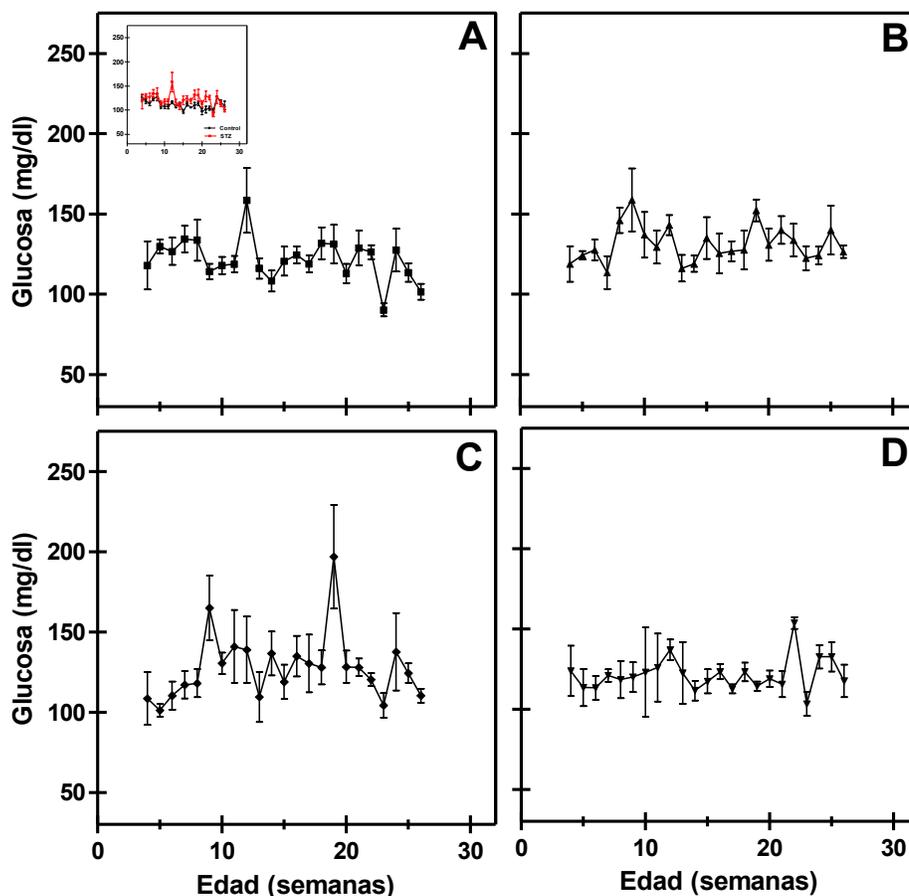
**Figura 10.** Peso mensual de ratas diabéticas y controles. n = 13 a las 4, 8 y 12 semanas. n = 3 a las 16, 20 y 24 semana. (**p<0.05**): 12 semanas, (a) con respecto al control, (b) con respecto al control suplementado con ω3 y (c) con respecto al grupo diabético STZ suplementado con ω3.

ii) **Glucosa sanguínea:** La glucosa sanguínea tuvo una concentración promedio a lo largo del tiempo de 118.1 a 124.2 mg/dl en los animales control y de 125.7 a 130.8 mg/dl en los animales diabéticos, esto debido al modelo de diabetes utilizado, ya que presenta hiperglicemias ligeras que se asemejan a la DMT2 en su etapa inicial y por lo tanto no son tan diferentes los grupos inducidos con STZ con respecto al grupo control. Durante el estudio se pudo observar un incremento en la concentración de glucosa sanguínea de los grupos diabéticos con ácidos grasos omega 3 (13.6%) y 6 (19.8%) y del grupo control con ácidos grasos omega 9 (19.85%) a las 16 semanas de edad respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). A las 20 semanas de edad los grupos diabéticos con ácidos grasos omega 3 y 6 tuvieron un incremento del 24.8% y 31.8% respectivamente respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) (figuras 11 y 12).



**Figura 11.** Concentración promedio de glucosa sanguínea por semana de ratas control sin (A) y con suplemento de ácidos grasos omega 3 (B), 6 (C) y 9 (D).  $n = 13$  de las 4 a las 13 semanas.  $n = 3$  de las 14 a las 26 semanas.

Analizando cada una de las gráficas de los animales de estudio en forma separada se puede observar una menor dispersión de los datos en los grupos control (figura 11) comparados con los datos de los animales de los grupos diabéticos (figura 12), lo cual es consistente con una pérdida parcial en el control de la glicemia en los grupos inducidos a DMT2 con STZ con y sin suplementos de ácidos grasos omega (3, 6 ó 9).



**Figura 12.** Concentración promedio de glucosa sanguínea por semana de ratas diabéticas (STZ), sin (A) y con suplemento de ácidos grasos omega 3 (B), 6 (C) y 9 (D). n = 13 de las 0 a las 13 semanas. n = 3 de las 14 a las 26 semanas.

En la figura 13 se muestra el resultado del análisis estadístico de las concentraciones de glucosa obtenidas durante el tratamiento experimental, comparando todos los grupos control y diabéticos, así como con sus respectivos grupos suplementados con los diferentes ácidos grasos omega 3,6 ó 9. A la semana 16 el grupo control suplementado con omega 9 ( $\omega$ -9) mostró

diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. A la semana 20 los grupos diabéticos suplementados con ácidos grasos omega 3 ( $\omega$ -3) y omega 6 ( $\omega$ -6) respectivamente, tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control. Estos datos muestran que un análisis puntual de las glicemias, no permite distinguir claramente el desarrollo de la hiperglicemia en sus etapas iniciales.

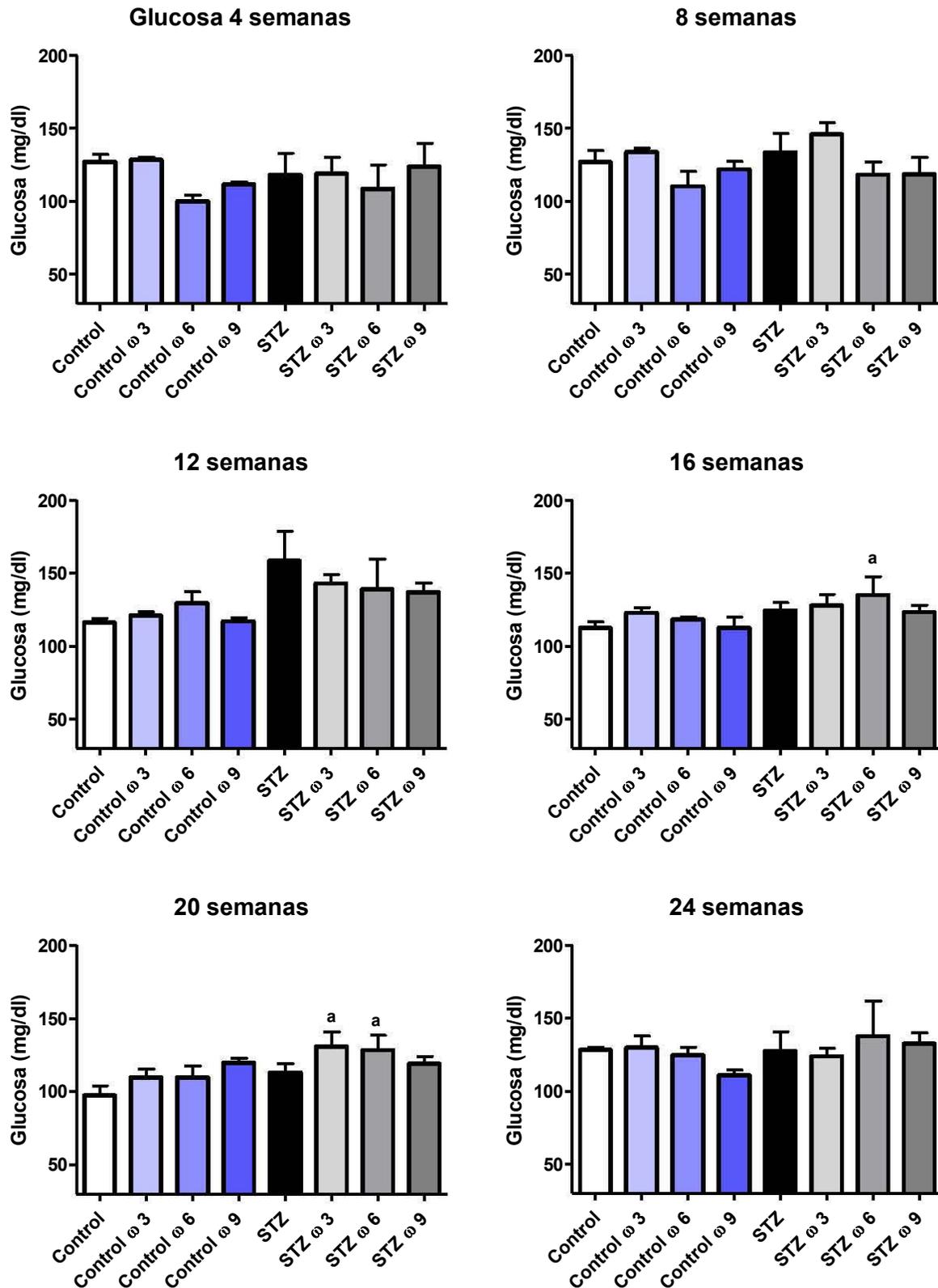
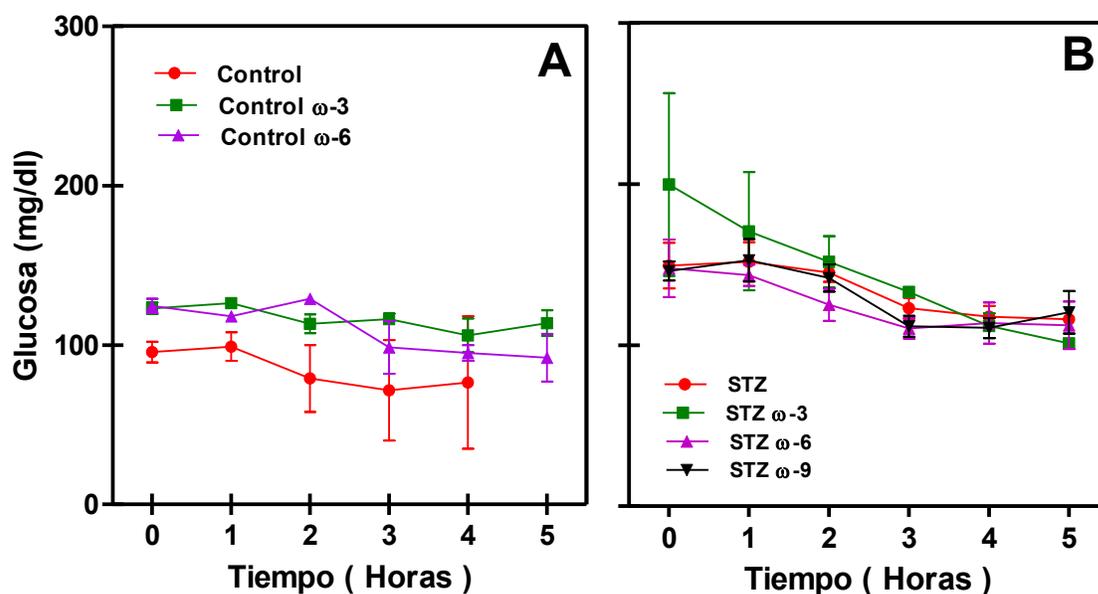


Figura 13. Comparación de la glucosa sanguínea por semana de ratas diabéticas (STZ), y su control con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9. n = 13 de las 0 a las 13 semanas. n = 3 de las 14 a las 26 semanas. **a** ( $p < 0.05$ ) con respecto al control.

### iii) Curva de ayuno

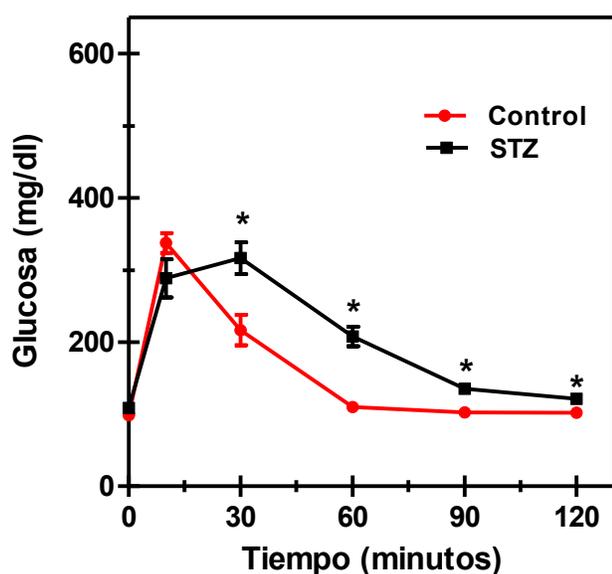
El periodo de ayuno es un factor muy importante a considerar antes de obtener la concentración de glucosa sanguínea; ya que durante el ayuno se presentan eventos metabólicos regulados por hormonas liberadas para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, evitando así daño a los diferentes tejidos, sobre todo a aquellos que de forma normal utilizan como sustrato únicamente glucosa (Schwartz, 2009). En animales de laboratorio se debe reconsiderar si realmente es necesario un ayuno prolongado para la valoración de dichos parámetros fisiológicos; para ello se determinó cual es el tiempo óptimo de ayuno requerido para la valoración de la concentración de glucosa en sangre. El ayuno se consideró a partir del momento en que se priva de alimento, se determinó la concentración de glucosa, tomando este periodo como tiempo cero de ayuno. Se monitoreo la concentración de glucosa sanguínea durante 5 horas En la figura 14 A que pertenece al grupo control no diabético con y sin suplemento, observamos que varían la glucosa en concentraciones bajas o normales, sin embargo, a partir de la 4 hora es cuando notamos que ya se estabilizó. En la figura 14 B tenemos el grupo de diabéticos inducidos con STZ con y sin suplemento de aceites omega 3, 6 ó 9, se observó que empiezan de una concentración de glucosa sanguínea mucho más alta y que a partir de la tercera hora de ayuno ya no hay variaciones en cuanto a la concentración de glucosa sanguínea, pero siguen más altas que las controles.



**Figura 14.** Concentración de glucosa (mg/dl) durante un ayuno de 5 horas. Grupo control vs grupo con diabetes mellitus tipo 2 (STZ) a las 4 semanas de edad. n=4 grupo control y n=4 grupo diabético (STZ).

**iv) Curva de tolerancia a la glucosa**

A las 4 semanas de edad la curva de tolerancia a la glucosa mostró que el grupo control incrementó un poco más 49 mg/dl (17%) la concentración de glucosa en comparación al grupo inducido con STZ después de 10 minutos de la administración de dextrosa, sin embargo, mostró que es capaz de metabolizar de manera eficiente la glucosa sanguínea, regresando a su concentración basal a los 60 minutos y manteniéndose así hasta los 120 minutos (tiempo en que termino la prueba), sin embargo, el grupo diabético inducido con STZ a pesar de disminuir la concentración de glucosa el tiempo que le toma en metabolizar la glucosa es mayor en comparación con el grupo control y aunque pareciera ser que a los 60 minutos el grupo con STZ regresará a la concentración basal, no lo consigue (figura 15) y existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo diabético y el grupo control a partir de los 30 minutos de haber inyectado la dextrosa.



**Figura 15.** Curva de tolerancia a la glucosa grupo control vs grupo con diabetes mellitus tipo 2 (STZ) a las 4 semanas de edad.  $n=4$  grupo control y  $n=4$  grupo diabético (STZ). \* ( $p<0.05$ )

Se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el grupo control con ácidos grasos omega 3 y el control sin tratamiento a los 4 (figura 16 E) y 6 (figura 17 C) meses de edad. Para el caso de los animales del grupo diabético no se observó diferencia estadística significativa entre grupos. Sin embargo, se puede observar que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos diabéticos y el control en todas las edades analizadas. Cabe señalar que el periodo de regresión de los valores de glucosa a la concentración inicial en los grupos diabéticos se incrementó con la edad, además de que a los seis meses de edad la concentración de glucosa sanguínea se mantuvo por más de 120 minutos en concentraciones por arriba de los 400 mg/dl. También es importante señalar que en los animales del grupo control con tratamiento de ácidos grasos omega, el tiempo de regresión de los valores de glicemia se va incrementando conforme avanza la edad de los animales e incrementa la dispersión de los datos.

Teniendo en cuenta que el modelo de estudio es semejante a la DMT2 en sus primeras etapas, ya que las hiperglicemias son ligeras ( $\sim 120$  mg/dl), se hace hincapié en la importancia de las curvas de tolerancia ya que resulta el método más adecuado para determinar si se tiene control sobre la glicemia principalmente en los individuos con DMT2.

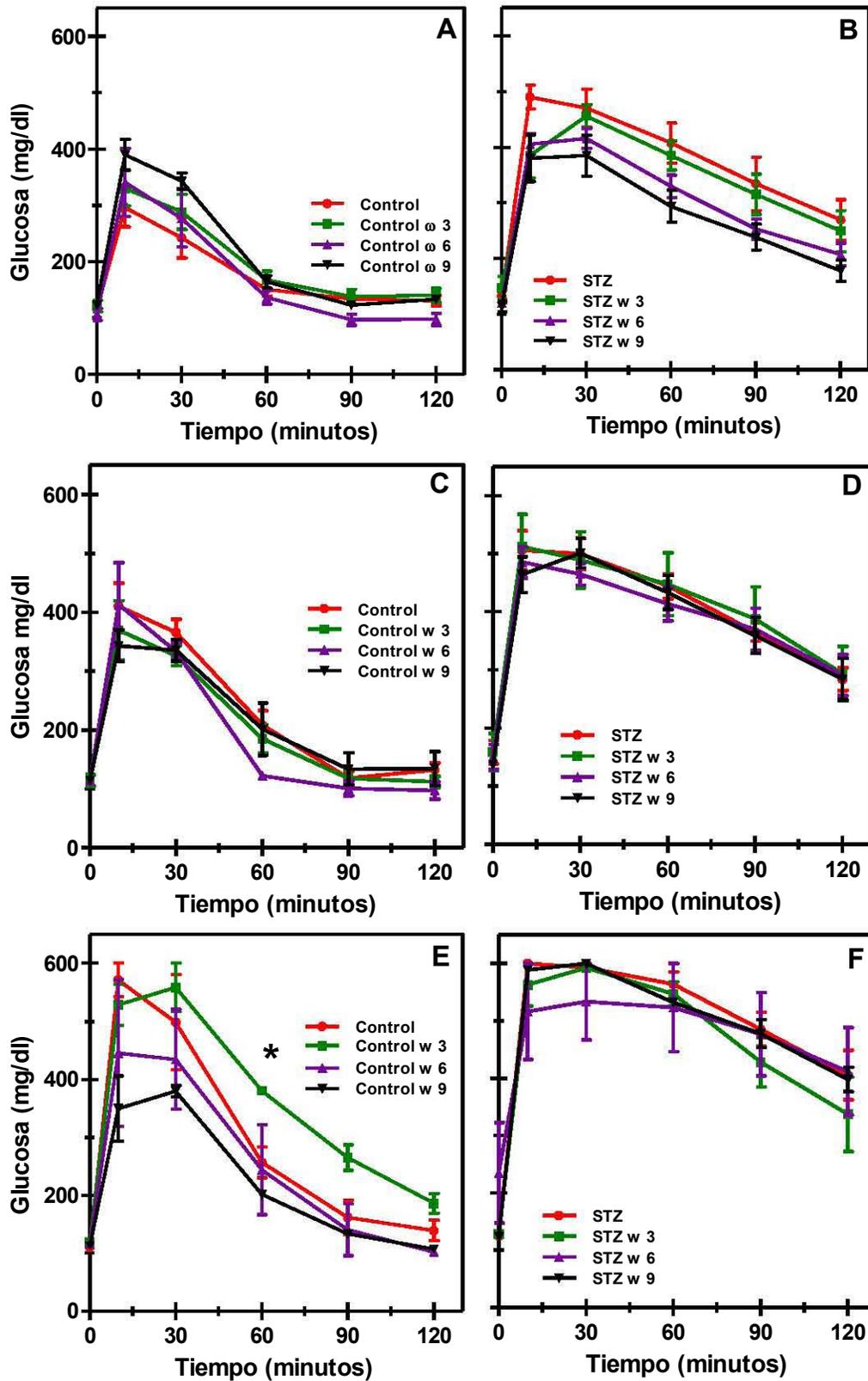


Figura 16. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas y sus controles a diferentes edades. A y B 2 meses, C y D 3 meses y E y F 4 meses. n= 3

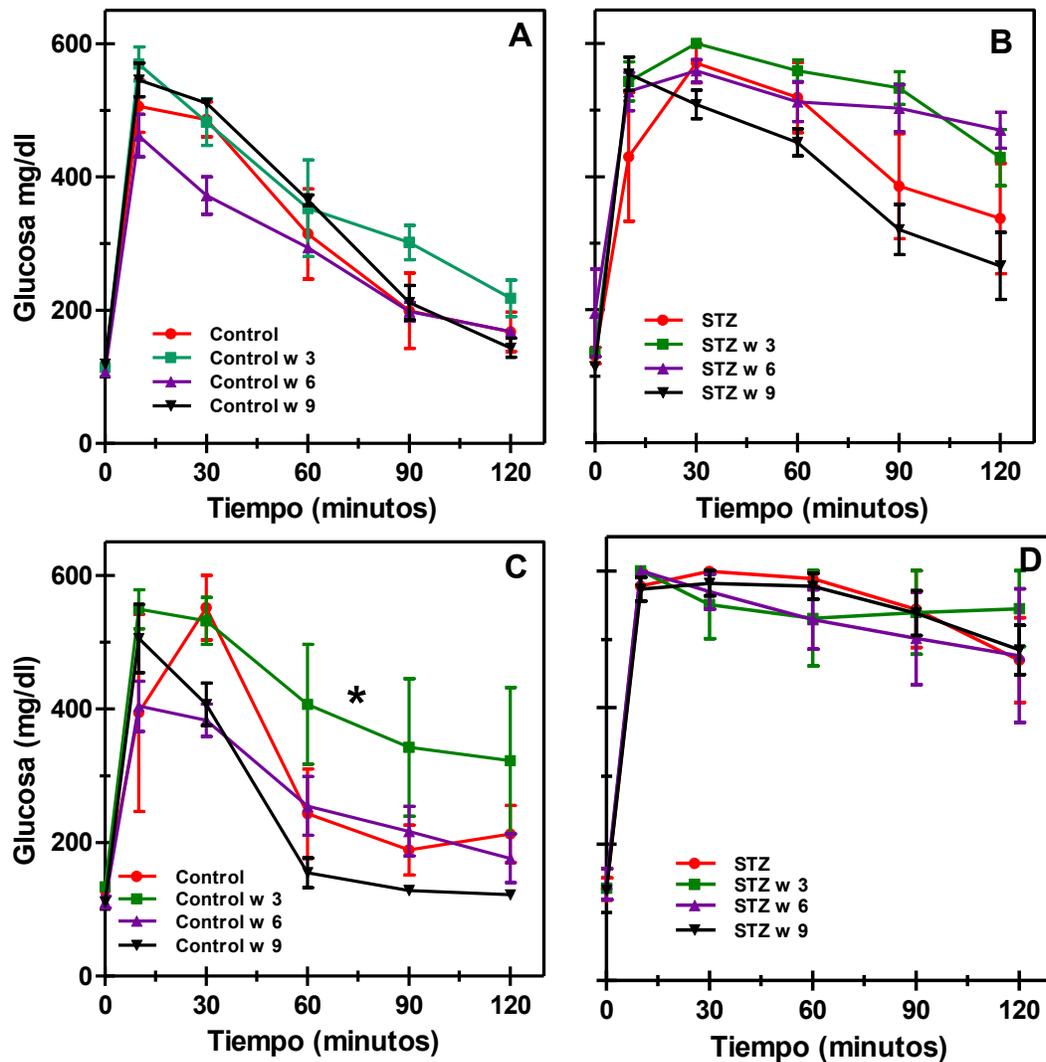
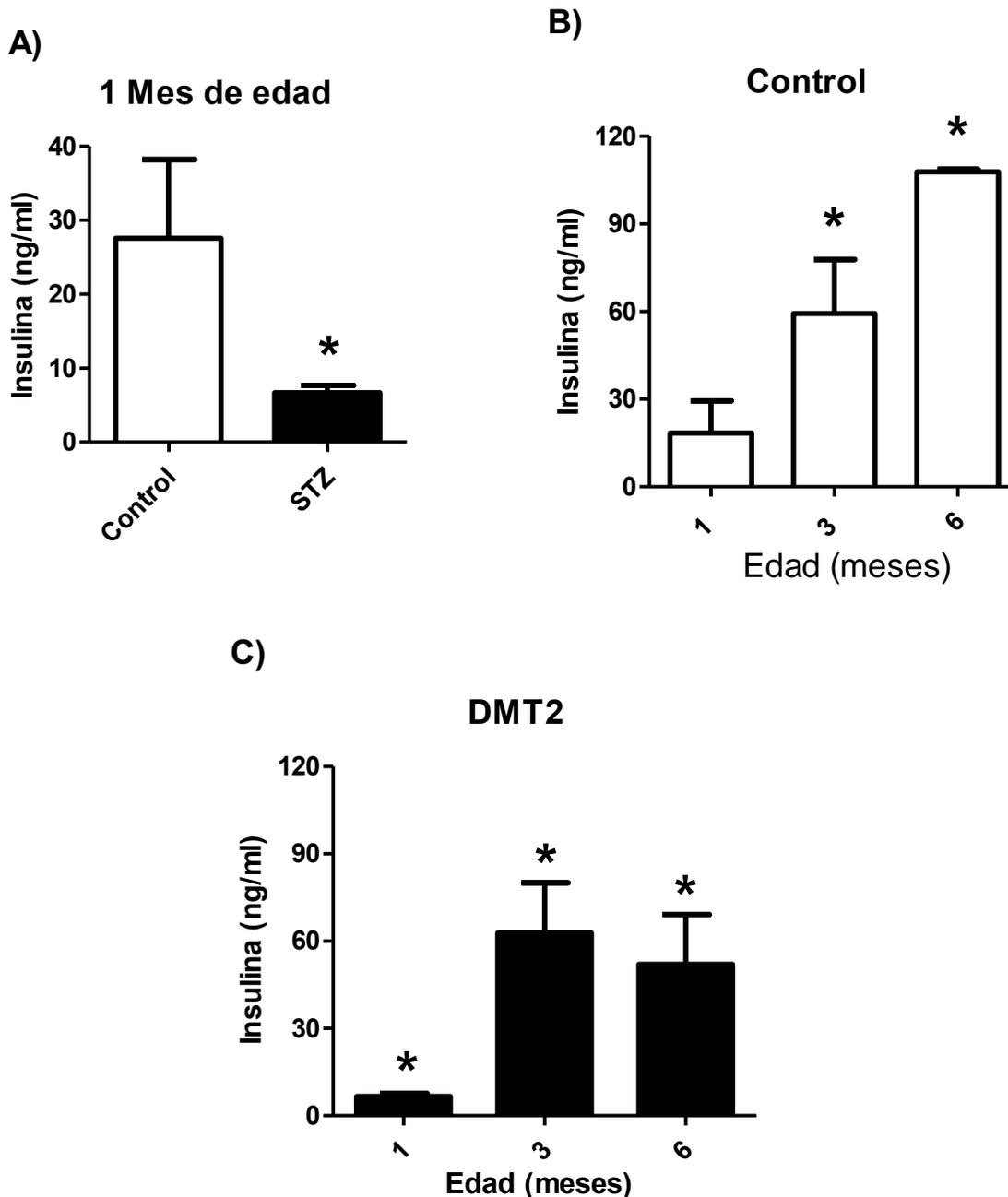


Figura 17. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas diabéticas y sus controles a diferentes edades. A y B 5 meses y C y D 6 meses. n=4 grupo control y n=4 grupo diabético (STZ). \* ( $p < 0.05$ )

v) **Insulina**

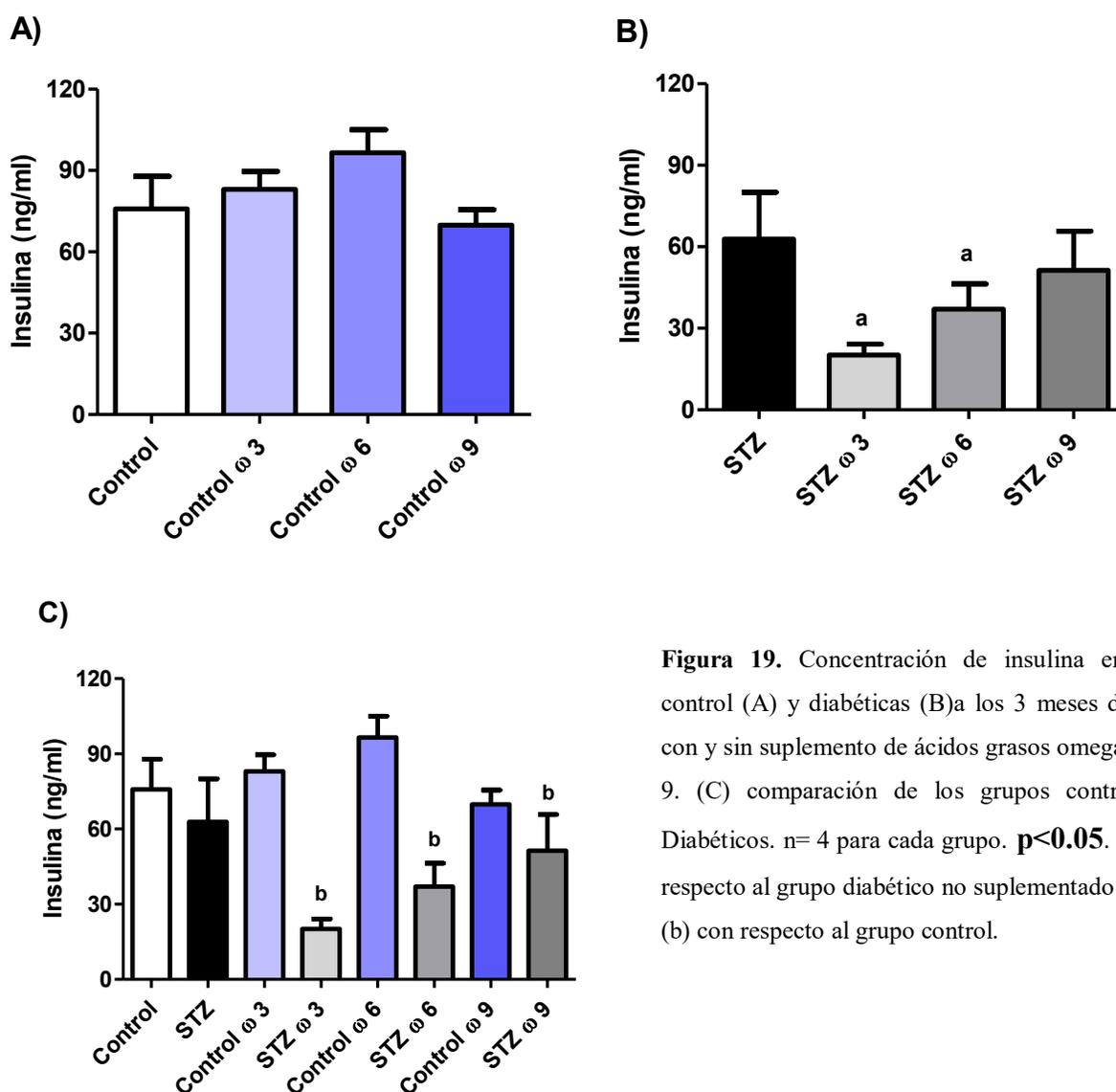
La concentración de insulina plasmática encontrada en los animales del grupo control a las 4 semanas de edad (figura 18 A), fue 4 veces mayor que la del grupo diabético ( $p < 0.05$ ). En la figura 18 B se observa un incremento de 3 y 4 veces en la concentración de insulina de los animales del grupo control a lo largo del tiempo ( $p < 0.05$ ). Los animales del grupo diabético incrementan la concentración de insulina al tercer mes de edad pero disminuye a los 6 meses;  $p < 0.05$  (figura 18 C).



**Figura 18.** Concentración de insulina en suero de ratas diabéticas y controles. (A) 1 mes de edad, B) 1, 3 y 6 meses grupo control y C) 1, 3 y 6 meses grupo diabético n= 4 para cada grupo. \* ( $p<0.05$ ) con respecto al control.

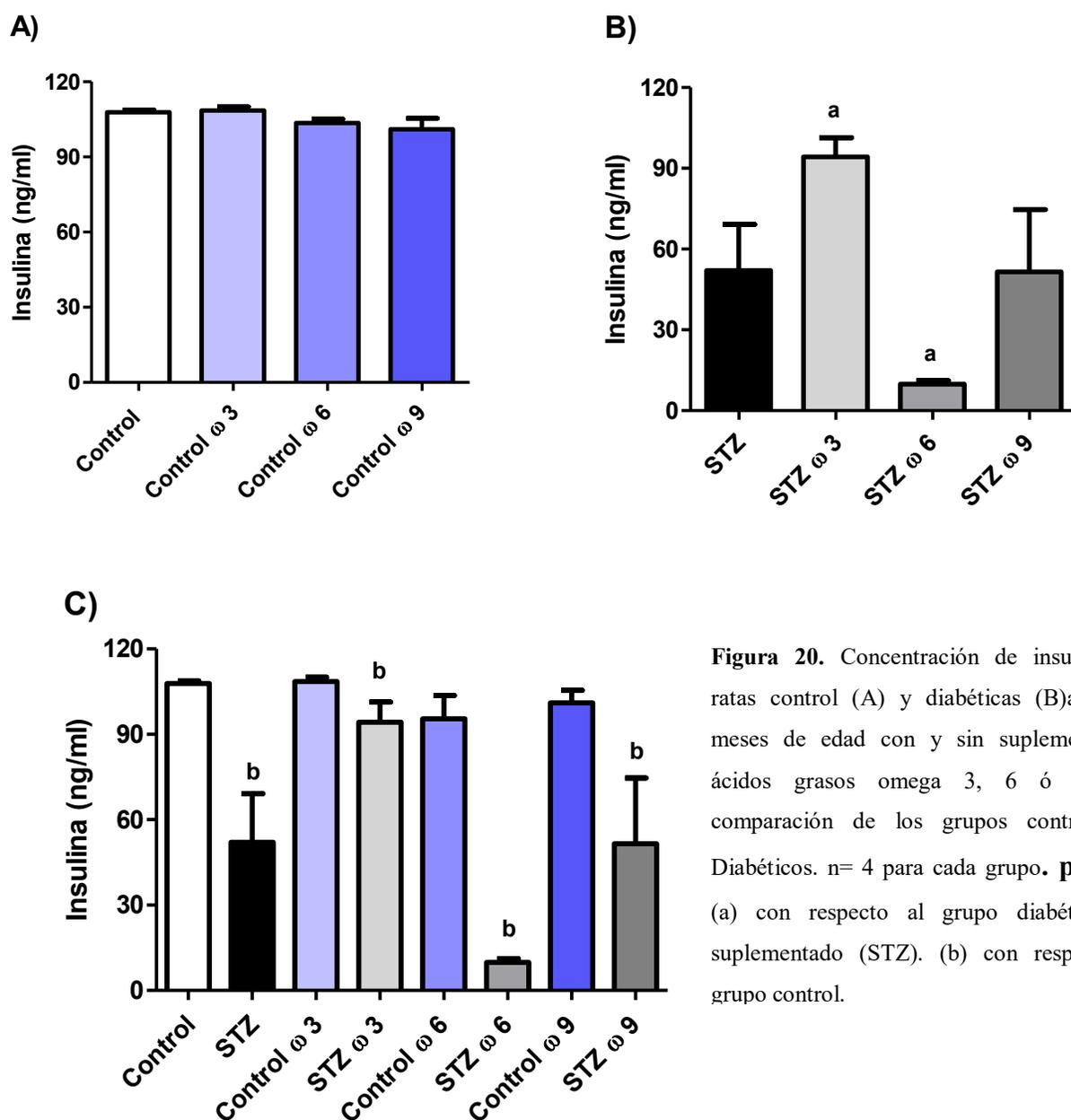
A los tres meses de tratamiento se observó que el grupo control suplementado con ácido graso  $\omega 6$  tuvo un 27% más de insulina plasmática con respecto del grupo control, aunque no llega a ser estadísticamente significativo (figura 19 A). Mientras que los grupos diabéticos

suplementados con los diferentes ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) mostraron tener menos insulina comparada con el grupo diabético no suplementado ( $p < 0.05$ ) (figura 19 B). La figura 19 C muestra la comparación de la concentración de insulina plasmática entre los grupos controles contra los grupos diabéticos a los tres meses de tratamiento, se muestra



**Figura 19.** Concentración de insulina en ratas control (A) y diabéticas (B) a los 3 meses de edad con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9. (C) comparación de los grupos control Vs. Diabéticos.  $n = 4$  para cada grupo.  $p < 0.05$ . (a) con respecto al grupo diabético no suplementado (STZ). (b) con respecto al grupo control.

A los 6 meses de edad, la concentración de insulina plasmática de los animales del grupo control con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9 se encontró en un rango de 100 a 108 ng/ml (figura 20 A). Mientras que en el grupo diabético se observó una mayor concentración del 23.4 % en el grupo suplementado con omega 3 y del 61 % menos en el grupo omega 6 comparado con el grupo diabético sin suplementos de omegas,  $p < 0.05$  (figura 20 B). En la figura 20 C se observa que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos control con y sin adición de ácidos grasos omega 3, 6 y 9 y su respectivo grupo diabético.

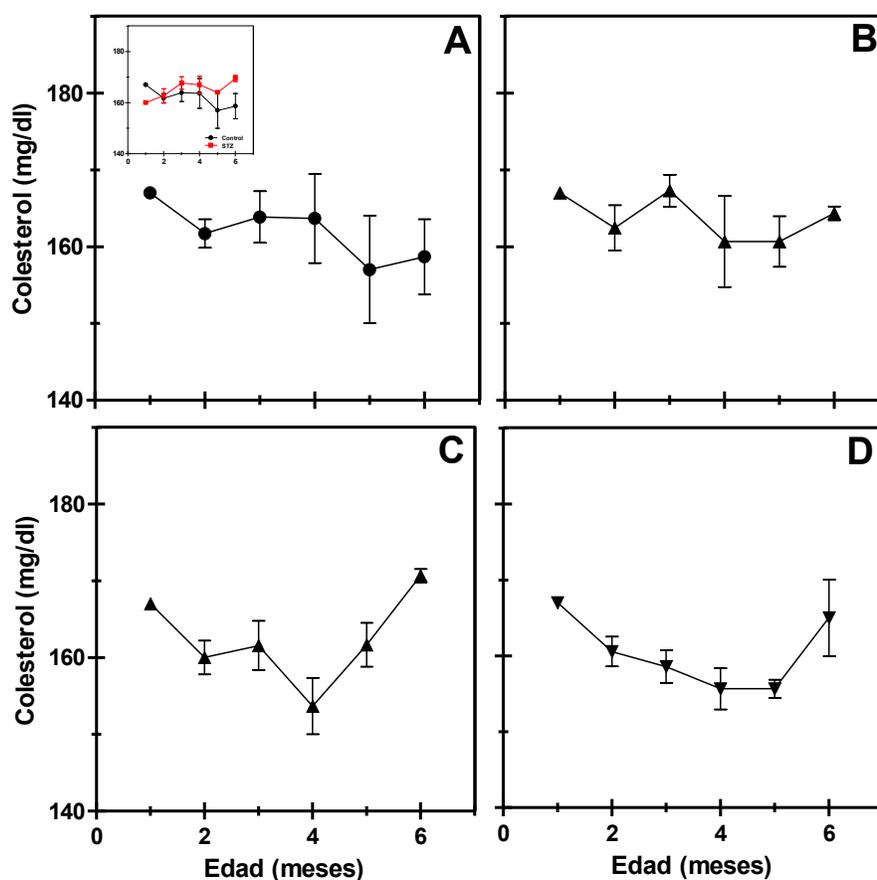


**Figura 20.** Concentración de insulina en ratas control (A) y diabéticas (B) a los 6 meses de edad con y sin suplemento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9. (C) comparación de los grupos control Vs. Diabéticos.  $n= 4$  para cada grupo.  $p < 0.05$ . (a) con respecto al grupo diabético no suplementado (STZ). (b) con respecto al grupo control.

## 8.2 Metabolismo de lípidos

**8.2.1 Colesterol:** En los resultados se observó que existe una mayor concentración de colesterol del 7.5 % (170 mg/dL) en sangre de ratas control suplementadas con ácidos grasos omega 6 (figura 21 C) respecto los grupos control no suplementado (figura 21 A) a los 6 meses de edad.

También se observó una menor concentración de colesterol en sangre en los grupos diabéticos suplementados con ácidos grasos omega 6 (figura 22 C) 6.6% a los 5 meses de edad y 5.5% a los 6 meses de edad comparado con el grupo diabético no suplementado (figura 22 A).



**Figura 21.** Concentración de colesterol en sangre de ratas de los grupos control de 1 a los 6 meses de edad: (A) control sin tratamiento, B) control suplementado con ácido graso omega 3, C) control suplementado con ácido graso omega 6 y D) control suplementado con ácido graso omega 9. n=4 para cada grupo.

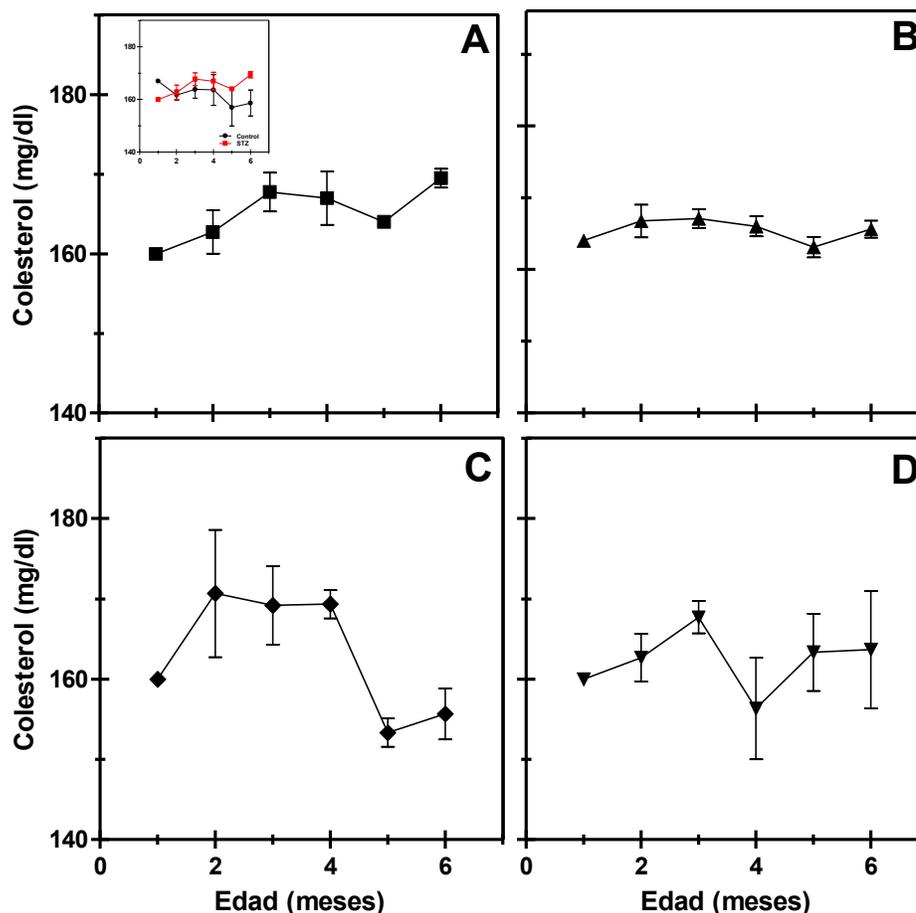
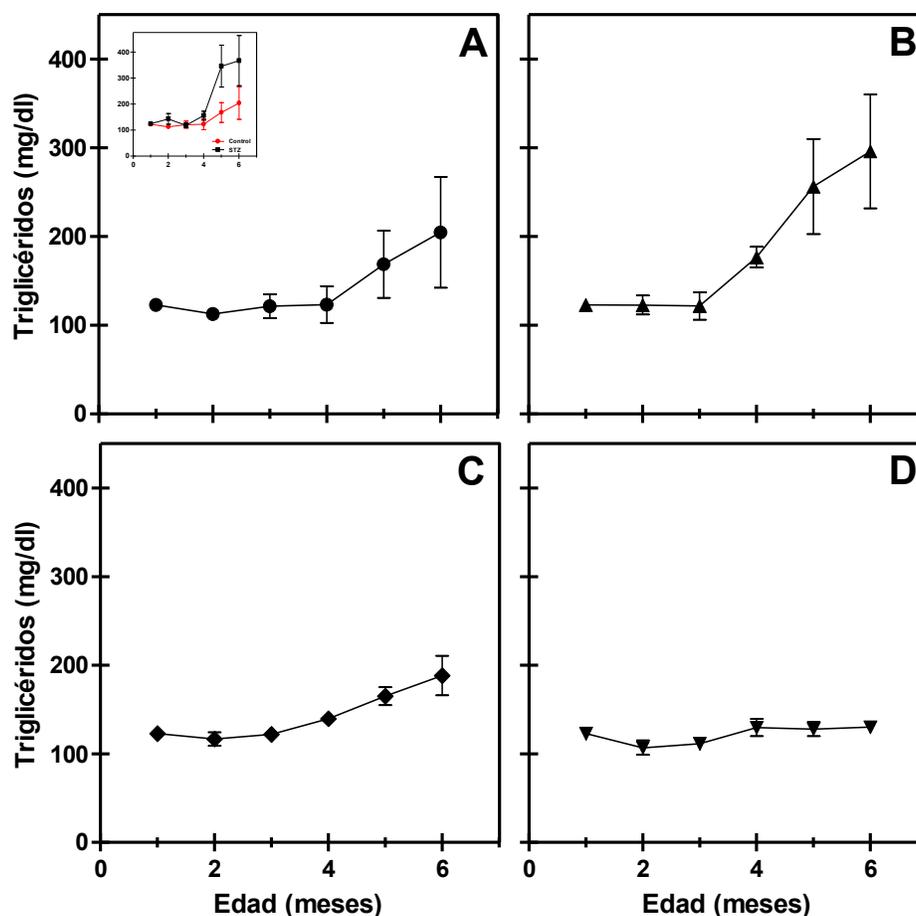


Figura 22. Concentración de colesterol en sangre de ratas de los grupos diabéticos (STZ) de 1 a los 6 meses de edad: (A) STZ sin tratamiento, (B) STZ suplementado con ácido graso omega 3, (C) STZ suplementado con ácido graso omega 6 y (D) STZ suplementado con ácido graso omega 9.  $n=4$  para cada grupo.

**8.2.2 Triglicéridos:** En términos generales, la concentración de triglicéridos entre los grupos control es similar hasta los 3-4 meses de edad. Sin embargo, después de esa edad (4 meses) la concentración de triglicéridos en sangre de ratas es mayor un 43.3 % (53.3 mg/dL) en el grupo control suplementado con ácidos grasos omega 3 (figura 23 B) respecto al grupo control (figura 23 A) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 23.** Concentración de triglicéridos en sangre de ratas de los grupos control de 1 a los 6 meses de edad: (A) control sin tratamiento, (B) control suplementado con ácidos grasos omega 3, (C) control suplementado con ácidos grasos omega 6 y (D) control suplementado con ácidos grasos omega 9. n=4 para cada grupo.

En la figura 24 se muestra el resultado de las concentraciones de triglicéridos de los grupos diabéticos con y sin suplementos de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9, se observó que a partir del 5 mes el grupo sin suplemento incrementó la concentración de triglicéridos (figura 24A), pero no llegó a ser estadísticamente significativo. El resto de los grupos que fueron suplementados con los diferentes ácidos grasos omega 3, 6 ó 9 mantuvieron concentraciones de triglicéridos en promedio de 125 – 130 mg/dl sin mostrar diferencias estadísticas entre ellos (Figuras 24 B, C y D).

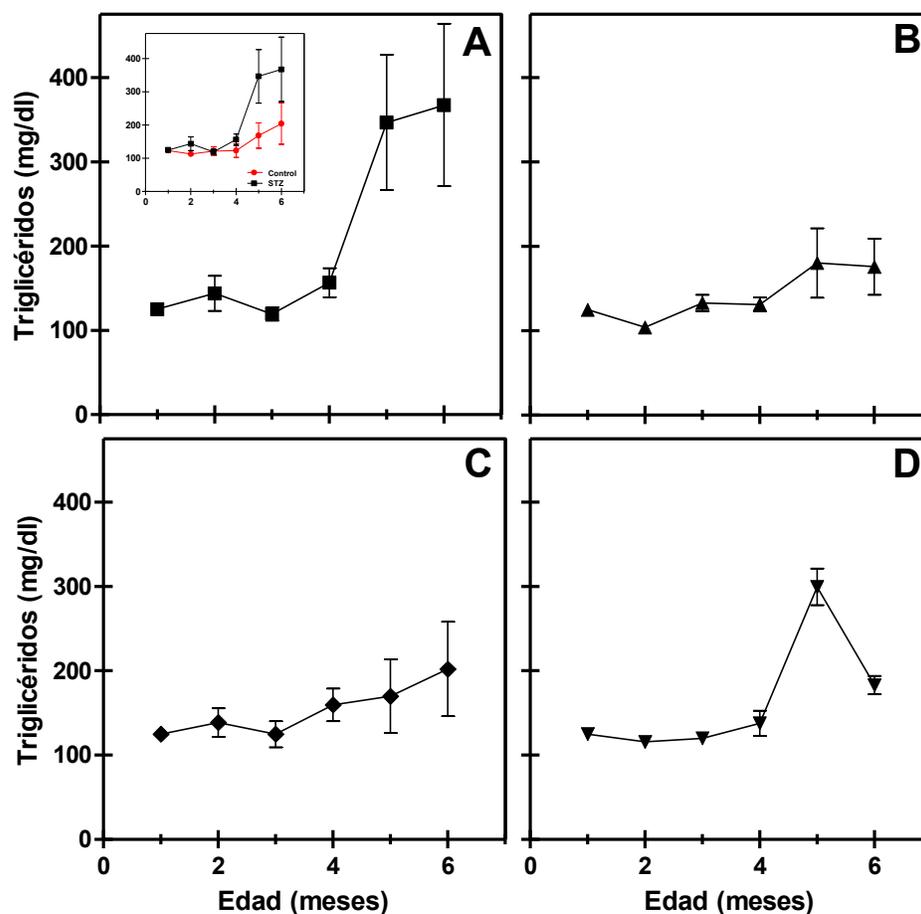


Figura 24. Concentración de triglicéridos en sangre de ratas de los grupos diabéticos (STZ) de 1 a los 6 meses de edad: (A) STZ sin tratamiento, (B) STZ suplementado con ácidos grasos omega 3, (C) STZ suplementado con ácido graso omega 6 y (D) STZ suplementado con ácido graso omega 9.  $n=4$  para cada grupo.

### 8.3 Análisis del suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos

#### 8.3.1 Cuantificación de proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos

Se cuantificó la proteína en membrana de fantasmas de eritrocitos y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los grupos control como diabéticos suplementados y no suplementados con los diferentes ácidos grasos omega 3, 6 ó 9.

### 8.3.2 Cuantificación de proteína, colesterol y triglicéridos en suero:

Se cuantificó proteína, colesterol y triglicéridos en suero y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tratamientos (1, 3 y 6 meses) ni en los grupos controles y diabéticos con y sin suplementos de ácidos grasos omega (3, 6 ó 9). Sin embargo es claro que el metabolismo de lípidos se ve alterado a los 6 meses con respecto a los triglicéridos donde observamos que la concentración aumentó considerablemente si los comparamos con los datos de 3 meses

**Tabla 1.** Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo control y diabéticos de 1 mes de edad

Parámetro	Control	STZ
Proteína en suero ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	48.9 $\pm$ 14.1	40.3 $\pm$ 1.8
Colesterol en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	84 $\pm$ 1.1	70 $\pm$ 7.5
Triglicéridos en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	57 $\pm$ 26.1	63 $\pm$ 7.7
Proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1.0 0.3	1.2 $\pm$ 0.4

**Tabla 2.** Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo control suplementado y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) de 3 meses de edad

Parámetro	Control	Control $\omega$ 3	Control $\omega$ 6	Control $\omega$ 9
Proteína en suero ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	53.1 $\pm$ 1.4	52.1 $\pm$ 1.2	53.3 $\pm$ 3.0	56.6 $\pm$ 6.3
Colesterol en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	64 $\pm$ 11.4	75 $\pm$ 18	71 $\pm$ 8	66 $\pm$ 5.7
Triglicéridos en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	82 $\pm$ 39	64 $\pm$ 16.9	112 $\pm$ 57	58 $\pm$ 15.6
Proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	2.8 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.2

**Tabla 3.** Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo diabético suplementado y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) de 3 meses de edad

Parámetro	STZ	STZ ω 3	STZ ω 6	STZ ω 9
Proteína en suero ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	61.9 ± 3.0	55.2 ± 6.9	54.0 ± 7.9	32.8 ± 10.7
Colesterol en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	67 ± 12.0	63 ± 21	67 ± 6.7	64 ± 12.9
Triglicéridos en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	70 ± 0.4	52.0 ± 16.3	118 ± 31.3	85 ± 18.9
Proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	2.9 ± 0.4	2.9 ± 1.1	2.2 ± 0.6	0.8 ± 0.5

**Tabla 4.** Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo control suplementado y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) de 6 meses de edad.

Parámetro	Control	Control ω 3	Control ω 6	Control ω 9
Proteína en suero ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	54.5 ± 2.5	63.3 ± 11.5	55.6 ± 3.5	57.8 ± 6.1
Colesterol en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	108 ± 22.2	77 ± 6.8	85 ± 6.0	99 ± 22
Triglicéridos en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	404 ± 82.3	190 ± 66.4	169 ± 77	116 ± 30.2
Proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1.3 ± 0.3	1.8 ± 0.6	2.2 ± 1.3	1.4 ± 0.2

**Tabla 5.** Cuantificación de proteína, colesterol, triglicéridos en suero y proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos, grupo diabético suplementado y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) de 6 meses de edad

Parámetro	STZ	STZ ω 3	STZ ω 6	STZ ω 9
Proteína en suero ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	53.7 ± 3.6	54.8 ± 6.9	56.5 ± 4.4	56.7 ± 3.5
Colesterol en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	95 ± 16.8	73 ± 18.4	83 ± 24.8	97 ± 22.9
Triglicéridos en suero ( $\text{mg}/\text{dl}$ )	211 ± 75.4	168 ± 95.7	129 ± 82.6	190 ± 29.5
Proteína de membrana de fantasmas de eritrocitos ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	1.3 ± 0.4	3.6 ± 1.1	2.7 ± 1.5	0.9 ± 0.3

#### 8.4 Composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos

Se analizó la composición de ácidos grasos de membranas de eritrocitos con la finalidad de observar si hay cambios entre los diferentes grupos de animales inducidos con STZ y no inducidos (control), suplementados y no suplementados con omega (3, 6 ó 9), que ocurren durante el crecimiento de los animales así como con el desarrollo de la diabetes.

En la tabla 6 se puede ver la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos de ratas al mes de edad. Ocurrieron cambios durante el tiempo experimental, en la concentración del ácido linoleico y araquidónico que son mayores en el grupo control con respecto al grupo inducido a DMT2; estos cambios probablemente estén influenciados por la diabetes generada en este modelo. Es interesante ver que pese a tratarse de una hiperglicemia ligera la que se indujo en los grupos con STZ, los efectos se dejan ver en el cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados (I/S), el cual se ha visto que es un índice directamente relacionado con la fluidez membranal, así que dichos cambios apuntan a que hubo una disminución en la fluidez membranal de los eritrocitos de las ratas inducidas a diabetes con STZ en aproximadamente un 22% en promedio, aunque no tuvo diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos.

**Tabla 6.** Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 1 mes de edad. Grupos control y diabéticos (STZ)

Ácido graso	Control		STZ	
Mirístico	0.7	± 0.3	1.3	± 0.2
Miristoleico	0.4	± 0.1	0.6	± 0.1
Palmítico	41.4	± 3.6	47.7	± 3.2
Palmitoleico	1.9	± 1.2	4.2	± 2.1
Esteárico	23.3	± 5.4	21.4	± 2.1
Oleico	6.9	± 1.9	5.5	± 2.5
Linoleico	4.3	± 3.5	1.9	± 0.6
$\gamma$ -Linolénico	2.1	± 0.4	2.7	± 0.5
$\alpha$ -Linolénico	0.4	± 0.3	0.3	± 0.0
Araquidónico	15.9	± 1.8	10.3	± 3.0
EPA	1.3	± 1.0	1.3	± 0.3
DHA	0.7	± 0.3	0.9	± 0.4
NI	2.5	± 1.0	2.7	± 0.5
I/S	0.50	± 0.14	0.39	± 0.09

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificados; I/S: cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados.

En la tabla 7 mostramos los resultados de los grupos control con y sin suplementos de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9 a los 3 meses de edad. La composición de ácidos grasos saturados e insaturados es similar, los cambios son mínimos, sin embargo el cociente de I/S nos muestra que los suplementos de omega 3, 6 ó 9 son diferentes con respecto al grupo control sin suplemento, aumentando la concentración de insaturados, lo cual implica aumento en la fluidez de la membrana.

La composición de ácidos grasos del grupo STZ de 3 meses de edad (tabla 8) tiene un cociente de I/S mayor que el de 1 mes de edad (tabla 6), lo cual indica que a los 3 meses de edad del grupo inducido a DMT2, las membranas de fantasmas de eritrocitos están más fluidas que al mes de edad. Del mismo modo encontramos que a los 3 meses de edad el grupo STZ tiene un cociente de I/S mayor que el grupo control a la misma edad. Estos resultados son atribuibles al modelo de hiperglicemia ligera ya que a edades tempranas, apenas inicia el desarrollo de la enfermedad.

Los grupos inducidos a DMT2 suplementados con los diferentes omega (3, 6 ó 9) tienen cocientes de I/S similares con diferencias mínimas de 20%, lo cual indica que las membranas se mantienen fluidas a los 3 meses de edad.

En la tabla 9 mostramos los resultados de la composición de ácidos grasos de los grupos control con y sin suplementos a los 6 meses de edad, los cocientes de I/S de los grupos suplementados con  $\omega$  3 y  $\omega$  6 respectivamente se mantienen igual que el grupo control sin suplemento. Sin embargo el grupo suplementado con  $\omega$  9 disminuye la fluidez que tenía a los 3 meses de edad un 45 %. Los grupos diabéticos de 6 meses de edad (tabla 10) nuevamente tienen cambios en cuanto a la composición de ácidos grasos, de acuerdo a la información que nos brinda el cociente de I/S disminuyendo 50% lo que indica que las membranas son menos fluidas. Sin embargo, el grupo STZ suplementado con  $\omega$  6, es el único que no cambia con el paso del tiempo experimental.

**Tabla 7.** Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 meses de edad. Grupos control suplementados y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9).

Ácido graso	Control	Control ω 3	Control ω 6	Control ω 9
Mirístico	0.7 ± 0.4	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1
Miristoleico	0.5 ± 0.4	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1
Palmítico	41.3 ± 3.7	32.6 ± 4.1	36.0 ± 1.5	36.9 ± 3.8
Palmitoleico	2.7 ± 1.6	2.5 ± 0.7	2.7 ± 1.8	2.7 ± 0.6
Estearico	22.4 ± 6.3	23.8 ± 4.0	17.7 ± 3.2	20.7 ± 2.3
Oleico	7.2 ± 3.4	11.5 ± 2.0	11.8 ± 6.1	12.2 ± 2.8
Linoleico	4.7 ± 5.1	5.8 ± 4.1	5.4 ± 0.9	4.3 ± 2.4
γ-Linolénico	3.5 ± 4.4	1.4 ± 0.9	3.7 ± 3.5	0.4 ± 0.0
α-Linolénico	0.6 ± 0.3	0.1 ± 0.1	0.5 ± 0.8	0.2 ± 0.1
Araquidónico	17.9 ± 6.7	17.3 ± 3.0	14.2 ± 5.9	17.4 ± 6.9
EPA	2.5 ± 1.0	0.6 ± 0.3	3.1 ± 3.7	1.4 ± 1.2
DHA	1.0 ± 0.8	1.3 ± 0.5	2.3 ± 2.0	0.9 ± 0.8
NI	1.9 ± 1.0	3.3 ± 0.3	2.9 ± 0.8	3.0 ± 0.6
<b>I/S</b>	<b>0.54 ± 0.18</b>	<b>0.72 ± 0.19</b>	<b>0.81 ± 0.15</b>	<b>0.68 ± 0.06</b>

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificados; I/S: cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados.

**Tabla 8.** Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 meses de edad. Grupos inducidos con STZ suplementados y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9).

Ácido graso	STZ	STZ ω 3	STZ ω 6	STZ ω 9
Mirístico	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.04	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.4
Miristoleico	0.2 ± 0.2	0.1 ± 0.03	0.1 ± 0.03	2.0 ± 1.2
Palmítico	35.6 ± 2.4	34.8 ± 1.6	27.1 ± 6.1	41.1 ± 4.0
Palmitoleico	2.0 ± 0.8	2.3 ± 0.8	1.6 ± 0.1	2.8 ± 1.4
Esteárico	20.8 ± 2.8	20.5 ± 1.2	21.2 ± 15.2	22.0 ± 1.9
Oleico	9.9 ± 2.5	7.9 ± 1.7	10.0 ± 3.1	9.1 ± 3.5
Linoleico	4.8 ± 2.7	5.4 ± 0.8	10.8 ± 2.4	2.5 ± 1.3
γ-Linolénico	0.9 ± 0.4	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.05	1.4 ± 0.8
α-Linolénico	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.02	0.4 ± 0.3
Araquidónico	21.2 ± 5.3	23.0 ± 1.3	23.6 ± 4.6	12.9 ± 1.6
EPA	0.4 ± 0.3	1.2 ± 1.3	0.7 ± 0.5	1.6 ± 1.1
DHA	0.4 ± 0.2	1.1 ± 0.6	1.2 ± 0.9	1.9 ± 1.1
NI	3.5 ± 1.1	3.1 ± 0.9	4.3 ± 2.8	3.4 ± 0.7
<b>I/S</b>	<b>0.70 ± 0.12</b>	<b>0.74 ± 0.04</b>	<b>1.02 ± 0.29</b>	<b>0.57 ± 0.09</b>

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificados; I/S: cociente de insaturados sobre saturados.

**Tabla 9.** Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 6 meses de edad. Grupos control suplementados y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9).

Ácido graso	Control	Control ω 3	Control ω 6	Control ω 9
Mirístico	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Miristoleico	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.1
Palmítico	40.6 ± 4.8	37.1 ± 7.5	36.7 ± 3.0	38.4 ± 4.9
Palmitoleico	1.7 ± 0.6	1.6 ± 1.1	2.4 ± 1.7	3.4 ± 2.4
Estearico	24.2 ± 5.6	23.2 ± 5.6	26.3 ± 5.7	28.8 ± 9.0
Oleico	8.3 ± 1.9	7.4 ± 2.6	7.8 ± 1.2	7.9 ± 4.3
Linoleico	5.0 ± 3.7	5.0 ± 4.0	4.0 ± 3.7	5.3 ± 4.8
γ-Linolénico	0.9 ± 0.3	1.7 ± 0.1	0.1 ± 0.03	0.3 ± 0.0
α-Linolénico	ND	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.2	ND
Araquidónico	13.1 ± 5.9	18.0 ± 8.4	16.0 ± 6.0	10.4 ± 5.8
EPA	1.9 ± 4.2	0.9 ± 0.6	1.4 ± 1.4	1.6 ± 1.1
DHA	1.9 ± 0.8	2.0 ± 1.4	1.1 ± 0.9	1.3 ± 1.1
NI	3.2 ± 0.7	3.9 ± 0.4	3.9 ± 0.5	2.7 ± 0.9
<b>I/S</b>	<b>0.52 ± 0.23</b>	<b>0.65 ± 0.33</b>	<b>0.54 ± 0.20</b>	<b>0.37 ± 0.13</b>

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificados; I/S: cociente de insaturados sobre saturados, ND: No Determinado.

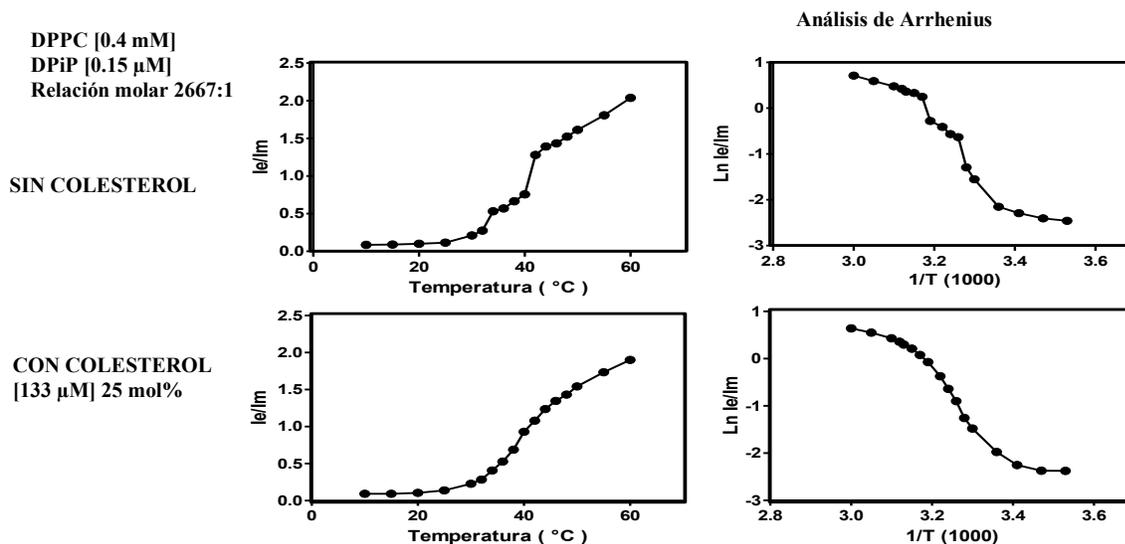
**Tabla 10.** Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de ratas de 6 meses de edad. Grupos inducidos con STZ suplementados y no suplementados con ácidos grasos omega (3, 6 ó 9).

Ácido graso	STZ	STZ ω 3	STZ ω 6	STZ ω 9
Mirístico	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3
Miristoleico	ND	ND	0.2 ± 0.0	ND ±
Palmítico	44.8 ± 8.9	36.3 ± 3.8	30.6 ± 2.6	39.7 ± 1.6
Palmitoleico	1.5 ± 1.4	1.1 ± 0.9	1.5 ± 0.9	0.5 ± 0.4
Estearico	29.5 ± 11.4	25.1 ± 6.8	19.0 ± 7.3	32.3 ± 4.6
Oleico	5.9 ± 2.2	8.6 ± 2.4	8.5 ± 2.3	7.4 ± 2.3
Linoleico	2.3 ± 1.1	5.8 ± 3.6	9.5 ± 4.0	4.8 ± 3.3
γ-Linolénico	0.6 ± 0.0	ND	ND	ND
α-Linolénico	ND	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0
Araquidónico	8.4 ± 6.3	17.3 ± 5.3	25.1 ± 3.8	12.8 ± 2.9
EPA	2.7 ± 2.2	1.1 ± 0.6	0.5 ± 0.3	1.2 ± 1.0
DHA	1.9 ± 1.6	0.5 ± 0.5	1.5 ± 0.8	1.4 ± 1.0
NI	3.4 ± 1.3	3.0 ± 0.7	2.9 ± 0.6	3.2 ± 0.4
I/S	0.23 ± 0.09	0.35 ± 0.11	0.98 ± 0.35	0.36 ± 0.10

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificados; I/S: cociente de insaturados sobre saturados, ND: No Determinado.

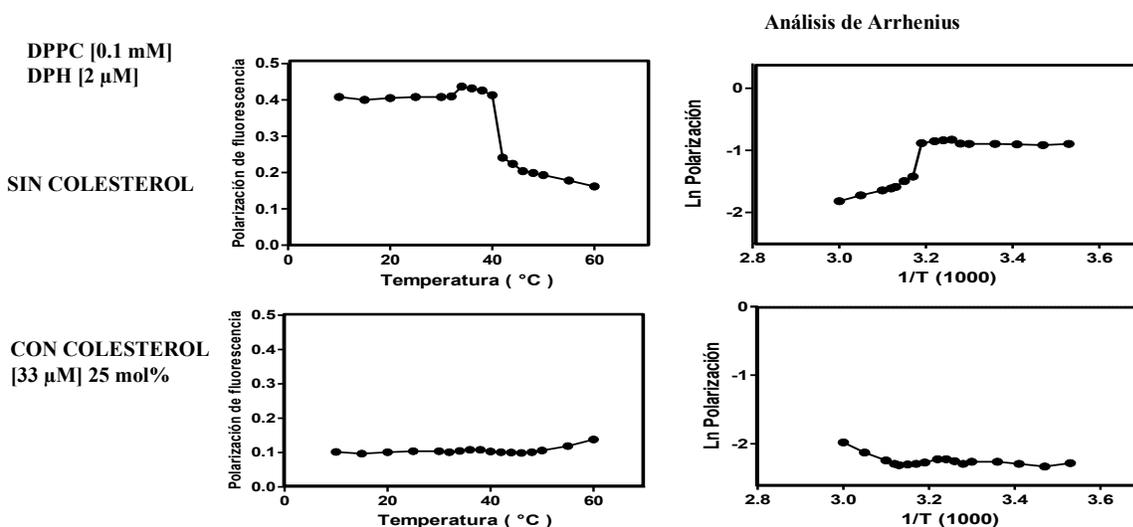
### 8.5 Fluidez membranal (liposomas de DPPC como modelo de membranas)

Para estudiar la fluidez de las membranas biológicas, en este trabajo decidimos hacer uso de varios monitores fluorescentes de fluidez membranal. Para evaluar la confiabilidad de cada uno de estos monitores, se utilizaron liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), la cual se conoce que tiene una temperatura de transición de fase de  $41^{\circ}\text{C}$  para pasar de fase gel a líquido cristalino y que la presencia de colesterol (en una relación molar cercana a 1 con los fosfolípidos) puede abatir dicha transición de fase. Así, en la Fig 25 se presentan las emisiones de fluorescencia de excímero/monómero ( $I_e/I_m$ ) del dipirenilpropano (DPiP) en liposomas de DPPC sin y con colesterol (25 mol%) y sus respectivos gráficos de Arrhenius. Claramente se demuestra que este monitor puede detectar la transición de fase de los liposomas de DPPC, e incluso las conocidas pretransiciones del DPPC, en ausencia de colesterol, así como el abatimiento de la misma en presencia de 25 mol% de colesterol. Lo anterior demuestra que este monitor parece ser confiable para medir la fluidez de membranas biológicas.



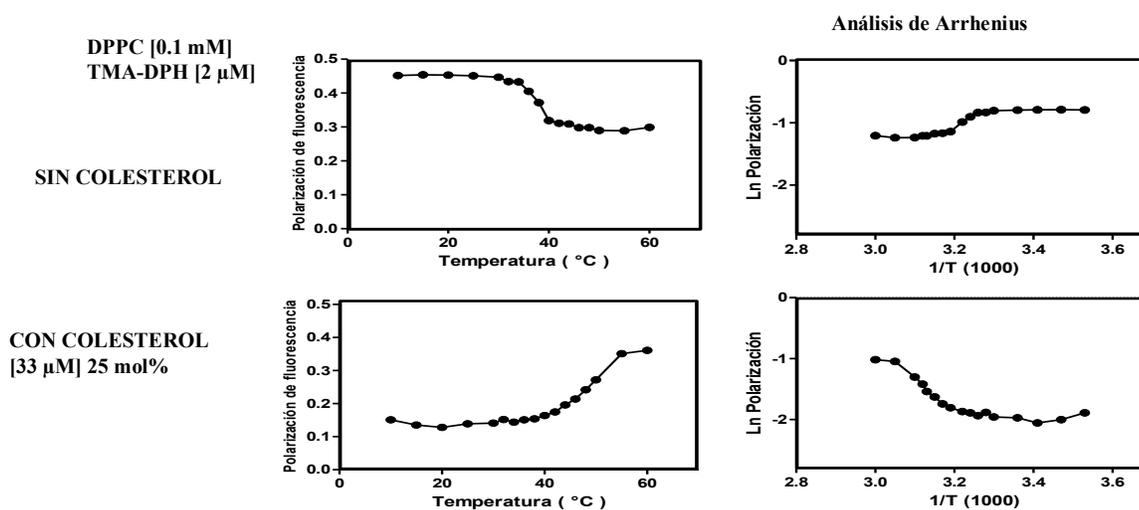
**Figura 25.** Fluidez membranal de liposomas de DPPC con el monitor DPiP en presencia y ausencia de colesterol.

En la figura 26 tenemos el análisis de Arrhenius aplicado al modelo de liposoma DPPC en presencia y ausencia de colesterol (25 mol%), con el monitor difenilhexatrieno (DPH) el cual se basa en la polarización de fluorescencia. Estos resultados nos muestran que el monitor es consistente con la ubicación propuesta, se ubica preferencialmente en el núcleo de la bicapa como lo cita la literatura y que la presencia de colesterol también abate la transición de fase que se había detectado, al aumentar la temperatura, haciendo imperceptibles los cambios de estado de gel a liquido cristalino.



**Figura 26.** Fluidez membranal de liposomas de DPPC con el monitor DPH en presencia y ausencia de colesterol.

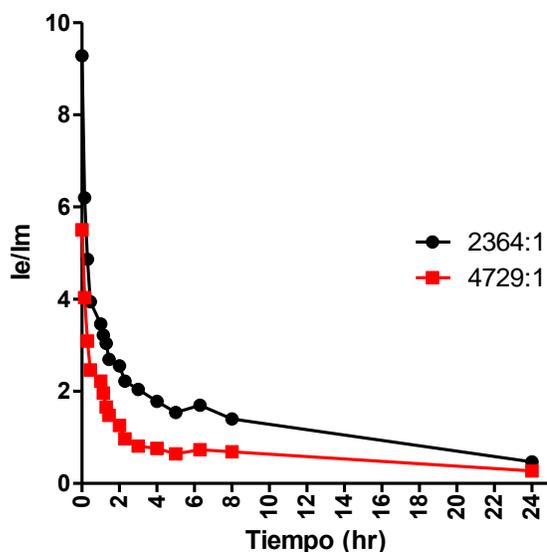
En la figura 27 se presenta la polarización de fluorescencia del Trimetil Amino difenilhexatrieno (TMA-DPH), un monitor que se ubica preferencialmente en la interfase de la bicapa. Se puede observar que el TMA-DPH también detecta la transición de fase gel a líquido cristalino, pero a diferencia del DPH, en presencia de colesterol aún detecta cambios en las membranas, lo cual es consistente con la localización del colesterol en cada monocapa. Así, contamos con tres monitores que nos proporcionan información de diferentes profundidades de la membrana celular.



**Figura 27.** Fluidez membranal de liposomas de DPPC con el monitor TMA-DPH en presencia y ausencia de colesterol.

## 8.6 Cinética de incorporación DPiP en fantasmas de eritrocitos

Como las membranas biológicas no se pueden sonicar si se desea conservar su estructura nativa, se realizó una cinética de incorporación del monitor fluorescente dipirenilpropano (DPiP) a dos diferentes concentraciones en una solución de membranas de fantasmas de eritrocitos registrando la incorporación a 10°C durante 24 horas, para determinar cuál sería la relación molar ideal entre fluoróforo y fosfolípido ideal para minimizar la formación de excímeros intermoleculares y garantizar que el monitor esté lo suficientemente incorporado y distribuido entre las membranas para la medición de fluidez. En la figura 28 podemos observar que a partir de las emisiones de excímero ( $I_e$ ) y monómero ( $I_m$ ) del monitor, se obtuvo el cociente  $I_e/I_m$  que normalmente refleja de manera directa la fluidez de las membranas, pero en los tiempos iniciales de su incorporación a las membranas, en realidad refleja el proceso monomerización del monitor y la llegada de  $I_e/I_m$  a valores asintóticos indica la distribución uniforme del monitor en las membranas disminuyendo la probabilidad de formación de excímeros intermoleculares a sólo excímeros intramoleculares. En este experimento los cocientes de  $I_e/I_m$  registrados durante la cinética son mayores al inicio; se puede observar que entre mayor sea la relación de fosfolípidos a monitor, más rápida es la incorporación. Así, la relación molar de fosfolípidos a DPiP (4729:1) alcanzó un valor asintótico desde las 5 horas de incubación. Es importante mencionar que gracias a la eficiencia cuántica del DPiP es posible utilizar proporciones molares tan bajas y aún tener lecturas detectables y reproducibles como las que aquí se utilizaron. Además, estas relaciones molares nos permitieron minimizar la posible formación de excímeros intermoleculares.



**Figura 28.** Cinética de incorporación de DPiP en membranas de fantasmas de eritrocitos.

### 8.7 Fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos

Para saber si ocurren cambios en la fluidez de las membranas durante el desarrollo de la diabetes, así como con la administración de suplementos omega (3, 6 ó 9) en ratas diabéticas y no diabéticas, se utilizaron 3 diferentes monitores fluorescentes que se ubican en diferentes regiones de la membrana, lo cual nos revela un campo más amplio de lo que ocurre a diferentes profundidades de la membrana. Los eritrocitos no cuentan con organelos, lo que nos garantiza que las mediciones de fluidez membranal correspondan sólo a la membrana plasmática.

El DPiP es una molécula hidrofóbica que se ubica preferentemente en la parte intermedia de la monocapa, el DPH el cual se ubica preferentemente en el núcleo de la bicapa y el TMA-DPH se ancla en la interfase membranal.

Los fantasmas de eritrocitos, con los monitores DPiP, DPH y TMA-DPH, fueron sometidos a un barrido de temperatura desde los 10 ° C hasta los 55 ° C. En general, se conoce que las membranas biológicas tienen transiciones de fase y que dichas características son dependientes de su estructura química. En este trabajo se analizó a las membranas de eritrocitos y sus características termotrópicas. Para realizar la caracterización termotrópica, se utilizaron varios monitores y la información obtenida se analizó mediante gráficos de Arrhenius con los que se pudo calcular las energías de activación (Ea) en cada una de las fases de la membrana, así como sus temperaturas de transición de fases, los cuales están representados por los puntos de inflexión de los gráficos. En los gráficos se pueden distinguir varios puntos de inflexión.

**Tabla 11.** Energías de activación en membranas de fantasmas de eritrocitos de ratas de 1, 3 y 6 meses de edad, controles y diabéticas (STZ), sin ningún tratamiento de ácidos grasos omega, con diferentes monitores.

		Energía de Activación (KJ/mol)					
Edad (meses)		1		3		6	
DPiP		Control	STZ	Control	STZ	Control	STZ
			20.5	5.7	40.3	9.5	12.7
		9.8	1.9	18.9	11.2	12.0	12.4
DPH		2.5	2.3	4.6	2.2	3.1	2.3
TMA-DPH		1.8	1.5	44.1	1.3	1.6	4.8

← G

← L.Q

En la tabla 11 podemos observar las energías de activación ( $E_a$ ) obtenidas mediante el gráfico de Arrhenius para cada uno de los monitores fluorescentes (DPiP, DPH y TMA-DPH). Al parecer, el monitor más sensible o que presenta los mayores cambios en las  $E_a$  por la transición (gel (G) a líquido cristal (L.Q)), fue el DPiP debido a su ubicación intermedia entre el núcleo de la bicapa y la interfase, donde aparentemente ocurre la mayor modificación membranal. Sin embargo el DPH y el TMA-DPH, también proporcionan información sobre la región de la membrana donde estos se ubican aunque no encontramos transiciones de fases que nos indiquen que sean sensibles a estos cambios en la membrana, o que los cambios en esas regiones son menores. Las  $E_a$  reportadas en las diferentes edades sugieren cambios importantes en las membranas durante el desarrollo de la diabetes en el caso de las ratas inducidas con STZ y en el grupo control.

En la Tabla 12 se muestran las energías de activación ( $E_a$ ) de los tres monitores de fluidez membranal usados en fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 y 6 meses de edad que fueron suplementadas con ácidos grasos omega-3. Es interesante hacer notar de nuevo que de los tres monitores, sólo el DPiP nos permitió detectar transiciones de fase; el DPH y el TMA-DPH mostraron una sola tendencia en el análisis termotrópico. Por otro lado, la Tabla 12 muestra que la energía de activación del DPiP es mayor a los 6 meses de edad, tanto en controles como en inducidas con STZ, lo cual nos hace pensar en que eso es derivado del tratamiento con los ácidos grasos omega-3 y de alguna manera homogeniza el comportamiento de las membranas de los dos grupos.

**Tabla 12.** Energías de activación en membranas de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 y 6 meses de edad, controles e inducidas con STZ, suplementadas con ácidos grasos omega 3. Con diferentes monitores.

Energía de Activación (KJ/mol) $\omega$ 3					
Edad (meses)	3		6		
	Control	STZ	Control	STZ	
DPiP	11.6	8.8	20.7	20.1	← G
	8.9	5.5	14.1	13.3	← L.Q
DPH	2.1	2.4	2.3	2.3	
TMA-DPH	13.5	8.9	7.2	1.6	

En las Tablas 13 y 14 se presentan las energías de activación de los tres monitores en fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 o 6 meses de edad que fueron suplementadas con ácidos grasos omega-6 (Tabla 13) o con omega-9 (Tabla 14). Al igual que en las dos tablas anteriores (11 y 12), el único monitor que detecta dos fases es el DPiP. A diferencia de lo que se encontró en los grupos suplementados con ácidos grasos omega-3 con DPiP, con omega 6 (Tabla 13) no se aprecia un aumento en la energía de activación de los 3 a los 6 meses de edad, sino una disminución en el grupo control y casi sin cambio en el grupo con STZ. Con los otros monitores también se observa un comportamiento errático de las energías de activación, es decir, no se muestra una clara tendencia de los datos. Lo anterior nos indica que hay que aumentar el número de experimentos para clarificar estos datos. En el caso de los omega-9 (Tabla 14), tampoco se presenta una clara tendencia de los datos y es conveniente seguir la misma política que para los anteriores, es decir, aumentar el número de repeticiones experimentales.

**Tabla 13.** Energías de activación en membranas de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 y 6 meses de edad suplementadas con ácidos grasos omega 6. Con diferentes monitores.

Energía de Activación (KJ/mol) ω 6					
Edad (meses)	3		6		
	Control	STZ	Control	STZ	
DPiP	10.47	12.06	2.27	15.8	← G ← L.Q
	8.76	8.37	1.57	11.9	
DP H	2.33	1.45	4.32	2.3	
TMA-DPH	2.27	1.05	1.24	8.2	

**Tabla 14.** Energías de activación en membranas de fantasmas de eritrocitos de ratas de 3 y 6 meses de edad suplementadas con ácidos grasos omega 9. Con diferentes monitores.

Energía de Activación (KJ/mol) $\omega$ 9					
Edad (meses)	3		6		
	Control	STZ	Control	STZ	
DPIP	8.11	7.4	3.03	18.4	← G
	10.28	8.95	8.02	11.1	
DPH	2.7	2.55	2.32	2.27	
TMA-DPH	17.3	0.93	10.8	1.9	

## 9 DISCUSIÓN

### 9.1 Desarrollo del modelo experimental

#### 9.1.1 Caracterización del modelo (grupos control)

El uso de la estreptozotocina (STZ) para la inducción a diabetes está ampliamente estudiado en modelos biológicos como la rata. De acuerdo a las características del modelo deseado será el esquema de inducción a seguir; es así que, dependiendo de las características de la cepa, la edad, el género, la etapa fisiológica de los animales y la dosis de STZ, así como la vía de administración, se obtendrán distintos modelos que varían no sólo en las concentraciones de glicemia generadas, sino también en los resultados de las investigaciones que se estén desarrollando (Shafrir, 2007).

En el presente estudio se siguió el esquema de utilización de la toxina a dosis de 125 mg/kg de peso, a los dos días de edad, ya que en estudios realizados por nuestro grupo de investigación; y documentados en la bibliografía, se demuestra que a esta dosis y edad de inducción se tienen hiperglicemias de entre 130 y 160 mg/dl, consideradas como ligeras, además de una marcada intolerancia a la glucosa y dislipidemias casi inaparentes, similares con el periodo del inicio de la diabetes tipo 2 en humanos (Figuroa, 2015a; Pérez-Hernández, 2011; Orozco, 2008).

### 9.2 Etapa de lactancia

En los datos obtenidos durante la etapa de lactancia en los grupos control y grupos diabéticos se observó un incremento de 4 veces ( $p < 0.05$ ) la concentración de glucosa sanguínea en los animales diabéticos (468 mg/dL) entre los 5 y 7 días de edad (figura 6), este incremento está asociado a la administración de la STZ, la cual actúa específicamente sobre las células  $\beta$  del páncreas, utilizando el GLUT 2 para transportarse al interior de la célula; causando daño a través de los mecanismos de polirribosilación del DNA y la generación de radicales en la vía xantina-oxidasa (González, 2002). El daño causado es tan severo que provoca la muerte celular generando una deficiencia en la síntesis de insulina y con ello una hiperglicemia, marcada y crónica, en este periodo (Wang et al., 1994). Sin embargo, pasada esta etapa las concentraciones de glucosa en sangre tienden a regresar a estados basales (130 mg/dl), este fenómeno se debe a

que en animales neonatos el páncreas tiene la capacidad de regenerar y/o diferenciar parcialmente la población de células  $\beta$ , lo que resulta en un animal adulto con hipoinsulinemia e hiperglicemias moderadas (Bonner-Weir et al., 1981).

De los 12 a los 30 días de edad no se encontró diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones de glucosa en sangre entre el grupo control y el diabético. Cabe mencionar que durante la lactancia, en ratas, se presenta un estado de homeorresis característico, por lo que las concentraciones de glucosa tanto en animales normales como diabéticos se encuentran por arriba de los 100 mg/dl; concentración considerada como normal en la etapa adulta. Es importante señalar que los neonatos de ratas presentan hipoglicemia las primeras 24 a 48 horas de vida; por lo que el incremento del valor de glucosa sanguínea en la etapa de lactación (figura 6 A) del grupo control está asociado a los sistemas de adecuación metabólica en esta etapa.

Respecto al peso de los animales durante la etapa de lactancia (figura 6 B) podemos observar que el incremento en la ganancia diaria de peso es menor en los animales del grupo diabético con una diferencia de 4 gramos al inicio del estudio y de hasta 46 gramos al final de este periodo. Este efecto; que se puede asociar a un proceso de desnutrición marcado en los animales diabéticos, es importante ya que la mayoría de los órganos y tejidos terminan su proceso de maduración y/o desarrollo en esta etapa, además de que la malnutrición es uno de los factores asociados el desarrollo de patologías de origen metabólico en la edad adulta (Becerra, 1999).

### **9.3 Etapa de crecimiento**

Durante este periodo que va de las 4 a las 24 semanas de edad, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo normoglicémico y el diabético en cuanto a la ganancia de peso corporal. Sin embargo, podemos observar una clara diferencia matemática a lo largo del tiempo; donde el grupo diabético tiene una mayor (5 al 35%) concentración de glucosa en sangre, arriba del 90% de todo el tiempo experimental respecto a su control (figura 11 y 12), este comportamiento es el que se reporta en la mayoría de los estudios con ratas inducidas a diabetes tipo 2 con STZ (Pérez-Hernández, 2011; Orozco, 2008) y es también el comportamiento encontrado en pacientes con el síndrome en los primeros estadios de este o al establecimiento del padecimiento de acuerdo a lo descrito en la historia natural de la enfermedad.

Este fenómeno se debe a que las concentraciones de glucosa sanguínea se comportan de forma normal dentro de rangos de hasta  $\pm 25\%$  a lo largo de la vida de los individuos, es por ello que aún en el grupo normoglicémico podemos observar concentraciones de hasta 125 mg/dl. Sin embargo la tendencia de los datos en el grupo normoglicémico es a disminuir (10 y 25%) conforme incrementa el tiempo, contrario a lo que sucede en el grupo diabético. Otra explicación probable respecto a la concentración de glucosa sanguínea elevada en las primeras semanas de estudio en el grupo normal es que al inicio del tratamiento los animales no están familiarizados con prácticas de manejo, lo que podría estar afectando la liberación de catecolaminas, moléculas descritas como hiperglucemiantes, por su acción sobre las células hepáticas y del músculo esquelético, que promueven la degradación de glucógeno en situaciones de estrés incrementando la concentración de glucosa sanguínea.

Uno de los parámetros afectados durante la diabetes es el peso corporal debido a que los aportes de glucosa a las células dependientes de insulina son insuficientes y en ocasiones nulos debido a lo cual la célula tiene que instrumentar mecanismos que le permitan sobrevivir en estas condiciones. Al analizar las curvas de crecimiento de los animales en estudio se observó una menor ganancia de peso en los animales diabéticos. La literatura señala que los pacientes, previo al desarrollo de la DMT2, cursan con síndrome metabólico caracterizado por sobrepeso, intolerancia a la glucosa y alteración del metabolismo de los lípidos; sin embargo ya establecida la enfermedad los pacientes presentan pérdida progresiva de peso corporal (Drukker and Pogorelova, 1996). En el presente estudio se puede observar en la figura 8 y 9, que el efecto de la diabetes sobre esta variable (pobre ganancia de peso) concuerda con los datos reportados en la literatura, donde se han realizado estudios para evaluar el efecto de ciertos fármacos sobre la concentración de la glucosa en sangre y ganancia de peso corporal en ratas (Li et al., 2015). Se debe considerar que en este estudio los animales utilizados se encuentran en la etapa de desarrollo, donde la demanda energética es mayor. Esta pobre ganancia de peso en los animales del grupo diabético puede definirse como deficiente nutrición celular con un balance energético negativo ocasionado por el ineficiente aporte de glucosa y con una disminución de las reservas proteicas de la masa muscular, debido a la utilización de estas como fuente energética, teniendo como resultado el aumento en el catabolismo y un bajo anabolismo (Muoio and Newgard, 2008; Stumvoll et al., 2005). Los cambios derivados del catabolismo bajo las condiciones del estudio en

estos animales, es el observado en la mayoría de los pacientes diabéticos mismo que se traduce en bajo peso corporal o disminución del mismo, a lo largo del desarrollo de la patología (Fujii et al., 2010).

Otro de los parámetros evaluados durante el establecimiento de la diabetes tipo 2 es la dislipidemia; la cual implica el incremento de la concentración de triglicéridos, colesterol y la alteración de las lipoproteínas de baja y alta densidad en sangre. Debemos recordar que la concentración de glucosa sanguínea está en íntima relación con el metabolismo de los lípidos, por lo que las variaciones en las concentraciones de colesterol y triglicéridos en sangre son uno de los principales factores estudiados como posible causa de las patologías de tipo metabólico (Mensink et al., 2003).

Respecto a la concentración de triglicéridos se encontró que existe diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo diabético y el normoglicémico de las 16 a las 24 semanas, donde la concentración de estas moléculas es mayor hasta 2.4 veces en los animales del grupo diabético. Estos datos coinciden con los reportados en la literatura y hacen evidente la alteración en el metabolismo de los carbohidratos. Por otro lado las concentraciones de colesterol, en las cuales no se encontró diferencia estadísticamente significativa y se mantienen en rangos normales en ambos grupos a lo largo del tiempo hacen evidente el incipiente síndrome en estos animales. Más aun, en los resultados del análisis de la insulina se observa una concentración 3 veces menor en los animales diabéticos, dicha disminución concuerda con la mayor concentración de glucosa y triglicéridos en sangre (Damas et al., 2001; Havel et al., 1998, 2000).

La literatura señala que la concentración de glucosa normal en ratas se encuentra entre 80 a 100 mg/dl semejante a los valores reportados en la mayoría de los mamíferos incluyendo a los humanos (Goñi Avelina Caridad et al.; Poveda et al., 2008; Olivares Reyes and Arellano Plancarte, 2008). En el presente estudio durante la etapa adulta se observa una mayor (5 a 35 %) concentración de la glucosa sanguínea en los animales del grupo diabético (de 115 a 160 mg/dL). Los valores promedio en ratas con DMT2 registrados por diversos autores van de 6.6 a 19.4 mmol/l, dependiendo del manejo nutricional y estado fisiológico de los animales. En humanos, una concentración de glucosa sanguínea mayor a 6.1 mmol/l es un indicador del inadecuado uso

de la insulina y se consideran como pacientes pre-diabéticos a los cuales hay que realizar prueba de tolerancia a la glucosa para confirmar o descartar DMT2 (Poveda et al., 2008).

La diabetes mellitus tipo 2 se diagnostica por la presencia de los signos y síntomas clásicos y elevada glucemia; por altas concentraciones plasmáticas de glucosa en ayunas o por la elevación de la glucemia dos horas después de la administración de 75 g de glucosa vía oral. La mayoría de los diagnósticos se establecen en pacientes con sintomatología, la ADA especifica que en estos individuos sólo se necesita una glicemia mayor a 6.1 mmol/l en ayuno de 8 horas, o de 11.1 mmol/l en forma aleatoria, para su confirmación y la OMS da como positivos a aquellos pacientes que en forma repetida dan como resultado una concentración de glucosa sanguínea mayor a 6.1 mmol/l en ayuno de 8 horas (ADA, 2011). Al analizar los datos obtenidos tanto de la curva de tolerancia a la glucosa (CTG) como la curva de glucosa en ayuno (CGA) y la concentración de insulina de los animales en estudio se advierte una desregulación del metabolismo de los carbohidratos por la deficiente concentración de insulina. A pesar de que los mamíferos experimentan períodos de ayuno y de alimentación (estado postprandial), la variación de la glucosa plasmática se mantiene en un intervalo estrecho entre 4 y 7 mM en individuos normales. Este intervalo tan estricto y constante se encuentra bajo el control y equilibrio entre la absorción de glucosa desde el intestino, la producción de glucosa hepática y su absorción y metabolismo en los tejidos periféricos y está regulado de manera directa por dos hormonas, la insulina y el glucagón (Bastarrachea et al., 2005). Una de las principales características de los primeros estadios de este síndrome en humanos son las hiperglicemias moderadas que suelen pasar inadvertidas, siendo así que el diagnóstico se realiza hasta 10 años después de iniciado el problema. Un inadecuado diagnóstico puede surgir del periodo de ayuno al que se somete a los animales; si bien lo recomendado en pacientes humanos es de 8 horas, la curva de ayuno realizada a los animales en experimentación sugiere que este tiempo es inadecuado en estos animales, ya que a las 4 horas (figura 14) las concentraciones de glucosa en sangre son reportados como normales (90 a 100 mg/dl) en los individuos no inducidos a diabetes y tiende a incrementar hasta un 25% a partir de las 5 y hasta las 8 horas en el 80 % de los individuos, con lo cual se puede estar diagnosticando hiperglicemia en individuos normoglicémicos. Por otro lado la CGA de los animales del grupo diabético se observó el mismo efecto, pero con una disminución de los valores en ocasiones por debajo de los normales, lo que pone en riesgo la vida de los individuos.

La evidencia de los resultados obtenidos en la CGA son comprobables con los resultados de la CTG en la cual individuos que a las 8 semanas de edad parecieran hiperglicémicos muestran una curva de tolerancia a la glucosa normal; esto es, la disminución de la concentración de glucosa en sangre o recuperación de los valores normales suele ser entre los 30 y 60 minutos después de la descarga de sacarosa en el 100 % de los animales del grupo control, mientras que en el grupo de los animales diabéticos la normalización de la concentración de glucosa se observa después de los 120 minutos dando positivo a intolerancia a la glucosa. Tanto en humanos como en ratas un incremento prolongado (> 120 minutos) de la glicemia en la CTG corresponde a una tolerancia alterada de la glucosa y es utilizada junto con otros parámetros como: hiperglucemia en ayunas, dislipidemia, sintomatología e hiper o hipoinsulinemia en el diagnóstico de diabetes tipo 2 (Ernsberger et al., 1999). La CTG se realizó una vez al mes durante el estudio con la finalidad de comprobar que los resultados no se deben a factores de tipo ambiental como son alimentación, clima o manejo. Se observó que el comportamiento de los valores de glicemia tanto en el grupo control como el inducido a diabetes, son constantes tanto en la CGA como en la CTG a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo reportado por (Figuroa, 2015b) quienes caracterizan la concentración de glucosa en sangre en machos a lo largo de 6 meses con la finalidad de estandarizar el tiempo de ayuno adecuado en ratas.

Existen tres características constantes en la diabetes tipo 2: resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos (músculo, tejido adiposo y especialmente hígado); misma que podemos corroborar con la pobre ganancia de peso en el grupo indicado a diabetes, secreción alterada de la insulina en respuesta al estímulo de glucosa; que en nuestro estudio se muestra como menor concentración en comparación con los animales normoglicémicos y aumento en la producción de glucosa hepática; concentraciones de glucosa más altas (Lillioja et al., 1988).

Las pruebas realizadas en el presente trabajo para el diagnóstico de diabetes tipo 2 como son CTA, CTG, triglicéridos y colesterol muestran una ineficiente síntesis y utilización de la insulina, misma que se comprobó con el análisis de la hormona en el suero de los animales. La resistencia periférica a la insulina se presenta con una fase preclínica (en estadio de tolerancia alterada a la glucosa), además de una elevación moderada de la concentración de glucosa en

sangre y elevadas concentraciones de colesterol y triacilglicéridos (Pratley et al., 2003; Saad et al., 1991).

#### **9.4 Metabolismo de carbohidratos durante la etapa de crecimiento con tratamiento de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9.**

Los beneficios que aportan a la salud los ácidos grasos poliinsaturados omega 3,6 ó 9 están ampliamente documentados en la literatura y su consumo es recomendado por médicos y nutriólogos en todo el mundo. Además de lo anterior existen reportes de que estos lípidos contribuyen a la regulación de la glicemia en pacientes diabéticos; sin embargo los mecanismos a través de los cuales previenen el aumento de la concentración de glucosa no están claramente dilucidados.

En el presente estudio se evaluó el metabolismo de los carbohidratos en ratas normoglicémicas y con diabetes tipo 2, con y sin la adición de los ácidos grasos insaturados omega 3, 6 y 9, con la finalidad de verificar si estas moléculas tienen efecto en el control de la concentración de glucosa en sangre, encontrando que los efectos de estos ácidos grasos están asociados tanto a la dosis como al esquema de consumo y la duración del tratamiento.

Como ya se explicó en el desarrollo del modelo; no se observó diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el diabético. Una de las características de este modelo es justamente el moderado perfil de glicemia que presentan los sujetos a lo largo de los tratamientos. Debemos recordar que las glicemias aunque moderadamente altas (110 a 160 mg/dl) en forma crónica ocasionan las mismas alteraciones patológicas que las glicemias más altas (> 180 mg/dl) debido a que no es la concentración de glucosa sino su cronicidad la que daña los tejidos.

Por otro lado la adición de los ácidos grasos omega 3 parece tener un mayor beneficio en el control de la glicemia en animales diabéticos ya que mantuvo la concentración de glucosa en sangre en un rango de 120 a 130 mg/dl a partir de las doce semanas de edad. Mientras que las concentraciones de glucosa en sangre de los animales adicionados con los ácidos grasos omega 6 y 9 tienen un comportamiento errático y poco confiable. Sin embargo; el consumo de los ácidos grasos omega 3 (13%) en individuos normoglicémicos parece tener un efecto contrario al observado en los animales con diabetes y lejos de traer un beneficio se asocia a una ligera

intolerancia a la glucosa y descontrol de la concentración de glucosa sanguínea a lo largo del tiempo (figura 17). Este fenómeno se ha relacionado con la capacidad que tienen estos ácidos grasos de estimular la síntesis de insulina, por lo que administrados en forma habitual podrían contribuir con el desarrollo de la diabetes tipo 2, máximo en una población en la cual los factores genéticos y ambientales están señalados como el origen de este padecimiento.

En busca de evidencia que confirme o apoye la anterior afirmación encontramos que en ratas normoglicémicas suplementadas con ácidos grasos omega 3 durante la gestación se advierte el mismo efecto hiperglicemiante que en nuestro estudio (Figuroa G. et al., 2013). Por otro lado la relación existente entre la diabetes mellitus y el uso de aceite de pescado como posible tratamiento ha sido descrita desde 1966 en estudios realizados en poblaciones de esquimales donde se observó una menor incidencia de este síndrome en esta etnia comparado con la población danesa. La importancia del estudio de los efectos de los omega 3 y la diabetes deriva de su relación con las dislipidemias, pues las alteraciones del metabolismo de las grasas están en estrecha relación con el estrés metabólico. Por otro lado la resistencia a la insulina derivada de la fase hipermetabólica en la diabetes, obliga a que la glucosa no sea oxidada adecuadamente, por lo que la mayor parte de los requerimientos energéticos durante esta fase son aportados por las grasas. Durante el estrés metabólico, los tejidos insulinosensibles están capacitados para utilizar grasas como fuente energética; esto es posible gracias al incremento de los niveles plasmáticos de hormonas como el cortisol, epinefrina y glucagón.

Es adecuado señalar, que el efecto hiperglicemiante encontrado en el grupo de animales normoglicémicos adicionados con omega 3 también se advierte en los grupos adicionados con ácidos grasos omega 6 (25%) y 9 (23%) y, que este efecto es más severo en estos grupos. Se sabe que la administración de ácidos grasos de cadena larga puede conducir a un incremento del metabolismo del ácido araquidónico incrementando la síntesis de moléculas inflamatorias (prostaglandinas y tromboxanos) especialmente cuando dichos ácidos grasos se aportan en forma de ácidos grasos omega 6. Por el contrario la administración de ácidos grasos omega 3 disminuye la producción de estas moléculas aportando un beneficio antiinflamatorio. En este sentido se hace evidente la importancia en la relación  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 dado que a mayor ingesta de  $\omega$ -6 mayor incremento de la masa adiposa con incremento en las alteraciones metabólicas como resistencia a la insulina (Massiera et al., 2010). Se ha sugerido que la ingesta del ácido linoleico en los

pacientes con diabetes no sea mayor al 10% del total de Kcal requeridas, pues un consumo superior puede incrementar el riesgo de peroxidación lipídica en el organismo (Mensink et al., 2003).

Al adicionar en forma aislada cada uno de los ácidos grasos poliinsaturados de la familia de los omega podríamos estar ocasionando un desequilibrio en las proporciones de estos en la dieta y con ello generaríamos un modelo de diabetes tipo 2 de origen lipídico. En los últimos 150 años los seres humanos han incrementado el consumo de los ácidos grasos omega 6 (Grasas y ácidos grasos en Nutrición humana. FINUT-FAO. 2008) (maíz, carne y productos lácteos) y disminuido el de los omega 3 (hierba, las semillas de lino, la colza y los pescados como el salmón, la sardina o la caballa) de una proporción de 2:1 a 15:1 (México), esto es más del 250%, lo que ha generado un incremento en el acúmulo de grasa corporal, dislipidemia y resistencia a la insulina. Además de lo anterior se debe recordar que el ácido linoleico y el alfa linolénico compiten por el metabolismo de la enzima  $\Delta 6$ -desaturasa, por lo que el incremento en el consumo de  $\omega$ -6 puede reducir la disponibilidad de la enzima y limitar el metabolismo del  $\omega$ -3 (Villalobos et al., 2010). La proporción adecuada entre omega 3 y 6 de acuerdo a la FAO y la OMS es de 4:1.

Por otro lado, al revisar los resultados obtenidos tanto de la cuantificación de colesterol como de triglicéridos evidenciamos aún más esta posible asociación entre la dosis de los ácidos grasos omega 3, 6 ó 9 y el desarrollo de la hiperglicemia en los animales de los grupos control, pues si bien una de las características de los pacientes diabéticos es justamente las alteraciones en el metabolismo de los lípidos observadas a través del incremento del colesterol y los triglicéridos en sangre, esta sintomatología también se hace evidente en los individuos con tratamientos de ácidos grasos omega 3, 6 ó 9, siendo más evidente el efecto del  $\omega$ -6 que el de los  $\omega$ -3 y  $\omega$ -9.

Aunque ninguno de los tratamientos se correlaciona en forma positiva con la ganancia de peso, podemos asegurar que uno de los efectos del tratamiento con ácidos grasos omega 3, 6 ó 9 en los animales del grupo diabético es la lipólisis la cual se produce como respuesta a la acción de las hormonas contrareguladoras, incrementándose la concentración de los triglicéridos y el colesterol. Otros estudios relacionados con la presente investigación también han reportado una pobre ganancia de peso en animales inducidos a diabetes tipo 2, con incremento de los triglicéridos y el colesterol en combinación con hiperglicemias moderadas (Figuroa, 2015a).

Debemos señalar que en el presente estudio se encontró un incremento de los triglicéridos a lo largo del tiempo experimental (6 meses) en todos los grupos (control; 36%, control  $\omega$ -3; 45%, control  $\omega$ -6; 18%, control  $\omega$ -9; 16%, STZ; 146%, STZ  $\omega$ -3; 56%, STZ  $\omega$ -6; 27% y STZ  $\omega$ -9; 117%), lo que podría estar asociado a una disminución en la función de la tiroxina y una menor utilización de la glucosa sanguínea (Mendel et al., 1986). Sin embargo no se encontró este mismo efecto en los resultados del colesterol. Estudios realizados por Spector y Yorek (Spector and Yorek, 1985), con la finalidad de estudiar la relación de la tiroxina y los ácidos grasos libres usando ácido palmítico marcado demuestran que dicha hormona tiene un marcado efecto en la utilización de este ácido, así como en la movilización de los ácidos grasos, estos mismos resultados han sido reportados por Chopra y colaboradores (Chopra et al., 1993), quienes observan una correlación negativa entre la concentración de ácidos grasos libres y la acción de la hormona.

A su vez, el metabolismo celular está regulado por la síntesis y liberación de la hormona tiroidea “tiroxina” la cual depende de la albúmina para ser transportada y liberada en los sitios de acción, por lo que cualquier incremento en la concentración de triglicéridos y ácidos grasos libres y la saturación de la proteína por estas moléculas afecta de forma directa la unión de la hormona a dicha proteína, y con ello el transporte de la misma a los sitios de acción; limitando sus efectos.

Sin embargo debemos tener cuidado al momento de interpretar la relación del peso con la concentración de triglicéridos, colesterol y glucosa en sangre, pues si bien por un lado se evidencia la falta de acción de la hormona tiroidea por la saturación de la albúmina; lo que nos podría sugerir un cuadro de hipotiroidismo nutricional secundario, con incremento del peso (Kiess et al., 2001).

## 9.5 Fantasmas de eritrocitos

### 9.5.1 Composición de ácidos grasos

Las membranas plasmáticas son el principal indicador del estatus de las alteraciones de los ácidos grasos y su metabolismo en los organismos. Es por ello que el estudio de la composición de ácidos grasos en estas estructuras celulares es fundamental para el entendimiento de la dinámica de la hiperglicemia en los cambios metabólicos y su influencia en la patogénesis y desarrollo de enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2, el síndrome metabólico y la obesidad (Spector and Yorek, 1985).

Por otro lado los eritrocitos además de ser las células más abundantes en el tejido sanguíneo, también son elementos de recambio continuo, por lo que se pueden considerar como el monitor del estatus nutricional de los individuos, sirviendo como indicadores de cambios más profundos que evidencian el principio y desarrollo de alteraciones de tipo metabólico. Además de lo anteriormente planteado, aun cuando la toma de una muestra de sangre se considera un método diagnóstico invasivo no lo es tanto como la obtención de biopsias y su análisis y obtención de resultados es más rápido y eficaz.

En el presente estudio se analizó la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos encontrando que existe un comportamiento cuadrático tanto en la composición de ácidos grasos insaturados (AGI) como en la de los ácidos grasos saturados (AGS) en los animales del grupo diabético y en los grupos adicionados con omega 3, 6 y 9, tanto diabéticos como sanos, encontrando diferencia estadística significativa entre cada uno de ellos respecto al control ( $p < 0.05$ ) pero no entre ellos. Este comportamiento cuadrático que describe el incremento de los ácidos grasos insaturados y disminución de los ácidos grasos saturados en los primeros tres meses de vida de los individuos tiende a ser inverso hacia los seis meses. Con lo que también el cociente de Insaturados/Saturados (I/S) tiende a cambiar disminuyendo con el paso del tiempo. Todo lo anterior se correlaciona en forma positiva con la concentración de glucosa sanguínea, la cual, como ya se había hecho mención, pese a no ser tan elevada genera cambios en parámetros tan importantes como la composición de los ácidos grasos, de los cuales el I/S es muy importante ya que está directamente asociado con la fluidez membranal la cual es una de las características fisicoquímicas de las membranas, asociadas a la función de estas (Pérez-Hernández et al., 2010)

La importancia fisiológica de las modificaciones en las propiedades físicas de las membranas reside en su relación con numerosas funciones celulares, incluyendo la actividad de enzimas asociadas a ésta, transporte de solutos y procesos de transducción de señales inducidos por hormonas (García et al., 2003). Se sabe que tanto el aumento de la concentración de colesterol como la disminución de la relación I/S en las membranas biológicas reducen la fluidez al envejecer. Esta disminución de la fluidez se asocia a disminución en la señalización, mayor riesgo de rompimiento de las membranas con cambios osmóticos (Winocour et al., 1990) y apoptosis. Si bien es cierto que una de las características observadas en el presente estudio es el incremento de AGS y la disminución de los AGI con el tiempo en los animales de estudio, este fenómeno no fue registrado en los individuos del grupo control, los cuales permanecieron sin cambios aparentes ni en la composición de ácidos grasos o en el cociente I/S, por lo que los cambios derivados de la composición de los ácidos grasos que afectan la fluidez de las membranas no es atribuible a la edad. Por otro lado una de las características encontradas en animales diabéticos ha sido justamente la disminución en la fluidez de las membranas plasmáticas asociado este a la hiperglicemia.

La estructura de las membranas celulares se describe como una bicapa lipídica donde se insertan las proteínas y otros componentes. Esta estructura es altamente plástica y dinámica debido a las propiedades de los lípidos que la constituyen (Singer and Nicolson, 1972). Cualquier cambio en la composición lipídica de las membranas tiene como consecuencia alteraciones en la fluidez de las mismas, con lo que la medición de esta es un indicador de la actividad y/o metabolismo celular (Li et al., 1999). Un estudio realizado por Popp SC, (Popp-Snijders et al., 1987) en membranas de eritrocitos de paciente diabéticos con suplementación de ácidos grasos omega 3 durante 8 semanas encontraron una disminución en la concentración de la glucosa en sangre, así como el aumento en la composición de los AGI sin evidencia de modificaciones en la fluidez de la membranas, lo que atribuyeron a un incremento en la sensibilidad a la insulina y las de los triglicéridos en sangre. Los mismos autores realizaron un estudio en individuos sanos bajo el mismo esquema de suplementación del  $\omega$ -3 donde encontraron un incremento de los AGI en los fosfolípidos fosfatidil-colina y fosfatidil-etanolamina acompañados de una disminución de estos dos fosfolípidos y un incremento en la esfingomielina, sin cambios aparentes en la fluidez de la membrana, sugiriendo que los cambios en la composición de los AGs pueden ser

contrarrestados con la adecuación del contenido de fosfolípidos (Popp-Snijders et al., 1986). Los cambios encontrados por Popp SC *et al*, sugieren que tal vez los cambios en la composición de los ácidos grasos no son tan importantes como las modificaciones en la cantidad de fosfolípidos de las diferentes membranas pues las características fisicoquímicas de estas y el funcionamiento celular están en función del tipo de fosfolípidos que las constituyen (Stubbs and Smith, 1984).

El incremento en la fluidez de la membrana está relacionado con cambios en la composición de los ácidos grasos; es así que entre mayor sea la proporción de ácidos grasos insaturados y/o menor la de saturados, la fluidez se hace mayor (McMurchie, 1988). Estudios realizados en hembras con sobre peso y obesidad señalan una disminución de la fluidez de la membrana en eritrocitos debida a una disminución en el índice de PUFAS, principalmente los de cadena larga de la serie  $\omega$ -3, cabe señalar que dicho estudio fue realizado con la sonda fluorescente DPH. Los autores sugieren que estos hallazgos se asocian a estrés oxidante derivado de un metabolismo alterado de los lípidos, en el estudio también se señala una diferencia estadísticamente significativa para el parámetro glucosa, donde el grupo con sobrepeso tiene mayor concentración de ésta en sangre (Cazzola et al., 2004), Suzuki *et al.*, (Suzuki et al., 1998), señalan una disminución en la microviscosidad de la membrana plasmática de células de tejido nervioso y un incremento en la concentración del ácido graso poliinsaturado DHA. Este ácido graso ha sido señalado como posible modulador de varias de las características termotrópicas de las membranas entre ellas la fluidez, la transición de fases, la elasticidad, la permeabilidad, la fusión, el flip-flop, y la actividad de las proteínas. Su interacción con otros lípidos de la membrana, en particular con el colesterol pueden tener un papel importante en la modulación de la estructura local y la función de las membranas (Stillwell and Wassall, 2003).

Existen diversos factores intrínsecos de la membrana que afectan la fluidez de la misma. Algunos de ellos son la composición de ácidos grasos, la disposición e interacciones entre los mismos, así como la concentración de proteína y colesterol de la membrana. La membrana debe ser compatible con muchos de los procesos esenciales para la función celular, con excepción de ciertos lípidos, los productos del metabolismo del ácido araquidónico y poli-fosfatidilinositol, estos procesos se llevan a cabo por proteínas asociadas a la membrana. Las proteínas de membrana pueden ser modificadas por las propiedades fisicoquímicas, ya sea por los grupos de fosfolípidos con los que se asocian o por efectos de integración de los lípidos de la membrana

(McMurchie, 1988). Se estudió la concentración de proteína y colesterol en los fantasmas de eritrocitos para determinar su posible participación en el incremento de la fluidez sin encontrar diferencias estadísticamente significativa entre grupos. Además, la fluidez de membrana se ve afectada por procesos tales como la adaptación homoviscosidad, regulación viscotrópica, las transiciones de fase de lípidos y las separaciones de fases laterales (McMurchie, 1988).

Otros parámetros importantes en el estudio fisicoquímico de las membranas, que demuestran alteración en la fluidez de esta son: la energía de activación de las fases gel y líquido cristal y la temperatura a la que se da la transición de las mismas.

La importancia fisiológica de las modificaciones en las propiedades físicas de las membranas reside en su relación con numerosas funciones celulares, incluyendo la actividad de enzimas asociadas a ésta, transporte de solutos y procesos de transducción de señales inducidos por hormonas (García-Sáez and Schwille, 2010). Por lo anterior, es importante conocer cómo este parámetro se ve alterado durante el desarrollo de la diabetes y con el uso de suplementos de omega (3, 6 ó 9). Los monitores aquí utilizados proporcionaron información con respecto a la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos. Sin embargo, hay que señalar que los monitores de fluorescencia empleados en las distintas metodologías son uno de los principales factores a considerar al momento de hacer comparaciones, ya que estos monitores se localizan o insertan en distintos sitios de las membranas de acuerdo a su carácter lipofílico, por lo que el nivel de inserción varía con cada uno de ellos. Los ensayos realizados en este trabajo se desarrollaron con el uso de DPiP el cual, a través de la relación de fluorescencias de excímero a monómero ( $I_e/I_m$ ), está directamente relacionado con la fluidez membranal. Por otro lado, en el DPH y el TMA-DPH, la polarización de fluorescencia está inversamente relacionada con la fluidez. Es claro que la diabetes afecta diferencialmente dependiendo del tipo de membrana u organelo, así por ejemplo, utilizando el DPiP se ha reportado que la diabetes y la hipertensión disminuyen la fluidez de fantasmas de eritrocitos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) conforme progresan las patologías (Pérez-Hernández et al., 2010).

Otro dato importante obtenido de las membranas, que demuestra alteración en la fluidez es: la energía de activación. En nuestro estudio encontramos que la energía de activación varía de acuerdo al monitor que se utiliza y observamos cambios en cada uno de los grupos que tenemos

(control y STZ, suplementados y no suplementados), como se observa en las tablas correspondientes a la Ea.

También sabemos que la fluidez membranal está dada en función de la composición de ácidos grasos; es así que entre mayor sea la proporción de ácidos grasos insaturados y/o menor la de saturados, la fluidez se hace mayor.

## 10 CONCLUSIONES

- ❖ Con la dosis de estreptozotocina administrada (125 mg/kg de peso corporal) en ratas wistar machos, generamos un modelo de Diabetes Mellitus Tipo 2 con hiperglicemia ligera. Aparentemente la concentración de glucosa sanguínea era similar a los grupos control durante todo el tiempo experimental, sin embargo, al realizar las curvas de tolerancia a la glucosa, confirmamos que los animales inducidos eran diabéticos. Nuestros datos sugieren que este modelo experimental es semejante a la Diabetes en su etapa inicial, cuando aún no hay síntomas.
- ❖ El peso corporal de los animales diabéticos con y sin suplementos de los diferentes ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) no fueron diferentes a los grupos control, podemos decir que esta hiperglicemia ligera no puso en compromiso el crecimiento de los animales.
- ❖ Respecto al metabolismo de lípidos, no hay cambios significativos en la concentración de colesterol, sin embargo, la concentración de triglicéridos en el grupo diabético sin suplementos de ácidos grasos omega, se ve alterada aumentando significativamente. Al parecer, las alteraciones en triglicéridos podrían ser un buen indicador de las etapas iniciales del desarrollo de la diabetes.
- ❖ Las curvas de tolerancia a la glucosa demostraron que a pesar de la hiperglicemia ligera, sí hay una pérdida en el control de la glicemia en los grupos diabéticos, durante el tiempo experimental. Asimismo, este trabajo demuestra que en el grupo control suplementado con ácido graso omega 3, después de 4 meses de su administración comienza a perder el control sobre la glicemia, siendo así que a los 6 meses hay un descontrol similar al de los grupos diabéticos. El suplemento de ácidos grasos omega 3 a sujetos normoglicémicos a largo plazo, parece generar un modelo de diabetes por resistencia a la insulina. Por la información obtenida en esta tesis, más trabajo previo en el laboratorio, creemos que el mecanismo de generación de dicha resistencia está asociado a una mayor síntesis de insulina inducida por los ácidos grasos omega 3.
- ❖ La concentración de insulina fue diferente entre los grupos control y los diabéticos, pero cabe resaltar que entre los grupos diabéticos suplementados con los diferentes ácidos grasos omega (3, 6 ó 9) hay diferencias marcadas que sugieren que la concentración de insulina se ve afectada a lo largo del tiempo experimental, siendo que a los 6 meses los

grupos STZ suplementados tienen una menor concentración de insulina con respecto al grupo STZ no suplementado.

- ❖ La composición de ácidos grasos de los fantasmas de eritrocitos se modificó durante la suplementación de los ácidos grasos omega (3, 6 ó 9). El uso del cociente de I/S como indicador de fluidez membranal demostró claramente que hay cambios importantes en todos los grupos haciendo más fluidas o rígidas a las membranas a lo largo del tiempo experimental, lo cual es dependiente de la edad y del suplemento de ácido graso omega (3, 6 ó 9) que se utilice.
- ❖ El DPiP fue el único monitor de fluidez que detectó las transiciones de fase en los fantasmas de eritrocitos, muy probablemente por su localización preferencial en las membranas. Sin embargo, el uso de DPH y TMA-DPH nos proporcionó información para tener un campo más amplio acerca del estudio de las membranas y los cambios en la fluidez de las mismas.

## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2008. Membrane Structure. *In* Molecular Biology of THE CELL. H. Helenius, W. Kühnbrandt, D. Osterheit, and K. Simons, editors. Barcelona. 617–650.
- Avruch, J. 1998. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell. Biochem.* 182:31–48.
- Baird, J.D. 1986. Some aspects of the metabolic and hormonal adaptation to pregnancy. *Acta Endocrinol. Suppl. (Copenh).* 277:11–8.
- Bartlett, G. 1959. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem.* 234:466–468.
- Bastarrachea, R., H. Laviada-Molina, I. Machado-Domínguez, J.J. Kent, J. López-Alvarenga, and A. Comuzzie. 2005. El receptor de insulina como objetivo farmacogenómico: potenciando su señalización intracelular. *Endocrinol. y Nutr.* 13(4):180–189.
- Becerra, A. 1999. Malnutrición fetal y enfermedad metabólica en la vida adulta. *Nutr. y Obes.* 5:243–251.
- Bhattacharya, S., D. Dey, and S.S. Roy. 2007. Molecular mechanism of insulin resistance. *J. Biosci.* 32:405–13.
- Blume, A. 2004. Lipids. *In* Bioelectrochemistry of membranes. D. Walz, J. Teissie, and G. Milazzo, editors. Birkhäuser Verlag. 60–152.
- Bonner-Weir, S., D.F. Trent, R.N. Honey, and G.C. Weir. 1981. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes.* 30:64–9.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–54.
- Brady, L.M., S.S. Lovegrove, S.V.M. Lesauvage, B.A. Gower, A.-M. Minihane, C.M. Williams, and J.A. Lovegrove. 2004. Increased n-6 polyunsaturated fatty acids do not attenuate the effects of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids on insulin sensitivity or triacylglycerol reduction in Indian Asians. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:983–991.
- Burcelin, R., W. Dolci, and B. Thorens. 2000. Glucose sensing by the hepatoportal sensor is GLUT2-dependent: in vivo analysis in GLUT2-null mice. *Diabetes.* 49:1643–8.
- Burdge, G.C., and P.C. Calder. 2005. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:581–97. doi:10.1051/rnd:2005047.
- Carrero, J.J., L. Baró, J. Fonollá, J. Jiménez, and J.J.B.E. López-huertas. 2005a. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta OF OMEGA-3-FATTY ACIDS AND. 63–69.
- Carrero, J.J., E. Martín-Bautista, L. Baró, J. Fonollá, J. Jiménez, J.J. Boza, and E. López-Huertas. 2005b. [Cardiovascular effects of omega-3-fatty acids and alternatives to increase their intake]. *Nutr. Hosp.* 20:63–9.
- Cazzola, R., M. Rondanelli, S. Russo-Volpe, E. Ferrari, and B. Cestaro. 2004. Decreased membrane fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in

- overweight and obese female erythrocytes. *J. Lipid Res.* 45:1846–51. doi:10.1194/jlr.M300509-JLR200.
- Chopra, I.J., F. Santini, R.E. Hurd, and G.N. Chua Teco. 1993. A radioimmunoassay for measurement of thyroxine sulfate. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 76:145–50. doi:10.1210/jcem.76.1.8421080.
- Cramer, S.C., W.M. Pardridge, B.A. Hirayama, and E.M. Wright. 1992. Colocalization of GLUT2 glucose transporter, sodium/glucose cotransporter, and gamma-glutamyl transpeptidase in rat kidney with double-peroxidase immunocytochemistry. *Diabetes.* 41:766–70.
- Cuman, R.K., C.A. Bersani-Amado, and Z.B. Fortes. 2001. Influence of type 2 diabetes on the inflammatory response in rats. *Inflamm. Res.* 50:460–5.
- Damas, J., C. Hallet, and P.J. Lefebvre. 2001. Changes in blood glucose and plasma insulin levels induced by bradykinin in anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* 134:1312–8. doi:10.1038/sj.bjp.0704374.
- Danaei, G., M.M. Finucane, Y. Lu, G.M. Singh, M.J. Cowan, C.J. Paciorek, J.K. Lin, F. Farzadfar, Y.-H. Khang, G.A. Stevens, M. Rao, M.K. Ali, L.M. Riley, C.A. Robinson, M. Ezzati, G. Danaei, C. Lawes, S. Vander Hoorn, C. Murray, M. Ezzati, C. Lawes, V. Parag, D. Bennett, et al., T.D. study group on behalf of the E.D.E. Group, T. Nakagami, K. Khaw, N. Wareham, S. Bingham, R. Luben, A. Welch, N. Day, R. Klein, M. Finucane, G. Stevens, M. Cowan, on behalf of the G.B. of M.R.F. of C.D.C.G. (Body M. Index), et al., D. Abegunde, C. Mathers, T. Adam, M. Ortegón, K. Strong, P. Zimmet, K. Alberti, J. Shaw, S. Wild, G. Roglic, A. Green, R. Sicree, H. King, H. King, R. Aubert, W. Herman, A. Amos, D. McCarty, P. Zimmet, J. Shaw, R. Sicree, P. Zimmet, M. Nagata, T. Ninomiya, Y. Doi, et al., B. Berger, G. Stenstrom, G. Sundkvist, W. Gatling, S. Budd, D. Walters, M. Mullee, J. Goddard, R. Hill, D. Dunstan, P. Zimmet, T. Welborn, et al., E. Gregg, Y. Cheng, B. Cadwell, et al., S. Lusignan, C. Sismanidis, I. Carey, S. DeWilde, N. Richards, D. Cook, J. Chan, V. Malik, W. Jia, et al., N. Venketasubramanian, P. Bovet, S. Romain, C. Shamlaye, et al., C. Bjorkelund, D. Andersson-Hange, et al. 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *Lancet.* 378:31–40. doi:10.1016/S0140-6736(11)60679-X.
- Dangardt, F., Y. Chen, E. Gronowitz, J. Dahlgren, P. Friberg, and B. Strandvik. 2012. High physiological omega-3 fatty acid supplementation affects muscle fatty acid composition and glucose and insulin homeostasis in obese adolescents. *J. Nutr. Metab.* 2012. doi:10.1155/2012/395757.
- DeFronzo, R.A. 2004. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med. Clin. North Am.* 88:787–835. doi:10.1016/j.mcna.2004.04.013.
- Delarue, J., C. LeFoll, C. Corporeau, and D. Lucas. 2004. N-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity? *Reprod. Nutr. Dev.* 44:289–99.
- Donnelly, R., A.M. Emslie-smith, I.D. Gardner, and A.D. Morris. 2000. Vascular complications of diabetes Microvascular complications Macrovascular complications. 320.

- Drukker, N.A., and T.N. Pogorelova. 1996. [Fatty acid composition of placental membrane phospholipids in women with a history of hypofunctional ovaries]. *khimii*. 42:54–8.
- Dupuis, J., C. Langenberg, I. Prokopenko, R. Saxena, N. Soranzo, A.U. Jackson, E. Wheeler, N.L. Glazer, N. Bouatia-Naji, A.L. Gloyn, C.M. Lindgren, R. Mägi, A.P. Morris, J. Randall, T. Johnson, P. Elliott, D. Rybin, G. Thorleifsson, V. Steinthorsdottir, P. Henneman, H. Grallert, A. Dehghan, J.J. Hottenga, C.S. Franklin, P. Navarro, K. Song, A. Goel, J.R.B. Perry, J.M. Egan, T. Lajunen, N. Grarup, T. Sparsø, A. Doney, B.F. Voight, H.M. Stringham, M. Li, S. Kanoni, P. Shrader, C. Cavalcanti-Proença, M. Kumari, L. Qi, N.J. Timpson, C. Gieger, C. Zabena, G. Rocheleau, E. Ingelsson, P. An, J. O’Connell, J. Luan, A. Elliott, S.A. McCarroll, F. Payne, R.M. Roccascaccia, F. Pattou, P. Sethupathy, K. Ardlie, Y. Ariyurek, B. Balkau, P. Barter, J.P. Beilby, Y. Ben-Shlomo, R. Benediktsson, A.J. Bennett, S. Bergmann, M. Bochud, E. Boerwinkle, A. Bonnefond, L.L. Bonnycastle, K. Borch-Johnsen, Y. Böttcher, E. Brunner, S.J. Bumpstead, G. Charpentier, Y.-D.I. Chen, P. Chines, R. Clarke, L.J.M. Coin, M.N. Cooper, M. Cornelis, G. Crawford, L. Crisponi, I.N.M. Day, E.J.C. de Geus, J. Delplanque, C. Dina, M.R. Erdos, A.C. Fedson, A. Fischer-Rosinsky, N.G. Forouhi, C.S. Fox, R. Frants, M.G. Franzosi, P. Galan, M.O. Goodarzi, J. Graessler, C.J. Groves, S. Grundy, R. Gwilliam, et al. 2010. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat. Genet.* 42:105–16. doi:10.1038/ng.520.
- Ernsberger, P., R.J. Koletsky, D.D. Kline, D.M. Bedol, and J.E. Friedman. 1999. The SHROB model of syndrome X: effects of excess dietary sucrose. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 892:315–8.
- Febres Balestrini, F., E. Zimmer, C. Guerra, E. Zimmer, and J. Gil. 2000. Nuevos conceptos en diabetes mellitus gestacional: evaluación prospectiva de 3.070 mujeres embarazadas. *Rev. Obs. ginecol. Venez.* 60:229–36.
- Fernández, G., Á. Jardón, and F.-H. José. 2006. Modelos experimentales utilizados para el estudio e investigación de la diabetes mellitus. 2° *Congr. Nac. Química Médica*.
- Figuroa, G. 2015a. Análisis de las Alteraciones Morfológicas y Funcionales por Peroxidación de Lípidos de la Membrana Mitocondrial de la Placenta en Ratras Gestantes inducidas a Diabetes Mellitus Tipo 2 con STZ. Universidad Nacional Autónoma de México. 137 pp.
- Figuroa, G. 2015b. Perfil glicémico durante el ayuno en ratas macho con Diabetes Tipo 2 y su control no diabético. In *Memorias XX Simposio de Ciencias de la Salud UAM Iztapalapa*. Ciudad de México.
- Figuroa G., M.C., I. Pérez H., and R. Mejía Z. 2013. Characterization of a type 2 diabetes model in female Wistar rats. *Rev. MVZ Córdoba*. 18:3699–3707.
- Flachs, P., M. Rossmeisl, and J. Kopecky. 2014. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol. Res.* 63 Suppl 1:S93-118.
- Fleitas Estévez, A.S., L. Rafael Simón Carballo, D. Gisela Almeida, L.M. Ana Quintela Pena, and D. María Antonia Alfonso. 2000. MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES EN CONEJOS. *Rev. Cuba. Angiol y Cir Vasc.* 1:10–4.
- Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497–509.

- Fujii, H., Y. Watanabe, A. Ueki, A. Ohno, M. Kato, K. Kondo, H. Takamura, M. Takesue, H. Nishimura, D. Matsuda, and T. Miyakawa. 2010. An increased dose of insulin detemir improves glycaemic control and reduces body weight of Japanese patients with diabetes. *Int. J. Clin. Pract.* 64:1512–9. doi:10.1111/j.1742-1241.2010.02391.x.
- García, M.A., C. Millán, C. Balmaceda-Aguilera, T. Castro, P. Pastor, H. Montecinos, K. Reinicke, F. Zúñiga, J.C. Vera, S.A. Oñate, and F. Nualart. 2003. Hypothalamic ependymal-glia cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem.* 86:709–24.
- García-Sáez, A.J., and P. Schwillle. 2010. Stability of lipid domains. *FEBS Lett.* 584:1653–8. doi:10.1016/j.febslet.2009.12.036.
- Goldman, M., J.L. Kitzmiller, B. Abrams, R.M. Cowan, and R.K. Laros. 1991. Obstetric complications with GDM. Effects of maternal weight. *Diabetes.* 40 Suppl 2:79–82.
- Gonçalves-de-Albuquerque, C.F., I.M. Medeiros-de-Moraes, F.M. de J. Oliveira, P. Burth, P.T. Bozza, M.V. Castro Faria, A.R. Silva, and H.C. de Castro-Faria-Neto. 2016. Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis. *PLoS One.* 11:e0153607. doi:10.1371/journal.pone.0153607.
- González, É. 2002. DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL: ETIOLOGÍA DE LAS MALFORMACIONES CONGÉNITAS EN DESCENDIENTES DE RATAS DIABÉTICAS\*. *Rev Cuba. Endocrinol.* 13:53–63.
- Goñi Avelina Caridad, L., B. Diuris, P. Amelia, R. Marisel, G.O. Bárbara, A.E. María, B.M. Ana, G. Yana, and M. Axel. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD (Hematological and biochemical parameters in Sprague Dawley laboratory rats breed in CENPALAB, Cenp: SPRD).
- Havel, P.J., T.M. Hahn, D.K. Sindelar, D.G. Baskin, M.F. Dallman, D.S. Weigle, and M.W. Schwartz. 2000. Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the hypothalamic melanocortin system and muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *Diabetes.* 49:244–52.
- Havel, P.J., J.Y. Uriu-Hare, T. Liu, K.L. Stanhope, J.S. Stern, C.L. Keen, and B. Ahrén. 1998. Marked and rapid decreases of circulating leptin in streptozotocin diabetic rats: reversal by insulin. *Am. J. Physiol.* 274:R1482-91.
- Hemmings, S.J., and D. Spafford. 2000. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32:905–919. doi:10.1016/S1357-2725(00)00019-4.
- Hernández-ávila, M., J.P. Gutiérrez, and N. Reynoso-noverón. 2013. Diabetes mellitus en México . El estado de la epidemia. 55:129–136.
- Hugues, H., G. Rodríguez, and G. Rodríguez. 2001. Temas de revisión ANIMALES DE LABORATORIO EN LA ENDOCRINOLOGÍA: BIOMODELOS DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1. *Rev Cuba. Endocrinol.* 12:168–177.
- Jeppesen, C., K. Schiller, and M.B. Schulze. 2013. Omega-3 and omega-6 fatty acids and type 2 diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 13:279–88. doi:10.1007/s11892-012-0362-8.
- Kaushik, M., and D. Mozaffarian. 2009. Long-chain omega-3 fatty acids, fish intake, and the risk

- of type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Clin. Nutr.* 90:613–20. doi:10.3945/ajcn.2008.27424.1.
- Kellett, G.L., E. Brot-Laroche, O.J. Mace, and A. Leturque. 2008. Sugar absorption in the intestine: the role of GLUT2. *Annu. Rev. Nutr.* 28:35–54. doi:10.1146/annurev.nutr.28.061807.155518.
- Kiess, W., A. Reich, G. Müller, A. Galler, T. Kapellen, K. Raile, A. Böttner, B. Seidel, and J. Kratzsch. 2001. Obesity in childhood and adolescence: clinical diagnosis and management. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* 14 Suppl 6:1431–40.
- Kopelman, P.G. 2000. Obesity as a medical problem. *Nature.* 404:635–43. doi:10.1038/35007508.
- Li, J.X., C.W. Tong, D.Q. Xu, and K.M. Chan. 1999. Changes in membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhausting exercise in rats. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.* 80:113–7. doi:10.1007/s004210050566.
- Li, M., M. Zeng, Z. He, Z. Zheng, F. Qin, G. Tao, S. Zhang, and J. Chen. 2015. Effects of Long-Term Exposure to Free  $N^{\epsilon}$ -(Carboxymethyl)lysine on Rats Fed a High-Fat Diet. *J. Agric. Food Chem.* 63:10995–11001. doi:10.1021/acs.jafc.5b05750.
- Lillioja, S., D.M. Mott, B. V Howard, P.H. Bennett, H. Yki-Järvinen, D. Freymond, B.L. Nyomba, F. Zurlo, B. Swinburn, and C. Bogardus. 1988. Impaired glucose tolerance as a disorder of insulin action. Longitudinal and cross-sectional studies in Pima Indians. *N. Engl. J. Med.* 318:1217–25. doi:10.1056/NEJM198805123181901.
- Massiera, F., P. Barbry, P. Guesnet, A. Joly, S. Luquet, C. Moreilhon-Brest, T. Mohsen-Kanson, E.-Z. Amri, and G. Ailhaud. 2010. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. *J. Lipid Res.* 51:2352–61. doi:10.1194/jlr.M006866.
- Mataix, J., M. López-Frías, E. Martínez-de-Victoria, M. López-Jurado, P. Aranda, and J. Llopis. 2005. Factors associated with obesity in an adult Mediterranean population: influence on plasma lipid profile. *J. Am. Coll. Nutr.* 24:456–65.
- McCarthy, A.M., and J.S. Elmendorf. 2007. GLUT4's itinerary in health & disease. *Indian J. Med. Res.* 125:373–88.
- McMurchie, E. 1988. Dietary lipids and the regulation of membrane fluidity and function invited. *In Physiological Regulation of Membrane Fluidity.* R. Aloia, C. Curtain, and L. Gordon, editors. New York. 189–237.
- Mendel, C.M., P.H. Frost, and R.R. Cavalieri. 1986. Effect of free fatty acids on the concentration of free thyroxine in human serum: the role of albumin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 63:1394–9. doi:10.1210/jcem-63-6-1394.
- Mendez, J.D., and H.G. Ramos. 1994. Animal models in diabetes research. *Arch. Med. Res.* 25:367–75.
- Mensink, R.P., P.L. Zock, A.D.M. Kester, and M.B. Katan. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 77:1146–55.
- Mohler, M.L., Y. He, Z. Wu, D.J. Hwang, and D.D. Miller. 2009. Recent and emerging anti-diabetes targets. *Med. Res. Rev.* 29:125–195. doi:10.1002/med.20142.

- Morrison, W.R., and L.M. Smith. 1964. PREPARATION OF FATTY ACID METHYL ESTERS AND DIMETHYLACETALS FROM LIPIDS WITH BORON FLUORIDE--METHANOL. *J. Lipid Res.* 5:600–8.
- Mounien, L., N. Marty, D. Tarussio, S. Metref, D. Genoux, F. Preitner, M. Foretz, and B. Thorens. 2010. Glut2-dependent glucose-sensing controls thermoregulation by enhancing the leptin sensitivity of NPY and POMC neurons. *FASEB J.* 24:1747–58. doi:10.1096/fj.09-144923.
- Mouritsen, O.G. 2005. *Life — As a Matter of Fat*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Muoio, D.M., and C.B. Newgard. 2008. Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:193–205. doi:10.1038/nrm2327.
- Murali, B., and R.K. Goyal. 2001. Improvement in insulin sensitivity by losartan in non-insulin-dependent diabetic (NIDDM) rats. *Pharmacol. Res.* 44:385–9. doi:10.1006/phrs.2001.0858.
- Olivares Reyes, J., and A. Arellano Plancarte. 2008. Bases moleculares de las acciones de la Insulina. *Rev. Educ. Bioquímica.* 27:9–18.
- Orozco, R. 2008. Efecto de los ácidos grasos omega-3 (FA w-3) y linoleico conjugado (CLA) en la diabetes mellitus 2 (DM2) en ratas wistar. Universidad Nacional Autónoma de México. 110 pp.
- Ortiz-Avila, O., C.A. Sámano-García, E. Calderón-Cortés, I.H. Pérez-Hernández, R. Mejía-Zepeda, A.R. Rodríguez-Orozco, A. Saavedra-Molina, and C. Cortés-Rojo. 2013. Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 45:271–87. doi:10.1007/s10863-013-9502-3.
- Pérez-Hernández, I.H. 2008. Cambios en lípidos durante la diabetes y la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Universidad Nacional Autónoma de México. 77 pp.
- Pérez-Hernández, I.H. 2011. Efecto del aceite de linaza (ácido alfa linolénico) sobre la fluidez membranal en células de ratas espontáneamente hipertensas con diabetes. Universidad Nacional Autónoma de México. 131 pp.
- Pérez-Hernández, I.H., Y.S. Avendaño-Flores, and R. Mejía-Zepeda. 2010. Analysis of the membrane fluidity of erythrocyte ghosts in diabetic, spontaneously hypertensive rats. *Acta Diabetol.* 47 Suppl 1:47–55. doi:10.1007/s00592-009-0120-9.
- Popp-Snijders, C., J.A. Schouten, W.J. van Blitterswijk, and E.A. van der Veen. 1986. Changes in membrane lipid composition of human erythrocytes after dietary supplementation of (n-3) polyunsaturated fatty acids. Maintenance of membrane fluidity. *Biochim. Biophys. Acta.* 854:31–7.
- Popp-Snijders, C., J.A. Schouten, R.J. Heine, J. van der Meer, and E.A. van der Veen. 1987. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Res.* 4:141–7.
- Poveda, E., P. Trujillo, F. Ruiz, E. Lopez, and E. Lopez. 2008. Glucemia y concentraciones de insulina en sangre de ratas Wistar sometidas a dieta alta en grasa y a tratamiento con

- péptidos miméticos de leptina. *Biomédica*. 28:50. doi:10.7705/biomedica.v28i1.108.
- Prabhakar, P.K., and M. Doble. 2009. Synergistic effect of phytochemicals in combination with hypoglycemic drugs on glucose uptake in myotubes. *Phytomedicine*. 16:1119–1126. doi:10.1016/j.phymed.2009.05.021.
- Pratley, R., C. Weyer, and C. Bogardus. 2003. Anormalidades Metabólicas en la Génesis de la Diabetes Tipo 2. *In Diabetes Mellitus*. 680–689.
- Pugsley, A.P., and C.A. Schnaitman. 1978. Identification of three genes controlling production of new outer membrane pore proteins in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 135:1118–29.
- Quinn, P.J., C. Tessier, D. Rainteau, K.S. Koumanov, and C. Wolf. 2005. Structure and thermotropic phase behaviour of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1713:5–14. doi:10.1016/j.bbamem.2005.04.013.
- Ramos, G., and J. Domingo. 1994. DIABETES MELLITUS EXPERIMENTAL. *Cienc. Vet.* 6:347–377.
- Le Roith, D., M. Quon, and Y. Zick. 2003. Molecular and cellular aspects of insulin resistance implications for diabetes. En *Signal Transduction and Human Disease*. *In Diabetes Mellitus*. T. Finkel, J. Gutkind, and Hoboken, editors. Wiley Interscience, New Jersey. 171–200.
- Saad, M.F., W.C. Knowler, D.J. Pettitt, R.G. Nelson, M.A. Charles, and P.H. Bennett. 1991. A two-step model for development of non-insulin-dependent diabetes. *Am. J. Med.* 90:229–35.
- Sala, P.C., R.S. Torrinas, D. Giannella-Neto, and D.L. Waitzberg. 2014. Relationship between gut hormones and glucose homeostasis after bariatric surgery. *Diabetol. Metab. Syndr.* 6:87. doi:10.1186/1758-5996-6-87.
- Saltiel, A.R., and C.R. Kahn. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 414:799–806. doi:10.1038/414799a.
- Schwartz, E. 2009. No Endocrine Regulation of Glucose. *Endocr. Rev. Univ. Chicago*. 55–69.
- Schwingshackl, L., B. Strasser, and G. Hoffmann. 2011a. Effects of monounsaturated fatty acids on cardiovascular risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Nutr. Metab.* 59:176–86. doi:10.1159/000334071.
- Schwingshackl, L., B. Strasser, and G. Hoffmann. 2011b. Effects of monounsaturated fatty acids on glycaemic control in patients with abnormal glucose metabolism: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Nutr. Metab.* 58:290–6. doi:10.1159/000331214.
- Sesti, G. 2006. Pathophysiology of insulin resistance. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 20:665–79. doi:10.1016/j.beem.2006.09.007.
- Shafir, E. 2007. *Animal models of diabetes : frontiers in research*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton :
- Singer, S.J., and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720–31.
- Sofi, F., F. Cesari, R. Abbate, G.F. Gensini, and A. Casini. 2008. Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*. 337:a1344.
- Spector, A.A., and M.A. Yorek. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *J.*

*Lipid Res.* 26:1015–35.

- Stillwell, W., and S.R. Wassall. 2003. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids.* 126:1–27.
- Straczkowski, M., I. Kowalska, J. Górski, and I. Kinalska. 2000. The effect of a single bout of exhaustive exercise on muscle carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 37:47–53.
- Stubbs, C.D., and A.D. Smith. 1984. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochim. Biophys. Acta.* 779:89–137.
- Stumvoll, M., B.J. Goldstein, and T.W. van Haeften. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet (London, England).* 365:1333–46. doi:10.1016/S0140-6736(05)61032-X.
- Suzuki, H., S.J. Park, M. Tamura, and S. Ando. 1998. Effect of the long-term feeding of dietary lipids on the learning ability, fatty acid composition of brain stem phospholipids and synaptic membrane fluidity in adult mice: a comparison of sardine oil diet with palm oil diet. *Mech. Ageing Dev.* 101:119–28.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 50:537–546.
- Thorseng, T., D.R. Witte, D. Vistisen, K. Borch-Johnsen, P. Bjerregaard, and M.E. Jørgensen. 2009. The association between n-3 fatty acids in erythrocyte membranes and insulin resistance: the Inuit Health in Transition Study. *Int. J. Circumpolar Health.* 68:327–36.
- Unger, R.H., and L. Orci. 2010. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:16009–12. doi:10.1073/pnas.1006639107.
- Villalobos, M. E., F.J. Sánchez-Muniz, M. T. Acín, M. P. Vaquero, F.J. Higuera, and S. Bastida. 2010. Similitudes, diferencias y agonismos en los efectos pleiotrópicos de las estatinas y los ácidos grasos omega-3. *Nutr. Hosp.* 25:889–909.
- Wang, R.N., L. Bouwens, and G. Klöppel. 1994. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. *Diabetologia.* 37:1088–96.
- Winocour, P.D., M. Bryszewska, C. Watala, M.L. Rand, R.M. Epand, R.L. Kinlough-Rathbone, M.A. Packham, and J.F. Mustard. 1990. Reduced membrane fluidity in platelets from diabetic patients. *Diabetes.* 39:241–4.

#### Páginas WEB citadas

**American Diabetes Association.** (2011). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 34(1):S62-S69.

**Diabetes UK. Diabetes in the UK 2010:** Key statistics on diabetes. Diabetes UK; 2010. [Consultado 2012 noviembre]. Disponible en: [http://www.diabetes.org.uk/Documents/Reports/Diabetes\\_in\\_the\\_UK\\_2010.pdf](http://www.diabetes.org.uk/Documents/Reports/Diabetes_in_the_UK_2010.pdf)

---

**International Diabetes Federation.** Atlas de Diabetes. Update 2012. 5th edición. [Consultado 2012 diciembre]. Disponible en: <http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/Update2012>.

**Organización Mundial de la Salud.** Diabetes. Nota Descriptiva No.312. OMS; 2012. [Consultado 2012 diciembre]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>.

**Grasas y Ácidos Grasos en Nutrición Humana.** FINUT-FAO. 2008

[themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org).

## 13. ANEXO

**Anexo 1. PRUEBA DE INSULINA POR ELISA**

ALPCO IMMUNOASSAYS Insulin (Rat) Ultrasensitive EIA (Catalog Number 80-INSRTU-E01 1x96 Wells)

**Material incluido**

<b>Reactivos</b>	<b>Contenido</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Preparación</b>
Placa recubierta contra insulina	1 microplaca	12 x 8 celdas ó 96 pozos	Listo para usar
Estandar (Zero 0)	1 vial	5 ml	Listo para usar
Estandar insulina (0.02, 0.05, 0.15, 0.4, 1, 3, 5.5 ng/ml)	7 viales	1ml /vial	Listo para usar
Controles de insulina de mamífero	2 viales	0.6 ml/vial	Mira abajo
Concentrado de enzima conjugada (11x)	1 vial	0.9 ml	Mira abajo
Amortiguador de enzima conjugada	1 botella	9 ml	Mira abajo
Amortiguador de lavado concentrado (21x)	1 botella	40 ml	Mira abajo
Sustrato	1 botella	12 ml	Listo para usar
Solución STOP	1 botella	12 ml	Listo para usar

**Material requerido pero no incluido**

- Micropipetas de 5 µl y 25 µl
- Micropipeta repetidora
- Contenedor volumétrico
- Pipetas graduadas
- Agua bidestilada
- Piseta

**Preparación de reactivos**

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de prepararse y para su uso.

Enzima conjugada concentrado (11x) se diluye con 10 partes del amortiguador de enzima conjugada. Por ejemplo: si se va a utilizar una placa completa (96 pozos) se diluyen 0.9 ml de enzima conjugada concentrada en 9 ml de amortiguador de enzima conjugada.

*Controles de insulina de mamífero (bajo y alto)* vienen liofilizados. Diluir cada control con 0.6 ml de agua destilada. Cerrar el vial con el tapón de goma, agitar y dejar reposar 30 minutos antes de su uso. El contenido debe estar en solución sin partículas visibles. El control resuspendido es estable por 7 días

almacenado en refrigeración (2-8 °C). Si se va a almacenar por largo tiempo se deben hacer alícuotas y almacenar a  $\leq -20$  °C es estable por 6 meses (evitar ciclos de congelación y descongelación). El rango de concentración de los controles se proporciona en el certificado de análisis que viene en cada kit.

*Amortiguador de lavado concentrado (21x)* diluirlo en 20 partes de agua destilada. Por ejemplo: diluir 20 ml de amortiguador de lavado concentrado en 400 ml de agua destilada. Esta dilución es estable por 30 días a temperatura ambiente (18-25 °C).

#### PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Tener todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso. Agitar en el vortex brevemente antes de usar. Se debe incluir una curva estándar en cada microplaca. Todos los controles, estándares y muestras se deben procesarse por duplicado.

1. Pipetear 5 ó 25  $\mu$ l de cada estándar, control reconstituido o muestra en su respectivo pozo.

5 $\mu$ l muestra – usar estándares 0.15, 0.4, 1.0, 3.0 y 5.5 ng/ml
25 $\mu$ l muestra – usar estándares 0.02, 0.05, 0.15, 0.4 y 1.0 ng/ml

2. Adicionar 75  $\mu$ l de la enzima conjugada concentrada en cada pozo
3. Incubar durante 2 horas en movimiento entre 700-900 rpm a temperatura ambiente
4. Lavar 6 veces la placa con el amortiguador de lavado ya diluido, secar perfectamente con papel filtro antes del siguiente paso.
5. Adicionar 100  $\mu$ l del sustrato en cada pozo.
6. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente a 700-900 rpm
7. Adicionar 100  $\mu$ l de la solución STOP en cada pozo. Mezclar bien para detener la reacción. Remover las burbujas antes de la lectura. La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración de insulina en cada pozo.
8. Leer la Abs a 450 nm con una emisión de 620-650 nm. No debe analizarse 30 min después de la adición de la solución STOP.

**Anexo 2. Análisis del contenido de los suplementos de ácidos grasos omega 3, 6 y 9 por cromatografía de gases****FLAX SEED oil GNC ( $\omega$ -3)**

Ácido graso	Contenido (%)
Palmítico	4.6
Esteárico	2.4
Oleico	15.4
Linoleico	14.5
Linolénico	63.2

**EVENING PRIMOROSE oil ( $\omega$ -6)**

Ácido graso	Contenido (%)
Palmítico	6.0
Esteárico	0.9
Oleico	5.0
Linoleico	73.5
Gama-linoleico	13.7
Linolénico	0.9

**ACEITE DE AGUACATE ( $\omega$ -9)**

Ácido graso	Contenido (%)
Palmítico	5.6
Esteárico	1.5
Oleico	73.4
Linoleico	19.2
Linolénico	0.4

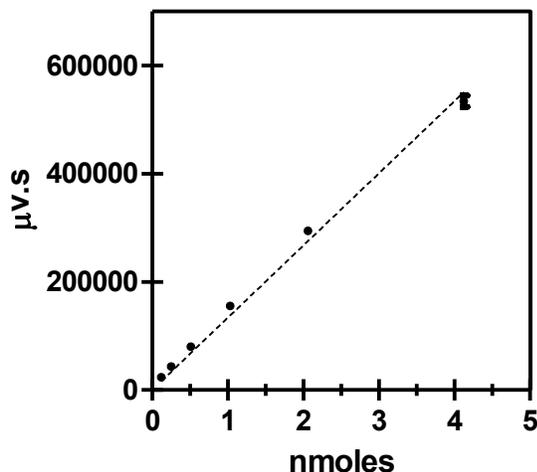
**Anexo 3. Análisis del contenido del alimento (Nutricubos) por cromatografía de gases**

Ácido graso	Contenido (%)	
Mirístico	<b>2.2</b>	<b>± 0.5</b>
Palmítico	<b>18.4</b>	<b>± 2.1</b>
Palmitoleico	<b>3.7</b>	<b>± 0.5</b>
Estearico	<b>4.3</b>	<b>± 0.3</b>
Oleico	<b>23.6</b>	<b>± 0.9</b>
Linoleico	<b>39.4</b>	<b>± 1.9</b>
γ-Linoleico	<b>3.3</b>	<b>± 0.1</b>
Linolénico	<b>0.4</b>	<b>± 0.1</b>
Araquídico	<b>0.1</b>	<b>± 0.1</b>
Araquidónico	<b>0.2</b>	<b>± 0.2</b>
EPA	<b>2.1</b>	<b>± 0.7</b>
DHA	<b>1.6</b>	<b>± 0.5</b>
NI	<b>0.7</b>	<b>± 0.2</b>

**Anexo 4. CROMATOGRAFÍA DE GASES PARA METIL ÉSTERES ESTANDAR**

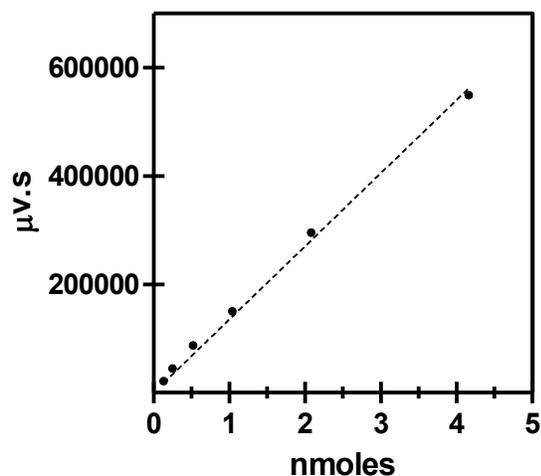
**Mirístico PM= 242.4 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.12	23789 $\pm$ 497
0.062	0.25	43206 $\pm$ 2662
0.125	0.51	80097 $\pm$ 2363
0.25	1.03	155662 $\pm$ 3412
0.5	2.06	294004 $\pm$ 9577
1	4.12	534116 $\pm$ 17855



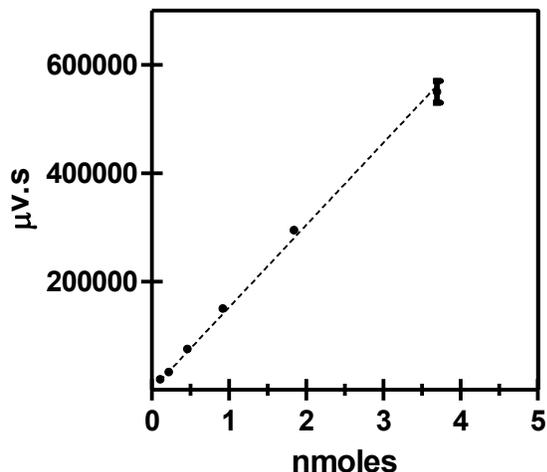
**Miristoleico PM= 240 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.13	21437 $\pm$ 1965
0.062	0.25	44828 $\pm$ 1752
0.125	0.52	87001 $\pm$ 2811
0.25	1.04	150272 $\pm$ 2185
0.5	2.08	295529 $\pm$ 5390
1	4.16	549314 $\pm$ 5414



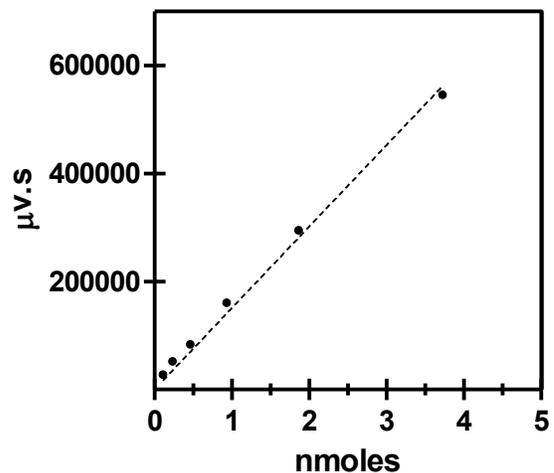
**Palmitico PM= 270.5 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.11	19292 $\pm$ 814
0.062	0.22	32807 $\pm$ 8058
0.125	0.46	75609 $\pm$ 3509
0.25	0.92	150273 $\pm$ 2706
0.5	1.84	295016 $\pm$ 3310
1	3.69	550092 $\pm$ 34420



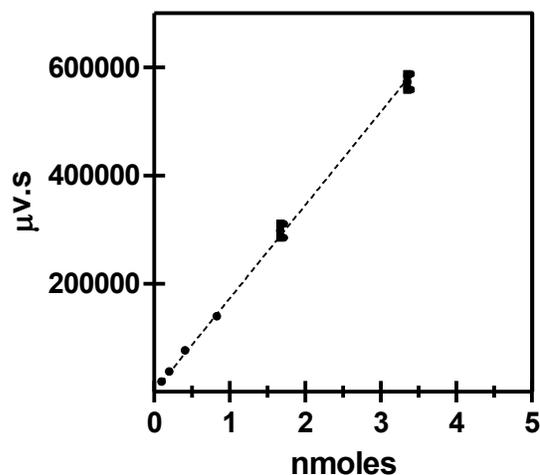
**Palmitoleico PM= 268.5 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.11	$27556 \pm 288$
0.062	0.23	$52148 \pm 1532$
0.125	0.46	$83778 \pm 3037$
0.25	0.93	$160805 \pm 2001$
0.5	1.86	$294963 \pm 4008$
1	3.72	$545871 \pm 2364$



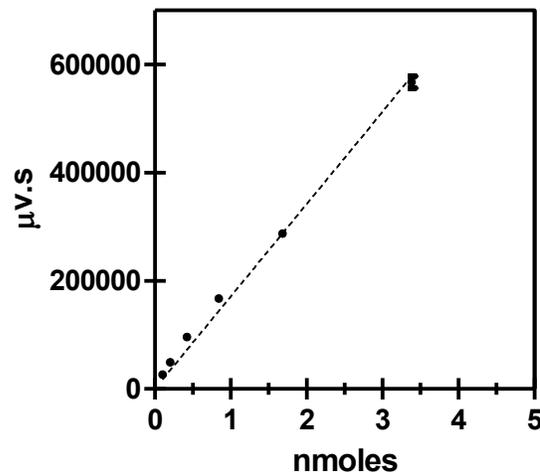
**Esteárico PM= 298 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.10	$18979 \pm 1255$
0.062	0.20	$37353 \pm 85$
0.125	0.41	$76946 \pm 2977$
0.25	0.83	$139516 \pm 7328$
0.5	1.67	$297737 \pm 21904$
1	3.35	$573184 \pm 25144$



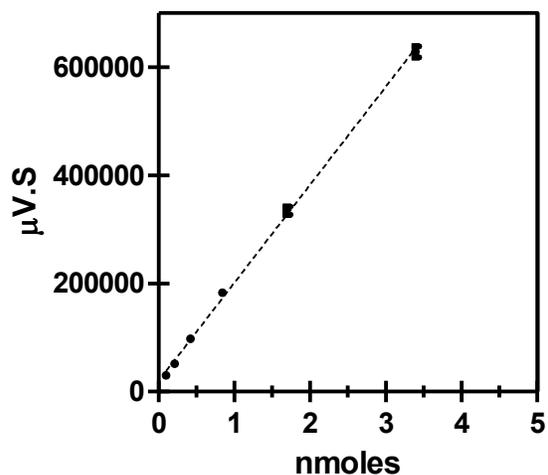
**Oleico PM= 296 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.10	$26493 \pm 780$
0.062	0.20	$49047 \pm 2239$
0.125	0.42	$96032 \pm 1836$
0.25	0.84	$166914 \pm 3568$
0.5	1.68	$282509 \pm 9077$
1	3.38	$528656 \pm 19003$



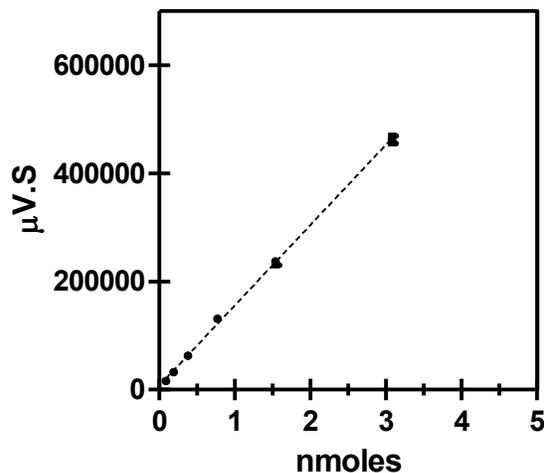
**Linoleico PM= 294.5 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.10	$29809 \pm 1254$
0.062	0.21	$51776 \pm 1824$
0.125	0.42	$97551 \pm 4140$
0.25	0.84	$183003 \pm 7534$
0.5	1.69	$334421 \pm 12944$
1	3.39	$628264 \pm 17764$



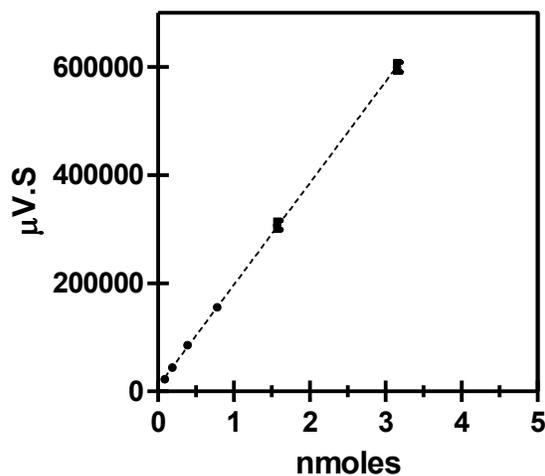
**Araquídico PM= 324 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.09	$15976 \pm 1309$
0.062	0.19	$32568 \pm 2426$
0.125	0.38	$62871 \pm 1699$
0.25	0.77	$130831 \pm 3685$
0.5	1.54	$236835 \pm 11246$
1	3.08	$462529 \pm 12198$



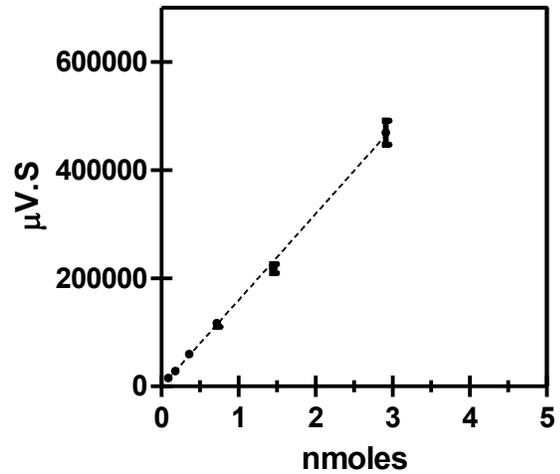
**EPA PM= 316.48 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.09	$22342 \pm 625$
0.062	0.19	$43937 \pm 2162$
0.125	0.39	$85249 \pm 1337$
0.25	0.77	$155450 \pm 4865$
0.5	1.57	$307262 \pm 14575$
1	3.15	$599530 \pm 15690$



**DHA PM= 342.5 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.09	$15557 \pm 1052$
0.062	0.18	$28532 \pm 44696$
0.125	0.36	$60000 \pm 1382$
0.25	0.72	$116726 \pm 11456$
0.5	1.45	$217828 \pm 14706$
1	2.91	$469553 \pm 38411$



**Docosanoico PM= 354.6 g/mol**

$\mu\text{g}$	nmoles	$\mu\text{V.S}$
0.031	0.08	$19130 \pm 1009$
0.062	0.17	$37863 \pm 2171$
0.125	0.35	$75314 \pm 6651$
0.25	0.70	$127430 \pm 7120$
0.5	1.41	$240314 \pm 16091$
1	2.82	$480967 \pm 8884$

