



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA LINOLÉNICO SOBRE PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS DE MEMBRANAS MITOCONDRIALES Y SU REPERCUSIÓN
EN LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DURANTE EL DESARROLLO DE LA
DIABETES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

PÉREZ HERNÁNDEZ ISMAEL HERMINIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR RICARDO MEJIA ZEPEDA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
COMITÉ TUTOR: DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"
COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LOS REYES IXTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO AGOSTO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOMEDICINA

**EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA LINOLÉNICO SOBRE PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS DE MEMBRANAS MITOCONDRIALES Y SU REPERCUSIÓN
EN LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DURANTE EL DESARROLLO DE LA
DIABETES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

PÉREZ HERNÁNDEZ ISMAEL HERMINIO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR RICARDO MEJIA ZEPEDA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
COMITÉ TUTOR: DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHAVEZ"
COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

MÉXICO, CD. MX. AGOSTO 2018



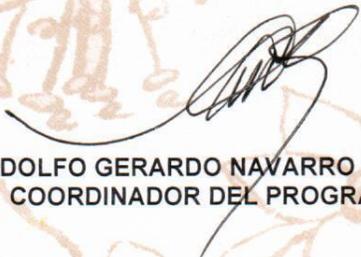
LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de agosto de 2017, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **PEREZ HERNANDEZ ISMAEL HERMINIO**, con número de cuenta **300143188**, con la tesis titulada "Efecto del ácido alfa linolénico sobre propiedades fisicoquímicas de membranas mitocondriales y su repercusión en la actividad mitocondrial durante el desarrollo de la diabetes", realizada bajo la dirección del **DR. RICARDO MEJIA ZEPEDA**:

Presidente: DRA. ROCIO SALCEDA SACALLANES
Vocal: DR. HUGO VIRGILIO PERALES
Secretario: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Suplente: DR. DIEGO GONZALEZ HALPHEN
Suplente: DR. OSCAR FLORES HERRERA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 13 de marzo de 2018.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos Institucionales

Al posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado (Becario233851/CVU 329213)

Al apoyo otorgado por la UNAM-DGAPA a través de los proyectos PAPIIT IN216314-3 e IN215917-3 al Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por la beca de tesis folio 17BBTD0115

Al Dr. Ricardo Mejía Zepeda por su apoyo para la realización del proyecto de investigación.

A los miembros del comité tutor: Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal y al Dr. Luis Arturo Baiza Gutman por sus valiosos comentarios y apoyo durante el desarrollo del presente proyecto de investigación.

Agradecimientos a Título Personal

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Por brindarme un hogar en el que encontré grandes amigos, trabajo, al amor de mi vida y que me ha mostrado el universo del conocimiento. Mis años más felices los he vivido en sus aulas. Gracias a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por ser mi casa durante los últimos 15 años de mi vida.

Al Dr. Ricardo Mejía Zepeda por la oportunidad de realizar la tesis de licenciatura, maestría y doctorado. Por el apoyo otorgado durante estos años en su laboratorio; por sus enseñanzas, sus conocimientos y su gran ejemplo en la investigación.

Al Dr. Arturo Baiza Gutman por su gran apoyo en los momentos más difíciles durante el doctorado. Gracias por su orientación y el tiempo dedicado durante la candidatura, fue usted pieza fundamental para aprobar mi examen. Asimismo, agradezco su valiosa amistad y sus consejos de vida que me han ayudado a comprender mejor el mundo laboral, académico y vivencial.

A la Dra. Cecilia Zazueta por brindarme el apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Biomedicina Cardiovascular. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y hacerme sentir parte de su equipo de trabajo, por sus palabras de aliento, guía y orientación durante mi examen de candidatura.

Al Dr. Francisco Correa Segura. Gracias por enseñarme las técnicas para aislamiento de mitocondrias, por su apoyo en los análisis de resultados e invitarme a los seminarios de su grupo de trabajo. Agradezco las pláticas y gratos momentos que me brindó durante mi estancia en el laboratorio de Biomedicina Cardiovascular.

Al Dr. Martin Palomar Morales por las facilidades y soporte en su laboratorio para la realización de algunas técnicas experimentales. Agradezco su apoyo, sus consejos y su paciencia durante mi proyecto de tesis de doctorado.

A los Dres. Oscar Flores Herrera, Diego González Halphen y a la Dra. Rocío Salceda Sacanelles por sus valiosos comentarios y revisión de la presente tesis.

Al Dr. Hugo Perales. Gracias por su interés e importantes preguntas sobre mi proyecto de investigación. Usted ha sido un gran ejemplo para mí como persona, investigador y docente. Agradezco su gran apoyo durante esta última etapa de escritura de tesis.

A la Farmacéutica Neolpharma por darme la oportunidad de integrarme a la industria y las facilidades otorgadas para la realización de los trámites de tesis. Gracias a mis compañeros de laboratorio: **Eleazar, Gabriela, Angélica (Lucero), Gustavo, David y Sandra** por apoyarme en este último tramo del doctorado. A **Javier (Tito)** por tu apoyo y consejos que me han servido para ser un mejor profesionalista.

Dedicatoria

A Jehová por darme la vida y el regalo de la existencia. Gracias Padre por ser mi fortaleza, darle sentido a mi vida, darme tu bondad y amor en los momentos más difíciles de la vida. Por enseñarme a no inquietarme, a sentir tu paz y tu bondad hacia mí. Gracias por un día más de vida y por tu infinita bondad.

A mi esposa Norma: Por llenar de alegría cada página de nuestra historia. Eres mi inspiración para ser una mejor persona. Agradezco tus palabras de aliento y tu apoyo en los momentos difíciles. Por ponerme los pies en la tierra cuando lo he necesitado y ser una luz que guía mis pasos. Te amo infinitamente amor

A mis Padres Sofía e Ismael: Han sido inspiración y fortaleza en mi vida. Gracias por su cuidado, su amor incondicional y sus enseñanzas. He sido afortunado al crecer a su lado.

A mis hermanas Cecilia, Cynthia y Eira: Sin duda mi más grande tesoro, gracias por sus palabras de aliento, su amor, sus bromas y sobre todo por seguir creyendo en mí. Las amo hermanitas. **A mi sobrino Saúl:** Por llenar de alegría nuestras vidas.

A la Familia Carraro Morales: Sr. Salvador, Sra Merced, Cinthia, Karla y Lucero. Gracias por aceptarme como un miembro más de la familia y brindarme su valioso apoyo. Gracias suegros por el calor de hogar, por las noches de música y tardes de convivencia.

A mi hermano Omar: Por las noches de música, el buen rock y las pláticas más profundas que me han enseñado a disfrutar la vida. Gracias por tus sabias palabras hermano, por tu cariño y tu fortaleza. Has sido un maestro de vida y gran amigo.

A Daniel, Dous, Alan, Jovani, Mauro Saúl (Rayo): Por brindarme su amistad y su apoyo durante estos años. Gracias por sus visitas a casa y por dejarme entrar en sus vidas.

A Gina. Gracias por su paciencia y apoyo durante estos años en el posgrado, por sus regaños, sus consejos y por ser una gran amiga.

A Pilar: Gracias amiga, por estar a mi lado en los buenos y malos ratos que he vivido durante los últimos años. Nuevamente comparto un logro más contigo ya que has sido parte fundamental para poderlo realizar.

A la Sra Lourdes y a la Sra Edith: Por acercarme a jehová, por sus enseñanzas y por darme un lugar especial los sábados por la mañana. Agradezco su apoyo, sus sabios consejos y la guía espiritual que me han otorgado.

A Bobby: Por ser mi amigo inseparable en los buenos y malos momentos durante 14 años. Algún día nos volveremos a encontrar amigo y caminaremos juntos por la eternidad.

*Porque sabemos agradecer a pesar de lo vivido
porque de todo comienza a ser ya mucho tiempo
porque quien encontró el amor no lo buscaba tanto
porque las cosas cambian.*

E. Bunbury

ÍNDICE

Índice de figuras	i
Índice de tablas	iii
Abreviaturas	iv
Resumen	1
Abstract	4
1. Introducción	7
1.1 Diabetes mellitus	8
1.2 Clasificación de la diabetes	8
1.3 Tratamiento para el control de la diabetes	10
1.4 Ácidos grasos omega-3 y su efecto en el desarrollo de la diabetes	15
1.5 Mitocondrias	19
1.6 Membranas mitocondriales cadena respiratoria	20
1.7 Disfunción mitocondrial y cambios en la fluidez membranal durante el desarrollo de la diabetes	21
2. Objetivos	25
2.1 Objetivos particulares	25
3. Material y métodos	26
3.1 Animales	26
3.2 Química sanguínea	27
3.3 Aislamiento de mitocondrias y determinación del consumo de oxígeno	28
3.4 Extracción de lípidos totales de mitocondrias de hígado	29
3.5 Metilación de ácidos grasos de mitocondrias de hígado	29
3.6 Análisis de la composición de ácidos grasos de mitocondrias de hígado	30
3.7 Análisis de la fluidez membranal de mitocondrias de hígado	30
3.8 Determinación de Malondialdehído (MDA) por método de TBARS	31
3.9 Análisis estadístico	32

4. Resultados	33
4.1 Peso corporal y glucosa sanguínea	33
4.2 Colesterol y triglicéridos	39
4.3 Actividad mitocondrial	41
4.4 Composición de ácidos grasos de mitocondrias de hígado	45
4.5 Fluidez membranal de mitocondria de hígado	51
4.6 Lipoperoxidación en mitocondrias de hígado	59
5. Análisis y discusión	61
5.1 Desarrollo de diabetes tipo 2	61
5.2 Efecto de los ácidos grasos omega-3 en el metabolismo de carbohidratos y lípidos	65
5.3 Mitocondrias de hígado función mitocondrial, composición de ácidos grasos y fluidez membranal.....	69
5.4 Lipoperoxidación mitocondrial	73
6. Conclusiones	77
7. Referencias bibliográficas	79
8. Apéndice	90
8.1 Apéndice I. Datos de microsomas.....	90
8.1.1 Microsomas de Hígado	90
8.1.2 Ailamiento de microsomas de hígado y análisis de la fluidez membranal	90
8.1.3 Extracción de lípidos totales de microsomas de hígado	91
8.1.4 Metilación de ácidos grasos de microsomas	91
8.1.5 Análisis de la composición de microsomas de hígado	91
8.1.6 Análisis de la fluidez membranal de microsomas de hígado	92
8.1.7 Composición de ácidos grasos de microsomas de hígado	95
8.2 Apéndice II. Artículo requisito.....	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Mecanismos de acción de la metformina en la célula.....	11
Fig. 2. Mecanismos de acción de las sulfonilureas	13
Fig. 3. Mecanismos de acción de las tiazolidinedionas.....	14
Fig. 4. Funciones y efectos de los ácidos grasos poliinsaturados.....	16
Fig. 5. Isoformas de PPARs y su participación en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.	18
Fig. 6. Concentración de glucosa sanguínea y peso corporal en neonatos control y ratas diabéticas durante el primer mes de vida	33
Fig. 7. Curva de tolerancia a la glucosa a diferentes tiempos en ratas C y STZ al mes de vida.	34
Fig. 8. Concentración de glucosa sanguínea en grupo control y en el grupo STZ a diferentes edades.....	35
Fig. 9. Concentración de glucosa sanguínea de los animales suplementados con ALA a diferentes edades.....	36
Fig. 10. Comparación de la glucosa sanguínea en el grupo Control y el grupo ALA durante los 6 meses de experimentación.	37
Fig. 11. Concentración de glucosa en los grupos de ratas Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad.	38
Fig. 12. Peso corporal y concentración de glucosa sanguínea de los grupos de ratas Wistar durante los 6 meses de vida.	39
Fig. 13. Concentración de lípidos sanguíneos en ratas Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad.....	39
Fig. 14. Actividad mitocondrial a 1 mes de edad.....	41
Fig. 15. Actividad mitocondrial a 3 meses de edad.....	42
Fig. 16. Actividad mitocondrial a 6 meses de edad.....	43

Fig. 17. Análisis del control respiratorio de mitocondrias de hígado de los grupos Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad.....	44
Fig. 18. Contenido de AGPIs ω -3 (mol %) en membranas mitocondriales de hígado de ratas Wistar a 6 meses de edad.....	49
Fig. 19. Cociente de insaturación de ácidos grasos mitocondriales de hígado de ratas Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad.	50
Fig. 20. Medición de fluidez membranal de mitocondrias de hígado de ratas control y diabéticas detectadas con los monitores fluorescentes	53
Fig. 21. Medición de fluidez membranal a los 6 meses de edad detectada por el DPiP a diferentes temperaturas	56
Fig. 22. Cociente de insaturación de ácidos grasos de membranas mitocondriales a 6 meses de edad. Fluidez membranal (38 ° C) por el monitor de fluorescencia DPyP en membranas mitocondriales a 6 meses de edad.	57
Fig. 23. Cambios en la fluidez membranal y CR al paso del tiempo (1, 3 y 6 meses de edad).....	58
Fig. 24. Cambios en la fluidez membranal y CR en los grupos suplementados con ALA al paso del tiempo (1, 3 y 6 meses de edad).	59
Fig. 25. Lipoperoxidación en membranas mitocondriales durante el desarrollo de la diabetes y/o con el suplemento de ALA (A) 1 mes de edad y (B) 6 meses de edad.....	60
Fig. 26 Fluidez membranal detectada por el monitor fluorescente DPiP en microsomas de hígado de Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad	93
Fig. 27 Fluidez membranal detectada por el monitor fluorescente DPiP en microsomas de hígado de Wistar vs SHR a 1, 3 y 6 meses de edad.....	94
Fig. 28 Cociente de insaturación de microsomas de hígado de los grupos Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad.....	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 1 mes de edad.....	46
Tabla 2. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 3 meses de edad.....	47
Tabla 3. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar a 6 meses de edad.....	48
Tabla 4. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y cristal líquido de mitocondrias de hígado de ratas Wistar a 1 mes de edad.....	55
Tabla 5 Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de hígado a 1 mes de edad.....	95
Tabla 6 Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de hígado a 3 meses de edad.....	97
Tabla 7 Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de hígado a 6 meses de edad.....	98

ABREVIATURAS

ADA	American Diabetes Association
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difosfato
AGLs	Ácidos grasos libres
AGPIs ω-3	Ácidos grasos poliinsaturados ω -3
ALA	Ácido alfa linoleico
AMP	Adenin Monofosfato
ATP	Adenosin trifosfato
BF3	Trifluoruro de boro
C-ALA	Grupo control
CAT	Catalasa
CR	Control respiratorio
DHA	Ácido docosahexaenoico
DM	Diabetes Mellitus
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DM2	Diabetes Mellitus tipo 2
DPH	Difenilhexatrieno
DPIP	Dipirenilpropano
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FAD	Flavin adenin dinucleótido
FADH	Flavin adenin dinucleótido reducido
FFAR4	Free fatty acids receptor 4
GK	Glucocinasa
GLP-1	Glucagon-like peptide 1
GLUT2	Glucotransportador 2
GLUT4	Glucotransportador 4
GNC	General Nutrition Center
GPR120	G protein-coupled receptor 120
GPx	Glutation peroxidasa
GYS1	Glucogeno sintasa 1

HNF-4α	Factor 4 α nuclear de hepatocitos
hOCT1	Organic Cation Transporter
I/m	Intensidad de fluorescencia de monómero
Ie	Intensidad de fluorescencia de excímero
Ins/Sat	Cociente de insaturación
IRS	Receptor de insulina
JNK	Jun NH2 terminal-kinase
LDL	Por sus siglas en inglés: low density lipoprotein
MDA	Malondialdehído
NAD	Nicotinamida adenin dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenin dinucleótido reducido
NF-κB	Factor nuclear κ B
OMS	Organización mundial de la salud
PPAR γ	Receptores activados por proliferación de peroxisomas isoforma γ
PPARs	Por sus siglas en inglés peroxisome proliferator-activated receptors
RXR	Receptor de ácido 9-cis retinoico
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SOD	Superóxido dismutasa
SREBP	Sterol regulatory element-binding proteins
STZ	Estreptozotocina
SUR1	sulfonylurea receptors
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TMA-DPH	Trimetilamonio-Difenilhexatrieno
TZDs	Tiazolidinedionas
VLDL	Por sus siglas en inglés: Very low density lipoprotein

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome multifactorial crónico degenerativo, que se caracteriza por concentraciones elevadas de glucosa en sangre. La DM tipo2 (DM2) es la forma más frecuente de diabetes, se caracteriza por trastornos de la acción y/o de la secreción de insulina y corresponde al 90% de los pacientes diabéticos. Se sabe que los factores genéticos y ambientales influyen en el establecimiento de dicha patología, sin embargo, los mecanismos por los que se desarrolla la diabetes aún no se han descifrado en su totalidad. La disfunción de las mitocondrias está estrechamente relacionada con desordenes metabólicos como la diabetes. Se ha encontrado que la actividad mitocondrial es anormal en tejidos involucrados en el desarrollo de diabetes. Asimismo, los cambios en las propiedades físicas y químicas de las membranas mitocondriales pueden modificar la actividad de estos organelos y consecuentemente llevar a que sean disfuncionales.

Algunos investigadores han mostrado que el consumo de Ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) repercute en la composición de las membranas mitocondriales, incrementando el índice de insaturación y la fluidez membranal modificando la función de las mitocondrias. No obstante, son pocos los estudios enfocados en observar los efectos del ácido alfa linolénico (ALA) en la función mitocondrial durante el desarrollo de la diabetes. El objetivo general del presente estudio fue determinar el efecto del ácido alfa linolénico (ALA) en las propiedades fisicoquímicas de membranas de mitocondrias de hígado de ratas Wistar y su repercusión en la actividad mitocondrial durante el desarrollo de la diabetes.

Se generó un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar de 48 h mediante una inyección intraperitoneal con una dosis única de estreptozotocina (STZ) de 135 mg/kg de peso corporal en amortiguador de citratos pH 4.6. A las ratas control de 48h de nacidas se les inyectó únicamente amortiguador de citratos. Se destetaron a las 4 semanas de edad y cada grupo se dividió en dos, a uno de ellos se le suministró aceite de linaza (rico en ácido alfa linolénico) como suplemento por medio de una cánula (125 mg de aceite de linaza/kg de peso corporal 5 días a la semana), de esta manera quedaron cuatro grupos de ratas: C, STZ, STZ-ALA y C-ALA. Se hizo el seguimiento semanal de la glucosa sanguínea, así como las

mediciones mensuales de colesterol y triglicéridos sanguíneos. El sacrificio de al menos 4 animales se realizó a 1, 3 y 6 meses de edad. Se removieron los hígados y a partir de estos se obtuvieron las mitocondrias por centrifugación diferencial. El consumo de oxígeno mitocondrial se determinó mediante oximetría polarográfica con un electrodo tipo Clark. El análisis de la composición de ácidos grasos, se realizó con un cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin-Elmer. Para evaluar la lipoperoxidación en membranas mitocondriales se determinó la concentración de malondialdehído (MDA) mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico. Para analizar la fluidez membranal, se incorporó el monitor fluorescente dipirenil propano (DPIP) a las mitocondrias y se midió la fluorescencia en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55.

El grupo diabético (STZ) mostró concentraciones altas de glucosa a lo largo de los 6 meses de experimentación (210 ± 40 mg/dl a 408 ± 10). Al suplementar con ALA se observó que en el grupo STZ-ALA se controló la glicemia a los 3 meses de edad, llegando a concentraciones basales, manteniéndose así hasta los 6 meses de vida. La concentración de glucosa en el grupo C-ALA incrementó significativamente con respecto al grupo C y al grupo STZ-ALA, generándose probablemente resistencia a la insulina como consecuencia del suplemento. Con respecto a los lípidos sanguíneos, a los 6 meses de edad se observó que los animales diabéticos tuvieron un incremento en la concentración de triglicéridos y colesterol sanguíneos (260 mg/dl y 220 mg/dl respectivamente) mientras que el grupo control presentó concentraciones bajas en triglicéridos y colesterol (160 y 180 mg/dl respectivamente). El suplemento de ALA controló la concentración de triglicéridos sanguíneo en las STZ-ALA a los 6 meses de vida llegando a 162 ± 6 mg/dl de triglicéridos, significativamente más bajo con respecto a las ratas diabéticas y control. En el caso de la respiración mitocondrial, el grupo diabético mostró un decremento en el control respiratorio (CR) a partir del mes de vida, disminuyendo severamente a los 6 meses de edad. Al suplementar a los respectivos grupos, se observó que el CR de STZ-ALA y C-ALA fue mayor con respecto al grupo control. En la composición de ácidos grasos se observó que con el desarrollo de DM hubo una tendencia al aumento de ácidos grasos saturados y un decremento de los ácidos grasos insaturados en las membranas mitocondriales de los animales diabéticos. Asimismo, la modificación en la composición de ácidos grasos incidió en la fluidez membranal, repercutiendo en la actividad

mitocondrial. En los grupos suplementados, observamos que las membranas mitocondriales presentaron un mayor contenido de AGPIs, (ALA y EPA). Finalmente se observó un aumento en el contenido de MDA en las mitocondrias del grupo STZ (2.6 ± 0.2) con respecto al grupo control (0.9 ± 0.09). En el caso del grupo STZ-ALA, se observó una concentración baja, similar a la del grupo control (0.7 ± 0.09). Por el contrario, en el grupo C-ALA la lipoperoxidación parece exacerbarse, ya que el contenido de MDA fue de 1.5 ± 0.11 , ligeramente más baja que en los animales diabéticos, pero significativamente mayor que en el grupo control.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a chronic degenerative multifactorial syndrome, characterized by elevated blood glucose levels. Type 2 DM (DM2) is the most frequent form of diabetes, it is characterized by disorders of action and / or insulin secretion and corresponds to 90% of diabetic patients. It is known that genetic and environmental factors influence the establishment of this pathology, however, the mechanisms by which diabetes develops have not yet been described. Mitochondria dysfunction is closely related to metabolic disorders such as diabetes. It has been found that mitochondrial activity is abnormal in tissues involved in the development of diabetes. Also, changes in the physical and chemical properties of mitochondrial membranes can modify the activity of these organelles and consequently lead to them being dysfunctional.

Some researchers have shown that the consumption of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) affects the composition of mitochondrial membranes, increasing the rate of unsaturation and membrane fluidity, consequently improving the function of mitochondria. However, there are few studies focused on observing the effects of alpha-linolenic acid (ALA) on mitochondrial function during the development of diabetes. The objective of this study was to determine the effect of alpha linolenic acid (ALA) on the physicochemical properties of liver mitochondria membranes of Wistar rats and their impact on mitochondrial activity during the development of diabetes.

Type 2 diabetes was induced in newborn male Wistar rats (48 h-old) by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) of 135 mg / kg body weight dissolved in citrate buffer pH 4.6. The control rats were injected with citrate buffer. They were weaned at 4 weeks of age and each group was divided into two, one of them was supplied with flaxseed oil (rich in alpha linolenic acid) as a supplement through a cannula (125 mg flaxseed oil / kg body weight 5 days a week), in this way there were four groups of rats: C, STZ, STZ-ALA and C-ALA. Weekly monitoring of blood glucose was carried out, as well as monthly measurements of cholesterol and blood triglycerides. The rats were killed at 1, 3 and 6 months of age. The liver mitochondria were isolated by differential centrifugation.

Mitochondrial oxygen consumption was determined by polarographic oximetry with a Clark-type electrode. The analysis of the fatty acid composition was carried out in a Perkin Elmer Clarus 500 chromatograph. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane was estimated by the concentration of malondialdehyde (MDA). To evaluate the mitochondrial membrane fluidity, the fluorescence of dipyrrenil propane (DPyP) incorporated into the mitochondrial membranes was measured in a Perkin Elmer Fluorescence spectrometer LS55

The diabetic group (STZ) showed high glucose concentrations during the 6 months of experimentation (210 ± 40 mg / dl to 408 ± 10). When supplemented with ALA, it was observed that in the STZ-ALA group the glycaemia was controlled at 3 months of age, reaching baseline concentrations, thus remaining until 6 months of age. The concentration of glucose in the C-ALA group increased significantly with respect to group C and the STZ-ALA group, probably generating insulin resistance as a consequence of the supplement. Regarding blood lipids, at 6 months of age it was observed that the diabetic animals had an increase in the concentration of triglycerides and blood cholesterol (260 mg/dl and 220 mg/dl respectively) while the control group presented low concentrations in triglycerides and cholesterol (160 and 180 mg/dl respectively). The ALA supplement controlled the concentration of blood triglycerides in the STZ-ALA at 6 months of life, reaching 162 ± 6 mg/dl of triglycerides, significantly lower respect to the diabetic and control rats. In the case of mitochondrial respiration, the diabetic group showed a decrease in respiratory control (CR) from the month of life, decreasing severely at 6 months of age. When supplementing the respective groups, it was observed that the CR of STZ-ALA and C-ALA was greater with respect to the control group. In the composition of fatty acids it was observed that with the development of DM there was a tendency to increase saturated fatty acids and a decrease of unsaturated fatty acids in the mitochondrial membranes of diabetic animals. Likewise, the modification in the composition of fatty acids affected the membrane fluidity, affecting mitochondrial activity. In the supplemented groups, we observed that the mitochondrial membranes presented a higher content of PUFAs, (ALA and EPA). Finally, an increase in the MDA content was observed in the mitochondria of the STZ group (2.6 ± 0.2) with respect to the control group (0.9 ± 0.09). In the case of the STZ-ALA group, a low concentration was observed, similar to that of the control group (0.7 ± 0.09). In contrast, in the C-ALA group

lipoperoxidation seems to be exacerbated, the MDA content was 1.5 ± 0.11 , slightly lower than in the diabetic animals, but significantly higher than in the control group.

1. INTRODUCCIÓN

La DM es un síndrome multifactorial crónico degenerativo, caracterizado por concentraciones elevadas de glucosa en sangre. La DM2 es la forma más frecuente de diabetes, se caracteriza por trastornos de la acción y/o de la secreción de insulina y corresponde al 90% de los pacientes diabéticos. Se sabe que los factores genéticos y ambientales influyen en el establecimiento de dicha patología, sin embargo, los mecanismos por los que se desarrolla la diabetes aún no se han descifrado en su totalidad (Malecki, 2005, Dey y Swaminathan 2010, Flachs *et al.*, 2014). Diferentes autores indican que existen diversos mecanismos y modificaciones de la célula relacionadas con el establecimiento de la DM, incluyendo alteraciones en la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares y mitocondriales (Waczulikova 2007, Pérez-Hernández *et al.*, 2010, Figueroa-García *et al.*, 2015).

La disfunción de las mitocondrias está estrechamente relacionada con desordenes metabólicos (Sorriento *et al.*, 2014) como la diabetes. Al respecto, se ha encontrado que la actividad mitocondrial es anormal en diversos tejidos involucrados en el desarrollo de síndrome metabólico y de resistencia a la insulina, incluyendo el músculo esquelético, el hígado, tejido adiposo, el corazón y páncreas (Bugger y Dale 2008, De Pauw *et al.*, 2009) Asimismo, los cambios en las propiedades físicas y químicas de las membranas mitocondriales pueden modificar la actividad de estos organelos y consecuentemente llevar a que sean disfuncionales (Waczulikova, 2007, Matravadia *et al.*, 2014, Figueroa-García *et al.*, 2015)

Durante los últimos años se ha propuesto el uso de ácidos grasos poliinsaturados ω -3 (AGPIs ω -3) principalmente de cadena larga, como son el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) en el control de la diabetes (Poudyal 2011), debido principalmente a sus efectos antiinflamatorios (Oh y Walenta, 2014) hipolipidémicos (Rossmeisl *et al.*, 2012) e hipoglucémicos (Oh *et al.* 2010). Algunos investigadores han mostrado que el consumo de AGPIs repercute en la composición de las membranas mitocondriales, incrementando el índice de insaturación y la fluidez membranal (Jump 2002,

Leonard *et al.*, 2004, Das 2006, Rohrbach 2009; Yu *et al.*, 2014) modificando la función de las mitocondrias. No obstante, son pocos los estudios enfocados en observar los efectos del ácido alfa linolénico (ALA) en la función mitocondrial durante el desarrollo de la diabetes.

En la siguiente sección se abordarán algunos detalles e información básica sobre las características distintivas de la DM2, los factores que contribuyen a su desarrollo y la relación de esta enfermedad con las modificaciones en las membranas mitocondriales.

1.1 Diabetes mellitus

Actualmente, la diabetes mellitus es un problema de salud que afecta alrededor de 415 millones de personas alrededor del mundo. Se estima que para el año 2040 este número incrementa a 642 millones de personas (IDF Diabetes Atlas 2015). La diabetes engloba una serie de alteraciones metabólicas, caracterizadas por un estado crónico de hiperglicemia, así como modificaciones en el metabolismo de lípidos y proteínas que resultan de defectos en la secreción de insulina, resistencia a la acción de dicha hormona o ambos (Bennett, 2003, Atkinson 2014). Las causas de la DM son múltiples, sin embargo, los factores genéticos y ambientales tienen un papel importante en la etiología de esta enfermedad (Kuzuya *et al.*, 2002).

1.2 Clasificación de la diabetes

La DM ha sido clasificada en varias categorías, como son: **Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)**, de tipo autoinmune, en la que el sistema de defensas del organismo ataca a las células β -pancreáticas encargadas de la síntesis de insulina (Wherrett, 2014). **Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)**: causada por factores como son la resistencia a la insulina o una producción baja de insulina por parte de las células β pancreáticas (Kuzuya *et al.*, 2014). **Diabetes Mellitus Gestacional**: se presenta por alteraciones hormonales durante el embarazo. Se caracteriza por hiperglucemia crónica que aparece generalmente en el último trimestre del embarazo como consecuencia de la condición diabetogénica del mismo (Febres *et al.*, 2000). **Otros tipos específicos de diabetes mellitus**: Defectos genéticos de las células β

pancreáticas, enfermedades del páncreas exógeno o inducida por agentes químicos. A continuación, se describirá con mayor detalle las características de la DM1 y DM2

Diabetes mellitus tipo 1: ésta se establece como consecuencia de una reacción autoinmune que da como resultado la destrucción de las células β pancreáticas, mientras que la diabetes tipo 2 es causada principalmente por resistencia a la insulina (Blake y Trounce 2014). La reducción del número de células β pancreáticas ocasiona una incapacidad para mantener las concentraciones necesarias de insulina en respuesta a la ingesta calórica. Esta patología es la variedad más frecuente que ocurre principalmente en sujetos jóvenes. En estas personas la enfermedad se caracteriza por el comienzo repentino de síntomas: poliuria, polidipsia y polifagia (Wherrett 2014, Atkinson 2014).

En México la incidencia de DM1 en pacientes entre 10 y 19 años se duplicó durante la última década, con un registro de 6.2 casos nuevos por cada 100,000 habitantes en el año 2010. Para controlar la DM1 se han propuesto diversas estrategias como el trasplante pancreático y el uso de fármacos inmunomoduladores para disminuir la destrucción de células β pancreáticas, con resultados poco eficientes. El tratamiento recomendado es la administración de insulina de forma basal y en bolos o en bomba de infusión (Atkinson 2014).

Diabetes mellitus tipo 2: Se caracteriza por un déficit en la acción y/o secreción de la insulina. La DM2 se desarrolla principalmente en edades adultas, sin embargo también puede llegar a ocurrir en personas jóvenes. Al igual que en la DM1, parte de los síntomas de esta patología son la poliuria, polidipsia y polifagia (Kuzuya *et al.*, 2014).

La disminución en la secreción de insulina y en la sensibilidad de los tejidos a su acción (resistencia a la insulina) está involucrada en la DM2. La resistencia a la insulina se desarrolla por el déficit en la unión de dicha hormona a sus receptores, así como por la insensibilización de dichos receptores. El sobrepeso y la obesidad son los factores de mayor riesgo para el desarrollo de la resistencia a la insulina. (Bailey 2007). La hiperglucemia es la característica bioquímica fundamental de la DM2, causando estrés oxidativo, inflamación y

disfunción endotelial lo que contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares que causan un aumento de la morbilidad y mortalidad en pacientes con DM2 (Brownlee 2005).

Para atenuar y controlar los efectos del desarrollo de la DM2 se han utilizado diversas estrategias, entre las que destacan: cambios en el estilo de vida (incluyendo cambios en la dieta), control de peso corporal y actividad física. No obstante, a largo plazo llega a ser difícil mantener estos hábitos y dificulta el control de la enfermedad. Por ello la mayoría de pacientes con DM2 recurren a tratamientos orales e inyectables, los cuales atenúan los efectos de la enfermedad (Tahrani *et al.*, 2016). Sin embargo, en algunos casos dichos tratamientos pueden tener efectos adversos a la salud. En el siguiente tema se abordarán con mayor detalle los tratamientos más comunes en el control de la diabetes

1.3 Tratamientos para el control de la diabetes

El diagnóstico de DM se establece siguiendo los criterios consensuados en 1999 por la ADA (American Diabetes Association 2011) y la organización mundial de la salud (OMS). Ambas organizaciones han propuesto diversas medidas terapéuticas para el control glucémico con el fin de revertir o evitar la progresión de complicaciones secundarias a la diabetes y reducir la morbilidad y mortalidad asociada a la enfermedad. El tratamiento de la DM2 es muy complejo, es necesaria la intervención inmediata en el control de la hiperglucemia y de los factores de riesgo cardiovascular asociados a la DM como la dislipidemia y la hipertensión. En general, los fármacos utilizados en el tratamiento de la DM2 tienen un efecto hipoglucemiante similar, que varía dependiendo de los valores glucémicos previos al inicio del tratamiento (Ascaso 2014). Entre los fármacos hipoglucemiantes tradicionales se encuentran:

Biguanidas: Actualmente, la única biguanida disponible en la práctica clínica es la metformina (dimetilbiguanida). Otras biguanidas como la fenformina y la buformina han sido retiradas del mercado debido a los riesgos asociados al desarrollo de acidosis láctica. La metformina comenzó a utilizarse en Estados Unidos en el año de 1995 y llegó a ser el medicamento con mayor prescripción para el tratamiento de la DM2. La metformina entra a

la célula a través de un acarreador (“carrier”) denominado transportador de cationes orgánicos 1 (hOCT1 por sus siglas en inglés: *Organic Cation Transporter*) y ejerce múltiples acciones con o sin la presencia de insulina (Fig.1). Sus efectos dependen en gran medida de la exposición al medicamento (tiempo y concentración) y al metabolismo de los nutrientes dentro de los diferentes tejidos (Ferrannini 2014; Tahrani *et al.* 2016). En el hígado, la metformina, incrementa la señal de la insulina, reduce la acción del glucagón y reduce la gluconeogénesis por la inhibición de la fosfoenolpiruvato carboxicinas. Por otro lado, en músculo, dicho fármaco promueve la captación de la glucosa mediada por insulina a través del glucotransportador 4 (GLUT 4) (Bailey 2015).

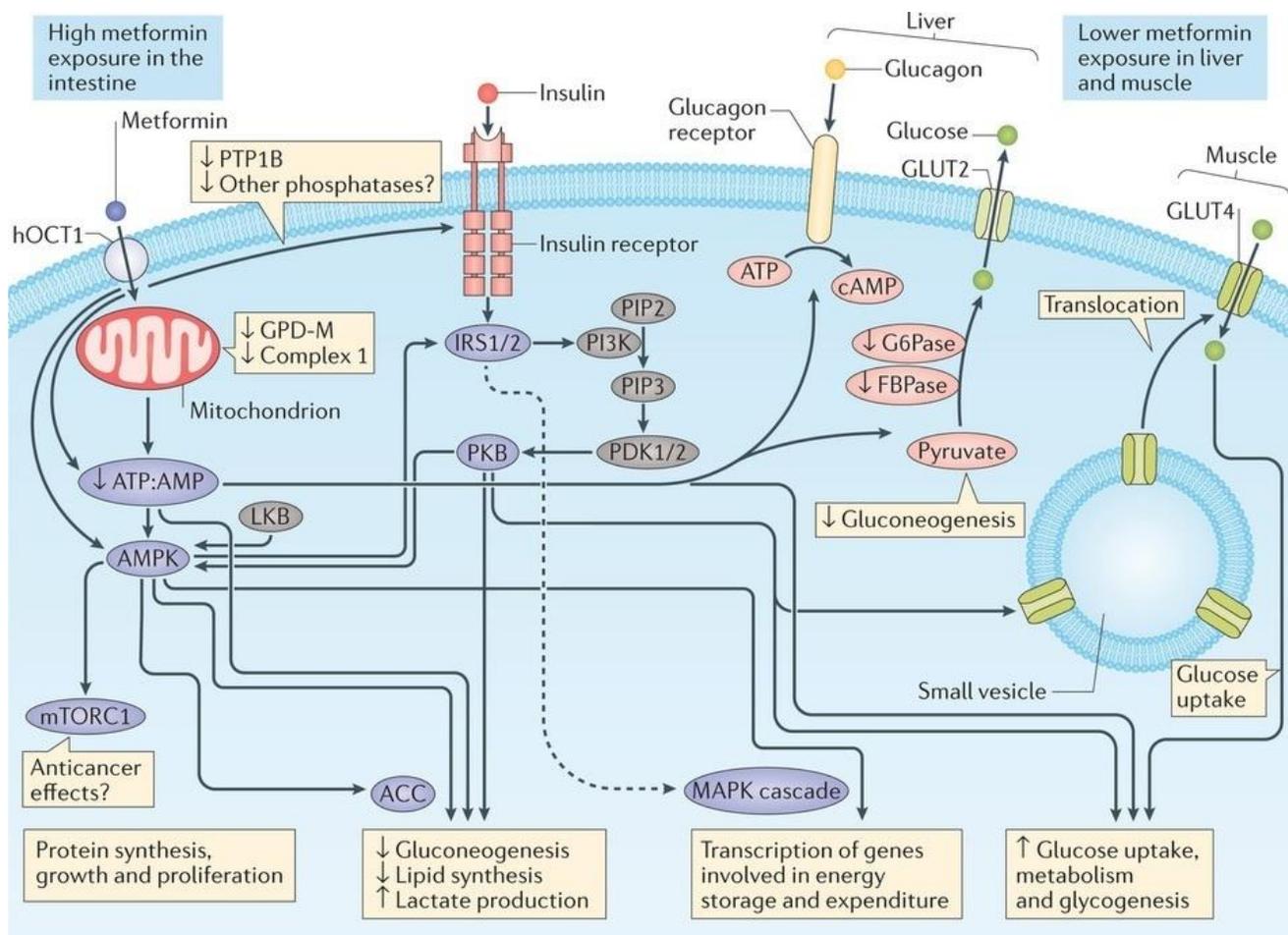


Fig. 1. Mecanismos de acción de la metformina en la célula (Tomado de Tahrani *et al.*, 2016). La metformina ingresa a las células a través del transportador de cationes orgánicos 1. Las células intestinales están expuestas a altas concentraciones de metformina, que interrumpen la cadena respiratoria mitocondrial en el complejo I. Además, promueve un aumento de la glucólisis y síntesis de lactato. En el hígado, aumenta la señalización de la insulina, disminuye la acción del glucagón y reduce la gluconeogénesis y la glucogenólisis. Asimismo, la metformina puede inhibir la enzima mitocondrial glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, alterando el estado redox hepatocelular, dando como resultado una alteración en la relación ATP:AMP

Grupo de secretágoros (sulfonilureas y meglitidas): Las sulfonilureas estimulan la liberación de insulina por las células β del páncreas y el aumento de la sensibilidad de los tejidos periféricos a esta hormona, siendo útiles en el tratamiento de diabéticos tipo 2. Su principal blanco es el receptor de sulfonilureas, específicamente la subunidad receptora de sulfonilureas 1 (SUR1) un componente del canal de potasio sensible a ATP, inhibiendo la salida de potasio de la célula beta pancreática lo que conduce a la despolarización de la membrana y a la entrada de calcio extracelular que a su vez favorece la exocitosis de los gránulos de insulina (Fig. 2) Las sulfonilureas pueden producir hipoglucemias graves y aumento de peso, también aumenta la incidencia de hipoglucemia cuando se utiliza en combinación con otros hipoglucemiantes. Además, se unen al receptor SUR2A de los cardiomiocitos y al SURB de la pared vascular y pueden inhibir el preconditionamiento isquémico, mecanismo endógeno de protección cardíaca durante episodios isquémicos (Krentz y Bailey 2005).

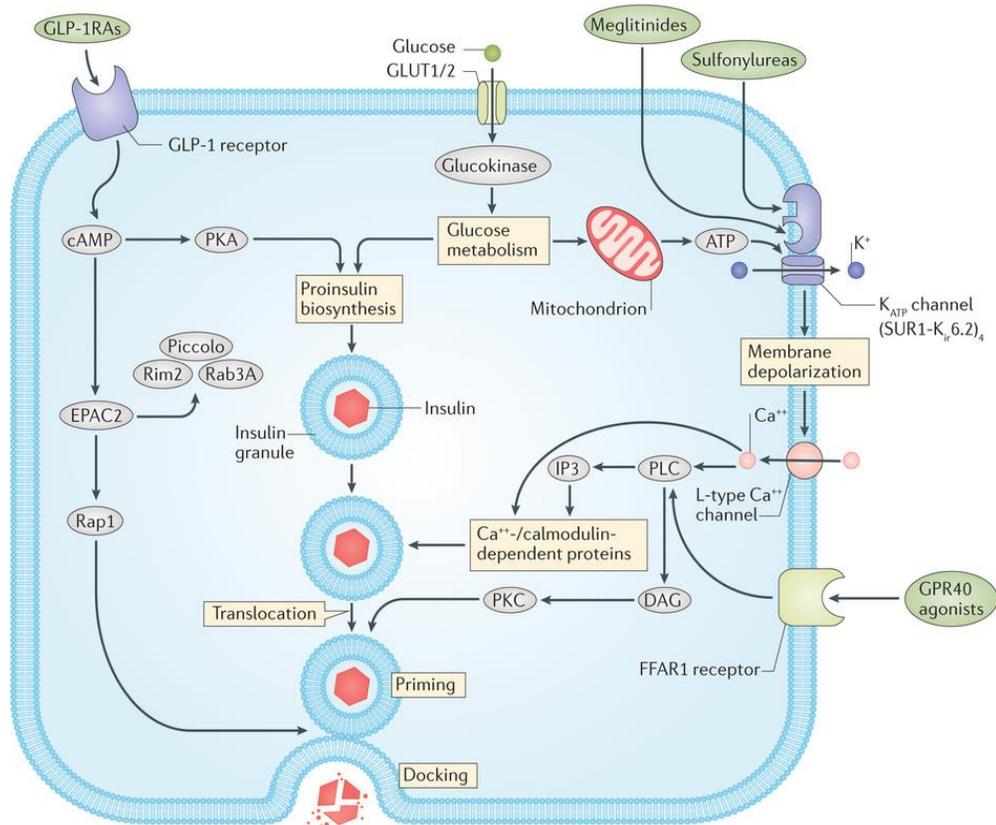


Fig. 2. Mecanismos de acción de las sulfonilureas (Tomado de Tahrani et al., 2016). Las sulfonilureas y agonistas del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP 1) actúan sobre las células β pancreáticas para aumentar la secreción de insulina inducida por glucosa. Estos agentes se unen a la superficie citosólica del receptor de sulfonilurea 1 (SUR1), que es parte del canal de potasio $K_{ir}6.2$ sensible a ATP. La unión de la sulfonilurea o meglitinida cierra el canal $K_{ir}6.2$, evitando el eflujo de potasio y despolarizando así la membrana plasmática. La despolarización abre los canales de calcio dependientes del voltaje, aumentando la afluencia de calcio y activando las proteínas de señalización dependientes del calcio que controlan la exocitosis de la insulina.

Tiazolidinedionas (pioglitazona): las drogas derivadas de las tiazolidinedionas (TZDs) incluyen la pioglitazona, la rosiglitazona y la troglitazona. La troglitazona fue introducida al mercado en 1997, sin embargo fue retirada muy pronto (1999) debido a los casos de hepatotoxicidad (Bailey 2015). En el caso de la rosiglitazona y la pioglitazona fueron introducidas en 1999, la primera fue descontinuada en Europa y fue restringida en Estados Unidos en 2008 por reportes de riesgos cardiovasculares. La pioglitazona fue descontinuada en algunas ciudades de Europa en el año de 2011 debido a su posible asociación con la aparición cáncer de vejiga. Sin embargo en Estados Unidos y en nuestro país su uso es común. Las tiazolidinedionas son agonistas selectivos de los receptores activados por proliferación de peroxisomas isoforma γ (PPAR γ). Cuando dichos receptores se activan por un ligando, se unen al receptor de ácido 9-cis retinoico (RXR) para formar un heterodímero, uniéndose posteriormente al DNA para regular la transcripción genética y la traducción de una variedad de proteínas involucrados en la diferenciación celular y el metabolismo de glucosa y lípidos (Fig. 3). Se sabe que PPAR γ altera la expresión de algunos genes que participan en la síntesis de la insulina, captación de la glucosa y reducción de inflamación. Además la activación de PPAR γ en los adipocitos reduce la circulación de ácidos grasos libres y la acumulación ectópica de lípidos en músculo esquelético e hígado (Tahrani *et al.* 2016).

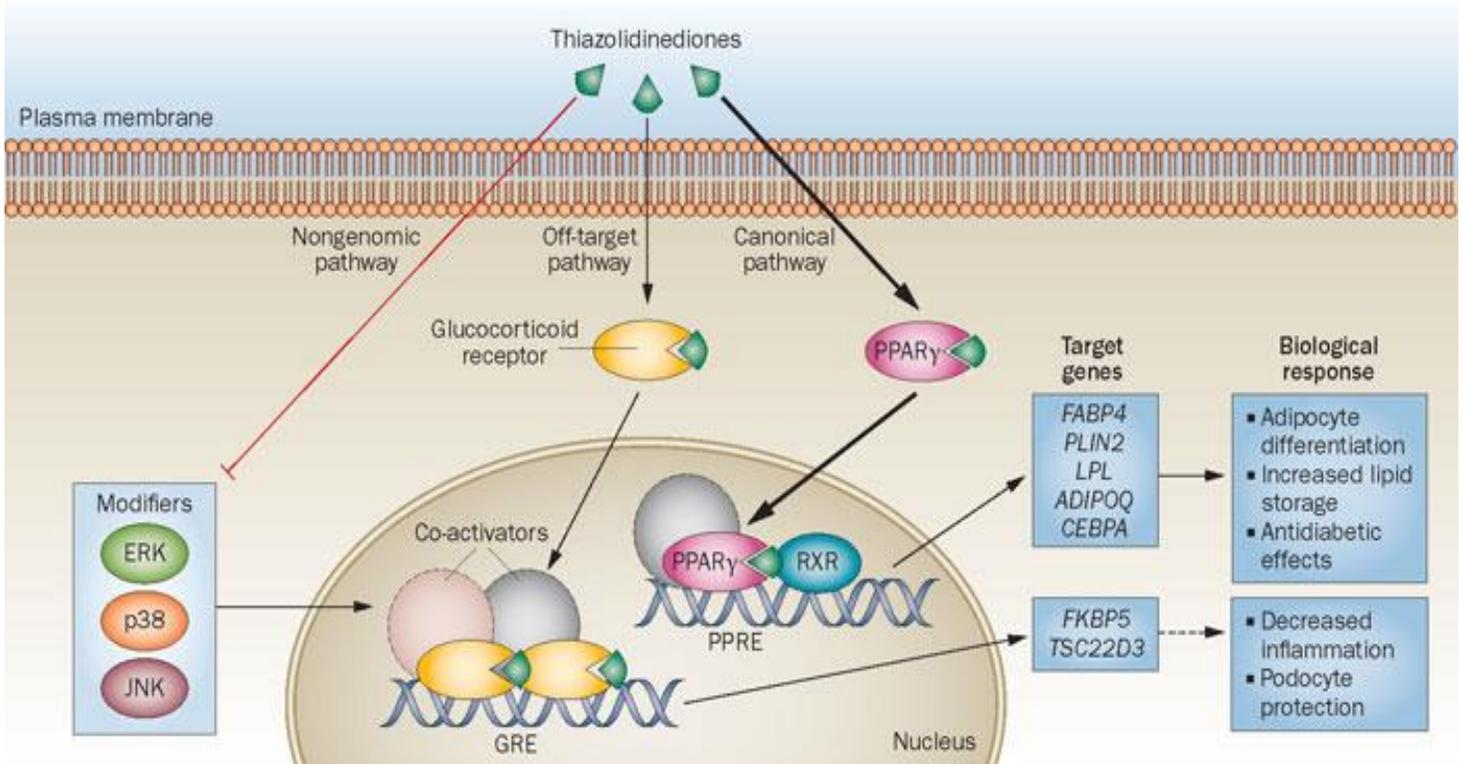


Fig. 3. Mecanismos de acción de las tiazolidinedionas (Tomado de Tahrani et al., 2016). Las tiazolidinedionas promueven un aumento en la sensibilidad de la insulina sin afectar su secreción. Se une específicamente a los PPARs. Promueve la captación de glucosa en músculo, esquelético, tejido adiposo y en hígado a través de los receptores celulares PPARs. Antagoniza el factor de necrosis tumoral a nivel celular, previniendo hiperglucemia severa inducida por resistencia a la insulina.

Uno de los efectos adversos de las tiazolidinedionas es la retención de líquidos, como resultado de la reabsorción de sodio en los riñones debido al incremento en la expresión de canales de sodio en los túbulos renales. Por otro lado, su uso durante tiempos prolongados en pacientes con DM2 resulta en menor densidad ósea así como en un mayor riesgo de fracturas, principalmente en mujeres (Tahrani *et al.*, 2016).

Insulina: suele ser utilizada como tratamiento para contrarrestar la secreción defectuosa de insulina. La insulina tiene una acción hipoglucemiante superior al resto de fármacos utilizados para el tratamiento de la DM, controlando la glucemia, y manteniendo la ganancia de peso corporal. En uso de la insulina, ha generado discrepancias en diversos aspectos; por ejemplo, no está bien determinado en qué momento de la patología debe ser utilizada. Por lo común, se ha indicado su uso cuando los tratamientos orales dejan de ser

eficientes o si la hemoglobina glicosilada se encuentra en altas concentraciones (Ascaso 2014). No obstante, aún sigue siendo uno de las opciones de tratamiento menos socorridas.

Los tratamientos mencionados en los párrafos anteriores son importantes para coadyuvar el control de la DM2 y disminuir sus efectos. Sin embargo, algunos producen efectos adversos en el organismo, lo que puede provocar enfermedades secundarias. En la actualidad se han propuesto alternativas que coadyuvan en el tratamiento de la diabetes, entre las cuales se encuentran los AGPIs ω -3. Dichos ácidos grasos pueden tener efectos a múltiples niveles, repercutiendo de manera favorable en el control de la DM, controlando la glucemia, colesterolemia e hipertrigliceridemia. Se han descrito varios mecanismos por los que ejercen sus efectos, de lo cual hablaremos en el siguiente tema.

1.4 Ácidos grasos omega-3 y su efecto en el desarrollo de la diabetes

Los AGPIs tienen funciones heterogéneas y de gran importancia en mamíferos. Son componentes estructurales de las membranas celulares, por lo que regulan diversas propiedades físicas y químicas de las mismas (Fig. 4). En ese sentido se ha reportado que un incremento de AGPIs en las membranas aumenta la fluidez mientras que los ácidos grasos saturados tienen el efecto contrario, es decir, generan una mayor rigidez a la membrana (Jump 2002, Leonard *et al.*, 2004, Das 2006). El aumento en la fluidez membranal puede influir en la función y actividad de receptores y enzimas asociadas a las membranas celulares (Leonard *et al.*, 2004). Asimismo, se ha reportado que el incremento en la fluidez membranal está asociado con un aumento de la afinidad a la insulina a sus receptores y en el aumento en el número de éstos sobre la superficie celular (Risérus 2008).

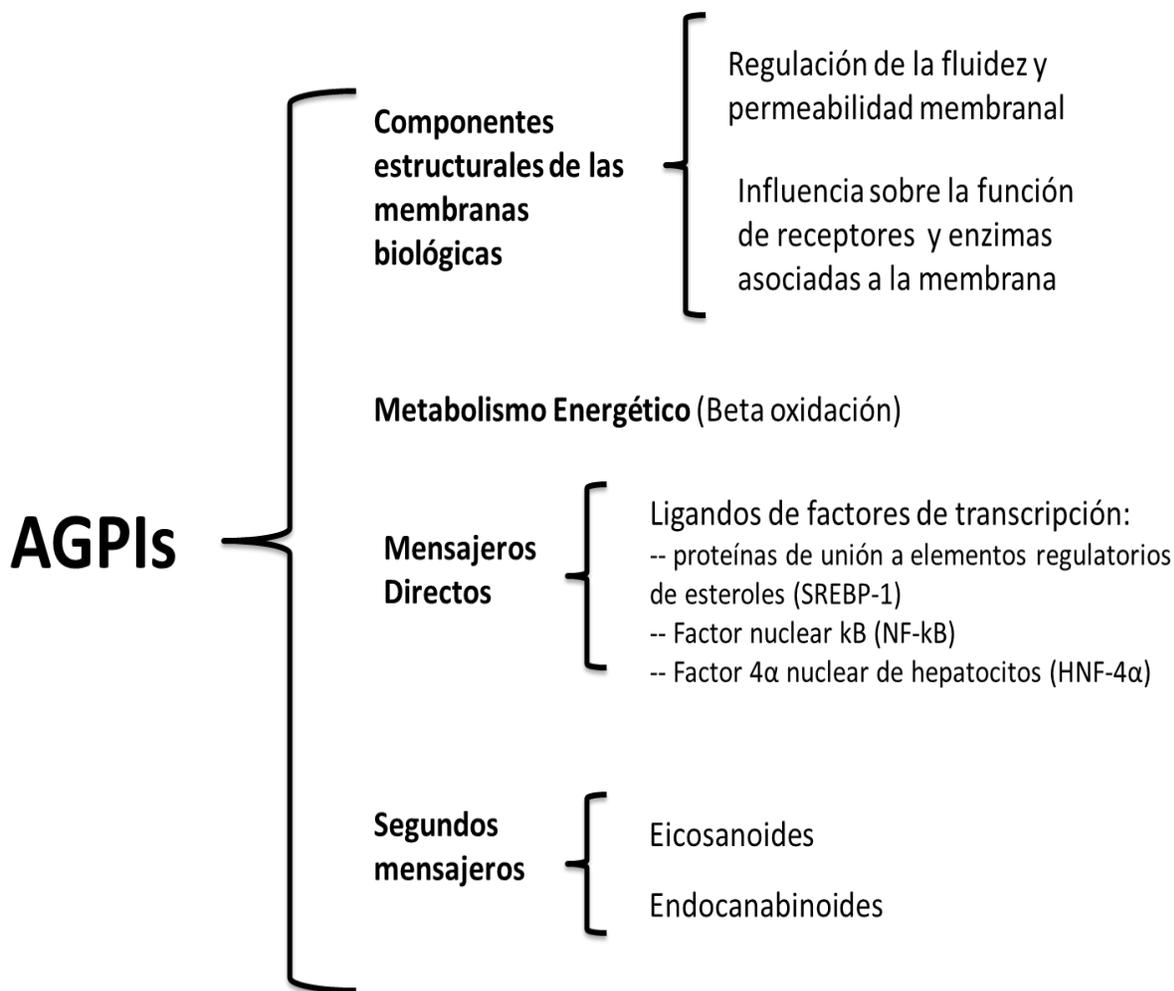


Fig. 4. Funciones y efectos de los ácidos grasos poliinsaturados.

Se han documentado diversas vías mediante las cuales pueden actuar los AGPIs, participando como señalizadores, segundos mensajeros y en la modulación de la expresión de genes involucrados en el metabolismo de lípidos y glucosa (Campioli *et al.*, 2012). Los AGPIs de cadena larga como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) actúan como agonistas (ligandos) o reguladores de factores de transcripción de proteínas de unión a elementos regulatorios de esteroides (SREBP-1), del factor nuclear kappa B (NF-KB) y del factor 4 α nuclear de hepatocitos (HNF-4 α) (Jump y Clarke, 1999).

En el ser humano (y los mamíferos en general) los AGPIs ω -3 deben ser obtenidos de los alimentos. Las dietas modernas contienen concentraciones excesivas de AGPIs ω -6 y una baja cantidad de AGPIs ω -3 lo que propicia trastornos en metabolismo de los lípidos (Jie *et*

al., 2014). Los efectos biológicos del consumo de AGPIs ω -3 dependen entre otros factores de la capacidad de absorción del intestino y de su transporte a los tejidos (biodisponibilidad), lo que puede diferir en gran medida entre los individuos y puede depender de muchos factores, incluyendo la estimulación para la liberación de las lipasas pancreáticas en respuesta a los lípidos de la dieta (Schuchardt y Hahn 2013). El consumo de animales marinos provenientes de regiones frías provee una proporción más alta de grasas poliinsaturadas que la dieta occidental típica. Uno de los ácidos grasos que se encuentra mayoritariamente en los peces de agua fría es el EPA el cual parece inhibir la formación de prostaglandinas de la serie 2, las cuales en su mayoría son potentes vasoconstrictoras y algunas estimuladoras de la agregación plaquetaria. Además, el EPA disminuye la concentración de colesterol y triglicéridos en plasma (Minami *et al.*, 2002).

Los AGPIs, tanto de cadena corta como de cadena larga, pueden ser ligandos de PPARs (Liu *et al.*, 2014). Los PPARs son miembros de una superfamilia de receptores (Fig 5). Se han reportado tres isoformas: α , δ (también llamado β) y γ . Dichos receptores controlan la expresión de una gran cantidad de genes implicados en varias funciones fisiológicas, incluidas la homeostasis de lípidos y glucosa, proliferación y diferenciación celular, así como en procesos inflamatorios (Luquet *et al.*, 2004).

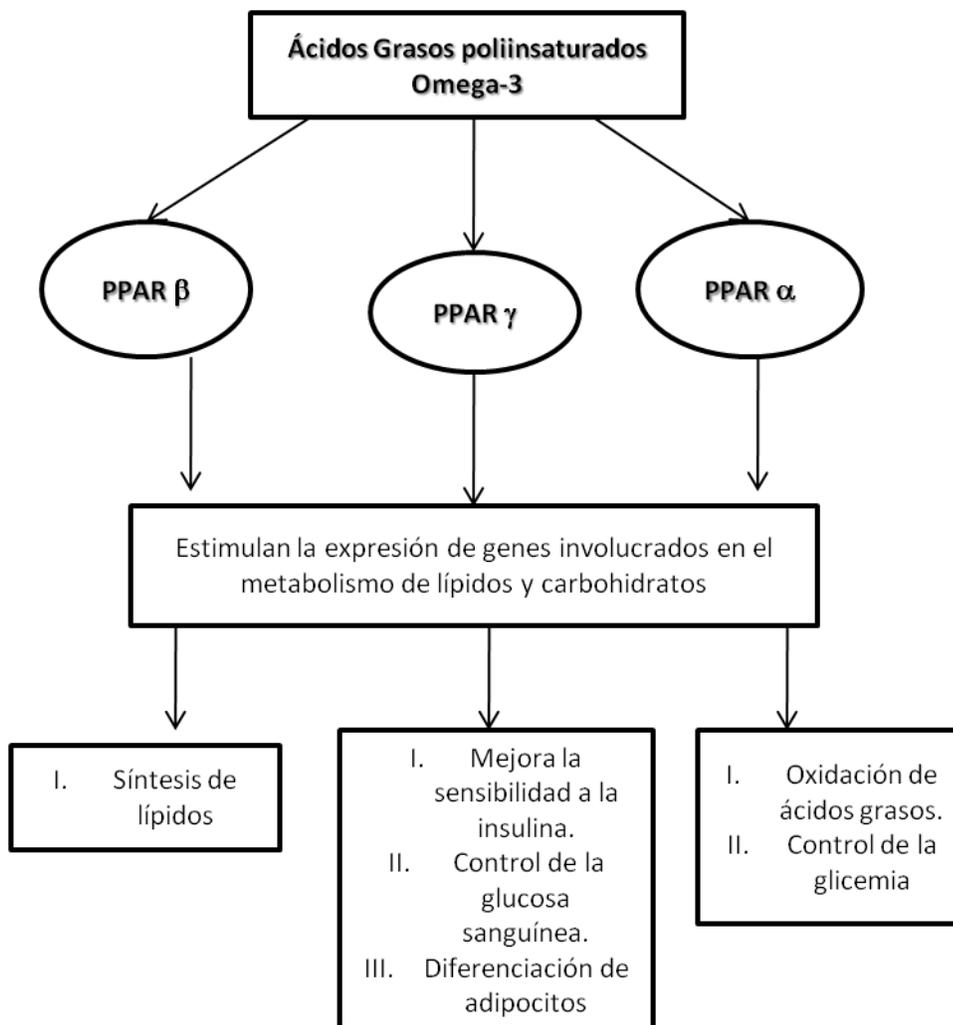


Fig. 5. Isoformas de PPARs y su participación en el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

Los isotipos de PPARs tienen diferentes características. PPAR α es activado por AGPIs y leucotrienos B₄, se expresa en hígado, corazón, macrófagos y otras células. La activación de PPAR α incrementa el catabolismo de los ácidos grasos mediante la α oxidación y la β oxidación, asimismo promueve una disminución en el contenido de VLDL (Por sus siglas en inglés: *Very Low density Lipoprotein*) (Luquet *et al.*, 2004). PPAR γ se expresa en adipocitos, macrófagos, placenta y otros tejidos, es activado por algunos ácidos grasos así como por determinados metabolitos derivados de los AGPIs como las 15-desoxi-prostaglandinas J₂. La activación de PPAR γ disminuye la expresión de genes que promueven la actividad de la glicerol cinasa, (enzima que participa en la síntesis de

triglicéridos) y que consecuentemente produce la disminución en el contenido de triglicéridos sanguíneos (Rosen *et al.*, 2000).

Se ha demostrado también que los AGPIs incrementan la actividad transcripcional de genes regulados por PPARs de una manera directa y pueden ser reguladores metabólicos. Otros ligandos importantes de PPARs son las TZDs que como se describió previamente, son medicamentos utilizados para el tratamiento de la diabetes. La activación de los PPAR γ por las TZD y los AGPIs ω -3 acelera la velocidad de la diferenciación celular, incrementa la expresión del transportador de glucosa 4 (GLUT 4) y de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo. También se ha observado en el músculo esquelético; que los PPARs incrementan la sensibilidad a la insulina, aceleran el metabolismo de la glucosa controlando su concentración sanguínea y disminuyen la concentración de triglicéridos en sangre (Ruzickova *et al.* 2004; Tahrani *et al.* 2016).

1.5 Mitocondrias

Las mitocondrias son organelos intracelulares presentes en prácticamente todas las células eucariontes, suministran la mayor parte de la energía que éstas requiere para diversos procesos que se realizan dentro de ella. El tamaño y la forma de las mitocondrias varían en grado considerable, en función de su origen y estado metabólico. Son organelos elipsoides de 0.5 μm de diámetro y 1 μm de largo aproximadamente (Voet *et al.*, 2007). La mitocondria está delimitada por una membrana externa y contiene una membrana interna con varias invaginaciones. El número de las invaginaciones llamadas crestas, varía con la actividad respiratoria de un tipo particular de célula, esto se debe a que las proteínas que median la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa están unidas a la membrana mitocondrial interna, por lo tanto la velocidad de respiración varía con el área de superficie de esta membrana (Suen *et al.*, 2008). El compartimento interno mitocondrial presenta una sustancia tipo gel llamada matriz mitocondrial la cual contiene altas concentraciones de enzimas solubles del metabolismo oxidativo (por ejemplo las enzimas del ciclo de Krebs, así como sustratos, cofactores, nucleótidos y iones orgánicos (Voet *et al.*, 2007).

1.6 Membranas mitocondriales: cadena respiratoria

Las membranas mitocondriales se caracterizan por presentar bajos porcentajes de ciertos lípidos como el ácido fosfatídico, las esfingomielinas y los glucolípidos característicos de las membranas plasmáticas de las células eucariotas. Estas membranas presentan un bajo porcentaje de colesterol (entre el 7%-11%) en comparación con la membrana de una célula (25-34%) (Lodish 2006). El alto contenido de fosfatidilglicerol, cardiolipinas y fosfatidiletanolamina, hacen que la membrana mitocondrial sea semejante a las membranas de ciertas bacterias. Al igual que las membranas plasmáticas, las membranas mitocondriales poseen una asimetría en la distribución de los lípidos, no sólo entre la membrana interna y externa, sino también entre las capas interna y externa de la bicapa lipídica, de tal suerte que una alteración en esta distribución puede tener consecuencias para la función y supervivencia de las mitocondrias y de la célula misma por los procesos de apoptosis (Grimm y Brdiczka 2007).

La membrana interna mitocondrial presenta diferencias estructurales y moleculares con respecto a la membrana externa. Posee 75% de proteínas y un 25% de lípidos. Asimismo, es permeable sólo al O₂, el CO₂ y el H₂O. Además de las proteínas de la cadena respiratoria contiene numerosas proteínas transportadoras que controlan el movimiento metabolitos como ATP, ADP, piruvato, Ca⁺ y fosfato. Contiene tres tipos de proteínas:

- a) Proteínas que llevan a cabo las reacciones de óxido-reducción de la cadena respiratoria.
- b) El complejo enzimático denominado ATP sintetasa que lleva a cabo la síntesis de ATP.
- c) Proteínas transportadoras específicas (por ejemplo las lanzaderas malato-aspartato) que regulan el paso de metabolitos dentro y fuera de la matriz mitocondrial.

La cadena respiratoria mitocondrial es un conjunto de más de veinte transportadores distintos de electrones asociados a un número determinado de péptidos estructurales, todos los cuales se localizan en la membrana interna mitocondrial. Algunos componentes de la

cadena respiratoria funciona como una bomba de protones controlada por procesos de oxidación-reducción, pero las bases estructurales que fundamentan esta función aún no se conocen del todo (Voet *et al.*, 2007).

La cadena respiratoria transfiere electrones desde el par NAD^+/NADH o el grupo prostético FAD/FADH , hasta el O_2 (Ide *et al.*, 1999). Los transportadores de electrones que los trasladan desde NADH y FADH_2 hacia el O_2 se asocian con la membrana mitocondrial interna. Algunos de estos centros redox son móviles y otros son componentes de complejos proteicos integrales de la membrana interna. La secuencia de los transportadores de electrones refleja aproximadamente sus potenciales de reducción relativos, así que el proceso total del transporte de electrones es exergónico (Voet *et al.*, 2007, Monteiro *et al.*, 2013).

1.7 Disfunción mitocondrial y cambios en la fluidez membranal durante el desarrollo de la diabetes

Se han utilizado diversos modelos de DM en ratas Goto Kakizaki, Zucker Wistar-STZ y en ratones C57BL/6J para determinar cómo se modifica la bioenergética mitocondrial en esta enfermedad. Parámetros como el consumo de oxígeno, el potencial transmembranal, estrés oxidativo, lipoperoxidación y fluidez membranal han sido evaluados para determinar las modificaciones que se generan con el desarrollo de la DM (Figuroa-García *et al.*, 2015).

La disfunción mitocondrial está estrechamente relacionada con desórdenes metabólicos (Sorriento *et al.*, 2014) y es considerada como un componente crítico en el desarrollo de la resistencia a la insulina y de la diabetes tipo 2. Esto ha sido demostrado en varios tejidos relacionados con el desarrollo de síndrome metabólico, resistencia a la insulina y diabetes, incluidos músculo esquelético, hígado, tejido adiposo, corazón y páncreas. Se ha observado que en músculo esquelético incrementan los niveles de especies reactivas de oxígeno, disminuye la capacidad de respiración mitocondrial, la producción de ATP y la oxidación de ácidos grasos (Short *et al.*, 2005).

El incremento en la producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno durante la hiperglicemia es reconocido como una de las principales causas de las complicaciones clínicas asociadas con la diabetes y la obesidad (Chang *et al.*, 2003, Raza *et al.*, 2011). Modificaciones en la cadena de transporte de electrones, sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y un incremento en la lipoperoxidación, ha sido reportado durante la diabetes (Lujerio *et al.*, 2003, Raza *et al.*, 2011, Figueroa-García *et al.*, 2015). La disfunción mitocondrial causa daño celular y muerte por el déficit en la producción de ATP. Asimismo se incrementan los procesos de apoptosis causados por la liberación de citocromo c y otros factores apoptóticos hacia el citoplasma (Miyamoto *et al.*, 2008).

Los lípidos de las mitocondrias están involucrados en un gran número de procesos. En el caso particular de la producción de energía existe información de que los lípidos pueden modular la respiración mitocondrial, lo cual ha llevado a evaluar el impacto que tiene la dieta en el tipo de ácidos grasos de las membranas mitocondriales y en el consumo de oxígeno (Yu *et al.*, 2014). Al respecto Cavaliere *et al.*, (2016) mostraron que en ratas Wistar obesas (como modelo de resistencia a la insulina) suplementadas con AGPIs ω -3 (EPA y DHA) incrementó el consumo de oxígeno mitocondrial, la biogénesis mitocondrial y se redujo el estrés oxidativo. Flachs *et al.*, (2005) suplementaron con ALA, EPA y DHA a ratones C57BL/6J durante 4 semanas y observaron que EPA y DHA estimulan la formación de mitocondrias en las células adiposas y activan la expresión del gen de la carnitina palmitoil-transferasa-1. Esta proteína estimula la entrada de ácidos grasos en las mitocondrias activando la β oxidación.

Existen reportes de que los suplementos dietéticos con DHA alteran la composición de ácidos grasos de fosfolípidos mitocondriales y retrasan la apertura del poro de la transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial inducida por Ca^{2+} (Stanley *et al.*, 2012). En ese sentido, está reportado que al suplementar con DHA a ratas Wistar, incrementa el contenido de dicho ácido graso en la membrana interna mitocondrial de corazón, en asociación con un aumento en la respiración mitocondrial. Se concluye que el contenido de DHA retrasa la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial y que se favorece la retención de calcio de la mitocondria originando un efecto cardioprotector (Krairallah *et al.*, 2010).

La composición de ácidos grasos así como el grado de insaturación de los mismos en los fosfolípidos es de gran importancia para la regulación de la fluidez membranal, la permeabilidad y por consiguiente, para las funciones especializadas de las membranas celulares (Tsalouhidou *et al.*, 2006, Pérez-Hernández *et al.*, 2010, Yu *et al.*, 2014). Se han utilizado membranas de eritrocitos, microsomales y mitocondriales de animales diabéticos para evaluar las modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de la membrana ocurridas durante el desarrollo de esta enfermedad (Pérez-Hernández *et al.*, 2010, Pérez 2011, Waczulikova *et al.*, 2007).

En un trabajo previo, analizamos la fluidez en membranas de eritrocitos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con diabetes a diferentes edades (1, 3 y 6 meses de edad). Desde el primer mes de edad, los animales diabéticos mostraron una disminución de la fluidez membranal con respecto al grupo control. Al analizar la composición de ácidos grasos observamos un incremento de los ácidos grasos saturados, lo que se reflejó en un decremento en el cociente de insaturación (Ins/Sat). Estos resultados indican que cambios en la composición de ácidos grasos contribuyeron significativamente a la disminución de la fluidez membranal (Pérez-Hernández *et al.*, 2010).

Se ha propuesto que un defecto en la actividad de la delta-6 y la delta-5 desaturasas modifica la composición de ácidos grasos poliinsaturados, lo cual parece ser un factor que predispone a individuos al desarrollo de resistencia a la insulina y a la diabetes. Asimismo, se sugiere que los AGPIs ω -3 pueden incrementar la fluidez membranal, aumentar el número de receptores de insulina así como su afinidad por la glucosa e incrementar el número de transportadores de glucosa (GLUT 4) (Das, 2006). Lo anterior sugiere que la composición de los ácidos grasos altera la sensibilidad a la insulina, indicando que un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática mejora la sensibilidad a la insulina y una disminución en el contenido de AGPIs provoca un efecto contrario.

Las elongasas, desaturasas, fosfolipasas, y las lisofosfolípido acil transferasas son las enzimas responsables en la regulación de la composición de ácidos grasos de las membranas.

Ya que la afinidad de algunas de estas enzimas están estrechamente influenciadas por el ambiente lipídico que las rodea, es probable que un cambio en la composición de las membranas (en específico del contenido de ácidos grasos ω -3 y ω -6) pueda influir de manera relevante en el mantenimiento de la fluidez y la actividad enzimática (Hulbert *et al.*, 2005). Al parecer, las modificaciones en la composición de ácidos grasos, fosfolípidos y en el contenido de ω -3 y ω -6 en la membrana pueden afectar la fluidez y regular los diferentes procesos bioquímicos que en ésta se realizan, generando anormalidades en la célula y contribuyendo al desarrollo de diferentes trastornos metabólicos (Delany *et al.*, 2000). Los autores antes referidos, indican que el mantenimiento de la fluidez membranal es esencial para el buen funcionamiento de las células y los procesos que se llevan a cabo en la bicapa lipídica. Asimismo, la composición de ácidos grasos parece contribuir no sólo a la regulación de la fluidez, sino también al funcionamiento de las mitocondrias. Al respecto los AGPIs ω -3 parecen tener un papel importante en la bioenergética mitocondrial Sin embargo aún no quedan del todo claro cuáles son los mecanismos por los que llevan a cabo sus efectos.

2. OBJETIVO

El objetivo general del presente estudio fue determinar el efecto del ácido alfa linolénico (ALA) sobre las propiedades fisicoquímicas de membranas de mitocondrias de hígado de ratas Wistar y su repercusión en la actividad mitocondrial durante el desarrollo de la diabetes.

2.1 Objetivos particulares

- Determinar el efecto del ácido alfa linolénico (ALA) sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos midiendo la concentración de glucosa, triglicéridos y colesterol sanguíneos en un modelo de DM2 en ratas Wistar.
- Evaluar si el consumo de oxígeno y el control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas Wistar se ve afectado durante el desarrollo de la diabetes y/o con el suplemento de ALA a 1, 3 y 6 meses de edad
- Analizar el efecto de la diabetes y/o el suplemento de ALA sobre la composición de ácidos grasos de mitocondrias de hígado y su repercusión en la respiración mitocondrial
- Analizar la fluidez de membranas mitocondriales de hígado en tres regiones diferentes de la membrana (intermedia, núcleo y superficie) haciendo uso de tres monitores fluorescentes: dipirenilpropano (DPiP), difenil hexatrieno (DPH) y trimetilamonio difenil hexatrieno (TMA-DPH).
- Caracterizar termotrópicamente a las membranas de mitocondrias de hígado y conocer las energías de activación y la temperatura de transición de fase.
- Evaluar si durante el desarrollo de la diabetes incrementa la lipoperoxidación en membranas mitocondriales de ratas Wistar.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos y solventes utilizados en esta investigación 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 metil-ésteres se adquirieron de Sigma-Aldrich con una pureza mínima del 98%. Los monitores utilizados para medir la fluidez membranar: dipirenilpropano (DPiP), 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) y 1-[4-(trimetilamino)fenil]-6-fenil-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH), fueron obtenidos de Molecular Probes. Las cápsulas de aceite de linaza (Flax seed oil) que contienen el ácido α linolénico fueron obtenidas de la tienda de suplementos alimenticios General Nutrition Center (GNC) y se analizaron mediante cromatografía de gases para saber su composición de ácidos grasos.

3.1 Animales

Se utilizaron ratas Wistar, las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio (aprox. 22°C, 12 h luz, 12 h oscuridad). Se generó un modelo de diabetes tipo 2 en neonatos de 48 h. mediante una inyección intraperitoneal con una dosis única de estreptozotocina (STZ) de 135 mg/kg de peso corporal en amortiguador de citratos pH 4.5. A las ratas neonatas control se les inyectó únicamente amortiguador de citratos. Las ratas se destetaron a las 4 semanas de edad y cada grupo se dividió en dos, a uno de ellos se le dio aceite de linaza (con alto contenido de ácido alfa linolénico) como suplemento (125 mg de aceite de linaza/kg de peso corporal) y al otro no, de esta manera quedaron cuatro grupos de ratas: Control (C), Diabético (STZ) Diabético con ALA (STZ-ALA) y Control con ALA (C-ALA)

Durante la lactancia se hizo el seguimiento de la glucosa sanguínea y el peso corporal cada tercer día. Al destete se realizaron estas cuantificaciones semanalmente. La medición de la concentración de la glucosa sanguínea se realizó mediante tiras reactivas en un glucómetro de la marca Accu-chek active®, las mediciones mensuales de colesterol y triglicéridos sanguíneos se realizaron utilizando tiras reactivas en un multiparamétrico de la marca Accutrend®.

Al mes de vida se realizó una curva de tolerancia (previo al inicio del tratamiento) con el fin de observar la respuesta del páncreas (secreción de insulina) al estímulo de glucosa. Se utilizó dextrosa a una concentración de 2 g/kg de peso corporal. Previo a la administración de la dextrosa se obtuvo la concentración basal de la glicemia. Posteriormente se aplicó la dosis de dextrosa mediante cánula esofágica y se realizaron las mediciones de glucosa sanguínea cada 30 min hasta los 150 min (2 horas y media). Para ello nuevamente se utilizó un glucómetro de la marca Accu-chek active®.

El sacrificio de al menos 4 animales se realizó a 1, 3 y 6 meses de edad. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal. La sangre se extrajo por punción cardíaca con agujas y tubos Vacutainer. La sangre se depositó en tubos de química sanguínea de 10 ml, se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 10 minutos en una centrifuga marca Hermle Z206 A. El suero obtenido se depositó en tubos Eppendorf y se congeló a -70 °C para las cuantificaciones de colesterol y triglicéridos. Asimismo, se removió el hígado y se depositó en un recipiente que contenía solución salina para su uso inmediato en el aislamiento de mitocondrias.

3.2 Química sanguínea

Colesterol en suero: Para determinar la concentración de colesterol total en suero se utilizó un kit comercial (SpinReact). Se desarrolló una curva con estándar de colesterol en el intervalo de 0 a 20 µg/dl. Se tomaron por duplicado, 10 µl de suero y se adicionó 1 ml del reactivo para determinar el colesterol de acuerdo a las especificaciones del fabricante (SpinReact). Se permitió el desarrollo de color incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se leyó 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 se basa en la reacción de la colesterol esterasa que libera el colesterol de ácidos grasos esterificados de la colesterol oxidasa que produce 4-colestenona + H₂O₂. En presencia de peroxidasa el H₂O₂, reacciona con fenol + 4-aminofenazona, dando lugar a un compuesto colorido.

Triglicéridos en suero: Para determinar la concentración de triacilglicerol en suero se utilizó un kit comercial (SpinReact). Se desarrolló una curva con estándar de triglicéridos en el intervalo de 0 a 20 $\mu\text{g/dl}$. Se tomaron, por duplicado, 10 μl de suero y se adicionó 1 ml del reactivo para determinación de triglicéridos de acuerdo a las especificaciones del fabricante (SpinReact). Se permitió el desarrollo de color incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 505 nm en un espectrofotómetro Genesys 20 Thermo Scientific. La cuantificación de triglicéridos mediante esta técnica se basa en el mismo principio de formación de hidroperóxidos y desarrollo de una reacción colorida, descrito para colesterol, con la diferencia de formación de gliceraldehído 3 fosfato e hidroxiacetona fosfato a partir del glicerol de los triglicéridos.

3.3 Aislamiento de mitocondrias y determinación del consumo de oxígeno

Se removieron los hígados y a partir de estos se obtuvieron las mitocondrias. Los órganos fueron depositados en recipientes con una solución de aislamiento que contenía sacarosa 250 mM, Hepes 10 mM y EGTA 1 mM ajustado a un pH de 7.3. Posteriormente los hígados fueron triturados y homogenizados en frío en un homogenizador Potter-Elvehjem con el mismo medio y centrifugados 10 minutos a 2,500 r.p.m. El sobrenadante se filtró en gasa, se depositó en tubos limpios y se centrifugó 10 minutos a 10,000 r.p.m. en un rotor F15-6x100y Thermo Scientific. Nuevamente se decantó el sobrenadante y la pastilla fue removida cuidadosamente e incubada en un medio que contenía sacarosa 250 mM, Hepes 10 mM y albúmina libre de ácidos grasos al 0.1% durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 10,000 r.p.m. Finalmente se removió la pastilla que contenía la fracción mitocondrial y se depositó en tubos Eppendorf los cuales se mantuvieron en frío.

El consumo de oxígeno mitocondrial se determinó mediante oximetría polarográfica con un electrodo tipo Clark. Se obtuvieron las gráficas de consumo de oxígeno y se cuantificaron los nanomoles de oxígeno/mg proteína en estado basal (estado 4). Asimismo, se cuantificaron los nanomoles/mg proteína que se consumieron por cada nanomol de ADP

adicionado (estado 3). Se calculó el control respiratorio con base al cociente de las pendientes obtenidas de los trazos del oxímetro de los estados 3 y 4.

3.4 Extracción de lípidos totales de mitocondrias de hígado

Los lípidos de las mitocondrias fueron extraídos de acuerdo al procedimiento de Bligh y Dyer (1959) y Ames (1968) como se describe en Pérez-Hernández *et al.*, 2010 para fantasmas de eritrocitos. El procedimiento se describe a continuación: se tomaron las mitocondrias (2mg prot), se depositaron en un homogenizador Potter-Elvehjem, se adicionó una mezcla de metanol-cloroformo-agua (2:1:0.8 relación volumen) y se homogenizó. Después de la adición de la mezcla de solventes a las muestras, mantenidas en hielo, se adicionó un volumen de cloroformo y uno de agua y se volvió a homogenizar brevemente. Después el homogenado se centrifugó a 2500 r.p.m a 8°C durante 5 minutos en una centrífuga Z206 A marca Hermle y se obtuvo un sistema de dos fases. Se eliminó la fase acuosa y se colectó la clorofórmica. Después se evaporó el solvente bajo una corriente de nitrógeno.

3.5 Metilación de ácidos grasos de mitocondrias de hígado

Los metil ésteres de los ácidos grasos se prepararon esencialmente como describen Morrison y Smith (1964). Las reacciones de derivatización se realizaron en viales de vidrio de 4 ml en los cuales se evaporaron entre 50 y 200 µg de lípidos a sequedad bajo una corriente de gas de nitrógeno. Después de la adición de 0.5 ml de reactivo de trifluoruro de boro (BF₃) al 14% en metanol, se generó una atmósfera de nitrógeno y se cerró el vial con una tapa de rosca y disco inerte de silicón con cubierta de teflón. Se calentó por 30 min. a aproximadamente 92 °C en baño de agua. La muestra se enfrió a temperatura ambiente, el vial se abrió y se añadieron dos volúmenes de hexano y un volumen de agua, se agitó vigorosamente y se formó un sistema de dos fases, los metil ésteres se extrajeron de la fase orgánica. Se evaporó el hexano bajo una corriente de nitrógeno y los metil ésteres de los ácidos grasos se almacenaron a -70 °C y protegidos de la luz hasta su posterior análisis por cromatografía de gases.

3.6 Análisis de la composición de ácidos grasos de mitocondrias de hígado

Los ácidos grasos transesterificados se resuspendieron en *n*-hexano grado HPLC. Los metil ésteres se analizaron en un cromatógrafo de gases Clarus 500 Perkin Elmer controlado por computadora, equipado con un inyector capilar “Split/splitless” y detector de ionización de flama (FID). Los metil ésteres de los ácidos grasos se separaron en una columna capilar Omegawax (0.25 mm de diámetro interno y 0.25 mm de grosor) de 30 metros de longitud. Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas de acarreo. 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 por análisis de las áreas bajo los picos.

3.7 Análisis de la fluidez membranal de mitocondrias de hígado

Para la determinación de la fluidez membranal se utilizaron tres monitores fluorescentes: DPiP, DPH y TMA-DPH. El microambiente que cada monitor puede percibir es diferente ya que los monitores utilizados se ubican en diferentes regiones de la membrana. El DPiP se ubica preferencialmente en la región intermedia de la monocapa lipídica, el DPH se localiza en el núcleo de la bicapa de fosfolípidos y el TMA-DPH se ubica preferencialmente en la región polar.

El DPiP fue incorporado en las membranas mitocondriales. Se tomó el volumen necesario de mitocondrias y se depositaron en tubos eppendorf. A partir de una solución de DPiP 89 μ M en etanol se inyectaron 5 μ l del monitor fluorescente a las membranas, al mismo tiempo se mantenía en agitación con vortex, todo lo anterior se realizó en condiciones de poca luz, además las muestras se mantuvieron en hielo. Luego de adicionar el DPiP las membranas fueron sonicadas en baño a temperatura ambiente durante 1 minuto. Una vez inyectado el DPiP las muestras se mantuvieron en incubación en cuarto frío con agitación constante durante 24 horas para asegurar la incorporación del monitor fluorescente. Al día siguiente nuevamente se sonicaron las muestras en baño durante 1 minuto y se

resuspendieron en solución de aislamiento de mitocondrias a un volumen final de 3 ml. La concentración final de DPiP fue 0.15 mM y con una relación molar de fluoróforo/fosfolípido de 1:2500.

Las mediciones de fluidez se realizaron a diferentes temperaturas partiendo de los 10 °C y llegando hasta los 60 °C, en un espectrofluorómetro LS55 Perkin-Elmer conectado a un baño recirculante con termostato. La fluorescencia del DPiP para monómero fue de 379 nm y para excímero de 480 nm. A partir de las intensidades de fluorescencia de excímero (I_e) y monómero (I_m) obtuvimos el cociente I_e/I_m , el cual es directamente proporcional a la fluidez de la membrana.

Las mediciones con los monitores DPH y TMA-DPH se realizaron como se describe en Waczulikova *et al.*, (2007) con algunas modificaciones: Se tomaron 0.5 mg proteína/ml de la suspensión de mitocondrias, posteriormente se incorporó el DPH o TMA-DPH. 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 0.25 mM. Las mediciones de polarización de fluorescencia se realizaron a diferentes temperaturas, a partir de 10 °C hasta 60 °C en el mismo espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS55 conectado a un baño recirculante con termostato. Ambos fluoróforos fueron excitados a 365 nm, la emisión del DPH fue detectada a 430 nm y a 425 nm en el caso del TMA-DPH.

3.8 Determinación de Malondialdehído (MDA) por método de TBARS

Se cuantificó la concentración de malondialdehído (MDA) como índice de lipoperoxidación (Ohkawa *et al.*, 1979) en membranas mitocondriales. Para la determinación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBA) se tomaron 500 µl de la solución de mitocondrias y se depositaron en tubos Falcon. Después se añadió 200 µl de SDS al 0.8%, 1.5 ml de ácido acético al 20% (ajustado a pH de 3.5) y solución de TBA al 0.8%. Asimismo, se añadió hidroxitolueno butilado (0.01%) para evitar la auto-oxidación de las muestras. Posteriormente los tubos se calentaron en baño de aceite a 95°C durante 60 min. Transcurrido

este tiempo, los tubos se enfriaron y se agregaron 1 ml de agua destilada y 5 ml de solución butanol: piridina (15:1 vol/vol). Inmediatamente se centrifugaron los tubos a 4000 r.p.m. durante 10 min. Se recuperó la fase superior (fase lipídica) y se leyó en espectrofotómetro a 532 nm. El resultado se expresó en nmoles de MDA/mg prot mitocondrial.

3.9 Análisis estadístico

Los parámetros se obtuvieron de al menos 4 ratas por grupo. Se utilizó una prueba de Tukey para el análisis estadístico de los datos con una **p<0.05**.

4. RESULTADOS

4.1 Peso corporal y glucosa sanguínea

Durante la lactancia, se obtuvieron las concentraciones de glucosa sanguínea y la ganancia de peso corporal. A los 5 días de nacidos (3 días después de la inyección de STZ) los animales inducidos a diabetes (STZ) mostraron una concentración elevada de glucosa en sangre (Fig. 6A). La glicemia alcanzó los 320 mg/dl, significativamente más alta con respecto al grupo control que a esa misma edad mostró una glicemia de 85 mg/dl. Al paso de los días notamos una paulatina disminución de la glucosa sanguínea del grupo STZ, llegando a los 188 mg/dl a los 15 días de vida, no obstante incrementó ligeramente a los 20 días manteniéndose en los 210 mg/dl promedio hasta llegar a los 30 días de vida.

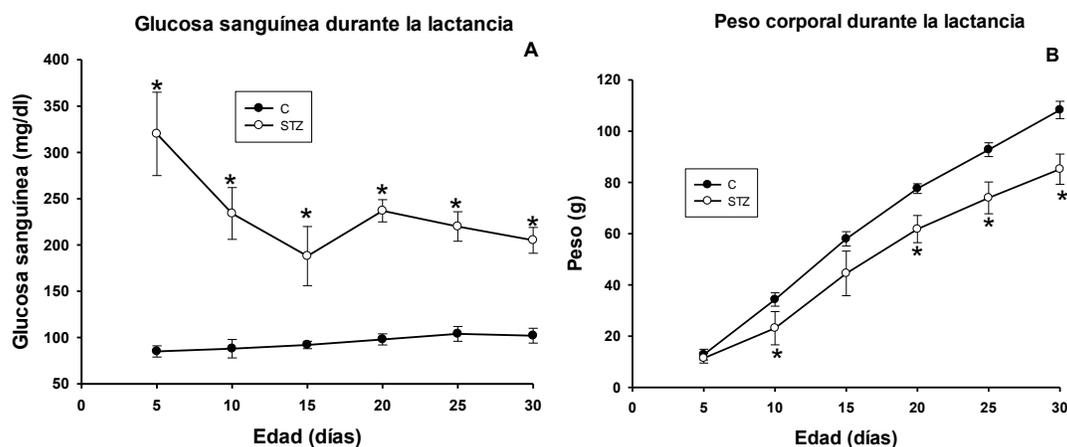


Fig. 6. A) Concentración de glucosa sanguínea y B) peso corporal en neonatos control y ratas diabéticas durante el primer mes de vida n=8 (* $p < 0.05$).

En el caso del grupo control, la glicemia se mantuvo en concentraciones basales (90 mg/dl promedio) sin grandes variaciones durante los primeros días de vida. A los 30 días de nacidas la glicemia de estos animales fue de 102 mg/dl.

En lo que respecta a la ganancia de peso corporal en la figura 6B observamos que en los animales diabéticos la ganancia de peso fue significativamente más baja con respecto a su contraparte normoglicémica. Al tercer día posterior a la inducción de diabetes, el peso

corporal fue de 11.4 ± 1.9 g, sin diferencias significativas con respecto al grupo control (12.8 ± 2.1 g). Es hasta el décimo día cuando los animales diabéticos muestran una menor ganancia en el peso corporal (32% menos) con respecto al grupo control. Esta tendencia se mantuvo durante toda la lactancia llegando a los 30 días de nacidas en donde el grupo diabético tuvo un peso promedio de 85.2 ± 5.9 g, es decir un 21% menos con respecto a los animales control (108.3 ± 3.4 g). Es evidente que desde los primeros días de vida, la condición patológica de los animales diabéticos repercutió severamente en la ganancia de peso.

Al destete se realizó una curva de tolerancia a la glucosa con la intención de conocer la capacidad de los animales para metabolizarla (Fig. 7). Al administrar la dextrosa, observamos que el grupo diabético alcanzó una concentración de 295 ± 38 mg/dl (95 mg/dl arriba de su basal) mientras que en el grupo control la concentración fue de 180 ± 12 mg/dl (91 mg/dl arriba de su basal). Es evidente que, desde el inicio de la prueba, los animales diabéticos tuvieron la glicemia más alta, y aunque al parecer tienen la capacidad de metabolizarla en ningún punto de la curva llegan a concentraciones basales. Al término de la prueba, los animales diabéticos tuvieron una concentración de 219 ± 16 mg/dl.

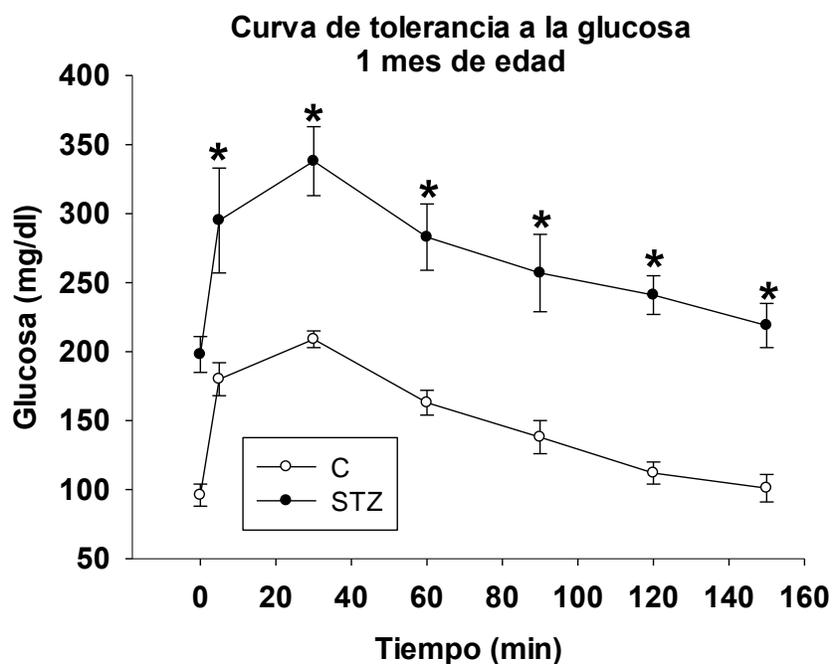


Fig. 7. Curva de tolerancia a la glucosa a diferentes tiempos en ratas C y STZ al mes de vida. $n=5$ (* $p < 0.05$).

Observamos que al paso de los minutos en el grupo C disminuyó gradualmente su glucosa y al término de la curva llegó a su concentración basal (101 ± 10 mg/dl). Con lo anterior podemos ver que se logró generar el modelo de DM2 en las ratas Wistar.

Como ya se mencionó, se realizó un seguimiento de la concentración de glucosa de los diferentes grupos de ratas Wistar. En la Fig. 8A se observa que en las ratas control la concentración de glucosa fue de 100 ± 12 mg/dl en promedio durante los 6 meses de experimentación. Al recibir únicamente la inyección con el buffer de citratos no se esperaban grandes variaciones en la glicemia en este grupo de animales. Por otro lado, en los animales diabéticos se observó que al mes de edad y al destete de estos animales, la concentración de glucosa fue de 210 ± 40 mg/dl. La glicemia se mantuvo oscilando entre los 210 ± 40 y 270 ± 52 mg/dl hasta los 4 meses de vida, sin embargo a los 5 meses incrementó severamente alcanzando los 408 ± 101 mg/dl manteniéndose así hasta los 6 meses de edad.

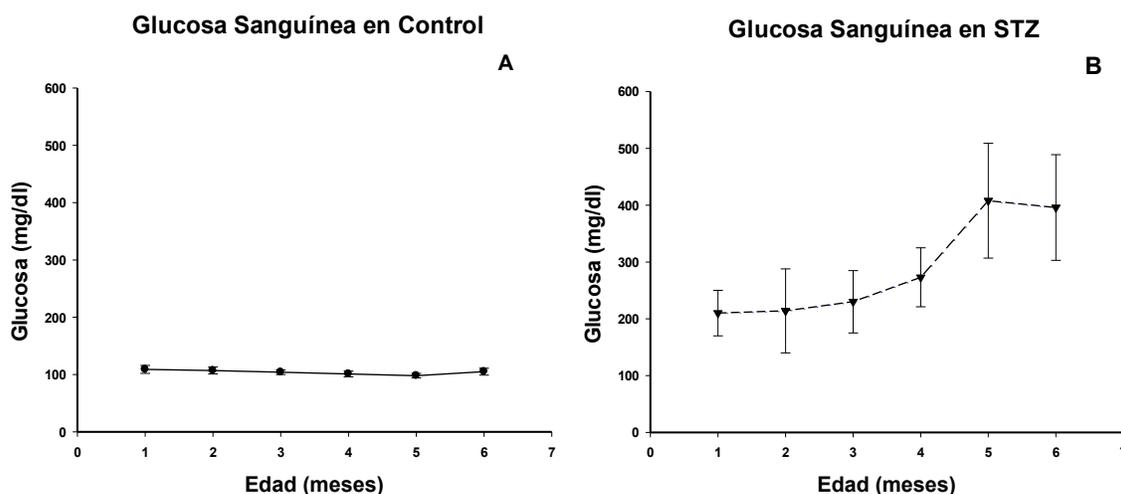


Fig. 8. Concentración de glucosa sanguínea en A) grupo control y B) en el grupo STZ a diferentes edades. n=5

Con respecto a los animales inducidos a diabetes y suplementados con ALA (STZ-ALA) se observaron datos interesantes (Fig. 9A). Este grupo de animales tuvo una concentración elevada de glucosa al mes de edad (210 ± 40 mg/dl). A partir de ese momento se comenzó a suplementar a dicho grupo. A los dos meses de edad se observa que la glicemia se mantiene sin grandes variaciones (214 ± 28 mg/dl), sin embargo a los 3 meses de edad (2

meses de suplementación) la glicemia disminuyó considerablemente, llegando a 150 ± 13 mg/dl. En la misma figura se puede observar que durante el tratamiento dicha concentración continuó disminuyendo hasta los 6 meses de edad llegando a concentraciones basales (102 ± 20 mg/dl). No obstante, en el caso de los animales normoglicémicos (C-ALA) encontramos un resultado inesperado.

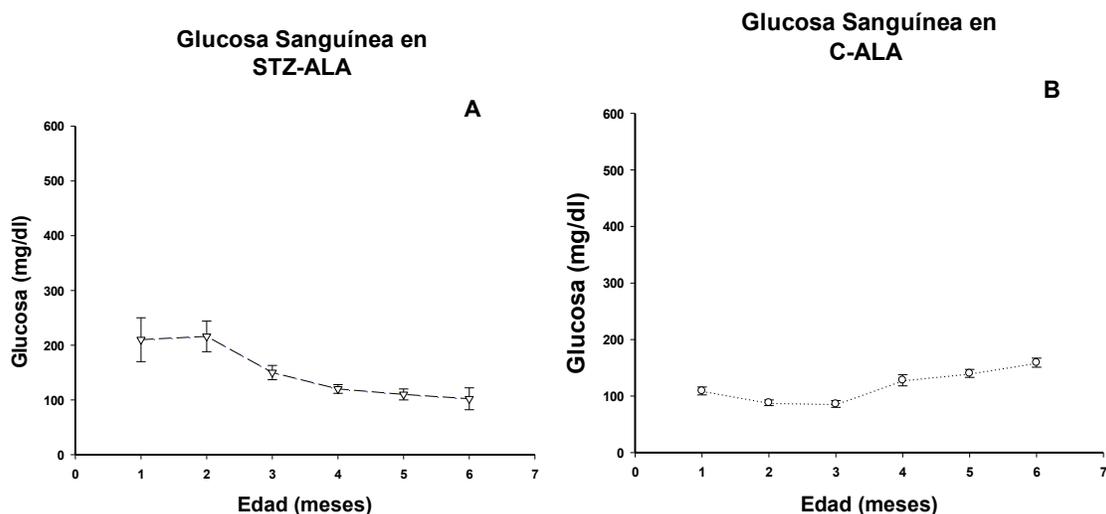


Fig. 9. Concentración de glucosa sanguínea de los animales suplementados con ALA a diferentes edades. A) STZ-ALA y B) ALA n=5

En la figura 9B se puede observar que la concentración de glucosa en el grupo C-ALA fue de 109 ± 7 mg/dl al mes de edad. En ese momento comenzó la suplementación y posteriormente se observó una ligera disminución de la glicemia a los 2 y 3 meses de edad (88 ± 5 y 86 ± 6 mg/dl). Sin embargo, a los 5 y 6 meses de vida hubo un notable incremento de la glucosa (140 ± 8 y 159 ± 6 mg/dl respectivamente).

Al comparar las glicemias entre el grupo control y el grupo C-ALA (Fig. 10) se observa de manera notoria el incremento en la concentración de glucosa en el grupo C-ALA. Estos datos son relevantes ya que en la literatura se ha indicado principalmente que los suplementos de AGPIs omega-3 suelen tener efectos hipoglucemiantes después de un periodo de ingesta. Sin embargo nuestros datos apuntan a que en condiciones normales, es decir sin el desarrollo de alguna enfermedad, los AGPIs ω -3 no parecen ser del todo benéficos.

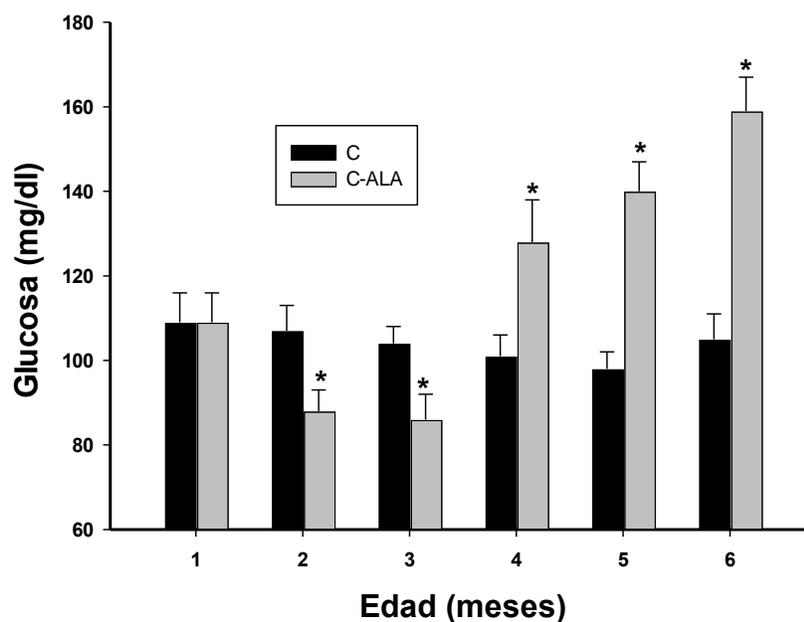


Fig. 10. Comparación de la glucosa sanguínea en el grupo Control y el grupo ALA durante los 6 meses de experimentación. n=5 ***p < 0.05** en relación al grupo control.

En la figura 11 se muestran los cambios ocurridos en los grupos de Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad. Observamos claramente que las ratas diabéticas alcanzaron una concentración de glucosa más alta con respecto al grupo control, la cual se mantuvo así hasta los 6 meses de vida. Asimismo se observa que el grupo STZ-ALA tuvo un control de la glicemia a los 3 meses de edad, llegando a concentraciones basales y manteniéndose así hasta los 6 meses de vida. En la misma figura también se observa incremento significativo de la concentración de glucosa en el grupo C-ALA con respecto al grupo C y al grupo STZ-ALA, probablemente como consecuencia del suplemento.

Glucosa sanguínea en Wistar

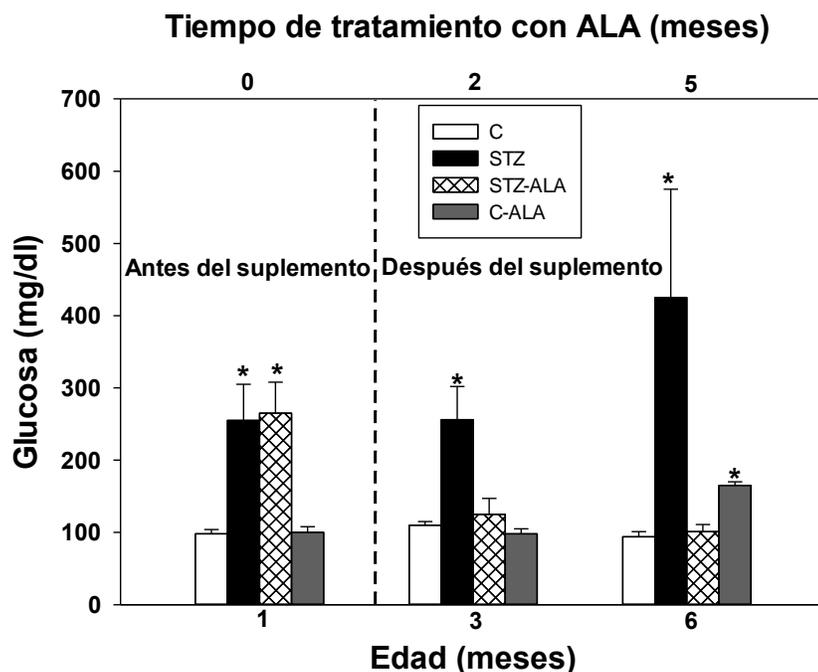


Fig. 11. Concentración de glucosa en los grupos de ratas Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad. n=5 *p < 0.05 en relación al grupo control.

La ganancia de peso corporal en los cuatro grupos de animales se muestra en la figura 12A. Se observa que al destete los animales presentan diferencias significativas en la ganancia de peso corporal (102 ± 3.4 g y 90 ± 5.9 g control y diabéticas respectivamente) las cuales se fueron acentuando con el paso del tiempo. En las STZ la ganancia de peso a los 3 y 6 meses de edad fue de 330 ± 28 g y 420 ± 19 g respectivamente, menor con respecto a la del grupo control que fue de 414 g y 602 g a los 3 y 6 meses de vida. Al analizar estos datos y compararlos con las glicemias de la Fig. 12B se observa que el incremento de la glucosa sanguínea repercute en una menor ganancia de peso y que el control de la glicemia en las STZ-ALA da como resultado una ganancia de peso similar al grupo control a los 3 y 6 meses de edad.

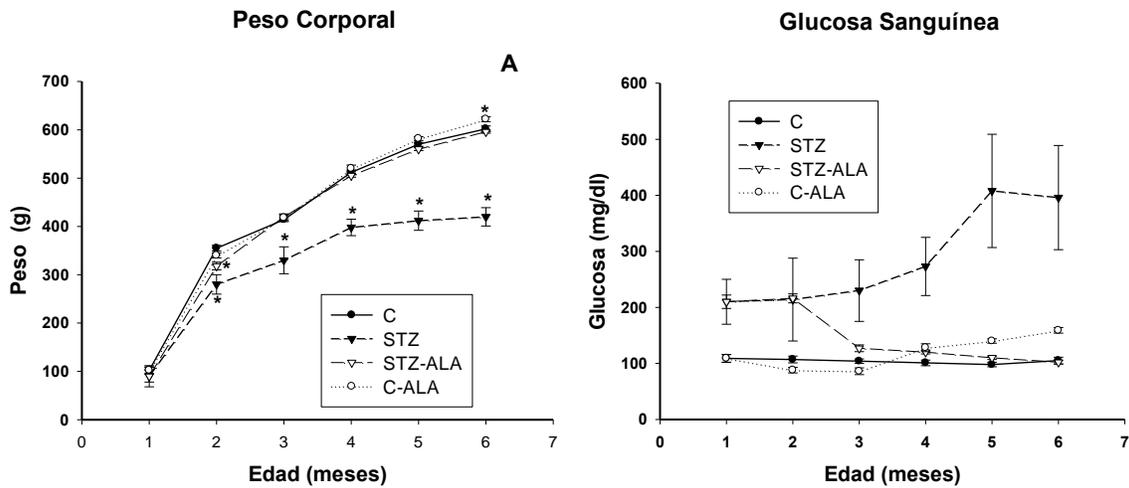


Fig. 12. Peso corporal y concentración de glucosa sanguínea de los grupos de ratas Wistar durante los 6 meses de vida. n=5 *p < 0.05 en relación al grupo control.

4.2 Colesterol y triglicéridos

Al medir el colesterol y triglicéridos de los animales normoglicémicos, diabéticos y/o suplementados con ALA encontramos los siguientes resultados:

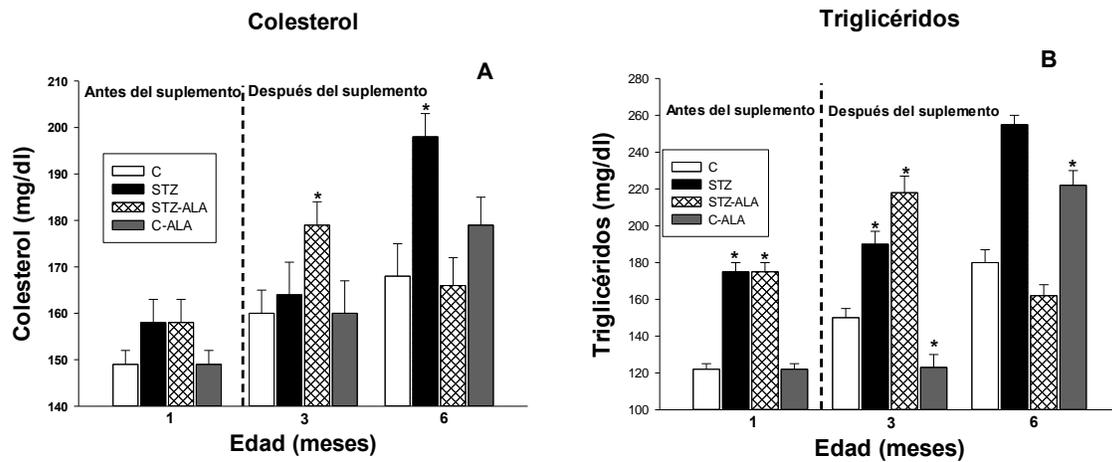


Fig. 13. Concentración de lípidos sanguíneos en ratas Wistar a 1 mes de edad (previo al tratamiento) y a 3 y 6 meses de edad (2 y 5 meses de tratamiento) A) Contenido de colesterol y B) de triglicéridos n=5 p < 0.05 en relación al grupo control.

Al mes de edad, no hubo diferencias significativas en la concentración de colesterol entre el grupo diabético y el control (158 ± 5 y 149 ± 3 mg/dl respectivamente). Sin embargo, de forma similar a lo observado en la glicemia (Fig. 7B) al paso de los meses incrementó notablemente la concentración de colesterol en los animales diabéticos alcanzando los 198 ± 7 mg/dl a los 6 meses de edad (Fig. 13 A). El grupo STZ-ALA mostró un incremento significativo de colesterol a los 3 meses de edad, con una concentración de 179 ± 6 mg/dl. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la concentración de colesterol (166 ± 6 mg/dl) a los 6 meses de vida, alcanzando valores similares al control, probablemente como consecuencia del suplemento. En el grupo C-ALA se puede ver un ligero incremento de la concentración de colesterol, sin embargo no fue significativo.

La concentración de triglicéridos fue significativamente más alta en los animales diabéticos desde el primer mes de vida (175 ± 5 mg/dl) con respecto al grupo control (122 ± 3 mg/dl) (Fig. 13 B). En la misma figura se observa que dicho parámetro incrementó considerablemente con el desarrollo de la diabetes ya que en este grupo los triglicéridos fueron de 255 ± 7 mg/dl a los 6 meses de vida. Caso contrario, las ratas control tuvieron una menor concentración a las mismas edades. En este estudio corroboramos que el suplemento de ALA controló la concentración de triglicéridos sanguíneo en las STZ-ALA a los 6 meses de vida. A esta edad las STZ-ALA tuvieron 162 ± 6 mg/dl de triglicéridos, significativamente más bajo con respecto a las ratas diabéticas y las ratas control.

En el caso de los animales del grupo C-ALA, se observan variaciones en el contenido de triglicéridos sanguíneos durante los meses de experimentación. Por una parte, a los 3 meses de edad disminuyó de manera significativa en comparación con los grupos restantes (Fig. 13B) Sin embargo, posteriormente incrementó de manera severa, alcanzando los 220 ± 8 mg/dl, una concentración similar a la encontrada en los animales diabéticos a los 6 meses de vida.

Observamos que el suplemento de ALA suministrado a los animales inducidos a diabetes tuvo un efecto hipolipidémico a los 6 meses de edad (Fig. 13), además de controlar la glicemia (Fig. 9 y 13), y las concentraciones sanguíneas de colesterol y triglicéridos. Sin

embargo, en los animales normoglucémicos suplementados con ALA los efectos parecen ser contraproducentes pues se detectó un incremento en la glucosa y triglicéridos sanguíneos a los 6 meses de edad (Fig. 10 y 13).

4.3 Actividad Mitocondrial

Parte importante del presente estudio fue conocer las modificaciones en la actividad mitocondrial durante el desarrollo de la diabetes así como los posibles efectos de los AGPIs ω -3 para contrarrestar los efectos de dicha patología. Por tal motivo realizamos las mediciones del consumo de oxígeno de las mitocondrias a 1, 3 y 6 meses de edad.

Al analizar los datos obtenidos de las mitocondrias de las ratas de 1 mes de edad observamos que el consumo de oxígeno en el estado 4 (Fig. 14) no presentó diferencias significativas entre el grupo control y diabético (70 ± 12 y 74 ± 5 nAtO/min/mg prot respectivamente). Sin embargo, tras la adición de ADP (200 nm), el consumo de oxígeno en estado 3 de las STZ fue significativamente mayor en comparación de sus contrapartes normoglicémicas (223 ± 10 nAtO/min/mg prot. y 180 ± 11 nAtO/min/mg prot respectivamente).

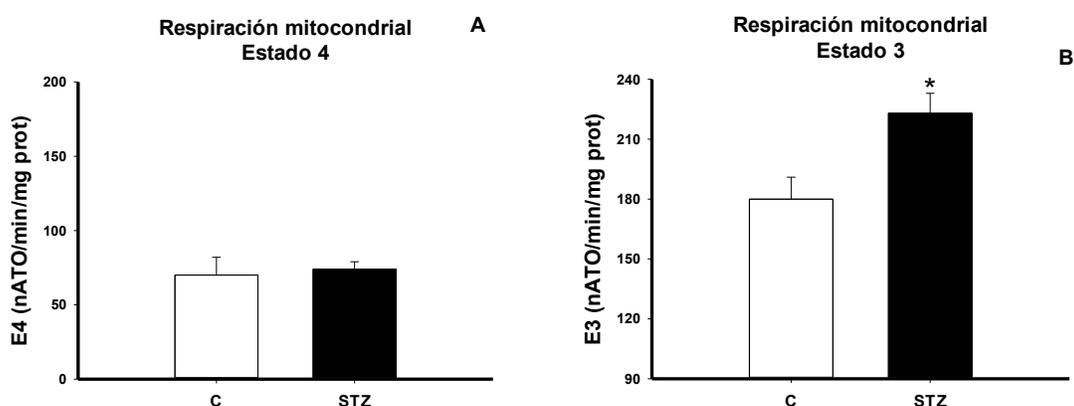


Fig. 14. Actividad mitocondrial a 1 mes de edad. A) Respiración en estado 4 y B) Respiración en estado 3. n=5 (* $p < 0.05$).

A los 3 meses de vida, observamos nuevamente que durante el estado 4 de las mitocondrias no hubo diferencias significativas entre los 4 grupos de animales (Fig. 15A). No obstante tras la adición del ADP fue notorio el incremento en la actividad mitocondrial. En la figura 15B se observa que los animales diabéticos tuvieron un menor consumo de oxígeno con respecto al resto de los grupos (83.2 ± 4.6 nAtO/min/mg prot). Es interesante el hecho de que a los 3 meses de edad los animales diabéticos hayan mostrado un menor consumo de oxígeno en estado 3 con respecto al grupo control; ya que al mes de vida (Fig.14B) los animales diabéticos tuvieron mayor consumo. Más adelante, se discutirá la posible relación entre el consumo de oxígeno y los cambios en la hiperglicemia, la composición de ácidos grasos y la fluidez membranal.

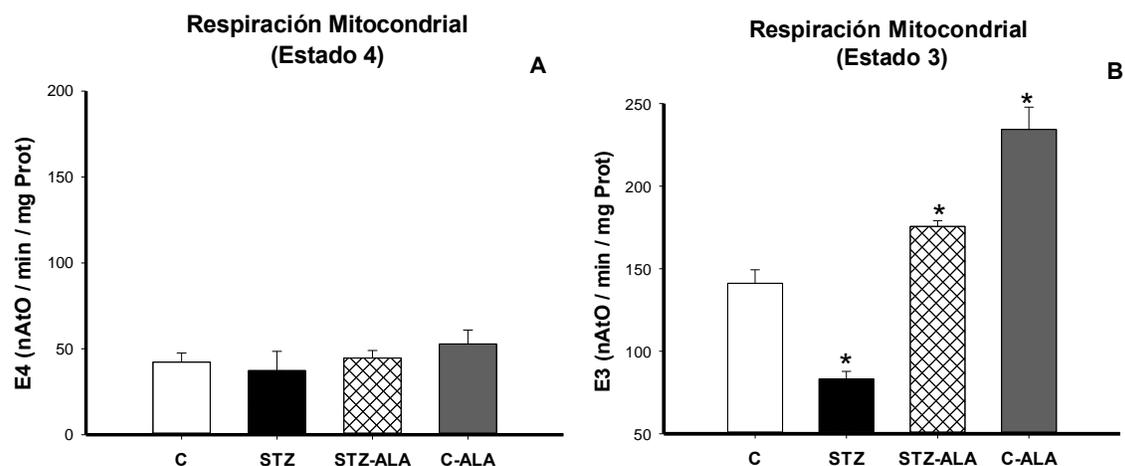


Fig. 15. Actividad mitocondrial a 3 meses de edad. A) Respiración en estado 4 y B) Respiración en estado 3. n=5 * $p < 0.05$ en relación al grupo control.

Al suplementar a los animales inducidos a diabetes se controló la glicemia y los lípidos sanguíneos. La Fig. 15B nos muestra que también el ALA parece influir en la actividad mitocondrial. Al comparar el consumo de oxígeno en el estado 3 de las STZ-ALA con su contraparte no suplementada ($175.6 \pm$ y $83.2 \pm$ nAtO/min/mg prot respectivamente) observamos que el consumo de oxígeno fue 112% mayor. De igual manera al comparar el consumo de oxígeno de las STZ-ALA con el grupo C (175.6 ± 3.5 y 141.2 ± 8.2 nAtO/min/mg prot) notamos que dicho consumo fue 24% más alto. Al analizar a las C-ALA observamos que este grupo tuvo el mayor consumo de oxígeno. El estado 3 fue de 234.4 ± 13.5

nAtO/min/mg prot, mientras que en el grupo C fue de 141.2 ± 8.2 nAtO/min/mg prot, es decir fue 66% más alto en el grupo C-ALA.

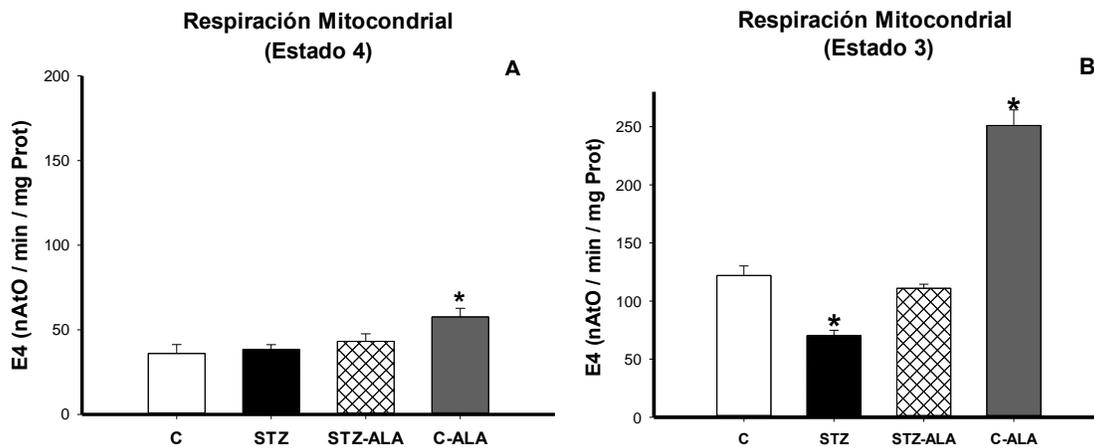


Fig. 16. Actividad mitocondrial a 6 meses de edad. A) Respiración en estado 4 y B) Respiración en estado 3. $n=5$ $p < 0.05$ en relación al grupo control.

Al comparar los resultados de 1 y 3 meses de edad (Fig. 13 B y 14 B) observamos que las mitocondrias de los animales del grupo STZ consumen una mayor cantidad de oxígeno tras la adición del ADP y que a los 3 meses de vida este grupo presentó el consumo de oxígeno más bajo. Este efecto se agudizó a los 6 meses de vida pues al analizar el consumo de oxígeno de los animales diabéticos (Fig. 16B) se observa un consumo bajo en el estado 3 (70 ± 8.2 nAtO/min/mg prot) con respecto al grupo control (122 ± 4.6 nAtO/min/mg prot).

A los 6 meses de edad STZ-ALA tuvieron un consumo de oxígeno similar al grupo control, sin diferencias significativas (111 ± 3.5 y 122 ± 8.2 nAtO/min/mg prot). Por otro lado, el grupo ALA mostró diferencias significativas durante el estado 4 y 3 (Fig. 16A y B). Su consumo basal de oxígeno fue más alto que el resto de los grupos y tras la adición de ADP se observa un consumo de 251 ± 13.5 nAtO/min/mg prot, muy por encima de los demás grupos.

Se calculó el control respiratorio con las pendientes obtenidas de los trazos del oxímetro en los estados 3 y 4, para determinar qué tan acopladas se encontraban las

mitocondrias de los 4 grupos de animales. Para hacer un análisis integral de todos los datos, se graficaron a las tres edades de estudio (Fig. 17). Los animales STZ iniciaron con un CR de 3.01 ± 0.03 , mientras que el grupo C tuvo un valor de 2.57 ± 0.05 , significativamente más bajo. Sin embargo, como hemos observado previamente, a los tres meses de vida la actividad mitocondrial disminuyó drásticamente en los animales diabéticos, lo cual es evidente al analizar el CR. El valor fue de 1.45 ± 0.09 , es decir 52% más bajo con respecto al 1er mes de vida. Aunque a los 6 meses de vida este valor incrementa ligeramente (1.84 ± 0.1) sigue siendo muy bajo, lo cual refleja un desacoplamiento de la actividad mitocondrial, muy probablemente como consecuencia del desarrollo de la diabetes.

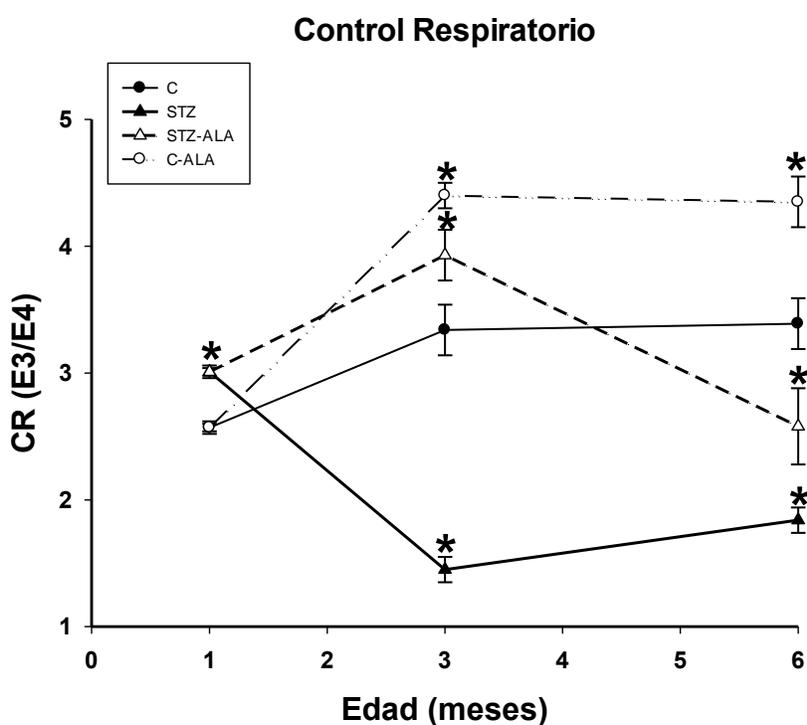


Fig. 17. Análisis del control respiratorio de mitocondrias de hígado de los grupos Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad. $n=5$ (* $p < 0.05$).

Los animales suplementados con ALA mostraron un aumento en el consumo de oxígeno en el estado 3. Al analizar el CR de los grupos STZ-ALA y C-ALA y control a la edad de 3 meses, notamos que este parámetro fue mayor significativamente en los animales suplementados (3.93 ± 0.3 , 4.4 ± 0.2 y 3.34 ± 0.3 respectivamente). En el caso de las STZ-ALA el CR disminuyó un 44% a los 6 meses de edad al compararlo con el valor obtenido a los 3 meses, mientras que en el grupo C-ALA dicho parámetro fue el más alto, con un valor de

4.35±0.2. Posiblemente, el ALA estimula la actividad de las mitocondrias mediante diversos procesos como puede ser un incremento en la beta oxidación (información que se discutirá con profundidad más adelante) así como en la modificación de sus propiedades fisicoquímicas (composición de ácidos grasos y fluidez), las cuales se mostrarán a continuación.

Hasta este punto hemos hablado sobre las modificaciones metabólicas (glucosa, colesterol y triglicéridos) durante la diabetes y su posible repercusión en la actividad mitocondrial. Al analizar los parámetros respiratorios de las mitocondrias notamos diversos cambios asociados a la suplementación con ALA que podrían estar relacionados con la fluidez membranal y con la composición de ácidos grasos. Por esta razón se analizaron dichos parámetros para conocer su posible participación en la actividad mitocondrial.

4.4 Composición de ácidos grasos de mitocondrias de hígado

En la tabla 1 se muestra la composición de ácidos grasos de las mitocondrias del grupo control y el grupo diabético. Durante el primer mes de vida ocurrieron diversos cambios. Para ilustrar dichas modificaciones tomaremos como ejemplo al palmítico, oleico y docosahexaenoico, que representan a un ácido graso saturado, monoinsaturado y poliinsaturado, respectivamente.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 1 mes de edad.

Ácidos Grasos	C	STZ
Palmítico	20.0±1.1	17.1±0.5*
Palmitoleico	0.3±0.2	1.5±0.6*
Esteárico	21.9±2.2	20.6±0.7
Oleico	9.4±1.4	12.0±0.4*
Linoleico	17.0±1.6	18.4±0.4
γ linoleico	0.1±0.0	0.2±0.0
Araquidónico	21.4±0.8	20.0±0.7
EPA	NI	NI
DHA	9.1±0.2	10.1±0.2*
NI	0.7±0.3	0.1±0.1
Ins/Sat	1.4±0.09	1.7±0.04*

EPA: Ácido Eicosapentaenoico DHA: Acido Docosaheaxaenoico.
 NI: No Identificado Ins/Sat: Insaturados/Saturados.

n=5 *p< 0.05

En las STZ el ácido palmítico tuvo un porcentaje del 17.1±0.5% mientras que en el grupo C el porcentaje fue de 20±1.1%, Por otro lado, el ácido oleico se encontró presente en las membranas mitocondriales en un 12±0.4% en el grupo diabético y en un 9.4±1.4% en el grupo control. Finalmente, en el caso del DHA, observamos que el grupo diabético presentó 11% más de dicho ácido graso con respecto al grupo control (10.1±0.2 y 9.1±0.2 respectivamente). Estos ligeros cambios afectaron el cociente de insaturación, en el grupo diabético. El valor de dicho cociente fue de 1.7±0.04 mientras que en el grupo control fue significativamente más bajo (1.4±0.09).

En la tabla 2 se muestra la composición de ácidos grasos de las mitocondrias de hígado de ratas Wistar a 3 meses de edad. De manera similar al primer mes de vida, encontramos variaciones en los porcentajes de diversos ácidos grasos. Resulta complicado hablar de cada uno de esos cambios, por ello tomaremos como referente nuevamente a un ácido graso saturado, un ácido graso monoinsaturado y un ácido graso poliinsaturado.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 3 meses de edad.

Ácidos grasos	C	STZ	STZ-ALA	C-ALA
Mirístico	0.2 ±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1
Palmítico	18.6±0.8	20.2±0.2*	19.8±0.5	19.7±1.4
Palmitoleico	0.1±0.0	0.2±0.1	1.8±0.4*	1.2±0.3*
Esteárico	20.0±1.1	21.6±0.3	17.6±1.2	18.3±1.4
Oleico	10.2±0.9	8.8±0.4*	13.6±1.7*	10.4±1.6
Linoleico	18.5±0.8	21.6±1.7	20.2±0.5*	19.8±0.8
γ Linolénico	0.4±0.1	0.7±0.3*	0.3±0.1	0.4±0.1
α Linolénico	NI	NI	0.8±0.1*	1.1±0.1*
Araquidónico	24.1.0±0.9	21.5±1.2*	19.5±1.5*	22.5±1.3
EPA	NI	NI	0.4±0.1*	0.6±0.1*
DHA	7.3±0.2	4.8±0.3*	5.3±0.2*	5.1±0.9*
NI	0.6±0.2	0.3±0.3	0.3±0.1	0.5±0.2
Ins/Sat	1.56±0.04	1.36±0.07*	1.63±0.08	1.59±0.06

EPA: Ácido Eicosapentaenoico DHA: Acido Docosahexaenoico. NI: No Identificado Ins/Sat: Insaturados/Saturados.
n=5 *p< 0.05

En los animales diabéticos el contenido de ácido palmítico fue de 20.2±0.2%. Al comparar este porcentaje con el del primer mes, notamos un incremento del 18%. Además, observamos que dicho ácido graso fue mayor en las ratas diabéticas con respecto al grupo control. En el caso de los animales suplementados no observamos cambios.

Por otro lado, el ácido oleico tuvo un porcentaje menor en las mitocondrias de los animales diabéticos con respecto al grupo control (8.8±0.4 y 10.2±0.9% respectivamente). En el caso de las STZ-ALA el porcentaje fue de 13.6±1.7%, 33% más alto en comparación al grupo C. Las C-ALA no presentaron un cambio significativo.

En lo que respecta al DHA observamos algo interesante, este ácido graso disminuyó drásticamente en los animales diabéticos en un 52% de 1 a 3 meses de edad. A los 3 meses el contenido fue de 4.8±0.3%, significativamente más bajo con respecto al grupo control que tuvo un porcentaje de 7.3±0.2. Las modificaciones en el contenido de DHA, oleico y

palmítico en el grupo STZ pueden ser consecuencia del desarrollo de diabetes. Recordemos que en el caso de este grupo, a los 3 meses sufren una caída severa de su actividad mitocondrial (Fig. 15) por lo que no podemos descartar que estos cambios sean un factor a considerar.

Observamos que en las C-ALA, el DHA se encuentra presente en las membranas mitocondriales. En las STZ-ALA el porcentaje fue de $0.8 \pm 0.1\%$, mientras que en las C-ALA fue de $1.1 \pm 0.1\%$. Como consecuencia de la suplementación, también observamos la presencia de EPA, recordemos que el ALA es su precursor y por tal motivo tenemos la presencia de ambos. El porcentaje de EPA fue de 0.4 ± 0.1 y $0.6 \pm 0.1\%$ para el grupo STZ-ALA y ALA respectivamente. La tabla 3 muestra la composición de ácidos grasos de hígado de ratas a los 6 meses de edad. Observamos varias modificaciones las cuales pueden ser consecuencia de al menos uno de estos tres factores: la edad, la diabetes y la suplementación con AGPIs ω -3.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias de hígado de ratas Wistar a 6 meses de edad.

Ácidos grasos	C	STZ	STZ-ALA	C-ALA
Mirístico	0.0 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1
Palmítico	17.3 \pm 0.1	17.5 \pm 0.6	20.3 \pm 0.7*	20.5 \pm 1.8*
Palmitoleico	0.6 \pm 0.2	0.5 \pm 0.3	1.8 \pm 0.7*	1.9 \pm 0.5*
Esteárico	18.9 \pm 0.6	22.3 \pm 0.2*	17.2 \pm 2.0	17.3 \pm 1.1
Oleico	8.5 \pm 0.3	7.6 \pm 0.4*	10.3 \pm 0.7*	11 \pm 0.7
Linoleico	20.9 \pm 0.9	21.3 \pm 0.7	20.4 \pm 1.5	20.2 \pm 2.2
γ Linoleico	0.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.2
Linolénico	NI	NI	0.6 \pm 0.1*	1.2 \pm 0.3*
Araquidónico	26.0 \pm 0.7	20.6 \pm 0.3*	21.7 \pm 1.4*	20.3 \pm 1.6*
EPA	NI	NI	0.6 \pm 0.2*	0.6 \pm 0.1*
DHA	4.7 \pm 0.2	3.5 \pm 0.3*	4.7 \pm 0.7	6.0 \pm 0.9*
NI	2.0 \pm 0.7	1.7 \pm 0.3	1.3 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1
Ins/Sat	1.71 \pm 0.03	1.4 \pm 0.03	1.61 \pm 0.04	1.62 \pm 0.06

EPA: Ácido eicosapentaenoico DHA: Ácido docosahexaenoico. Ins/Sat: Insaturados/Saturados NI: No identificados

n=5 *p < 0.05

Hemos observado una tendencia al aumento de ácidos grasos saturados y un decremento de los ácidos grasos insaturados en las membranas mitocondriales de los animales diabéticos. Ejemplo de ello el ácido esteárico, que tuvo un porcentaje de $22.3\pm 0.2\%$, mayor con respecto a los grupos restantes. En el caso del DHA, observamos que la concentración fue baja en este grupo. Además al analizar los cambios ocurridos de 3 a 6 meses notamos que el DHA disminuyó un 27%. En conjunto estas modificaciones pueden ser una causa de la baja actividad mitocondrial que se observó en este grupo de animales (Fig. 17). Asimismo la modificación en la composición de ácidos grasos incide en la fluidez membranal, parámetro que mostraremos más adelante y que definitivamente también repercute en la actividad mitocondrial.

En los grupos suplementados, observamos que sus membranas mitocondriales presentan ALA y EPA. En las STZ-ALA el contenido fue de $0.6\pm 0.2\%$ para ambos ácidos grasos, mientras que en las C-ALA el porcentaje de ALA fue de $1.2\pm 0.3\%$ y de EPA fue del $0.6\pm 0.1\%$. Haciendo un balance general de los AGPIs ω -3 podemos ver que hay diferencias significativas entre los grupos.

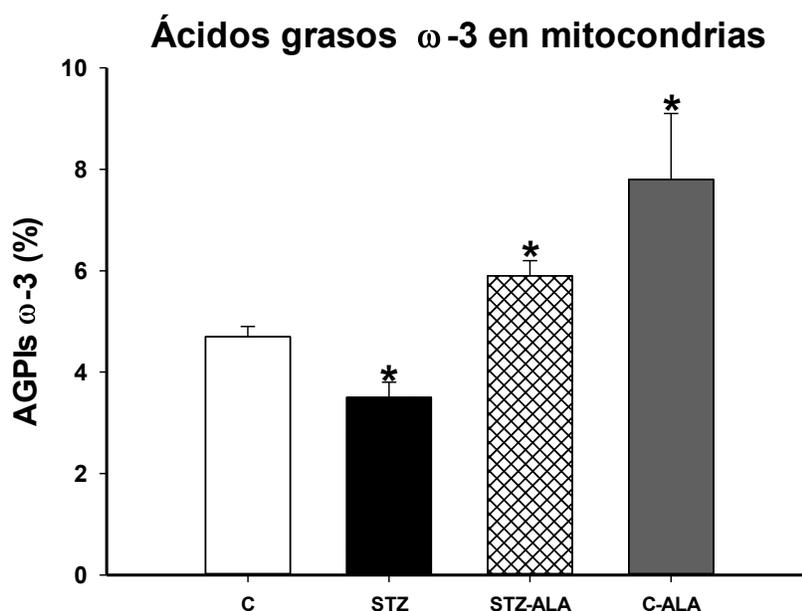


Fig. 18. Contenido de AGPIs ω -3 (mol %) en membranas mitocondriales de hígado de ratas Wistar a 6 meses de edad. $n=5$ * $p < 0.05$ en relación al grupo control.

Podemos ver en la figura 18 que el porcentaje de ω -3 en las membranas mitocondriales de los animales diabéticos fue bajo ($3.5\pm 0.3\%$) en comparación al grupo control ($4.7\pm 0.2\%$). Caso contrario, en los grupos suplementados con ALA el porcentaje de ω -3 fue significativamente mayor. En las STZ-ALA el porcentaje fue de $5.9\pm 0.5\%$ mientras que en el grupo C-ALA fue de $7.8\pm 0.3\%$. Estos datos nos muestran que el ALA proveniente del aceite de linaza se incorporó a las membranas mitocondriales y no sólo eso, parece promover la síntesis de EPA que de igual manera se ve reflejado en la composición de ácidos grasos de dichas membranas.

Al obtener la composición de ácidos grasos de las mitocondrias a 1, 3 y 6 meses de edad, obtuvimos el cociente de insaturación (Ins/Sat). En la figura 19 se muestra los cambios de dicho cociente durante los meses de experimentación.

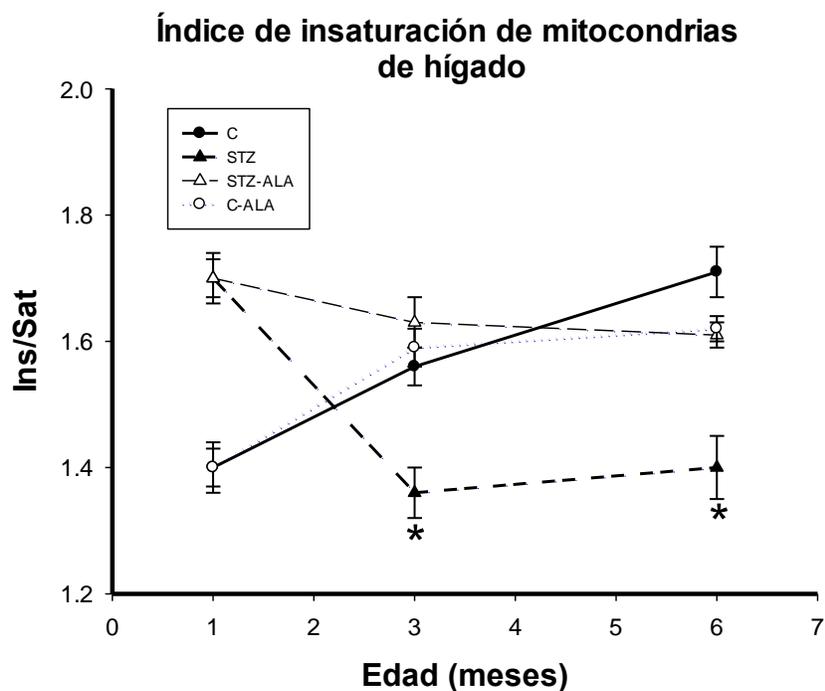


Fig. 19. Cociente de insaturación de ácidos grasos mitocondriales de hígado de ratas Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad. $n=5$ $p < 0.05$ en relación al grupo control.

Observamos claramente que los animales diabéticos iniciaron con un cociente más alto con respecto al grupo control (1.7 ± 0.09 y 1.4 ± 0.04 respectivamente). Sin embargo, es

evidente la caída abrupta de dicho cociente a los 6 meses (1.4 ± 0.03). Es probable que las modificaciones metabólicas (especialmente en lo que respecta a los lípidos), hayan repercutido gravemente a disminuir el contenido de ácidos grasos insaturados (menor fluidez membranal) generando a su vez, una disminución en la actividad mitocondrial, tal como lo observamos previamente en la figura 17. En el caso del grupo STZ-ALA observamos que a los 6 meses incrementó el contenido de AGPIs ω -3, reflejándose en el cociente de insaturación. En este grupo, el valor de Ins/Sat fue de 1.61, un 13% más alto con respecto al grupo diabético. En el caso de los animales C-ALA el cociente fue de 1.62.

Al analizar la composición de ácidos grasos nos hemos percatado de los cambios ocurridos como consecuencia de la edad, la diabetes y el suplemento de ALA. Diversos estudios han mostrado que el consumo de AGPIs modifica la composición de las membrana mitocondriales, incrementando el índice de insaturación y la fluidez membranal (Jump 2002, Leonard *et al.*, 2004, Das 2006, Rohrbach 2009; Yu *et al.*, 2013,) repercutiendo en la función de las mitocondrias. La composición de ácidos grasos así como el grado de insaturación de los mismos en los fosfolípidos es de gran importancia para la regulación de la fluidez membranal, la permeabilidad y, por consiguiente de las funciones especializadas de las membranas mitocondriales. Por ello realizamos las mediciones de fluidez membranal para conocer su posible participación y su correlación con la actividad mitocondrial.

4.5 Fluidez membranal de mitocondrias de hígado

Para las mediciones de fluidez membranal a 1 mes de edad utilizamos los monitores de fluorescencia DPiP, DPH y TMA-DPH con la finalidad de evaluar la fluidez en tres regiones diferentes: la parte intermedia de la monocapa, el núcleo y la región superficial de la bicapa lipídica. Las membranas mitocondriales fueron sometidas a un barrido de temperatura desde los 10 °C hasta 60°C con el objetivo de detectar la transición de fases (Fase gel-cristal líquido) y con ello conocer las características termotrópicas de las membranas mitocondriales.

En la figura 20A observamos que utilizando el DPiP las membranas mitocondriales del grupo STZ mostraron una mayor fluidez desde el inicio de las mediciones. Al analizar la composición de ácidos grasos observamos que el cociente de insaturación fue más alto en este grupo a la misma edad (Fig. 19), lo cual concuerda con una mayor fluidez membranal. Relacionando ambos resultados con el control respiratorio (Fig. 17) notamos que un incremento en la fluidez membranal derivado de la composición de ácidos grasos está relacionado con una mayor actividad mitocondrial.

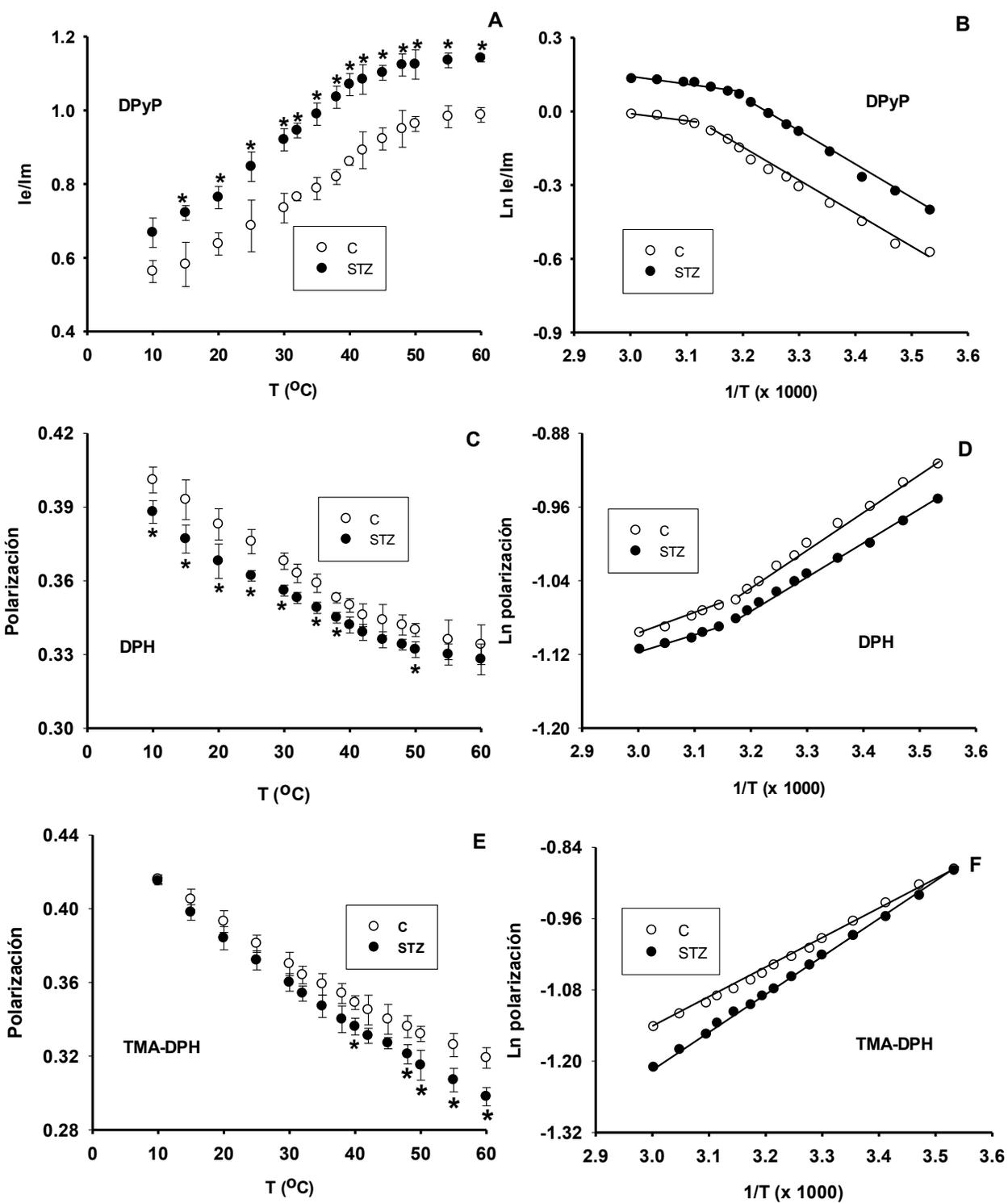


Fig. 20. Medición de fluidez membranal de mitocondrias de hígado de ratas control y diabéticas detectadas con los monitores fluorescentes A) DPiP B) DPH y C) TMA-DPH.

Gráficos de Arrhenius de los análisis termotrópicos correspondientes. B), D) y E) n=5 (*p < 0.05).

Cuando analizamos la fluidez membranal con el DPH el cual se ubica preferentemente en el núcleo de la bicapa lipídica, observamos nuevamente que las membranas mitocondriales del grupo diabético presentan una mayor fluidez en esta región. Sin embargo, pese a que hay diferencias significativas, las diferencias entre ambos grupos son menores con respecto a lo reflejado con el DPiP. Las mediciones con el TMA-DPH muestran la fluidez de la región superficial de la membrana. En este caso, observamos que las diferencias en la fluidez entre ambos grupos fueron mínimas (Fig. 20E). Sólo a temperaturas altas (48 °C) dicho parámetro es mayor en los animales diabéticos.

Al parecer el movimiento del TMA-DPH dentro de la membrana está influenciado principalmente por las cabezas polares de los fosfolípidos, mientras que el DPiP y el DPH son más sensibles a los cambios ocurridos en la composición de ácidos grasos. En conjunto, estos resultados nos dan una gran información de lo acontecido en las membranas por los cambios generados con el desarrollo de la diabetes.

Las mediciones de fluidez membranal con los diferentes monitores se analizaron mediante los gráficos de Arrhenius y se obtuvieron las energías de activación de las fases de las membranas mitocondriales. Observamos que al utilizar el DPiP y el DPH se aprecian los puntos de inflexión (Fig. 20 B y D), los cuales reflejan la transición de fases de las mitocondrias de ambos grupos. Sin embargo, cuando se realizaron las mediciones con el TMA-DPH (Fig. 20F) no se detectó la transición de fases.

Tabla 4. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y cristal líquido de mitocondrias de hígado de ratas Wistar a 1 mes de edad. n=5 ($p < 0.05$).

	Grupo	Energía de activación (Kcal/mol)		Temperatura de transición de fase (°C)
		Gel	Cristal- Líquido	
DPiP	Control	18.2±1.8	3.37±0.6	45±1.4
	STZ	14.3±1.3*	3.91±0.4	38±1.5*
DPH	Control	1.74±0.05	0.91±0.04	45±1.4
	STZ	1.61±0.03*	0.74±0.08	45±1.6
TMA-DPH	Control	1.72±0.07	ND	ND
	STZ	1.54±0.08	ND	ND

ND: No detectada

n=5 * $p < 0.05$

En la tabla 4 se muestran las energías de activación evaluada con los tres monitores de fluidez membranal. En la misma tabla podemos ver que la energía de activación fue significativamente menor en los animales diabéticos en fase gel respecto al grupo control detectada por el DPiP (14.3±1.3 y 18.2±1.8) y con el DPH (1.74±0.05 y 1.61±0.03). Notamos que el DPiP parece ser más sensible a la transición de fases, debido a que el microambiente que percibe un monitor, puede ser distinto al que percibe otro. Los monitores utilizados se insertan en diferentes zonas de las membranas. En el caso del DPiP se ubica preferencialmente en la región intermedia de la monocapa de lípidos, mientras que el DPH se localiza preferencialmente en el núcleo de la bicapa.

Respecto a la temperatura de transición de fases, encontramos que en las membranas mitocondriales de los animales diabéticos ésta fue significativamente más baja con respecto al grupo control. Con el DPiP, la temperatura de transición en el grupo STZ fue de 38.5±1.5°C mientras que el grupo control tuvo una temperatura de transición de 45±1.4°C. En el caso del DPH la temperatura de transición fue de 45 °C en ambos grupos mientras que con el TMA-DPH no se detectó transición de fases.

En la figura 21A se muestra la fluidez membranal a los 6 meses de edad. Las mitocondrias del grupo diabético fueron significativamente menos fluidas al compararlas con el grupo control. Observamos que lo ocurrido al primer mes, donde los animales diabéticos presentaron una mayor fluidez membranal, se revierte completamente. A los 6 meses de vida, el Ins/Sat también fue bajo, de tal manera que la fluidez observada podría ser consecuencia de las modificaciones en la composición de ácidos grasos, derivadas de la diabetes. Es interesante recordar que a esta edad, también el acoplamiento de las mitocondrias fue más bajo en el grupo STZ (Fig. 17) lo que refleja la relación existente entre la respiración mitocondrial y la fluidez de las membranas mitocondriales.

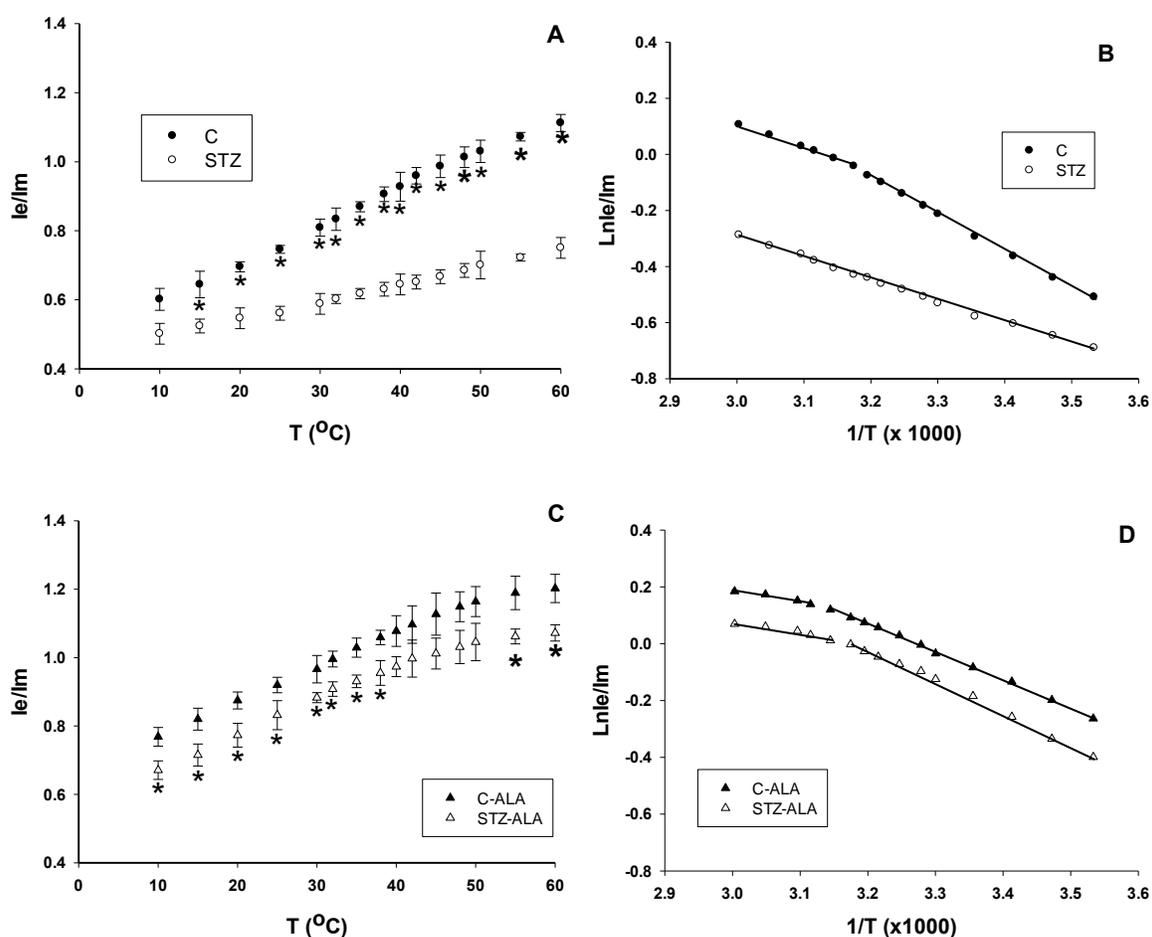


Fig. 21. Medición de fluidez membranal a los 6 meses de edad detectada por el DPiP a diferentes temperaturas A) Mitocondrias de hígado del grupo Control y STZ y C) Grupo STZ-ALA y ALA. Análisis termotrópicos mediante gráficos de Arrhenius. B) Grupo Control y STZ D) Grupo STZ-ALA y ALA. $n=5$ ($p < 0.05$).

En el caso de los animales del grupo STZ-ALA, observamos que la fluidez membranal fue significativamente más baja con respecto al grupo C-ALA (Fig. 21C). Sin embargo si comparamos los valores de ambos grupos con el control, notamos que no hay diferencias significativas. El grupo STZ mostró la fluidez más baja con respecto a todos los grupos.

Para hacer un análisis más claro de los cocientes de insaturación y de fluidez membranal se muestran los valores de Ins/Sat y los valores de Ie/Im (obtenidos a 38 ° C) de los cuatro grupos a los 6 meses de vida en la figura 22 A y B.

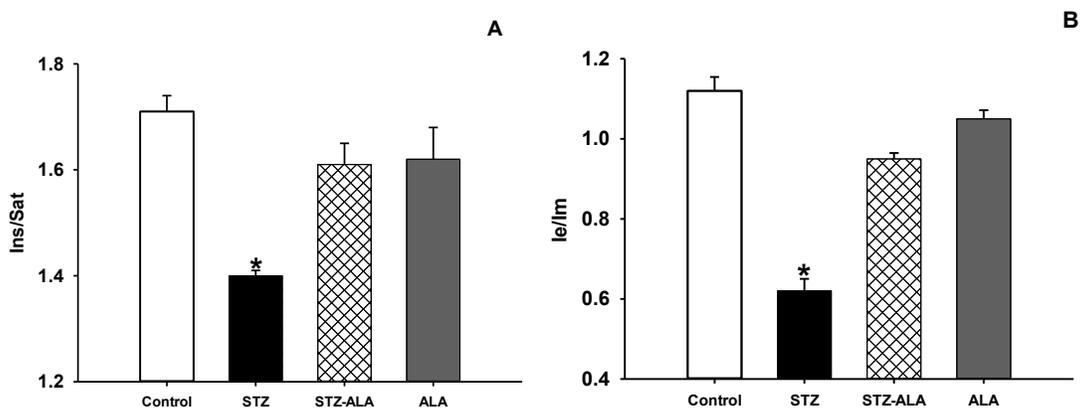


Fig. 22. A) Cociente de insaturación de ácidos grasos de membranas mitocondriales a 6 meses de edad. B) Fluidez membranal (38 ° C) por el monitor de fluorescencia DPYP en membranas mitocondriales a 6 meses de edad. n=5 $p < 0.05$ en relación al grupo control.

Observamos que en ambos parámetros, los animales STZ tuvieron valores bajos, lo cual refleja una mayor rigidez de sus membranas. En el caso de los animales STZ-ALA, la fluidez de sus membranas se asemeja a la de los animales normoglicémicos. Con estos resultados podemos decir que la fluidez de las membranas parece ser dependiente de la composición de ácidos grasos.

Durante la descripción de los resultados de fluidez membranal se habló brevemente de la relación que puede tener dicho parámetro con la actividad mitocondrial, en específico con el control respiratorio. Para un mejor análisis de la relación de ambos parámetros, se

construyeron gráficas de CR e Ie/Im a 1, 3 y 6 meses de vida. Asimismo, para tener una mayor precisión en el análisis, las gráficas fueron realizadas por grupo.

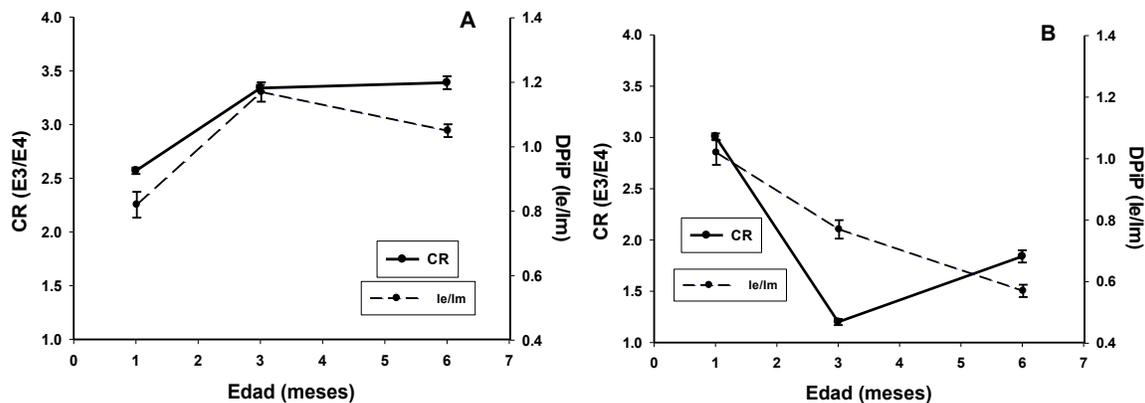


Fig. 23. Cambios en la fluidez membranal y CR al paso del tiempo (1, 3 y 6 meses de edad). A) Grupo control B) Grupo STZ n=5 (* $p < 0.05$).

En ambos grupos (Control y STZ) el control respiratorio mostró un comportamiento similar al reportado por el DPiP. En el grupo control incrementó la fluidez membranal a partir de los 3 meses de vida y se mantuvo así hasta los 6 meses. En el mismo sentido notamos un incremento en el consumo de oxígeno al paso del tiempo. Caso contrario lo observamos en las membranas mitocondriales de los animales diabéticos, donde la fluidez membranal disminuyó drásticamente a los 3 meses de edad, haciéndose aún más rígidas las membranas a los 6 meses (Fig. 23). Dichas modificaciones repercutieron severamente en el consumo de oxígeno mitocondrial llevando a un decremento en el control respiratorio.

Al realizar el mismo análisis comparativo en los grupos suplementados con ALA (Fig. 24) encontramos resultados similares a los grupos anteriores. En el caso del grupo C-ALA observamos un aumento en la fluidez membranal a los 3 meses de edad, el cual disminuye ligeramente a los 6 meses. El control respiratorio mostró una cinética muy parecida a la reportada por el DPiP, reflejando la relación que hay entre la fluidez y el consumo de oxígeno mitocondrial.

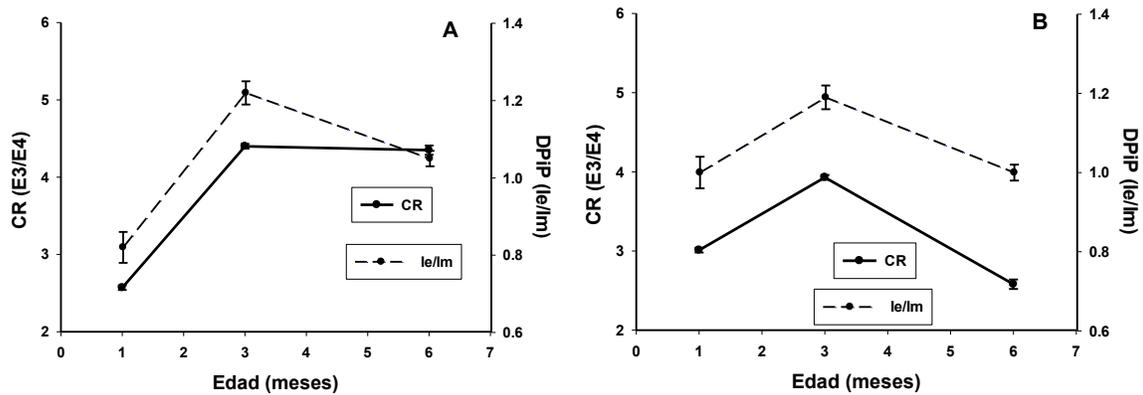


Fig. 24. Cambios en la fluidez membranal y CR en los grupos suplementados con ALA al paso del tiempo (1, 3 y 6 meses de edad). A) Grupo C-ALA B) Grupo STZ-ALA n=5 (* $p < 0.05$).

4.6 Lipoperoxidación en mitocondrias de hígado

Durante la diabetes se promueve un incremento de estrés oxidativo, lo que puede afectar diversos procesos celulares. Las membranas mitocondriales parecen ser afectadas por un incremento de especies reactivas de oxígeno. Este proceso puede desencadenar oxidación de los lípidos de las membranas y consecuentemente, afectar la funcionalidad de dicho organelo. Se determinó la lipoperoxidación de membranas mitocondriales durante el desarrollo de la diabetes (Fig. 25A y 25B).

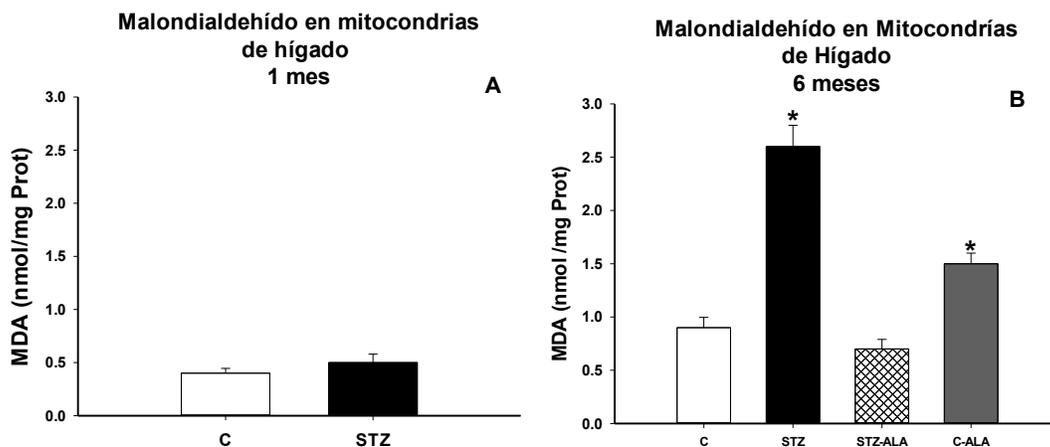


Fig. 25. Lipoperoxidación en membranas mitocondriales durante el desarrollo de la diabetes y/o con el suplemento de ALA (A) 1 mes de edad y (B) 6 meses de edad. n=5 * $p < 0.05$ en relación al grupo control.

La Fig. 25A muestra las concentraciones del MDA al mes de vida, en ella observamos que no hubo diferencias significativas entre ambos grupos (0.4 ± 0.04 y 0.5 ± 0.08 control y diabéticas respectivamente). Sin embargo, estos datos sugieren una ligera tendencia al incremento de lipoperoxidación en los animales diabéticos, lo cual se confirma al realizar las mediciones a los 6 meses de vida. En la Fig. 25B se observa claramente el aumento en el contenido de MDA en las mitocondrias de los animales diabéticos (2.6 ± 0.2) con respecto al grupo control (0.9 ± 0.09).

Cuando se determinó la concentración de MDA en los animales suplementados, se obtuvieron resultados interesantes. En el caso del grupo STZ-ALA, se observa una concentración baja, similar a la del grupo control (0.7 ± 0.09 y 0.9 ± 0.09). Es probable que al controlar la glicemia como resultado de la suplementación con ALA en este grupo de animales se refleje una disminución en los procesos de lipoperoxidación y por tal motivo haya una baja concentración de MDA. Por el contrario, en el grupo C-ALA la lipoperoxidación parece exacerbarse, ya que el contenido de MDA fue de 1.5 ± 0.11 , ligeramente más baja que en los animales diabéticos, pero significativamente mayor que en el grupo control.

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

5.1 Desarrollo de diabetes tipo 2

Actualmente, la diabetes es un problema de salud que afecta alrededor de 415 millones de personas alrededor del mundo. Se estima que para el año 2040 este número incrementa a 642 millones de personas (IDF Diabetes Atlas 2015). La DM2 genera una alta mortandad y representa una de las principales complicaciones de la obesidad; asimismo está asociada a desordenes metabólicos los cuales están agrupados dentro del síndrome metabólico (incluida la dislipidemia, resistencia a la insulina e hipertensión) (Flachs *et al.*, 2014). Por ello es necesario ampliar la información referente a esta patología y contribuir al conocimiento y consecuente tratamiento.

La DM2 es un síndrome multifactorial que está relacionada con susceptibilidad genética y estilo de vida, lo que dificulta el establecimiento de modelos experimentales que pudieran ayudar al entendimiento de la patogénesis y el desarrollo de nuevos tratamientos (Zhang *et al.*, 2003). Los modelos de roedores han sido de gran trascendencia para el conocimiento de la DM2 y de sus complicaciones pues se pueden estudiar los aspectos fisiológicos, metabólicos y de acción de la insulina. Algunas características de las enfermedades pueden reproducirse en células en cultivo, pero los efectos en el organismo se observarán sólo en el animal vivo, en ese sentido los modelos animales permiten identificar vías reguladoras y metabólicas (Reitman 2003).

Los modelos de DM2 más utilizados son la pancreatectomía parcial y la destrucción química de las células beta del páncreas mediante el uso de fármacos como la estreptozotocina (STZ). Ambos métodos originan hipoinsulinemia e hiperglicemia causada por un defecto en el transporte de la glucosa (Kahn *et al.*, 2005). Para realizar el presente estudio se utilizaron ratas Wistar a las cuales se les inyectó STZ a una dosis intraperitoneal de 135 mg/kg de peso corporal. Dos días posteriores a la inyección observamos un incremento considerable en la concentración de glucosa sanguínea, superando los 300 mg/dl. El desarrollo del modelo de DM2 en estas ratas puede ser explicado de la siguiente manera:

La STZ entra específicamente a las células β -pancreáticas a través de GLUT 2, donde forma especies reactivas de oxígeno por la vía de la xantina oxidasa las cuales son responsables de la fragmentación del DNA y de la posterior destrucción de dichas células (Szkudelski 2001).

La STZ se ha utilizado para generar el modelo de diabetes tipo 2 en roedores. Cuman *et al.*, (2001) reportaron la inducción de diabetes en neonatos de ratas Wistar de 48 h de vida con una dosis de 160 mg/kg de peso. Sin embargo, la tasa de mortandad fue elevada, dificultando la realización del estudio. Por su parte Murali y Ramesh (2001) generaron hiperglicemia ligera en neonatos Wistar de 5 días de vida utilizando una dosis de 70 mg/kg. Previamente, en un estudio que realizamos con ratas espontáneamente hipertensas (SHR) reportamos que una dosis de STZ de 75 mg/kg de peso corporal en neonatos de 48 h de nacidas aumentaba la concentración de glucosa en sangre, alcanzando los 250 mg/dl en promedio (Pérez-Hernández *et al.*, 2010). Es importante utilizar la dosis adecuada de STZ para generar el modelo de diabetes, pues dependiendo de la cepa de rata utilizada, este compuesto puede generar un daño casi total de las células β pancreáticas.

En nuestro modelo de estudio observamos que días posteriores a la inducción (15 días de vida), la concentración de glucosa sanguínea disminuye de manera considerable llegando a los 180 mg/dl. Este dato es relevante; ya que está documentado que a los 15 días de vida las células pancreáticas de los neonatos tienen la capacidad de regenerarse o diferenciarse en células β , de tal manera que hay una recuperación parcial de dicha población celular. Sin embargo la secreción de insulina en estas ratas fue insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo y por lo tanto observamos oscilaciones en la glicemia del grupo STZ durante toda la etapa experimental.

Sabemos que la insulina cumple una función importante en el metabolismo de los carbohidratos; ya que estimula la captura de la glucosa por parte de algunas de las células del cuerpo (cardíacas, musculares, adiposas, etc.) manteniendo controlada la glicemia. En situaciones normales (exposición aguda a la glucosa), la subida posprandial de glucosa es el elemento inductor esencial de la secreción de insulina, equilibrando la concentración de glucosa extracelular con la del interior de la célula (Roche *et al.*, 2000).

Se ha observado que en los casos de hiperglicemia crónica, la glucosa es capaz de modificar diferentes moléculas y generar trastornos metabólicos. La exposición crónica a concentraciones elevadas de glucosa produce la unión de ésta última a los grupos amino terminales de las proteínas, fenómeno llamado glicación. Esta unión química modifica la estructura de las moléculas alterando sus funciones, como la de los transportadores de glucosa, lo que lleva a una menor captación de dicha molécula en los tejidos periféricos (Bilan y Klip 1990, Mazzone *et al.*, 2008). Así, se ha observado en diferentes modelos experimentales con animales y células cultivadas, que la alta concentración de glucosa modifica la expresión del gen codificador del transportador de glucosa (GLUT2), activa la primer enzima de la vía glucolítica, la glucocinasa (GK), y causa una inducción coordinada de genes que codifican enzimas de la lipogénesis (Roduit *et al.*, 2000, Lee *et al.*, 2015). Por otro lado, la insuficiencia de insulina provoca en células musculares y adipocitos la disminución de GLUT 4, el cual se encuentra secuestrado intracelularmente en vesículas, pues es dependiente de la señal de insulina para migrar a la membrana plasmática (Lee *et al.*, 2015). Como consecuencia del déficit en glucosa, se activa la gluconeogénesis y se exagera la lipólisis, elevándose los niveles de lípidos en suero, lo que contribuye a la lipotoxicidad.

Se ha reportado que la hiperglicemia induce estrés oxidativo, lo cual puede tener efectos nocivos sobre la pared de las arterias. La autooxidación de la glucosa, lleva a la formación de especies reactivas de oxígeno, como anión superóxido, el cual puede promover la oxidación de las LDL, lo que favorece un incremento de colesterol y triglicéridos sanguíneos (Mazzone *et al.*, 2008).

Los ácidos grasos libres (AGLs) pueden servir como una fuente de energía y también como moléculas de señalización de la homeostásis energética, así como de otros procesos fisiológicos (Poudyal *et al.*, 2011). Se ha reportado que la lipotoxicidad, derivada de AGLs saturados es la principal causa de la activación de JNK (por sus siglas en inglés: *Jun NH2 terminal-kinase*), molécula relacionada con procesos apoptóticos y de inflamación que a su vez se ha relacionado con el desarrollo de resistencia a la insulina durante la obesidad (Mazzone *et al.*, 2008).

Otro de los parámetros evaluados en el presente estudio fue la concentración de lípidos sanguíneos. Con el establecimiento de la DM2 observamos que el colesterol y los triglicéridos incrementaron severamente con respecto al grupo control (Fig 8A y B). Está reportado que en pacientes con diabetes es común observar un aumento de los triglicéridos sanguíneos, lo cual a su vez se asocia a riesgos cardiovasculares (Pirillo y Catapano 2013). Al respecto Mazzone *et al.*, (2008) indican que las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL por sus siglas en inglés: *Very Low Density Lipoprotein*) suelen incrementar en pacientes diabéticos, llevando al desarrollo de aterosclerosis. Asimismo la dislipidemia se relaciona con alteraciones en el metabolismo de carbohidratos; por lo que al presentarse elevadas concentraciones de glucosa en sangre en los animales diabéticos, estos presentan altas concentraciones de colesterol y triglicéridos en sangre.

Diversos autores (Kelley *et al.*, 2002; Crunkhorn *et al.*, 2007) indican que los pacientes con DM2 presentan una menor población de mitocondrias en músculo esquelético, llevando a una acumulación ectópica de lípidos como consecuencia de un decremento en la función mitocondrial y la β oxidación. Además señalan que la disminución del contenido y función mitocondrial está acompañado de una menor expresión de proteína 1α coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PCG- 1α) el cual funciona como coactivador de PPAR γ que a su vez actúan como factores de transcripción de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial. En el grupo STZ, observamos un severo incremento de lípidos a los 3 y 6 meses de edad, por lo que es probable que un mecanismo similar al descrito esté involucrado, considerando que en dicho grupo de animales la función mitocondrial también decrementa a la misma edad.

5.2 Efecto de los ácidos grasos omega-3 en el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

Se han descrito diversas estrategias farmacológicas para controlar los efectos de la diabetes en pacientes. Sin embargo, al paso de los años los daños colaterales que se presentan en algunos casos, suelen ser más perjudiciales que la misma diabetes (Ascaso 2014). Una alternativa para el tratamiento de enfermedades metabólicas ha sido la ingesta de AGPIs ω -3, principalmente de EPA y DHA proveniente del aceite de pescado. Durante las últimas décadas ha ganado interés el uso de los AGPIs como parte del tratamiento de enfermedades cardiovasculares y metabólicas, principalmente por sus efectos sensibilizadores hacia la insulina. Estos ácidos grasos parecen prevenir la resistencia a la insulina y optimizar el metabolismo de la glucosa (Lanza *et al.*, 2013). Al respecto Lance *et al.*, (2013) mostraron que en ratones suplementados con EPA y DHA incrementó significativamente la síntesis de GLUT 4, de la glucogeno sintasa 1 (GYS1) y del receptor de insulina (IRS), moléculas que median el metabolismo de la glucosa. Estos resultados apuntan a que la ingesta de AGPIs previene la reducción en la tolerancia a la glucosa y mejora la sensibilidad a la insulina. De manera similar Ruzickova *et al.*, (2004) reportaron que EPA y DHA promueven la expresión del gen de GLUT 4 en células adiposas de ratones C57BL/6J y que en consecuencia, aumenta el transporte de la glucosa al interior de la célula. Dichos resultados parecen apuntar a que el EPA y el DHA tienen un efecto antiadipogénico durante el desarrollo de la obesidad previniendo así el desarrollo de resistencia a la insulina (y posteriormente el desarrollo de diabetes).

En comparación con el EPA y DHA, se conoce poco sobre el efecto del ALA en la resistencia a la insulina y el metabolismo de la glucosa (Matravadia *et al.*, 2014), por lo que es necesario analizar los efectos del ALA en las enfermedades metabólicas. Matravadia *et al.*, (2014 y 2016) indican que la ingesta de ALA previene la resistencia a la insulina en ratas Zucker obesas y controla la glucosa sanguínea. Nuestros resultados reflejan una notoria mejoría con la ingesta de ALA en las concentraciones de glucosa del grupo STZ-ALA (Fig. 4A). En dicho grupo observamos un decremento significativo de la glicemia a partir de los 3 meses de vida (2 meses de suplementación). Sabemos que ALA es precursor de la síntesis

endógena de EPA y DHA por lo que es muy probable que el ALA administrado a los animales inducidos a diabetes actúe a través mecanismo similar al reportado por Lanza *et al.*, (2013); incrementando la síntesis de IRS (molécula mediadora en la señalización de la insulina) y de GLUT 4, lo que de acuerdo con Ruzickova *et al.*, (2004) podría favorecer la captación de glucosa.

Además de los mecanismos antes mencionados, existen otros que contribuyen a producir los efectos “antidiabéticos” de los AGPIs ω -3. Algunos estudios han mostrado que los efectos de sensibilización a la insulina se deben parcialmente a procesos antiinflamatorios mediados por el receptor 120 acoplado a la proteína G (GPR120) (White *et al.*, 2010). El receptor GPR120, es un receptor de ácidos grasos ω -3 en macrófagos y las células adiposas. La activación de GPR120 por los AGPIs ω -3 inhibe múltiples cascadas de inflamación en los macrófagos y revierte la resistencia a la insulina en ratones obesos (Oh *et al.*, 2010). Este grupo, se ha enfocado en dilucidar los efectos de los AGPIs ω -3 y de GPR120 en el desarrollo de la resistencia a la insulina. Suplementaron con EPA y DHA a ratones C57BL/6J, a los que previamente administraron una dieta alta en ácidos grasos saturados. Comprobaron que esta dieta puede tener efectos nocivos en la acción de la insulina y que al suplementar con EPA y DHA se revirtieron los efectos deletéreos sobre la homeostasis de la glucosa y el almacenamiento de lípidos (esteatosis) generados por la dieta rica en ácidos grasos saturados. Los AGPIs ω -3 de la dieta activan al receptor GPR120 en los macrófagos M1 (Oh *et al.*, 2010), lo cual atenúa la respuesta inflamatoria promoviendo la actividad de macrófagos M2 anti-inflamatorios en el tejido adiposo. Eventualmente, estos macrófagos M2 restauran la secreción de la interleucina-10 y mejoran la sensibilidad a la insulina. La ingesta de alimentos ricos en AGPIs ω -3 y la consecuente activación de los FFAR4 (Por sus siglas en inglés: *Free fatty acids receptor 4*) incrementan la liberación intestinal de GLP-1 (Por sus siglas en inglés: *Glucagon-like peptide 1*) aumentando la secreción de insulina lo que se traduce en una mayor captación de glucosa en el músculo esquelético y cardiaco (Oh y Walenta 2014).

Otro posible mecanismo por el cual los AGPIs pueden ejercer un efecto hipoglucémico se relaciona con modificaciones en la composición de ácidos grasos de las membranas celulares. Algunos autores han indicado que el incremento de AGPIs aumenta la

actividad de los receptores de insulina. Se conoce que los bezafibratos (utilizados como sensibilizadores de insulina) actúan modificando la fluidez de las membranas, por lo que su efecto de sensibilización en parte se debe a un incremento en la fluidez membranal, lo cual incide sobre la funcionalidad de los receptores de insulina (Matsui *et al.*, 1997; Hulbert *et al.*, 2005). Es probable que dentro de los mecanismos que regulan la glicemia en los animales suplementados con ALA se encuentre el incremento de la fluidez de membranas celulares de diferentes tejidos insulino-dependientes, promoviendo así la captación de la glucosa para su posterior metabolismo.

Al analizar la concentración de lípidos sanguíneos en el grupo STZ-ALA a los 6 meses de edad, observamos que colesterol y triglicéridos se encuentran dentro de los niveles basales. Recordemos que en este grupo la glicemia también se controló, lo que pudo contribuir en la regulación de los lípidos sanguíneos. Se han descrito varios mecanismos posibles para explicar los efectos benéficos de los AGPIs en el metabolismo de los lípidos. Se ha indicado que los AGPIs ω -3, como el ácido α linolénico (ALA), inducen la expresión génica de enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos y reprimen la expresión de enzimas lipogénicas a través de diferentes mecanismos (Clarke, 2001). Uno de ellos se realiza a través de SREBP-1. Estas proteínas son parte de una familia de factores de transcripción formada por tres miembros: SREBP-1a, 1c y 2. La SREBP-2 regula genes involucrados en el metabolismo de colesterol, mientras que las SREBP-1a y 1c regulan genes involucrados en la lipogénesis. Se ha reportado que los AGPIs reducen la forma activa de SREBP-1 y favorecen la disminución de la lipogénesis (Kuda *et al.*, 2009). También se han descrito efectos de los AGPIs ω -3 en diferentes órganos y aunque en cada uno de ellos los mecanismos de acción son distintos, en todos los casos parece haber un efecto regulatorio en el metabolismo de lípidos y carbohidratos. En hígado por ejemplo, se ha descrito: (a) la activación de PPAR α , que da como resultado un aumento de la oxidación de ácidos grasos en peroxisomas y en menor medida en las mitocondrias; (b) la disminución en la expresión del gen de SREBP-1, lo que genera una menor expresión de genes lipogénicos y la disminución en la síntesis de triglicéridos y VLDL (Lombardo y Chicco 2006) y (c) la estimulación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), probablemente a través de un mecanismo mediado por la adiponectina (Jelenik *et al.*, 2010).

Algunas adipocinas como la adiponectina y la leptina incrementan la sensibilidad a la insulina en músculo mediante la estimulación de AMPK, controlando el flujo metabólico en células de diversos tejidos (Yamauchi *et al.*, 2002). Entre las funciones que se han reportado para AMPK está el inhibir la lipogénesis, estimular la oxidación de ácidos grasos e incrementar el transporte de glucosa en las células (Barnes y Zierath 2005). Asimismo, AMPK puede ser activado en respuesta a la metformina, una droga común para el tratamiento de la diabetes (Fryer *et al.*, 2002). El consumo de AGPIs ω -3 promueve la actividad de AMPK en hígado, aumentando los efectos metabólicos. La actividad de factores de transcripción como PPARs y SREBP-2 incrementa y como resultado disminuye el contenido de triglicéridos en hígado, y aumenta la sensibilidad de los hepatocitos a la insulina (Kuda *et al.*, 2009). Las concentraciones reducidas de triglicéridos plasmáticos durante la diabetes parece ser el efecto más prominente de una ingesta de EPA y DHA en humanos según Balk *et al.*, (2004). Sin embargo, otros autores (Lombardo y Chicco 2006) han demostrado que también hay una mejoría en el control de la hiperglicemia. Nuestro estudio concuerda con lo ya reportado por estos autores, pues observamos que tras la ingesta de ALA los animales inducidos a diabetes mostraron una disminución significativa de colesterol y triglicéridos sanguíneos.

Se han realizado diversas investigaciones para dilucidar los efectos de la activación de PPAR γ en obesidad y diabetes. Flachs *et al.*, (2014) han generado información interesante al reportar que los AGPIs ω -3 activan a PPAR γ promoviendo la oxidación de ácidos grasos, lo que da como resultado un efecto hipolipidémico, previniendo el desarrollo de obesidad y diabetes. Rossmeisl *et al.*, (2012) realizaron un estudio en ratones C57BL/6J que recibieron una dieta rica en ácidos grasos saturados y a los cuales se les administró EPA y DHA durante 9 semanas. Algo importante de resaltar es que tanto EPA como DHA fueron administrados como triglicéridos o fosfolípidos con el argumento de que la biodisponibilidad podría influir en los efectos de los AGPIs. Se observó que la acción protectora de AGPIs ω -3 contra la obesidad fue mayor en el grupo con ingesta de fosfolípidos con DHA y EPA, que el grupo que ingirió triglicéridos con estos mismos AGPIs ω -3, debido en parte a la inhibición de la proliferación de células adiposas. Asimismo se reportó que el efecto anti-obesidad de los

AGPIs ω -3 fue más evidente cuando el tratamiento se combinó con la restricción calórica. Los autores concluyen que el efecto catabólico de los AGPIs ω -3 en tejido adiposo depende en gran medida de la formación de sus metabolitos y en la regulación del sistema endocanabinoide.

ALA al ser precursor de EPA y DHA potencia los efectos de dichos ácidos grasos en el control de obesidad y la hiperlipidemia tal como lo demostraron Campioli *et al.*, (2012), quienes suplementaron a ratones C57BL/6J con una mezcla de aceite de pescado (EPA y DHA) y aceite vegetal (ALA). Observan una disminución en la concentración de colesterol total y triglicéridos con respecto a los grupos tratados únicamente con aceite vegetal o de pescado. Por su parte Flachs *et al.*, (2005) suplementaron con ALA, EPA y DHA a ratones C57BL/6J durante 4 semanas. Observaron que EPA y DHA estimulan la formación de mitocondrias en las células adiposas y activan la expresión del gen de la carnitina palmitoil-transferasa-1. Esta proteína estimula la entrada de ácidos grasos en las mitocondrias activando la β oxidación. También reportaron la disminución en la concentración de lípidos sanguíneos y que los efectos del ALA no fueron tan evidentes como los de EPA y DHA. No obstante Rajaram (2014) indica que los efectos del ALA pueden observarse en periodos de tiempo más largos.

5.3 Mitocondrias de hígado: función mitocondrial, composición de ácidos grasos y fluidez membranal

Las membranas biológicas tienen una participación esencial en diversos procesos biológicos, como la transducción de señales, la actividad hormonal y la actividad enzimática de proteínas membranales (Voet *et al.*, 2007). Las propiedades fisicoquímicas de las membranas desempeñan un papel importante en la funcionalidad de las células y organelos. Asimismo, la función de las membranas está regulada por las diferentes moléculas que la componen, como son las proteínas, el colesterol, y los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos. Varios autores indican que hay una estrecha relación entre las alteraciones de las membranas celulares y mitocondriales con el desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes (Waczulikova *et al.*, 2007; Pérez-Hernández *et al.*, 2010). Las membranas

mitocondriales, mantienen y regulan los gradientes iónicos, la diferencia de potencial y el paso de sustratos, como por ejemplo el transporte de acil-CoA para la beta oxidación. La composición de ácidos grasos así como el grado de insaturación de los mismos en los fosfolípidos es de gran importancia para la regulación de la fluidez membranar, la permeabilidad y, por consiguiente para las funciones especializadas de las membranas mitocondriales.

En el presente estudio evaluamos la función mitocondrial, cuantificando el consumo de oxígeno en E3 y E4 a diferentes edades. Encontramos que la diabetes repercute severamente en ambos parámetros, reflejándose en la disminución en el control respiratorio (desacoplamiento) a los 6 meses de edad. Está reportado que la disfunción mitocondrial está estrechamente relacionada con desordenes metabólicos (Sorriento *et al.*, 2014). Los ácidos grasos son moléculas de suma importancia en la regulación de la estructura y la función mitocondrial, bajo ciertas circunstancias, como la obesidad y la diabetes, los ácidos grasos libres pueden desacoplar la cadena respiratoria, causando pérdida en el potencial de membrana. Lowell y Shulman (2005) indican que en mitocondrias de músculo esquelético disminuye el consumo de oxígeno así como la síntesis de ATP durante el desarrollo de diabetes. Por otro lado Soto-Urquieta *et al.*, (2014) reportan que en ratones con diabetes el consumo de oxígeno es mayor. Estas discrepancias muestran la necesidad de continuar investigando los efectos de la diabetes en la funcionalidad de la mitocondria.

Los lípidos de las membranas mitocondriales están involucrados en una serie de procesos; como la biogénesis de diversas proteínas, la producción de ATP procesos de fusión de membranas y apoptosis. En el caso particular de la producción energética, algunas investigaciones señalan que la modificación de los lípidos de la dieta repercute en la composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales, afectando la respiración mitocondrial, y la generación de EROs (Yu *et al.*, 2014; Lionetti *et al.*, 2014).

Durante la resistencia a la insulina o el desarrollo de la diabetes se modifica el contenido de colesterol, ácidos grasos y fosfolípidos de las membranas (Mei *et al.*, 2012, Pérez-Hernández *et al.*, 2010, Ferreira *et al.*, 2003). En el caso de los ácidos grasos, hemos

reportado previamente el papel que desempeñan en la regulación de la fluidez membranal. En fantasmas de eritrocitos de SHR con diabetes encontramos que el cociente de insaturación de ácidos grasos disminuyó al igual que la fluidez membranal. (Pérez-Hernández *et al.*, 2010). En este trabajo realizamos las mediciones de fluidez a 1, 3 y 6 meses de edad con diferentes monitores fluorescentes: DPiP, DPH y TMA-DPH, que son sensibles a las modificaciones ocurridas en el entorno en el que se encuentran, por lo que pueden detectar los cambios en el contenido de proteínas colesterol y ácidos grasos (Almeida *et al.*, 1982, Suzuki y Miura 2014). La movilidad así como la ubicación de dichos monitores es diferente, el DPH y el TMA-DPH tienen un movimiento rotacional y se ubican en el núcleo de la bicapa y la parte superficial de la monocapa respectivamente. En el caso del DPiP se localiza preferencialmente dentro de la parte intermedia de la monocapa lipídica.

En 2007 Waczulikova *et al.*, utilizaron TMA-DPH y DPH para realizar mediciones de fluidez membranal en mitocondrias de cardiomiocitos de animales diabéticos y control. Encontraron que los valores de anisotropía del DPH fueron bajos en los animales diabéticos, indicando una mayor fluidez en las membranas mitocondriales de este grupo con respecto al grupo control. Sin embargo al realizar las mediciones con TMA-DPH no encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, lo que les llevó a concluir que el incremento de la fluidez puede ser parte de un proceso adaptativo bajo condiciones de diabetes. Al mes de edad, nuestros resultados con DPH se asemejan a lo reportado por Waczulikova *et al.*, (2007) (Fig. 15C), pues las membranas mitocondriales del grupo diabético fueron más fluidas, sin diferencias significativas al medirlas con TMA-DPH.

Al analizar la fluidez membranal con las diferentes sondas fluorescentes, es importante utilizar bajas concentraciones para evitar alteraciones en la estructura membranal y generar “artificios” durante las mediciones. Las moléculas de pireno han sido utilizadas con frecuencia para el estudio de la fluidez membranal. La relación de intensidad de la fluorescencia excímero/monómero depende de varios factores tales como el contenido de colesterol, relación lípido/proteína y temperatura, que afectan la velocidad de difusión lateral del pireno en las membranas (Almeida *et al.*, 1982). La formación de excímeros intramoleculares de DPiP es un proceso monomolecular, que ocurre independientemente de

la concentración, minimizando así las perturbaciones en la membrana por dicha sonda. Por esta razón, las mediciones sólo reflejan las alteraciones de la membrana derivadas de la composición de los ácidos grasos, colesterol y el contenido de proteínas. El aumento en la relación de excímero a monómero indica una membrana más fluida, mientras que cuanto más baja es la relación, más rígida es la membrana. Por lo tanto, esta relación es directamente proporcional a la fluidez de la membrana.

Utilizando al DPiP al mes de edad observamos que las mitocondrias de los animales diabéticos fueron más fluidas en comparación al grupo control (Fig. 15A). Al determinar la composición de ácidos grasos (Tabla 1) observamos que también el Ins/Sat fue más alto en el grupo diabético, lo cual es consistente con los valores de fluidez. Recordemos también que a esa misma edad la actividad mitocondrial fue mayor en este grupo de animales, lo cual parece mostrar una relación, entre la fluidez y el control respiratorio (figuras 18 A y B) mostrando una cinética muy similar desde el primer mes de vida y hasta los 6 meses de edad.

Diversos estudios indican que el EPA y DHA se incorporan a los fosfolípidos de las membranas mitocondriales, incrementando el consumo de oxígeno, además de inducir la transcripción de genes involucrados en la biogénesis mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos. Todos estos efectos en conjunto, mejoran la bioenergética mitocondrial y la sensibilidad a la insulina (Jelenik *et al.*, 2010). El uso de los AGPIs ω -3 en la diabetes y su relación con la actividad mitocondrial ha ganado interés en recientes décadas, sin embargo el efecto del ALA en dicho parámetro aun es poco estudiado (Matravadia *et al.*, 2014). Nuestro estudio revela que el ALA incrementó el consumo de oxígeno mitocondrial. Estudios previos indican que los AGPIs ω -3 parecen mejorar la actividad de los complejos mitocondriales (Herbst *et al.*, 2014) e incrementan la concentración de algunas proteínas de la cadena respiratoria, en específico la subunidad NUDFB8 del complejo I mitocondrial, además de incrementar la concentración de la ATP sintetasa (Matravadia *et al.*, 2014). Es probable que ocurra el mismo efecto en los grupos suplementados con ALA, lo cual generó un incremento en el consumo de oxígeno mitocondrial.

A pesar de que el ALA puede ser convertido endógenamente a EPA y DHA, algunos estudios han indicado que dicha conversión es muy baja, menor al 8% (Matravadia *et al.*, 2014). En un estudio que realizamos previamente, nuestros resultados apuntan a que al suministrar ALA en la dieta, ocurre la conversión endógena a EPA y DHA. En el caso de las membranas de eritrocitos observamos que dichos ácidos grasos incrementaron en un 42% del contenido total. Asimismo al analizar el contenido de ácidos grasos de membranas microsomales de hígado notamos un incremento significativo en ALA, EPA y DHA, lo cual sólo se observó en los animales suplementados al compararlos con el grupo control (Pérez 2011). Al respecto algunos autores indican que una dieta rica en AGPIs ω -3 modifica la composición lipídica de las membranas, incrementando el índice de insaturación en mitocondrias (Herbst *et al.*, 2014; Matravadia *et al.*, 2014) lo que a su vez puede alterar la función mitocondrial (Yu *et al.*, 2014). Nuestros resultados son consistentes con estos reportes, pues encontramos que en las membranas mitocondriales el contenido de ALA y el EPA incrementó significativamente en los grupos suplementados (Tabla 3). Como ya se ha mencionado, en los animales inducidos a diabetes con suplemento notamos una mejoría en los parámetros bioenergéticos, siendo parecidos a los del grupo control. En otro estudio al suplementar con AGPIs omega-3 en especial con EPA y DHA aumentó el contenido de dichos ácidos grasos en diversas especies de fosfolípidos de membranas celulares de músculo esquelético. El DHA representó una fracción importante de la composición de ácidos grasos de las mitocondrias, por lo que se propuso que podría participar en la organización y función de diversas proteínas incorporadas a las membranas mitocondriales (Herbst *et al.*, 2014).

5.4 Lipoperoxidación mitocondrial

Una de las consecuencias de la hiperglicemia crónica es el incremento de las especies reactivas de oxígeno que favorecen la peroxidación de las membranas celulares, alterando sus propiedades fisicoquímicas (Dey y Swaminathan 2010). La lipoperoxidación es un proceso autooxidante iniciado por radicales libres, a los que son susceptibles los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares (Yu *et al.*, 2014, Catala 2012). La lipoperoxidación puede influir en diversos procesos bioquímicos que se llevan a cabo sobre la bicapa lipídica, entre las que se encuentran la actividad enzimática, procesos de

transducción de señales y síntesis de ATP. De tal suerte que un incremento de la lipoperoxidación puede dar como consecuencia un aumento de la rigidez de las membranas (Wong *et al.*, 2007) afectando la actividad mitocondrial y acelerando los procesos de envejecimiento y apoptosis de las células. Está documentado que las mitocondrias son la principal fuente de ROS en las células (Raza *et al.*, 2011). Estas moléculas pueden dañar severamente a la célula y en consecuencia la funcionalidad de los tejidos. Existen evidencias que apuntan al incremento del estrés oxidativo como una consecuencia de la hiperglicemia, lo cual a su vez contribuye a un daño en diversos órganos (Vinik *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2003, Soto-Urquieta *et al.*, 2014).

Cuando analizamos la concentración de MDA al primer mes de vida no observamos diferencias significativas entre el grupo STZ y el grupo control, a pesar de la severa hiperglicemia que presentó el grupo diabético. . Se sabe que la hiperglicemia incrementa la formación de radicales libres (Robertson y Harmon 2006; Rolo y Palmeira 2006). Al respecto, Figueroa-García *et al.*, (2015) mostraron que una hiperglicemia ligera crónica incrementa la lipoperoxidación en mitocondrias de placenta, repercutiendo también en la función mitocondrial. En nuestro modelo es probable que 1 mes de exposición a la glicemia no haya sido suficiente para generar daños evidentes en las membranas mitocondriales, considerando que utilizamos mitocondrias provenientes de hígado, órgano que se caracteriza por ser más resistente a alteraciones metabólicas.

A los 6 meses de edad, los animales diabéticos mostraron hiperglicemias de hasta 400 mg/dl, repercutiendo severamente en la concentración de lípidos sanguíneos. Al analizar la concentración de MDA observamos un severo incremento, reflejando un aumento de la lipoperoxidación en mitocondrias. En ese sentido, diversos autores han encontrado que como consecuencia del incremento de la lipoperoxidación, las membranas tienden a volverse más rígidas, afectando su funcionalidad (Chen y Yu 1984, Soto-Arriaza 2008). Nuestros resultados concuerdan con dichos autores, al analizar la composición de ácidos grasos de los animales diabéticos observamos que el Ins/Sat fue bajo, por lo que la fluidez membranal fue baja, por lo que podemos ver una relación entre el incremento de MDA con un decremento de la fluidez membranal y el cociente de insaturación.

Miyamoto *et al.*, (2008) encontraron que en ratones inducidos a diabetes con una dosis alta de STZ (200 mg/kg) la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), disminuyen significativamente, al igual que los niveles de ATP en la mitocondria. Estas modificaciones sugieren que la disminución en la actividad mitocondrial se exagera debido principalmente al incremento del estrés oxidativo que se genera con el desarrollo de la diabetes (Miyamoto *et al.*, 2008). Considerando los datos anteriores, existe la posibilidad de que en los animales diabéticos de 6 meses la actividad de los sistemas antioxidantes haya disminuido pues nuestros datos apuntan a un incremento de la lipoperoxidación y una baja actividad mitocondrial.

Hemos hablado de los diferentes efectos que muestran los AGPIs omega-3 en la salud y en el desarrollo de enfermedades metabólicas como la diabetes. Asimismo se han explicado algunos de los mecanismos mediante los cuales actúan. En lo que respecta a procesos de estrés oxidativo; Molinar-Toribio *et al.*, (2015) suplementaron con EPA y DHA (2:1) a ratas espontáneamente hipertensas con obesidad (modelo de síndrome metabólico). Encontraron que la concentración de colesterol sanguíneo y de isoprostanos en orina (como un marcador de estrés oxidativo) disminuyeron en los animales suplementados en comparación con los grupos no suplementados. Asimismo, la actividad enzimática de moléculas antioxidantes como son SOD, CAT y Glutathion peroxidasa (GPx) incrementaron significativamente en eritrocitos y riñón de los animales suplementados. El EPA se identificó como el principal activador de genes relacionados con el sistema antioxidante (SOD, CAT y GPx), lo cual lleva a una disminución del estrés oxidativo (Molinar-Toribio *et al.*, 2015).

En nuestro estudio observamos que en el grupo STZ-ALA la concentración de MDA fue significativamente más baja con respecto al grupo diabético (STZ) e igual al grupo control (Fig. 20B). Hemos hablado previamente de la capacidad endógena de conversión del ALA a EPA observada en microsomas de hígado de SHR (Pérez 2011), lo que podría ocurrir también en ratas Wistar. Existe la posibilidad de que en el grupo STZ-ALA, además del control de la glicemia, el ALA (y su conversión a EPA) contribuya a aumentar la actividad

de SOD, CAT y GPx, según lo reporta Molinar-Toribio *et al.*, (2015) llevando al decremento en la lipoperoxidación mitocondrial.

En el caso de los animales normoglicémicos suplementados con ALA, observamos un incremento en la concentración de MDA (Fig. 20B). Sin duda es un resultado inesperado, considerando que en los animales inducidos a diabetes y suplementados con ALA, la concentración de MDA fue significativamente más baja, llegando a valores similares al grupo control. Algunos autores han sugerido que la incorporación de los AGPI omega-3 en las membranas mitocondriales las hace vulnerables a los procesos de estrés oxidativo. Matravadia *et al.*, (2014) indican que tras la incorporación de EPA y DHA en las membranas mitocondriales hay un aumento de la fluidez de la membrana mitocondrial, lo cual puede crear una interfaz más estrecha entre la bicapa de fosfolípidos y las proteínas integrales de membrana, disminuyendo la fuga de protones y aumentando la emisión mitocondrial de ROS. Si bien este mecanismo es posible, el apoyo directo a esta suposición queda por determinar. Lanza *et al.*, (2013) encontraron un incremento en la síntesis y actividad de catalasa en animales alimentados con una dieta alta en grasas saturadas y posteriormente suplementadas con aceite de pescado (EPA y DHA), sin embargo en animales suplementados únicamente con este aceite no observan los mismos resultados. Concluyen que el aceite de pescado sólo beneficia de manera notoria a los animales que presentan resistencia a la insulina. Analizando nuestros resultados, parece que parte de los efectos benéficos de los omega-3 dependen del estado de salud del organismo, en el caso de no ser necesarios generan diversas anomalías, tal como lo hemos observado en el grupo ALA, en el que tras la ingesta del suplemento aumentó la lipoperoxidación.

6. CONCLUSIONES

- Se generó con éxito un modelo de DM2 en ratas Wistar con hiperglicemia severa al utilizar una dosis de 135 mg/kg de STZ. Dicho modelo muestra oscilaciones en las concentraciones de glucosa, similar a lo observado en la DM en humanos sin tratamiento.
- La hiperglicemia que presentaron los animales inducidos a diabetes generó una menor ganancia de peso corporal y un incremento en la concentración de colesterol y triglicéridos sanguíneos. Sin embargo el suplemento de ALA promueve una ganancia de peso corporal similar al grupo control. Asimismo, se controló la concentración de colesterol y triglicéridos sanguíneos, probablemente el ALA promueve un incremento en la oxidación de ácidos grasos debido a la activación de factores de transcripción (PPARs FFAR4) que regulan la expresión de una gran cantidad de genes implicados en funciones fisiológicas, como la homeostasis de lípidos y glucosa.
- Los animales normoglicémicos suplementados con ALA generaron resistencia a la insulina, lo que promovió un incremento en la concentración de glucosa, y triglicéridos sanguíneos. Trabajos previos en nuestro grupo de investigación parecen indicar que dicha resistencia está asociado a una mayor síntesis de insulina inducida por los AGPIs 3. En ese sentido sería importante determinar si la dosis en el consumo de ALA desempeña un papel relevante en los efectos sobre la diabetes
- Al analizar la composición de ácidos grasos observamos que la diabetes modificó el contenido de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Además la ingesta de ALA incrementó el contenido de AGPIs ω -3 (EPA y DHA) en las membranas mitocondriales, probablemente por la elongación y desaturación del ALA lo que parece repercutir en el incremento de la fluidez membranal.

- Al analizar el consumo de oxígeno mitocondrial observamos que en los animales diabéticos el CR es mayor, sin embargo, a los 6 meses cae drásticamente dicho parámetro. La fluidez membranal mostró un comportamiento similar por lo que aportamos información sobre la asociación que hay entre el control respiratorio y la fluidez membranal.
- Encontramos que las características termotrópicas de las membranas de mitocondrias de hígado se ven afectadas por el desarrollo de la diabetes, disminuyendo la energía de activación y la temperatura de transición de fase.
- La hiperglucemia crónica en los animales diabéticos parece contribuir al incremento en la concentración de MDA a los 6 meses de edad, afectando la fluidez membranal y la respiración mitocondrial

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida L, Vaz W, Zachariasse K, Madeira V. Fluidity of sarcoplasmic reticulum membranes investigated with dipyranylpropane, an intramolecular excimer probe. *Biochemistry*. 1982. 21:5972–5977.
- American Diabetes Association. (2011). Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 34(1):62-69.
- Ames G. Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J Bacteriol*. 1968. 95:833–843.
- Ascaso J. Diabetes mellitus tipo 2: nuevos tratamientos. *Med Clínica*. 2014. 143:117–123.
- Atkinson M. Losing a Grip on the Notion of β -Cell Specificity for Immune Responses in Type 1 Diabetes: Can We Handle the Truth? *Diabetes*. 2014. 63:3572–3574.
- Bailey C. The Current Drug Treatment Landscape for Diabetes and Perspectives for the Future. *ClinPharmacolTher*. 2015. 98:170–184.
- Bailey C. Treating insulin resistance: future prospects. *DiabVasc Dis Res*. 2007 4:20–31.
- Balk E, Chung M, Liechtenstein A, Chew P, Kupelnick B, Lawrence A, Devine D, Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on cardiovascular risk factors and intermediate markers of cardiovascular disease. Summary, Evidence Report/Technology Assessment. 2004. 93: 114-120.
- Barnes B, Zierath J. Role of AMP-activated protein kinase in the control of glucose homeostasis. *Curr. Mol Med*. 2005. 5: 341-348.
- Bartlett G. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol chem*. 1959. 234: 466-468.
- Bennett H. Aspectos epidemiológicos de la Diabetes Mellitus Tipo 2. En LeRoith D, Taylor S, Olefsky J. *Diabetes Mellitus, texto básico y clínico*. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003. Pp 1331.

- Bilan P, Klip A. Glycation of the human erythrocyte glucose transporter in vitro and its functional consequences. *Biochem J.* 1990. 268: 661-667.
- Blake R, Trounce I. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *BiochimBiophysActa BBA - Gen Subj.* 2014. 1840:1404–1412.
- Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys.* 1959.37:911–917.
- Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes.* 2005. 54:1615–1625.
- Bugger H, Dale A. E. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clin Sci.* 2008. 114:195–210.
- Campioli E, Rustichelli C, Avallone R. n-3 Dietary supplementation and lipid metabolism: Differences between vegetable and fish derived oils. *J. of Functional Foods.* 2012. 4: 207-212.
- Catala, A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid Mosaic Model” to the “Lipid Whisker Model.” *Biochimie.* 2012. 94, 101–109.
- Cavaliere G, Trinchese G, Bergamo P, De Filippo C, Mattace Raso G, Gifuni G, Putti R, Moni B, Canani R, Meli R, Mollica M. Polyunsaturated Fatty Acids Attenuate Diet Induced Obesity and Insulin Resistance, Modulating Mitochondrial Respiratory Uncoupling in Rat Skeletal Muscle. *PLoS One.* 2016 22;11(2). 19
- Chang, T, Horal M, Jain S, Wang F, Patel R, Loeken M. Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia.* 2003. 46:538–545.
- Chen J, Yu B. Alterations in mitochondria membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free RadicBiol Med.* 1984. 17: 411–418.
- Clarke S. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: A molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr.* 2001. 131: 1129-1132.
- Crunkhorn S, Dearie F, Mantzoros C, Gami H, da Silva W Espinoza D, Faucette R, Barry K, Bianco A, Patti M. Peroxisome Proliferator Activator Receptor γ Coactivator-1 Expression Is Reduced in Obesity. Potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2007. 282:15439–15450.

- Cuman R, Bsersani-Amado A, Fortes B. Influence of type 2 diabetes on the inflammatory response in rats. *Inflamm. Res.* 2001. 50: 460-465.
- Das U. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. *Biotechnol J.* 2006. 1: 420–39.
- De Pauw A, Tejerina S, Raes M, Keijer J, Arnould T, Mitochondrial dysfunction in adipocyte differentiation and systemic metabolic alterations. *The American Journal of Pathology.* 2009. 175: 927–939.
- Delany J, Windhauser M, Champagne C, Bray G. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2000. 72: 905–911.
- Dey A, Swaminathan K. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sciences.* 2010. 87: 197-214.
- Febres B, ZimmerE, Guerra C, Zimmer E, Gil J. Nuevos conceptos en diabetes mellitus gestacional: evaluación prospectiva de 3.070 mujeres embarazadas. *Rev. Obs. ginecol. Venez.* 2000. 60:229–36.
- Ferrannini E. The Target of Metformin in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med.* 2014. 371:1547–1548.
- Ferreira F, Seïça R, Oliveira P, Coxito P, Moreno A, Palmeira C, Santos M. Diabetes induces metabolic adaptations in rat liver mitochondria: role of coenzyme Q and cardiolipin contents. *Biochim et BiophysActa.*2003.1639:113-120.
- Figueroa-García M, Espinosa-García M, Martínez-Montes F, Palomar-Morales M, Mejía-Zepeda R. Even a chronic mild hyperglycemia affects membrane fluidity and lipoperoxidation in placental mitochondria in Wistar rats. *PLoS One.* 2015 10 (12):1–15.
- Flachs P, Horakova O, Brauner P, Rossmeisl M, Pecina P, Franssen-Van Hal N, Ruzickova J, Sponarova J, Drahota Z, Vlcek C, Keijer J, Houstek J, Kopecky J. Polyunsaturated fatty acids of marine origin upregulate mitochondrial biogenesis and induce beta-oxidation in white fat. *Diabetologia.*2005. 48: 2365-2375.
- Flachs P, Rossmeisl M, Kopecky J. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. *Physiol. Res.* 2014. 63 (Suppl. 1) 93-118.

- Fryer L, Parbu-Patel A, Carling D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002. 277: 25226-25232.
- Grimm S, Brdiczka D. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis.* 2007. 12(5):841-55.
- Herbst E, Paglialunga S, Gerling C, Whitfield J, Mukai K, Chabowski A, Heigenhauser G, Spriet L, Holloway G. Omega-3 supplementation alters mitochondrial membrane composition and respiration kinetics in human skeletal muscle. *J Physiol.* 2014. 592:1341–1352.
- Hulbert A, Turner N, Storlien L, Else P. Dietary fats and membrane function: Implications for metabolism and disease. *ResearchGate.* 2005. 80:155–69.
- IDF Diabetes Atlas (2015) International Diabetes Federation, 7th edn
- Ide T, Tsutsui H, Hayashidani S, Kang D, Suematsu N, Nakamura K, Utsumi H, Hamasaki N, Takeshita A. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circ Res.* 2001. 88: 528-535
- Jelenik T, Rossmeisl M, Kuda O, Jilkova Z, Medrikova D, Kus V, Hensler M, Janovska P, Miksik I, Baranowski M, Gorski J, Hebrard S, Jensen T, Flachs P, Hawley S, Viollet B, Kopecky J. AMP-activated protein kinase alpha 2 subunit is required for the preservation of hepatic insulin sensitivity by *n-3* polyunsaturated fatty acids. *Diabetes.* 2010. 59: 2737-2746.
- Jie L, Fanghong R, Dong W, Wei J, Jing K, Maja S, Allan Z. Endogenous ω -3 polyunsaturated fatty acid production confers resistance to obesity, dyslipidemia, and diabetes in mice. *MolEndocrinol* 2014. 28: 1316–1328.
- Jump D, Clarke S. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev. Nutr.* 1999. 90: 19-63.
- Jump D. The biochemistry of *n-3* polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 2002. 277: 8755–8758.
- Kahn R, Weir G, King G, Moses A, Smith R, Jacobson A. Diabetes Mellitus 14a edición. Editorial Internacional ediciones médicas. 2005. Barcelona España. pp 1207.

- Kates M, Pugh E, Ferrante G. Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. *Biomembranes membrane fluidity*. 1984. 12: 379-395.
- Kelley D, He J, Menshikova E, Ritov V. Dysfunction of Mitochondria in Human Skeletal Muscle in Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2002. 51:2944–2950.
- Khairallah R, O'Shea K, Brown B, Khanna N, Des Rosiers C, Stanley W. Treatment with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, delays Ca²⁺-induced mitochondria permeability transition in normal and hypertrophied myocardium. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2010; 335: 155–162.
- Krentz A, Bailey C. Oral Antidiabetic Agents. *Drugs*. 2005. 65:385–411.
- Kuda O, Jelenik T, Jilkova Z, Flachs P, Rossmeisl M, Hensler M, Kazdova L, Ogston N, Baranowski M, Gorski J, Janovska P, Kus V, Polak J, Mohamed-Ali V, Burcelin R, Cinti S, Bryhn M, Kopecky J. *n-3* fatty acids and rosiglitazone improve insulin sensitivity through additive stimulatory effects on muscle glycogen synthesis in mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*. 2009. 52: 941-951.
- Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T; Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes mellitus Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res ClinPract*. 2002. 55(1):65-85.
- Lanza I, Blachnio-Zabielska A, Johnson M, Schimke J, Jakaitis D, Lebrasseur N, Jensen M, Sreekumaran Nair K, Zabielski P. Influence of fish oil on skeletal muscle mitochondrial energetics and lipid metabolites during high-fat diet. *Am J PhysiolEndocrinolMetab*. 2013. 304:E1391–E1403.
- Leonard A, Pereira S, Sprecher H, Huang Y. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2004. 43: 36–54.
- Lee S, Seo H, Ryu S, Kwon T. The effect of swimming exercise and powdered-*Salicornia herbacea*L. ingestion on glucose metabolism in STZ-induced diabetic rats. *J. Exerc. Nutr. Biochem*. 2015. 19(3):235-245.
- Lionetti L, Mollica M, Donizzetti I, Gifuni G, Sica R, Pignalosa A, Cavaliere G, Gaita M, De Filippo C, Zorzano A, Putti R. High-Lard and High-Fish-Oil Diets Differ in

Their Effects on Function and Dynamic Behaviour of Rat Hepatic Mitochondria. PLOS ONE. 2014. 9:e 92753.

- Liu M, Montgomery M, Fiveash C, Osborne B, Cooney G, Anderson K, Turner N. PPAR α -independent actions of omega-3 PUFAs contribute to their beneficial effects on adiposity and glucose homeostasis. Scientific Reports. 2014. 4: 1-8
- Lodish H. Biología celular y molecular. Médica Panamericana Eds., 2006. pp: 513-634.
- Lombardo Y, Chicco A. Effects of dietary polyunsaturated *n*-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. J NutrBiochem. 2006. 17: 1-13.
- Lowell B, Shulman G. Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. Science. 2005. 307:384–387.
- Luquet S, Gaudel C, Holst D, Lopez-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, Grimaldi P. Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. Bioch. Biophys. Acta. 2004. 1740: 313-317.
- Malecki M (Genetics of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice. 2005. 68:10–21
- Matravadia S, Herbst E, Jain S, Mutch D, Holloway G. Both linoleic and α -linolenic acid prevent insulin resistance but have divergent impacts on skeletal muscle mitochondrial bioenergetics in obese Zucker rats. Am J Physiol - EndocrinolMetab. 2014. 307:E102–E114.
- Matravadia S, Zabielski P, Chabowski A, Mutch D, Holloway G. LA and ALA prevent glucose intolerance in obese male rats without reducing reactive lipid content, but cause tissue-specific changes in fatty acid composition. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2016. 1;310(7): 619-630
- Matsui H, Okumura K, Kawakami K, Hibino M, Toki Y, Ito T. Improved Insulin Sensitivity by Bezafibrate in Rats: Relationship to Fatty Acid Composition of Skeletal-Muscle Triglycerides. Diabetes. 1997. 46:348–353.
- Mazzone T, Chait A, Plutzky J. Cardiovascular disease risk in type 2 diabetes mellitus: insights from mechanistic studies. The Lancet. 2008. 371:1800–1809.

- Mei S, Gu H, Yang X, Guo H, Liu Z, Cao W. Prolonged exposure to insulin induces mitochondrion-derived oxidative stress through increasing mitochondrial cholesterol content in hepatocytes *Endocrinology*. 2012. 153(5):2120-9.
- Minami A, Ishimura N, Sakamoto S, Takishita E, Mawatari K, Okada K, Nakaya Y. Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester v. oleic acid-rich safflower oil on insulin resistance in type 2 diabetic model rats with hypertriacylglycerolaemia. *British Journal of Nutrition*. 2002. 87, 157–162.
- Miyamoto A, Takeshita M, Pan-Hou H, Fujimori H. Hepatic changes in adenine nucleotide levels and adenosine 3'-monophosphate forming enzyme in streptozotocin-induced diabetic mice. *J ToxicolSci*. 2008. 33(2):209-17.
- Molinar-Toribio E, Pérez-Jiménez J, Ramos-Romero S, Romeu M, Giralt M, Taltavull N, Muñoz-Cortes M, Jáuregui O, Méndez L, Medina I, Torres J. Effect of n-3 PUFA supplementation at different EPA:DHA ratios on the spontaneously hypertensive obese rat model of the metabolic syndrome. *Br J Nutr*. 2015. 113:878–887.
- Monteiro J, Oliveira P, Jurado A. Mitochondrial membrane lipid remodeling in pathophysiology: A new target for diet and therapeutic interventions. *Prog in Lip Research*. 2013. 52: 513-528.
- Morrison W, Smith L. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 1964. 5:600-608.
- Murali B, Ramesh K. Improvement insulin sensitivity by losartan in non-insulin-dependent diabetic rats. *Pharmacol Res*. 2001. 44 (5): 385-389.
- Oh D, Talukdar S, Bae E, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu W, Watkins S, Olefsky J. GPR120 Is an Omega-3 Fatty Acid Receptor Mediating Potent Anti-inflammatory and Insulin-Sensitizing Effects. *Cell* 2010. 142:687–698.
- Oh D, Walenta E. Omega-3 Fatty acids and FFAR4. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014. 5: 1-5.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979. 95:351-358

- Pérez-Hernández I, Avendaño-Flores Y, Mejía-Zepeda R. Analysis of the membrane fluidity of erythrocyte ghosts in diabetic, spontaneously hypertensive rats. *ActaDiabetol*2010. 47:47–55.
- 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.
- Pirillo A, Catapano A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of hypertriglyceridaemi. *Int J Cardiol.* 170(2 Suppl 1):S16-20.
- Poudyal H, Panchal S, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Progress in lipidresearch.* 2011. 50: 372-387.
- Rajaram S. Health benefits of plant-derived α linolenic acid. *Am J ClinNutr.* 2014. 100: 443-448.
- Raza H, Prabu S, John A, Avadhani N. Impaired Mitochondrial Respiratory Functions and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Mol Sci.* 2011. 12:3133–3147.
- Reitman M. Modelos genéticos de obesidad y diabetes mellitus En LeRoith, D. Taylor, S. Olefsky, J. *Diabetes Mellitus Texto básico y clínico.* 2ª edición. Editorial Mc Graw-Hill. México. D.F. 2003. pp: 1331.
- Risérus U. Fatty acids and insulin sensitivity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2008. 5: 11-100
- Robertson RP, Harmon JS () Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell. *Free Radic Biol Med* 2006. 41(2):177–184.
- Roche E, Maestre I, Martín F, Fuentes E, Casero J, Reig J. Nutrient toxicity in pancreatic β -cell dysfunction. *J PhysiolBiochem.* 2000. 56: 119-128.
- Roduit R, Morin J, Massé F, Segall L, Roche E, Newgard CB Assimacopoulos-Jeannet F, Prentki M. Glucose down-regulates the expresion of the peroxisome proliferator-activated receptor- α gene in the pancreatic β -cell. *J BiolChem* 2000. 275: 35799-35806.

- Rohrbach S. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on mitochondria. *Current Pharmaceutical Design*. 2009. 15: 4103–4116.
- Rolo A, Palmeira C. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;212:167–178.
- Rosen E, Walkey J, Puigserver P, Spiegelman P. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev*. 2000. 14: 1293–1307.
- Rossmeisl M, Macek J, Kuda O, Jelenik T, Medrikova D, Stankova B, Kristinsson B, Haraldsson G, Svensen H, Stoknes I, Sjoval P, Magnusson Y, Balvers M, Verhoeckx K, Tvrzicka E, Bryhn M, Kopecky J. Metabolic effects of *n*-3 PUFA as phospholipids are superior to triglycerides in mice fed a high-fat diet: possible role of endocannabinoids. *PlosOne*. 2012. 7: 388 394.
- Ruzickova J, Rossmeisl M, Prazak T, Flachs P, Sponarova J, Veck M, Tvrzicka E, Bryhn M, Kopecky J. Omega-3 PUFA of marine origin limit diet-induced obesity in mice by reducing cellularity of adipose tissue. *Lipids*. 2004. 39:1177–1185.
- Santos D , Palmeira C, Seça R, Dias J, Mesquita J, Moreno A, Santos M. Diabetes and mitochondrial oxidative stress: a study using heart mitochondria from the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Mol Cell Biochem*. 2003. 246(1-2):163-70.
- Schuchardt J, Hahn A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids*.2013. 89: 1-8.
- Short K, Bigelow M, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, Nair K. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. 12;102(15): 5618-23
- Sorriento D, Pascale A, Finelli R, Carillo AL, Annunziata R, Trimarco B, Iaccarino G. Targeting mitochondria as therapeutic strategy for metabolic disorders. *ScientificWorldJournal*. 2014.13: 1-9.
- Soto-Arriaza M, Sotomayor C, Lissi E. Relationship between lipid peroxidation and rigidity in L- α - phosphatidylcholine-DPPC vesicles. *J Colloid Interface Sci*. 2008. 323: 70–74.
- Soto-Urquieta M, López-Briones S, Pérez-Vázquez V, Saavedra-Molina A, González-Hernández G, Ramírez-Emiliano J. Curcumin restores mitochondrial

functions and decreases lipid peroxidation in liver and kidneys of diabetic db/db mice. *Biol Res.* 2014. 47:74.

- Stanley W, Khairallah R, Dabkowski E. Update on lipids and mitochondrial function: impact of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2012. 15: 122–126.
- Suen D, Norris K, Youle R. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev.* 2008. 22:1577-1590.
- Suzuki M, Miura T. Effect of amyloid β -peptide on the fluidity of phosphatidylcholine membranes: Uses and limitations of diphenylhexatriene fluorescence anisotropy. *Biochim Biophys Acta.* 2015. 1848(3):753-9
- Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001. 50: 536-546.
- Tahrani A, Barnett A, Bailey C. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2016. 12:566–592.
- Tsalouhidou S, Argyrou C, Theofilidis G, Karaoglanidis D, Orfanidou E, NikolaidisMG, Petridou A, Mougios V Mitochondrial phospholipids of rat skeletal muscle are less polyunsaturated than whole tissue phospholipids: implications for protection against oxidative stress. *J Anim Sci.* 2006. 84:2818–2825.
- Vinik A, Park T, Stansberry K, Pittenger G. Diabetic neuropathies. *Diabetologia.* 2000. 43: 957-973.
- Voet D, Voet J, Pratt C. *Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular.* Médica Panamericana. 2007. 2ª Ed: pp1130.
- Waczulikova I, Habodaszova D, Cagalinec M, Ferko M, Ulicna O, Mateasik A, Sikurova L, Ziegelhöffer A. Mitochondrial membrane fluidity, potential, and calcium transients in the myocardium from acute diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007. 85:372–381.
- Wherrett D. Trials in the Prevention of Type 1 Diabetes: Current and Future. *Can J Diabetes.* 2014. 38:279–284.
- White P, Arita M, Taguchi R, Kang J, Marette A. Transgenic Restoration of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Insulin Target Tissues Improves Resolution Capacity and

Alleviates Obesity-Linked Inflammation and Insulin Resistance in High-Fat-Fed Mice. *Diabetes*. 2010. 59:3066–3073.

- Wong-Ekkabut, J, Xu Z, Triampo W, Tang I, Tieleman D, Monticelli L. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophys. J*. 2007. 93, 4225–4236.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn B, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase1. *Nat Med*. 2002. 8: 1288-1295
- Yu L, Fink B, Herlein J, Oltman C, Lamping K, Sivitz W. Dietary fat, fatty acid saturation and mitochondrial bioenergetics. *J. BioenergBiomembr*. 2014. 46 (1):33-44.
- Zhang, F, Ye C, Li G, Ding W, Zhou W, Zhu H, Chen G, Luo T, Guang M, Liu Y, Zhang D, Zheng S, Yang J, Gu Y, Xie X, Luo M. “The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. *Exp. Anim*. 2003. 52(5), 401-407.

8. APÉNDICE.

8.1 APÉNDICE I. DATOS DE MICROSOMAS

8.1.1 Microsomas de Hígado

En el presente estudio analizamos la fluidez membranal y la composición de ácidos grasos de mitocondrias de hígado. Encontramos modificaciones importantes en ambos parámetros relacionados con el tiempo, con el desarrollo de la diabetes y con el suplemento de ALA. En conjunto dichos cambios repercutieron en la función de las mitocondrias. Previo al estudio de dicho organelo analizamos también la fluidez membranal y composición de ácidos grasos de microsomas de hígado, para conocer las modificaciones en estas membranas y saber la probable relación con los cambios ocurridos en las membranas mitocondriales, ya que se ha sugerido que existe un intercambio de componentes (ácidos grasos, fosfolípidos, proteínas, etc) entre ambos sistemas membranales, sin embargo aún no hay información suficiente que valide dichas hipótesis. Por ello nuestro interés de conocer qué ocurre en la fluidez y composición de ácidos grasos de microsomas de hígado a través del tiempo y con el desarrollo de la diabetes.

8.1.2 Aislamiento de microsomas de hígado y análisis de la fluidez membranal

Los hígados se pesaron y lavaron con KCl, después se homogenizaron en frío en una solución amortiguadora que contenía 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 0.25 M de sacarosa y 1 mM de EDTA. Posteriormente el homogenizado se centrifugó a 10,000 x g durante 20 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante y se añadió la solución amortiguadora de tris-HCl para centrifugar nuevamente, esta vez a una velocidad de 100,000 x g durante 60 minutos a 4°C. Una vez obtenidos los microsomas, se realizó la cuantificación de fósforo por método de Bartlett (1959) para estimar la cantidad de fosfolípidos contenidos en las membranas microsomales y de esta manera determinar el volumen necesario de DPiP para tener una relación molar mínima de fosfolípidos de 2500:1. Posteriormente se incorporó el monitor fluorescente DPiP. Mediante las intensidades de fluorescencia de excímero a monómero (I_e/I_m) del dipirenilpropano se midió la fluidez membranal de los microsomas en un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55.

8.1.3 Extracción de lípidos totales de microsomas de hígado

Los lípidos de las mitocondrias fueron extraídos de acuerdo al procedimiento de Bligh y Dyer (1959) y Ames (1968) como se describe en Pérez-Hernández *et al.* (2010) para fantasmas de eritrocitos. El procedimiento se describe a continuación: se tomaron alrededor de 500 µl de microsomas, se depositaron en un homogenizador Potter-Elvehjem, se adicionó una mezcla de metanol-cloroformo-agua (2:1:0.8 relación volumen) y se homogenizó. Después de la adición de la mezcla de solventes a las muestras, mantenidas en hielo, se adicionó un volumen de cloroformo y uno de agua y se volvió a homogenizar brevemente. Después el homogenado obtenido se centrifugó a 2500 r.p.m a 8°C durante 5 minutos en una centrífuga Z206 A marca Hermle y se obtuvo un sistema de dos fases. Se eliminó la fase acuosa y se colectó la clorofórmica. Después se evaporó el solvente bajo una corriente de nitrógeno.

8.1.4 Metilación de ácidos grasos de microsomas

Los metil ésteres de los ácidos grasos se prepararon esencialmente como describen Morrison y Smith (1964). Las reacciones de derivatización se realizaron en viales de vidrio de 4 ml en los cuales se evaporaron entre 50 y 200 µg de lípidos a sequedad bajo una corriente de gas de nitrógeno. Después de la adición de 0.5 ml de reactivo de trifluoruro de Boro (BF₃) al 14% en metanol, se le puso una atmósfera de nitrógeno y se cerró el vial con una tapa de rosca y disco inerte de silicón con cubierta de teflón. Se calentó por 30 min a aproximadamente 92 °C en baño de agua. La muestra se enfrió a temperatura ambiente, el vial se abrió y se añadieron dos volúmenes de hexano y un volumen de agua, se agitó vigorosamente y se formó un sistema de dos fases, los metil ésteres se extrajeron de la fase orgánica. Se evaporó el hexano bajo una corriente de nitrógeno y los metil ésteres de los ácidos grasos se almacenaron a -70 °C y protegidos de la luz hasta su posterior análisis por cromatografía de gases.

8.5 Análisis de la composición de ácidos grasos de microsomas de hígado

Los ácidos grasos transesterificados se resuspendieron en n-hexano grado HPLC. Los metil ésteres se analizaron en un cromatógrafo de gases Clarus 500 Perkin Elmer controlado por computadora, equipado con un inyector capilar “Split/splitless” y detector de ionización de flama (FID). Los metil ésteres de los ácidos grasos se separaron en una columna capilar Omegawax (0.25 mm de diámetro interno y 0.25 mm de grosor) de 30 metros de longitud. Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas de acarreo. 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 por análisis de las áreas bajo los picos.

8.1.6 Análisis de la fluidez membranal de microsomas de hígado

En la figura 28 se muestra la fluidez membranal de los grupos de Wistar detectada por el DPiP a 1, 3 y 6 meses de edad. Observamos que al mes de edad no existen diferencias entre los cuatro grupos de animales. Es importante mencionar que a partir de esta edad, los grupos STZ-ALA y ALA comenzaron con el suplemento. A los 3 meses de vida, se observa que en las membranas microsomales de los animales diabéticos muestran un valor bajo del I_e/I_m (1.04 ± 0.02) con respecto al grupo control, el cual mostró un incremento en la fluidez membranal, teniendo un valor del I_e/I_m de 1.19 ± 0.01 .

Fluidez Membranal de Microsomas de Hígado de ratas Wistar

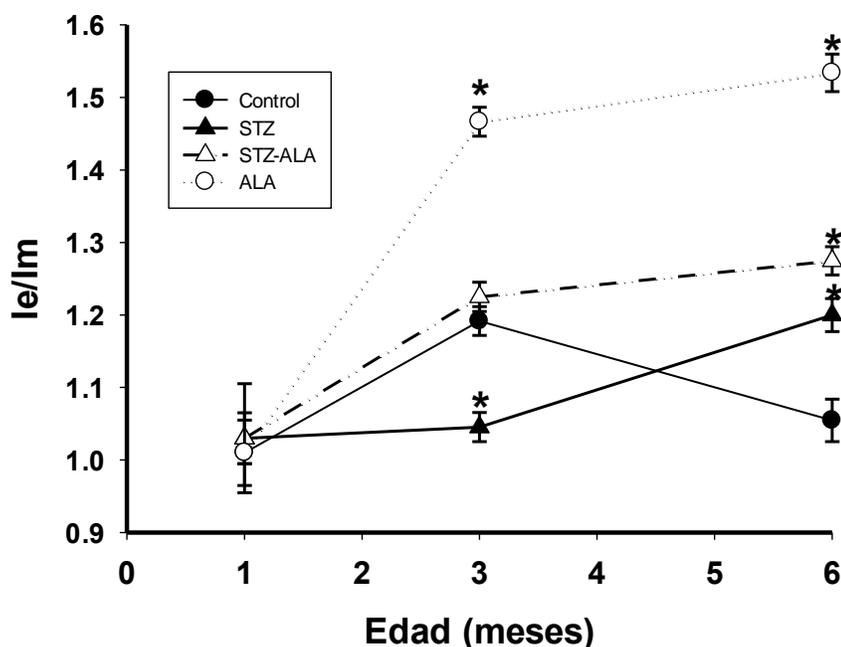


Fig. 26 Fluidez membranal detectada por el monitor fluorescente DPiP en microsomas de hígado de Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad n=5 ($p < 0.05$).

En el caso de los animales suplementados observamos que la fluidez membranal de los microsomas también incrementa a los 3 meses de edad. El grupo STZ-ALA presenta un valor de Ie/Im de 1.22 ± 0.02 , 17% más alto con respecto al grupo STZ y sin diferencias significativas con respecto al grupo control. En lo que respecta al grupo ALA podemos observar claramente que el incremento en la fluidez membranal fue el más alto con respecto a los grupos restantes. El valor de Ie/Im fue de 1.46 ± 0.02 , 17% más alto con respecto al grupo STZ-ALA y 22% mayor comparado con el grupo control.

A los 6 meses de edad se observan cambios interesantes, considerando las tendencias que observamos a los tres meses de vida. En el caso de los animales diabéticos observamos un incremento en el valor de Ie/Im el cual fue de 1.20 ± 0.02 , 15% mayor al que presentaron a los tres meses y significativamente más alto con respecto al grupo control, el cual mostró un Ie/Im de 1.05 ± 0.02 . Este valor de fluidez en los animales control fue 14% más bajo con respecto a los tres meses de vida.

Los grupos suplementados nuevamente mostraron una mayor fluidez membranal con respecto a los grupos no suplementados. Por un lado las STZ-ALA tuvieron un I_e/I_m de 1.27 ± 0.03 , sin cambios con respecto al valor observado a los 3 meses de vida (1.22 ± 0.02) pero 5% más alto con respecto al grupo STZ y significativamente mayor comparado con el grupo control por un 20%.

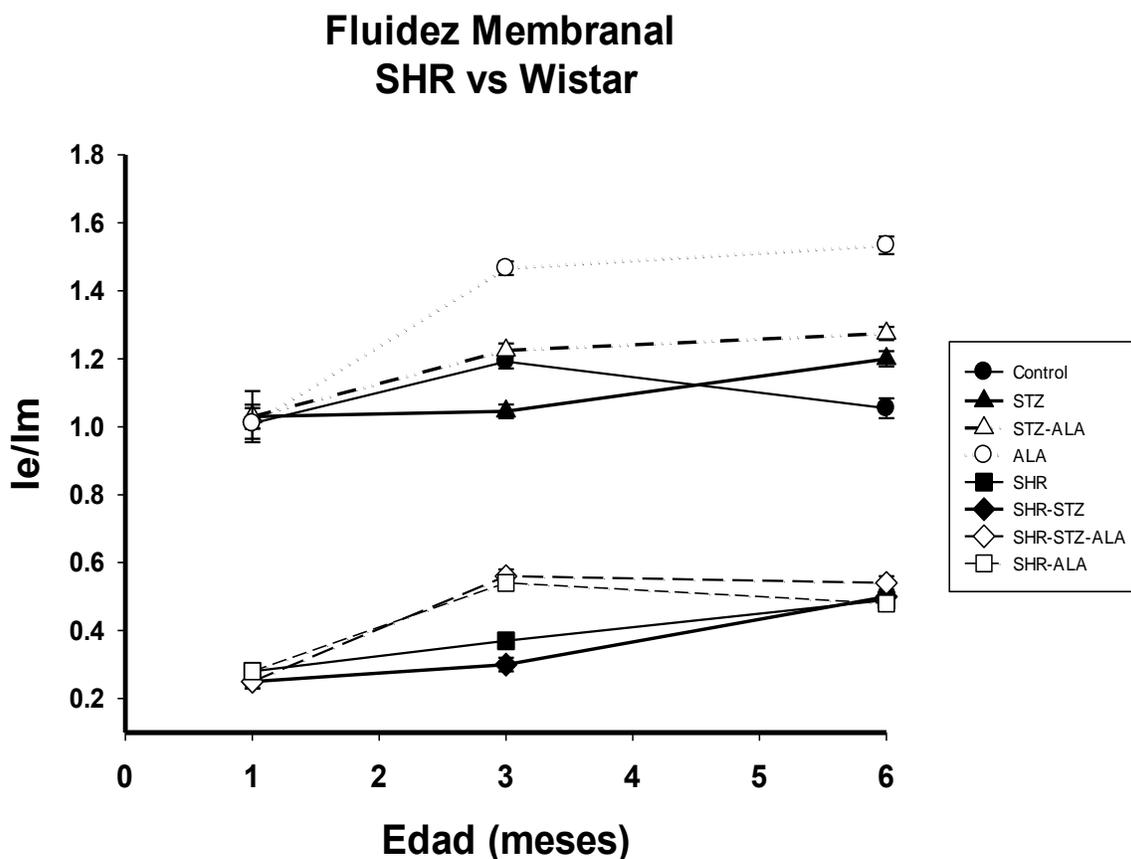


Fig. 27 Fluidez membranal detectada por el monitor fluorescente DPiP en microsomas de hígado de Wistar vs SHR a 1, 3 y 6 meses de edad $n=5$ ($p < 0.05$).

La fluidez membranal detectada por el DPiP muestra diversos cambios ocurridos propiamente por la edad (en el caso del grupo control) y como consecuencia del desarrollo de la diabetes. Asimismo el suplemento de ALA parece favorecer un incremento de la fluidez membranal, lo cual es similar a lo detectado en las membranas mitocondriales. Previamente en un estudio en el que analizamos la fluidez membranal de microsomas de ratas

espontáneamente hipertensas control, con diabetes y suplementadas con ALA observamos que con el desarrollo de diabetes la fluidez membranal era menor, asimismo el suplemento promovía un mayor incremento de dicho parámetro (Pérez et al., 2011) Sin embargo en el caso de los animales control observamos un aumento de la fluidez membranal a los tres y seis meses de edad, caso contrario a lo que encontramos en los microsomas de las Wistar control.

En la figura 29 se muestran los valores de fluidez membranal de ratas Wistar comparados con los valores de este parámetro de SHR. Es interesante ver que claramente se distinguen las dos poblaciones de ratas en la figura 29, mostrando una mayor fluidez los microsomas de Wistar, con valores de I_e/I_m que van de 1.01 ± 0.01 a 1.53 ± 0.02 . En el caso de las SHR el cociente I_e/I_m va de 0.25 ± 0.02 a 0.56 ± 0.02 . Con ello podemos ver que el estado de salud de los animales parece tener un papel importante en las características fisicoquímicas de las membranas microsomales.

8.1.7 Composición de ácidos grasos de microsomas de hígado

En la tabla 6 se muestra la composición de ácidos grasos en microsomas de hígado del grupo control y diabético al mes de vida. A esta edad, hay diferencias en el contenido de algunos ácidos grasos del grupo diabético con respecto al grupo control. Por ejemplo el ácido mirístico se encontró en una proporción de $2.1 \pm 0.1\%$, mientras que en el grupo control el valor fue de $0.4 \pm 0.2\%$. El ácido esteárico también tuvo un alto porcentaje en los animales diabéticos (23.8 ± 1.3) comparándolo con los animales control (20.8 ± 1.1). En el caso de los AGPIs observamos que hubo una menor concentración en el grupo diabético. Como ejemplo tenemos al ácido araquidónico el cual tuvo una proporción del $15.2 \pm 0.7\%$ mientras que en el grupo control el contenido fue del $17.3 \pm 0.8\%$. Dichas modificaciones repercutieron significativamente cociente de insaturación de los animales diabéticos mostrando un valor bajo (1.17 ± 0.03) al compararlo con el grupo control 1.25 ± 0.04 .

Tabla 5 Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de hígado a 1 mes de edad.

Ácidos Grasos	Control	STZ
Mirístico	0.4±0.2	2.1±0.1*
Palmítico	21.6±0.5	22.3±0.2
Palmitoleico	0.5±0.1	0.4±0.0
Esteárico	20.8±1.1	23.8±1.3*
Oleico	12.1±2.1	10.6±2.8
Linoleico	16.0±2.3	20.8±1.4*
γ Linolénico	0.2±0.2	0.5±0.3
Araquidónico	17.3±0.8	15.2±0.7*
EPA	ND	ND
DHA	7.3±2.8	6.4±1.2
NI	3.3±0.7	1.30±1.8
Ins/Sat	1.25±0.04	1.17±0.03*
EPA: Ácido Eicosapentaenoico DHA: Acido Docosaheptaenoico. NI: No Identificado Ins/Sat: Insaturados/Saturados. n=4 * <i>p</i> < 0.05		

A los 3 meses de edad se observan cambios en la composición de los animales diabéticos, probablemente como consecuencia del desarrollo de la diabetes (Tabla 7). No obstante no afectaron el cociente de insaturación el cual fue de 1.29±0.03, similar al del grupo control (1.32±0.09). En el caso de los grupos suplementados, observamos que las STZ-ALA y ALA tuvieron una proporción del 1.0±0.1% y 1.6±0.1 respectivamente de ácido alfa linolénico. En el caso de las STZ-ALA el Ins/Sat fue de 1.24±0.06, similar a STZ y control, mientras que el grupo ALA presentó el cociente de insaturación más alto en comparación a los demás grupos (1.56±0.06).

Tabla 6 Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de hígado a 3 meses de edad.

Ácidos grasos	Control	STZ	STZ-ALA	ALA
Mirístico	0.5 ±0.1	0.7±0.2	0.6±0.1	0.6±0.1
Palmítico	21.4±0.7	24.3±0.9*	25.3±1.8*	21.2±0.4
Palmitoleico	1.3±0.2	2.2±1.4	2.0±0.5	1.7±0.5
Esteárico	20.9±1.1	18.2±1.9	18.9±1.2	18.1±1.2
Oleico	11.2±0.4	15.4±0.8*	14.2±1.1	13.6±0.6
Linoleico	15.4±1.2	18.4±3.2	17.3±1.4	18.2±1.6
γ Linolénico	0.3±0.1	0.3±0.3	0.3±0.1	0.3±0.1
α Linolénico	ND	ND	1.0±0.1*	1.6±0.1*
Araquidónico	23.1±0.9	15.8±1.5*	16.5±1.7*	20.0±0.5*
EPA	ND	ND	0.5±0.1*	0.5±0.2*
DHA	4.4±0.2	2.9±0.1*	3.5±0.9	4.1±0.2
NI	1.6±0.2	1.7±1.1	0.2±0.1	0.1±0.1
Ins/Sat	1.32±0.09	1.29±0.03	1.24±0.06	1.53±0.06*

EPA: Ácido Eicosapentaenoico DHA: Acido Docosahexaenoico. NI: No Identificado
 Ins/Sat: Insaturados/Saturados.
n=4 *p< 0.05

A los 6 meses de edad, observamos diversos cambios en la composición de ácidos grasos de microsomas como consecuencia de la edad (en el caso de los animales control) y/o el desarrollo de la diabetes y/o el suplemento suministrado a los grupos ALA (Tabla 8). Dentro de las modificaciones más relevantes observamos que en el grupo control hubo un incremento de ácido palmítico al paso del tiempo. A los 3 meses dicho ácido graso tuvo un valor de 21.4±0.7% y a los 6 meses de 29.2±3.8, es decir incrementó un36%. Además, observamos que de 3 a 6 meses de edad el ácido araquidónico disminuyó severamente, paso de un 23.1±0.9% a 14.0± 1.1%.

En el caso del grupo STZ observamos que el contenido de ácido palmítico fue menor al compararlo con el grupo control (23.0±1.7 y 29.2±3.8 respectivamente). En el caso del ácido linoleico el porcentaje fue de 22.2±1.3, 27% mayor que el porcentaje que presentó el grupo control (17.4%).

Tabla 7 Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de hígado a 6 meses de edad.

Ácidos grasos	Control	STZ	STZ-ALA	ALA
Mirístico	0.5 ±0.1	0.6±0.4	1.7±0.5*	0.7±0.3
Palmítico	29.2±3.8	23.0±1.7*	23.4±1.3*	22.5±1.3*
Palmitoleico	1.4±0.3	1.5±0.8	2.3±0.5	1.8±0.7
Esteárico	23±2.9	17.9±3.4	13.9±1.2*	13.8±0.5*
Oleico	10.4±1.5	10.4±2.4	23.2±0.6*	12.6±0.5
Linoleico	17.4±1.5	22.2±2.3*	14.7±1.6	22.5±0.4*
γ Linolénico	0.3±0.1	0.4±0.1*	0.2±0.1	0.3±0.1
α Linolénico	ND	ND	0.9±0.1*	2.1±1.9*
Araquidónico	14.0±1.1	18.1±1.2*	12.7±0.5	18.4±1.4*
EPA	ND	ND	1.0±0.2*	0.8±0.1*
DHA	2.3±0.9	4.1±1.1	5.3±0.2*	4.3±0.7*
NI	1.1±0.5	1.9±0.1	0.7±0.1	0.8±0.1
Ins/Sat	0.87±0.07	1.39±0.03*	1.54±0.06*	1.69±0.08*

EPA: Ácido Eicosapentaenoico DHA: Acido Docosahexaenoico. NI: No Identificado
 Ins/Sat: Insaturados/Saturados.
n=4 *p< 0.05

Los grupos suplementados muestran un porcentaje de ácido alfa linolénico de 0.9±0.1 y 2.1±0.9 en las STZ-ALA y ALA respectivamente. Al analizar los cocientes de insaturación de todos los grupos, observamos que el grupo control tuvo el Ins/Sat más bajo (0.87±0.07). En el caso de las STZ dicho cociente fue de 1.39±0.03, es decir 59% más alto que en el grupo control. En el grupo STZ-ALA el cociente fue de 1.54±0.06 y en el grupo ALA fue de 1.69±0.08 (77% y 94 más alto con respecto al grupo control).

En la figura 29 se muestran los cocientes de insaturación durante los 6 meses de experimentación. Observamos que los grupos suplementados dichos cocientes muestran un incremento al paso de los meses. Además observamos que el Ins/Sat muestra una tendencia similar a lo observado en la fluidez membranal (Fig. 28) reportada por el DPiP.

Cociente de Insaturación de Microsomas de Hígado de ratas Wistar

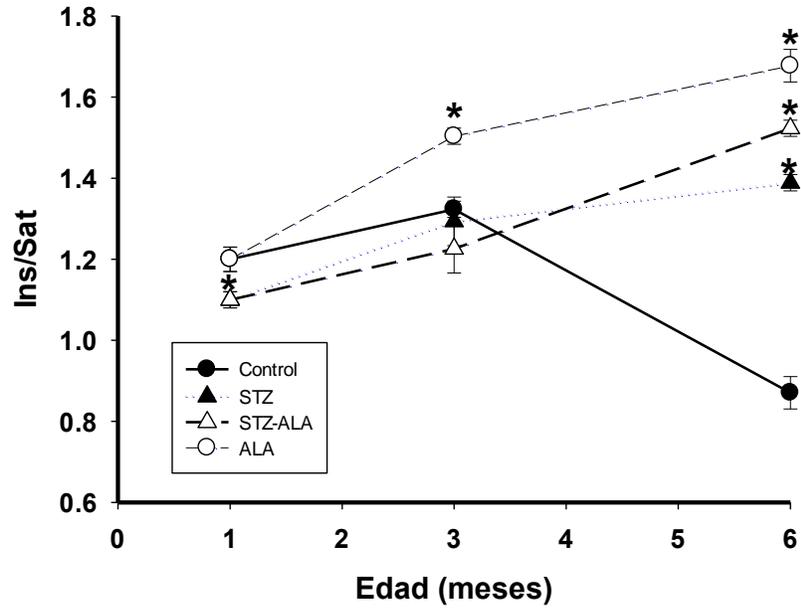


Fig. 28 Cociente de insaturación de microsomas de hígado de los grupos Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad n=5 ($p < 0.05$)

8.2 APÉNDICE II. ARTÍCULO REQUISITO

J Bioenerg Biomembr
DOI 10.1007/s10863-017-9700-5



Liver mitochondrial membrane fluidity at early development of diabetes and its correlation with the respiration

Ismael H. Pérez-Hernández¹ · Josué Misael Domínguez-Fuentes¹ ·
Martín Palomar-Morales² · Ana Cecilia Zazueta-Mendizabal³ · Arturo Balza-Gutman² ·
Ricardo Mejía-Zepeda¹

Received: 2 December 2016 / Accepted: 15 March 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract The biological membranes are important in cell function but, during development of diseases such as diabetes, they are impaired. Consequently, membrane-associated biological processes are impaired as well. The mitochondria are important organelles where oxidative phosphorylation takes place, a process closely related with the membranes. In general, it is accepted that the development process of diabetes decreases membrane fluidity. However, in some cases, it has been found to increase membrane fluidity of mitochondria but to decrease the Respiratory Control (RC) index. In this study we found an increase of membrane fluidity and an increase of the RC at an early phase of the development of a type 2 diabetes model. We measured the lipoperoxidation, analyzed the fatty acids composition by gas chromatography, and assessed membrane fluidity using three fluorescent monitors located at different depths inside the bilayer, dipyrrenilpropane (DPyP), diphenylhexatriene (DPH), and trimethylammonium diphenylhexatriene (TMA-DPH). Our findings indicate that in the initial stage of diabetes development, when lipoperoxidation still is not significant, the membrane fluidity of liver mitochondria increases because of the increment in the unsaturated to saturated fatty acids ratio (U/S), thus producing

an increase of the RC. The membrane fluidity is not the same at all depths in the bilayer. Contrary to the results obtained in mitochondria, the diabetes induced a decrease in the U/S fatty acids ratio of liver total lipids, indicating that the mitochondria might have an independent mechanism for regulating its fatty acids composition.

Keywords Diabetes · Mitochondria · Membrane fluidity · Fatty acids composition · Respiratory control · Liver

Introduction

The biological membranes are important in cell function and consequently for the whole organism. It is known that several processes take place in or through membranes (Fagone and Jackowski 2009; van Meer et al. 2008) and there is evidence indicating that the development of pathologies such as Diabetes Mellitus (DM) and/or the hypertension, are associated with changes in the physical and chemical properties of the membranes (Figueroa-García et al. 2015; Nanetti et al. 2008; Pérez-Hernández et al. 2010; Waczulikova et al. 2007; Weijers 2012). In the case of diabetes, there is strong evidence that the membrane fluidity of red blood cells is decreased (Pilon 2016), but in heart mitochondria (Waczulikova et al. 2007) and placental mitochondria (Figueroa-García et al. 2015) an increase of membrane fluidity with the development of diabetes has been reported. In addition, it has been documented that membrane associated processes can be affected by diabetes; Nanetti et al. (2008) reported that both, platelets ATPase activity and membrane fluidity, were lower in diabetic patients compared to healthy subjects. Waczulikova et al. (2007) and Figueroa-García et al. (2015) studying heart and placental mitochondria, respectively, reported an increase of mitochondrial membrane fluidity in diabetic rats, but a

✉ Ricardo Mejía-Zepeda
mejia@uaam.mx

¹ Unidad de Biomedicina, FES Izacala, UNAM, Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Izacala, 54090 Tlalrepan, Estado de México, C.P., Mexico

² Unidad de Morfofisiología, FES Izacala, UNAM, Av. De los Barrios No. 1, Los Reyes Izacala, 54090 Tlalrepan, Estado de México, C.P., Mexico

³ Depto. Biomedicina Cardiovascular, Instituto Nacional de Cardiología I Ch, Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Hlalpan, 14080 Ciudad de México, Mexico

decrease of the Respiratory Control (RC) index, which is possibly due to free radicals. The impairment of mitochondrial function during diabetes due to several effects of hyperglycemia is known, especially by the formation of Reactive Oxygen Species (ROS) (Rolo and Palmeira 2006). In this study we were interested in investigating how the liver mitochondrial respiration and the physicochemical properties of membranes are affected, at an early phase of the development of type 2 diabetes, before a significant increment of free radicals in membranes is presented. For assessing the membrane fluidity, we used three membrane fluidity probes located at different depths inside the membrane, and we obtained the thermotropic characteristic reported by each monitor. For understanding the origin of the physical parameter fluidity, the fatty acids composition was obtained and analyzed through the unsaturated to saturated (U/S) fatty acids ratio.

Materials and methods

Chemicals

Individual and a mixture of fatty acids methyl ester standards, 14% boron trifluoride in methanol, and streptozotocin were obtained from Sigma Chemical Co. 1,3-Di(1-pyrenyl) propane (DPyP), 1,6 diphenyl 1,3,5 hexatriene (DPH), and 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene *p*-toluenesulfonate (TMA-DPH) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). *n*-Hexane HPLC grade and all other analytical reagents and solvents were purchased from J.T. Baker. Purified double distilled water was used for analytical procedures.

Animals

Wistar rats were maintained under controlled conditions (12 h of light, 12 h of dark, at 22 °C) following the guidelines of the institutional bioethics committee and in accordance with Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (NOM 062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, Mexico). The diabetes was induced in newborn male Wistar rats (48 h old) by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) [135 mg/kg of body weight] dissolved in 50 μ l of citrate buffer, pH 4.6. The control group was injected with citrate buffer. The newborn rats were kept with the mothers in cages with standard diet and tap water ad libitum. The animals were weighted every five days in an electronic balance. The blood glucose was measured also every five days with an Accucheck digital glucometer taking a drop of blood from the tail of the rats. The rats were weaned at 32 days-old; two days after the Glucose Tolerance Curves (GTC) were done with dextrose (3 g/kg of body weight) administered with esophageal cannula and measuring blood glucose every

30 min with the digital glucometer. The rats were killed at 34 days-old; they were anesthetized with pentobarbital (40 mg/kg of body weight) and blood was collected by heart puncture in vacutainer tubes for obtaining serum. Cholesterol and triglycerides were measured in the serum using an enzymatic Spinreact kit following the manufacturer instructions.

Isolation of liver mitochondria

The liver mitochondria were isolated by differential centrifugations according to the following description. First, the liver was transferred to an aqueous medium containing 250 mM sucrose, 10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.4 and 1 mM ethylene glycol-bis (b-aminoethyl ether) *N,N'*-tetra acetic acid (EGTA) at 4 °C; the liver was minced and rinsed several times on this buffer. The minced tissue was homogenized with a Potter-Elvehjem glass tissue homogenizer (10 strokes in approximately 4 min) avoiding overheating of the sample. The homogenate was centrifuged 10 min at 800 \times g, the supernatant was spun 10 min at 10,000 \times g and the pellet was washed once with the same medium. Later, the pellet was incubated 10 min in the same buffer with 0.2% albumin free of fatty acids and spun at 10,000 \times g during 10 min. Finally, the pellet was resuspended in the same isolation buffer and the protein content was determined by the micro Bradford method (Bradford 1976).

Respiration of liver mitochondria

Mitochondrial function was evaluated by measuring oxygen consumption. Mitochondrial oxygen consumption was determined using a Clark-type oxygen electrode. The experiments were carried out in 1.5 ml of medium containing 125 mM KCl, 10 mM MOPS, 3 mM H_2PO_4 , 5 mM succinate, pH 7.3. The respiratory state 4 (S4) (nAt O_2 /min/mg prot) was evaluated in the presence of 10 mM succinate plus 1 μ g/ml rotenone. The respiratory state 3 (S3) (nAt O_2 /min/mg prot) was measured after addition of 200 nM adenosine diphosphate (ADP) final concentration. The Respiratory Control (RC) index was calculated as the ratio between the state 3 and the state 4 rates.

Measurement of malondialdehyde (MDA)

Lipid peroxidation in mitochondrial membrane was estimated by the accumulation of malondialdehyde (MDA), whose concentration was measured by a color reaction with thiobarbituric acid (Ohkawa et al. 1979).

Analysis of fatty acids composition

The liver total lipids were extracted by Folch et al. (1957) and the liver mitochondria lipids were extracted according

to Bligh and Dyer (1959) and Ames (1968) as previously described in Pérez-Hernández et al. (2010) for ghost erythrocytes. The fatty acids composition of mitochondrial membrane was determined by gas chromatography after transesterification (Morrison and Smith 1964) with boron trifluoride 14% in methanol. Gas chromatography was carried out in a Perkin Elmer Clarus 500 controlled by computer, equipped with a split/splitless capillary injector and flame ionization detector (FID). The fatty acid methyl esters were separated on a 30 m, omegawax column (0.25 mm i.d., 0.25 mm thickness). Ultra highly pure nitrogen was used as the carrier gas (14 ml/min). The injector and detector were at 250 °C. The temperature program applied to the column was as follows: 5 min at 180 °C, increased at a rate of 5 °C/min to a final temperature of 240 °C, which was maintained for 18 min more. Identification of acyl chains in each sample was done by comparison with retention times and peak areas relative to the standard mixture of fatty acid methyl esters. The fatty acids composition is reported as mol%. The unsaturation index (U/S) was obtained from total sum of unsaturated divided by total sum of saturated fatty acids.

Mitochondrial membrane fluidity

To evaluate the mitochondrial membrane fluidity, three different fluorescent probes were used: DPyP, DPH, and TMA-DPH. The measurements with DPyP were done as previously described (Figueroa-García et al. 2015). The fluorescence of DPyP incorporated into the mitochondrial membranes was measured at several temperatures, from 10 to 60 °C, in a Perkin Elmer Fluorescence Spectrometer LS55 connected to a circulating water bath. The fluorophore was excited at 337 nm and the monomer (I_m) and excimer (I_e) fluorescence intensities were read at 385 and 480 nm, respectively. From these readings, the excimer to monomer fluorescence intensity ratios (I_e/I_m) were calculated. The measurements of mitochondrial membrane fluidity with the lipophilic fluorescent probes DPH and TMA-DPH were essentially as described by Waczulikova et al. (2007) with minor modification: from the mitochondrial suspension, 0.5 mg protein/ml were taken to be labeled with DPH or TMA-DPH at a final concentration of 0.25 mM. The samples were protected from the light and incubated for 30 min under magnetic stirring previous to measurements. The fluorescence polarization measurements were done in the same Perkin Elmer Fluorescence Spectrometer LS55 connected to a circulating water bath. Both fluorophores were excited at 365 nm and emission of DPH was detected at 430 nm and TMA-DPH at 425 nm. The measurements were done from 10 to 60 °C.

Statistical analysis

All the parameters were measured in a minimum of 4 rats per group. All data are expressed as means \pm SD. A Student's *t* test was used for the statistical analysis of data ($p < 0.05$).

Results

Type 2 diabetes model

For the development of the type 2 diabetes model, STZ was injected intraperitoneally into newborn rats (48 h old). As can be seen in Fig. 1 at the fifth day of life, glycaemia was around 320 mg/ml, which was 3 times higher than the concentration in control rats. Eventually, blood glucose decreased to an average concentration of 188 mg/ml at day 15 and it was kept over 200 mg/ml, which is twice as high as the blood glucose in control rats, until day 34 when the rats were sacrificed. Due to this hyperglycemia, the growth of diabetic rats was affected. Figure 2 shows that the body weight of diabetic rats was significantly lower at all times. By the time of the sacrifice, the average weight of the diabetic rats was 21% lower than the weight of the control rats.

Demonstrating that the rats developed type 2 diabetes, Fig. 3 shows the Glucose Tolerance Curves (GTC) of 30 days-old rats. It can be seen that despite the higher glucose concentration in the diabetic group since the beginning, it is clear that they still have the capability of partially controlling blood glucose, just like in type 2 diabetes, almost reaching their basal concentrations within the time measured. In the same way, Fig. 4 shows the serum cholesterol and triglycerides concentrations; only the concentration of triglycerides was significantly higher in diabetic rats, reaching 182 mg/dl (50% higher compared to the control rats).

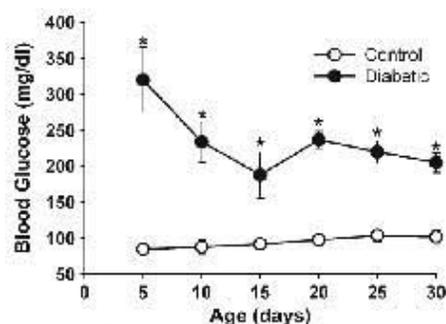


Fig. 1 Blood glucose of control and diabetic rats at different times during their growth. $n = 4$, $p = 0.05$

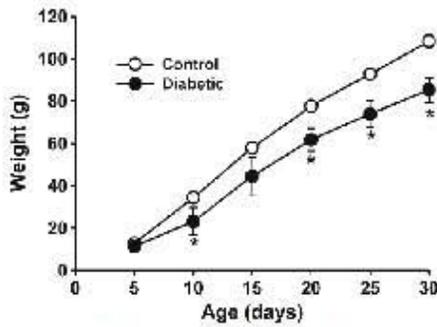


Fig. 2 Body weight of control and diabetic rats during their growth. $n = 4$, $p = 0.05$

Lipoperoxidation in mitochondrial membranes

To ensure that free radicals are not influencing our experiments on this model of type 2 diabetes, at least in membranes, we assess lipoperoxidation in mitochondria. As shown in Fig. 5, MDA in liver mitochondria of diabetic rats was almost 20% higher than in control rats, but it was not statistically significant.

Mitochondrial respiration

In Fig. 6 the average respiration of liver mitochondria from control and diabetic rats is depicted. The basal respiration (state 4) was not different between groups (Fig. 6a). However, once the oxidative phosphorylation was induced by the addition of ADP (state 3), the respiration of mitochondria from diabetic rats was 23% higher than the respiration of mitochondria from control rats (Fig. 6b). As a result, the RC of mitochondria from diabetic rats was significantly higher than that found in mitochondria from control rats (Fig. 6c).

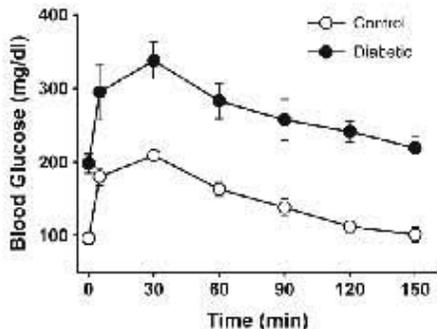


Fig. 3 Glucose Tolerance Curve (GTC) of control and diabetic rats at 1 month-old. $n = 4$, $p = 0.05$

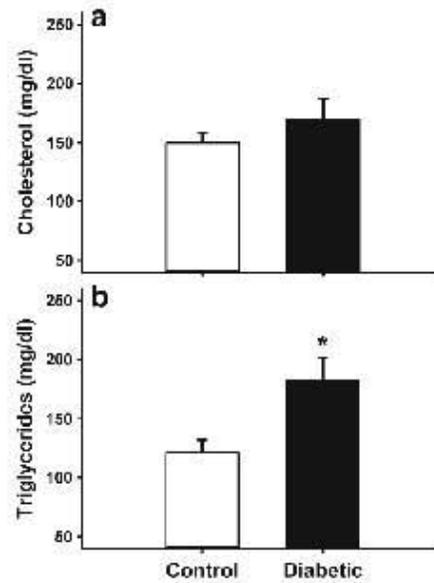


Fig. 4 Cholesterol (a) and Triglycerides (b) concentration in serum of control and diabetic rats at 1 month-old. $n = 4$, $p = 0.05$

Fatty acids composition of liver total lipids and liver mitochondria

The fatty acids composition of mitochondria from both groups was analyzed by gas chromatography, as was the fatty acid composition of liver total lipids. Table 1 shows the fatty acids composition of liver total lipids and liver mitochondria from control and diabetic rats; there were several differences between these groups. For instance, the palmitic acid was 56% higher in the liver total lipids of diabetic rats but 14% lower in mitochondria, both of them compared with their respective controls. The stearic acid was 33% higher in liver total lipids of diabetic rats but remained unchanged in mitochondria. The linoleic acid was 40% lower in liver total lipids of diabetic rats but remained unchanged in mitochondria. With the aim to better understand and interpret the fatty acids composition, at the end of Table 1 is included the ratio of total unsaturated

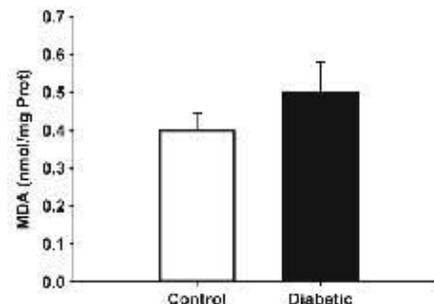


Fig. 5 Malondialdehyde (MDA) in liver mitochondria of control and diabetic rats at 1 month-old. $n = 4$, $p = 0.05$

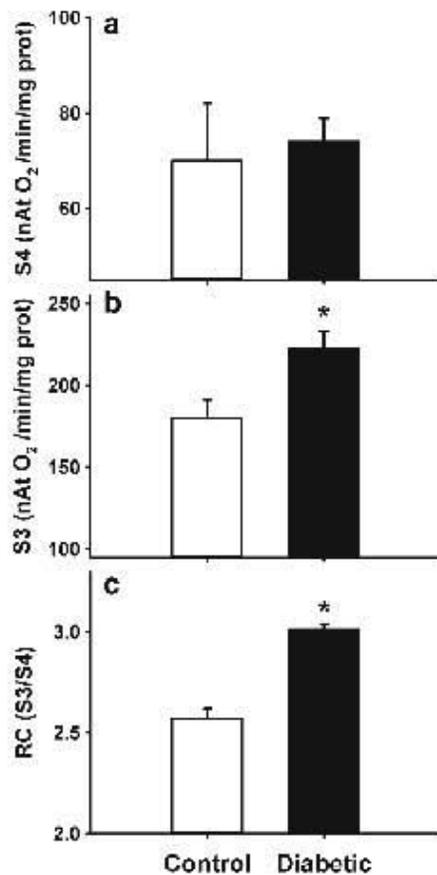


Fig. 6 Measurements of mitochondrial oxygen consumption of control and diabetic rats at 1 month-old. State 4 (a), State 3 (b), and Respiratory Control (c), $n = 4$, $p = 0.05$

fatty acids over total saturated fatty acids (U/S) as an index directly related to membrane fluidity. If we compare the fatty acids composition of liver total lipids of control rats with their respective mitochondria, we can see that their compositions were similar, and their U/S ratios are close (1.64 ± 0.14 vs. 1.36 ± 0.12). However, in diabetic rats there were remarkable differences between the fatty acids composition of the tissue and the mitochondria and their U/S ratios are very different (0.81 ± 0.23 vs. 1.67 ± 0.04 respectively). It is also seen that the diabetes increased the saturated fatty acids in the tissue, resulting in a lower U/S ratio than in control rats, but remarkably the U/S ratio of mitochondria is significantly higher than that of mitochondria from control rats ($p < 0.05$).

Membrane fluidity of liver mitochondria

To assess the mitochondrial membrane fluidity, in this work we used three different fluorescent probes: DPyP, DPH, and TMA-DPH with the knowledge that they are located inside the membranes at different levels. Figure 7 shows the measurements of membrane fluidity with the former three probes at different temperatures, from 10 to 60 °C, for obtaining a thermotropic characterization of the mitochondrial membranes from control and diabetic rats. Figure 7a shows the ratio of excimer to monomer fluorescence of DPyP, and due to the fact that this ratio is directly related to membrane fluidity, then it is easy to see that at almost all temperatures, the detected mitochondrial membrane fluidity of diabetic rats was higher than the mitochondrial membrane fluidity of control rats. The representative Arrhenius plot depicted in Fig. 7b shows that DPyP detected a biphasic behavior of both mitochondria, but with different transition temperatures.

Table 1 Fatty acids composition (mol%) of liver total lipids (tissue) and liver mitochondria from control and diabetic rats

Fatty Acid	Tissue		Mitochondria	
	Control	Diabetic	Control	Diabetic
Palmitic	19.3 ± 1.8	30.3 ± 1.9*	20.0 ± 1.1	17.1 ± 0.5*
Palmitoleic	1.5 ± 0.2	0.9 ± 0.2*	0.3 ± 0.2	1.5 ± 0.6**
Stearic	18.4 ± 1.4	24.5 ± 3.1*	21.9 ± 2.2	20.6 ± 0.7
Oleic	17.1 ± 0.7	15.6 ± 0.7*	9.4 ± 1.4	12.0 ± 0.4*
Linoleic	18.1 ± 1.2	10.6 ± 2.6*	17.0 ± 1.6	13.4 ± 0.4
Gamma Linoleic	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Arachidonic	20.2 ± 2.8	15.8 ± 2.9	21.4 ± 0.8	20.0 ± 0.7
EPA	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.1	ND	ND
DHA	4.1 ± 1.2	1.6 ± 0.3*	9.1 ± 0.2	10.1 ± 0.2*
Unidentified	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.1 ± 0.1
U/S	1.64 ± 0.14	0.81 ± 0.23**	1.36 ± 0.12	1.67 ± 0.04**

EPA, Eicosapentaenoic acid; DHA, Docosahexaenoic acid; ND, None Detected; U/S, Unsaturated/Saturated Ratio, $n = 4$

* $p < 0.05$

Fig. 7 Measurements of mitochondrial membrane fluidity of control and diabetic rats with the fluorescent probes DPyP (a), DPH (c), TMA-DPH (e) and a representative Arrhenius plots for each thermotropic analysis: DPyP (b), DPH (d), and TMA-DPH (f). $n = 4$, $p = 0.05$

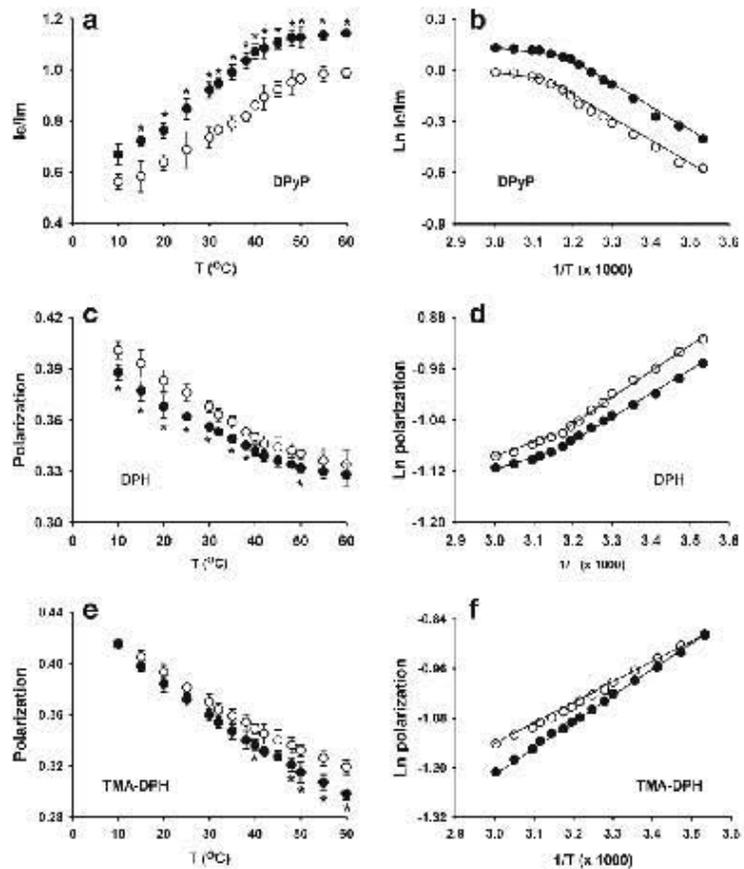


Figure 7c shows the fluorescence polarization of DPH in the same mitochondrial membranes. As polarization is inversely related to membrane fluidity, the results depicted in this figure also show that mitochondrial membrane fluidity of diabetic rats was higher than controls, but mainly at temperatures below 38 °C. Above that temperature (38 °C), there were almost no significant differences. The representative Arrhenius plot of Fig. 7d shows two parallel and close plots, as well as a lesser evident biphasic behavior but there were not differences in the transition temperature between the two groups.

Figure 7e shows the fluorescence polarization of TMA-DPH in the mitochondrial membranes of the two groups. As can be seen in the figure, contrary to DPH, there were only significant differences at the highest temperatures; also seen is a higher fluidity in mitochondria of diabetic rats. In the representative Arrhenius plot of Fig. 7f it is shown that the TMA-DPH did not detect a biphasic behavior of the plots but just different slopes, which means that TMA-DPH did not detect any transition temperature. TMA-DPH indicated that at the interphase, the differences were evident mainly at the higher temperatures. Again, the mitochondrial membrane fluidity of

diabetic rats was higher than the mitochondrial membrane fluidity of control rats.

Table 2 summarizes the Arrhenius analysis of the data of Fig. 7. The results are presented as the average Activation Energies (Kcal/mol) and the Phase Transition Temperatures [PTT] (°C) of the mitochondrial membranes as detected by

Table 2 Activation energies and Phase Transition Temperatures (PTT) of liver mitochondria from control and diabetic rats measured with the three different fluidity probes (DPyP, DPH, and TMA-DPH)

Fluorophore	Group	Activation energy (Kcal/mol)		PTT (°C)
		Below PTT	Above PTT	
DPyP	Control	18.7 ± 1.81	3.37 ± 0.63	45.3 ± 1.43
	Diabetic	14.3 ± 1.32*	3.91 ± 0.40	37.6 ± 1.52*
DPH	Control	1.74 ± 0.05	0.91 ± 0.04	45.4 ± 1.42
	Diabetic	1.61 ± 0.03*	0.74 ± 0.08	45.2 ± 1.61
TMA-DPH	Control	1.68 ± 0.07	N.D.	N.D.
	Diabetic	1.49 ± 0.08	N.D.	N.D.

PTT, Phase Transition Temperature; N.D. None detected; $n = 4$
* $p < 0.05$

each one of the fluorescent probes used (DPyP, DPH, and TMA-DPH). With DPyP it was possible to detect the PTT around 45.3 ± 1.43 °C in control mitochondria, and a lower PTT in diabetic rats (37.6 ± 1.52 °C). With DPH it was also possible to detect the PTT, but with no difference between the two groups. Finally, with TMA-DPH it was not possible to detect any PTT. In all cases, the activation energies below the PTT were lower in mitochondria of diabetic rats, whereas above the PTT, there were no differences or the PTT was not detected.

Discussion

Diabetes is a prevalent and growing health problem; it is estimated that currently 415 million people have diabetes and in the year 2040 that number will rise to 642 million people (IDF Diabetes Atlas 2015). Understanding as much as possible about this disease is necessary, especially at the initial stages of its development. In this current study, we worked with a type 2 diabetes mellitus model in Wistar rats for studying the effects of diabetes, at an early stage of progression, on mitochondrial membrane fluidity and its consequences on respiration. The development of type 2 diabetes models by STZ injection in newborn rats has been extensively documented (Damasceno et al. 2013; Portha et al. 1979; Wang et al. 1994) although the protocols and STZ concentration varies among rat strains. In spontaneously hypertensive rats (SHR), it has been used 75 mg of STZ/kg of body weight (Pérez-Hernández et al. 2010), in Sprague Dawley 90 mg/kg (Patil et al. 2014), and in this research we used 135 mg/kg of body weight in Wistar rats generating hyperglycemias around 200 mg/dl at the time of sacrifice, which is considered as a mild diabetes (Damasceno et al. 2013). All these protocols reflect the variety of ways for reaching a type 2 diabetes mellitus model and the different concentrations of STZ for reaching hyperglycemia. As we observed in Fig. 1, three days after induction with STZ, the blood glucose concentration on average was around 320 mg/dl but it clearly descended to concentrations around 200 mg/dl, showing the recovery capability of the rats for controlling glycaemia. The glycaemia reported here is consistent with the destruction of pancreatic beta cell by STZ at injection (2 days-old) and subsequent partial restoration of these cells as described elsewhere (Wang et al. 1994). The rate of growth (Fig. 2) reflects the damage inflicted by hyperglycemia on the rat anabolic processes. The GTC shown in the Fig. 3 clearly shows that at 1 month-old, the diabetic rats still have the capability for controlling glycaemia, but less efficiently than the control rats, which is coherent with the initial phase of development of type 2 diabetes. It is known that diabetes affects almost all lipids and lipoproteins; triglycerides are significantly increased in type 2 diabetic patients but also the low density

lipoproteins cholesterol (Costa et al. 2006). In 1 month old rats induced to diabetes the cholesterol concentration was not different from that of the control rats, although it shows a tendency to increase. Triglycerides, however, were significantly higher in diabetic rats. These results also support the notion that we were working with a model of type 2 diabetes at the initial phase of development and that lipotoxicity is not well established yet.

It is noteworthy that lipoperoxidation was not different between the two groups by the time of sacrifice, showing that despite the higher blood glucose concentration in the diabetic rats, free radical formation has not reached a higher level. It is known that hyperglycemia increases free radical formation (Robertson and Harmon 2006; Rolo and Palmeira 2006), but perhaps the exposure to glucose was not high enough nor for enough time so as to generate critical free radical formation. It is also likely that due to the youth of the rats and their high metabolic rate, lipoperoxidation did not increase further.

It has been reported that diabetes has dramatic effects on mitochondrial function (Dey and Swaminathan 2010; Raza et al. 2011; Rolo and Palmeira 2006) causing among several effects, the decrease in mitochondrial respiration. In this study we found at an early stage of diabetes an increase in the RC in liver mitochondria of diabetic rats compared to normoglycemic controls. This result seems contrary to the expectation of a decrease in mitochondrial function as described by researchers that recognize the free radical formation as one of the most important factors ameliorating the mitochondrial function (Dey and Swaminathan 2010; Rolo and Palmeira 2006; Santos et al. 2003), however, in 1 month-old diabetic rats, the lipoperoxidation in liver mitochondria seems not to be significant. This leads to another question: If lipoperoxidation in liver mitochondrial membranes of diabetic rats is not increased, why is the RC higher than in normal rats? The answer seems to be directly related to the increased membrane fluidity in liver mitochondria of diabetic rats. Due to the relevance of membrane for the respiratory process, we analyzed the fluidity of mitochondrial membranes using three different fluorescent monitors at different depths inside the membrane. The DPH is located mainly at the core of the bilayer, TMA-DPH close to the polar region of the bilayer, and DPyP in an intermediate region between the two former monitors. Making measurements at a single temperature, for example at room temperature (20 °C), DPH and DPyP indicate that liver mitochondrial membrane fluidity is higher in diabetic rats than in control rats. At 20 °C TMA-DPH does not detect statistical differences between groups, which means that at the interphase, both membranes are the same and the biggest changes take place in the core and intermediate regions of the membrane. However, measurements at a high temperature (55 °C) shows that only DPyP and TMA-DPH detect differences, but not DPH, which means that the core of the bilayer is similar in control and diabetic rats, but

not the polar and the intermediate regions of the bilayer, demonstrating the differential effects of temperature on biological membranes. The thermotropic analysis of liver mitochondrial membranes with the three monitors reveals several characteristics of these membranes and the effect of diabetes on them, specially the fact that mitochondrial membrane fluidity is higher in diabetic rats, as reflected by the lower activation energies calculated. Apparently, the most affected region was the intermediate because DPyP detected differences between diabetics and controls at almost all temperatures, or maybe DPyP is more sensitive than the other two monitors. It is known that DPyP is sensitive to the lipid/protein molar ratio (Almeida et al. 1982) and proteins are so abundant in mitochondrial membranes that could be regulating membrane fluidity. In fact, even when some researchers consider that membrane properties are mainly under control of their proteins (Rossy et al. 2014), the measurement of DPyP are consistent with the fatty acids composition detected here. The core was mainly affected at low temperatures as reported by DPH, and the polar region at high temperatures according to TMA-DPH (Fig. 7). These results show the gradient of membrane fluidities displayed in mitochondria and the effects of diabetes on them.

Another interesting characteristic of membranes was the PTT obtained in these membranes. At the intermediate region of the bilayer DPyP detected that the PTT decreased from 45.3 ± 1.43 to 37.6 ± 1.52 due to diabetes, DPH did not detect any change in PTT at the core (45.4 ± 1.42 vs 45.2 ± 1.61) and TMA-DPH was not able to detect a PTT at all at the interphase, which clearly shows that mitochondrial membranes were affected differentially depending of the depth of the bilayer. A similar decrease in the gel to liquid-crystal transition was reported in placental mitochondria of diabetic rats with mild hyperglycemia (Figuerola-García et al. 2015).

In order to investigate the origin of the membrane fluidity of these mitochondrial membranes, we analyzed their fatty acids composition. In Table 2 it is shown that diabetes generated several changes in the fatty acids composition of the liver mitochondrial membranes, especially increasing the proportion of unsaturated fatty acids and decreasing the saturated fatty acids as reflected in the U/S ratio that changed from 1.36 ± 0.12 to 1.67 ± 0.04 . This explains the increase in the membrane fluidity observed by the fluorescent probes DPyP, DPH and TMA-DPH. It is generally accepted that diabetes decrease membrane fluidity (Pilon 2016), but here we have shown the contrary effect which is perfectly coherent between the physical and the chemical parameter, and together seems to explain the increase in the RC in mitochondria of diabetic rats. Other researches also have found an increase of membrane fluidity but a decrease of the RC (Figuerola-García et al. 2015; Waczulikova et al. 2007), but the main difference is the free radicals formed in their models. Despite the fact that both models are of short time exposure to hyperglycemia

(Waczulikova et al. 2007) or mild hyperglycemia (Figuerola-García et al. 2015), the free radical formed are higher than in controls. Here, we found no difference in lipoperoxidation between diabetics and controls and because of that, it is likely that the increase in membrane fluidity is increasing the RC and still is not affected by free radicals.

Another remarkable fact about the fatty acids composition of the mitochondrial membrane is that whereas the diabetes induced an increase in the U/S ratio and consequently in the membrane fluidity too, in the fatty acids composition of the whole liver, the U/S ratio decreased from 1.64 ± 0.14 in control rats to 0.81 ± 0.23 in diabetic rats. This means that the fatty acids composition of the liver in diabetic rats behaves as expected according to Pilon (2016), but mitochondria, at least until this point, does not. How is it possible that liver and their mitochondria are reacting to diabetes in contrary ways as to have different fatty acids compositions? It has been postulated that mitochondria phospholipids are imported from the Endoplasmic Reticulum (ER) through contact points (Fagone and Jackowski 2009; Mejia and Hatch 2016), specifically known as the mitochondrium associated membrane (Fagone and Jackowski 2009). Such disposition implies that any change in phospholipid composition in mitochondria comes from the ER and consequently the fatty acids composition too. However, little is known about the regulation of the fatty acids composition in the mitochondria despite several interesting and very good reviews about phospholipids in mitochondria (Hall et al. 2016; Mejia and Hatch 2016; Patwardham et al. 2016). Another possibility is that mitochondria, due to its bacterial origin, at the beginning of the damage responds by modifying its fatty acids composition just the way bacteria respond to an exposure to cold temperatures (Shivaji and Prakash 2010) but that means the existence of a mechanism not yet described in mitochondria. Previously, working with placental mitochondria in a model of mild hyperglycemia the same phenomenon was found (Figuerola-García et al. 2015), i.e. whereas mitochondria increase U/S ratio, total tissue lipids decrease the U/S ratio. It is likely that the changes in mitochondrial fatty acids composition are not only intended to increase the membrane fluidity, but also to improve the respiration; it has been suggested that the fatty acids composition of cardiolipin modulates the mitochondrial function by modulating the electron entry point in the respiratory chain (Vergeade et al. 2016).

In summary, in this study we found in the early stages of hyperglycemia development, before amelioration of mitochondria by lipotoxicity and lipoperoxidation, that mitochondrial membrane fluidity increases due to an increase in the U/S fatty acids ratio and this physicochemical changes leads to a higher RC. The former means that the amelioration in mitochondrial function in diabetes is mainly derived from free radical formation. In addition, we have shown that diabetes generates differential effects at different depths inside the

mitochondrial membrane and that more studies needs to be done in order to thoroughly understand the mechanisms for regulating fatty acids composition in mitochondria.

Acknowledgements We thank the financial support for this project from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT IN 316314 to RMZ. Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM). We also thank to the Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the fellowship 23381 to HPH.

Compliance with ethical standards

Competing interests The authors have declared that no competing interests exist.

References

- Almida LM, Vaz WL, Zachariasse KA, Madeira VM (1982) Fluidity of sarcoplasmic reticulum membranes investigated with diisocyanopropane, an intramolecular excimer probe. *Biochemistry* 21:597–597
- Ames GF (1968) Lipids of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: structure and metabolism. *J Bacteriol* 95:833–843
- Bligh L, Dyer W (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys* 37:911–917
- Braceford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Costa J, Borges M, David C, Vaz-Carneiro A (2006) Efficacy of lipid lowering drug treatment for diabetic and non-diabetic patients: meta-analysis of randomized controlled trials. *BMI* 33(7580): 1115–1124. doi:10.1136/bmj.38793.468449.AB
- Damascano DC, Sanzato YK, Dueno A, Netto AO, Dallaqua B, Gallego FQ, Jessi IL, Corvino SB, Seriano RG, Marini G, Picolo F, Calderon IMP, Rudge F (2013) Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. 2013:473575. doi:10.1155/2013/473575
- Dey A, Swaminathar K (2010) Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sci* 87(7–8):197–214. doi:10.1016/j.lfs.2010.06.007
- Figone P, Jackowski S (2009) Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res* 50(Suppl):S311–S316. doi:10.1194/jlr.R800049-JLR200
- Figueroa-García MC, Espinosa-García MI, Martínez-Montes I, Palomar-Morales M, Mejía-Zepeda R (2015) Even a chronic mild hyperglycemia affects membrane fluidity and lipoperoxidation in placental mitochondria in Wistar rats. *PLoS One* 10(12):1–15. doi:10.1371/journal.pone.0143778
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
- Hall ED, Wang JA, Bosken JM, Singh IN (2016) Lipid peroxidation in brain or spinal cord mitochondria after injury. *J Bioenerg Biomembr* 48(2):169–174. doi:10.1007/s10863-015-9600-5
- IDF Diabetes Atlas (2015) International Diabetes Federation, 7th edn.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(2):112–124. doi:10.1038/nrm2330
- Mejía EM, Hach GM (2016) Mitochondrial phospholipids: role in mitochondrial function. *J Bioenerg Biomembr* 48(2):99–113. doi:10.1007/s10863-015-9601-4
- Morrison WR, Smith LM (1964) Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res* 5:600–608
- Narain L, Vignini A, Raffaelli F, Moroni C, Silvestrini M, Provinciali L, Mazanti L (2008) Platelet membrane fluidity and Na⁺/K⁺ ATPase activity in acute stroke. *Brain Res* 1205:21–26. doi:10.1016/j.brainres.2008.02.005
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358
- Patil MA, Suryanarayana P, Partha UK, Srinivas M, Raddy GB (2014) Evaluation of neonatal streptozotocin induced diabetic rat model for the development of cataract. *Oxidative Med Cell Longev* 2014: 463264. doi:10.1155/2014/463264
- Patwardhan GA, Beverly LJ, Siskind LJ (2016) Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 48(2):153–168. doi:10.1007/s10863-015-9600-3
- Pérez-Hernández IH, Averdaño-Flores YS, Mejía-Zepeda R (2010) Analysis of the membrane fluidity of erythrocyte ghosts in diabetic, spontaneously hypertensive rats. *Acta Diabetol* 47(Suppl 1):S47–S55. doi:10.1007/s00592-009-0120-9
- Pilon M (2016) Revisiting the membrane-centric view of diabetes. *Lipids Health Dis* 15(1):167. doi:10.1186/s12944-016-0342-0
- Pouha B, Picon L, Rosselin G (1979) Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 17: 371–377
- Raza H, Praba SK, John A, Avadhani NG (2011) Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci* 12(5): 3131–3147. doi:10.3390/ijms12053133
- Robertson RP, Harmon JS (2006) Diabetes, glucose toxicity, and oxidative stress: a case of double jeopardy for the pancreatic islet β cell. *Free Radic Biol Med* 41(2):177–184. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.04.036
- Rolo AP, Palmeira CM (2006) Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 212:167–178. doi:10.1016/j.taap.2006.01.003
- Rossy J, Ma Y, Gaus K (2014) The organization of the cell membrane: do proteins rule lipids? *Curr Opin Chem Biol* 20:54–59. doi:10.1016/j.cobpa.2014.04.009
- Santos DL, Palmeira CM, Sziça R, Dias J, Mesquita J, Monteiro AJ, Santos MS (2003) Diabetes and mitochondrial oxidative stress: a study using heart mitochondria from the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Mol Cell Biochem* 246(1–2):165–170
- Shivaji S, Prakash JSS (2010) How do bacteria sense and respond to low temperature? *Arch Microbiol* 192:85–95. doi:10.1007/s00203-009-0539-y
- Vogelzang A, Bertram CC, Bikiriyeva AT, Zaacke WF, Zinkel SS, May JM, Dikalov SI, Roberts LJ, Boutaud O (2016) Cardiolipin fatty acid remodeling regulates mitochondrial function by modifying the electron entry point in the respiratory chain. *Mitochondrion* 28:88–95. doi:10.1016/j.mito.2016.04.007
- Wazulikova I, Habodaszova D, Cagalinec M, Ferko M, Uljana O, Mateasik A, Sitarova L, Ziegelhoffer A (2007) Mitochondrial membrane fluidity, potential, and calcium transients in the myocardium from acute diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 85:372–381. doi:10.1139/Y07-035
- Warg RN, Bouwens L, Klöppel G (1994) Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. *Diabetologia* 37:1088–1096
- Wejces RNM (2012) Lipid composition of cell membranes and its relevance in type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 8:390–400