



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Efecto de los ácidos grasos ω -3 en un modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con diabetes mellitus tipo 2”

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE P A R A O B T E N E R E L T Í T U L O D E:
B I Ó L O G A

PRESENTA:

YESICA SUJEIL AVENDAÑO FLORES

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA



TLALNEPANTLA DE BAZ, EDO. DE MÉXICO

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

Para la realización de este proyecto se contó con apoyo del proyecto PAPIIT No. IN223506-3 UNAM, otorgado al Dr. Ricardo Mejía Zepeda. Asimismo, hubo apoyo parcial por parte del proyecto PAPCA 2006-2007 otorgado al Dr. Rafael Villalobos y a Ricardo Mejía, así como de PAPCA 2007-2008 a Ricardo Mejía.

*A mis padres
Elena y Antonio:*

Gracias por su amor, su apoyo, sus sacrificios, sus consejos y por todo lo que me han enseñado, sin ustedes habría sido imposible lograr esta meta. No tengo más palabras para expresarles mi agradecimiento, sin embargo todos mis éxitos siempre estarán dedicados a ustedes. ¡Los quiero mucho!

A mis hermanos:

Miguel, gracias por tus largas y enriquecedoras charlas, tus chistes, por la infinidad de consejos que me das y por ayudarme a ser una mejor persona.

Gracias Betty, por todo lo que hemos compartido, por tu apoyo, tus consejos y tus locuras. Por tener un niño tan tierno y latoso.

A mi sobrino Ari, por brindarme muchos momentos de felicidad y por enseñarme a trabajar mi tolerancia ☺.

A mis abuelitos:

Margarita[†] y Eduardo[†], por sus enseñanzas y sus consejos. Gracias abuelita, por tu amor, tu apoyo y por todos los sacrificios que hiciste para que nada nos faltara. ¡Siempre estarás en mi corazón!

María y Alfonso, por su cariño y apoyo. Gracias abuelita por impulsarme a ser una buena estudiante y por ayudarme con las matemáticas.

A mis amigas:

Diana y Ana, por todo el tiempo compartido, por nuestras aventuras, nuestras tonterías, porque sé que cuento con ustedes en todo momento, por escucharme y aconsejarme, por darme todo su apoyo, su cariño y por ser parte fundamental de mi vida. ¡Las quiero mucho!

A Alma, porque has sido tú la que ha tenido que soportarme en muchos momentos tristes, difíciles, ridículos y felices de mi vida. Por nuestras tonterías y por esas interminables charlas abstractas que me provocan migraña. Gracias también por todos tus consejos, tus reaos y por el tiempo que hemos compartido.

A Guaipy, por ser mi amiga a pesar de ser tan diferentes. Por escucharme, aconsejarme y brindarme tu apoyo. Por todos los momentos divertidos.

A Lety Lozano, gracias! Porque eres parte de la familia, porque hemos vivido sucesos difíciles pero también momentos muy divertidos. Por todo tu apoyo.

Le agradezco también, a mi director de tesis Ricardo Mejía. Por asesorarme y por el apoyo que me brindó. Porque compartimos momentos divertidos y complicados, por todas las tonterías dichas, los chistes y los instantes en que parecía no soportarme, gracias por su paciencia y también por algunas discusiones que enriquecieron mi experiencia en el laboratorio. ¡Gracias por todo!

A mis compañeros de laboratorio:

*Gracias Isma, por escucharme, apoyarme y darme valiosos consejos,
Por que siempre estuviste dispuesto a resolver mis dudas y a ayudarme.
Por todo.*

Gracias Riiiiita, por tu ayuda y porque convivir contigo fue una experiencia divertida y enriquecedora.

A todos con los que compartí tiempo y espacio, gracias por hacer agradable mi estancia en el laboratorio: Fer, por las divertidas pláticas, Carmen, Emmanuel, Martha, Jaime, Raquel, Reynaldo, Leo.

*A Laura Vera, gracias por acercarte a mí, por darme excelentes consejos y escucharme.
Por el apoyo que me diste siempre.*

También agradezco enormemente a las personas que contribuyeron en esta tesis, sin las cuales no habría sido posible concluiría: Consuelo Figueroa, Gudelia, Fernanda Torres, Dra. Norma Laura Delgado, Dr. Maximiliano Ibarra y al Dr. Juan Carlos del Río García.

Asimismo, le agradezco a la UNAM por darme la oportunidad de convertirme en universitaria y también a mi querida Facultad, la FES Iztacala, por ser mi segundo hogar durante varios años.

¡¡¡Orgullosamente UNAM y orgullosamente Iztacalteca!!!

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS	7
2. RESUMEN	8
3. INTRODUCCIÓN	10
3.1 Obesidad	12
3.2 Síndrome metabólico	14
3.3 Fructosa	15
3.4 Diabetes	19
3.5 Hipertensión arterial	22
3.6 Ácidos grasos y eicosanoides	24
3.7 Modelo de hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2	25
4. ANTECEDENTES	27
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVO GENERAL	29
6.1 Objetivos particulares	29
7. MATERIALES Y MÉTODOS	30
7.1 Reactivos	30
7.2 Modelos experimentales	30
7.3 Dietas experimentales	31
7.4 Manejo de los animales	32
7.5 Mediciones bioquímicas en suero	34
7.6 Mediciones bioquímicas en órganos	35
7.7 Aislamiento de lípidos en hígado y riñón	36
7.8 Transesterificación de ácidos grasos	37
7.9 Análisis por cromatografía de gases	37
7.10 Histología	38
7.11 Análisis estadístico	39
8. RESULTADOS	41
8.1 Modelos de inducción de diabetes mellitus tipo 2	41

8.2 Efecto de la estreptozotocina (50 mg/kg) en SHR	47
8.3 Efecto de los ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA) en SHR y SHR-STZ 50 ...	58
8.4 Efecto de la dieta hipercalórica (DHC) y de los ácidos grasos ω -3 en SHR y SHR-STZ 50	71
8.5 Análisis histopatológico	90
9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN	96
9.1 Modelos de DM2 en SHR	96
9.2 Efectos sobre los niveles de glucosa	100
9.3 Efectos sobre la presión arterial	102
9.4 Efectos sobre el metabolismo de lípidos	106
9.5 Efectos sobre la composición de ácidos grasos	112
9.6 Histopatología	116
10. CONCLUSIONES	118
ANEXO 1	120
ANEXO 2	122
ANEXO 3	124
ANEXO 4	128
ANEXO 5	137
REFERENCIAS CITADAS	146

1. ABREVIATURAS

20-HETE *	Ácido 20-hidroxieicosatetraenóico
AA	Ácido araquidónico
DHA *	Ácido docosahexaenóico
EPA *	Ácido eicosapentaenóico
GLA *	Ácido gama-linoléico
AL	Ácido linoléico
CLA *	Ácido linoléico conjugado
ALN	Ácido linolénico
EDPs *	Ácidos epoxidocosapentaenóicos
EETs *	Ácidos epoxieicosatrienóicos
AG	Ácidos grasos
ω -3	Ácidos grasos de la serie omega 3
ω -6	Ácidos grasos de la serie omega 6
AGL	Ácidos grasos libres
AGPIs	Ácidos grasos poliinsaturados
BSA *	Albúmina de suero bovino
WKY	Cepa Wistar Kyoto
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CYP450 *	Citocromo P450
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DHC	Dieta hipercalórica
STZ *	Estreptozotocina
G3P *	Glicerol-3-fosfato
GLUT	Glucotransportador
HI	Hiperinsulinemia
HTA	Hipertensión arterial
LT	Leucotrienos
LOx	Lipooxigenasa
HDL *	Lipoproteína de alta densidad
LDL *	Lipoproteína de baja densidad
VLDL *	Lipoproteína de muy baja densidad
LPL	Lipoproteína lipasa
LRT	Lipoproteína rica en triglicéridos
Lx	Lipoxina
PTT	Pancreatectomía
PA	Presión arterial
PGIs	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
CETP *	Proteína de transferencia de ésteres de colesterol
SHR *	Ratas espontáneamente hipertensas
PPAR *	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
RI	Resistencia a la insulina
SM	Síndrome metabólico
TG	Triglicéridos
TX	Tromboxanos

* (por sus siglas en inglés)

2. RESUMEN

La creciente incidencia de obesidad ha aumentado de manera importante la prevalencia de otras enfermedades como la diabetes mellitus tipo 2 y la hipertensión arterial. En México, la diabetes mellitus está considerada como la primera causa de muerte, y se sabe que esta enfermedad aumenta aproximadamente un 70% la prevalencia de hipertensión. Debido a la incidencia de estas enfermedades y a sus consecuencias en la esperanza y calidad de vida de la población, es necesario el avance en investigaciones que contribuyan a prevenir estos trastornos y a disminuir su prevalencia. Se ha sugerido que el uso de ácidos grasos poliinsaturados, principalmente los de la serie omega 3, pueden tener un efecto benéfico sobre el control de la diabetes mellitus, además de favorecer la producción de eicosanoides con menor actividad vasoconstrictora.

Con la finalidad de estudiar un modelo de hiperglicemia ligera durante 8 meses, en este trabajo se probaron 3 modelos de diabetes mellitus tipo 2 en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), de los cuales, se eligió la dosis de 50 mg/kg de estreptozotocina (STZ) aplicada a neonatos de 48 hrs., por inducir hiperglicemia ligera sin ocasionar una pérdida importante de la población, logrando darles seguimiento por un tiempo largo (8 meses). A partir de este modelo, se obtuvieron 4 grupos diabéticos, de los cuales, uno se mantuvo con dieta estándar; otro recibió un suplemento de ácidos grasos ω -3 (cuatro veces por semana); otro fue alimentado con una dieta hipercalórica (DHC), conformada por manteca y fructosa; mientras que el cuarto recibió la dieta hipercalórica más el suplemento de ω -3. También se mantuvieron 4 grupos de SHR no diabéticos con las dietas ya mencionadas. A todos los grupos se les midió la glucosa y la presión arterial semanalmente y el peso corporal fue medido 3 veces por semana. Los grupos fueron mantenidos durante 8 meses. Al final de este periodo, las ratas fueron sacrificadas; se llevaron a cabo mediciones de proteína, triglicéridos y colesterol en suero, hígado y riñón. También se analizó la composición de ácidos grasos y se realizó el análisis histológico de hígado y riñón.

Los datos obtenidos permiten concluir que la dosis de 50 mg/kg de STZ produjo una hiperglicemia ligera (~140 mg/dl) con grandes oscilaciones, lo cual mostró el descontrole de la glicemia en estos animales. Esta hiperglicemia no produjo cambios importantes en el

contenido de triglicéridos y colesterol en suero, hígado y riñón, así como tampoco en la composición de ácidos grasos. Sin embargo, sí causó una pérdida importante de proteína en suero, hígado y riñón, sugiriéndonos la activación de la gluconeogénesis estimulada por la disminución de la cantidad de insulina. Por otra parte, las SHR diabéticas con suplemento de ácidos grasos ω -3 mantuvieron la glucosa normal durante todo el estudio, quizá debido a la activación de PPAR- γ , el cual promueve la síntesis de insulina. Las SHR con suplemento de ω -3, presentaron una reducción en la presión arterial sistólica, esto puede ser atribuido a varios mecanismos, como la formación de eicosanoides con actividad vasodilatadora, incremento de un índice de fluidez membranal, formación de productos derivados de la epoxigenasa (vasodilatadores) a partir de los ácidos araquidónico (AA) o docosahexaenóico (DHA), entre otros. En lo que respecta a los ácidos grasos, las SHR y SHR diabéticas suplementadas con ω -3, tuvieron una mayor proporción de ácidos grasos insaturados en hígado y riñón. El suplemento de ω -3 disminuyó los niveles de triglicéridos y colesterol en suero de SHR con DHC, quizá por su conocida acción como ligandos de PPAR- α , el cual promueve el catabolismo de lípidos. En el grupo STZ-DHC la glicemia fue menor que el grupo STZ. En las SHR, la DHC no modificó la glicemia pero sí indujo cambios importantes en la composición de ácidos grasos de riñón. La DHC promovió una degeneración grasa moderada en hígado de SHR y SHR diabéticas, esto, estimulado por el exceso de grasas de la DHC y por la acción lipogénica de la fructosa. El análisis histológico mostró que la combinación de hipertensión y diabetes produjo un daño renal moderado en las SHR, no obstante, el suplemento de ω -3 protegió la estructura renal del daño provocado por estas enfermedades.

3. INTRODUCCIÓN

A partir de la primera mitad del siglo XX ocurrió una transición demográfica reflejada en una creciente urbanización, la cual ha conllevado modificaciones en el estilo de vida de las personas. Estas modificaciones han traído consigo la incidencia de muchas enfermedades entre las que destaca la obesidad, que actualmente está alcanzado proporciones epidémicas en algunos países y ha llegado a ser considerada como pandemia por afectar a personas de los cinco continentes (Villa *et al.*, 2004).

Aunque la obesidad se consideraba un problema exclusivo de los países de altos ingresos, actualmente también ha aumentado en los países de ingresos bajos y medios, sobretodo en el medio urbano (OMS, 2006a).

Los factores que se atribuyen al desarrollo de la obesidad son principalmente la modificación mundial de la dieta, impulsada por una nueva industria alimentaria que promueve la tendencia hacia alimentos hipercalóricos, ricos en grasas saturadas y azúcares pero con escasas vitaminas, minerales y otros micronutrientes, y la disminución de la actividad física o sedentarización, debida a los cambios en los medios de transporte y al constante crecimiento urbano (OMS, 2006a).

La obesidad se considera un factor desencadenante de otras patologías graves entre las que se encuentran la resistencia a la insulina (RI) y la hiperinsulinemia (HI), fenómenos a los cuales se les atribuye el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y la hipertensión arterial (HTA) en individuos obesos (Bastos *et al.*, 2005).

Tanto la obesidad, la DM2, la HTA, la RI y la HI, entre otros factores, han sido considerados en conjunto como parte del síndrome metabólico (SM), que se ha extendido rápidamente entre la población con un impacto negativo en la esperanza y la calidad de vida de las personas (Martínez *et al.*, 2003). El implemento de rutinas de ejercicio y especialmente de un manejo dietario adecuado, son métodos para mejorar la condición de las personas con SM o para prevenir su desarrollo (Bastos *et al.*, 2005).

En apoyo a lo anterior, en la última década se amplió el uso de la fructosa como endulzante habitual debido a la idea de que contenía un menor número de calorías y no incrementaba los niveles de glucosa sanguínea en los pacientes diabéticos que la consumían, sin embargo, se ha demostrado que el consumo excesivo o constante de fructosa tiene efectos secundarios perjudiciales que analizaremos más adelante (Elliott *et al.*, 2002).

Por otra parte, en varios estudios se ha sugerido que el uso de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), primordialmente los de la serie omega 3 (ω -3), pueden, entre otras cosas, mejorar la sensibilidad a la insulina, aumentar la oxidación de ácidos grasos y favorecer la producción de eicosanoides con menor actividad vasoconstrictora. El avance en las investigaciones con respecto a este tema, podría llevarnos a la prevención o disminución de la prevalencia de enfermedades como la obesidad, la DM2 y la HTA (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005).

3.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad multifactorial caracterizada por acumulación excesiva de tejido adiposo en el organismo, resultado de un desequilibrio permanente y prolongado entre la ingestión de alimentos y el gasto energético (Bastos *et al.*, 2005).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2005 había al menos 400 millones de adultos con obesidad y se calcula que en el 2015, la cifra alcanzará los 700 millones; esto nos hace ver que la obesidad se ha convertido en un problema de salud pública a escala mundial que ya no sólo abarca a la población adulta, ya que los resultados también indicaron que en el 2005 había al menos 20 millones de niños menores de 5 años con sobrepeso (OMS, 2006a).

Hay varios factores que en conjunto influyen en la acumulación acentuada de tejido adiposo, entre ellos se encuentran: el factor genético, que puede influir en la distribución de la grasa corporal y en el aumento de peso en respuesta a la ingesta excesiva de alimentos; el factor nutricional, en el que se considera el consumo de dietas hipercalóricas, el tamaño de las raciones y el número de comidas realizadas al día; y la inactividad, que implica una combustión insuficiente de las calorías ingeridas con la dieta, que a su vez se almacenarán en forma de tejido graso (Bastos *et al.*, 2005).

En las personas obesas se ha identificado un trastorno que está relacionado con el desarrollo de otras enfermedades, la resistencia a la insulina.

3.1.1 Resistencia a la insulina

La insulina es una hormona producida, almacenada y secretada por las células β del páncreas, consta de dos cadenas de polipéptidos unidas por dos puentes disulfuro y juega un importante papel a nivel metabólico (Voet y Voet, 1992). Sus principales efectos son:

- Estímulo de la captación de glucosa, mediante el favorecimiento de la traslocación de los glucotransportadores GLUT4 a la membrana plasmática en músculo y tejido adiposo.

- Estímulo de la síntesis de glucógeno e inhibición de su degradación en hígado y músculo.
- Estímulo del metabolismo oxidativo de la glucosa (glucólisis).
- Inhibición de la gluconeogénesis hepática.
- Estímulo de la captación y almacenamiento de grasas por el tejido adiposo.
- Inhibición de la lipólisis en tejido adiposo (Mendivil y Sierra, 2005).

La RI es la disminución de la capacidad de la insulina para producir sus efectos en presencia de las concentraciones plasmáticas que son efectivas en sujetos sanos (Fernández-Mejía, 2001).

Los individuos obesos tienen un mayor porcentaje de tejido adiposo y por ende, una mayor cantidad de ácidos grasos libres (AGL). El aumento de los AGL, eleva su captación y oxidación, usándose éstos como fuente de energía en los distintos tejidos en competencia con la glucosa. Además, los AGL reducen la afinidad insulina-receptor, disminuyendo la acción de la insulina en los tejidos insulinosensibles; favoreciendo así la RI (Durruty y García de los Ríos, 2001).

Un mecanismo propuesto para explicar la RI en la obesidad, es que el incremento en el depósito de grasa en el tejido adiposo disminuye la reesterificación de AGL, favoreciendo un aumento en el nivel sérico de los mismos; la exposición crónica a niveles de AGL puede inhibir la secreción de insulina debido a que el aumento de la β -oxidación incrementa las concentraciones intracelulares de acetil CoA y citrato, lo que lleva a la inhibición de la fosfofructoquinasa y la glucólisis subsecuente. Los incrementos en las concentraciones de ácidos grasos en plasma inicialmente inducen RI por inhibición del transporte de glucosa o la actividad de la fosforilación, seguida de la reducción de la síntesis de glucógeno en músculo y la oxidación de glucosa (Randle *et al.*, 1963).

Otro posible mecanismo por el cual se produce RI está relacionado con la dieta, ya que se ha visto que el consumo excesivo de grasas saturadas induce RI al cambiar la composición de los fosfolípidos de las membranas celulares, al modificar las señales para la secreción de la hormona o al inhibir la síntesis de glucógeno (Storlien *et al.*, 1991).

Al disminuir la captación de glucosa se produce hiperglicemia; el exceso de glucosa hace que se incrementen los niveles de insulina provocando una hiperinsulinemia (HI) compensatoria. La HI crónica disminuye el número de receptores a la insulina en los órganos blanco, principalmente en los tejidos adiposo y muscular (González *et al.*, 1999).

La HI es un predictor del desarrollo de la diabetes en grupos con predisposición genética. Los sujetos obesos no diabéticos son insulino-resistentes, pero mantienen una tolerancia a la glucosa normal porque las células β del páncreas son capaces de compensar esa RI con un aumento de la secreción de insulina (Torres, 1999). La diabetes ocurre cuando las células β pancreáticas ya no son capaces de producir la cantidad suficiente de insulina para contrarrestar los efectos de la RI, y es en esta etapa, donde se hace evidente la hiperglicemia o elevación anormal de la glucosa de manera crónica (Fernández-Mejía, 2001).

Se ha demostrado que la hipertensión arterial y los niveles altos de insulina están positivamente correlacionados. La insulina podría actuar a través de varios mecanismos que a largo plazo produzcan un aumento en la presión arterial: A) aumentando la actividad del sistema nervioso simpático (SNS), B) produciendo retención renal de sodio, C) estimulando el transporte de sodio/hidrógeno en el músculo liso vascular, activando el factor de crecimiento, síntesis de colágena y acúmulo de lipoproteínas de baja densidad (LDL), con la subsecuente alteración de la función endotelial y D) favoreciendo la producción de endotelina-1, bloqueando la producción de óxido nítrico y aumentando la respuesta vasoconstrictora y mitogénica sobre el endotelio (Rodríguez, 2002; Torres, 1999).

3.2 Síndrome Metabólico

Es un conjunto de trastornos multifactoriales influenciados por un fuerte componente genético. Dicha predisposición genética está modulada por factores ambientales relacionados con los hábitos de vida como: la dieta rica en calorías y grasas saturadas, sedentarismo, consumo excesivo de alcohol y tabaquismo, entre otros (Martínez *et al.*, 2003).

Para que a un individuo se le diagnostique SM, es necesario que coexistan en él resistencia a la insulina más otros dos componentes de los enlistados (Figura 1).

El SM tiene un fuerte impacto en la calidad de vida de la población, es por eso que las medidas para prevenir y disminuir la RI están dirigidas principalmente a la prevención del SM y a las complicaciones de éste. Las bases de estas medidas de prevención, hasta el momento, continúan siendo las modificaciones en el estilo de vida como la disminución de peso, llevar una dieta equilibrada rica en fibras y con bajo contenido de grasas saturadas y la práctica regular de ejercicio aeróbico (González *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2003).

1. Diabetes mellitus tipo 2 o intolerancia a la glucosa.
 2. Hipertensión arterial primaria (TA \geq 140/90 mm Hg)
 3. Obesidad central (índice cintura cadera >0.90 en hombres, en mujeres > 0.85 y/o IMC ≥ 27 kg/m²).
 4. Dislipidemias: hipertrigliceridemia (≥ 200 mg/dL) y disminución de C-HDL (< 35 en hombres y < 45 mg/dL en mujeres).¹⁵
 5. Hiperinsulinemia.
 6. Hiperuricemia.
 7. Microalbuminuria (de 30 mg a 300 mg en orina/24 horas) o (20 μ g/minuto) o (albúmina/creatinina > 20 mg/g).
 8. Hiperfibrinogenemia.
 9. Aterosclerosis.
- Abreviaturas: IMC = Índice de masa corporal.
C-HDL = Colesterol de lipoproteínas de alta densidad.

Figura 1. Componentes del Síndrome Metabólico (González *et al.*, 1999).

3.3 Fructosa

Los pacientes con SM o las personas propensas a padecerlo, han buscado opciones para mejorar su alimentación y además de limitar su consumo de grasas saturadas han centrado su atención en la ingesta de carbohidratos. En las últimas décadas se reemplazó el uso de la sacarosa como endulzante habitual por la fructosa, ya sea de manera cristalina o como jarabe de maíz de alta fructosa (high-fructose corn syrup o HFSC, por sus siglas en inglés), debido a que se consideraba benéfico en el manejo dietario de pacientes con DM2 y RI, porque su ingesta provocaba sólo un ligero incremento del índice glicémico postprandial (Elliott *et al.*, 2002).

A raíz de esto, se acrecentó la producción de alimentos y bebidas endulzadas con fructosa, y de manera paralela, también la prevalencia de obesidad. Al profundizar en las investigaciones con respecto al metabolismo de la fructosa se ha observado que su consumo puede contribuir al aumento de peso y a las alteraciones metabólicas que éste conlleva. Estos efectos vienen dados por la diferencia entre el metabolismo de la fructosa y el de la glucosa (Elliott *et al.*, 2002).

3.3.1 Metabolismo de la fructosa

Se conocen dos vías para metabolizar la fructosa, una se lleva a cabo en el músculo y la otra en el hígado. El metabolismo de la fructosa en el músculo se diferencia poco del de la glucosa. La fructosa es fosforilada por una hexoquinasa produciendo fructosa-6-fosfato, por lo cual la incorporación de la fructosa a la glucólisis requiere sólo de una etapa (Figura 2) (Voet y Voet, 1992).

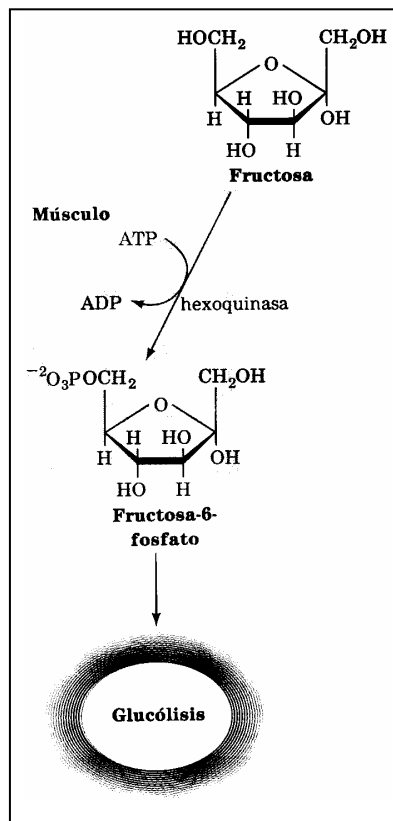


Figura 2. Metabolismo de la fructosa en músculo (Voet y Voet,1992).

Por otra parte, el hígado transforma la fructosa en intermediarios glicolíticos por una vía que involucra tres enzimas particulares. En el hígado, la fructosa entra a través de GLUT5 y es rápidamente fosforilada por ATP para formar fructosa-1-fosfato, catalizada por la enzima fructoquinasa. Después, la fructosa-1-fosfato es cortada por una aldolasa B, en gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato. La tercera enzima en la vía de la fructosa es la triokinasa, la cual cataliza la reacción de gliceraldehído con ATP, para formar gliceraldehído-3-fosfato (Figura 3) (Mayes, 1993).

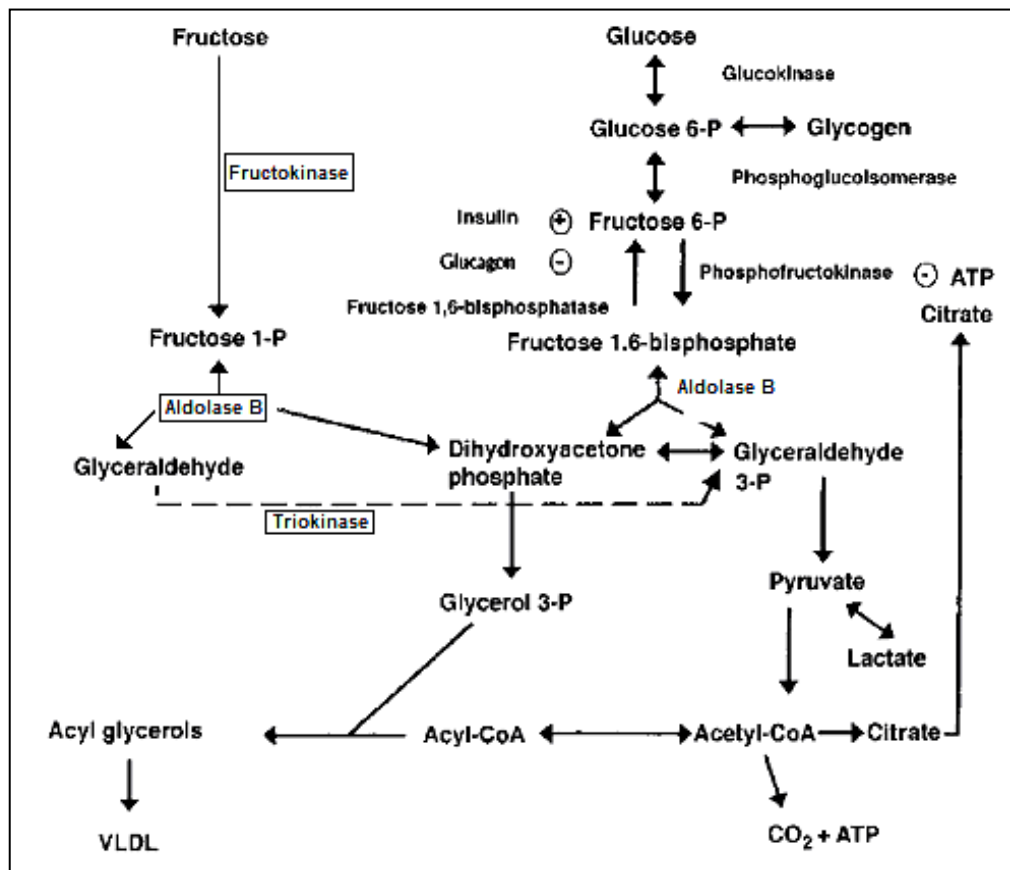


Figura 3. Metabolismo hepático de la glucosa y la fructosa (Elliott, 2002).

Las vías metabólicas de la glucosa y la fructosa convergen al nivel de la triosa fosfato y a partir de este punto, sus metabolismos son relativamente similares, sin embargo, es importante recalcar que la fructosa llegó a este nivel metabólico sin pasar por el principal punto de control de la glucólisis (Mayes, 1993). Si recordamos, el metabolismo de la glucosa es limitado por su capacidad de almacenarla en forma de glucógeno y de manera más

importante, por el control de la glucólisis por medio de citrato y ATP que inhiben la fosfofructoquinasa (Elliott *et al.*, 2002).

Por consiguiente, la ingesta excesiva o crónica de fructosa deriva en la producción de cantidades no reguladas de glicerol-3-fosfato y acetil-CoA (Elliott *et al.*, 2002). El glicerol-3-fosfato es el cosustrato para la esterificación de cadenas largas de acil-CoA para la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos, mientras que el acetil-CoA es el principal recurso de carbono para la lipogénesis. Primero el acetil-CoA es transportado hacia la membrana mitocondrial en forma de citrato, luego es reconvertido en el citosol, y finalmente, es convertido a ácidos grasos de cadena larga por medio de la vía del malonil-CoA. En consecuencia, la fructosa es más lipogénica que la glucosa, efecto que podría ser acrecentado en individuos con hiperlipidemia, RI o DM2 (Mayes, 1993).

Teff *et al.* (2004) reportan que la fructosa no estimula la producción de insulina en las células β pancreáticas (debido posiblemente a la baja concentración de GLUT5 en estas células) ni de leptina (ya que su secreción es estimulada por insulina). Ambas son hormonas clave involucradas en la regulación a largo plazo de la ingesta de alimento y el gasto energético. Sin embargo, otros autores han reportado que la fructosa puede entrar a las células β a través de GLUT2 (Díaz y Burgos, 2002).

3.3.2 Ingesta de fructosa, ganancia de peso y resistencia a la insulina

Una de las razones que impulsó la ingesta de la fructosa es que ésta no estimula la secreción de insulina (Elliott *et al.*, 2002). Gracias a los conocidos efectos de la insulina para estimular la síntesis de lípidos y promover el almacenamiento de grasas, es que se originó la idea de que la pérdida de peso sería incrementada si se evitaban alimentos que no provocaran síntesis de insulina. Sin embargo, la insulina está involucrada en la regulación de la adiposidad corporal actuando sobre el sistema nervioso central (SNC) para inhibir la ingesta de alimento e incrementar el gasto de energía. De manera paralela, al no haber secreción de leptina, aumenta la sensación de hambre, la hiperfagia y el acúmulo de grasas (Elliott *et al.*, 2002).

Así, el consumo prolongado de dietas altas en fructosa puede contribuir a la ganancia de peso y al aumento de ácidos grasos no esterificados. Además, la exposición a concentraciones elevadas de ácidos grasos no esterificados reduce la sensibilidad a la insulina e incrementa la producción hepática de glucosa, lo que conduce a la RI y a largo plazo, puede producir efectos deletéreos en la célula β pancreática (Elliott *et al.*, 2002).

3.4 Diabetes Mellitus

La diabetes mellitus (DM) es un síndrome resultante de la predisposición genética y la interacción con factores ambientales; se caracteriza principalmente por una concentración anormalmente elevada de glucosa en la sangre y por alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, los cuales son causados por una deficiencia relativa o absoluta de la secreción de insulina y diferentes grados de resistencia a la misma. Las manifestaciones clínicas clásicas de la DM son poliuria, polidipsia y polifagia, que son consecuencia de la hiperglicemia. Las manifestaciones crónicas consisten en daños a varios órganos como los ojos (retinopatía con pérdida de la visión), riñones (nefropatía que conduce a falla renal), nervios (neuropatía periférica y autonómica), corazón y vasos sanguíneos (enfermedad cardiovascular, cerebrovascular y aterosclerosis periférica vascular) (Ríos y Rull, 1992; Belfiore e Iannello, 2000a).

La DM es la enfermedad endócrina más frecuente y está considerada entre las principales causas de muerte a nivel mundial, su prevalencia aumenta rápidamente. Según cálculos de la OMS, en el 2005 había 180 millones de personas con DM y ocurrieron 1.1 millones de muertes a causa de este padecimiento (OMS, 2006b).

En México, la DM es la primera causa de mortalidad. En el año 2000 se estimó que había aproximadamente 2,179,000 personas con este padecimiento y se calcula que dicha cifra se triplicará en el año 2030 (OMS, 2008).

3.4.1 Clasificación

En 1979, la OMS y el National Diabetes Data Group (NDDG) propusieron una clasificación de la DM que comprendía 5 categorías. Posteriormente, basada en esa

clasificación y de acuerdo al avance en las investigaciones sobre la diabetes, la American Diabetes Association (ADA) propuso en 1996 una clasificación diferente y estableció cuatro categorías: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2, otros tipos específicos de diabetes mellitus y diabetes mellitus gestacional, además de un quinto grupo de individuos con glicemias anormales: intolerancia a la glucosa y glicemia de ayunas alterada. Los tipos de DM más frecuentes comprenden las primeras dos categorías (Harris, 2003).

3.4.2 Diabetes mellitus tipo 1

Antes era conocida como diabetes juvenil o diabetes insulino dependiente. Es la forma más grave de DM y representa entre el 5 y 10% de los casos del síndrome diabético. Se presenta de manera más frecuente en niños y adolescentes, aunque puede iniciarse a cualquier edad. Es consecuencia de la destrucción de las células β con deficiencia absoluta de la secreción de insulina y tendencia a la cetosis. La acción de ciertos agentes ambientales sobre un individuo genéticamente susceptible genera una respuesta inflamatoria del páncreas denominada insulinitis y la modificación antigénica de las células β pancreáticas, como consecuencia se activa un proceso autoinmune que destruye progresivamente a estas células y reduce la reserva de insulina. Con el tiempo, las células β se pierden por completo. Para que ocurra la DM1 se requiere que la masa total de células β se reduzca en un 80 a 90% (Ríos y Rull, 1992).

Se distinguen dos subclases de DM1: autoinmunitaria e idiopática, la primera y más frecuente, se caracteriza por la destrucción autoinmunitaria de las células β pancreáticas, la otra subclase incluye casos en los que no se conoce la causa de la destrucción de las células β . Las personas con diabetes tipo 1 manifiestan los síntomas clásicos ligados con la hiperglicemia, además de pérdida de peso, fatiga y visión borrosa. Requieren de la administración de insulina exógena (Ríos y Rull, 1992).

3.4.3 Diabetes mellitus tipo 2

Se conocía como diabetes no insulino dependiente o diabetes del adulto. Es la forma más frecuente de DM pues representa entre el 90 y 95% de todos los casos, generalmente

se presenta después de los 40 años y su incidencia se incrementa con la edad. En algunos casos esta enfermedad puede acompañarse de hipertensión y dislipidemia (Ríos y Rull, 1992). Se caracteriza por dos defectos fisiológicos, la reducción en la secreción de insulina y la resistencia a la acción de la misma (Foster, 1994). El páncreas es incapaz de mantener una producción adecuada de insulina ante una demanda aumentada por disminución de la acción biológica de la hormona. Esta insensibilidad a la insulina afecta en diferentes grados al metabolismo de la glucosa y los lípidos, principalmente en los tejidos muscular, hepático y adiposo (Ríos y Rull, 1992). La hiperglicemia de la DM2 es consecuencia de uno o varios defectos genéticos no definidos y su expresión es modificada por factores ambientales. En una fase posterior, la hiperglicemia ejerce un efecto deletéreo sobre la producción de insulina, por un fenómeno denominado glucotoxicidad (Guerra *et al.*, 2005).

Los principales factores adquiridos que contribuyen al desarrollo de DM2 son aquellos que se asocian al aumento en la RI como obesidad, ingesta calórica excesiva, inactividad física, embarazo y edad avanzada (Foster, 1994).

3.4.4 Metabolismo de lípidos en la DM2

De manera general, las personas diabéticas con un buen control de la glucosa sanguínea tienen valores de colesterol total y triglicéridos en plasma dentro de los límites normales, sin embargo, estos valores se elevan en los pacientes con un pobre control glicémico. En estos pacientes también pueden ocurrir alteraciones cualitativas de las lipoproteínas como glicación, oxidación y peroxidación, así como anormalidades en su composición que consisten en lipoproteínas de baja densidad (LDL) más pequeñas y densas, y por ende, más aterogénicas. Aunado a esto, la hiperlipidemia a largo plazo puede ejercer efectos inhibitorios sobre la función de la célula β , fenómeno conocido como lipotoxicidad (Belfiore e Iannello, 2000b).

La hipertrigliceridemia se presenta en un 20 a 60% de los pacientes con DM2 y no siempre se corrige con un buen control de la glicemia. También se encuentran niveles bajos de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Un factor que contribuye a la elevación de los TG en la DM2 puede ser la incapacidad de la insulina para inhibir la liberación de

lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Aschner, 1992). En la DM2 existen dos anomalías que caracterizan el metabolismo de las VLDL: una tasa de producción aumentada de VLDL y una eliminación disminuida de las partículas ricas en TG. Esto ocurre porque la actividad enzimática de la lipasa de las lipoproteínas (LPL) suele ser inferior a lo normal en los pacientes con DM2 pues esta enzima es dependiente de insulina (Malmström *et al.*, 1999). El resultado es la reducción en el catabolismo de los quilomicrones y las VLDL, además éstas donan el exceso de TG a las HDL y adquieren ésteres de colesterol mediante la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), las HDL enriquecidas con TG se convierten en un buen sustrato para la lipasa hepática que remueve estos TG, reduce el tamaño de la lipoproteína, aumenta su densidad y facilita su depuración del plasma. Los niveles de HDL descienden en la medida que aumentan los TG, hecho que favorece la aterogénesis (Aschner, 1992). Así mismo, las HDL pueden experimentar glicación y oxidación, lo que provoca que pierdan su habilidad para captar el colesterol de los tejidos periféricos. La hipercolesterolemia en el diabético podría deberse también a un incremento de la síntesis de colesterol independiente de insulina, por el aumento de VLDL circulantes que aportan el 20% del colesterol total y por disminución del catabolismo de las LDL (Guerra *et al.*, 2005).

En pacientes con DM2 descompensada, la hipertrigliceridemia también se acompaña de alteraciones en las características de las LDL ya que presentan una composición anómala de las mismas y una preponderancia de LDL densas y pequeñas (Malmström *et al.*, 1999).

3.5 Hipertensión Arterial

Al ser la obesidad, la DM2 y la HTA, enfermedades tan frecuentes, no es raro que coincidan en un mismo individuo y aún más, que estén íntimamente relacionadas. Anteriormente ya abordamos el papel de la obesidad en el desarrollo de HTA. La DM2 también es un factor importante que aumenta aproximadamente un 70% la prevalencia de hipertensión, ya sea por las alteraciones en el metabolismo de la insulina o por el daño que causa la diabetes a nivel renal (Stern y Tuck, 2003).

La hipertensión se define como “presión arterial elevada” y se caracteriza por una presión sistólica mayor o igual a 140 mmHg en forma sostenida. Es una enfermedad asintomática que con frecuencia tiene complicaciones mortales si no se trata. Su prevalencia,

al igual que la DM2, aumenta con la edad y se presenta aproximadamente en una de cada 5 personas durante la madurez o la senectud, entre los 50 a 60 años (Guyton *et al.*, 1987). En México, la Encuesta Nacional de Salud realizada en el año 2000, reveló que en ese año había 15 millones de personas con HTA (Sepúlveda, 2000).

La presión arterial (PA) alta tiene efectos negativos sobre diferentes órganos como cerebro, corazón y riñón. Tiene una correlación positiva con el riesgo de accidente cerebrovascular isquémico y hemorrágico, propicia el aumento de trastornos cardiacos como la enfermedad coronaria aterosclerótica y la insuficiencia cardiaca y también aumenta el riesgo de insuficiencia renal (Sáez y Serarols, 2007).

La HTA se puede clasificar por sus causas en hipertensión primaria e hipertensión secundaria.

3.5.1 Hipertensión primaria o esencial

La HTA esencial es un trastorno poligénico y multifactorial. Aproximadamente el 95% de las personas hipertensas se consideran dentro de este grupo. El término "esencial" se refiere a que se desconoce el origen o la causa de la presión elevada (Guyton *et al.*, 1987). La dificultad para descubrir los mecanismos responsables de hipertensión en estos pacientes se atribuye a la variedad de sistemas implicados en la regulación de la presión arterial y a la complejidad de las interrelaciones de estos sistemas entre sí (Williams, 1994).

Aunque no se ha definido una causa para este tipo de hipertensión, sí se sabe que varios factores pueden influir en su desarrollo.

3.5.2 Factores genéticos

Durante mucho tiempo se ha propuesto que los factores genéticos son importantes en la génesis de este trastorno. Los antecedentes familiares de HTA son un claro factor de riesgo para padecerla. Se estima que la influencia genética en los valores de PA oscila entre el 20 y el 60% (Sáez y Serarols, 2007).

3.5.3 Factores ambientales

Entre los factores ambientales que influyen en los niveles de PA se distinguen las condiciones nutricionales, estilos de vida y factores psicosociales.

- Ingesta de sal. El contenido de sal en la alimentación es un factor significativo en la regulación de la PA. La prevalencia de HTA es muy baja en sociedades primitivas que tienen un escaso consumo de sal. Sin embargo, la respuesta de la PA a la ingesta de sal es variable y sólo es sensible al consumo de sal en un 40% aproximadamente.
- Vida sedentaria. El sedentarismo es un factor de riesgo para muchas enfermedades, el incremento en los niveles de actividad física regular reduce el riesgo de presentar HTA.
- Factores psicosociales. Se incluyen los estilos de vida y la exposición al estrés crónico, que podrían propiciar el aumento en la PA.
- Otros factores que podrían modificar la evolución de HTA son la edad, la raza, el género, el consumo de alcohol y tabaco, el peso corporal, etc. (Williams, 1994).

3.5.4 Hipertensión secundaria

En una minoría de pacientes con hipertensión se puede identificar una causa específica. La mayoría de los casos de HTA secundaria corresponden a enfermedades renales, parenquimatosas o de origen vascular o están relacionadas con una alteración de la secreción hormonal (Sáez y Serarols, 2007).

3.6 Ácidos grasos y producción de eicosanoides

Los ácidos grasos (AG) son componentes importantes de las membranas celulares. La composición de AG, fosfolípidos y el contenido de colesterol en la membrana pueden ser modificados, lo cual altera la fluidez membranal y esto puede afectar diversas funciones celulares como la producción de eicosanoides (Spector y Yorek, 1985).

Muchas reacciones fisiológicas y fisiopatológicas tales como alteraciones cardiovasculares, prevalencia de DM2, regulación de la presión arterial, trombosis, reacciones

inflamatorias y de hipersensibilidad, coagulación sanguínea y vasomotilidad, son moduladas por derivados oxigenados del Ácido Araquidónico (AA) y otros ácidos grasos poliinsaturados, principalmente del Ácido Eicosapentaenóico (EPA). Estos metabolitos son colectivamente llamados eicosanoides e incluyen a las prostaglandinas (PGE_2 , PGD_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$), prostaciclina (PGI_2), tromboxanos (TX), leucotrienos (LT), lipoxinas (Lx) y ácidos grasos hidroxilados (Covarrubias y Ortega, 2002).

El AA es convertido en eicosanoides de las series 2 y 4, que pueden participar en reacciones inflamatorias y alérgicas, generalmente son pro-inflamatorios, pro-agregatorios e inmunoreactivos. En cambio, el EPA inhibe la formación de TX de la serie 2 (vasoconstrictor y estimulador de la agregación plaquetaria) y es metabolizado hasta eicosanoides de las series 3 y 5, que son compuestos con actividades fisiológicas sustancialmente inferiores que los derivados del AA. El EPA compite con el AA por su incorporación en los fosfolípidos y también por el acceso a las enzimas que participan en la síntesis de eicosanoides. Una regulación no balanceada en la formación de eicosanoides es un elemento común a varios tipos de enfermedades, asociada a disturbios de la función de células o tejidos y que trae consigo la presencia de síntomas no deseados (Voet y Voet, 1992; Covarrubias y Ortega, 2002).

3.7 Modelo de HTA y DM2

Cepa SHR

Debido a la incidencia de las enfermedades que abordamos anteriormente y a sus graves consecuencias en la esperanza y calidad de vida de la población, es necesario el avance en investigaciones que contribuyan a prevenir estos trastornos y a disminuir su prevalencia. El empleo de animales de laboratorio representa una manera económica, sencilla, relativamente rápida y no menos confiable de llevar a cabo las investigaciones.

En este trabajo se empleó una cepa de ratas conocida como SHR (Spontaneously Hypertensive Rats), cuyo término significa "ratas espontáneamente hipertensas". La cepa SHR fue originada en 1963 a partir de una colonia de ratas Wistar Kyoto. Dentro de esta colonia encontraron un macho con hipertensión espontánea y una hembra con presión elevada, éstos fueron cruzados. Se continuó la cruce de individuos seleccionados con

hipertensión espontánea para obtener la cepa de ratas hipertensas. Estas ratas tienen una alta incidencia de hipertensión que aumenta con la edad, sin presentar lesiones orgánicas primarias en riñones o glándulas adrenales. Este modelo responde a drogas o tratamientos antihipertensivos, por lo cual su empleo resulta adecuado para la investigación de la HTA esencial (Okamoto y Aoki, 1969).

Debido a que la DM2 y la HTA con frecuencia ocurren simultáneamente, se requieren modelos animales en donde se presenten ambas patologías. En roedores, la diabetes puede ser inducida mediante fármacos como la Estreptozotocina (STZ); esta sustancia entra a las células β pancreáticas mediante GLUT2, una vez dentro, forma especies reactivas de oxígeno, las cuales causan daño al DNA y propician la muerte de las células β por apoptosis o necrosis (Szkudelski, 2001). La diabetes de tipo 2 se obtiene al inyectar la STZ en neonatos, los cuales aún tienen células indiferenciadas y/o con gran capacidad de regeneración, evitando la pérdida total de células β . El resultado son ratas con un menor número de células β y por consiguiente, con una secreción reducida de insulina (Iwase *et al.*, 1987).

4. ANTECEDENTES

En un estudio, Frenoux y colaboradores probaron una mezcla de ácidos grasos ω -3 EPA, DHA (Ácido Docosahexaenoico) y GLA (Ácido Gama-linolénico) en SHR y Wistar Kyoto (WKY) durante 10 semanas para determinar su efecto antihipertensivo. Al final del tratamiento, disminuyó la presión arterial de las SHR y se redujeron los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma en ambas cepas de ratas (Frenoux *et al.*, 2000).

Se ha propuesto que el DHA y el EPA funcionan como protectores cardiovasculares, ya que los eicosanoides formados a partir de EPA son menos potentes como derivados de inflamación que los del AA. Cuando se incrementa el consumo de EPA en la dieta, la actividad enzimática puede ser desviada competitivamente hacia el precursor que se encuentra en exceso, produciendo eicosanoides de las series 3 y 5 que tienen poca o nula potencia inflamatoria y son moduladores de la agregación plaquetaria (Covarrubias y Ortega, 2002). Hirafuji y colaboradores estudiaron el efecto de EPA y DHA como protectores cardiovasculares, encontrando que el DHA es más efectivo que el EPA en su efecto hipotensivo. Además, propusieron que aumentar la proporción de ácidos grasos ω -3/ ω -6 produce un efecto anti-trombogénico, anti-aterogénico y mantiene la integridad vascular, proporcionando protección contra diferentes enfermedades cardiovasculares (Hirafuji *et al.*, 2003).

Por otra parte, se ha demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) ω -3 y ω -6 participan en el control de la expresión genética del metabolismo de los triglicéridos, inhibiendo la lipogénesis y favoreciendo la oxidación de ácidos grasos, reduciendo de esta manera, los niveles de triglicéridos y por ende, el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial (Alemán *et al.*, 2004). Diversos estudios sugieren también que los AGPIs tienen un efecto benéfico sobre el desarrollo o el control de la diabetes, ya que reducen la resistencia a la insulina (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005).

En otro estudio con SHR, probaron el efecto sobre la presión arterial y la protección glomerular de diferentes aceites comestibles, entre ellos, el aceite de pescado que es rico en EPA y DHA. Este aceite resultó ser el más eficiente para prevenir el desarrollo usual de la

hipertensión en las SHR, con el consecuente efecto benéfico sobre las alteraciones glomerulares (Aguila *et al.*, 2005).

5. HIPÓTESIS

La hipótesis planteada en este trabajo, es que el suministro crónico de una dieta hipercalórica, rica en fructosa y grasas, agrava la diabetes y la hipertensión. Por otro lado, el suministro de ácidos grasos ω -3 tiene un efecto benéfico en el desarrollo de estas patologías. De cumplirse lo esperado, se debe reflejar en la composición de ácidos grasos.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un suplemento de ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA) y de una dieta hipercalórica, en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y en SHR con diabetes tipo 2.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Probar tres diferentes modelos para el estudio de la diabetes mellitus y establecer el más adecuado para la inducción de diabetes tipo 2 en SHR.

En SHR control y SHR diabéticas:

- Estudiar el efecto de un suplemento crónico de ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA) durante 8 meses.
- Observar el efecto de una dieta hipercalórica con y sin suplemento de ácidos grasos ω -3, administrados de manera crónica durante 8 meses.
- Determinar los niveles de glucosa en sangre durante todo el estudio.
- Observar la evolución de la hipertensión a lo largo del estudio.
- Hacer el seguimiento de peso corporal hasta los 8 meses de edad.

- Posterior al sacrificio (8 meses de edad):

- Determinar triglicéridos, colesterol y proteína en suero, hígado y riñón.
- Analizar la composición de ácidos grasos en hígado y riñón.
- Realizar el análisis histológico de hígado y riñón.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se dividió en dos partes principales, la primera consistió en el establecimiento de un modelo animal con hipertensión y diabetes mellitus tipo 2 (DM2) inducida. En la segunda parte se probó el efecto de una dieta hipercalórica y de un suplemento de ácidos grasos ω -3 (DHA y EPA) en el modelo previamente establecido.

7.1 Reactivos

Los químicos empleados fueron grado reactivo y se obtuvieron de Merck® y de J.T. Baker®. El hexano empleado en la extracción de metil ésteres fue grado HPLC. Los metil ésteres estándares y el trifluoruro de boro 14% en metanol se obtuvieron de Sigma-Aldrich® de México. Los kits enzimáticos para la determinación de colesterol y triglicéridos fueron de Spinreact®.

7.2 Modelos experimentales

Se emplearon ratas macho de la cepa espontáneamente hipertensa (SHR), las cuales se mantuvieron en el bioterio en cajas de polisulfonato en un ciclo de 12 horas luz-12 horas oscuridad a $\sim 22^{\circ}\text{C}$. Las ratas fueron destetadas a las cuatro semanas de edad. Después del destete las ratas se alimentaron con una dieta estándar (Harlan®). El alimento y el agua fueron proporcionados *ad libitum*.

Se compararon 3 protocolos de inducción de diabetes. Pancreatectomía parcial (PTT), e inyección de estreptozotocina (STZ) a las concentraciones de 100 mg/kg de peso corporal y 50 mg/kg de peso corporal en neonatos de 48 h.

7.2.1 Pancreatectomía parcial

Las pancreatectomías se hicieron a ratas recién destetadas. La cirugía consistió en la extirpación del 50% y 70% del páncreas, considerando el área extendida del mismo. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (40 mg/kg) y el páncreas se extirpó mediante un electrocauterio. La pancreatectomía del 70% se realizó en 8 animales, mientras que la PTT del 50% se llevó a cabo en 17 ratas. Las SHR con PTT de 50% se dividieron en 2 grupos de 8 ratas cada uno; uno de ellos se mantuvo con dieta normal y el otro recibió el suplemento de ácidos grasos ω -3.

7.2.2 Inyección de STZ

La inyección de STZ se aplicó con una jeringa de insulina vía intraperitoneal a neonatos de 2 días a las concentraciones antes mencionadas. La STZ fue diluida en un amortiguador de citratos con un pH de 4.5 en un volumen de 50 μ l.

El modelo de 100 mg/kg de STZ se realizó con 30 animales. Uno de los criterios para elegir el método más adecuado de DM2 en SHR, fue el registro del número de animales muertos desde el momento de la inducción hasta las 6 semanas de edad. En el caso de la PTT, el registro de animales muertos se hizo posterior a la cirugía y en las 2 semanas siguientes (6 semanas de edad). Con estos registros se obtuvo el porcentaje de mortalidad en cada modelo experimental.

Cada modelo se mantuvo hasta los 8 meses de edad para observar sus efectos a largo plazo.

7.3 Dietas experimentales

Para probar el efecto de las dietas experimentales, se emplearon SHR control (A) y SHR diabéticas (B): el lote (A) consistió de 4 grupos de SHR con dietas experimentales (n = 4 a 6 ratas) y el lote (B) de 4 grupos de SHR diabéticas con dietas experimentales (n = 6 a 12 ratas) (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Grupos experimentales de SHR y SHR-STZ 50 mg/kg

A	B
SHR (SHR con dieta normal)	STZ 50 (SHR-STZ 50 con dieta normal)
SHR/ω-3 (SHR con suplemento de ω -3)	STZ 50/ω-3 (SHR-STZ 50 con suplemento de ω -3)
SHR-DHC (SHR con dieta hipercalórica)	STZ 50-DHC (SHR-STZ 50 con dieta hipercalórica)
SHR-DHC/ω-3 (SHR con dieta hipercalórica y suplemento de ω -3)	STZ 50-DHC/ω-3 (SHR-STZ 50 con dieta hipercalórica y suplemento de ω -3)

7.3.1 Dieta hipercalórica

La dieta hipercalórica consistió en alimento comercial (Harlan®) enriquecido 13% en peso con manteca de cerdo y fructosa (Astroquim®) al 10% en el agua de consumo diario. La manteca se puso a calentar a 60°C y las croquetas fueron sumergidas en ella durante 30 minutos, posteriormente se dejaron escurrir para retirar la grasa excedente. El agua se preparaba y cambiaba diariamente. Se les proporcionó agua y alimento *ad libitum*.

El suplemento de ácidos grasos ω -3 provenientes de aceite de salmón (GNLD®), se suministró por canulación, cuatro veces por semana, a los grupos ya mencionados en una proporción de DHA de 240 mg/kg de peso corporal y EPA de 360 mg/kg de peso corporal.

Las dietas fueron proporcionadas a partir de la sexta semana de edad para que las ratas ya estuvieran acostumbradas al alimento seco.

Tanto las dietas como el suplemento de ω -3, se mantuvieron hasta la edad de 8 meses para probar su efecto a largo plazo.

7.4 Manejo de los animales

El peso corporal de las ratas fue medido de 3 a 4 veces por semana para obtener su índice de ganancia diaria de peso en cada uno de los tratamientos.

Se llevó un registro semanal de los niveles de glucosa, ésta fue medida en sangre (obtenida de la cola de las ratas) por el método de la glucosa oxidasa de tiras reactivas en un glucómetro digital (AccuChek®).

La presión arterial fue medida cada semana con un pletismógrafo (Letica® Modelo LE 5007) en la cola de las ratas. El valor de la presión arterial se obtuvo con el promedio de 5 mediciones en cada rata. El pletismógrafo consiste en un insuflador, un transductor, una cámara de calefacción y computadora con un software especial. Para llevar a cabo la medición de la presión arterial, la rata es colocada dentro de un “restringidor de movimiento”, el cual consiste en una cámara de plástico con puertas en ambos extremos, dentro de la cámara, los movimientos de la rata son limitados sólo dejando libre la cola para que le sean colocados el transductor y el insuflador. El transductor monitorea continuamente el pulso (latidos por minuto) de la rata y el insuflador provoca la oclusión del flujo sanguíneo en la cola por medio de una bomba de aire, las pulsaciones producidas por la presión de los latidos del corazón son detectadas por el transductor. Esto permite la medición del pulso, la presión sistólica, diastólica y media. La cámara de calefacción consiste en una caja de acrílico con un ambiente cálido (~35°C), se emplea para producir la vasodilatación periférica y el aislamiento del animal de la luz y el ruido externo, evitando además el estrés excesivo de la rata. Las ratas dentro de los restringidores son metidas en la cámara de calefacción 15 minutos antes de realizar las mediciones. El software empleado es Chart® y permite visualizar y almacenar los registros de presión en la computadora.

7.4.1 Sacrificio

Las ratas fueron sacrificadas a la edad de 8 meses. Se anestesiaron con pentobarbital (40 mg/kg de peso corporal) y posteriormente se sacrificaron por punción cardíaca.

7.4.2 Extracción de muestra sanguínea

A cada rata se le obtuvo una muestra sanguínea (aprox. 5 ml) mediante punción cardíaca. La sangre se colectó en tubos de ensaye y fue colocada en un baño María a 37°C durante 15 minutos. Para la obtención del suero, la sangre se centrifugó a 3000 rpm durante

5 minutos en una centrifuga Hermle Z® 383 K con rotor 220.78 VO2. El suero se recolectó con una pipeta Pasteur y se mantuvo en congelación en tubos eppendorf.

7.4.3 Aislamiento de órganos

Se aislaron hígado y riñones. Una vez extraídos, los órganos se lavaron con solución salina fisiológica y PBS, fueron almacenados de la siguiente manera: un riñón y la mitad del hígado fueron almacenados en tubos de plástico con paraformaldehído al 4% en PBS, para su posterior análisis histológico. El hígado restante y el otro riñón fueron colocados por separado en tubos de plástico y mantenidos en congelación a -70°C .

7.5 Mediciones bioquímicas en suero

En el suero se midieron colesterol, triglicéridos y proteína.

7.5.1 Colesterol y triglicéridos

El colesterol y los triglicéridos fueron cuantificados mediante kits comerciales. Estos kits originan un compuesto coloreado de manera enzimática. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol o triglicéridos presente en la muestra.

Para el colesterol se empleó el kit Colesterol-LQ CHOD-POD de Spinreact®, los ésteres de colesterol reaccionan y forman colesterol y ácidos grasos mediante una colesterol esterasa. El colesterol es oxidado y produce 4-colestenona y peróxido de hidrógeno, esta reacción es catalizada por una colesterol oxidasa, finalmente el peróxido de hidrógeno reacciona con fenol y 4-aminofenazona para formar quinonimina y agua mediante una peroxidasa dando una coloración roja.

Para triglicéridos se utilizó el kit Triglicéridos-LQ GPO-POD de Spinreact®, los triglicéridos forman glicerol y ácidos grasos libres mediante lipoproteinlipasa. El glicerol es fosforilado por una glicerolfosfato deshidrogenasa y ATP en presencia de glicerol quinasa para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-fosfato. El G3P es entonces convertido a

dihidroxiacetona fosfato y peróxido de hidrógeno por glicerolfosfato deshidrogenasa. Al final, el peróxido de hidrógeno reacciona con 4-aminofenazona y p-clorofenol y forma quinona y agua, reacción catalizada por la peroxidasa dando una coloración roja.

Para cada muestra se colocó 1 ml de reactivo y 10 μ l de suero en un tubo eppendorf, se agitó y se dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente la solución fue vaciada en celdas para espectrofotómetro y fueron leídas en un espectrofotómetro (Amersham Biosciences®) a una longitud de onda de 505 nm. Cada muestra se preparó por triplicado.

Se construyó una curva patrón con las concentraciones de 0, 10, 20 y 30 μ g/ml de colesterol o triglicéridos, según fuera el caso; en esta curva se interpolaron los valores de absorbancia obtenidos.

7.5.2 Proteína

La proteína fue cuantificada por el método de Bradford (1976). Como patrón de referencia se utilizó albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 1 μ g/ μ l. Se elaboró la curva patrón de BSA de 0 a 10 μ g con un intervalo de 2 μ g, completando con agua bidestilada a un volumen de 200 μ l. Para el desarrollo de color se adicionó 1 ml de reactivo Bradford a cada punto de la curva. Las absorbancias se leyeron en un espectrofotómetro (Amersham Biosciences®) a 595 nm y sobre la curva resultante ($r^2 > 0.97$) se interpolaron los valores obtenidos de absorbancia de las muestras.

Para leer las muestras en el espectrofotómetro, se prepararon diluciones de suero en proporción 1:100. Se emplearon 10 μ l de dilución, 190 μ l de agua bidestilada y 1 ml de reactivo Bradford para cada muestra. Cada muestra se preparó por triplicado y se leyeron a 595 nm.

7.6 Mediciones bioquímicas en órganos

En hígado y riñón también se cuantificaron triglicéridos, colesterol y proteína.

Para llevar a cabo las mediciones se pesaron 200 mg de tejido y se colocaron en un tubo eppendorf con 300 μ l de PBS, a continuación el tejido se disgregó en homogenizadores con ayuda de un taladro. Se hicieron diluciones 1:10 para la medición de triglicéridos y colesterol y diluciones 1:100 para cuantificación de proteína.

- Los triglicéridos fueron medidos con el kit Triglicéridos-LQ GPO-POD de Spinreact®. Se utilizaron 10 μ l de dilución 1:10 por 1 ml de reactivo, las muestras se prepararon por triplicado y fueron leídas en espectrofotómetro a 505 nm.

- El colesterol se cuantificó con el kit Colesterol-LQ CHOD-POD de Spinreact®. Se emplearon 50 μ l de dilución 1:10 por 1 ml de reactivo, las muestras se prepararon por triplicado y fueron leídas a 505 nm en un espectrofotómetro.

- La proteína se cuantificó por el método de Bradford. Para leer las muestras en el espectrofotómetro se emplearon 10 μ l de dilución 1:100, 190 μ l de agua bidestilada y 1 ml de reactivo Bradford. Cada muestra se preparó por triplicado y se leyeron a 595 nm.

7.7 Aislamiento de lípidos en hígado y riñón

La extracción de lípidos totales se hizo por el método de Folch *et al.* (1957). Se utilizó 1 gramo de tejido en 19 ml de solución cloroformo-metanol (2:1). El tejido se disgregó en un homogenizador Potter-Elvehjem de vidrio por unos minutos y posteriormente se filtró en papel filtro libre de grasa. Al filtrado se le agregaron 0.2 vol. de agua bidestilada y se centrifugó 5 minutos a 3000 rpm con rotor 220.78 VO2 para facilitar la separación de las fases acuosa y lipídica. Se lavó tres veces con una solución de cloroformo-metanol-agua en proporción 3:48:47 retirando la fase acuosa entre cada lavado. La fase clorofórmica (que contiene los lípidos) fue colectada. Se evaporó el cloroformo para obtener el concentrado de lípidos.

7.8 Transesterificación de ácidos grasos

Los ácidos grasos se metilaron por transesterificación con trifluoruro de boro (BF_3) al 14% en metanol (Morrison y Smith, 1964). Para hacer la transesterificación, se resuspendieron los lípidos con 0.5 ml de cloroformo y se colocaron 50 μl de muestra en un vial de vidrio. El cloroformo se evaporó y se le agregaron 0.5 ml de BF_3 ; para evitar la oxidación de los lípidos se les añadió una atmósfera de nitrógeno. Los viales se cerraron herméticamente y se pusieron en agua en ebullición (92-93°C) durante 30 minutos. Al finalizar este tiempo, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez frías, se les añadió 1 ml de hexano grado HPLC y 0.5 ml de agua bidestilada, se agitaron y se dejaron reposar unos minutos hasta ver formadas dos fases. La fase inferior correspondía a la fase acuosa y la superior a la hexánica o lipídica, esta última se colectó en un vial limpio y se evaporó el hexano con ayuda de nitrógeno. Las muestras se guardaron en congelación (-20°C) protegidas de la luz.

7.9 Análisis por cromatografía de gases

La composición de ácidos grasos se analizó en un cromatógrafo de gases (Perkin-Elmer® Modelo Clarus 500 controlado por computadora) equipado con un detector de ionización de flama y con una columna capilar Omegawax de 30 m de longitud, diámetro interno de 0.25 mm y grosor de recubrimiento de 0.25 mm. Tanto la temperatura del inyector como del detector fueron de 250°C. Las muestras se separaron en la columna con un programa diseñado de la siguiente forma: 5 min. a 180°C, luego una rampa ascendente de 5°C/min hasta 240°C, donde permaneció por otros 18 min. Como gas de acarreo se utilizó nitrógeno. Cada corrida duró 35 minutos y la inyección se hizo con 1 μl de muestra con una jeringa Hamilton®.

7.9.1 Inyección de metil ésteres estándares

La identificación de cada uno de los ácidos grasos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de metil ésteres estándares (SIGMA®) con un grado de pureza superior al 98%.

Para llevar a cabo la identificación de los ácidos grasos de nuestras muestras, primero se inyectaron metil ésteres estándares con el fin de obtener sus tiempos de retención y así poder compararlos con los obtenidos de cada muestra. Los estándares inyectados fueron los siguientes:

- Metil Octanoato (8:0)
- Metil Decanoato (10:0)
- Metil Laurato (12:0)
- Metil Miristato (14:0)
- Metil Miristoleato (14:1)
- Metil Palmitato (16:0)
- Metil Palmitoleato (16:1)
- Metil Estearato (18:0)
- Metil Oleato (18:1)
- Metil Linoleato (18:2)
- Metil γ linoleato (18:2)
- Metil Linolenato (18:3)
- Metil linoleato conjugado (18:2) (tres isómeros)
- Metil Araquidato (20:0)
- Metil Eicosenoato (20:1)
- Metil Araquidonato (20:4)
- Metil Behenato (22:0)
- Metil Eicosapentaenoato (20:5)
- Metil Erucato (22:1)
- Metil Docosahexaenoato (22:6)

7.10 Histología

Los órganos para hacer el análisis histológico se mantuvieron en paraformaldehído al 4% en PBS, durante al menos 72 hrs. Posteriormente se lavaron con agua de grifo durante 30 minutos para retirar el fijador. Después se deshidrataron con diferentes concentraciones de alcohol durante 30 minutos en orden creciente, como se describe en el anexo 2, con el fin

de tener la consistencia adecuada del tejido. Una vez deshidratados los órganos, se aclararon con xilol para finalmente ser incluidos en parafina.

7.10.1 Montaje de los cortes

Los bloques de parafina fueron cortados en microtomo con un grosor entre 4 y 6 μm . Una vez hecho el corte se colocó en el portaobjetos previamente gelatinizado y se agregaron gotas de solución Ruyter hasta dejar extendido el corte. Posteriormente, para aumentar la adhesión, la laminilla se mantuvo en una estufa a 40°C hasta que se secó. Se realizó tinción de eosina-hematoxilina como se describe en el anexo 2.

7.10.2 Análisis histopatológico

Una vez montados los cortes para su observación histológica, estos fueron examinados y fotografiados con un microscopio de luz (Carl Zeiss ®). Los hallazgos histológicos se evaluaron observando 5 campos ópticos y las alteraciones morfológicas se clasificaron según el grado de daño observado en: sin cambios patológicos aparentes (SCPA) si no se observó cambio tisular, mientras que los daños fueron clasificados en leves, moderados y severos, según su intensidad.

7.11 Análisis estadístico

Los resultados de peso, presión arterial y cuantificaciones de proteína y lípidos en suero, hígado y riñón fueron analizados mediante la prueba de ANOVA simple, seguida de la prueba de Fischer con una $p < 0.05$.

En las figuras, los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre 2 grupos, al igual que letras diferentes (ej. *a* vs *b*); letras acompañadas (ej. *ab* o *bd*) indican que no hay diferencias significativas entre dos grupos específicos, pero sí con respecto a otros.

En el caso de la histopatología, los valores obtenidos se consideraron como no paramétricos, por lo que fueron evaluados utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, con el fin

de determinar el efecto de los tratamientos, mientras que la prueba U de Mann-Whitney fue usada para comparar las medias de cada parámetro entre los grupos, con un valor de significancia de $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Modelos de inducción de DM2

En este estudio se probaron tres modelos para la inducción de diabetes tipo 2 en ratas espontáneamente hipertensas (SHR); el propósito fue obtener un modelo animal que reflejara mejor las características de una hiperglicemia ligera en humanos. Se sabe que en la diabetes tipo 2 no controlada, los niveles de glucosa oscilan considerablemente sin que el sujeto tenga plena conciencia de ello, de tal manera que los niveles máximos y mínimos de glicemia, son cada vez más grandes conforme progresa la enfermedad. Por esta razón, proponemos que en el caso de una DM2 no controlada con hiperglicemia ligera, la representación de las áreas entre las que se mantiene la glucosa, deberá ser un indicador del desarrollo de la patología.

En la figura 4 se muestran los niveles máximos y mínimos de glucosa registrados para cada modelo experimental. En la figura 4A podemos apreciar que los niveles de glucosa en sangre de las SHR control se mantienen normales, entre 90 y 100 mg/dl. Cabe mencionar que las SHR con pancreatectomía del 70% no sobrevivieron, de manera que los resultados presentados en este trabajo son del grupo con PTT de 50% (n = 8). En la figura 4B se observa que en las ratas con PTT no se detectó un aumento en la glicemia, ya que la glucosa se mantuvo por debajo de los 100 mg/dl, lo cual demuestra que la PTT no condujo al desarrollo de diabetes tipo 2 en estas ratas. En la figura 4C se aprecia el intervalo en que oscilaron los niveles de glucosa en las ratas inyectadas con 50 mg/kg de STZ (n = 6–12); las ratas tuvieron un promedio de glucosa de 140 mg/dl que aumentó con la edad, presentando incrementos que alcanzaron los 450 mg/dl a las 30 semanas de edad, la oscilación en los niveles de glucosa demuestra el descontrol de la misma, lo cual se asemeja a un caso de diabetes tipo 2 en humanos. En la figura 4D vemos los niveles de glucosa sanguínea producidos por la inyección de 100 mg/kg de STZ (n = 3); la glicemia en sangre mantuvo un valor promedio de 190 mg/dl con grandes oscilaciones que alcanzaron los 600 mg/dl, esto demuestra la pérdida del control de la glicemia, muy posiblemente originado por la casi ausencia de insulina. Hay que recalcar que en los casos donde se aprecian áreas de glucosa muy grandes (Figuras 4C y 4D), no se debe a la presencia de dos o más poblaciones con

niveles muy altos o muy bajos de glucosa, sino de individuos que presentaron hiperglicemia, normoglicemia e hipoglicemia a lo largo de su vida. En la figura 5 se muestran dos gráficas representativas de dicho comportamiento; en estas gráficas se muestran los registros de glucosa de 2 ratas del grupo SHR con 50 mg/kg de STZ, podemos apreciar la oscilación de la glicemia conforme al tiempo.

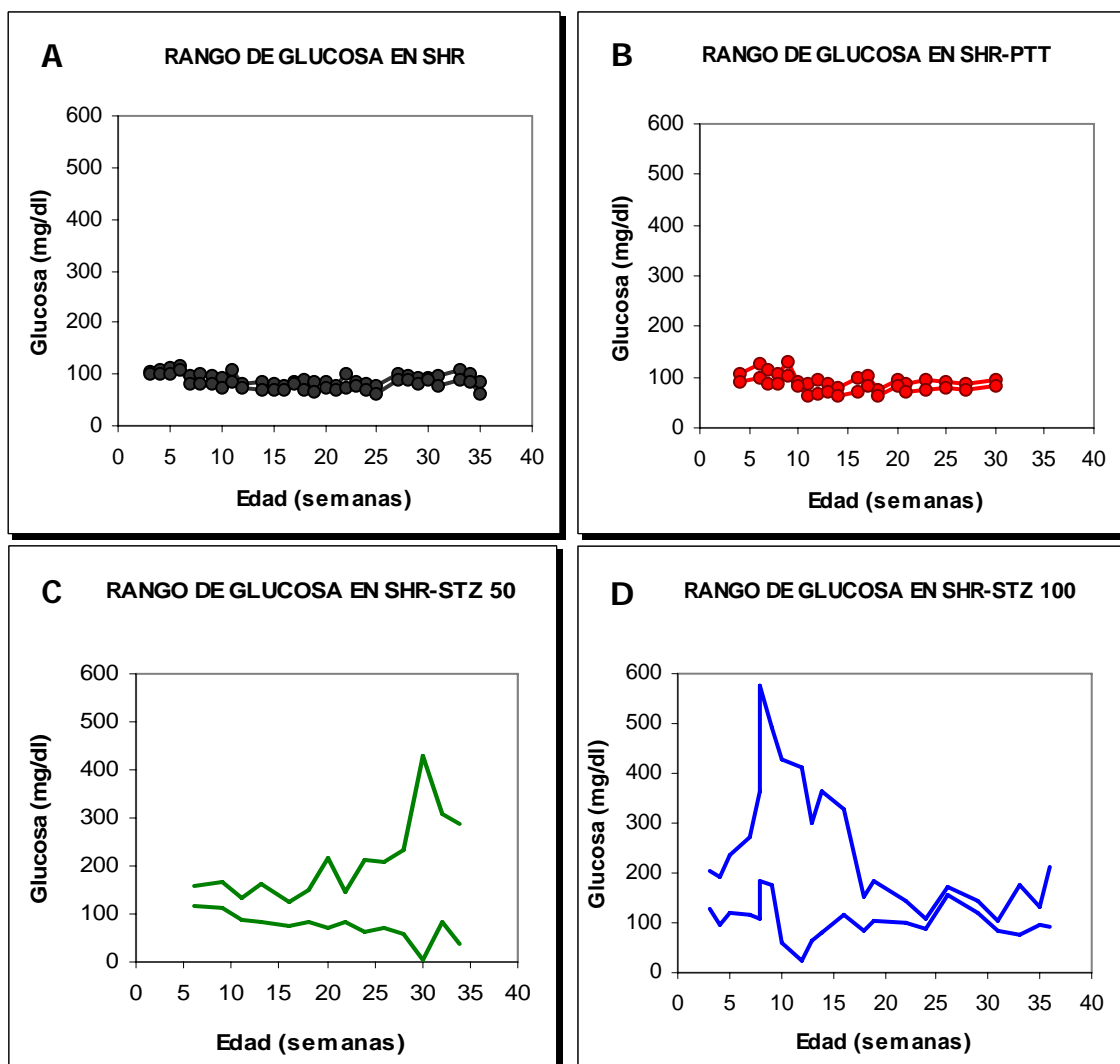


Figura 4. Máximos y mínimos en que se mantuvieron los niveles de glucosa sanguínea de SHR en cada uno de los modelos. A) Rango de glucosa en sangre de SHR control. B) Rango de glucosa de SHR con PTT. C) Rango de glucosa de SHR con 50 mg/kg de STZ. D) Rango de glucosa en SHR con 100 mg/kg de STZ.

La figura 6 muestra el porcentaje de mortalidad obtenido con cada modelo experimental. La PTT causó una mortalidad de 5.8%, la inyección de 50 mg/kg de STZ provocó 10.5% de mortalidad y la inyección de 100 mg/kg de STZ causó una mortalidad de

90%. Es importante mencionar que la mortalidad generó una reducción importante de la población en este último grupo, quedando un lote de 3 ratas, de las cuales se siguieron los parámetros de peso, glucosa y presión, hasta los 8 meses de edad.

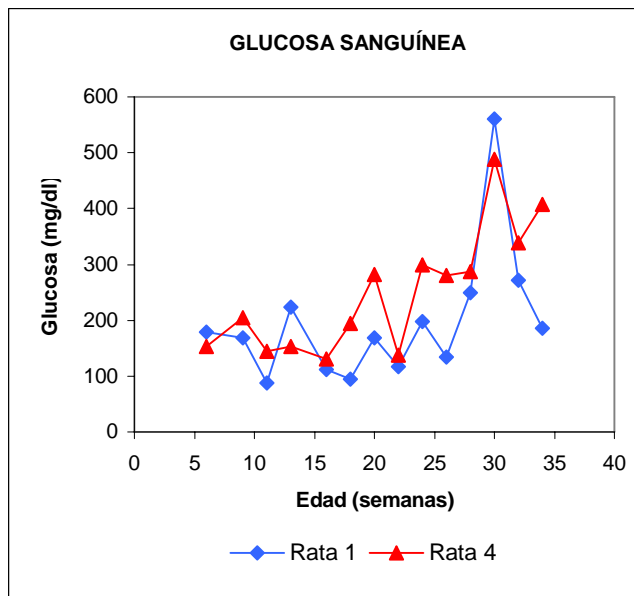


Figura 5. Comportamiento de la glucosa sanguínea de dos individuos del grupo SHR-STZ 50.

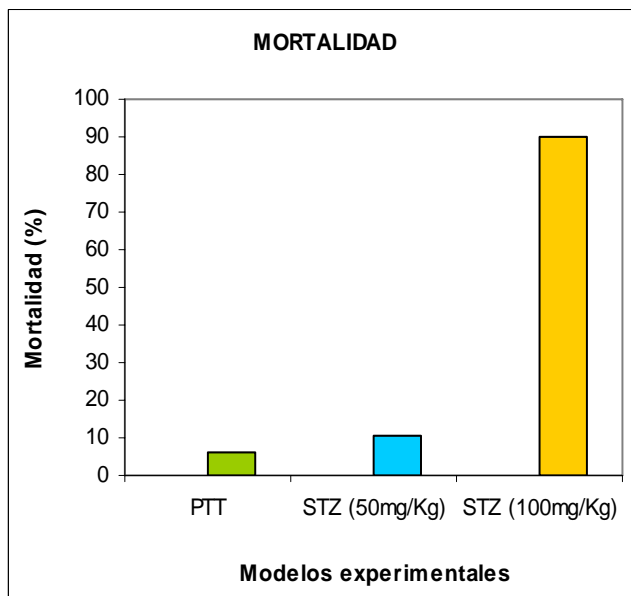


Figura 6. Porcentaje de mortalidad obtenido con cada uno de los modelos experimentales.

Los promedios de presión sistólica en cada uno de los modelos experimentales se muestran en la figura 7. En las SHR control (Figura 7A) se observa que la presión arterial rebasa los 140 mmHg a las 10 semanas de edad, fecha en que se establece la hipertensión. La presión arterial continúa elevándose a lo largo del tiempo hasta alcanzar valores de 170 mmHg a las 29 semanas de edad, posteriormente la presión disminuye ligeramente.

En la figura 7B se puede ver que las ratas con pancreatectomía parcial no presentaron incrementos aparentes de presión arterial, sino hasta la semana 18 en que alcanzó los 170 mmHg. No obstante, tiempo después la presión volvió a disminuir a 135 mmHg, esto nos demuestra que la PTT no contribuyó en el desarrollo de hipertensión e incluso estas ratas no parecen haberla desarrollado.

La figura 7C muestra que las ratas con 50 mg/kg de STZ desarrollaron hipertensión a las 11 semanas de edad, tiempo similar al de los controles SHR. Posteriormente la presión se elevó conforme a la edad de las ratas y finalmente se mantuvo en 150 mmHg.

En la figura 7D podemos observar que la presión arterial sistólica de las ratas con 100 mg/kg de STZ permaneció por debajo de los 140 mmHg casi todo el tiempo y sólo hasta la edad de 36 semanas, alcanzaron los 150 mmHg; esto parece indicar que la hiperglicemia que presentaron estas ratas no contribuyó al incremento de la presión arterial en este modelo.

En la figura 8 se representa el seguimiento de peso corporal del grupo SHR control y de los 3 modelos que probamos para inducir diabetes. El grupo con 100 mg/kg de STZ mostró una tendencia a aumentar de peso en comparación con los otros grupos (recordando que el promedio de peso corporal de este grupo fue de un lote de 3 ratas). La inyección de 50 mg/kg de STZ y la PTT, no afectaron el peso corporal de los animales, ya que se comportaron igual que el grupo control.

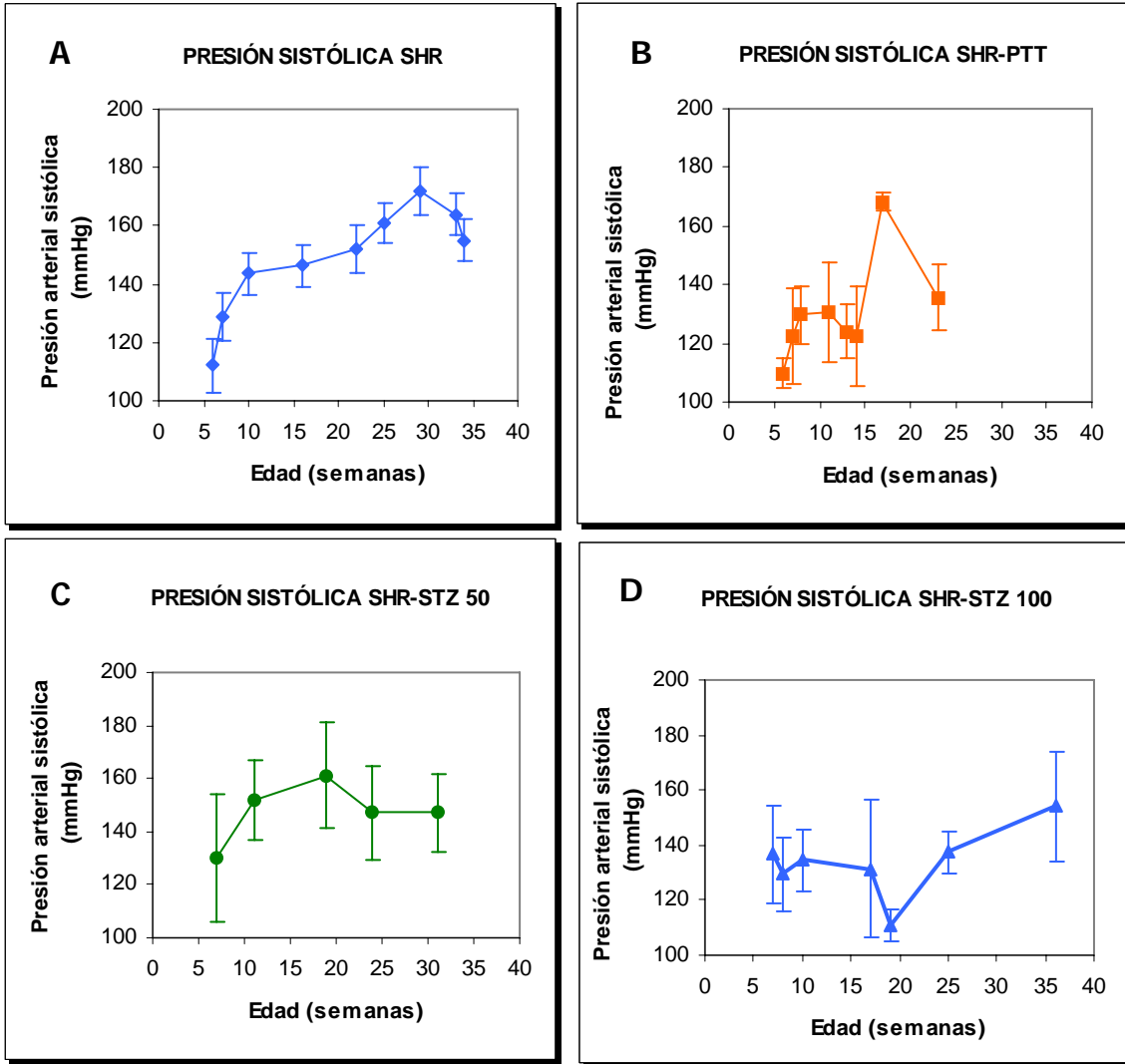


Figura 7. Promedios de presión arterial sistólica de las SHR con cada modelo de inducción. A) Presión sistólica de SHR control. B) Presión sistólica de SHR con PTT. C) Presión sistólica de SHR con 50 mg/kg de STZ. D) Presión sistólica de ratas inyectadas con 100 mg/kg de STZ.

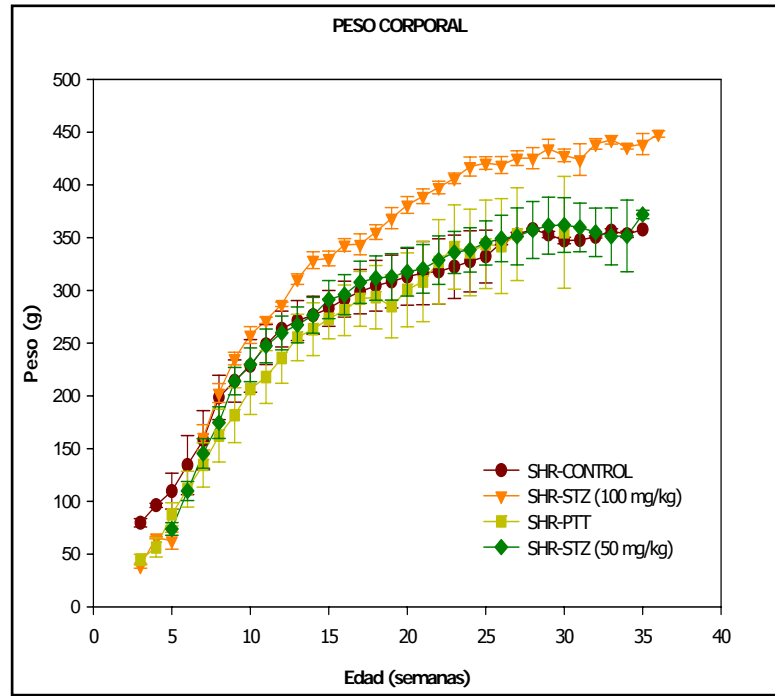


Figura 8. Seguimiento de peso corporal de SHR control, SHR con PTT y SHR inducidas con STZ a las concentraciones de 50 mg/kg y 100 mg/kg.

Debido a la reducida población restante de ratas con 100 mg/kg de STZ, nos resulta claro que sería difícil obtener datos concluyentes sobre este modelo, sin contar con la enorme población de ratas que sería necesario utilizar. Gracias a estos inconvenientes, el modelo de SHR con 100 mg de STZ resulta poco propicio para ser utilizado. Así, considerando los cuatro parámetros presentados anteriormente, se decidió que el modelo más adecuado para inducir DM2 en SHR es la inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de STZ a neonatos de 2 días, ya que promueve el aumento de la glicemia y el descontrol de la misma, semejando a un caso de DM2 en humanos. En este modelo también se desarrolló y se mantuvo la hipertensión, a diferencia de los grupos con PTT y STZ 100 en los que la hipertensión se presentó de manera tardía. Además, el porcentaje de mortalidad es bajo y por ende, puede llevarse a cabo sin una pérdida significativa de la población bajo estudio. También hay que mencionar que este estudio se propuso para su seguimiento durante 8 meses, de tal manera que la posibilidad de llegar a esa edad con la mayor parte de la población era superior con el modelo de 50 mg/kg de STZ.

8.2 Efecto de la STZ (50 mg/Kg de peso corporal) en SHR

En el caso de cada uno de los cuatro grupos de SHR control, la población fue de 3 a 6 animales en los que se midieron todos los parámetros. En el caso de las SHR diabéticas, las cinéticas de peso, glucosa y presión arterial comprendieron una población de 6 a 12 ratas, mientras que las cuantificaciones de proteína, lípidos y ácidos grasos se realizaron con una población de 5 a 6 animales.

En esta sección se presenta la comparación entre el grupo SHR control con el grupo de 50 mg/kg de peso de STZ (SHR-STZ 50), con la intención de ver los cambios producidos por la inyección de STZ sobre la glucosa sanguínea, la presión arterial, el peso corporal, el contenido de lípidos (triglicéridos y colesterol) en suero y tejidos (hígado y riñón), así como en la composición de ácidos grasos de hígado y riñón. Ambos grupos se mantuvieron hasta los 8 meses de edad.

8.2.1 Glucosa, presión arterial y peso

Los niveles de glucosa del grupo SHR control y SHR-STZ 50 se presentan en la figura 9. Las figuras 9A y 9B, representan el promedio de glucosa sanguínea a partir del destete y hasta los 8 meses edad, con sus respectivas desviaciones estándar. Las figuras 9C y 9D, representan los máximos y mínimos que definen el área entre la que se mantiene la glucosa sanguínea. Estas gráficas nos permiten apreciar mejor el comportamiento de la glicemia durante la vida de las ratas y hacer una comparación más clara entre ambos grupos. La glicemia de las ratas SHR control se mantuvo inferior a los 100 mg/dl (Figuras 9A y 9C) y las desviaciones estándar se mantuvieron pequeñas, esto demuestra el adecuado control de la glicemia en estas ratas, como era de esperarse. Por otro lado, el grupo con 50 mg/kg de STZ tiene una glicemia promedio de 140 mg/dl con grandes desviaciones estándar (Figura 9B), las cuales reflejan el descontrol de la glicemia y el incremento de ésta con la edad. Lo anterior se aprecia claramente al comparar las áreas representadas en la figura 9C vs. 9D.

En la figura 10 se muestra la presión arterial sistólica a diferentes tiempos. En la figura 10A se encuentra el registro de la presión sistólica de las SHR control, se observa que la hipertensión (> 140 mm Hg) se establece a partir de las 10 semanas de edad y ésta

continúa incrementándose conforme a la edad de las ratas, alcanzando su valor máximo (175 mmHg) a las 28 semanas de edad. La presión sistólica de las ratas inyectadas con 50 mg/kg de STZ se observa en la figura 10B. Las ratas sobrepasaron los 140 mmHg a las 9 semanas de edad y el valor máximo fue de 160 mmHg a la edad de 20 semanas. Esto nos indica que la inyección de 50 mg/kg de STZ no afecta el desarrollo ni la magnitud de la hipertensión, a pesar de inducir una ligera hiperglicemia, sin embargo, como sucede con la glicemia, la presión arterial presenta mayores oscilaciones, es decir, mínimos y máximos de presión más grandes que en las ratas control.

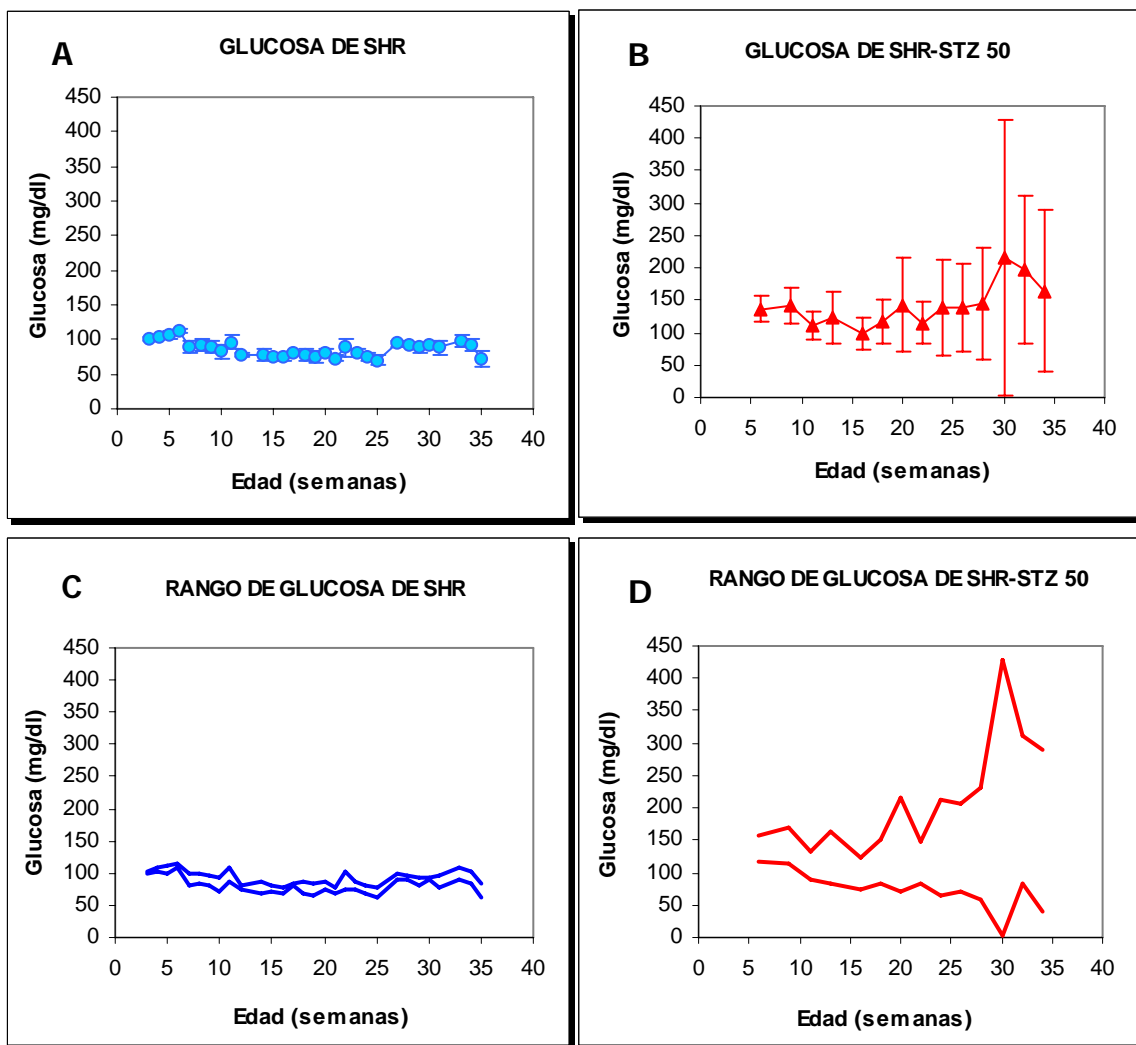


Figura 9. Glucosa sanguínea de SHR control y SHR con STZ, a partir del destete y hasta los 8 meses de edad. A) Promedios de glucosa de SHR control. B) Promedios de glucosa de SHR-STZ (50 mg/kg). C) Intervalo dentro del cual se situó la glicemia de las SHR. D) Intervalo en que oscilaron los valores de glicemia de las ratas con 50 mg/kg de STZ.

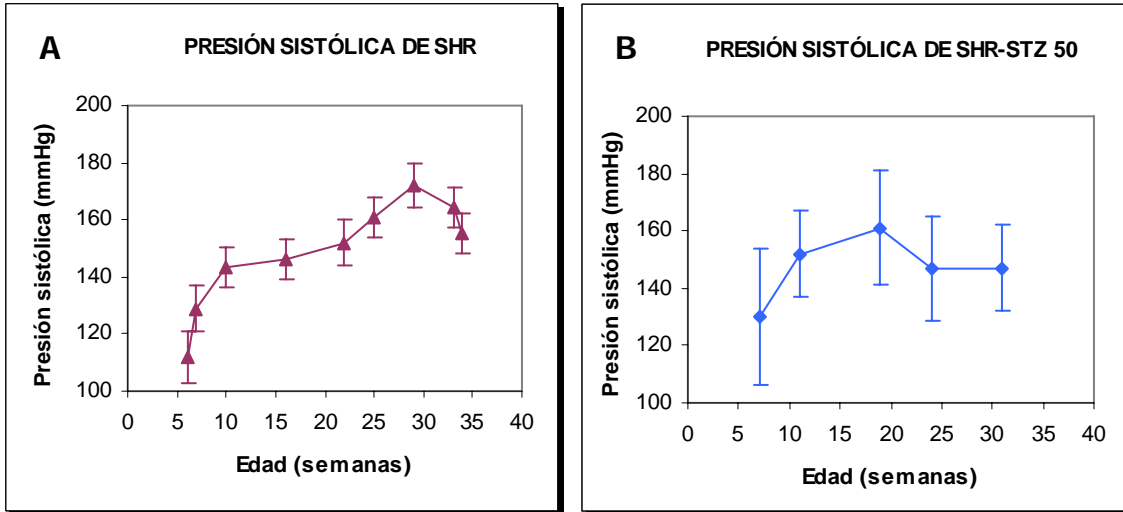


Figura 10. Seguimiento de la presión arterial sistólica. A) Presión sistólica de SHR control. B) Presión sistólica de SHR con 50 mg/kg de STZ.

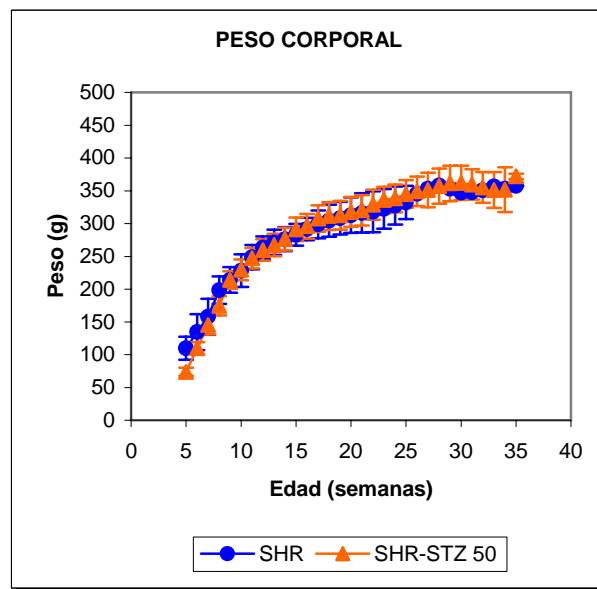


Figura 11. Seguimiento de peso corporal de SHR control y SHR con STZ (50 mg/kg).

En la figura 11 se puede apreciar la ganancia de peso conforme al tiempo de las SHR control y SHR con STZ (50 mg/kg), podemos ver que no hay diferencias entre ambos grupos.

Así pues, a pesar del descontrol en la glucosa, no se registraron alteraciones en la velocidad de crecimiento de las ratas ni en el desarrollo de la presión arterial, por lo cual no se esperaba gran cambio en el metabolismo de las ratas; para corroborar esto, se hicieron

cuantificaciones de lípidos y proteína, además se obtuvo la composición de ácidos grasos en hígado y riñón.

8.2.2 Cuantificaciones de lípidos y proteína

Se llevaron a cabo cuantificaciones de triglicéridos, colesterol y proteína en suero, hígado y riñón a los 8 meses de edad, para observar los cambios que ocurren por la hiperglicemia generada por 50 mg/kg de STZ, en comparación con SHR normales. En esta sección se reportan las cuantificaciones de dos formas: en la primera se presenta la cantidad total de triglicéridos y colesterol en suero, hígado y riñón; en la segunda el cociente de triglicéridos o colesterol respecto a la cantidad de proteína de cada grupo. Este cociente nos permite normalizar los resultados de acuerdo a la cantidad de proteína presente en la muestra y nos proporciona una relación de los lípidos en suero y órganos.

8.2.2.1 Proteína y Lípidos en Suero

En la figura 12 se muestra la cuantificación de proteína en suero de los grupos SHR control y SHR con 50 mg/kg de STZ. Se observa que en el grupo con STZ disminuyó 44% la cantidad de proteína con relación al grupo SHR.

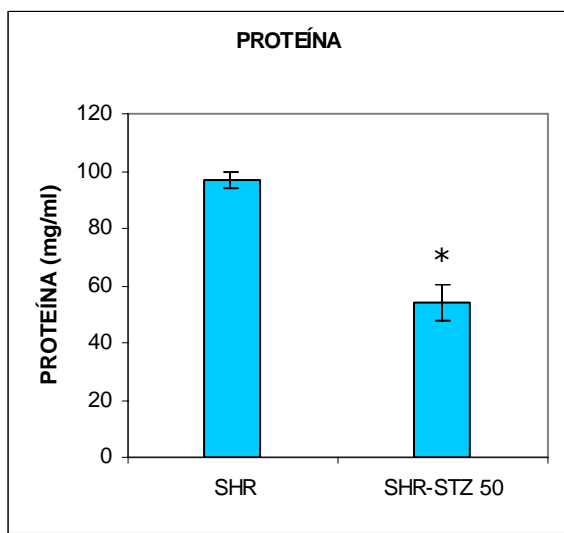


Figura 12. Cantidad de proteína en suero de SHR y SHR con STZ (50 mg/kg). (P < 0.05)

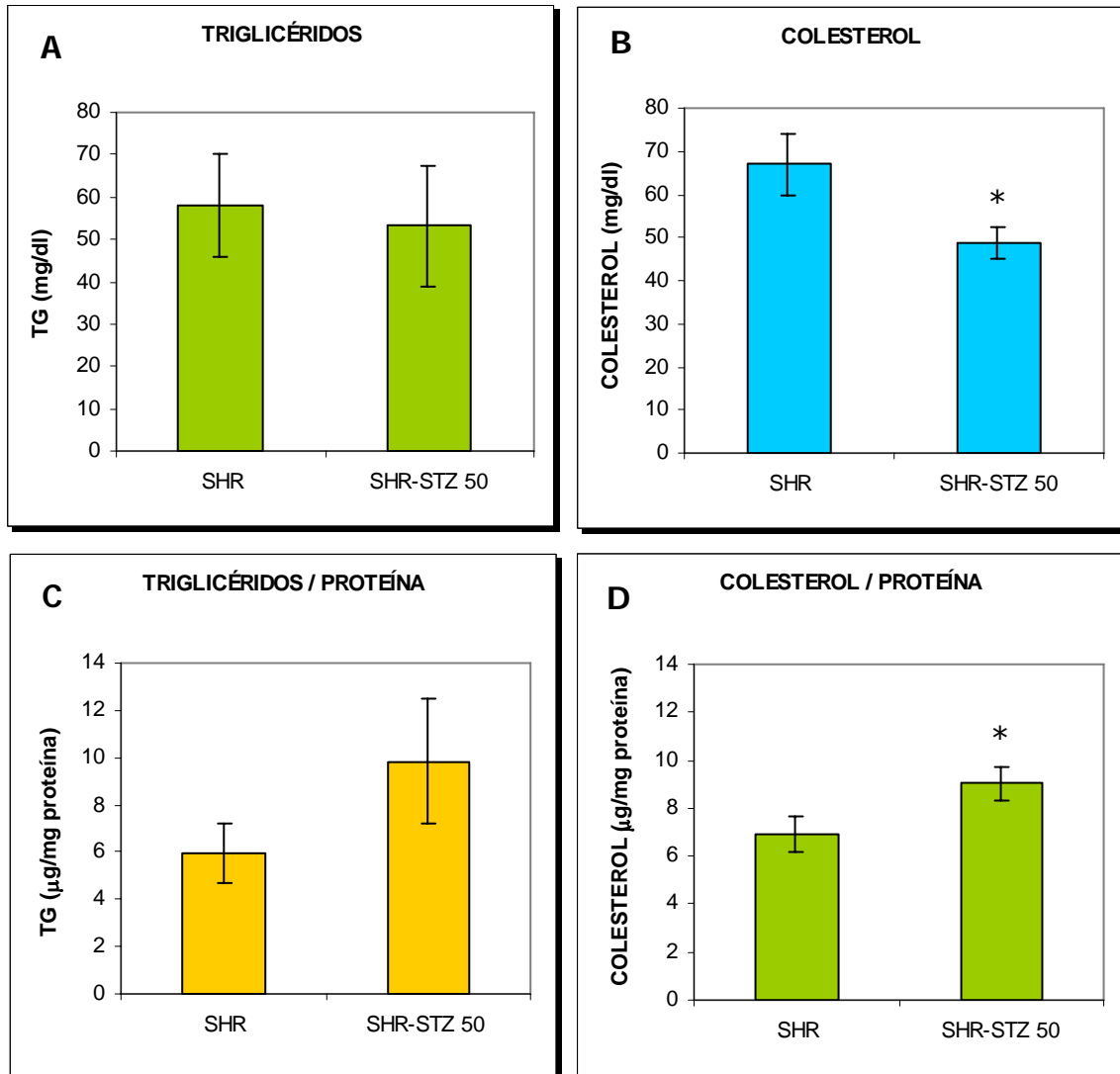


Figura 13. Cuantificaciones de triglicéridos y colesterol en suero de SHR control y SHR con 50 mg/kg de STZ a los 8 meses de edad. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cociente de triglicéridos/proteína. D) Cociente de colesterol/proteína. ($P < 0.05$)

En la figura 13 se muestran las cuantificaciones de triglicéridos y colesterol de las SHR control y SHR con STZ (50 mg/kg). En la figura 13A vemos que la cantidad de triglicéridos en suero es la misma en las ratas control y en las ratas con STZ, por lo cual, la diabetes parece no producir cambios en este parámetro. A diferencia de los triglicéridos, la cantidad de colesterol sí se modifica en el grupo inducido con STZ, como se observa en la figura 13B, la cantidad de colesterol en suero disminuye 26% en este grupo. En la figura 13C se muestra el cociente de triglicéridos/proteína en suero en los grupos SHR y SHR con STZ, podemos ver que aparentemente los triglicéridos aumentan un 40% en el grupo con STZ, sin embargo,

estadísticamente no hay diferencias entre ambos grupos. El cociente de colesterol/proteína en suero se muestra en la figura 13D, las ratas inyectadas con STZ muestran un aumento de 22% en la cantidad de colesterol con respecto a las ratas normales.

8.2.2.2 Proteína y Lípidos en Hígado

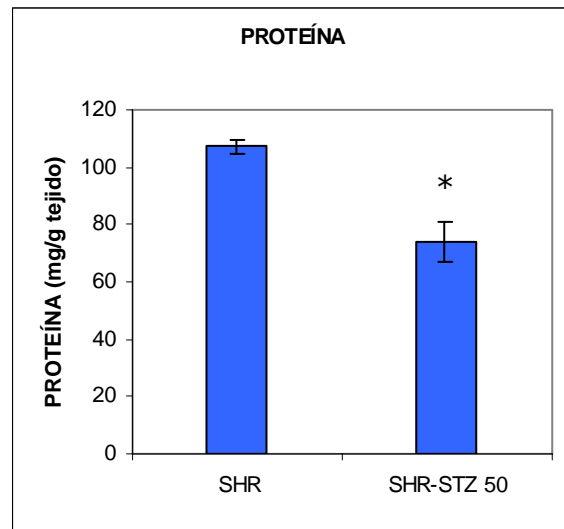


Figura 14. Cantidad de proteína en hígado de SHR y SHR con STZ (50 mg/kg). ($P < 0.05$)

En la figura 14 se encuentra graficada la cantidad de proteína en hígado de los grupos SHR y SHR con STZ (50 mg/kg), podemos observar que la proteína disminuye 31% en las SHR con STZ. La cuantificación de lípidos en hígado se muestra en las figuras 15A y 15B, la cantidad de triglicéridos en SHR normales es de 14 mg/g tejido, mientras que los TG de las ratas con STZ aumentaron a 17.6 mg/g tejido, lo que equivale a un incremento del 24.6%. La cantidad de colesterol en ratas normales fue de 3.4 mg/g tejido y la de ratas con STZ fue de 2.9 mg/g tejido, a pesar de que el colesterol tuvo una disminución del 14% en las ratas inducidas, este decremento no es estadísticamente significativo.

El cociente de TG sobre proteína nos muestra un incremento de 80% en las ratas inducidas con STZ en comparación con las SHR, es decir, la cantidad de TG aumentó de 132 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína a 238 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína (Figura 15C). En cuanto a la cantidad de colesterol en hígado, no se encontraron diferencias entre los cocientes de ambos grupos (Figura 15D).

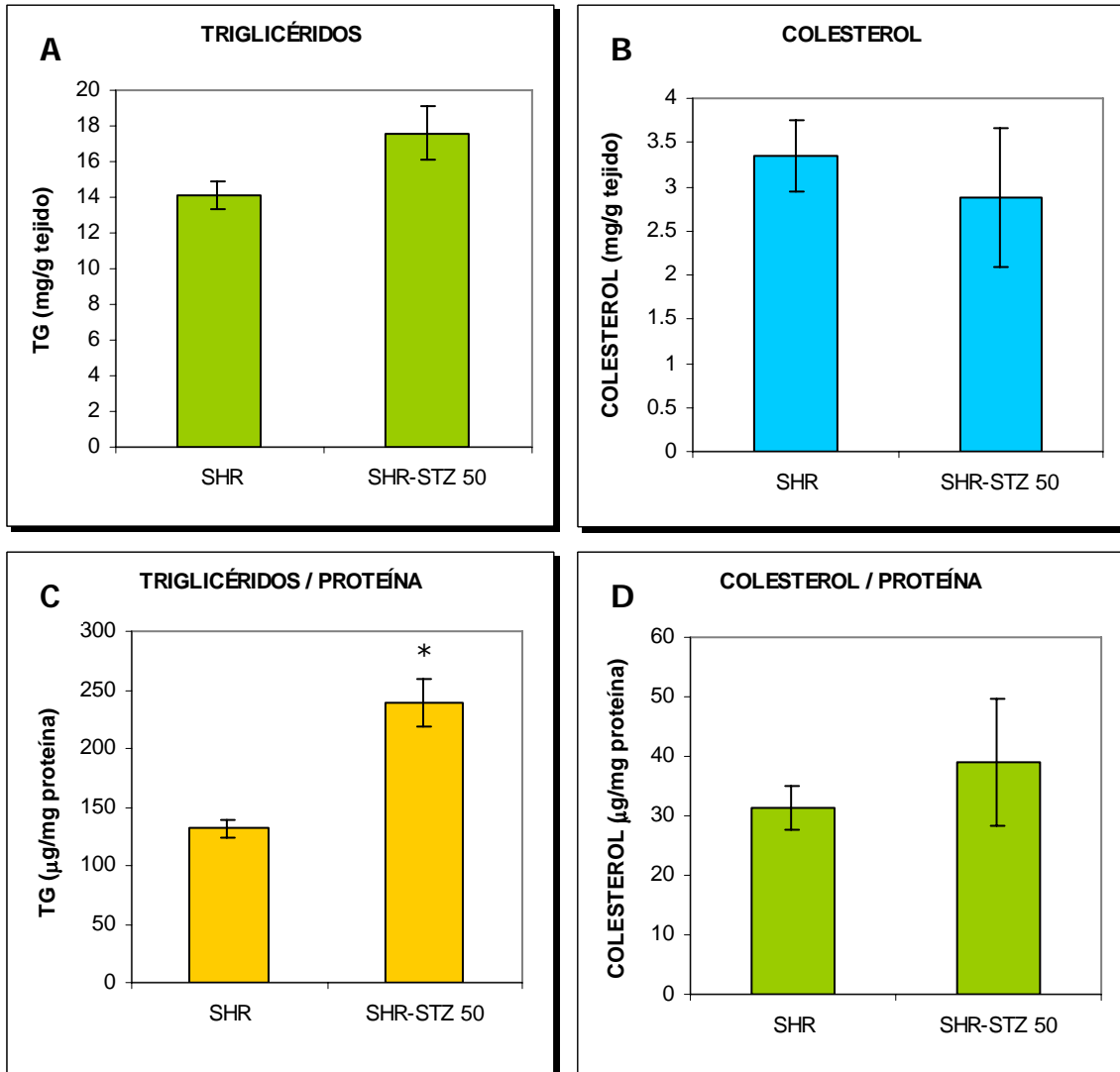


Figura 15. Cuantificaciones de triglicéridos y colesterol en hígado de SHR y SHR-STZ (50 mg/kg) a los 8 meses de edad. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cociente de triglicéridos/proteína. D) Cociente de colesterol/proteína. (P < 0.05)

8.2.2.3 Proteína y Lípidos en Riñón

En el riñón se presentaron diferencias importantes entre ambos grupos. En la figura 16 se observa la cuantificación de proteína en riñón; en las SHR este valor fue de 95 mg/g tejido, mientras que en las SHR inyectadas con STZ, la proteína fue de 47 mg/g tejido, mostrando un decremento del 50%.

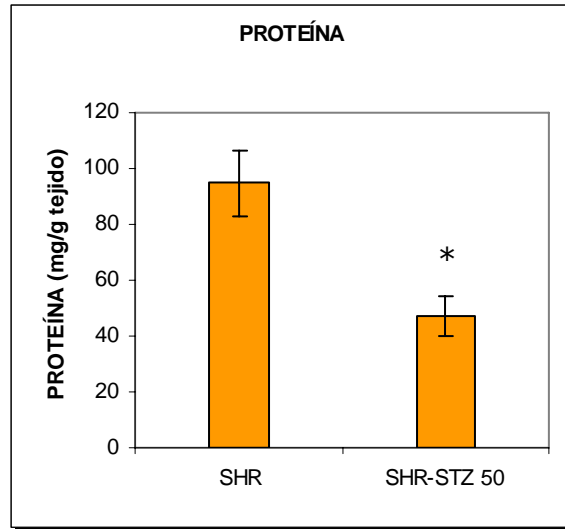


Figura 16. Cantidad de proteína en riñón de SHR y SHR con STZ (50 mg/kg). ($P < 0.05$)

La figura 17A muestra que en las SHR la cantidad de TG fue de 7.5 mg/g tejido y en las ratas inducidas con STZ la cantidad de TG aumentó a 13.2 mg/g tejido (76% más alta). El colesterol también tiene una tendencia a aumentar en las ratas con STZ, esto se puede apreciar en la figura 17B, el colesterol en riñón de las SHR fue de 1.42 mg/g tejido y en ratas diabéticas fue de 2.77 mg/g tejido, esto representa un incremento de 94.7%.

En los cocientes de TG y colesterol sobre proteína, las SHR con STZ también presentan valores más altos que las ratas control, sin embargo en el caso de los TG, el aumento fue casi 4 veces mayor; en la figura 18A se representan estos cocientes. El cociente de triglicéridos/proteína de las SHR fue de 79.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, mientras que el de las SHR-STZ 50 mg/kg fue de 280.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína, este incremento fue de 255%. En el caso de los cocientes de colesterol (Figura 18B), las ratas control tuvieron 94.8 μg colesterol/mg proteína y las ratas diabéticas 184.7 μg colesterol/mg proteína, siendo 95% más alto en estas últimas.

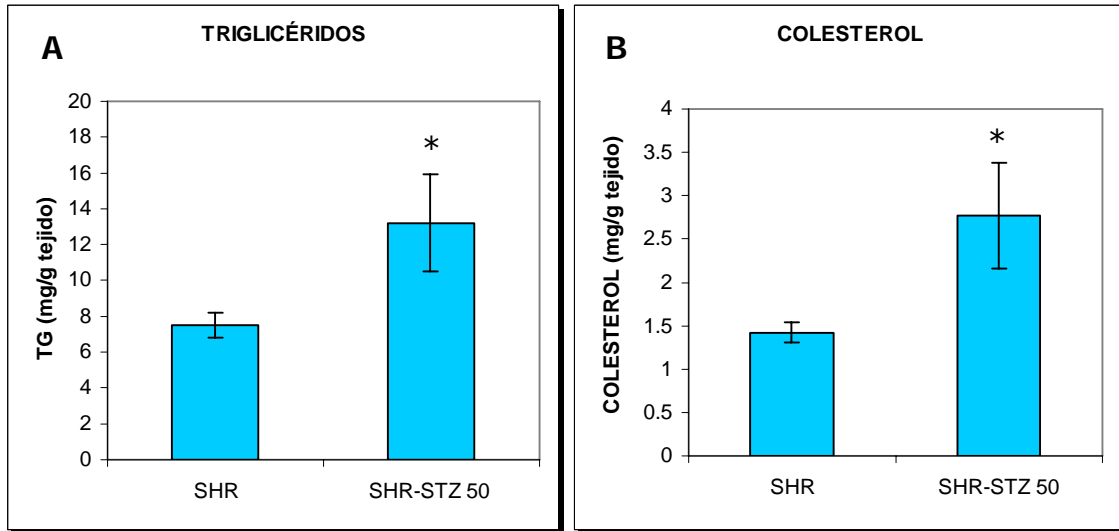


Figura 17. Cuantificaciones de triglicéridos y colesterol en riñón de SHR y SHR-STZ (50 mg/kg) a los 8 meses de edad. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. ($P < 0.05$)

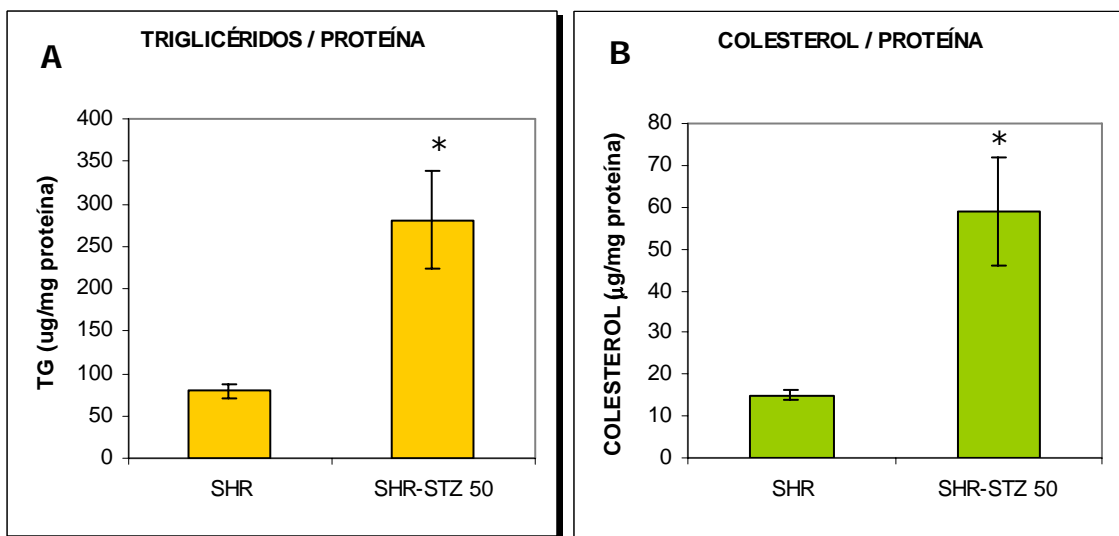


Figura 18. Cuantificaciones de triglicéridos y colesterol en riñón de SHR y SHR-STZ (50 mg/kg) a los 8 meses de edad. A) Cociente de triglicéridos/proteína. B) Cociente de colesterol/proteína. ($P < 0.05$)

Los resultados de lípidos nos mostraron que los triglicéridos en suero no son modificados en las ratas diabéticas, sin embargo, en hígado y riñón sí se presentaron cambios, ya que las ratas diabéticas (50 mg/kg STZ) mostraron incrementos significativos, lo cual nos sugiere que la diabetes inducida con esta concentración de STZ, promueve una mayor acumulación de triglicéridos en hígado y riñón. En el caso del colesterol, la dosis de STZ (50 mg/kg) no parece producir modificaciones en suero e hígado de las SHR, sin embargo parece promover la acumulación de colesterol en riñón. Además hay que mencionar

que las ratas inyectadas con STZ tuvieron menor cantidad de proteína que las ratas control, esto nos indica que aunque el modelo de 50 mg/kg de STZ genera una diabetes con hiperglicemia ligera, no sólo se inducen modificaciones en el metabolismo de lípidos sino también en el metabolismo de proteínas, probablemente al activarse la gluconeogénesis.

8.2.3 Composición de ácidos grasos en hígado y riñón

Se analizó la composición porcentual de ácidos grasos en hígado y riñón para observar los cambios ocurridos en las SHR inyectadas con 50 mg/kg de STZ, en comparación con las SHR normales a los 8 meses de edad. También se obtuvo un cociente de ácidos grasos insaturados/saturados (I / S) que sirve como parámetro indirecto de la fluidez membranal proporcionada por los ácidos grasos.

En la tabla 2, se muestra la composición de ácidos grasos en hígado, las diferencias están indicadas en negritas y como vemos, la composición de AG es muy similar en ambos grupos; entre los cambios ocurridos observamos que en las ratas inducidas con STZ, el porcentaje de ácido palmitoléico disminuyó 28.5% y el de linolénico 27.3% con respecto al grupo SHR, por otra parte, el ácido eicosapentaenoico subió de 0.2% a 0.8% en STZ 50 y los compuestos de 20:3 aumentaron de 0.76% en SHR a 2.97% en STZ 50.

Aunque estos resultados no muestran alteraciones importantes en la composición de ácidos grasos de las ratas inyectadas con STZ en comparación con el grupo control, el cociente I / S indica que el grupo con hiperglicemia ligera (STZ 50) tiene un menor índice de AG insaturados, lo cual podría significar una menor fluidez membranal.

En el caso de los ácidos grasos de riñón, tampoco se presentaron diferencias importantes entre los grupos; como se aprecia en la tabla 3, la composición de AG sólo difiere en el ácido mirístico que disminuye ligeramente de 0.82% en SHR a 0.62% en el grupo con STZ y también en el ácido linoléico conjugado que aumentó de 0.04% a 0.44% en las SHR diabéticas. Al parecer, la hiperglicemia ligera inducida con STZ 50 mg/kg no ocasiona cambios considerables en los AG de riñón, esto se ve reflejado en el cociente I / S, ya que se muestra igual en las ratas control y en las ratas con STZ.

Tabla 2. Composición porcentual de los ácidos grasos de hígado de SHR y SHR con 50 mg/kg de STZ de 8 meses de edad.

Ácido Graso	SHR	SHR-STZ 50
Mirístico	0.58% ± 0.04	0.45% ± 0.13
Palmitico	27.57% ± 1.94	27.81% ± 3.59
Palmitoléico	1.30% ± 0.05	0.93% ± 0.30
Esteárico	18.18% ± 1.41	18.76% ± 3.34
Oléico	15.69% ± 1.12	12.96% ± 2.50
Linoléico	20.88% ± 0.19	17.28% ± 4.55
γ Linoléico	0.31% ± 0.02	0.23% ± 0.05
Linolénico	0.44% ± 0	0.32% ± 0.09
Linoléico conjugado	0.29% ± 0.08	0.67% ± 0.37
Eicosenóico	0.40% ± 0	0.57% ± 0.40
Araquidónico	10.67% ± 3.73	11.21% ± 3.84
Eicosapentaenóico	0.20% ± 0.01	0.80% ± 0.46
Docosahexaenóico	1.34% ± 0.50	3.16% ± 1.51
Compuestos de 20:3	0.76% ± 0.11	2.97% ± 1.61
AG no identificados	1.43% ± 0.04	1.98% ± 0.43
I / S	1.13 ± 0.16	0.73 ± 0.29

Tabla 3. Composición porcentual de los ácidos grasos de riñón de SHR y SHR con 50 mg/kg de STZ de 8 meses de edad.

Ácido graso	SHR	SHR-STZ 50
Mirístico	0.82% ± 0.04	0.62% ± 0.13
Palmitico	28.19% ± 0.38	29.24% ± 5.60
Palmitoléico	1.36% ± 0.02	1.16% ± 0.22
Esteárico	25.54% ± 0.05	23.65% ± 5.11
Oléico	19.54% ± 0.14	16.57% ± 4.39
Linoléico	12.54% ± 0.13	14.13% ± 3.40
γ Linoléico	0.13% ± 0	0.16% ± 0.06
Linolénico	0.36% ± 0.04	0.25% ± 0.15
Linoléico conjugado	0.04% ± 0	0.44% ± 0.17
Eicosenóico	0.69% ± 0.09	0.42% ± 0.20
Araquidónico	6.28% ± 0.16	9.81% ± 3.56
Eicosapentaenóico	0.33% ± 0.22	0.41% ± 0.19
Docosahexaenóico	0.88% ± 0.29	0.93% ± 0.35
Compuestos de 20:3	0.91% ± 0.10	1.00% ± 0.72
AG no identificados	2.42% ± 0.26	2.39% ± 0.98
I / S	0.79 ± 0.01	0.87 ± 0.37

8.3 Efecto de los ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA) en SHR y SHR-STZ 50

En este estudio también se probó el efecto de un suplemento de ácidos grasos ω -3 (Eicosapentaenóico y Docosahexaenóico) en SHR y SHR con 50 mg/kg de peso de estreptozotocina, sobre la glucosa sanguínea, la presión arterial, el peso corporal, el contenido de lípidos y la composición de ácidos grasos.

8.3.1 Glucosa, presión arterial y peso

En la figura 19 se muestra la comparación de la glucosa sanguínea de los grupos STZ 50 y STZ 50/ ω -3, como se observa, las ratas suplementadas con ω -3 mantuvieron niveles de glucosa normales y tuvieron desviaciones estándar pequeñas, lo cual demuestra que el suplemento de ω -3 promueve el control de la glicemia.

En la figura 20 se encuentran representadas las áreas (máximos y mínimos) en que se situaron los valores de glicemia de las SHR control con suplemento de ω -3 y de las SHR inducidas con STZ suplementadas con ω -3. En la figura 20A podemos observar que el suplemento de ácidos grasos omega 3 no induce modificaciones en los niveles de glicemia de las SHR, ya que en promedio mantuvieron niveles inferiores a los 100 mg/dl de glucosa, siendo iguales que el grupo control (Figura 9C). De manera interesante, en la figura 20B vemos que las ratas inducidas con STZ y suplementadas con ω -3, mantuvieron valores de glucosa muy inferiores al grupo SHR-STZ 50 (Figura 9D), además de presentar desviaciones estándar más pequeñas. Hay que mencionar que de la semana 5 a 9 de edad, el rango de glucosa oscilaba entre los 80 mg/dl y los 150 mg/dl, sin embargo, después de este tiempo el intervalo disminuye y la glicemia se mantiene en 100 mg/dl hasta el final del tratamiento, esto nos sugiere que los ácidos grasos ω -3 promueven el control de la glicemia en este modelo de ratas.

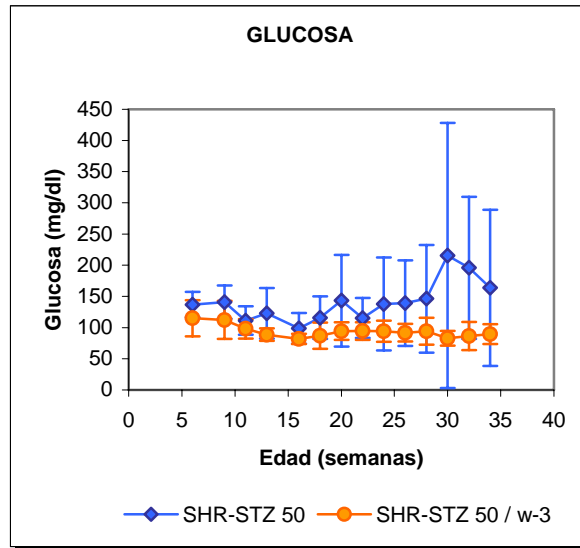


Figura 19. Seguimiento de la glucosa sanguínea de grupos STZ 50 y STZ 50/ ω -3.

El seguimiento de la presión arterial sistólica se presenta en la figura 21; en la figura 21A vemos que las SHR control suplementadas con ω -3 sobrepasaron los 140 mmHg a las 12 semanas de edad pero después de la semana 15, la presión comenzó a disminuir y se mantuvo más baja comparada con el grupo SHR control, aunque en la semana 34 la presión sistólica volvió a subir y fue muy similar en ambos grupos.

En el caso de las ratas inyectadas con 50 mg/kg de STZ y las SHR-STZ 50 con suplemento de ω -3 (Figura 21B), observamos que la presión sistólica de ambos grupos no es estadísticamente diferente, sin embargo, el grupo suplementado con ω -3 presenta un retraso en el desarrollo de la hipertensión, pues estas ratas sobrepasan los 140 mmHg a las 19 semanas de edad, en tanto que las ratas diabéticas sin suplemento llegaron a esta presión a la edad de 11 semanas. Parece ser que el suplemento de ácidos grasos ω -3 en las SHR, mantiene por un tiempo la presión arterial más baja en comparación con el grupo SHR control.

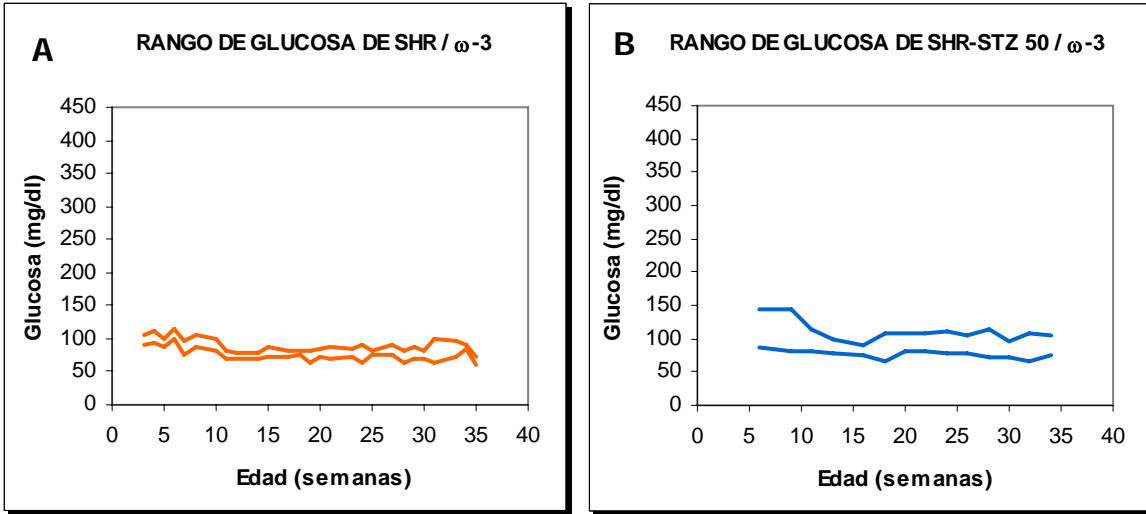


Figura 20. Máximos y mínimos en que se mantuvieron los niveles de glucosa sanguínea a partir del destete y hasta los 8 meses de edad. A) Intervalo dentro del cual se situó la glicemia de las SHR con suplemento de ω -3. B) Intervalo en que oscilaron los valores de glicemia del grupo SHR con 50 mg/kg de STZ y suplemento de ω -3.

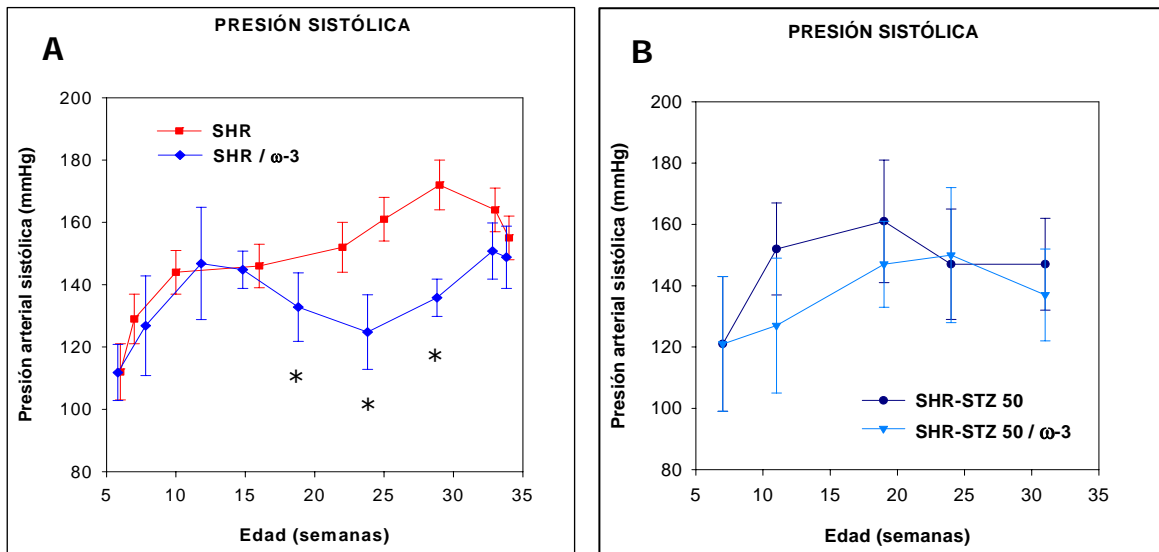


Figura 21. Promedios de presión arterial sistólica. A) Presión sistólica de grupos SHR y SHR con suplemento de ω -3. B) Presión sistólica de grupos SHR-STZ 50 y SHR-STZ 50 suplementadas con ω -3. ($P < 0.05$)

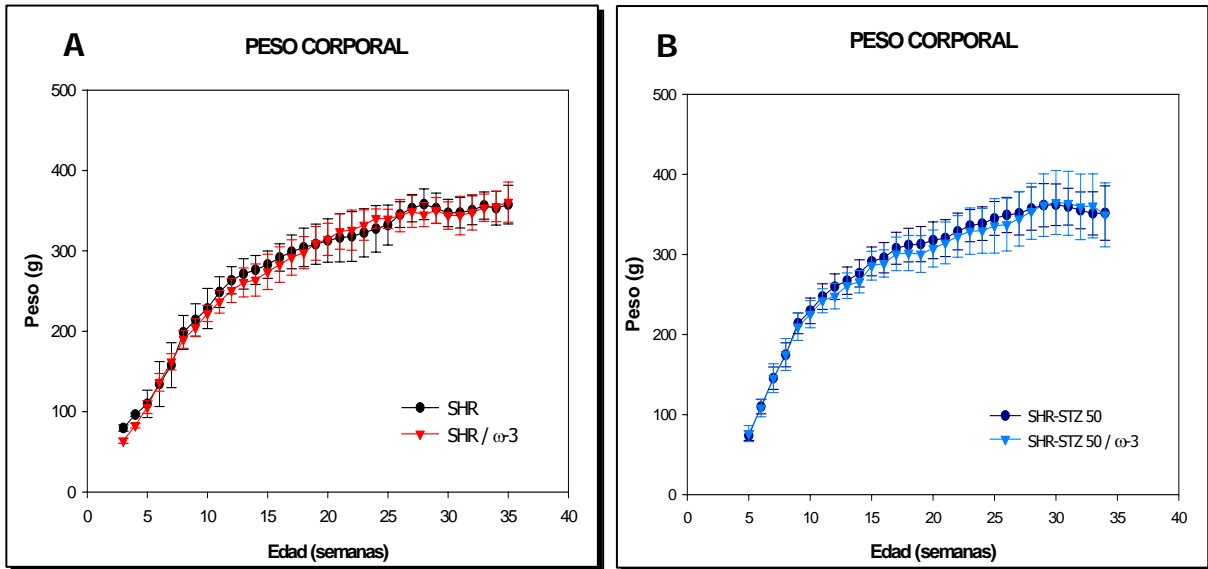


Figura 22. Seguimiento del peso corporal a partir del destete hasta los 8 meses de edad. A) Peso de SHR y SHR con suplemento de ω -3. B) Peso de SHR con 50 mg/kg de STZ y SHR-STZ 50 con suplemento de ω -3.

El peso corporal se encuentra graficado en la figura 22. Podemos ver que el suplemento de ω -3 no altera la ganancia de peso de las SHR (Figura 22A) y tampoco afecta el peso de las SHR con STZ (Figura 22B).

8.3.2 Efecto de los ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA) sobre las cuantificaciones de lípidos y proteína

8.3.2.1 Proteína y Lípidos en Suero

En esta sección se presentan los resultados de las cuantificaciones de proteína, triglicéridos y colesterol en suero, hígado y riñón de los grupos suplementados con ácidos grasos ω -3 comparados con los grupos SHR control y SHR con STZ (50 mg/kg de peso).

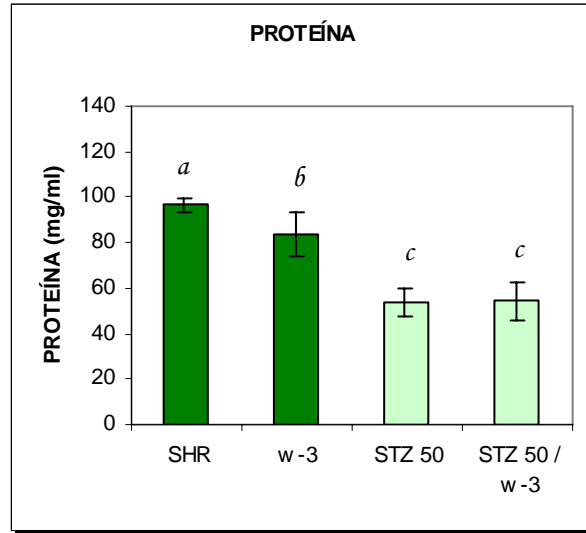


Figura 23. Proteína en suero de SHR (con y sin ω -3) y SHR-STZ 50 (con y sin ω -3) a 8 meses de edad. ($P < 0.05$)

En la figura 23 se aprecia la cantidad de proteína en suero de los grupos mencionados. Podemos observar que el grupo con ω -3 muestra una ligera disminución en la cantidad de proteína. Por otro lado, los grupos STZ 50 y STZ 50/ ω -3 no mostraron diferencias entre sí, no obstante, en ambos disminuyó la proteína en 44% y 35% respectivamente, lo cual nos sugiere que en suero, los ácidos grasos ω -3 no restituyen la pérdida de proteína provocada por la hiperglicemia de las SHR con estreptozotocina.

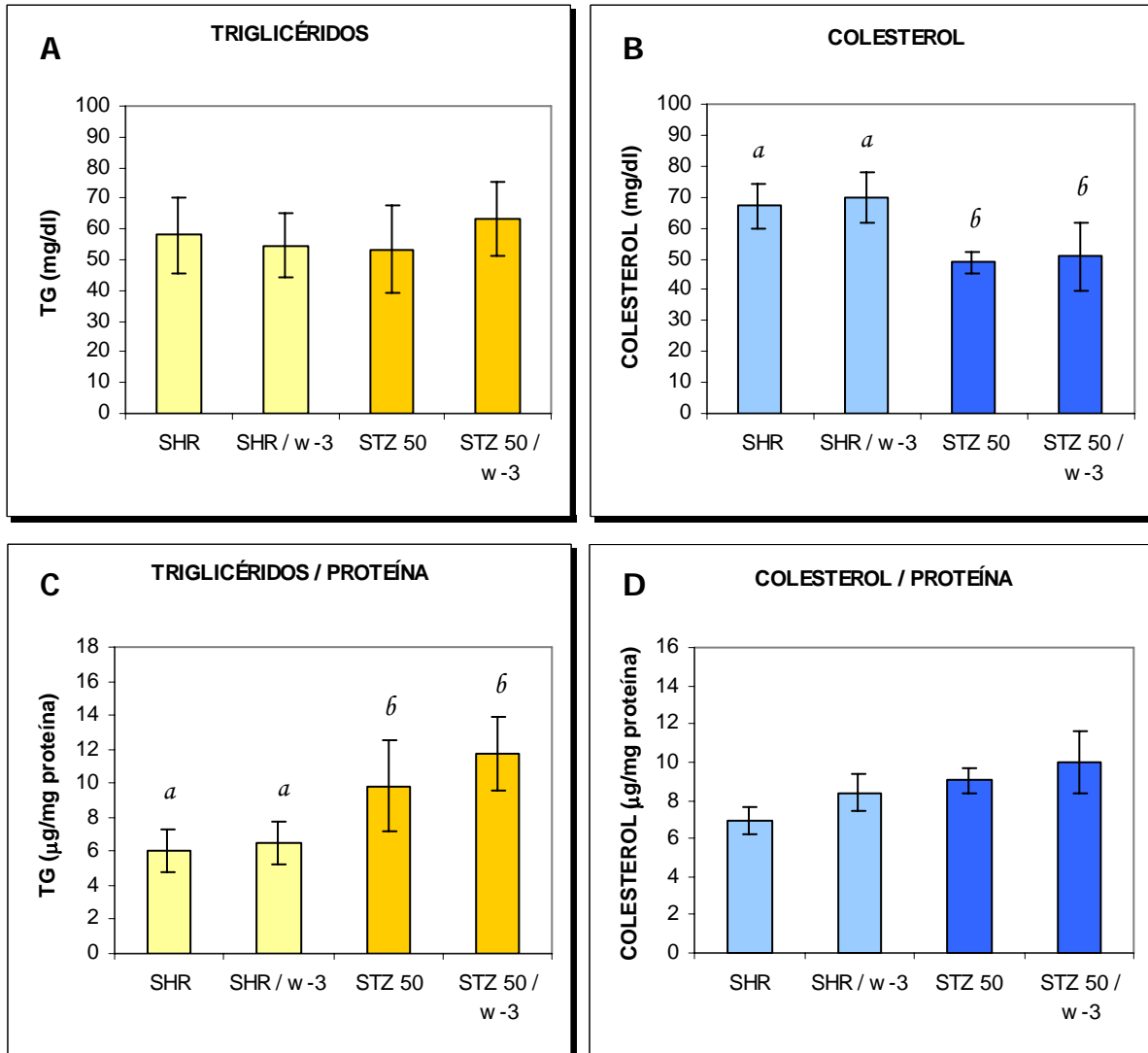


Figura 24. Cuantificación de triglicéridos y colesterol en suero a los 8 meses de edad de los grupos con ω -3, así como los grupos SHR y SHR-STZ 50. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cociente triglicéridos/proteína. D) Cociente colesterol/proteína. (P < 0.05)

Las cuantificaciones de triglicéridos y colesterol en suero se encuentran graficadas en la figura 24. Como vemos, la concentración de TG no fue modificada por el suplemento de ω -3 en SHR ni en SHR-STZ, ya que los cuatro grupos son estadísticamente iguales (Figura 24A). En lo que respecta al colesterol, tampoco hubo cambios significativos, ya que al apreciar la figura 24B notamos que los grupos SHR y SHR/ ω -3 no son diferentes entre sí, mientras que los grupos STZ 50 y STZ 50/ ω -3 tampoco muestran diferencias. Los cocientes de triglicéridos/proteína y colesterol/proteína arrojan resultados similares a las cuantificaciones

de TG y colesterol, puesto que el suplemento de ω -3 no parece modificar los lípidos en suero de SHR ni de SHR diabéticas (Figuras 24C y 24D).

8.3.2.2 Proteína y Lípidos en Hígado

En la figura 25 se muestra la cantidad de proteína en hígado de los grupos con y sin ω -3; podemos apreciar que la proteína disminuyó 15% en el grupo ω -3, mientras que los grupos con STZ no presentaron cambios en este parámetro.

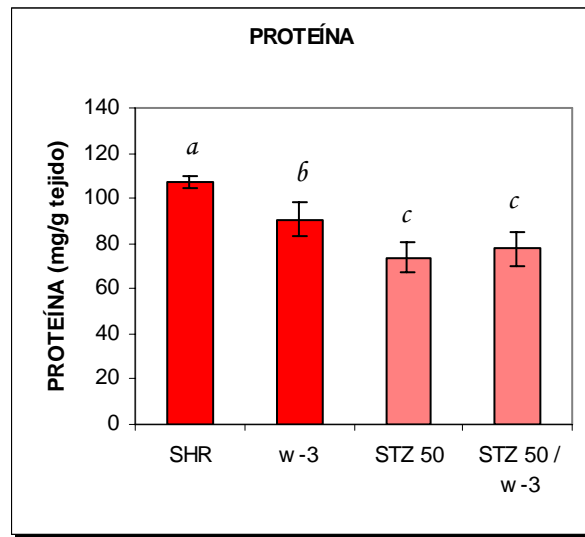


Figura 25. Proteína en hígado a los 8 meses de edad de los grupos SHR, SHR-STZ 50 y los grupos suplementados con ω -3. ($P < 0.05$)

La figura 26 muestra la cuantificación de triglicéridos y colesterol en hígado. Como se observa en la figura 26A, los ω -3 no alteran la cantidad de TG en SHR control ni en SHR con STZ. Las SHR suplementadas con ω -3 (Figura 26B) no presentaron diferencias estadísticas entre la cantidad de colesterol, pero las SHR-STZ con ω -3 mostraron una disminución significativa del colesterol respecto a las ratas que no recibieron el suplemento.

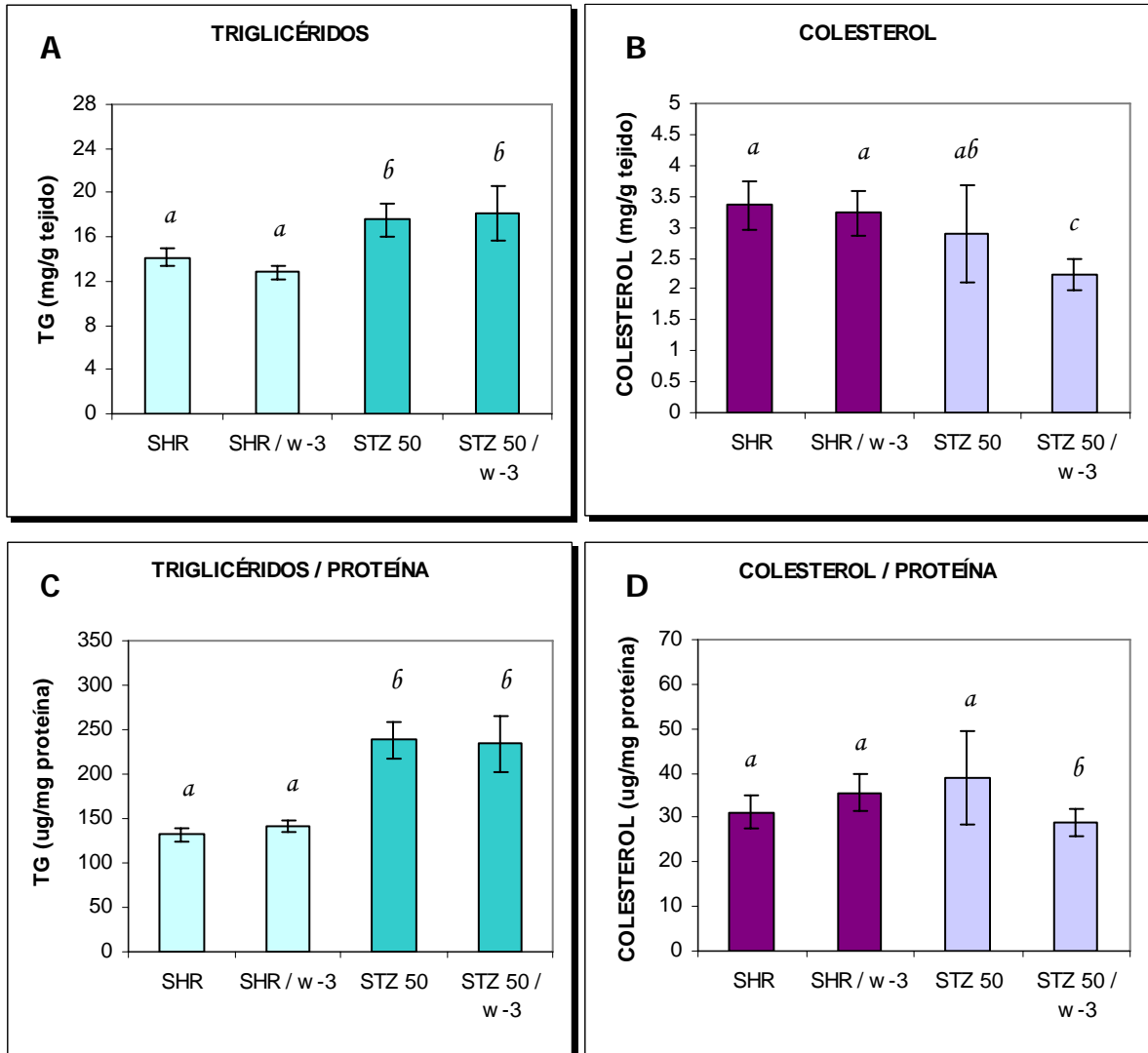


Figura 26. Cuantificación de triglicéridos y colesterol en hígado a los 8 meses de edad de los grupos con ω -3, SHR y SHR-STZ 50. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cociente triglicéridos/proteína. D) Cociente colesterol/proteína. ($P < 0.05$)

Los cocientes TG/proteína no manifiestan diferencias significativas entre los grupos con suplemento y sin suplemento de ω -3 (Figura 26C). El cociente colesterol/proteína de SHR-STZ con ω -3 fue significativamente más bajo que el de las STZ 50 sin suplemento (Figura 26D). Estos resultados demuestran que en este modelo, los ω -3 tuvieron pocos efectos sobre los parámetros de proteína y lípidos en hígado, ya que de manera general, mantienen la misma proporción que los grupos que no consumieron ω -3.

8.3.2.3 Proteína y Lípidos en Riñón

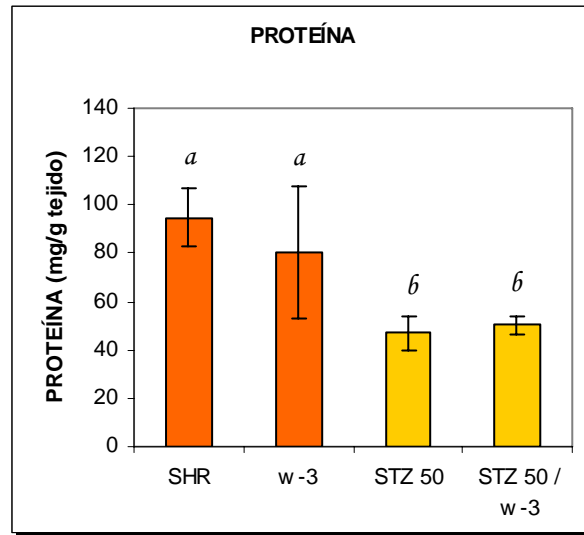


Figura 27. Cantidad de proteína en riñón de SHR control, diabéticas y con suplemento de ω -3. (P < 0.05)

Con relación a las cuantificaciones de lípidos y proteína en riñón, en la figura 27 se muestra la proteína presente en este órgano, como vimos en suero e hígado, el ω -3 no parece afectar la concentración proteica de las SHR control ni de las SHR con 50 mg/kg de STZ.

Las cuantificaciones de lípidos se muestran en la figura 28. Los triglicéridos y el colesterol en riñón no son afectados por el suplemento de ω -3 en SHR control ni en SHR diabéticas, como se aprecia en las figuras 28A y 28B. Los cocientes de TG nos indican que en SHR no hay modificaciones inducidas por los ω -3, sin embargo, en SHR con STZ (50 mg/kg), el grupo suplementado con AG ω -3 presenta una menor cantidad de TG que el grupo sin suplemento (Figura 28C). Por otra parte, el cociente colesterol/proteína no se modificó en los grupos que tomaron el suplemento de ω -3 en comparación con los grupos que no lo consumieron (Figura 28D).

Basándose en los resultados obtenidos de lípidos y proteína, es claro que los ácidos grasos ω -3 no tienen efecto sobre el metabolismo lipídico de las SHR, ni sobre el modelo de DM2 que se empleó en esta investigación, además este suplemento tampoco parece actuar sobre el metabolismo proteico, ya que en órganos y en suero, no se restituyó la proteína

perdida en este modelo. Por lo anterior, no se esperarían cambios inducidos por los ω -3 sobre la composición de ácidos grasos de hígado y riñón.

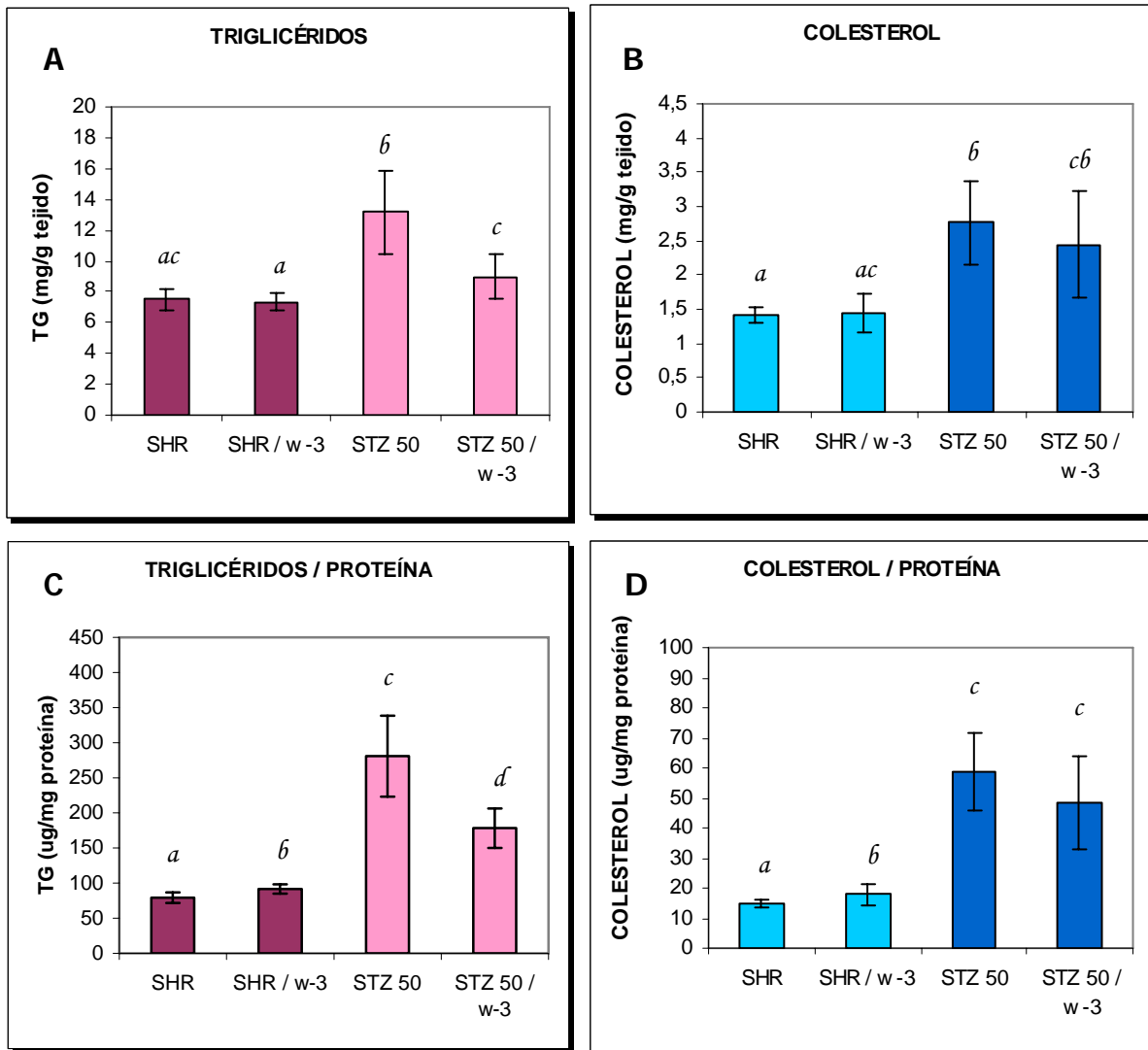


Figura 28. Cuantificación de triglicéridos y colesterol en riñón a la edad de 8 meses de los grupos con ω -3, SHR y SHR-STZ 50. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cociente triglicéridos/proteína. D) Cociente colesterol/proteína. ($P < 0.05$)

8.3.3 Efecto de los ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA) sobre la composición de ácidos grasos en hígado y riñón

Se llevó a cabo el análisis porcentual de los ácidos grasos de hígado y riñón en SHR y SHR-STZ 50 suplementadas con ω -3 a los 8 meses de edad, con la finalidad de observar los cambios provocados por la adición de estos ácidos grasos en la dieta de las ratas.

En la tabla 4 se muestra la composición de AG de hígado; las diferencias provocadas por el suplemento de ω -3 en comparación con el grupo no suplementado, se marcan en negritas. De forma interesante, vemos que las SHR/ ω -3 sí presentaron cambios importantes en la composición de sus AG. El ácido esteárico, que es un ácido graso saturado, mostró una reducción significativa de 28.4% con respecto al grupo SHR. Por otro lado, hubo un aumento significativo en la composición porcentual de algunos ácidos grasos poliinsaturados como el ácido γ linoléico que aumentó 51.6%, el linolénico que aumentó 72.7%, el linoléico conjugado (CLA) cuyo aumento fue de 0.29% a 1.17%, el EPA que se incrementó de 0.20% a 0.52%, el DHA que cambió de 1.34% a 3.31% y los compuestos de 20:3 que aumentaron de 0.76% a 3.44%, todos ellos registraron aumentos respecto al grupo SHR, de manera similar, el ácido eicosenóico (monoinsaturado) se incrementó de 0.40% a 0.62% en SHR/ ω -3.

Estos resultados nos demuestran que los ω -3 sí tienen efectos sobre la composición de ácidos grasos de hígado en SHR y al parecer, este suplemento aumenta la proporción de AGPI's, lo cual coincide con el cociente I / S, que es más alto en el grupo SHR/ ω -3. Lo anterior puede tener un efecto benéfico sobre la fluidez membranal de estas ratas y estar relacionado con sus niveles de presión arterial.

Tabla 4. Composición porcentual de los ácidos grasos de hígado de SHR control y SHR con 50 mg/kg de STZ y grupos con suplemento de ω -3 a los 8 meses de edad.

Ácido graso	SHR	ω -3	STZ 50	STZ 50/ ω -3
Mirístico	0.58% \pm 0.04	0.53% \pm 0.18	0.45% \pm 0.13	0.56% \pm 0.34
Palmitico	27.57% \pm 1.94	24.65% \pm 1.39	27.81% \pm 3.59	23.30% \pm 3.18
Palmitoléico	1.30% \pm 0.05	1.20% \pm 0.10	0.93% \pm 0.30	1.17% \pm 0.32
Esteárico	18.18% \pm 1.41	13.02% \pm 1.88	18.76% \pm 3.34	16.54% \pm 1.66
Oléico	15.69% \pm 1.12	12.94% \pm 2.23	12.96% \pm 2.50	13.68% \pm 1.93
Linoléico	20.88% \pm 0.19	22.19% \pm 2.25	17.28% \pm 4.55	17.46% \pm 1.44
γ Linoléico	0.31% \pm 0.02	0.47% \pm 0.07	0.23% \pm 0.05	0.31% \pm 0.05
Linolénico	0.44% \pm 0	0.76% \pm 0.09	0.32% \pm 0.09	0.46% \pm 0.24
Linoléico conjugado	0.29% \pm 0.08	1.17% \pm 0.11	0.67% \pm 0.37	1.38% \pm 0.66
Eicosenóico	0.40% \pm 0	0.62% \pm 0.18	0.57% \pm 0.40	0.63% \pm 0.41
Araquidónico	10.67% \pm 3.73	13.18% \pm 2.13	11.21% \pm 3.84	13.57% \pm 2.08
Eicosapentaenóico	0.20% \pm 0.01	0.52% \pm 0.11	0.80% \pm 0.46	0.89% \pm 0.21
Docosahexaenóico	1.34% \pm 0.50	3.31% \pm 0.50	3.16% \pm 1.51	4.86% \pm 1.21
Compuestos de 20:3	0.76% \pm 0.11	3.44% \pm 0.29	2.97% \pm 1.61	3.33% \pm 1.01
AG no identificados	1.43% \pm 0.04	2.01% \pm 0.28	1.98% \pm 0.43	1.85% \pm 0.25
I / S	1.13 \pm 0.16	1.57 \pm 0.14	0.73 \pm 0.29	1.44 \pm 0.21

Por otra parte, la composición de AG de hígado de SHR-STZ 50/ ω -3 no mostró diferencias significativas con el grupo STZ 50, únicamente ocurrió un ligero aumento en el ácido γ linoléico de 0.23% a 0.31%. Resulta llamativo que las ratas inyectadas con STZ que recibieron el suplemento de ω -3 no presentaran cambios en su composición de AG, al parecer este suplemento no tiene efecto sobre las ratas diabéticas, lo cual concuerda con los resultados de lípidos en este órgano, no obstante, el cociente I / S es más alto en el grupo STZ 50/ ω -3 sugiriéndonos que a pesar de no haber diferencias significativas con el grupo STZ 50, el grupo con ω -3 presenta un mayor índice de AG insaturados.

Tabla 5. Composición porcentual de los ácidos grasos de riñón de SHR control y SHR con 50 mg/kg de STZ y grupos con suplemento de ω -3 a los 8 meses de edad.

Ácido graso	SHR	ω -3	STZ 50	STZ 50/ ω -3
Mirístico	0.82% \pm 0.04	0.56% \pm 0.41	0.62% \pm 0.13	1.28% \pm 0.70
Palmítico	28.19% \pm 0.38	19.69% \pm 1.40	29.24% \pm 5.60	26.71% \pm 5.38
Palmitoléico	1.36% \pm 0.02	1.08% \pm 0.50	1.16% \pm 0.22	2.02% \pm 0.98
Estearico	25.54% \pm 0.05	18.07% \pm 0.98	23.65% \pm 5.11	15.05% \pm 1.67
Oléico	19.54% \pm 0.14	14.65% \pm 2.53	16.57% \pm 4.39	23.51% \pm 1.50
Linoléico	12.54% \pm 0.13	18.86% \pm 2.81	14.13% \pm 3.40	19.02% \pm 1.32
γ Linoléico	0.13% \pm 0	0.13% \pm 0.01	0.16% \pm 0.06	0.12% \pm 0.04
Linolénico	0.36% \pm 0.04	0.40% \pm 0.16	0.25% \pm 0.15	0.35% \pm 0.10
Linolénico conjugado	0.04% \pm 0	0.17% \pm 0.04	0.44% \pm 0.17	0.51% \pm 0.15
Eicosenóico	0.69% \pm 0.09	0.39% \pm 0.19	0.42% \pm 0.20	0.45% \pm 0.07
Araquidónico	6.28% \pm 0.16	21.42% \pm 3.86	9.81% \pm 3.56	8.73% \pm 4.21
Eicosapentaenóico	0.33% \pm 0.22	0.43% \pm 0.13	0.41% \pm 0.19	0.31% \pm 0.16
Docosahexaenóico	0.88% \pm 0.29	1.39% \pm 0.57	0.93% \pm 0.35	1.14% \pm 0.62
Compuestos de 20:3	0.91% \pm 0.10	0.92% \pm 0.30	1.00% \pm 0.72	1.09% \pm 0.82
AG No Identificados	2.42% \pm 0.26	2.48% \pm 0.78	2.39% \pm 0.98	1.88% \pm 0.51
I / S	0.79 \pm 0.01	1.43 \pm 0.32	0.87 \pm 0.37	1.32 \pm 0.37

La composición de AG de riñón se muestra en tabla 5, el grupo ω -3 también presentó diferencias en comparación con el grupo SHR. Podemos apreciar una disminución en los ácidos grasos saturados palmítico (de 28.19% a 19.69%) y esteárico (de 25.54% a 18.07%), así como en los monoinsaturados oléico (de 19.54% a 14.65%) y eicosenóico (de 0.69% a 0.39%). En este grupo también aumentó la proporción de AGPI's como el linoléico que se incrementó 50%, CLA que subió de 0.04% a 0.17% y el araquidónico, este último tuvo un aumento 3 veces mayor que en las SHR, lo cual resulta un tanto contradictorio, ya que este ácido graso comúnmente es relacionado con el aumento de la presión arterial, sin embargo, en nuestras ratas se retrasa el desarrollo de hipertensión en SHR/ ω -3. Por otra parte, el cociente I / S es 81% más alto en el grupo SHR/ ω -3 (1.43) en comparación con el grupo SHR (0.79), lo cual nos sugiere una mayor fluidez membranal que podría estar asociada con el retraso de la hipertensión en el grupo SHR/ ω -3.

8.4 Efecto de la dieta hipercalórica (DHC) y de los ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA) en SHR y SHR-STZ 50

En esta investigación también se proporcionó una dieta hipercalórica a SHR y SHR diabéticas, con el fin de simular una alimentación inadecuada, alta en grasas saturadas y carbohidratos, lo anterior fue para ver el efecto de esta dieta en ratas control y para agravar el cuadro de diabetes de las ratas con STZ. Adicionalmente se suplementó con ácidos grasos ω -3 a otros dos grupos, uno de SHR y otro de SHR-STZ 50 alimentados con DHC con la intención de estudiar el efecto de los ω -3 en dicha dieta hipercalórica.

8.4.1 Glucosa, presión arterial y peso

En la figura 29 se representan los rangos entre los que oscilaron los niveles de glucosa de los grupos con DHC y DHC/ ω -3, podemos ver que la DHC no provocó modificaciones en la glicemia de las SHR, ya que estas ratas mantuvieron la glicemia por debajo de los 100 mg/dl (Figura 29A). Las ratas con DHC que recibieron el suplemento de ω -3 no muestran diferencias significativas en cuanto al grupo sin suplemento, como vemos en la figura 29B, la glicemia permaneció dentro de valores normales (100 mg/dl). Estos datos nos demuestran que la DHC no altera la glicemia de las SHR y que el ω -3 no tiene efectos aparentes sobre la glucosa en este modelo de ratas.

En lo concerniente a las ratas diabéticas (50 mg/kg STZ), la figura 29C nos muestra que el rango de glucosa de las SHR con DHC es menor que el de las ratas con STZ sin esta dieta (Figura 9D); sin embargo, hay una oscilación en los niveles de glucosa, en donde el rango se amplía de las semanas 6 a 11 de edad, después parece controlarse y a partir de la semana 23 el rango va aumentando conforme a la edad. Al parecer la DHC propicia cierto control de la glicemia, sin embargo, este control se va perdiendo con el paso del tiempo, posiblemente por los efectos dañinos de esta dieta. Los AG ω -3 promueven un mejor control de la glicemia, lo cual se refleja en el área representada en la figura 29D, en este grupo se aprecia que la glicemia oscila entre los 100 mg/dl y 120 md/dl y sólo hasta la edad de 27 semanas se presenta un área más extensa, reflejando la disminución del control de la glicemia por parte de los ω -3.

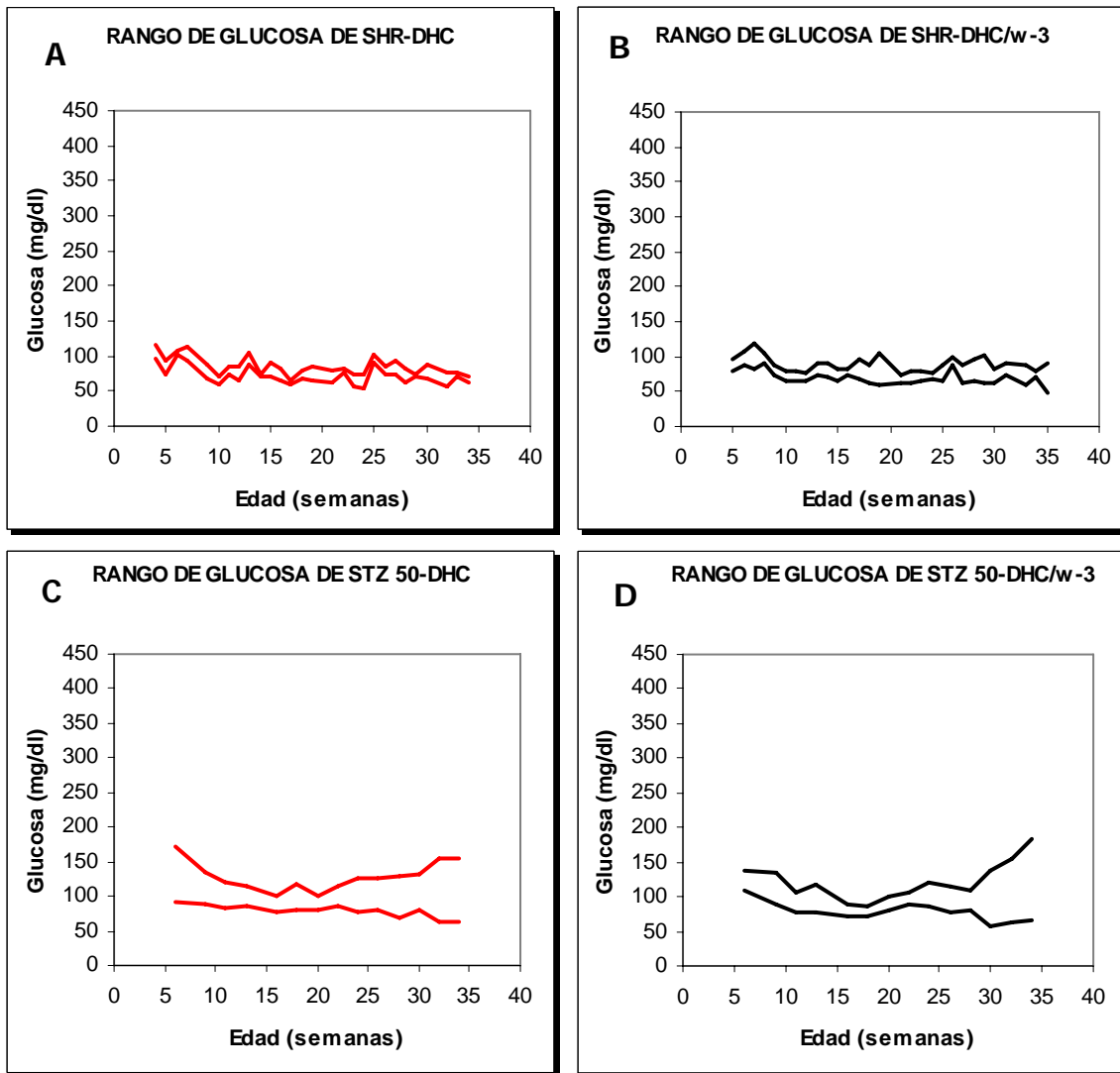


Figura 29. Maximos y mınimos en que se mantuvieron los niveles de glucosa sanguínea a partir del destete y hasta los 8 meses de edad. A) Rango de glucosa de las SHR con DHC. B) Rango de glucosa de SHR-DHC con ω -3. C) Rango de glucosa de SHR-STZ 50 con DHC. D) Rango de SHR-STZ 50 con DHC y ω -3.

La presión sistólica se muestra en la figura 30; en el grupo SHR-DHC la hipertensión (>140 mmHg) se alcanzó a la edad de 17 semanas, por lo que, contrario a lo que esperábamos, la DHC no acelera el desarrollo de hipertensión en SHR (Figura 30A). En las SHR con DHC y ω -3, la hipertensión se desarrolla a la edad de 10 semanas, igual que ocurre en las ratas control (Figura 10A), esto nos sugiere que el suplemento de ω -3 no tiene efecto sobre el desarrollo de la hipertensión. (Figura 30B). En el caso de las ratas con STZ, en las figuras 30C y 30D observamos que la presión de los grupos con DHC y con DHC/ ω -3 no es estadísticamente diferente, no obstante, en las ratas con dieta hipercalórica la presión

sobrepasa los 140 mmHg a las 17 semanas y en las ratas con DHC más suplemento de ω -3 se alcanza este valor de presión a las 19 semanas.

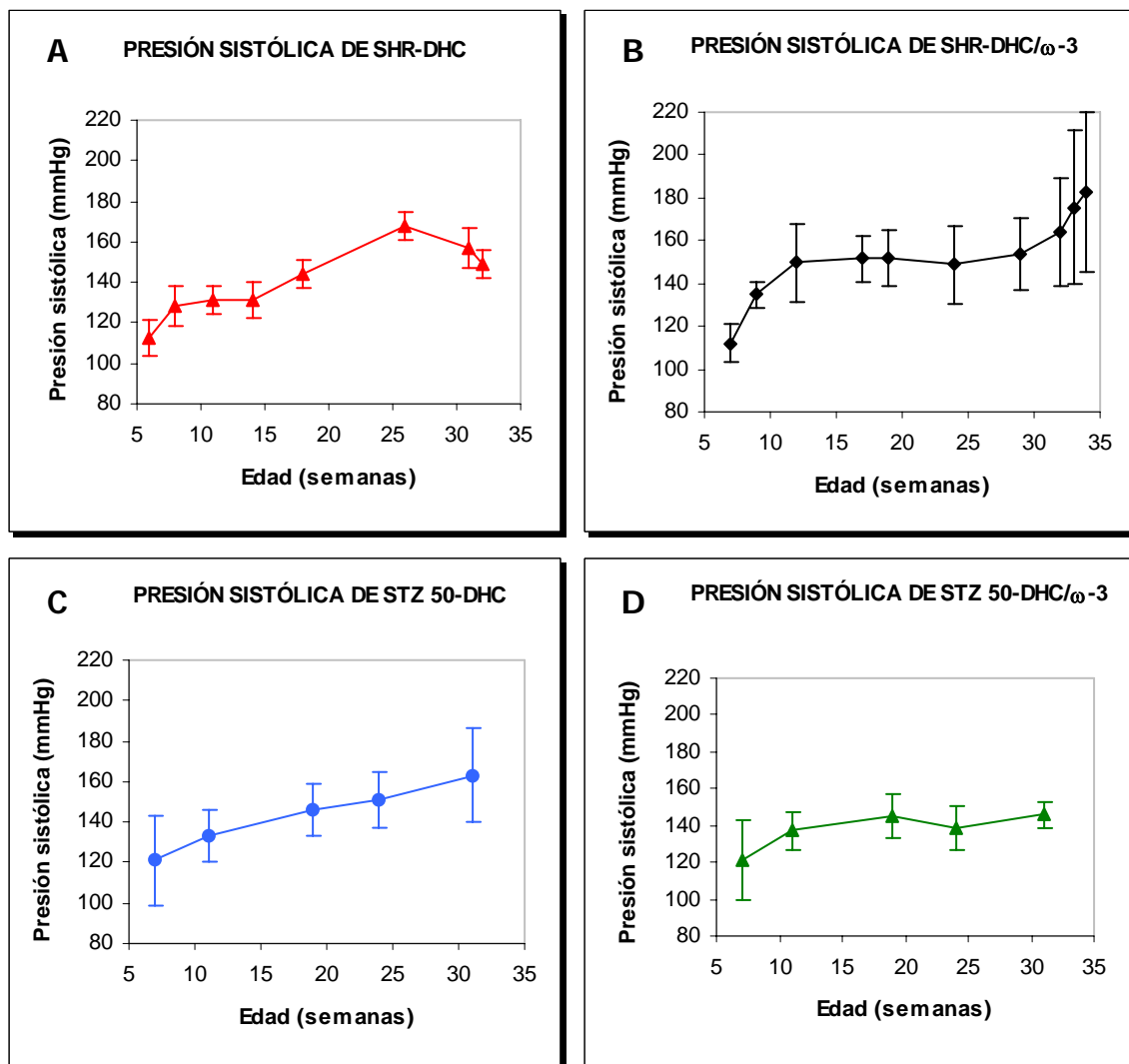


Figura 30. Registro de presión arterial sistólica de SHR y STZ 50 con DHC y suplemento de ácidos grasos ω -3. A) Presión sistólica de SHR con DHC. B) Presión sistólica de SHR con DHC y ω -3. C) Presión sistólica de STZ 50 con DHC. D) Presión sistólica de STZ 50 con DHC y ω -3.

Con respecto al peso corporal de las ratas, en las figuras 31A y 31B, podemos apreciar que la ganancia de peso no se ve afectada por la DHC ni por la adición de los ácidos grasos ω -3; el grupo STZ 50 con DHC/ ω -3 aparentemente tuvo un mayor peso en comparación con el grupo sin suplemento.

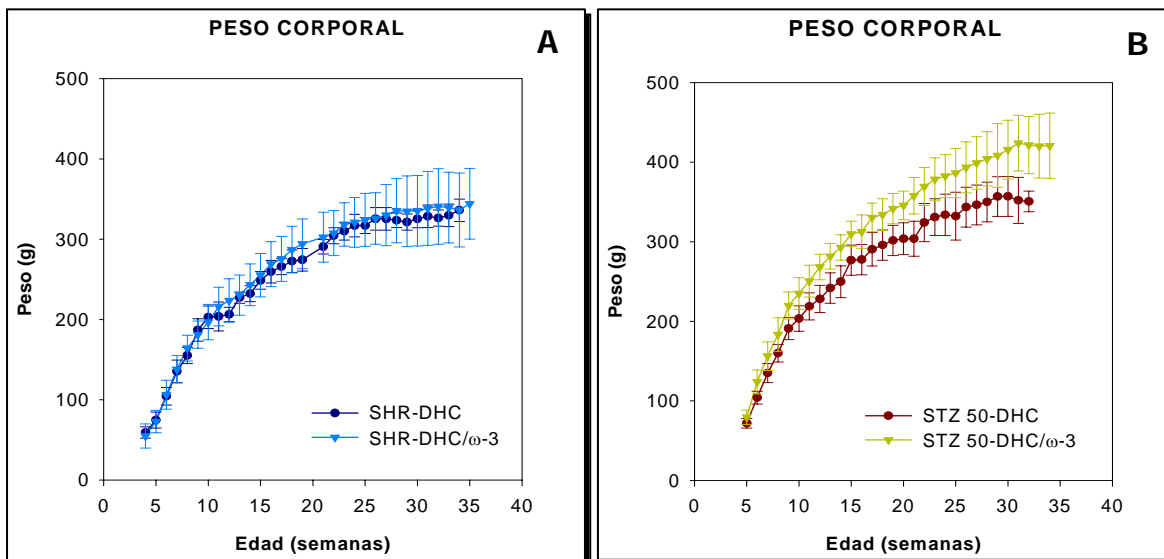


Figura 31. Seguimiento del peso corporal de SHR y SHR-STZ 50 con DHC y DHC más ω -3.

8.4.2 Efecto de la DHC y de los ácidos grasos ω -3 sobre la composición de proteína y lípidos

En esta sección se reportan las cuantificaciones de proteína, triglicéridos y colesterol en suero, hígado y riñón de SHR y SHR-STZ 50 alimentadas con dieta hipercalórica y suplementadas con ácidos grasos ω -3. Para su análisis, se comparan con los grupos SHR control y SHR-STZ (50 mg/kg de peso) para determinar los cambios producidos por la dieta y el suplemento.

8.4.2.1 Proteína y Lípidos en Suero

En la figura 32 está graficada la cantidad de proteína en suero. Podemos ver que la DHC, así como la combinación de DHC y ω -3 no produjeron cambios en la proteína de las SHR (Figura 32A). Las ratas inyectadas con STZ tampoco mostraron modificaciones en la proteína de suero cuando fueron alimentadas con DHC ni cuando recibieron DHC más ω -3, esto nos indica que la modificación de la dieta no agrava ni mejora el cuadro de diabetes tipo 2, ya que la pérdida de proteína es la misma que la de ratas diabéticas. El consumo de ω -3 tampoco tiene efecto sobre la cantidad de proteína (Figura 32B).

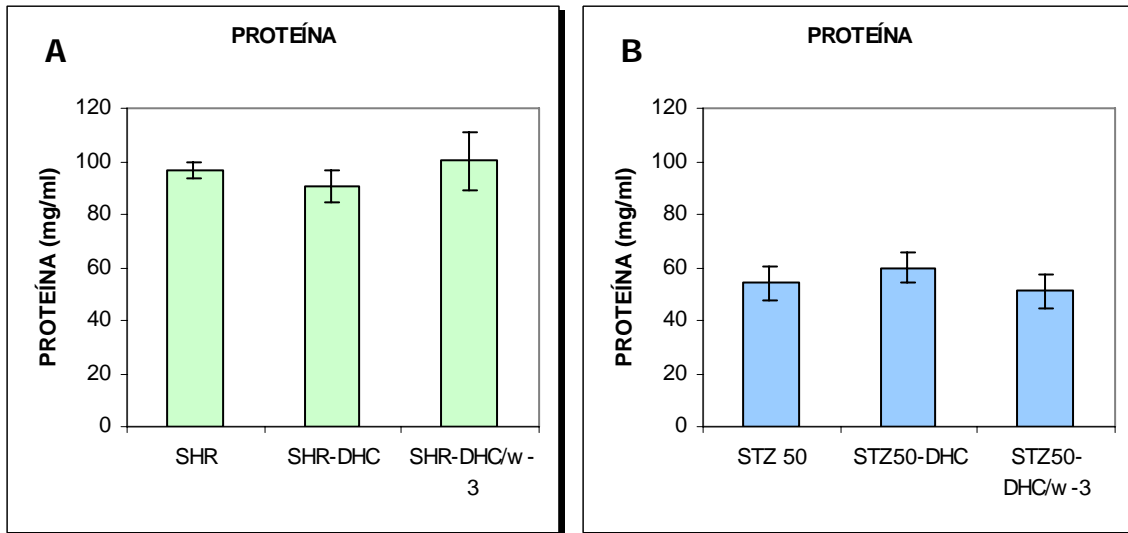


Figura 32. Proteína en suero a los 8 meses de edad. A) Proteína de SHR, SHR con DHC y SHR con DHC/ ω -3. B) Proteína de SHR-STZ 50, STZ 50 con DHC y STZ 50 con DHC y ω -3. ($P < 0.05$)

La cuantificación de triglicéridos en suero se muestra en la figura 33; en SHR la dieta hipercalórica ocasionó un aumento del 150% en la cantidad de TG, esto es, de 58 mg/dl en SHR a 145.1 mg/dl en SHR-DHC. Sin embargo, en el grupo suplementado con ω -3 hubo una reducción de TG del 26% comparado con las ratas sin suplemento, aunque esta disminución no fue suficiente para regresar a los niveles del grupo control (Figura 33A). En lo que respecta a las ratas inducidas con STZ, observamos que la DHC no provocó cambios en los TG, sin embargo, el grupo que recibió los ácidos grasos ω -3 registró un incremento de 85% con relación a las ratas diabéticas con DHC, es decir, de 63.5 mg/dl en STZ 50-DHC a 117.3 mg/dl en STZ 50-DHC/ ω -3 (Figura 33B); al parecer los AG ω -3 estimulan la movilización de lípidos en este grupo. Los cocientes TG/proteína demuestran que la dieta hipercalórica sí aumenta los TG en SHR en una proporción de 166% y los ω -3 disminuyen significativamente estos niveles en 33%, de 16 μ g/mg proteína en SHR-DHC a 10.7 μ g/mg proteína (Figura 33C). En la figura 33D vemos los cocientes TG/proteína de las ratas diabéticas, se observa que los grupos STZ 50 y STZ 50-DHC no muestran diferencias, pero en el grupo STZ 50-DHC/ ω -3 aumentaron los TG en un 96% con respecto al grupo sin suplemento, lo cual nos indica, la movilización de lípidos estimulada por los ácidos grasos ω -3.

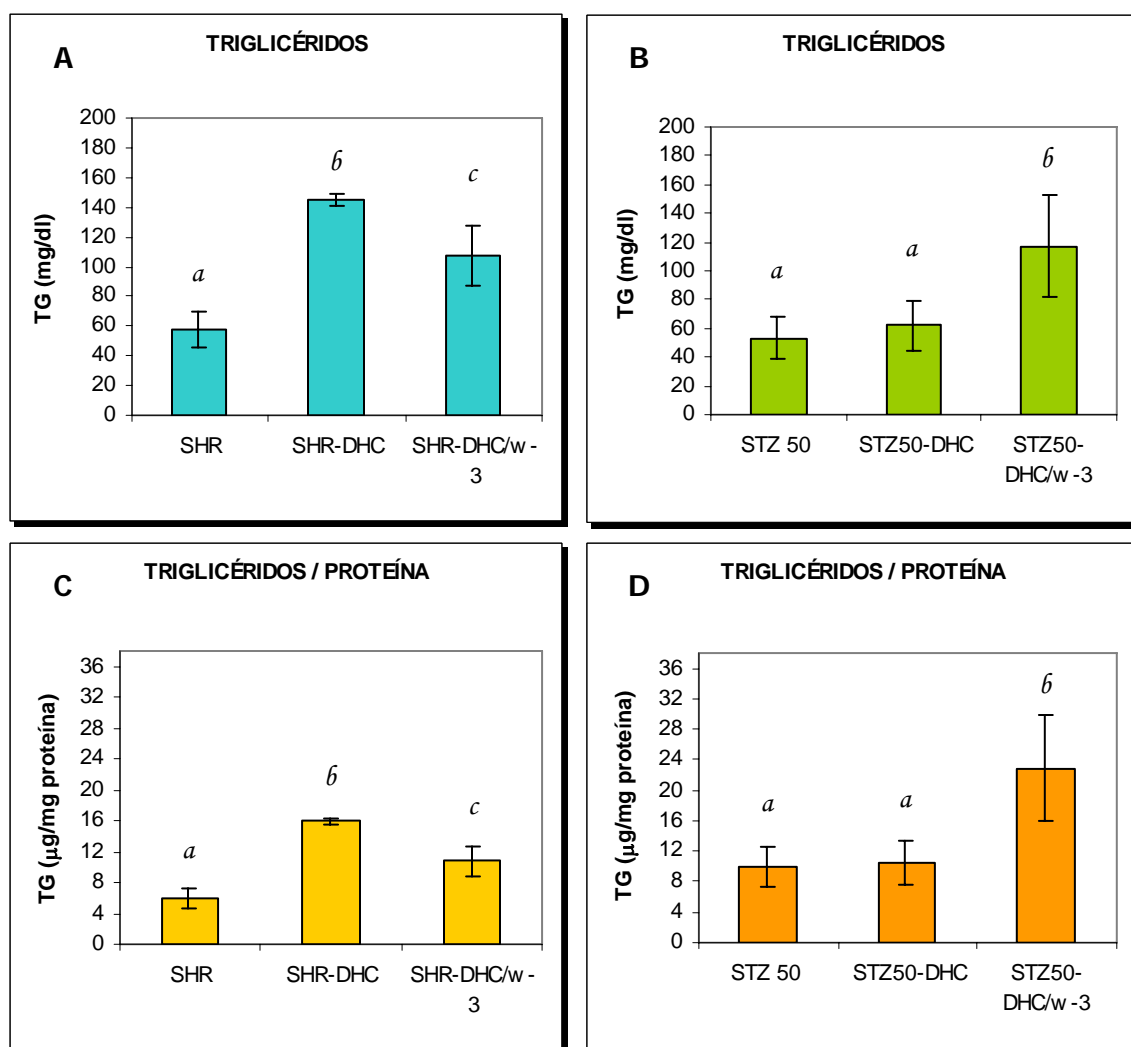


Figura 33. Cuantificación de triglicéridos en suero a la edad de 8 meses de los grupos SHR y SHR-STZ 50 con DHC y DHC más ω -3. A) Cuantificación de triglicéridos en SHR. B) Cuantificación de triglicéridos en SHR diabéticas. C) Cociente triglicéridos/proteína de SHR. D) Cociente triglicéridos/proteína de SHR diabéticas. ($P < 0.05$).

La cuantificación de colesterol está graficada en la figura 34, podemos observar que las SHR alimentadas con dieta hipercalórica presentaron un aumento del 17% en el colesterol, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa; el grupo con DHC y ω -3 (Figura 34A) disminuyó 28% sus niveles de colesterol, pasando de 78.4 mg/dl en SHR-DHC a 56.3 mg/dl en DHC/ ω -3, siendo incluso 16% menor que el colesterol registrado en las SHR control (67 mg/dl).

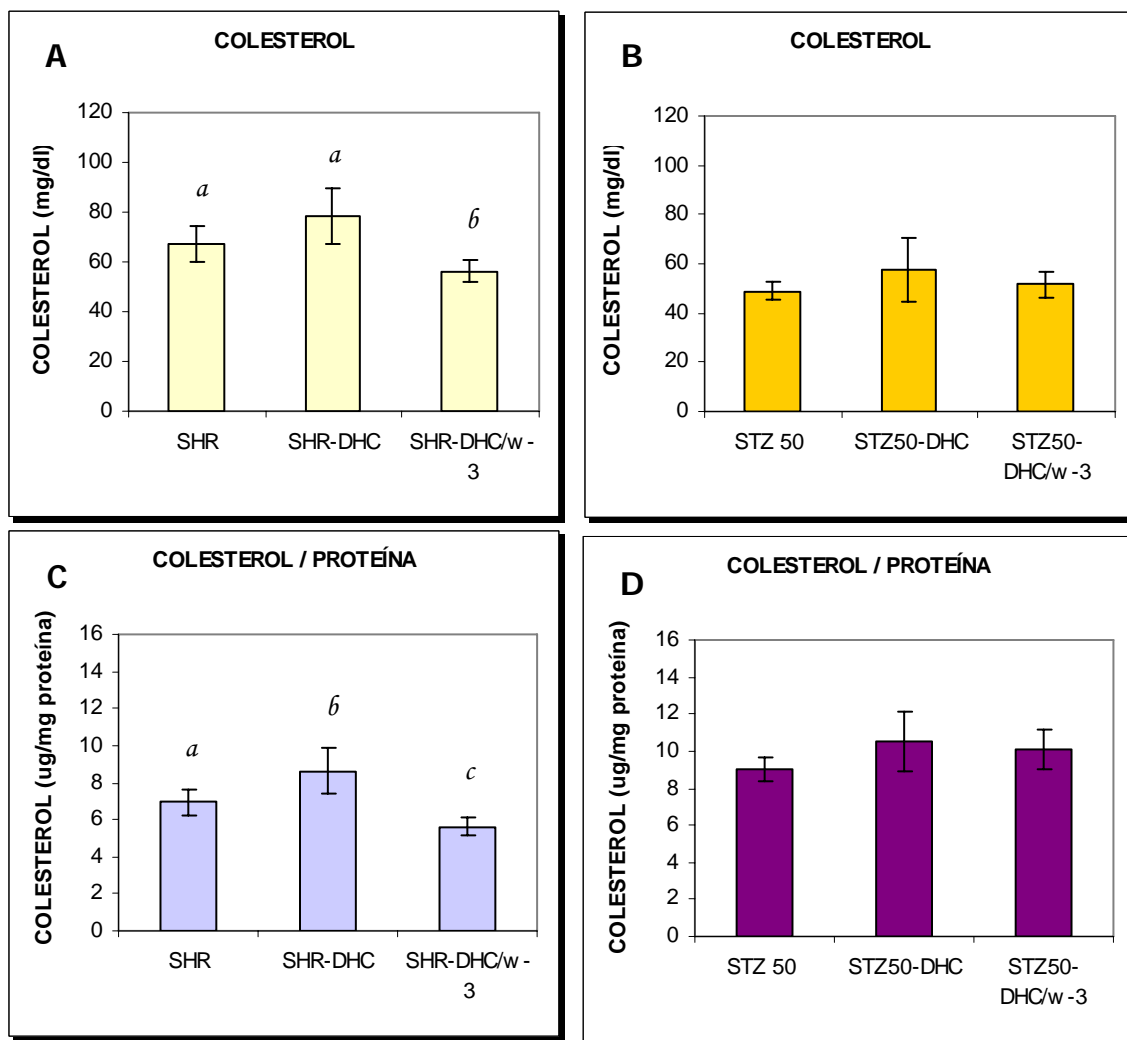


Figura 34. Cuantificación de colesterol en suero a la edad de 8 meses de los grupos SHR y SHR-STZ 50 con DHC y DHC más ω -3. A) Cuantificación de colesterol en SHR. B) Cuantificación de colesterol en SHR diabéticas. C) Cociente colesterol/proteína en SHR. D) Cociente colesterol/proteína en SHR diabéticas. ($P < 0.05$)

En la figura 34B vemos la cuantificación de colesterol de las ratas con STZ. En esta gráfica apreciamos que la DHC no induce modificaciones en el colesterol de suero y que el suplemento de ω -3 tampoco parece alterar este parámetro, ya que los dos grupos se muestran iguales que el de STZ 50 alimentado con dieta normal. Los cocientes colesterol/proteína de las SHR se observan en la figura 34C, aquí vemos que la DHC aumentó el colesterol en un 24.6% comparado con el grupo SHR. Por otra parte, la adición de los ácidos grasos ω -3 junto con la DHC, provocó una reducción del 35% en el colesterol con respecto al grupo DHC, mostrándose incluso 18.8% menor (5.6 mg/dl) que el grupo SHR control (6.9 mg/dl). En la figura 34D se observa que no hay diferencias significativas entre el

grupo STZ 50 y los grupos STZ 50 con DHC y con DHC/ ω -3, sugiriendo que en ratas diabéticas no se afecta la cantidad de colesterol por el cambio en la dieta ni por la ingesta de ω -3.

Los resultados de colesterol nos indican que en SHR normales, la dieta hipercalórica eleva los niveles de colesterol en suero, pero al añadir ω -3, hay una reducción de estos niveles a valores normales e inclusive menores que los grupos con dieta normal. Este fenómeno no se observa con las ratas diabéticas (STZ 50) puesto que el colesterol no fue modificado.

8.4.2.2 Proteína y Lípidos en Hígado

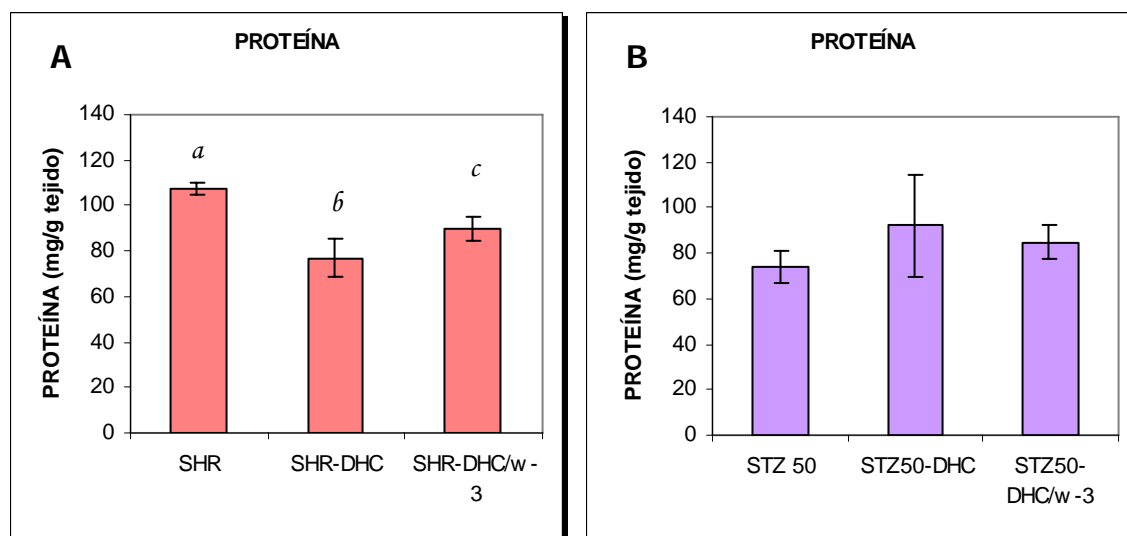


Figura 35. Proteína en hígado a los 8 meses de edad. A) Proteína de SHR, SHR con DHC y SHR con DHC/ ω -3. B) Proteína de SHR-STZ 50, STZ 50 con DHC y STZ 50 con DHC y ω -3. ($P < 0.05$).

En la figura 35 se presentan las cuantificaciones de proteína en hígado de los grupos SHR y STZ 50 con DHC y DHC/ ω -3. El grupo SHR-DHC mostró una pérdida de proteína de 30.2 mg/ml, lo que equivale al 28%, esta pérdida es similar a la encontrada en nuestro grupo STZ 50, en donde la disminución fue de 31%, lo anterior nos indica que la DHC podría semejar un cuadro de diabetes tipo 2 como nuestro modelo inducido con 50 mg/kg de STZ y estar activando la gluconeogénesis. Por otro lado, el grupo suplementado con ω -3 incrementó la cantidad de proteína de 77 mg/ml en DHC a 90 mg/ml en DHC/ ω -3; no obstante, este aumento de 17% no fue suficiente para reponer por completo la pérdida de

proteína causada por la DHC, esto nos indica que el suplemento de ω -3 puede tener efecto restituyendo parte de la proteína perdida (Figura 35A). En las ratas diabéticas, la DHC aparenta tener el efecto contrario al encontrado en SHR normales, pues la proteína aumentó 25% en el grupo STZ 50-DHC y 15% en STZ 50-DHC/ ω -3 con respecto a las ratas STZ 50, no obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 35B).

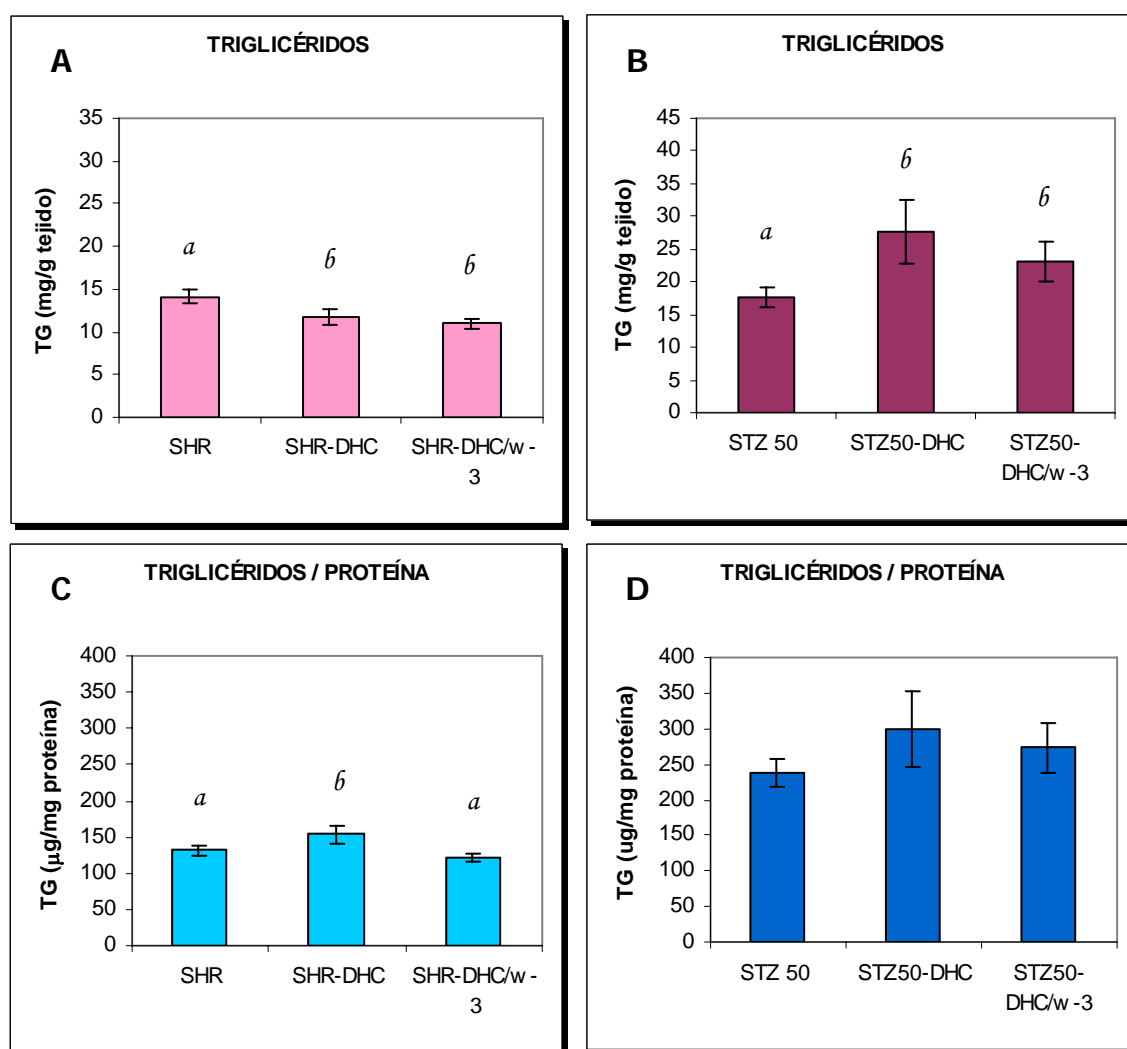


Figura 36. Cuantificación de triglicéridos en hígado a la edad de 8 meses de los grupos SHR y SHR-STZ 50 con DHC y DHC más ω -3. A) Cuantificación de triglicéridos en SHR. B) Cuantificación de triglicéridos en SHR diabéticas. C) Cociente triglicéridos/proteína de SHR. D) Cociente triglicéridos/proteína de SHR diabéticas. ($P < 0.05$)

La figura 36 muestra las cuantificaciones de triglicéridos en hígado; las SHR tuvieron 14.1 mg/g tejido de TG, mientras que en las ratas con DHC los TG disminuyen a 11.8 mg/g tejido, lo que representa una baja de 16.3%, el grupo con ω -3 no tiene diferencias respecto

al grupo sin suplemento (Figura 36A). Las ratas STZ 50 con dieta hipercalórica presentaron un aumento de 57% en la cantidad de triglicéridos, pasando de 17.6 mg/g tejido de STZ 50 a 27.6 mg/g tejido en STZ 50-DHC, los TG de este grupo no son significativamente diferentes que los del grupo que ingirió ω -3, aunque en promedio este último grupo registró 23.2 mg/g tejido de TG, es decir, 16% menos que el grupo sólo con DHC (Figura 36B). Estos resultados parecen contradictorios, ya que en SHR la cantidad de TG desciende en las ratas con dieta hipercalórica, mientras que en ratas diabéticas el grupo alimentado con DHC tuvo más TG. En ambos casos, el suplemento de ω -3 aparentemente no tiene efectos sobre este parámetro.

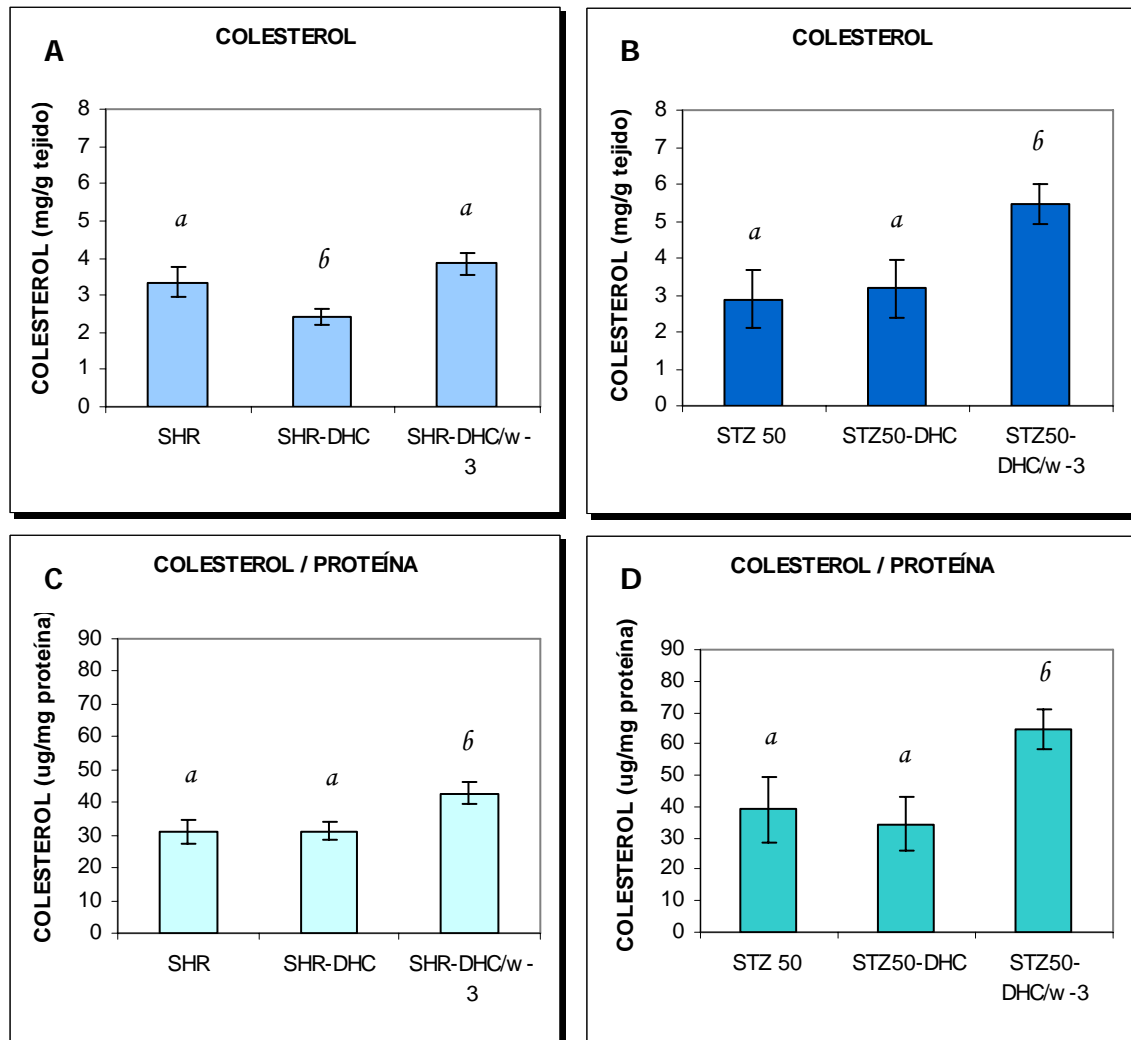


Figura 37. Cuantificación de colesterol en hígado a la edad de 8 meses de los grupos SHR y SHR-STZ 50 con DHC y DHC más ω -3. A) Cuantificación de colesterol en SHR. B) Cuantificación de colesterol en SHR diabéticas. C) Cociente colesterol/proteína en SHR. D) Cociente colesterol/proteína en SHR diabéticas. (P < 0.05)

Los cocientes de triglicéridos se encuentran en las figuras 36C y 36D, los resultados encontrados en las SHR indican que la DHC promueve un aumento de 16.4% en los triglicéridos, ya que cambian de 131.8 mg/g tejido en SHR a 153.4 mg/g tejido en SHR-DHC, en cambio, en el grupo SHR-DHC/ ω -3 los triglicéridos bajan a 121.4 mg/g tejido, esto es casi 21% menos que el grupo sin ω -3. En el caso de los grupos STZ 50, el que tiene DHC manifiesta una tendencia a aumentar los TG en 25% y el grupo suplementado con ω -3 tiene una reducción del 8.3% con respecto al STZ 50-DHC, sin embargo, el análisis estadístico no revela diferencias entre estos grupos. Con relación a estos datos, podemos decir que la DHC estimula la acumulación de triglicéridos en hígado y que los ω -3 tienden a reducir este fenómeno.

Los resultados de colesterol en hígado de SHR se pueden ver en la figura 37A. Las ratas con DHC tuvieron una reducción de 29.4% de colesterol (2.4 mg/g tejido) con respecto al grupo control (3.4 mg/g tejido), en tanto que las ratas con dieta hipercalórica y ω -3 incrementaron el contenido de colesterol en un 62.5% (3.9 mg/g tejido) con relación al grupo SHR-DHC, sin embargo, esta cantidad de colesterol es muy similar a la encontrada en el grupo SHR. En la figura 37B se aprecian las cuantificaciones de colesterol de las SHR con 50 mg/kg de STZ, en estas ratas la dieta hipercalórica no tuvo efectos aparentes, no obstante, en las ratas con DHC y ω -3 se encontró un gran incremento del colesterol equivalente al 73% en comparación con las ratas STZ 50. La cantidad de colesterol respecto a la proteína se observa en las figuras 37C y 37D, en SHR la DHC no induce cambios respecto al grupo control, pero las ratas DHC/ ω -3 muestran un incremento de casi 37%, pasando de 31.25 μ g/mg proteína en SHR a 42.8 μ g/mg proteína en DHC/ ω -3. El mismo fenómeno ocurre en ratas diabéticas, el grupo con DHC no muestra modificaciones en el colesterol, sin embargo las ratas STZ 50-DHC/ ω -3 incrementan la cantidad de colesterol en 87.4%.

Parece ser que la dieta hipercalórica por sí sola no tiene efectos en ratas normales ni en diabéticas, pero al añadir en la dieta ácidos grasos ω -3 ocurre una mayor acumulación de colesterol en hígado, lo cual nos sugiere que una dieta rica en grasas saturadas, fructosa y ω -3 produce efectos deletéreos.

8.4.2.3 Proteína y Lípidos en Riñón

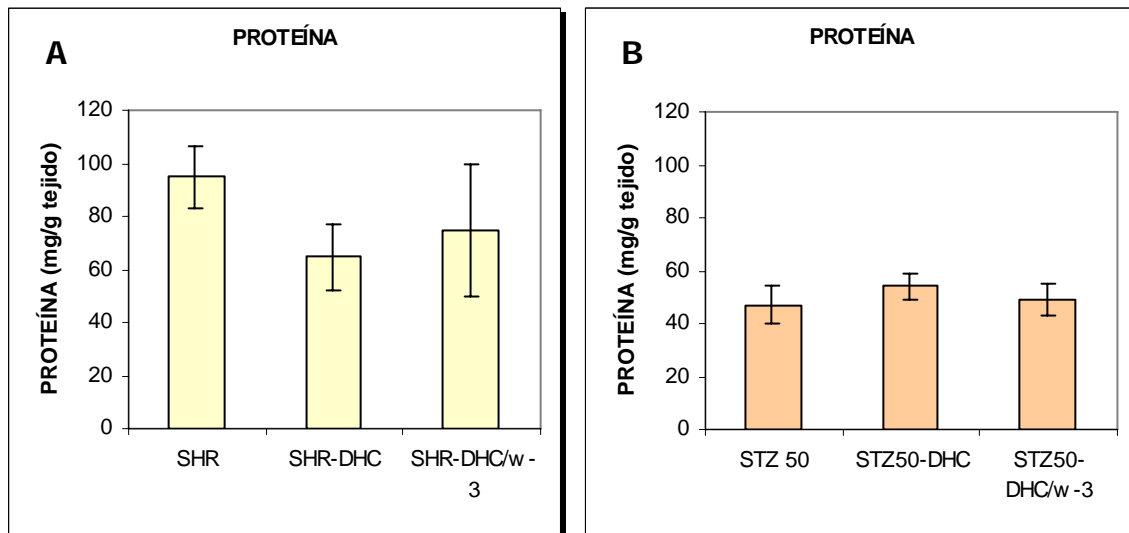


Figura 38. Proteína en riñón a los 8 meses de edad. A) Proteína de SHR, SHR con DHC y SHR con DHC/ ω -3. B) Proteína de SHR-STZ 50, STZ 50 con DHC y STZ 50 con DHC y ω -3. ($P < 0.05$)

Las cuantificaciones de proteína en riñón se observan en la figura 38, en SHR la dieta hipercalórica causó una pérdida de proteína de 31.8%. El grupo con DHC/ ω -3 tuvo un ligero aumento en proteína, pasó de 64.6 mg/g tejido en DHC a 75 mg/g tejido en DHC/ ω -3, aunque esta diferencia no es significativa (Figura 38A). Como observamos, en riñón ocurrió una disminución en la cantidad de proteína en el grupo con DHC, recordando que en hígado se presentó el mismo fenómeno. Es probable que la DHC ocasione alteraciones metabólicas que activen la gluconeogénesis; por otra parte, los ácidos grasos ω -3 podrían estar ayudando a restituir parte de la proteína perdida aunque no de manera significativa. Cuando observamos la proteína en riñón de las ratas diabéticas, notamos que la DHC y los ácidos grasos ω -3 no ocasionan cambios aparentes sobre este parámetro, ya que los tres grupos se comportaron de la misma manera (Figura 38B).

Con respecto a los triglicéridos en riñón, en la figura 39A observamos que el grupo alimentado con DHC registra una disminución del 20% en los TG, esto es, de 7.5 mg/g tejido en SHR a 6.0 mg/g tejido en SHR-DHC, sin embargo, las ratas con DHC/ ω -3 tuvieron 7.9 mg/g tejido, esto implica un aumento de 31.6% en cuanto al grupo DHC. Con estos resultados podríamos decir que el suplemento de ω -3 promueve la acumulación de TG en riñón, no obstante, la cantidad de TG encontrada en ratas con DHC/ ω -3 es muy similar a la

del grupo SHR control y quizá estas diferencias se vean modificadas al normalizar los datos respecto a la cantidad de proteína en riñón. Las SHR-STZ con DHC no mostraron cambios significativos respecto al grupo STZ 50 (Figura 39B), aunque si revisamos los datos de TG, podemos notar que el grupo DHC/ ω -3 (8.98 mg/g tejido) tuvo una cantidad de triglicéridos 32.5% menor que el grupo con DHC (13.3 mg/g tejido) e incluso que el grupo STZ 50 con dieta normal (13.2 mg/g tejido), sugiriéndonos que los ω -3 podrían estar reduciendo la acumulación de TG en riñón de ratas con hiperglicemia ligera.

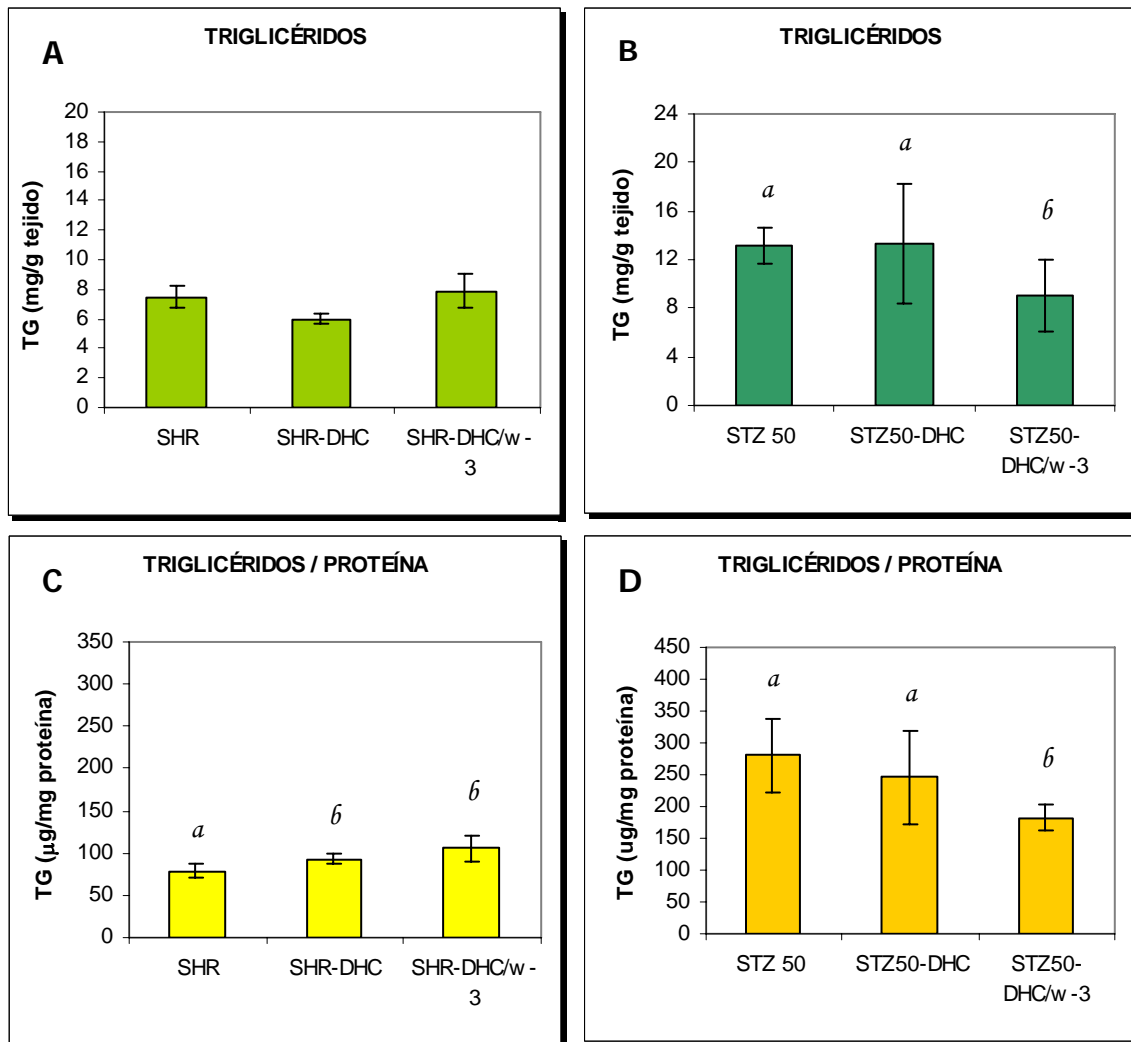


Figura 39. Cuantificación de triglicéridos en riñón a la edad de 8 meses de los grupos SHR y SHR-STZ 50 con DHC y DHC más ω -3. A) Cuantificación de triglicéridos en SHR. B) Cuantificación de triglicéridos en SHR diabéticas. C) Cociente triglicéridos/proteína de SHR. D) Cociente triglicéridos/proteína de SHR diabéticas. (P < 0.05)

Al revisar los cocientes de TG/proteína de SHR (Figura 39C), podemos ver que no hay diferencias entre los TG de los grupos con DHC y DHC/ ω -3. En la figura 39D observamos los cocientes de TG de ratas STZ 50, al parecer la dieta hipercalórica no induce alteraciones en la cantidad de TG. El grupo STZ 50 tuvo un cociente de TG de 280.8 μ g/mg proteína, el grupo STZ 50-DHC de 245.4 μ g/mg proteína, mientras que el cociente del grupo DHC/ ω -3 fue de 182.7 μ g/mg proteína, 25.5% menor que el de STZ 50-DHC. Estos datos nos permiten ver que las ratas STZ 50 suplementadas con ω -3 tienden a bajar sus niveles de TG, inclusive más que las ratas diabéticas (STZ 50).

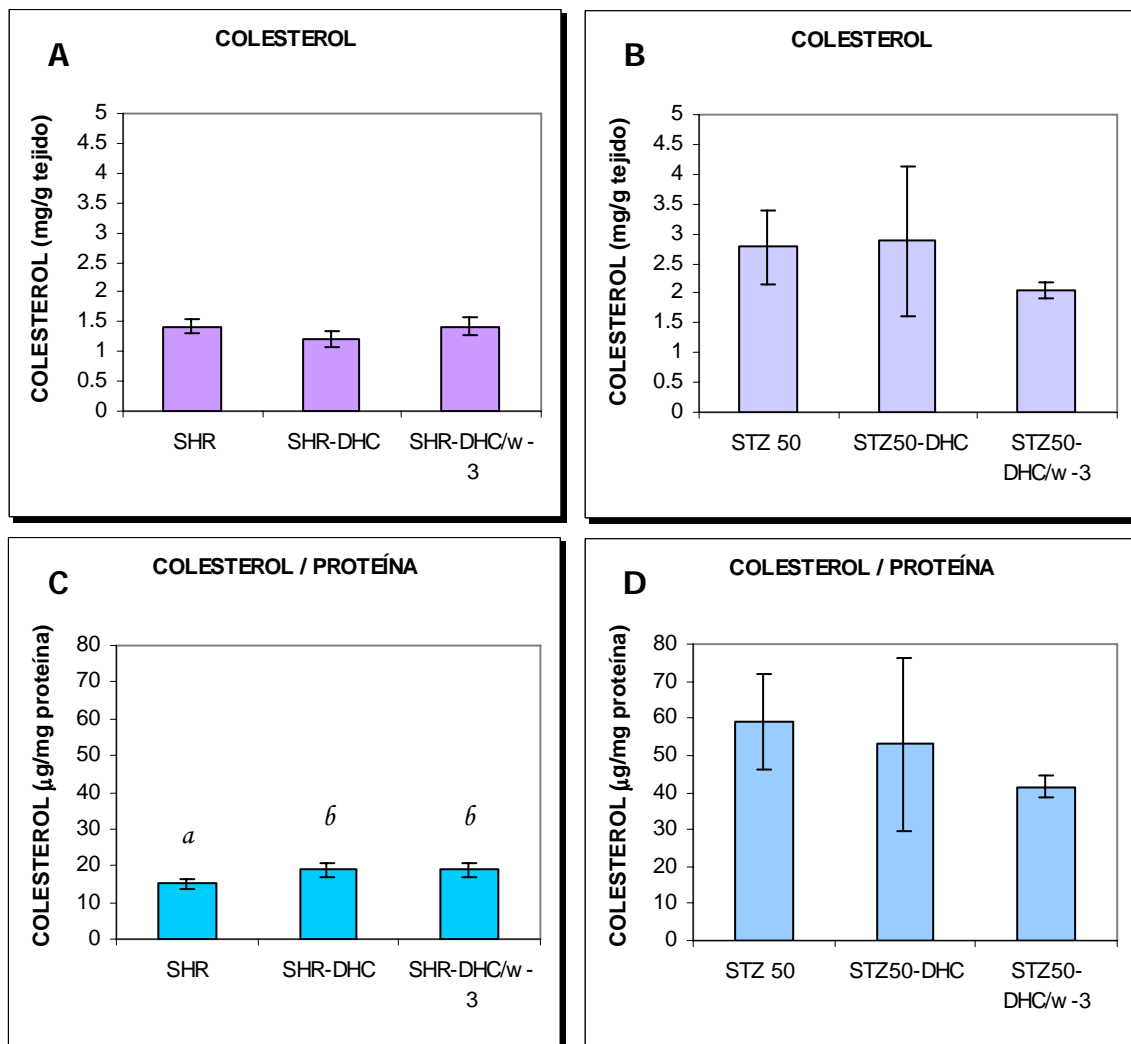


Figura 40. Cuantificación de colesterol en riñón a la edad de 8 meses de los grupos SHR y SHR-STZ 50 con DHC y DHC más ω -3. A) Cuantificación de colesterol en SHR. B) Cuantificación de colesterol en SHR diabéticas. C) Cociente colesterol/proteína en SHR. D) Cociente colesterol/proteína en SHR diabéticas. (P < 0.05)

La cuantificación de colesterol de SHR y SHR-STZ 50 se muestra en la figura 40. Parecer ser que en SHR, la dieta hipercalórica no produce cambios en el colesterol y tampoco la DHC con ω -3, puesto que ambos grupos se comportaron igual que las SHR control (Figura 40A). Con relación al colesterol de las ratas con STZ 50, vemos que el grupo STZ 50-DHC se comportó de manera muy similar al grupo STZ 50, sin embargo, en las ratas STZ 50-DHC/ ω -3 el colesterol bajó a 2.04 mg/g tejido con respecto al grupo STZ 50-DHC que tuvo 2.86 mg/g tejido, lo cual representa un descenso de 28.7% de colesterol, pese a que esta diferencia no es significativa (Figura 40B). La cantidad de colesterol en riñón respecto a la proteína se encuentra graficada en las figuras 40C y 40D. La figura 40C nos indica que en SHR la dieta hipercalórica ocasiona una elevación de 25% en el colesterol y el suplemento de ω -3 no la disminuye, ya que ambos grupos presentan cocientes similares, 18.8 μ g/mg proteína en DHC y 18.9 μ g/mg proteína en DHC/ ω -3. Por otra parte, en ratas con STZ, los cocientes de los grupos STZ 50 y STZ 50-DHC no son estadísticamente distintos, en cambio, el grupo STZ 50-DHC/ ω -3 presentó una disminución en la cantidad de colesterol de 29.5% con respecto al STZ 50 y de 21.5% en cuanto a STZ 50-DHC, si bien la diferencia con este último no es significativa (Figura 40D).

8.4.3 Efecto de la DHC y de los ácidos grasos ω -3 sobre la composición de ácidos grasos

En estos grupos también se llevó a cabo el análisis porcentual de los ácidos grasos de hígado y riñón a los 8 meses de edad, con la finalidad de observar los cambios provocados por la ingesta de la dieta hipercalórica y por la adición de los ácidos grasos ω -3.

En la tabla 6 vemos que la dieta hipercalórica causó pocas modificaciones sobre la composición de ácidos grasos de hígado en las SHR; el ácido oléico aumentó de 15.69% en SHR a 18.05% en SHR-DHC y el γ linoléico cambió de 0.31% en SHR a 0.40% en SHR-DHC, por otra parte el ácido linoléico disminuyó 17% con respecto al grupo SHR control y el ácido linolénico bajó de 0.44% en SHR a 0.38% en SHR-DHC. En lo que se refiere a las ratas con DHC/ ω -3, tampoco apreciamos muchas modificaciones en los ácidos grasos con relación al grupo DHC, algunos de los cambios encontrados son la disminución en el ácido palmitoléico y en el ácido oléico, este último disminuyó significativamente de 18.05% en DHC a 10.02% en

DHC/ ω -3 e incluso se muestra 36% más bajo que el grupo control, esto resulta interesante ya que la dieta hipercalórica está conformada por ácido oléico en un 42.8% (ver Anexo 1, tabla 10) y el suplemento de ω -3 parece impedir la acumulación de este ácido monoinsaturado y favorecer la acumulación de AGPI's. Entre otros cambios observados está el aumento de los ácidos poliinsaturados linoléico, que cambió de 0.38% en DHC a 0.83% en DHC/ ω -3 y del linoléico conjugado (CLA) que registró un aumento de casi 6 veces (1.93% DHC/ ω -3) con respecto al grupo DHC (0.29%). También se aprecian otras diferencias como el incremento de los ácidos eicosenóico, araquidónico, docosahexaenóico (DHA) y compuestos de 20:3 con relación a los grupos SHR y SHR-DHC, sin embargo, estos cambios no son significativos.

Tabla 6. Composición porcentual de los ácidos grasos de hígado a los 8 meses de edad de SHR con DHC y DHC/ ω -3.

Ácido graso	SHR	SHR-DHC	SHR-DHC/ ω -3
Mirístico	0.58% \pm 0.04	0.55% \pm 0.11	0.73% \pm 0.28
Palmitico	27.57% \pm 1.94	23.01% \pm 2.77	28.36% \pm 4.55
Palmitoléico	1.30% \pm 0.05	1.49% \pm 0.23	<u>0.90%</u> \pm 0.26
Esteárico	18.18% \pm 1.41	17.12% \pm 0.03	20.30% \pm 3.60
Oléico	15.69% \pm 1.12	18.05% \pm 0.81	<u>10.02%</u> \pm 4.40
Linoléico	20.88% \pm 0.19	17.33% \pm 0.74	17.07% \pm 0.40
γ Linoléico	0.31% \pm 0.02	0.40% \pm 0.01	0.46% \pm 0.24
Linoléico	0.44% \pm 0	0.38% \pm 0.03	<u>0.83%</u> \pm 0.33
Linoléico conjugado	0.29% \pm 0.08	0.29% \pm 0.05	<u>1.93%</u> \pm 0.93
Eicosenóico	0.40% \pm 0	0.42% \pm 0.35	0.97% \pm 0.44
Araquidónico	10.67% \pm 3.73	15.71% \pm 2.94	20.89% \pm 3.93
Eicosapentaenóico	0.20% \pm 0.01	0.22% \pm 0.04	0.20% \pm 0.08
Docosahexaenóico	1.34% \pm 0.50	1.73% \pm 0.58	2.99% \pm 1.24
Compuestos de 20:3	0.76% \pm 0.11	1.26% \pm 0.49	2.56% \pm 1.22
AG no identificados	1.43% \pm 0.04	1.96% \pm 0.18	2.21% \pm 0.25
I / S	1.13 \pm 0.16	1.42 \pm 0.16	1.06 \pm 0.47

Nota: Las diferencias con el grupo control están marcadas en negritas y las diferencias con el grupo SHR-DHC se encuentran subrayadas.

Tabla 7. Composición porcentual de los ácidos grasos de hígado a los 8 meses de edad de SHR-STZ 50 con DHC y DHC/ ω -3.

Ácido graso	STZ 50	STZ 50-DHC	STZ 50-DHC/ ω -3
Mirístico	0.45% \pm 0.13	0.76% \pm 0.57	0.48% \pm 0.18
Palmitico	27.81% \pm 3.59	25.88% \pm 5.57	24.33% \pm 6.39
Palmitoléico	0.93% \pm 0.30	1.81% \pm 0.88	1.74% \pm 0.41
Esteárico	18.76% \pm 3.34	14.69% \pm 3.82	12.30% \pm 2.26
Oléico	12.96% \pm 2.50	25.90% \pm 5.05	27.10% \pm 2.53
Linoléico	17.28% \pm 4.55	14.15% \pm 3.81	13.26% \pm 3.44
γ Linoléico	0.23% \pm 0.05	0.24% \pm 0.03	0.17% \pm 0.08
Linolénico	0.32% \pm 0.09	0.24% \pm 0.04	<u>0.48%</u> \pm 0.13
Linoléico conjugado	0.67% \pm 0.37	0.13% \pm 0.06	<u>0.54%</u> \pm 0.29
Eicosenoico	0.57% \pm 0.40	0.49% \pm 0.05	0.69% \pm 0.31
Araquidónico	11.21% \pm 3.84	10.82% \pm 4.87	11.89% \pm 0.69
Eicosapentaenoico	0.80% \pm 0.46	0.48% \pm 0.20	0.55% \pm 0.33
Docosahexaenoico	3.16% \pm 1.51	1.49% \pm 0.66	<u>4.75%</u> \pm 0.76
Compuestos de 20:3	2.97% \pm 1.61	1.05% \pm 0.17	0.89% \pm 0.50
AG no identificados	1.98% \pm 0.43	1.34% \pm 0.60	1.71% \pm 0.30
I / S	0.73 \pm 0.29	1.17 \pm 0.40	1.50 \pm 0.48

Nota: Las diferencias con el STZ 50 están marcadas en negritas y las diferencias con el grupo STZ 50-DHC se encuentran subrayadas.

En la tabla 7 vemos la composición de AG de hígado de las ratas con STZ, podemos observar un incremento de 99.6% en el ácido oléico en el grupo STZ 50-DHC (25.9%) con respecto al grupo STZ 50 (12.96%), también en el grupo STZ 50-DHC se registró la disminución de algunos AGPI's como el CLA (80% menor que STZ 50), el DHA (52.8% menor que STZ 50) y los compuestos de 20:3 (64.6% menor que STZ 50). El grupo DHC/ ω -3 no tuvo muchos cambios con relación al grupo DHC, entre las diferencias está el aumento del linolénico que pasó de 0.24% a 0.48% en STZ-DHC/ ω -3 y el CLA que aumentó de 0.13% a 0.54% en STZ-DHC/ ω -3. Una diferencia importante es el aumento del DHA que cambió de 1.49% en STZ-DHC a 4.75% en el grupo STZ-DHC/ ω -3, siendo incluso 50% más alto que el grupo STZ 50. Estos resultados nos muestran que en SHR-STZ 50, la DHC propicia la acumulación de ácido oléico y disminuye la proporción de ácidos poliinsaturados. El

suplemento de ω -3 no parece originar cambios importantes en ratas diabéticas aunque sí promueve ligeramente la acumulación de algunos ácidos poliinsaturados como el DHA que es un ω -3.

Tabla 8. Composición porcentual de los ácidos grasos de riñón a los 8 meses de edad de SHR con DHC y DHC/ ω -3.

Ácido graso	SHR	SHR-DHC	SHR-DHC/ ω -3
Mirístico	0.82% \pm 0.04	0.59% \pm 0.07	<u>0.93%</u> \pm 0.22
Palmitico	28.19% \pm 0.38	19.99% \pm 1.36	21.59% \pm 2.31
Palmitoléico	1.36% \pm 0.02	0.86% \pm 0.06	<u>1.22%</u> \pm 0.16
Esteárico	25.54% \pm 0.05	18.43% \pm 0.13	15.64% \pm 2.52
Oléico	19.54% \pm 0.14	17.14% \pm 0.08	21.36% \pm 5.46
Linoléico	12.54% \pm 0.13	15.24% \pm 0.13	<u>18.04%</u> \pm 2.02
γ Linoléico	0.13% \pm 0	0.13% \pm 0.01	0.11% \pm 0.01
Linolénico	0.36% \pm 0.04	0.37% \pm 0.03	0.45% \pm 0.21
Linoléico conjugado	0.04% \pm 0	0.06% \pm 0.01	<u>0.21%</u> \pm 0.13
Eicosenóico	0.69% \pm 0.09	0.70% \pm 0.14	0.50% \pm 0.15
Araquidónico	6.28% \pm 0.16	22.03% \pm 0.97	<u>15.73%</u> \pm 3.08
Eicosapentaenóico	0.33% \pm 0.22	0.21% \pm 0.08	<u>0.45%</u> \pm 0.04
Docosahexaenóico	0.88% \pm 0.29	1.32% \pm 0.12	1.15% \pm 0.08
Compuestos de 20:3	0.91% \pm 0.10	0.75% \pm 0.24	0.67% \pm 0.04
AG no identificados	2.42% \pm 0.26	2.16% \pm 0.11	1.93% \pm 0.54
I / S	0.79 \pm 0.01	1.51 \pm 0.08	1.59 \pm 0.31

Nota: Las diferencias con el grupo control están marcadas en negritas y las diferencias con el grupo SHR-DHC se encuentran subrayadas.

La composición de ácidos grasos de riñón de las SHR se encuentra en la tabla 8, podemos apreciar que la dieta hipercalórica sí generó cambios en los AG de las SHR y estas diferencias parecen un tanto contradictorias, ya que disminuyeron los ácidos grasos saturados, esto es, el ácido mirístico bajó de 0.82% en SHR a 0.59% en SHR-DHC, el palmítico bajó de 28.19% a 19.99% y el esteárico disminuyó de 25.54% a 18.43%. Otros cambios en SHR-DHC se vieron reflejados en los monoinsaturados, ya que el ácido palmitoléico disminuyó 36.7% y el oléico bajó 12.3%, ambos respecto al grupo control. En el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, hubo un aumento importante en el ácido

araquidónico (AA) que subió de 6.28% en SHR a 22.03% en SHR-DHC, el DHA también aumentó 50% con respecto al grupo SHR control. En el grupo con DHC, el cociente I / S fue más alto que el de las ratas control. En lo que respecta al grupo SHR-DHC/ ω -3, igualmente se registraron modificaciones con relación a las ratas DHC sin suplemento, el ácido mirístico se incrementó en un 57.6%, el palmitoléico subió de 0.86% a 1.22%, el linoléico subió también de 15.24% a 18.04% y el CLA de 0.06% a 0.21%. En el AA se registró un descenso de 28.6%, esto es, de 22.03% en SHR-DHC a 15.73% en SHR-DHC/ ω -3, así mismo el ω -3 eicosapentaenoico (EPA) aumentó de 0.21% a 0.45%. Estos resultados nos demuestran que la composición de ácidos grasos del riñón se ve más afectada por la dieta hipercalórica que la composición de hígado, al menos en ratas SHR normales. Los AG ω -3 parecen incrementar la acumulación de los AGPI's que se encuentran en baja proporción, por lo que no se encuentran diferencias entre los cocientes I / S entre los grupos DHC y DHC/ ω -3.

Tabla 9. Composición porcentual de los ácidos grasos de riñón a los 8 meses de edad de SHR-STZ 50 con DHC y DHC/ ω -3.

Ácido graso	STZ 50	STZ 50-DHC	STZ 50-DHC/ ω -3
Mirístico	0.62% \pm 0.13	0.58% \pm 0.22	0.84% \pm 0.46
Palmitico	29.24% \pm 5.60	25.17% \pm 5.80	27.86% \pm 3.62
Palmitoléico	1.16% \pm 0.22	1.01% \pm 0.29	1.53% \pm 0.55
Esteárico	23.65% \pm 5.11	19.38% \pm 2.51	17.56% \pm 6.00
Oléico	16.57% \pm 4.39	16.56% \pm 4.18	20.88% \pm 5.55
Linoléico	14.13% \pm 3.40	13.11% \pm 1.21	14.12% \pm 1.68
γ Linoléico	0.16% \pm 0.06	0.09% \pm 0.06	0.08% \pm 0.01
Linolénico	0.25% \pm 0.15	0.07% \pm 0.04	0.12% \pm 0.02
Linoléico conjugado	0.44% \pm 0.17	0.23% \pm 0.09	0.27% \pm 0.11
Eicosenoico	0.42% \pm 0.20	0.71% \pm 0.42	<u>0.20%</u> \pm 0.05
Araquidónico	9.81% \pm 3.56	20.11% \pm 2.38	<u>9.77%</u> \pm 4.51
Eicosapentaenoico	0.41% \pm 0.19	0.30% \pm 0.07	0.22% \pm 0.09
Docosahexaenoico	0.93% \pm 0.35	1.30% \pm 0.48	0.66% \pm 0.41
Compuestos de 20:3	1.00% \pm 0.72	1.36% \pm 0.75	0.62% \pm 0.17
AG no identificados	2.39% \pm 0.98	2.60% \pm 0.86	1.57% \pm 0.35
I / S	0.87 \pm 0.37	1.20 \pm 0.33	1.18 \pm 0.42

Nota: Las diferencias con el STZ 50 están marcadas en negritas y las diferencias con el grupo STZ 50-DHC se encuentran subrayadas.

En la tabla 9 se observa la composición de ácidos grasos de riñón de las ratas con STZ 50 mg/kg, se aprecia claramente que la DHC no indujo modificaciones importantes en los ácidos grasos. Podemos ver que el ácido esteárico disminuyó un 18% con respecto al grupo STZ 50, aunque este cambio no es significativo. El ácido linolénico bajó de 0.25% en STZ 50 a 0.07% en STZ 50-DHC, mientras que el AA aumentó un 105%, de 9.81% a 20.11% en el grupo con DHC. En lo que respecta a las ratas STZ 50-DHC/ ω -3 vemos que el ácido eicosenóico bajó de 0.71% a 0.20%, con relación al grupo STZ-DHC y el AA disminuyó de 20.11% en STZ 50-DHC a 9.77% en STZ 50-DHC/ ω -3, siendo muy similar al porcentaje del grupo STZ 50 (9.81%).

La composición de los AG de las ratas diabéticas nos indica que la DHC y el suplemento de ω -3 no inducen alteraciones importantes en riñón y quizá la modificación más evidente sea sobre el porcentaje del ácido araquidónico, que en el grupo con DHC y ω -3 parece regresar al porcentaje encontrado en el grupo STZ 50.

8.5 Análisis histopatológico

El análisis histopatológico reveló alteraciones en hígado y riñón que fueron clasificadas según el grado de lesión. Las alteraciones morfológicas observadas en hígado son degeneración grasa o cambio graso e infiltración linfocitaria portal. En riñón se observó esclerosis glomerular y glomerulitis.

- La degeneración grasa se caracteriza por presencia de vacuolas (múltiples o únicas) en el citoplasma celular, las cuales desplazan al núcleo de su posición original. Este tipo de lesión se relaciona con trastornos en el metabolismo de las grasas.
- La infiltración linfocitaria portal se caracteriza por una acumulación de células linfoides en el espacio porta. La acumulación de linfocitos indica una respuesta inflamatoria, la cual puede estar relacionada directamente con el daño al tejido hepático (degeneración grasa) o bien como una respuesta a infección.

- La esclerosis glomerular es un trastorno que se presenta por depósito de membranas hialinas conformadas de proteínas (α y/o β , fibrinógeno, entre otras), que se presentan en personas o animales con hipertensión y/o enfermedades metabólicas como la diabetes. La glomerulitis es una respuesta inflamatoria que se desarrolla por necrosis de las células glomerulares o depósito antígeno-anticuerpo (membranas hialinas).

8.5.1 Efecto de la hiperglicemia (STZ 50 mg/kg de peso corporal) sobre tejido

Hígado

El análisis histológico a los 8 meses de edad reveló que el grupo SHR control no mostró degeneración grasa (Figura 41A), mientras que las SHR inyectadas con STZ (50 mg/kg) presentaron una degeneración grasa leve, sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En el caso de la infiltración linfocitaria, el grupo control mostró un daño patológico leve (Figura 42B), en tanto que las ratas diabéticas tuvieron un daño de leve a moderado, aunque sin diferencias significativas. Al parecer la inyección de STZ no provocó daños histológicos graves al hígado, lo cual era de esperarse considerando que el grupo STZ 50 no presentó alteraciones importantes en los parámetros fisiológicos y bioquímicos que se estudiaron.

Riñón

En el caso del riñón del grupo SHR control a los 8 meses de edad, se observó una glomerulitis muy leve (Figura 43A), mientras que el grupo de SHR diabéticas presentó glomerulitis de grado moderado a severo (Figura 43B). En estos grupos sí se observaron diferencias significativas. Como se mencionó, el daño glomerular se puede presentar en animales con hipertensión, como el caso de las SHR; sin embargo, es evidente que la inducción de diabetes en estas ratas agravó de manera importante el daño renal.

8.5.2 Efecto del suplemento de ω -3 (EPA y DHA) sobre tejido

Hígado

Las SHR suplementadas con ω -3 no mostraron degeneración grasa (Figura 41A), lo cual nos indica que los ácidos grasos ω -3 no promueven la acumulación hepática de lípidos, tal como lo revelaron las cuantificaciones de lípidos en este grupo. Por otra parte, se observó una infiltración linfocitaria leve sin diferencias significativas con el grupo SHR control. En lo que concierne a las SHR diabéticas con suplemento de ω -3 (STZ 50/ ω -3), no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo SHR, esto es, que también mostraron un leve cambio grasa y una infiltración linfocitaria leve (Figuras 41B y 42B).

Riñón

Al igual que el grupo SHR control, las ratas que recibieron el suplemento de ω -3 mostraron un daño glomerular leve (Figura 43A), indicando que estos AG no tienen efectos aparentes sobre este parámetro. Sin embargo, las SHR diabéticas que fueron suplementadas (STZ 50/ ω -3) mostraron una glomerulitis muy leve (Figura 43C flecha blanca), en contraste con las SHR diabéticas sin suplemento que mostraron un daño de moderado a severo. Esto nos sugiere que los ω -3 posiblemente tuvieron un efecto protector sobre la anatomía renal.

8.5.3 Efecto de la DHC y los ácidos grasos ω -3 sobre tejido

Hígado

En lo que respecta al cambio grasa observado en hígado, el grupo SHR-DHC presentó un daño de grado moderado a severo (Figura 41B), a diferencia del grupo control SHR que no mostró cambios patológicos aparentes (Figura 41A). De manera interesante se encontró que el grupo SHR con DHC/ ω -3 no mostró degeneración grasa en el hígado, lo cual nos indica que la acumulación de lípidos en hígado causada por la DHC fue prevenida por el suplemento de ω -3. Con respecto a la infiltración linfocitaria, el grupo SHR-DHC tuvo un daño

moderado, mientras que el grupo con DHC/ ω -3 sólo presentó una infiltración muy leve, sin embargo, el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los grupos.

En el grupo de SHR diabéticas con DHC se observó una degeneración grasa de grado moderado y a pesar de que las ratas diabéticas con dieta normal sólo mostraron un daño leve, no se encontraron diferencias significativas entre estos dos grupos. Las ratas diabéticas con DHC/ ω -3 presentaron un cambio grasoso de moderado a severo, aunque no significativamente diferente del grupo STZ 50-DHC. Respecto a la infiltración linfocitaria, el grupo STZ-DHC al igual que el grupo STZ 50 mostró un daño moderado y el grupo STZ 50-DHC/ ω -3 tuvo un daño muy leve, aunque sin diferencias significativas entre sí.

Riñón

El daño observado en riñón del grupo SHR-DHC fue de moderado a severo (Figuras 43B y 43C flecha azul) y el observado en el grupo SHR-DHC/ ω -3 fue leve (Figura 43A) en comparación con el grupo SHR control que mostró un daño muy leve, no obstante, la prueba estadística no reveló diferencias significativas. Las ratas diabéticas tampoco mostraron diferencias significativas entre sí, el grupo STZ 50-DHC presentó una glomerulitis moderada (Figura 43B), mientras que el grupo STZ 50-DHC/ ω -3 tuvo un daño de moderado a severo.

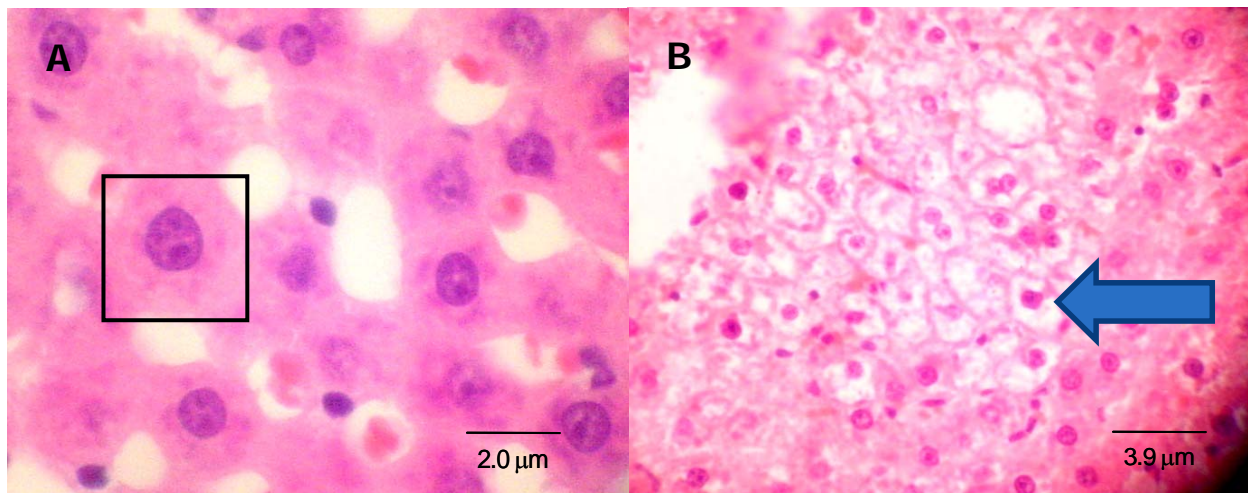


Figura 41. Hepatocitos. A) Sin cambio patológico aparente (SCPA). Aumento 10x. B) Con cambio grasoso (acumulación intracitoplasmática). Aumento 20x. Tinción eosina-hematoxilina.

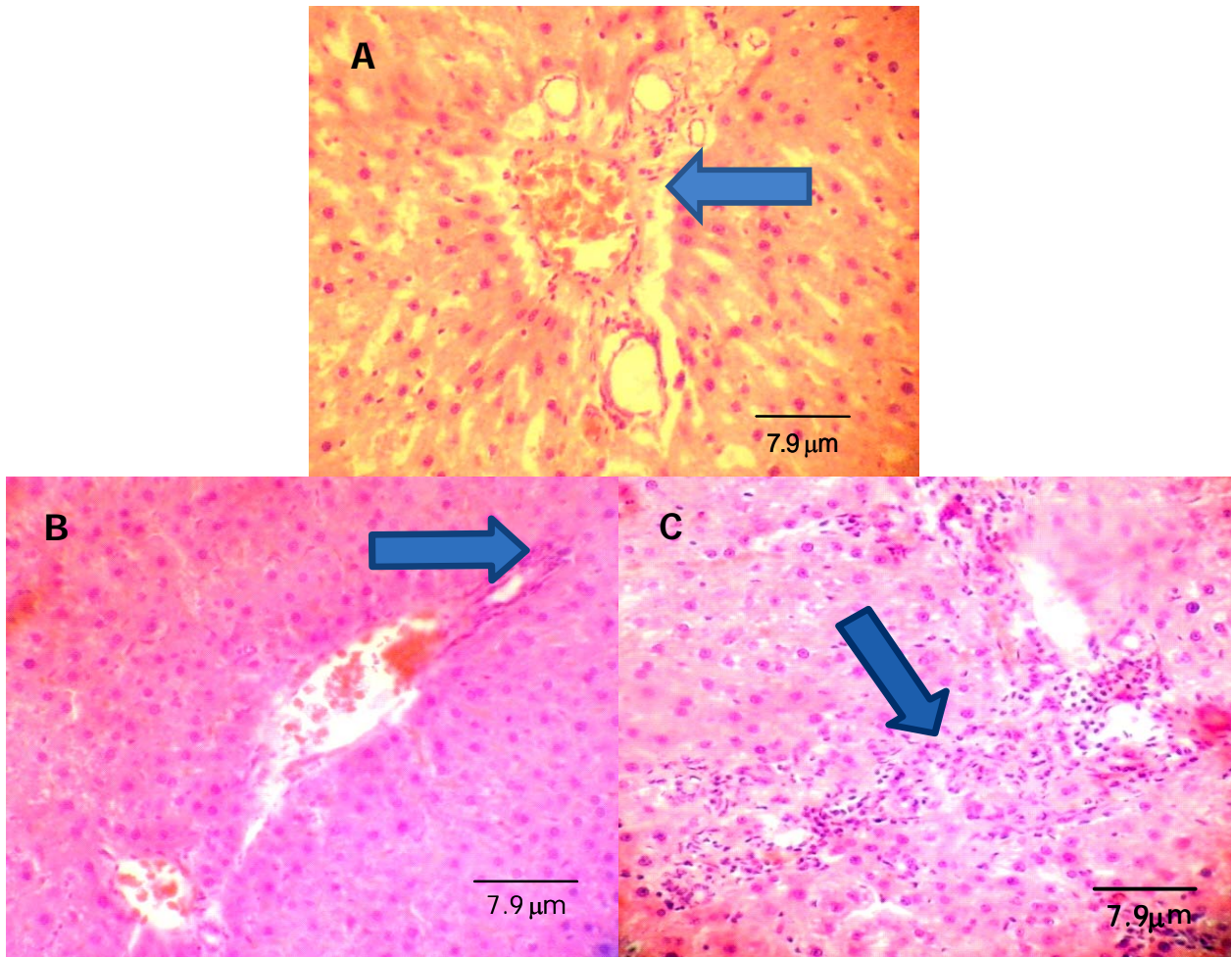


Figura 42. Espacio Porta. A) Sin infiltrado. B) Infiltrado linfocitario leve. C) Infiltrado linfocitario severo. Tinción eosina-hematoxilina. Aumento 10x.

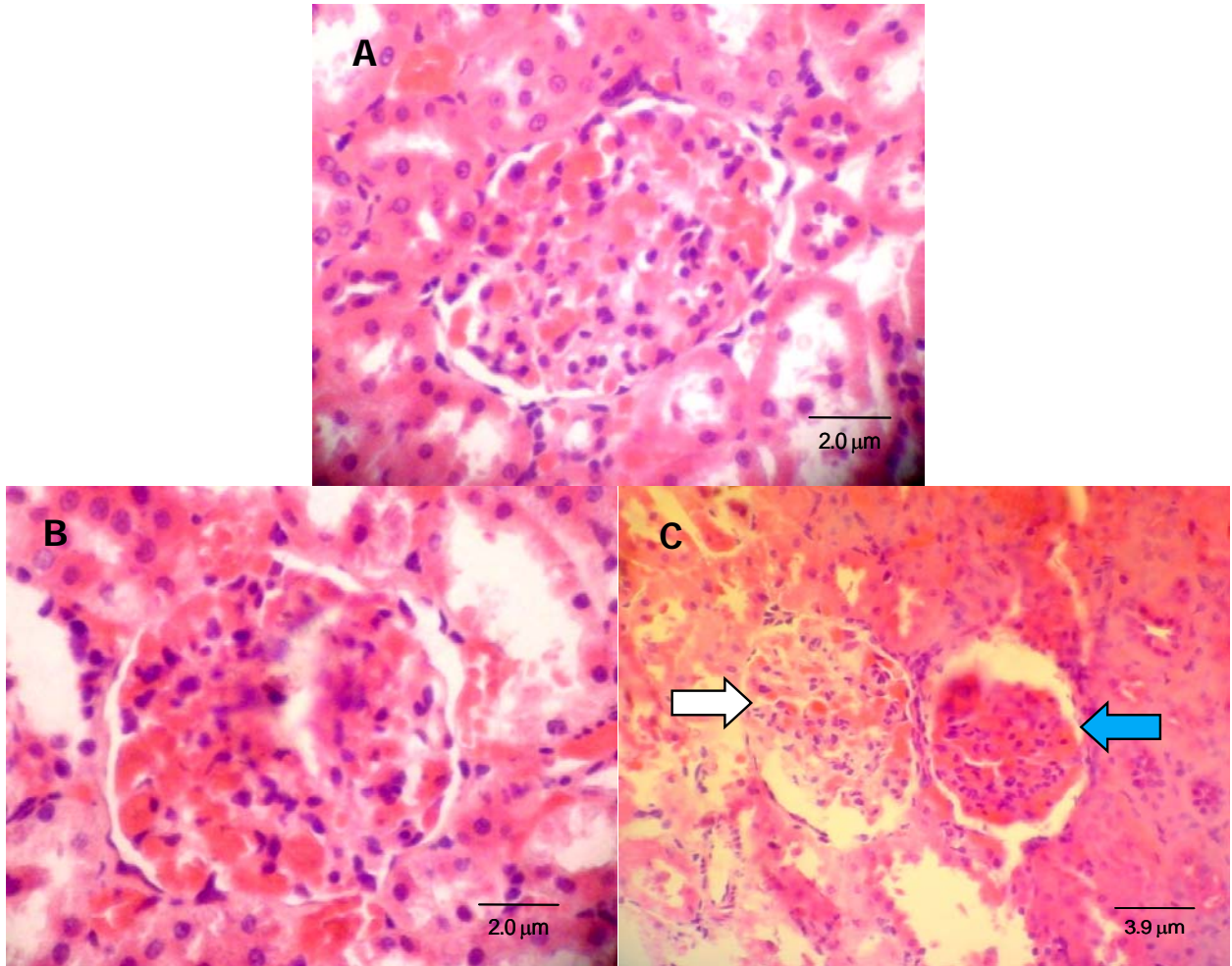


Figura 43. Glomérulo. A) Glomerulitis membranosa leve. Aumento 40x. B) Glomerulitis membranosa moderada. Aumento 40x. C) Glomérulo SCPA (flecha blanca); glomerulitis membranosa severa (flecha azul). Aumento 20x. Tinción eosina-hematoxilina.

9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Debido a que la diabetes tipo 2 y la hipertensión arterial son enfermedades estrechamente relacionadas, es necesario el empleo de modelos animales donde coincidan ambas enfermedades. En esta investigación se probaron tres modelos para generar hiperglicemia ligera que semejara diabetes tipo 2 en ratas espontáneamente hipertensas. Se estudió el efecto de la hiperglicemia sobre el metabolismo de los lípidos y se hizo un seguimiento del desarrollo de la hipertensión en estas ratas.

9.1 Modelos de diabetes tipo 2 en SHR

9.1.1 Pancreatectomía parcial (PTT)

Las ratas sometidas a pancreatectomía parcial no desarrollaron hiperglicemia a lo largo del estudio, lo cual resulta interesante pues a pesar de la extirpación del 50% del páncreas no se presentaron alteraciones aparentes sobre la glucosa, el peso corporal ni la presión arterial. Esto podría estar relacionado con la capacidad de regeneración de las células β pancreáticas que ha sido reportado por Liu *et al.* (2000), donde encontraron que las células β de ratas Sprague-Dawley tienen gran capacidad de adaptación, debido a la cual pueden mantener normoglicemia y normoinsulinemia después de una pancreatectomía del 60%. En ese mismo trabajo encontraron que las ratas tienen una proporción de 45% de células α y 55% de células β en los islotes pancreáticos; después de la cirugía, las ratas fueron capaces de regenerar el 40% del total de células β , además se incrementó la actividad catalítica de la glucoquinasa (enzima clave en el metabolismo de la glucosa) y la secreción de insulina en los islotes de las ratas con PTT; el incremento de estos dos parámetros permitió que la glicemia y la insulina se mantuvieran en niveles normales con respecto a las ratas sin cirugía. En nuestro trabajo, la normoglicemia que mantuvo el grupo PTT podría atribuirse a la capacidad regenerativa de las células β y quizá también a los parámetros estudiados por Liu *et al.* (2000); sin embargo, sería necesario un estudio dirigido en este grupo para corroborar dichos resultados.

9.1.2 100 mg/kg de estreptozotocina (STZ 100)

Las ratas inyectadas con 100 mg/kg de STZ tuvieron una mayor ganancia de peso con respecto a todos los demás grupos (SHR, STZ 50 y PTT), lo cual resulta contradictorio pues se sabe que las ratas diabéticas tienden a ganar menos peso, ya que al no poder metabolizar la glucosa, se promueve la gluconeogénesis y la degradación de proteína y tejido adiposo. Los resultados de peso del grupo STZ 100 difieren de lo reportado en otras investigaciones con SHR inyectadas con 75 mg/kg de STZ, estas ratas tuvieron una menor ganancia de peso en comparación con las SHR control, sin embargo hay que mencionar que la hiperglicemia generada por la STZ en el estudio de Iwase *et al.* (1991) fue de 541 mg/dl a la edad de 6 meses, en tanto que la hiperglicemia generada por Pérez-Hernández (2008) fue de 257 mg/dl a la misma edad. En esta investigación, el grupo STZ 100 tuvo una hiperglicemia mayor a 200 mg/dl con oscilaciones que alcanzaron los 600 mg/dl durante las primeras 15 semanas, sin embargo, después de las 16 semanas de edad, la glucosa se mantuvo por debajo de los 200 mg/dl, esto puede estar relacionado con la capacidad de regeneración y diferenciación que poseen las células β pancreáticas. La diferencia en la hiperglicemia generada con 75 y 100 mg/kg de STZ se le puede atribuir a un error durante la inyección de la STZ en las SHR, si recordamos, el grupo STZ 100 tuvo una mortalidad de 90% reduciendo la población a tres individuos, lo cual nos sugiere que la dosis administrada de STZ provocó un daño muy severo a las células β causando la muerte de la mayoría de las ratas, probablemente las tres ratas que sobrevivieron recibieron una menor dosis de STZ debido a un error en la inyección, lo cual permitió la regeneración parcial de algunas células β y el consecuente control de la glicemia, dicho fenómeno se ve reflejado en la disminución de la glucosa después de las 16 semanas de edad (Figura 4D). También cabe la posibilidad de que las ratas sobrevivientes no tuvieran el genotipo de las SHR y por ello no eran susceptibles al desarrollo de la hipertensión, por lo tanto pudieron ser más resistentes. De hecho, se conoce que cierto porcentaje de la población de SHR no desarrolla hipertensión. Esto es consistente con el hecho de que ratas Wistar inducidas con 100 mg/Kg de STZ a las 48 horas de nacidas, sólo desarrollan hiperglicemia ligera (alrededor de 150 mg/dl) (Orozco-Tapia, 2008), demostrando que el genotipo es muy importante en el desarrollo de la diabetes en este modelo.

La diferencia encontrada en el peso corporal puede atribuirse a que la hiperglicemia severa encontrada durante las primeras semanas en el grupo STZ 100, fue consecuencia de la deficiencia (casi total) en la secreción de insulina; algunas investigaciones proponen que durante la diabetes no controlada hay una deficiencia de insulina y de leptina, la leptina es una hormona involucrada en el control de la ingesta de alimento y su secreción es dependiente de insulina; Sindelar *et al.* (1999) encontraron que en la diabetes no controlada, disminuye la secreción de leptina y esto contribuye a la hiperfagia característica de la diabetes. En nuestro estudio, las ratas STZ 100 alcanzaron los valores máximos de glicemia entre las semanas 8 y 12 de edad, y es a partir de este periodo, que la ganancia de peso comienza a acentuarse en este grupo, probablemente por una mayor ingesta de alimento estimulada por la deficiencia de leptina. Aunado a este fenómeno se encuentra la disminución de la hiperglicemia a partir de la semana 16, el control de la glicemia indica que la glucosa está siendo metabolizada parcialmente y no se promueve gluconeogénesis, por lo que la ganancia de peso de este grupo se mantiene más alta.

9.1.3 50 mg/kg de estreptozotocina (STZ 50)

Este modelo se eligió por ser el más adecuado para generar diabetes tipo 2 en SHR. Se obtuvo a partir de la inyección intraperitoneal de 50 mg/kg de estreptozotocina en neonatos de 48 hrs. de la cepa SHR y a lo largo del experimento se caracterizó por presentar hiperglicemia ligera (140 mg/dl) con oscilaciones entre los 60 mg/dl y 450 mg/dl, lo cual nos demuestra el descontrol de la glicemia. La importancia de tener un modelo con hiperglicemia ligera es la oportunidad de seguirlo durante 8 meses sin tener una pérdida importante de población y el descontrol generado sobre la glicemia, nos muestra los efectos de ésta sobre la presión arterial, el metabolismo de lípidos y la composición de ácidos grasos.

La estreptozotocina es un fármaco empleado para producir diabetes tipo 1 y tipo 2 en modelos experimentales. Este compuesto ingresa de manera específica a la célula β pancreática vía transportador de glucosa 2 (GLUT 2), dentro de la célula induce daño al DNA por alquilación de sitios específicos; el metabolismo de la STZ genera especies reactivas de oxígeno, las cuales contribuyen a la fragmentación del DNA e inducen otros cambios deletéreos sobre las células. El daño severo del DNA por la STZ produce la muerte de células

β por apoptosis o necrosis. La pérdida de células β se refleja en la disminución de la biosíntesis y secreción de insulina y en el aumento subsecuente de la glucosa sanguínea (Szkudelski, 2001; Bolzán y Bianchi, 2002). El páncreas de los neonatos tiene células indiferenciadas y/o con gran capacidad regenerativa, en el modelo neonatal con STZ, la regeneración parcial de las células β en los islotes pancreáticos ocurre enseguida del daño provocado por la STZ, dando como resultado, una mejoría de la hiperglicemia inicial (Iwase *et al.*, 1987), esto se corrobora en el trabajo de Pérez-Hernández (2008) quien hizo el seguimiento de la glucosa sanguínea los días subsecuentes a la inyección de STZ (50 mg/kg), encontrando una glicemia de 190 mg/dl al día siguiente de la inducción, la cual descendió a 96 mg/dl el décimo día de nacimiento y finalmente se mantuvo entre 140 y 150 mg/dl a lo largo de su estudio.

En esta investigación, la dosis de 50 mg/kg de STZ generó un daño moderado a las células β , permitiendo su regeneración parcial, lo cual se ve reflejado en la hiperglicemia ligera que presentó este modelo. No obstante, el área en la que se sitúan los niveles de glicemia aumenta con la edad (Figura 4C), esto podría ser un reflejo del daño generado por la hiperglicemia sobre las células β . Se sabe que la exposición crónica a concentraciones suprafisiológicas de glucosa causa un daño irreversible a la célula β , induciendo defectos en la expresión del gen de insulina, lo cual además genera resistencia a la insulina y la disminución progresiva del contenido y secreción de la misma, dicho fenómeno se conoce como glucotoxicidad (Robertson *et al.*, 2003). Además del daño producido sobre las células β , se sabe que la hiperglicemia crónica promueve una reacción de condensación entre el grupo aldehído de la glucosa (o cualquier glúcido reductor) con el grupo amino terminal de las proteínas, esta unión química conocida como glicación, modifica la estructura de las proteínas alterando sus funciones. Dicho fenómeno puede afectar también a los glucotransportadores, resultando en una menor captación de glucosa en los tejidos periféricos (Gagliardino y Rebolledo, 1992; Durruty y García de los Ríos, 2001).

9.2 Efectos sobre los niveles de glucosa

9.2.1 Ácidos grasos ω -3

Las SHR suplementadas con ω -3 (SHR/ ω -3) no mostraron diferencias en la glicemia con respecto al grupo SHR control. Sin embargo, las SHR diabéticas (STZ 50/ ω -3) mantuvieron niveles normales de glucosa (\sim 100 mg/dl) con desviaciones estándar pequeñas a lo largo del tratamiento, esto nos demuestra que los ácidos grasos ω -3, en particular, el EPA y el DHA promueven el control de glicemia en SHR con diabetes inducida.

Diversos estudios han demostrado que los AGPIs pueden actuar como ligandos activadores de PPARs (peroxisome proliferator-activated receptor). Los PPARs son miembros de la superfamilia de receptores nucleares que se encargan del control de genes de varias rutas del metabolismo de lípidos que incluyen el transporte, captura, unión intracelular y activación de ácidos grasos, así como de su catabolismo o almacenamiento. También se ha visto que los PPARs incrementan la sensibilidad a la insulina y aceleran el metabolismo de la glucosa. Se conocen tres isoformas de PPARs que son: PPAR- α , PPAR- δ/β y PPAR- γ , las tres poseen características estructurales y funcionales similares (Alemán *et al.*, 2004). Los AGPIs se unen con mayor afinidad a PPAR- α . Se ha reportado que en modelos de resistencia a la insulina (ratas con dietas altas en grasa o ratas obesas Zucker), la activación de PPAR- α mejora considerablemente la sensibilidad a la insulina además de reducir la grasa visceral en ambos modelos (Ferré, 2004). Asimismo, existe evidencia de que los ligandos de PPAR- γ aumentan la sensibilidad a la insulina, para lo cual se han propuesto distintos mecanismos. La activación de PPAR- γ estimula la diferenciación de preadipocitos a adipocitos, lo cual aumenta la captura y almacenaje de ácidos grasos libres (AGL) por los nuevos adipocitos y disminuye el direccionamiento de los AGL hacia el músculo esquelético, esto genera un aumento en los receptores para insulina reduciendo la resistencia a la misma. En el tejido adiposo, PPAR- γ disminuye la expresión de algunas hormonas secretadas por los adipocitos que modulan la sensibilidad a la insulina como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), leptina, resistina, interleucina e induce la expresión de adiponectina, la cual aumenta la sensibilidad a la insulina. En el músculo esquelético, PPAR- γ aumenta la expresión del substrato para el receptor de insulina-2 y del transportador de glucosa 4 (GLUT4). También

estimula la expresión de GLUT2 en las células β pancreáticas y reduce la producción hepática de glucosa. Estos mecanismos mejoran el metabolismo de la glucosa, incrementan la sensibilidad a la insulina y reducen la RI (Alemán *et al.*, 2004; Ferré, 2004).

En el estudio realizado por Orozco-Tapia (2008) se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico de células β pancreáticas de ratas Wistar diabéticas con suplemento de ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA), encontrando que las ratas con suplemento mostraron una mayor síntesis de insulina en comparación con las ratas diabéticas sin suplemento.

Esto nos sugiere que además de la mejoría en la sensibilidad a la insulina también se promueve la síntesis y secreción de la misma, gracias a lo cual los niveles de glicemia se mantuvieron normales en nuestro grupo de SHR diabéticas con ω -3.

9.2.2 Dieta hipercalórica (DHC)

La dieta hipercalórica fue proporcionada a las ratas con el fin de simular una alimentación no balanceada rica en grasas principalmente saturadas y carbohidratos, en este caso fructosa al 10% (porcentaje similar al encontrado en los refrescos). De esta manera se pretendía ver el efecto de la DHC en las SHR y agravar el cuadro de diabetes tipo 2 en las SHR-STZ 50. Los niveles de glicemia no se modificaron en el grupo SHR-DHC. Estos resultados concuerdan con otras investigaciones en las cuales, a pesar de proporcionar una dieta con \sim 60% de fructosa, la glicemia no se vio modificada (Hwang *et al.*, 1987; Comte *et al.*, 2004). En las ratas diabéticas con dieta hipercalórica (STZ 50-DHC) se observó un control parcial de la glucosa.

Una probable razón por la cual los niveles de glicemia no se incrementan con la adición de fructosa en la dieta es que ésta es metabolizada de manera distinta a la glucosa, ya que requiere de una enzima específica para ser fosforilada (fructoquinasa). Asimismo, la fructosa es transportada por GLUT 5 (y parcialmente por GLUT 2), de manera que su metabolismo sólo puede ocurrir en las células que expresen a ambos. La fructoquinasa y GLUT 5 se encuentran abundantemente expresados en el hígado, debido a esto, la fructosa es rápidamente fosforilada a fructosa-1-fosfato, ésta es cortada por una aldolasa B, en

gliceraldehído y dihidroxiacetona fosfato, la trioquinasa cataliza la reacción de gliceraldehído con ATP para formar gliceraldehído-3-fosfato. A partir de este punto, su metabolismo es relativamente similar al de la glucosa, sin embargo, es importante recalcar que la fructosa llegó a este nivel metabólico sin pasar por el principal punto de control de la glucólisis, en consecuencia, la fructosa es principalmente utilizada como sustrato para la síntesis de triglicéridos (Mayes, 1993). La conversión de fructosa a triglicéridos consume ATP, esto explica el bajo índice glicémico de la fructosa (5 veces más bajo que el de la glucosa). El índice glicémico de los nutrientes es una medida de su habilidad para elevar los niveles de glucosa sanguínea y es inversamente proporcional a su efecto sobre la reducción del apetito a corto plazo (Anderson *et al.*, 2002).

Se ha reportado que la fructosa no estimula la secreción de insulina en las células β pancreáticas debido a la baja concentración del transportador de fructosa GLUT5 en estas células (Elliot *et al.*, 2002), no obstante, Díaz y Burgos (2002) reportan que la fructosa puede entrar a las células β a través de GLUT2. Otro estudio indica que en las células β , el gliceraldehído (intermediario metabólico de la fructosa) puede actuar como un potente secretágeno de insulina a concentraciones bajas, debido a que incrementa el nivel de NADH en mayor proporción que la glucosa, sin embargo, la exposición continua de la célula β al gliceraldehído también puede causar efectos dañinos, ya que su metabolismo forma metilglioxal y éste a su vez promueve la acumulación de D-lactato y propanediol, los cuales son tóxicos pues acidifican la célula β (MacDonald, 2006).

El control de la glicemia de las SHR diabéticas con DHC y ω -3 (STZ 50-DHC/ ω -3), podría ser atribuido tanto a los efectos de los ácidos grasos ω -3 como al metabolismo de la fructosa de la DHC.

9.3 Efectos sobre la presión arterial

La presión arterial no se vio significativamente alterada por la diabetes ni por la adición de la dieta hipercalórica en las SHR. Esto es consistente con los resultados de glicemia, ya que la inyección de 50 mg/kg de STZ indujo hiperglicemia ligera y por ende no se aceleró el desarrollo de hipertensión en este modelo. Pérez-Hernández (2008) estudió dos modelos de hiperglicemia, ligera y severa (50 y 75 mg/kg de STZ) en SHR, encontrando una

estrecha relación entre el desarrollo de la hipertensión y la hiperglicemia severa (>200 mg/dl), en ese grupo, la hipertensión se desarrolló a las 6 semanas de edad, mientras que en el grupo con hiperglicemia ligera, la hipertensión se alcanzó a la edad de 10 semanas. Lo anterior implica que la hiperglicemia ligera generada por la inyección de 50 mg/kg de STZ probablemente no produjo una glucotoxicidad lo suficientemente severa para dañar el riñón, principal órgano involucrado en el control de la presión arterial y de esta manera, elevar significativamente la presión arterial. La presión arterial tampoco se vio alterada en las SHR (diabéticas y no diabéticas) con DHC y con DHC/ ω -3, lo cual podría estar relacionado con el control parcial de la glicemia observado en estas ratas.

Las SHR diabéticas con ω -3 (STZ 50/ ω -3) tampoco tuvieron presión arterial diferente a las SHR diabéticas sin suplemento (STZ 50). Por otra parte, el grupo de SHR con suplemento de ω -3 disminuyó la presión arterial en comparación con el grupo SHR control, esto fue parcialmente, ya que ambos grupos sobrepasaron los 140 mmHg entre las semanas 10 y 11 de edad, sin embargo, las ratas suplementadas con ω -3 (SHR/ ω -3) presentaron una reducción significativa en la presión arterial durante 17 semanas, es decir de las 15 a las 32 semanas de edad y posteriormente ambos grupos se comportaron de la misma manera (Figura 21A). Estos resultados contrastan con los de Pérez-Hernández (2008) que administró a SHR, un suplemento de ácido α -linolénico (precursor de la serie ω -3) y encontró un retraso en el desarrollo de la hipertensión, ya que las SHR con suplemento sobrepasaron los 140 mmHg a las 20 semanas de edad y a partir de ahí, la presión continuó elevándose hasta 150 mmHg. Las diferencias entre la cinética de la presión arterial reportada por Pérez-Hernández (2008) y los reportados en esta investigación, radican en los suplementos administrados a las SHR, ya que a pesar de tratarse de ácidos grasos de la serie ω -3, su metabolismo, su incorporación a los fosfolípidos y su acción biológica parecen ser diferentes.

En lo que respecta a la presión diastólica (Anexo 3), nosotros tomamos como valor normal de referencia el promedio obtenido por Orozco-Tapia (2008) en ratas Wistar, el cual fue de 115 ± 12 mmHg. Pudimos observar que todos nuestros grupos de SHR Y SHR diabéticas, sobrepasaron ese valor, esto nos sugiere que el basal de presión diastólica es más elevado en las SHR debido probablemente a su genotipo. La presión diastólica nos da indicio del daño vascular (Agrest, 1992), en las SHR control se alcanzó un valor de 160 mmHg, lo

cual podría ser un reflejo de la susceptibilidad de esta cepa a sufrir daños renales o vasculares. A pesar de haber encontrado valores aparentemente elevados, la presión diastólica siguió una tendencia similar a la presión sistólica y no mostró diferencias inducidas por la diabetes ni por la dieta hipercalórica.

El grupo SHR/ ω -3 mantuvo la presión diastólica menor en comparación con el grupo SHR control. Al igual que en la presión sistólica, el control fue parcial y por un periodo más corto, es decir, el suplemento de ácidos grasos ω -3 mantuvo la presión diastólica significativamente más baja durante 8 semanas (de las semanas 24 a la 32 de edad).

Se han propuesto distintos mecanismos por los cuales los ácidos grasos ω -3 pueden contribuir a la disminución de la presión arterial. Varios autores atribuyen el efecto antihipertensivo de los ω -3 a la producción de eicosanoides. Si recordamos, la biosíntesis de AGPIs como el araquidónico y el eicosapentaenóico a partir de los ácidos linoléico (AL) ω -6 y linolénico (ALN) ω -3, requiere la participación de desaturasas y elongasas; el AL y el ALN compiten por las mismas enzimas Δ 5D y Δ 6D desaturasas, además el ALN usa la misma vía metabólica para producir DHA a partir de EPA (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005). Cuando las ratas son suplementadas con ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA), el EPA compite con el AA por su incorporación en los fosfolípidos y también por el acceso a las enzimas que participan en la síntesis de eicosanoides (Covarrubias y Ortega, 2002). El AA es precursor de los prostanoides (prostaglandinas y tromboxanos) de la serie 2 y de los leucotrienos de la serie 4, mientras que el EPA es el precursor de los prostanoides de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5. Cuando se incrementa el cociente ω -3/ ω -6, el EPA inhibe la formación de tromboxano de la serie 2 (TXA₂) que se considera vasoconstrictor y estimulador de la agregación plaquetaria, así como la producción de prostaglandina de la serie 2 (PGE₂) normalmente considerada como mediador pro-inflamatorio (Frenoux *et al.*, 2000; Hirafuji *et al.*, 2003). Sin embargo, hay que mencionar que los productos enzimáticos de la ciclooxigenasa (TX y PGE) pueden tener propiedades antihipertensivas y prohipertensivas dependiendo del perfil de prostanoides producidos, del modelo de hipertensión, así como del órgano en cuestión (Imig, 2006).

Kinsella *et al.* (1990) reportan que la incorporación de ácidos grasos ω -3 a la membrana celular vascular puede incrementar su fluidez y alterar el transporte de iones, enzimas y las actividades de los receptores. Dominiczak y Bohr (1990) proponen que las anormalidades en los sistemas de transporte de membrana de las SHR pueden estar relacionadas con la reducción de la fluidez membranal, el DHA puede normalizar las alteraciones físicas de la membrana celular vascular mediante el incremento de su fluidez, y de esta manera, afectar la permeabilidad de canales iónicos (K_{ATP} y Ca^{2+} tipo L) y estimular la respuesta vasorelajante.

Como se mencionó, los AGPIs son ligandos de PPARs y se ha reportado que los agonistas de PPAR- α pueden tener efectos anti-inflamatorios en células vasculares e incrementar la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). PPAR- α también reduce las concentraciones plasmáticas de interleucina 6 (IL-6) y decremента la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en células del músculo liso vascular (VSMCs) mediante la inhibición de la función del factor nuclear κ B (NF- κ B). Así mismo, los agonistas de PPAR- γ inhiben el receptor tipo 1 de angiotensina II en VSMCs; todos estos fenómenos son benéficos en la hipertensión (Kota *et al.*, 2005).

Es bien sabido que el AA es un ácido graso metabólicamente activo y está involucrado en la regulación de la presión arterial. En esta investigación también se obtuvo la composición porcentual de ácidos grasos de hígado y riñón. En riñón, el grupo SHR tuvo un porcentaje de 6.28% de AA, mientras que el grupo SHR/ ω -3 tuvo 21.42% de AA, recordemos que este último grupo mantuvo más baja la presión arterial respecto al grupo control, el alto porcentaje de AA también pudo contribuir al control de la presión arterial de este grupo. El AA puede ser metabolizado mediante tres vías enzimáticas: COX (ciclooxigenasa), LOX (lipooxigenasa) y CYP450 (citocromo P450). Como vemos en la figura 44, el AA es convertido en epóxidos vasodilatadores derivados del citocromo P450, los ácidos epoxieicosatrienólicos (EETs), estos metabolitos de la epoxigenasa contrarrestan las acciones vasoconstrictoras renales del ácido 20-hidroxeicosatetraenólico (20-HETE), otras propiedades vasculares de los EETs incluyen acciones anti-inflamatorias, efectos profibrinolíticos e inhibición de la migración de VSMC, estas propiedades pueden proteger el riñón y la vasculatura renal de la progresión del daño asociado con la diabetes y la hipertensión (Imig, 2006).

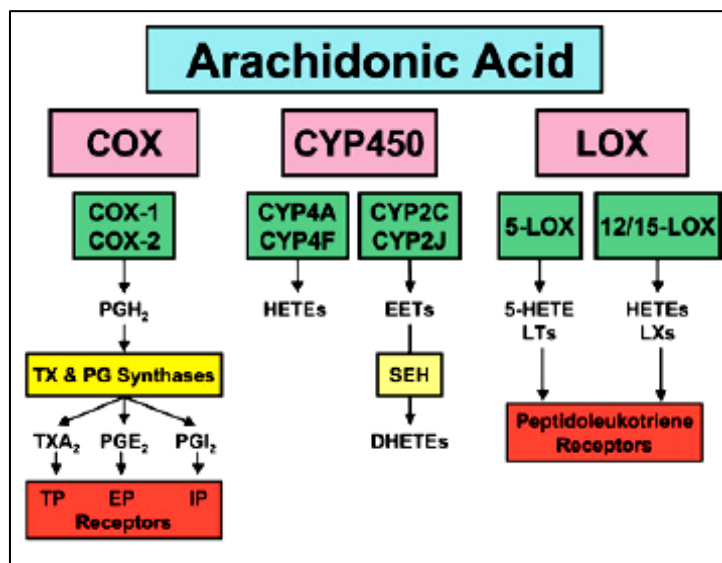


Figura 44. COX, CYP450 y LOX, diferentes vías que pueden metabolizar el AA (Imig, 2006).

Engler y Engler (2000) proponen otro mecanismo mediante el cual el DHA produce vasorelajación y está relacionado con el metabolismo del DHA a productos de la epoxigenasa. De manera similar al AA, el DHA puede ser metabolizado por la epoxigenasa a ácidos epoxidocosapentaenóicos (EDPs), los cuales son más potentes para inhibir la agregación plaquetaria que los epóxidos del AA. Los productos de la epoxigenasa del AA y del DHA en conjunto, pueden contribuir a la vasorelajación.

9.4 Efectos sobre el metabolismo de lípidos

9.4.1 Colesterol en suero

Se ha reportado que el contenido de colesterol aumenta en la diabetes (Malmström *et al.*, 1999). El modelo de diabetes ligera en SHR que utilizamos (STZ 50), no mostró cambios significativos en el contenido de colesterol, sólo algunos cambios marginales. No obstante, hubo una ligera disminución de colesterol en suero de ratas diabéticas probablemente relacionado con un menor consumo o una mayor eliminación del mismo, pero debido a que trabajamos con una hiperglicemia ligera, no hay cambios significativos. Se ha reportado que durante la diabetes tipo 2 se acelera el catabolismo del colesterol HDL y que las concentraciones de colesterol LDL total son similares o incluso inferiores a lo normal (Malmström *et al.*, 1999), esta podría ser otra razón por la cual el colesterol de las SHR

diabéticas se encontró ligeramente más bajo que el de las SHR control. Para confirmar dichos resultados sería conveniente realizar un perfil lipídico completo en donde se estudiaran las proporciones de lipoproteínas.

Por otra parte, encontramos que el suplemento de ω -3 (en SHR normales y diabéticas) no modificó el contenido de colesterol a pesar de conocerse que pueden activar el catabolismo de lípidos a través de los PPAR- α (Ferré, 2004). Cuando se proporcionó la dieta hipercalórica a SHR no diabéticas sí encontramos un ligero aumento en el contenido de colesterol en suero, lo cual podría ser explicado por el colesterol contenido en la manteca de la dieta hipercalórica, además de la posible participación de la fructosa como agente lipogénico (Elliott *et al.*, 2002).

9.4.2 Colesterol en hígado

Al igual que en suero, la diabetes no produjo cambios significativos del colesterol en hígado, lo cual sigue siendo consistente con la hiperglicemia ligera generada en nuestro modelo. Esto también concuerda con el colesterol del grupo STZ 100 que sí mostró un aumento significativo que podría estar relacionado con la hiperglicemia severa que mostró este grupo.

En SHR normales con DHC (SHR-DHC) se encontró una reducción en el colesterol en hígado. Sabemos que el hígado se considera la principal central metabólica del cuerpo y entre sus funciones se encuentra la síntesis y almacenamiento de colesterol y el transporte de lípidos (mediante las lipoproteínas). O' Meara *et al.* (1991) proponen que el colesterol puede tener una acción de auto-regulación, es decir, cuando hay un aumento en la ingesta de colesterol, éste disminuye la acción de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa, la cual es el paso limitante en la síntesis de colesterol. Posiblemente, la reducción en el colesterol de las SHR-DHC esté relacionada con el fenómeno expuesto anteriormente.

El grupo de SHR diabéticas con DHC (STZ 50-DHC) no mostró diferencias en el colesterol. Sin embargo, en los grupos con DHC/ ω -3 (normales y diabéticas) se observó un incremento en el colesterol en hígado. Este fenómeno podría ser explicado mediante la

activación de PPAR- α por los ω -3, sabemos que PPAR- α promueve el catabolismo de lípidos mediante la estimulación de la β -oxidación (Ferré, 2004). Los productos finales de la β -oxidación son moléculas de acetil-CoA, las cuales son el principal precursor para la síntesis de colesterol, lo cual aunado al colesterol presente en la manteca y al posible efecto lipogénico de la fructosa, podría verse reflejado en el incremento del colesterol en estos grupos.

También hay que mencionar que los AG ω -3 podrían estar estimulando el catabolismo de lípidos sólo bajo altas concentraciones de lípidos (como en el caso de la DHC), ya que los grupos que se alimentaron con dieta normal y recibieron el suplemento de ω -3 no mostraron diferencias significativas en sus niveles de colesterol.

9.4.3 Colesterol en riñón

A diferencia de lo ocurrido en suero e hígado, el colesterol en riñón se incrementó significativamente en el grupo de SHR diabéticas (STZ 50). Recordemos que en hígado, el colesterol no mostró diferencias en las SHR diabéticas, probablemente porque este órgano exporta el colesterol a otros órganos como el riñón, y es aquí donde se observa la acumulación del mismo. No obstante, los grupos de SHR y SHR diabéticas que recibieron la DHC, el suplemento de ω -3 y la DHC con ω -3 (DHC/ ω -3) no presentaron diferencias significativas en el colesterol de riñón.

9.4.4 Triglicéridos en suero

Es sabido que durante la diabetes aumentan los niveles de triglicéridos en suero (Malmström *et al.*, 1999). Se ha reportado que la actividad de la enzima lipoproteínlipasa (LPL) suele ser inferior a lo normal en los pacientes con diabetes tipo 2, ya que esta enzima es dependiente de insulina. Lo anterior puede contribuir al largo tiempo de permanencia de lipoproteínas ricas en TG (LRT) en la circulación (Nikkilä y Kekki, 1973; Kissebah *et al.*, 1982). Sin embargo, en nuestro caso los triglicéridos en suero no se vieron significativamente modificados en las SHR diabéticas. Como ya se mencionó, la hiperglicemia ligera con la que trabajamos al parecer no induce cambios significativos en el metabolismo de lípidos.

Las SHR con dieta hipercalórica (SHR-DHC) mostraron un aumento significativo de los triglicéridos, como en el caso del colesterol esto se explica por el contenido de triglicéridos en la manteca y por la acción lipogénica de la fructosa. Las SHR diabéticas con DHC (STZ 50-DHC) no mostraron diferencias en el contenido de TG.

El grupo SHR-DHC/ ω -3 mostró un aumento de los TG con respecto al grupo SHR control pero presentó una disminución significativa comparado con el grupo SHR-DHC, esto refleja un comportamiento anómalo, ya que esperaríamos ver un mayor contenido de TG en suero en el grupo SHR-DHC/ ω -3 (en comparación con el SHR-DHC) sin embargo ocurrió el fenómeno contrario. Los ácidos grasos ω -3 aumentan el catabolismo de lípidos por su unión a PPAR- α ; este fenómeno se expresa como un incremento de los TG en suero debido a la oxidación y movilización de los mismos, no obstante, es probable que esto se observe sólo a corto plazo, mientras que a un periodo más largo (8 meses) haya una disminución de los TG totales y por ende, disminuyan los TG en suero. Otra posible explicación de lo observado en el grupo SHR-DHC/ ω -3, es que la estimulación a largo plazo de PPAR- α puede producir una desensibilización del receptor y así reducir el efecto de los ω -3 y el subsecuente efecto catabólico.

Las SHR diabéticas con DHC y ω -3 (STZ 50-DHC/ ω -3) mostraron un aumento significativo de los TG, esto se explica por el efecto catabólico de los ácidos grasos ω -3 y la elevada concentración de lípidos en la DHC. Tal como ocurrió con el contenido de colesterol, los ácidos grasos ω -3 por sí solos (en SHR y SHR diabéticas) no indujeron modificaciones en el metabolismo de los TG en suero.

9.4.5 Triglicéridos en hígado

En el grupo de SHR diabéticas (STZ 50) se observó un ligero incremento de los triglicéridos en hígado. Como sabemos, una función importante de la insulina es la inhibición de la lipólisis en tejido adiposo (Mendivil y Sierra, 2005); durante la diabetes hay una menor síntesis y secreción de insulina, esto genera un aporte excesivo de ácidos grasos al hígado debido al estímulo de las señales lipolíticas, lo cual induce la síntesis de VLDL y puede ocasionar hipertrigliceridemia (Ros y Laguna, 2006).

En el grupo SHR-DHC se observó una disminución de los TG en hígado, esto aunque parece contradictorio puede ser explicado por la composición de ácidos grasos de la manteca de la DHC, en la tabla 10 podemos apreciar que la manteca está constituida en un 42.86% de ácido oléico. Kota *et al.* (2005) publicaron que el ácido oléico es ligando de PPAR- α , el cual acelera el catabolismo lipídico y disminuye su acumulación en el hígado, como lo que ocurrió en nuestro caso. Con respecto a las SHR diabéticas, el grupo STZ 50-DHC mostró un aumento significativo de los TG en hígado, lo cual era de esperarse por el contenido de TG provenientes de la manteca y por la actividad lipogénica de la fructosa y debido a que la dieta se proporcionó durante un periodo largo, los TG se acumularon en el hígado.

Los grupos que recibieron el suplemento de ω -3, ya sea que fueran alimentados con dieta normal o con dieta hipercalórica, no mostraron diferencias significativas contra su respectivo grupo control. A pesar de que distintas publicaciones afirman que los ÁG ω -3 tienen efectos catabólicos sobre los lípidos (Ferré, 2004; Kota *et al.*, 2005), en nuestra investigación no se corroboraron dichas afirmaciones pues los ω -3 no presentaron efectos aparentes sobre la cuantificación de TG en hígado a largo plazo (8 meses).

9.4.6 Triglicéridos en riñón

Como se mencionó anteriormente, es común que durante la diabetes se altere el metabolismo lipídico y se genere hipertrigliceridemia. En hígado observamos una acumulación de triglicéridos y en el caso del riñón se observó el mismo fenómeno. Probablemente la hiperglicemia generada en nuestro modelo, aunque ligera, sí fue capaz de alterar el metabolismo de los TG y de promover su acumulación en el riñón.

Los TG en riñón de las SHR-DHC mostraron el mismo comportamiento que los TG en hígado, esto es disminuyeron. La explicación de este comportamiento puede atribuirse también al elevado contenido de ácido oléico en la manteca y a su función como ligando de PPAR- α , como ya se mencionó.

En el caso de las ratas diabéticas, las que recibieron DHC no presentaron diferencias respecto a las diabéticas con dieta normal, sin embargo las ratas con DHC y ω -3 (STZ 50-

DHC/ ω -3) mostraron una tendencia a disminuir los TG. Quizá la unión del ácido oléico (de la manteca) en conjunto con la unión del EPA y el DHA (del suplemento de ω -3) a PPAR- α promuevan el catabolismo de los lípidos y no permitan la acumulación de TG en el riñón.

Las SHR con suplemento de ω -3 (SHR/ ω -3) no presentaron cambios en el contenido de TG. Las SHR diabéticas con ω -3 (STZ 50/ ω -3) mostraron TG en riñón significativamente menores que el grupo de ratas diabéticas sin suplemento (STZ 50), esto nos sugiere que el EPA y el DHA actuaron como ligandos de PPAR- α y estimularon la actividad catabólica, reduciendo la acumulación de TG observada en las ratas diabéticas. Este efecto podría reflejarse en una mejoría de la vasculatura renal del grupo STZ 50/ ω -3 comparado con el grupo STZ 50.

9.4.7 Proteína

Las cuantificaciones de proteína en suero mostraron una pérdida significativa en los 4 grupos de SHR diabéticas en comparación con sus respectivos controles no diabéticos, probablemente por la activación de la gluconeogénesis debido a la deficiencia de insulina. En hígado y en riñón también se observó una disminución en la proteína de los grupos diabéticos. Está reportado que la deficiencia en la acción de la insulina deriva en una menor utilización de glucosa en los tejidos sensibles a insulina (principalmente en músculo), así como en la activación de la lipólisis en el tejido adiposo (cabe mencionar que la insulina normalmente ejerce un efecto antilipolítico) con una mayor liberación de ácidos grasos libres. Debido a que los ácidos grasos libres no pueden ser convertidos a glucosa, es que se favorece la gluconeogénesis (Belfiore e Ianello, 2000a). La gluconeogénesis ocurre en el hígado y, en menor medida, en el riñón. Los precursores que pueden transformarse en glucosa incluyen al lactato, piruvato y a la mayor parte de los aminoácidos, así como al glicerol, que es el producto de la escisión de los triglicéridos (Voet y Voet, 1992).

Los grupos SHR-DHC y SHR-DHC/ ω -3 también tuvieron una menor cantidad de proteína en hígado respecto al grupo SHR control. Esto puede deberse a que los grupos con dieta hipercalórica no tuvieron una alimentación balanceada, ya que la base de su dieta fue principalmente de grasas y carbohidratos. Debido a que en estos grupos la glicemia se

mantuvo normal y la insulina tuvo efectos lipogénicos normales, no podemos hablar de la activación de gluconeogénesis; además, debido a la misma composición de las dietas, hubo una mayor asimilación de lípidos y carbohidratos que de proteínas. En el grupo SHR/ ω -3 también se observó una ligera disminución en la proteína, al igual que en los grupos con DHC, esto puede deberse a una menor asimilación de la proteína proveniente de la dieta.

Al parecer la hiperglicemia ligera no altera de manera importante el metabolismo de lípidos en las SHR; sin embargo, el metabolismo proteico sí se vio modificado en los grupos con diabetes.

9.5 Efectos sobre la composición de ácidos grasos

Los ácidos grasos son importantes constituyentes de las membranas celulares; la composición de ácidos grasos y el contenido de colesterol son factores importantes que tienen influencia sobre las propiedades y funciones de la membrana celular. Las diferencias en los ácidos grasos de la membrana pueden inducir cambios en la fluidez membranal, en el comportamiento de los canales iónicos y en las actividades de las enzimas y receptores acoplados a la membrana (Spector y Yorek, 1985). Las alteraciones de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos en las SHR pueden contribuir a la alteración de las propiedades y funciones de la membrana, y esto puede estar relacionado en parte, al desarrollo de la hipertensión en SHR (Watanabe *et al.*, 1989).

Como ocurrió con la mayoría de los parámetros que estudiamos, no se presentaron alteraciones importantes por la inducción de diabetes, ya que la hiperglicemia generada no fue lo suficientemente severa para afectar el metabolismo de los animales. Por ello, la composición de ácidos grasos en hígado y riñón de las SHR con 50 mg/kg de STZ, casi no presentó modificaciones. A diferencia de esto, las SHR que fueron inyectadas con 100 mg/kg de STZ mostraron alteraciones importantes en la mayoría de los ácidos grasos identificados, tanto en hígado como en riñón (Ver Anexo 4, Tablas 12 y 13). Entre los cambios más importantes encontrados en este grupo, está el aumento significativo de EPA y DHA, así como la disminución de los ácidos palmítico, esteárico y linoléico en el hígado. En el riñón se encontraron en menor proporción los ácidos palmítico, esteárico, oléico y linolénico, en tanto que el linoléico, araquidónico, EPA y DHA aumentaron significativamente. Estos resultados

nos demuestran que la hiperglicemia generada por 100 mg/kg de STZ, efectivamente altera el metabolismo lipídico de las SHR.

9.5.1 Ácidos grasos en hígado

A pesar de encontrar pocas diferencias entre las SHR control y las SHR diabéticas (STZ 50), el cociente I / S en hígado fue menor en el grupo de SHR diabéticas (Tabla 2), lo cual nos indica una posible disminución de la fluidez membranal inducida por la diabetes.

Las SHR que recibieron el suplemento de ácidos grasos ω -3 (SHR/ ω -3) sí mostraron cambios en los ácidos grasos (Tabla 4). Presentaron una reducción del ácido esteárico e incrementos en varios ácidos poliinsaturados como el γ linoléico, linoléico conjugado (CLA) y los compuestos de 20:3. Como era de esperarse, este grupo tuvo un aumento significativo de los ácidos eicosapentaenóico y docosahexaenóico debido a la administración del suplemento, así como una acumulación del ácido linoléico (ALN). Como ya se ha mencionado, el ALN es el precursor de los ácidos grasos ω -3 y gracias a una serie de desaturaciones (por medio de Δ 5 y Δ 6 desaturasas) y elongaciones, forma EPA y DHA. Ya que estos ácidos grasos (EPA y DHA) fueron directamente proporcionados a las ratas, el mecanismo de desaturación-elongación del ALN quizá se mantuvo inactivo y por ello se favoreció su acumulación. Este fenómeno podría explicar también el hecho de no encontrar diferencias en el porcentaje de AA, pues diversas investigaciones afirman que los ácidos linoléico y linoléico compiten por las mismas desaturasas y elongasas para dar origen al AA y EPA, respectivamente (Covarrubias y Ortega, 2002; Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005). Otra posibilidad es que la formación de AA a partir del ácido linoléico (AL) proveniente de la dieta, fuera exportado a otros órganos y por ello no se haya acumulado en el hígado. Dado que el grupo SHR/ ω -3 mostró incrementos en varios AGPIs, el cociente I / S fue significativamente más alto, sugiriendo el desarrollo de una mayor fluidez membranal.

Las SHR diabéticas con suplemento de ω -3 (STZ 50/ ω -3) sólo presentaron algunos cambios marginales respecto a las SHR diabéticas (STZ 50), no obstante el cociente I / S también fue mayor en las ratas suplementadas (Tabla 4), por lo que los ácidos ω -3 podrían estar contribuyendo a restituir la pérdida de fluidez membranal inducida por la diabetes. Lo

anterior podría estar relacionado con la normoglicemia que presentaron estas ratas (Figura 20B).

En las SHR y las SHR diabéticas con DHC se observó un incremento significativo del ácido oléico. Este pudo provenir de la manteca, la cual contiene 42.86% de ácido oléico o ser el resultado de la alimentación con fructosa. Comte *et al.* (2004) reportaron que ratas alimentadas con fructosa muestran un incremento significativo de los productos de la $\Delta 9$ desaturasa como el ácido palmitoléico y el ácido oléico. Los mismos investigadores reportaron que la acumulación hepática de ácido oléico observada durante la hipertensión genética, es reforzada por la alimentación con fructosa. Otros investigadores han atribuido este efecto a la estimulación de la esteroil-CoA desaturasa-1 (SCD-1) hepática (Waters y Ntambi, 1994). En el grupo SHR-DHC también se observó un decremento en el porcentaje de ácido linoléico, el cual pudo ser utilizado para la formación de AA, ya que este último se encontró en mayor porcentaje en comparación con el grupo control.

En lo que respecta a las SHR con DHC/ ω -3, se encontró una reducción en los ácidos palmitoléico y oléico, lo que nos sugiere que el suplemento de ω -3 impide la acumulación de ácidos grasos monoinsaturados y promueve el incremento de ácidos poliinsaturados, en este caso, del linoléico, el CLA y del DHA. Algunas investigaciones han demostrado que una mezcla de AGPIs en la dieta, regula la acumulación de ácido oléico en SHR mediante la supresión de la SCD-1 (Bellenger-Germain *et al.*, 2002; Bellenger *et al.*, 2004). Probablemente el suplemento que nosotros utilizamos haya actuado por este mecanismo, reduciendo así el porcentaje de ácido oléico en hígado. En las SHR diabéticas con DHC/ ω -3 no ocurrió el mismo fenómeno, en este grupo se observó una mayor acumulación de ácido oléico, quizá porque la combinación de hipertensión, diabetes y DHC hace más susceptibles a los animales de sufrir alteraciones metabólicas, por lo que en este caso el ω -3 no tuvo efecto.

9.5.2 Ácidos grasos en riñón

Al igual que en hígado, las SHR suplementadas con ω -3 presentaron cambios en su composición de ácidos grasos de riñón. Entre los cambios más significativos se encuentran los decrementos en los ácidos grasos palmítico y esteárico. Mientras que los ácidos linoléico y

araquidónico mostraron aumentos significativos. Esta acumulación de AA en riñón, puede ser explicada por dos mecanismos. La tabla 11 (Anexo 1) muestra la composición de AG del alimento comercial proporcionado a las ratas, podemos observar que la dieta está constituida en un 30% de ácido linoléico, el cual es el principal precursor para la formación de AA. El AA al ser formado en el hígado, pudo ser exportado y acumulado en el riñón. Otro mecanismo puede estar relacionado con la competencia del AA y el EPA por las ciclooxigenasas para la formación de eicosanoides, ya que las ratas recibían un suplemento constante de EPA y DHA, estos ácidos grasos pudieron ser el sustrato preferente de las ciclooxigenasas. Así, la formación de AA es estimulada de manera constante por el AL de la dieta, y debido a que el AA no se está empleando para la formación de eicosanoides, se aprecia su acumulación en el riñón. Este grupo también mostró un cociente I / S más alto que el grupo SHR control, lo cual indicaría una mayor fluidez membranal.

Tal como sucedió con los lípidos en riñón, las ratas diabéticas con ω -3 (STZ 50/ ω -3) casi no mostraron cambios en sus ácidos grasos. Únicamente se observó una reducción en el ácido esteárico e incrementos en los ácidos oléico y linoléico, en este grupo el AA no mostró diferencias respecto a las SHR diabéticas sin suplemento. El cociente I / S también fue más alto respecto a las SHR-STZ 50, aunque no significativamente.

En el grupo SHR-DHC se observaron varios cambios en los ácidos grasos del riñón, los cuales pudieron estar inducidos por la composición de la DHC y por el efecto que tiene la fructosa sobre la SCD-1, estos cambios también pudieron ser el resultado de la exportación proveniente del hígado. Recordemos que el riñón es un órgano que no participa muy activamente en la formación de ácidos grasos, sino más bien, recibe y acumula los ácidos grasos que el hígado exporta. La acumulación de AA en riñón quizá ocurrió por la suma del AL proveniente de la dieta estándar (30%) más el de la manteca (12.64%). Por otra parte, en el grupo SHR-DHC/ ω -3 aumentó el contenido de AL y disminuyó el AA. Tal vez el AL no era utilizado para la formación de AA o probablemente el AA estaba siendo empleado por las ciclooxigenasas para la formación de eicosanoides. En las ratas diabéticas con DHC, el cambio más evidente fue un aumento en el AA quizá proveniente de la dieta, en tanto que las ratas diabéticas con DHC/ ω -3 tuvieron una disminución en el porcentaje de AA, lo cual

podría evitar la formación de eicosanoides de las series 2 y 4 y tener un efecto benéfico sobre la presión arterial.

9.6 Histopatología

El análisis histopatológico reveló daños en hígado y riñón provocados principalmente por la diabetes, por la dieta hipercalórica o por la combinación de ambas.

9.6.1 Hígado

Degeneración grasa

La inyección de STZ (50 mg/kg) no provocó un daño considerable en el tejido hepático respecto a la acumulación de lípidos, lo cual es consistente con los resultados obtenidos de lípidos y composición de ácidos grasos en hígado, ya que se encontraron leves diferencias en estos parámetros. Al parecer, la concentración de 50 mg/kg de STZ no tiene efectos importantes sobre el metabolismo lipídico, debido a la ligera hiperglicemia que se generó.

Por otra parte, las ratas suplementadas con ω -3 no mostraron degeneración grasa, sin embargo este suplemento no reestableció el daño leve observado en las ratas diabéticas. Estos resultados coinciden con la cuantificación de lípidos en hígado, ya que no se observaron diferencias en este parámetro.

Los grupos que fueron alimentados con DHC sí mostraron cambios importantes. Las SHR con DHC presentaron una degeneración grasa moderada, al igual que las SHR diabéticas con DHC. Esta acumulación lipídica fue producida por la alimentación continua con la DHC, conformada por manteca (con un elevado contenido de grasas saturadas) y fructosa, la cual es altamente lipogénica. El grupo SHR-DHC/ ω -3 no presentó daños aparentes, esto nos demuestra que el suplemento de ácidos grasos ω -3 participa en la prevención de la acumulación de lípidos en hígado, quizá por su conocido efecto sobre el catabolismo de lípidos mediante la activación de PPAR- α (Ferré, 2004). La cuantificación de lípidos en hígado no arrojó diferencias significativas en este grupo (SHR-DHC/ ω -3) con respecto al grupo sólo

con DHC. Esto, aunque contradictorio, parece indicarnos que los cambios histológicos anteceden a los cambios bioquímicos, pues el daño observado en las SHR con DHC no se ve reflejado en las cuantificaciones de lípidos. Las SHR diabéticas con DHC/ ω -3 mostraron un daño similar al observado en las ratas alimentadas sólo con DHC, lo cual nos sugiere que durante la diabetes, el suplemento de ω -3 no tiene el mismo efecto sobre el catabolismo lipídico.

9.6.2 Riñón

Esclerosis glomerular y glomerulitis

Se sabe que la hipertensión mantenida a largo plazo, induce un número de alteraciones vasculares y renales en modelos animales de hipertensión arterial. El glomérulo es considerablemente más sensible a daños oxidativos que otros segmentos de la nefrona (Klahr, 1997). Por ello se ha observado que las SHR muestran gradualmente un número más bajo de glomérulos conforme progresa la enfermedad hipertensiva (Skov *et al.*, 1994). En este trabajo, las SHR de 8 meses de edad mostraron un daño glomerular muy leve, sin embargo observamos que la diabetes (STZ 50) en SHR indujo un daño glomerular de grado moderado a severo, quizá por los conocidos efectos de la glucotoxicidad en el riñón.

Por otra parte, las SHR diabéticas suplementadas con ω -3 sólo presentaron un leve daño glomerular. Estos resultados concuerdan con los de Aguila *et al.* (2005), quienes reportaron que SHR alimentadas con un suplemento de aceite de pescado (conformado de EPA y DHA) durante 13 semanas, aumentaron tres veces más el número de glomérulos en comparación con las SHR no tratadas, además de presentar glomérulos con estructura cortical normal, sin hipertrofia ni fibrosis intersticial. Esto nos indica que los ácidos grasos ω -3 proveen una protección renal debido a su habilidad para suprimir la inflamación y la producción de tromboxanos y/o leucotrienos proinflamatorios (Clark *et al.*, 1990).

10. CONCLUSIONES

- Para estudiar el efecto de la hiperglicemia a largo plazo, el modelo más adecuado de diabetes tipo 2 en SHR, fue generado con la inyección de 50 mg/kg de estreptozotocina en neonatos de 48 hrs., ya que generó hiperglicemia ligera sin una mortalidad importante de la población.
- El modelo de diabetes inducida con 50 mg/kg de estreptozotocina no indujo cambios importantes en el contenido promedio de colesterol y triglicéridos en suero, hígado, riñón, ni en la composición de ácidos grasos.
- Las SHR diabéticas mostraron una pérdida importante de proteína en suero, hígado y riñón, dándonos indicio de la activación de gluconeogénesis.
- El grupo de SHR diabéticas suplementadas con ácidos grasos ω -3, mantuvo la glicemia normal durante todo el estudio.
- Las SHR que recibieron ácidos grasos ω -3 mostraron una reducción significativa de la presión arterial sistólica en comparación con las SHR control.
- El suplemento de ω -3 incrementó la proporción de ácidos grasos insaturados en hígado y riñón de SHR y SHR diabéticas, es decir, aumentó un índice de fluidez membranal.
- Las SHR suplementadas con ω -3 presentaron un mayor porcentaje de AA en riñón respecto al grupo SHR control.
- El suplemento de ω -3 disminuyó los triglicéridos y colesterol en suero de SHR con dieta hipercalórica.
- La dieta hipercalórica controló la glicemia en SHR diabéticas y no intervino en el desarrollo de la hipertensión en las SHR.

- La dieta hipercalórica incrementó los triglicéridos en suero y disminuyó la cantidad de proteína en hígado de las SHR.
- La dieta hipercalórica indujo modificaciones importantes en la composición de ácidos grasos de riñón en SHR, pero no en SHR diabéticas.
- Las SHR y SHR diabéticas con dieta hipercalórica mostraron una degeneración grasa moderada en hígado.
- Los ácidos grasos ω -3 impidieron la degeneración grasa en hígado de SHR con DHC.
- El análisis histológico demostró que la combinación de hipertensión y diabetes produjo un daño renal moderado en las SHR.
- En SHR diabéticas, el suplemento de ω -3 protegió la estructura renal del daño provocado por la diabetes y la hipertensión.

ANEXO 1

COMPOSICIÓN DE LA MANTECA (DHC) Y DE LA DIETA NORMAL

Tabla 10. Composición porcentual de ácidos grasos en la manteca de la dieta hipercalórica.

Ácido graso	MANTECA
Mirístico	2.57%
Palmitico	23.30%
Palmitoléico	3.54%
Esteárico	10.76%
Oléico	42.86%
Linoléico	12.64%
γ Linoléico	N.D.
Linolénico	0.86%
Linoléico conjugado	N.D.
Eicosenóico	0.71%
Araquidónico	0.16%
Eicosapentaenóico	0.17%
Docosahexaenóico	0.08%
Compuestos de 20:3	0.57%
AG no identificados	1.76%

N.D. = no detectado

Tabla 11. Composición porcentual de ácidos grasos de la dieta estándar.

Ácido graso	DIETA ESTÁNDAR
Mirístico	0.25%
Palmitico	14.55%
Palmitoléico	0.21%
Esteárico	4.33%
Oléico	15.75%
Linoléico	30.03%
γ Linoléico	N.D.
Linolénico	3.11%
Linoléico conjugado	1.53%
Eicosenóico	7.27%
Araquidónico	0.38%
Eicosapentaenóico	0.22%
Docosahexaenóico	0.05%
Compuestos de 20:3	14.75%
AG no identificados	7.51%

N.D. = no detectado

ANEXO 2

TINCIÓN DE HÍGADO Y RIÑÓN CON EOSINA-HEMATOXILINA

1) Deshidratación de tejidos

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

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

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

Agua Corriente (Lavado)	
OH 70%	1
OH 90%	1
OH 100%	2
OH 100%	3
Xilol I	5
Xilol II	5

ANEXO 3

PRESIÓN DIASTÓLICA

En este anexo se presenta el seguimiento de la presión arterial diastólica de los 8 grupos experimentales de esta investigación. La presión diastólica se incluyó porque refleja la resistencia del lecho vascular y algunos la han considerado con un indicador clínico fundamental. En una investigación realizada en el grupo de trabajo con ratas Wistar, el promedio de presión diastólica fue de 115 ± 12 mmHg (datos no mostrados) (Orozco-Tapia, 2008), por esta razón tomamos este valor como referencia de la presión diastólica en ratas. Como veremos a continuación, todos los grupos de SHR sobrepasaron los 115 mmHg de presión diastólica, sin embargo, hubo algunas diferencias entre los grupos, relacionadas con el momento en que superaron el valor normal y los valores máximos registrados.

Efecto de la STZ (50 mg/kg de peso) sobre la presión diastólica de SHR

En la figura 45 podemos observar la presión diastólica de los grupos SHR control y SHR-STZ 50. Como vemos (Figura 45A), el grupo SHR control sobrepasó los 115 mmHg a las 11 semanas de edad y continuó aumentando, alcanzando su valor máximo (157 mmHg) a las 29 semanas de edad, posteriormente la presión comenzó a declinar. El grupo STZ 50 (Figura 45B) sobrepasó el valor de referencia a la edad de 8 semanas y alcanzó los 138 mmHg a la semana 19, aunque después la presión disminuyó ligeramente.

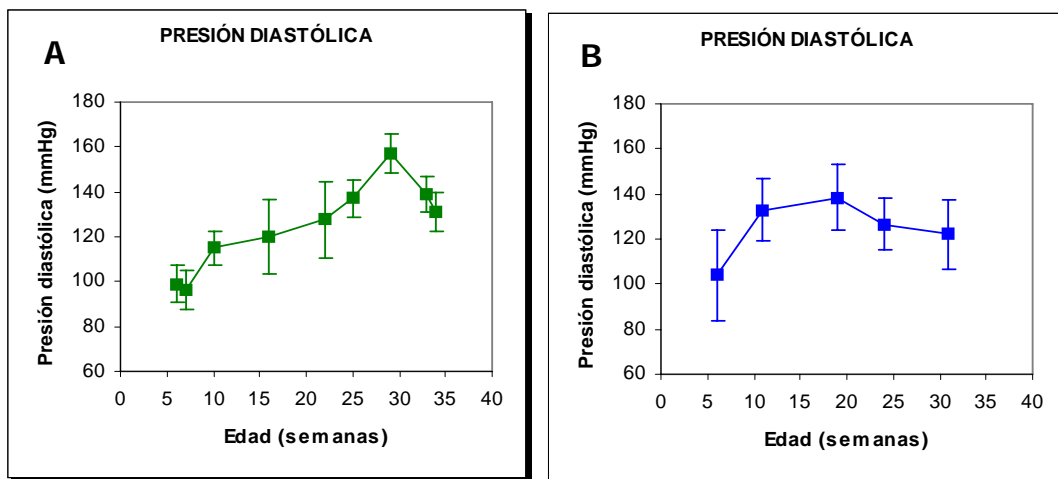


Figura 45. Seguimiento de la presión arterial diastólica. A) Presión diastólica de SHR control. B) Presión diastólica de SHR con 50 mg/kg de STZ.

Efecto de los ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA) sobre la presión diastólica de SHR y SHR-STZ 50

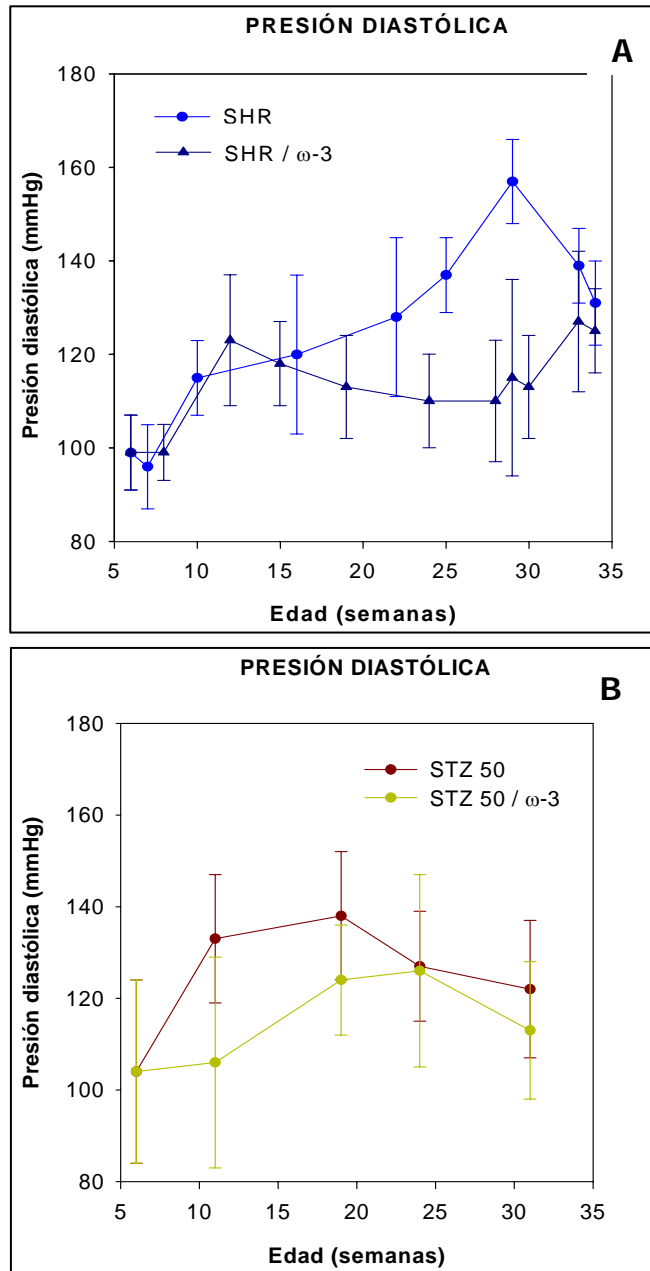


Figura 46. Seguimiento de la presión arterial diastólica. A) Presión diastólica de SHR control. B) Presión diastólica de SHR con 50 mg/kg de STZ.

En la figura 46 vemos los promedios de presión diastólica de las SHR y STZ 50 con suplemento de ω -3. El grupo SHR/ ω -3 (Figura 46A) sobrepasó los 115 mmHg a las 10 semanas de edad, igual que ocurrió con el grupo SHR control. El valor máximo registrado

para el grupo SHR/ ω -3 fue de 127 mmHg a la semana 12, posteriormente fue disminuyendo y se mantuvo ligeramente más baja que el grupo control. En la figura 46B, el grupo STZ 50/ ω -3 sobrepasó los 115 mmHg a las 15 semanas de edad, esto es, 7 semanas después que el grupo STZ 50 y 5 semanas después que el grupo SHR, el valor máximo del grupo STZ/ ω -3 fue de 126 mmHg a las 24 semanas.

Efecto de la DHC y de los ácidos grasos ω -3 (EPA y DHA) sobre la presión diastólica de SHR y SHR-STZ 50

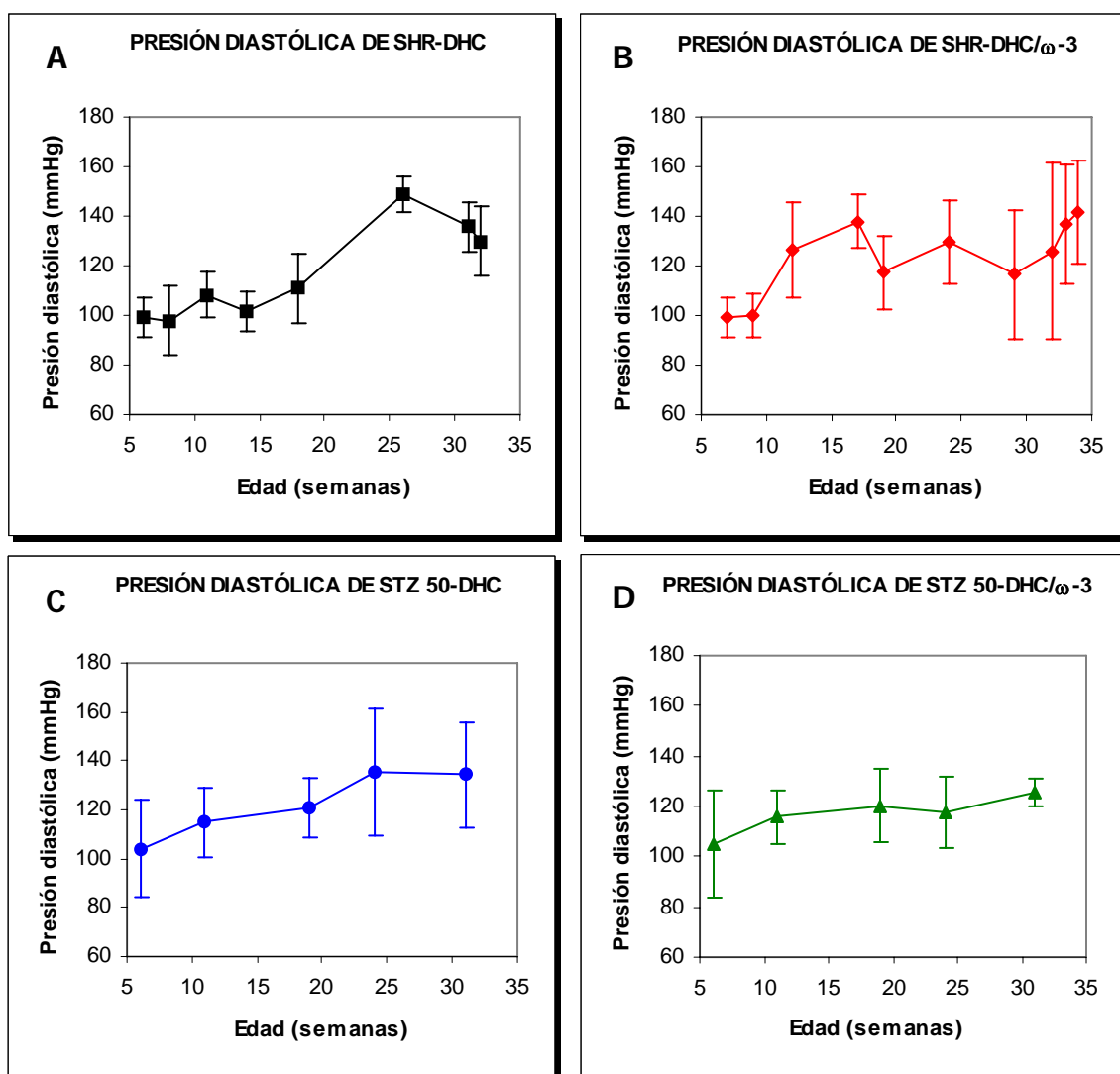


Figura 47. Registro de presión arterial diastólica de SHR y STZ 50 con DHC y suplemento de ácidos grasos ω -3. A) Presión diastólica de SHR con DHC. B) Presión diastólica de SHR con DHC y ω -3. C) Presión diastólica de STZ 50 con DHC. D) Presión diastólica de STZ 50 con DHC y ω -3.

En la figura 47, se observan los registros de presión diastólica de las ratas con DHC y con DHC/ ω -3, podemos ver (Figura 47A) que el grupo SHR-DHC sobrepasó los 115 mmHg a las 20 semanas de edad, alcanzando un valor máximo de 149 mmHg a la edad de 26 semanas. El grupo SHR-DHC/ ω -3 (Figura 47B) sobrepasó el nivel normal de presión diastólica a las 11 semanas de edad y su nivel máximo alcanzado (142 mmHg) fue a las 34 semanas. En el caso de las ratas diabéticas, el grupo STZ 50-DHC sobrepasó la presión diastólica de referencia a las 12 semanas de edad y alcanzó los 135 mmHg a las 24 semanas (Figura 47C). El grupo STZ 50-DHC/ ω -3 (Figura 47D) superó los 115 mmHg a la semana 11 y llegó a los 126 mmHg a las 31 semanas de edad.

ANEXO 4

LÍPIDOS Y ÁCIDOS GRASOS DEL GRUPO STZ 100 mg/kg

Se siguió el desarrollo del grupo STZ 100 hasta la edad de 8 meses, aunque debido a la alta mortalidad (90%), la población quedó reducida a 3 individuos. Se obtuvieron las cuantificaciones de lípidos, proteína y se analizó la composición de ácidos grasos en hígado y riñón. Los resultados mostrados a continuación muestran el efecto de la inyección de 100 mg/kg de peso de estreptozotocina en SHR.

Efecto de la STZ (100 mg/Kg de peso) en SHR sobre las cuantificaciones de lípidos y proteína

Proteína y Lípidos en Suero

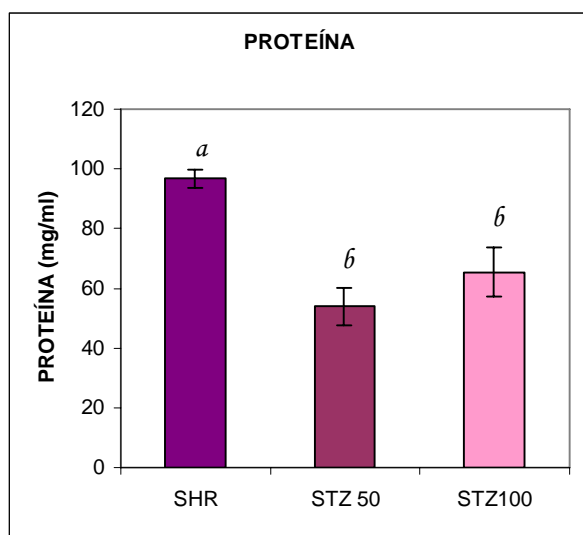


Figura 48. Proteína en suero de SHR control, STZ 50 y STZ 100. (P < 0.05)

En la figura 48 podemos observar la cuantificación de proteína en suero de las SHR control y de los grupos con 50 mg/kg y 100 mg/kg de STZ. El grupo STZ 100 presentó una pérdida de proteína en suero de 32.4% (65.4 mg/ml) con respecto al grupo SHR (96.8 mg/ml), así mismo, el grupo STZ 100 tuvo 21% más proteína que el grupo STZ 50 (54 mg/ml).

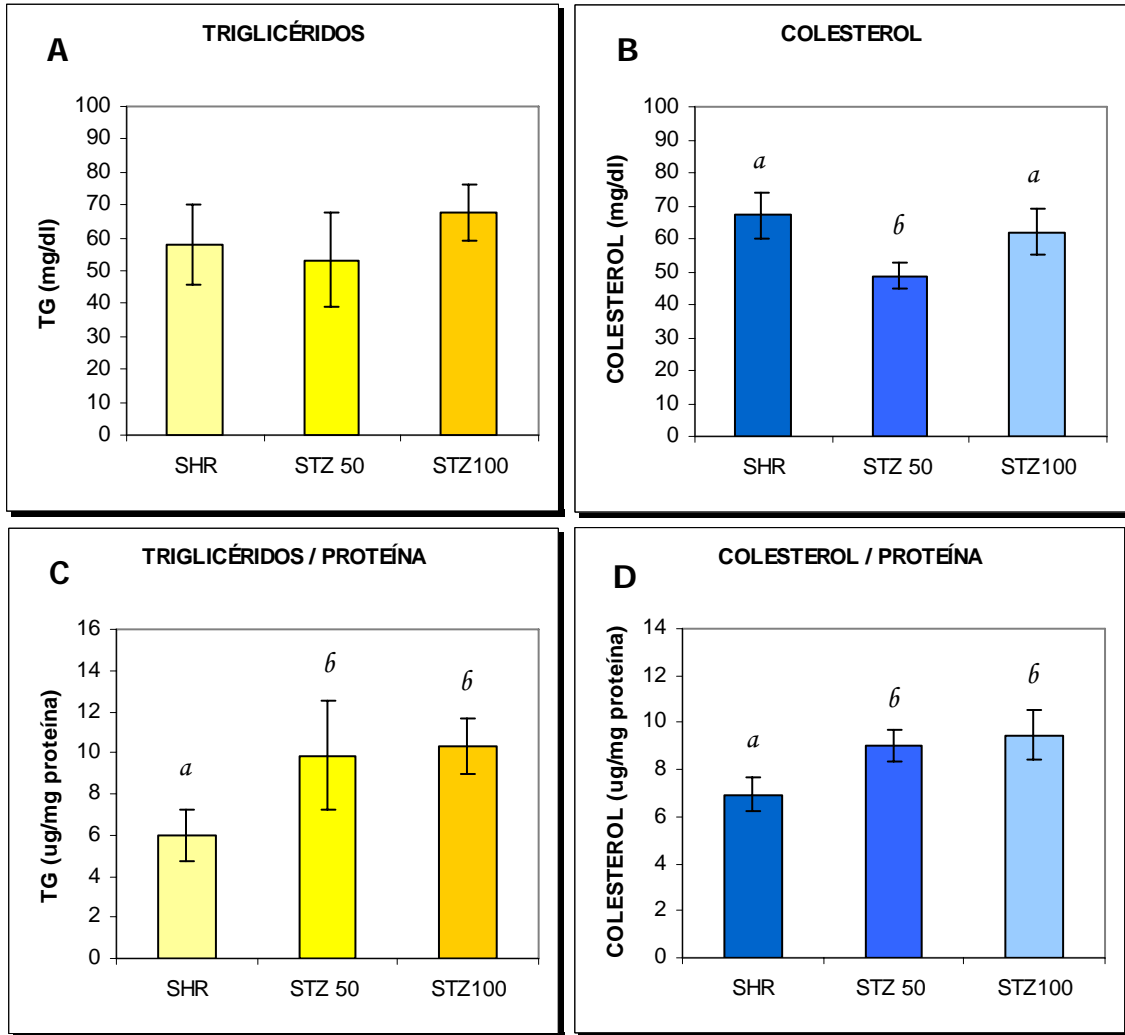


Figura 49. Cuantificación de triglicéridos y colesterol en suero a la edad de 8 meses de los grupos SHR, STZ 50 y STZ 100. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cociente triglicéridos/proteína. D) Cociente colesterol/proteína. ($P < 0.05$)

En lo que respecta a lípidos, en la figura 49A se presentan las cuantificaciones de triglicéridos en suero. El grupo STZ 100 tiene un valor promedio de TG 16.7% más alto que el grupo SHR. Los resultados de colesterol (Figura 49B) muestran que la concentración de 100 mg/kg de STZ no modifica el colesterol en suero, pues el grupo STZ 100 (62 mg/ml) y el grupo SHR control (67 mg/ml) no son diferentes, sin embargo, el grupo STZ 100 tiene una cantidad de colesterol 27% más elevada que el grupo STZ 50 (48.8 mg/ml). Los cocientes TG/proteína se muestran en la figura 49C. Los grupos STZ 50 y STZ 100 no son diferentes entre sí, ambos grupos presentan un aumento en los TG. Las ratas STZ 50 tienen 63% más TG, mientras que el grupo STZ 100 tiene 71.6% más TG, ambos con respecto al grupo SHR. Los cocientes colesterol/proteína indican que los grupos STZ 50 y STZ 100 no muestran

diferencias significativas, sin embargo, ambos tienen más colesterol que el grupo SHR control en 30.4% y 37.7% respectivamente (Figura 49D).

Los resultados de lípidos en suero nos indican que la dosis de 100 mg/kg de STZ no genera más cambios que la dosis de 50 mg/kg de STZ, puesto que ambos grupos se comportaron de forma similar.

Proteína y Lípidos en Hígado

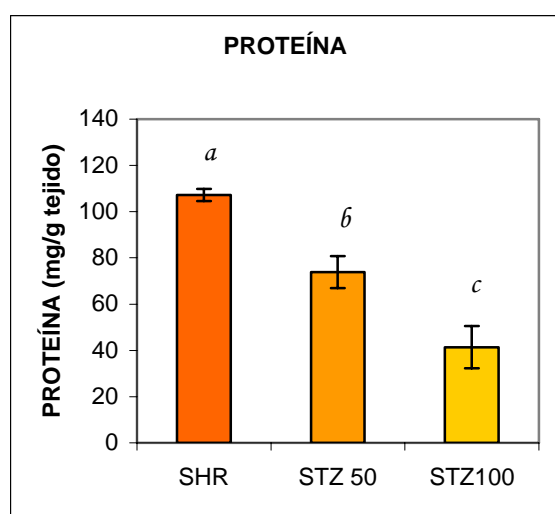


Figura 50. Proteína en hígado de SHR control, STZ 50 y STZ 100.

La cantidad de proteína en hígado sí fue modificada en los grupos inyectados con STZ. Podemos observar (Figura 50) que el grupo STZ 50 tiene 31% menos proteína que las ratas control, mientras que el grupo STZ 100 presentó una disminución de 61.4% en la proteína con respecto al grupo control y también es 44% más baja que el grupo STZ 50. Esto nos demuestra que la pérdida de proteína se ve más estimulada conforme aumenta la concentración de STZ inyectada.

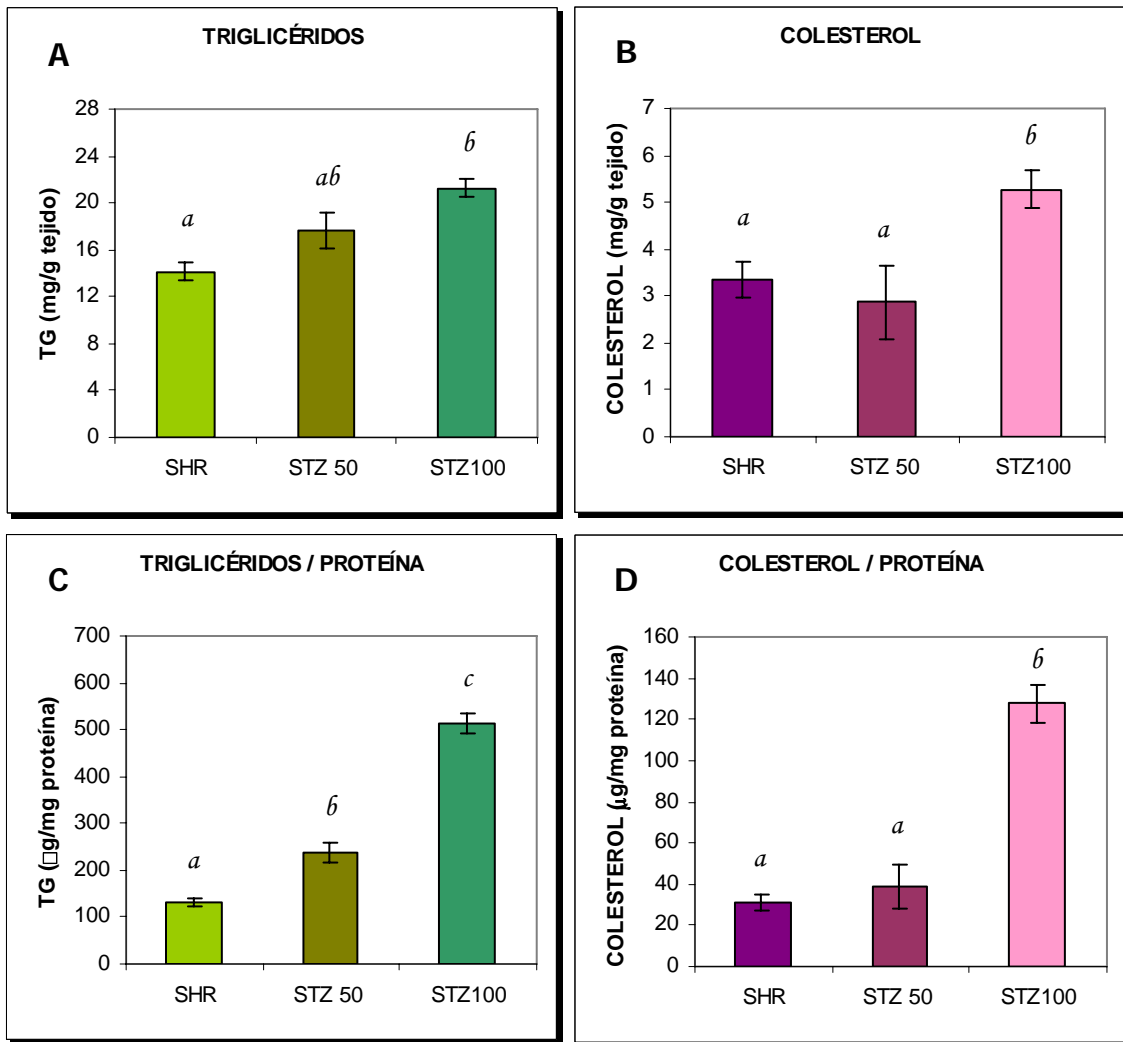


Figura 51. Cuantificación de triglicéridos y colesterol en hígado a la edad de 8 meses de los grupos SHR, STZ 50 y STZ 100. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cociente triglicéridos/proteína. D) Cociente colesterol/proteína.

En la figura 51 vemos las cuantificaciones de lípidos en hígado. Los resultados de triglicéridos (Figura 51A) muestran un fenómeno similar al ocurrido con la proteína, el grupo STZ 50 registra un incremento de casi 25%, mientras que el grupo STZ 100 registró un aumento del 51%, ambos con respecto a las SHR control. Con relación al colesterol en hígado, las ratas STZ 50 no presentaron diferencias respecto a las ratas control, sin embargo, el grupo STZ 100 tuvo 58.2% más colesterol que las SHR (Figura 51B). Los cocientes TG/proteína (Figura 51C) revelan que las ratas STZ 50 (238.4 µg/mg proteína) tuvieron 80.9% más TG y las ratas STZ 100 (514.3 µg/mg proteína) presentaron un aumento de 290.2% respecto a las SHR control (131.8 µg/mg proteína). Por otra parte, los cocientes colesterol/proteína indican que la concentración de 50 mg/kg de STZ no genera cambios, no

obstante, la concentración de 100 mg/kg de STZ induce un aumento de 308.3% en el colesterol de hígado con respecto al grupo control, esto equivale a un incremento de 31.25 a 127.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína en STZ 100 (Figura 51D).

Estos resultados nos muestran que los triglicéridos de hígado se incrementan conforme aumenta la concentración de STZ inyectada, mientras que el colesterol sólo aumenta en el grupo con 100 mg/kg de STZ, puesto que la concentración de 50 mg/kg de STZ no indujo cambios en este parámetro.

Proteína y Lípidos en Riñón

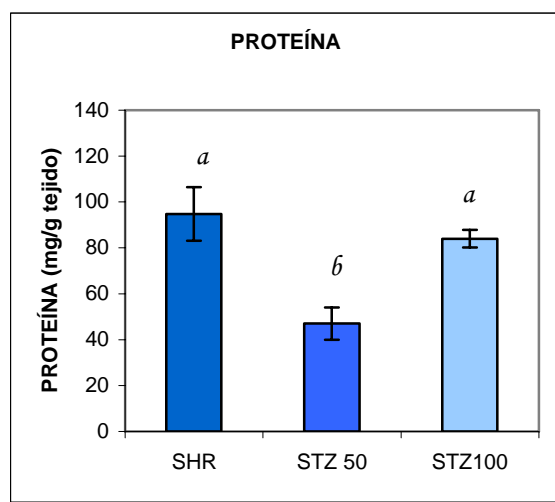


Figura 52. Proteína en riñón de SHR control, STZ 50 y STZ 100.

La proteína en riñón se observa en la figura 52, donde podemos apreciar que los grupos SHR y STZ 100 no son significativamente diferentes, pero el grupo STZ 50 tuvo 50% menos proteína que el grupo control. Esto nos indica que la concentración de 50 mg/kg de STZ sí generó cambios en la proteína de riñón, no así la concentración de 100 mg/kg de STZ.

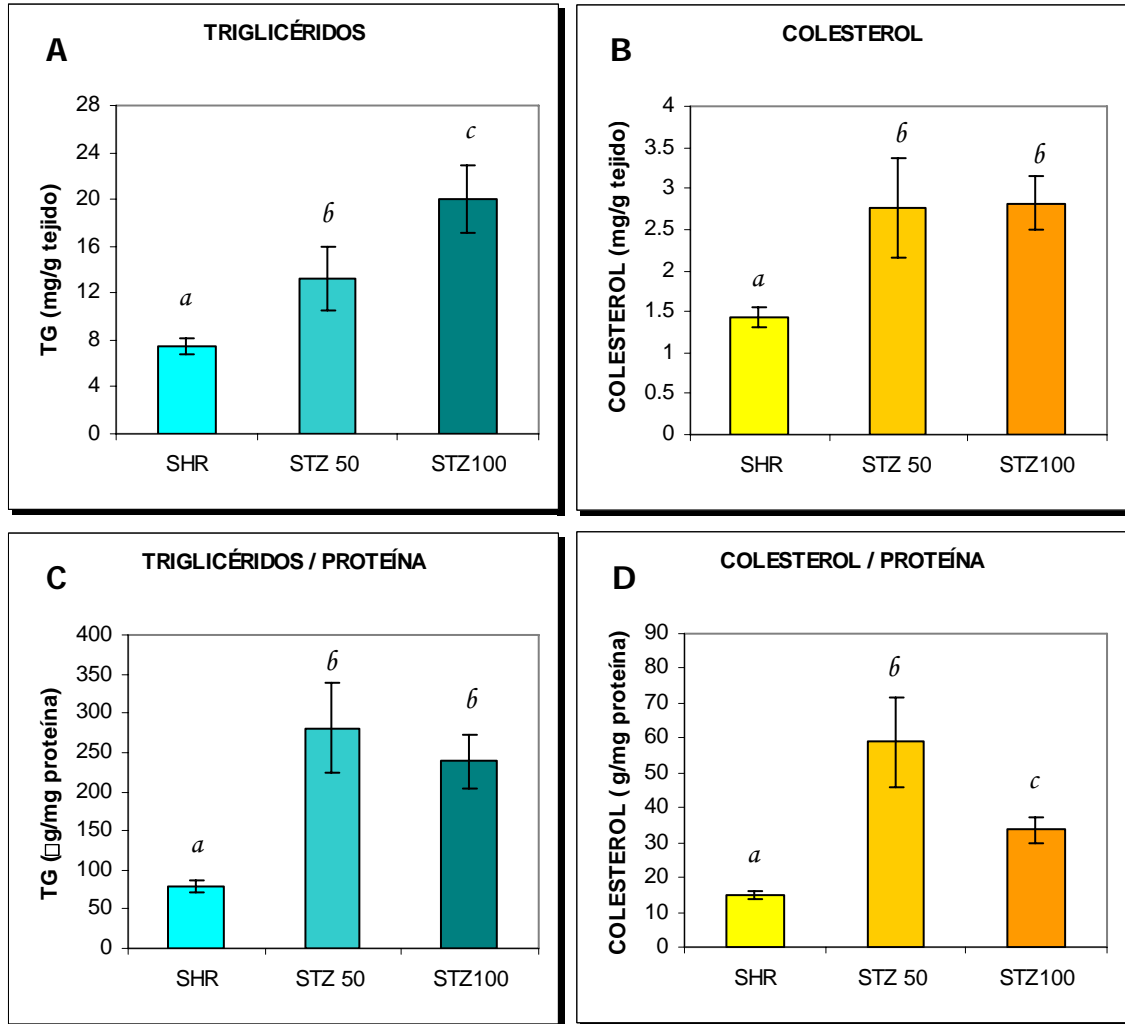


Figura 53. Cuantificación de triglicéridos y colesterol en riñón a la edad de 8 meses de los grupos SHR, STZ 50 y STZ 100. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cociente triglicéridos/proteína. D) Cociente colesterol/proteína.

En la figura 53 se aprecian las cuantificaciones de lípidos. En lo que respecta a los TG en riñón (Figura 53A), observamos un fenómeno similar al encontrado en hígado, el grupo STZ 50 (13.2 mg/g tejido) tuvo un incremento de 76% y el grupo STZ 100 (20 mg/g tejido) aumentó 166%, ambos respecto al grupo control (7.5 mg/g tejido). Al parecer, los TG en riñón también aumentan conforme a la concentración de STZ. El colesterol se incrementa en los grupos que fueron inyectados con STZ, pero no presentan diferencias entre sí. El colesterol del grupo STZ 100 se incrementó en 98.6% con relación al grupo SHR control (Figura 53B). Los cocientes TG/proteína de los grupos STZ 50 y STZ 100 se muestran más elevados que el del grupo SHR control, puesto que los TG se incrementaron de 79.1 µg/mg

proteína en SHR a 280.8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína en STZ 50 y a 238.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ proteína en STZ 100, estos dos últimos grupos no fueron estadísticamente diferentes al control (Figura 53C). En lo que respecta al cociente colesterol/proteína, vemos que en el grupo STZ 50 aumentó 292.6% la cantidad de colesterol con relación al grupo SHR, mientras que en el grupo STZ 100 el incremento fue de 124% con respecto al control, esto nos indica que cuando normalizamos los resultados con la cantidad de proteína, el grupo STZ 100 presenta una menor proporción de colesterol en riñón que el grupo con 50 mg/kg de STZ (Figura 53D).

Efecto de la STZ (100 mg/Kg de peso) en SHR sobre la composición de ácidos grasos

Tabla 12. Composición porcentual de los ácidos grasos de hígado a los 8 meses de edad de SHR, STZ 50 mg/kg y STZ 100 mg/kg.

Ácido graso	SHR	STZ 50	STZ 100
Mirístico	0.58% \pm 0.04	0.45% \pm 0.13	0.76% \pm 0.05
Palmitico	27.57% \pm 1.94	27.81% \pm 3.59	24.36% \pm 0.14
Palmitoléico	1.30% \pm 0.05	0.93% \pm 0.30	2.13% \pm 0.95
Esteárico	18.18% \pm 1.41	18.76% \pm 3.34	14.22% \pm 1.44
Oléico	15.69% \pm 1.12	12.96% \pm 2.50	14.16% \pm 0.93
Linoléico	20.88% \pm 0.19	17.28% \pm 4.55	16.99% \pm 0.16
γ Linoléico	0.31% \pm 0.02	0.23% \pm 0.05	0.27% \pm 0
Linolénico	0.44% \pm 0	0.32% \pm 0.09	0.39% \pm 0.04
Linoléico conjugado	0.29% \pm 0.08	0.67% \pm 0.37	N.D.
Eicosaenóico	0.40% \pm 0	0.57% \pm 0.40	0.71% \pm 0.04
Araquidónico	10.67% \pm 3.73	11.21% \pm 3.84	13.30% \pm 0.66
Eicosapentaenóico	0.20% \pm 0.01	0.80% \pm 0.46	1.31% \pm 0.29
Docosahexaenóico	1.34% \pm 0.50	3.16% \pm 1.51	7.78% \pm 0.59
Compuestos de 20:3	0.76% \pm 0.11	2.97% \pm 1.61	1.92% \pm 0.21
AG no identificados	1.43% \pm 0.04	1.98% \pm 0.43	1.74% \pm 0.10
I / S	1.13 \pm 0.16	0.73 \pm 0.29	1.50 \pm 0.08

En la tabla 12 se muestra la composición de ácidos grasos de hígado de los grupos SHR, STZ 50 y STZ 100. Las diferencias con respecto al grupo SHR se marcan en negritas. Como podemos observar, el grupo STZ 100 muestra grandes diferencias respecto al grupo

control, lo cual concuerda con nuestra hipótesis, ya que al generarse una hiperglicemia severa en este grupo, se ve afectada la composición de casi todos los ácidos grasos, a diferencia del grupo STZ 50 en que los cambios inducidos son mínimos. Entre los cambios más notorios del grupo STZ 100, podemos mencionar una disminución en el ácido palmítico de 27.57% a 24.36%, en el esteárico que bajó de 18.18% a 14.22% y en el linoléico que cambió de 20.88% a 16.99%, todos con respecto al grupo control (SHR). Además aumentaron algunos AGPI's como el EPA de 0.20% a 1.31%, el DHA de 1.34% a 7.78% y los compuestos de 20:3 de 0.76% a 1.92%, también con relación al grupo SHR. Estas diferencias también se ven reflejadas en el cociente I / S que se muestra distinto al del grupo control.

Tabla 13. Composición porcentual de los ácidos grasos de riñón a los 8 meses de edad de SHR, STZ 50 mg/kg y STZ 100 mg/kg.

Ácido graso	SHR	STZ 50	STZ 100
Mirístico	0.82% ± 0.04	0.62% ± 0.13	0.40% ± 0.06
Palmítico	28.19% ± 0.38	29.24% ± 5.60	22.02% ± 0.93
Palmitoléico	1.36% ± 0.02	1.16% ± 0.22	1.06% ± 0.26
Esteárico	25.54% ± 0.05	23.65% ± 5.11	18.01% ± 1.50
Oléico	19.54% ± 0.14	16.57% ± 4.39	10.92% ± 3.04
Linoléico	12.54% ± 0.13	14.13% ± 3.40	17.33% ± 1.39
γ Linoléico	0.13% ± 0	0.16% ± 0.06	0.14% ± 0
Linolénico	0.36% ± 0.04	0.25% ± 0.15	0.18% ± 0.11
Linoléico conjugado	0.04% ± 0	0.44% ± 0.17	N.D.
Eicosaenóico	0.69% ± 0.09	0.42% ± 0.20	0.31% ± 0.10
Araquidónico	6.28% ± 0.16	9.81% ± 3.56	22.37% ± 2.52
Eicosapentaenoico	0.33% ± 0.22	0.41% ± 0.19	0.90% ± 0.01
Docosahexaenóico	0.88% ± 0.29	0.93% ± 0.35	2.24% ± 0.08
Compuestos de 20:3	0.91% ± 0.10	1.00% ± 0.72	1.27% ± 0.01
AG no identificados	2.42% ± 0.26	2.39% ± 0.98	2.88% ± 0.08
I / S	0.79 ± 0.01	0.87 ± 0.37	1.41 ± 0.14

En la tabla 13 vemos la composición de los AG de riñón, en el grupo STZ 100 se aprecia el mismo fenómeno observado en hígado, la mayoría de los ácidos grasos fueron modificados en este grupo, lo cual no ocurrió en el grupo STZ 50. Los cambios más notables

son un decremento en el ácido palmítico de 28.19% a 22.02%, en el esteárico que bajó de 25.54% a 18.01%, el oléico que disminuyó de 19.54% a 10.92%, con respecto al grupo SHR control. También se encontraron algunos incrementos como en el ácido linoléico de 12.54% a 17.33% y en el araquidónico de 6.28% a 22.37%, respecto a las ratas control. El cociente I / S del grupo STZ 100 también fue diferente al cociente del grupo control.

Es evidente que una mayor concentración de STZ, al generar una hiperglicemia severa, induce modificaciones en la composición de ácidos grasos de hígado y riñón.

ANEXO 5

PANCREATECTOMÍA PARCIAL (PTT) CON Y SIN SUPLEMENTO DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 (PTT/ ω -3).

El grupo con pancreatectomía también se siguió hasta los 8 meses de edad para ver si a pesar de no haber desarrollado hiperglicemia, se presentaban modificaciones en lípidos y ácidos grasos. Adicionalmente, las ratas pancreatectomizadas fueron divididas en dos grupos, de los cuales, a uno de ellos se le administró el suplemento de ácidos grasos ω -3. En este anexo se muestran las cuantificaciones de lípidos, proteína y composición de ácidos grasos de los grupos PTT y PTT/ ω -3.

Cuantificaciones de lípidos y proteína en SHR con PTT y PTT/ ω -3

Proteína y Lípidos en Suero

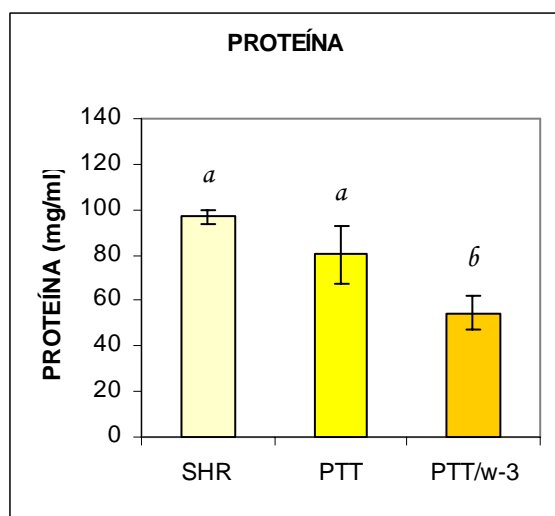


Figura 54. Proteína en suero a los 8 meses de edad de los grupos SHR, PTT y PTT/ ω -3. ($P < 0.05$)

La cuantificación de proteína en suero del grupo control y de los grupos con PTT y PTT/ ω -3 se muestra en la figura 54. Podemos observar que en el grupo PTT hubo una disminución de 17% en la proteína con respecto al grupo control, aunque ambos grupos no presentan diferencias. Por otra parte, el grupo PTT/ ω -3 mostró una reducción de la proteína en suero de 56.5% con relación al grupo SHR.

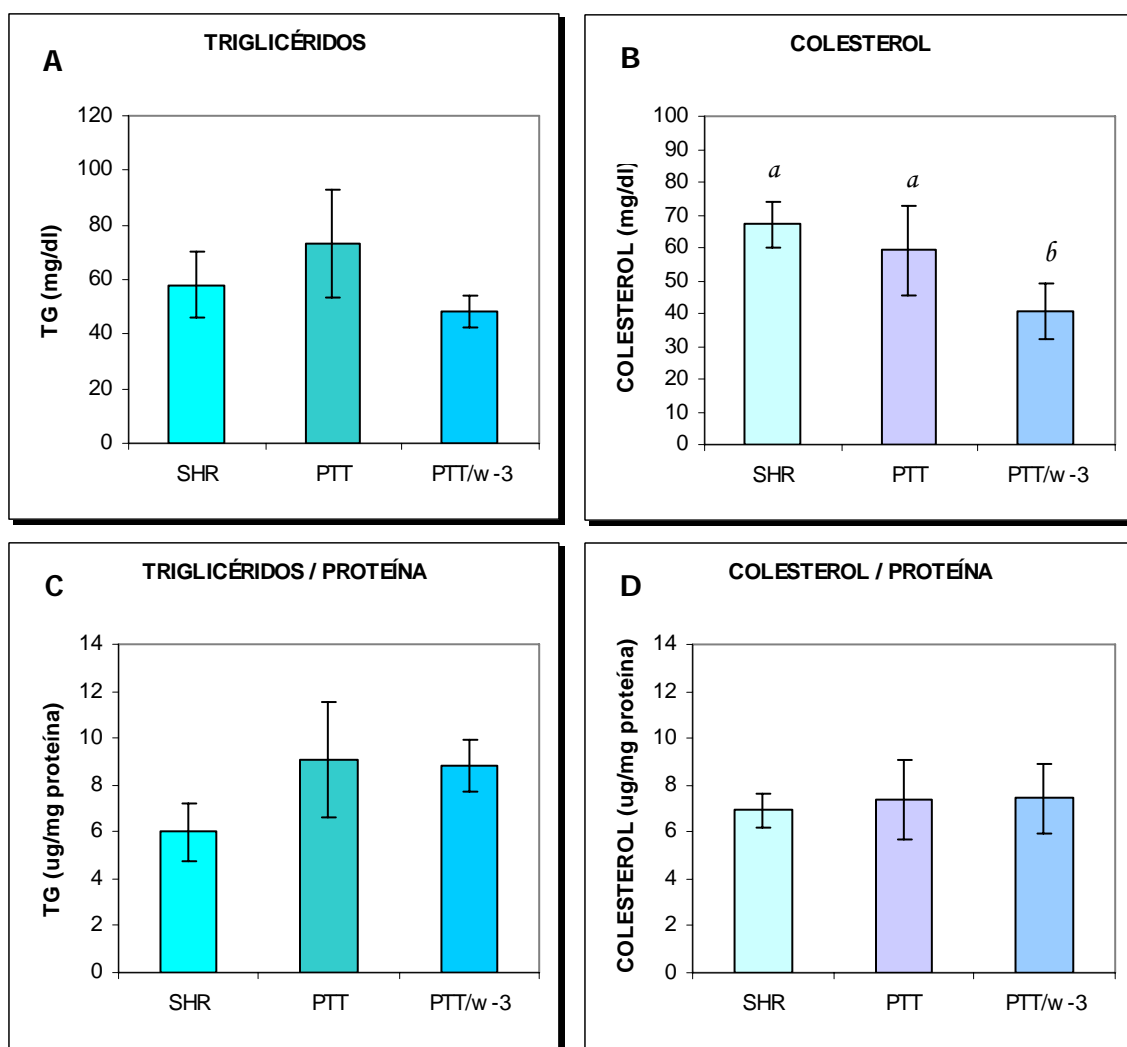


Figura 55. Cuantificaciones de triglicéridos y colesterol en suero a los 8 meses de edad de SHR-PTT y PTT/ ω -3. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cocientes triglicéridos/proteína. D) Cocientes colesterol/proteína. ($P < 0.05$)

Las cuantificaciones de lípidos en suero se presentan en la figura 60. Como podemos observar (Figura 55A), el grupo SHR y los grupos PTT y PTT/ ω -3 no muestran diferencias significativas entre sí, sin embargo, el grupo PTT presentan una cantidad de TG 26% más alta que el grupo control y las ratas con PTT/ ω -3 tienen una cantidad de TG menor que el grupo SHR. Al parecer en las ratas con PTT tienden a aumentar los TG y en las ratas con PTT/ ω -3, la cantidad de TG regresa a valores similares al de las SHR control. La cuantificación de colesterol en suero (Figura 55B) nos indica que la PTT no tienen efectos sobre este parámetro, pues el grupo PTT se comportó igual que el grupo SHR control, en tanto que las ratas PTT/ ω -3 muestran una disminución de 39.4% en los TG (40.6 mg/dl) en comparación con las SHR control (67 mg/dl). Los cocientes triglicéridos/proteína (Figura 55C)

nos indican un aumento de 33% en los TG de las ratas con PTT respecto al grupo SHR, aunque estos grupos no muestran diferencias. Al parecer en el grupo PTT/ ω -3 los TG también aumentan, sin embargo, el aumento en los TG de este grupo está más relacionado con la disminución en la proteína que con el aumento real de los TG, es por eso que la proporción TG/proteína se ve más elevada. Los cocientes colesterol/proteína no muestran diferencias entre los 3 grupos comparados (Figura 55D).

Proteína y Lípidos en Hígado

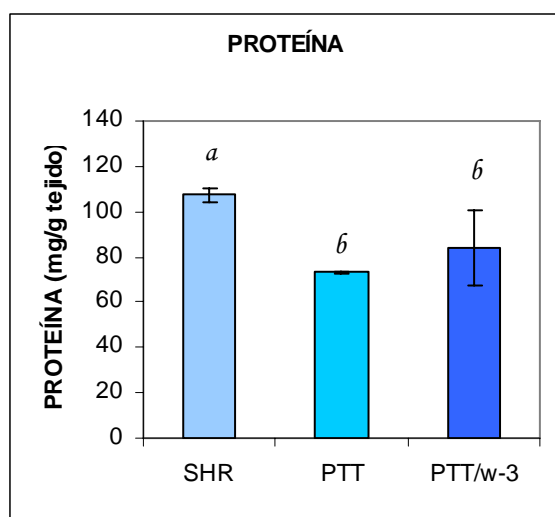


Figura 56. Proteína en hígado a los 8 meses de edad de los grupos SHR, PTT y PTT/ ω -3.

La cantidad de proteína en hígado de los grupos SHR, PTT y PTT/ ω -3 se presenta en la figura 56, donde se observa que las ratas con PTT muestran una ligera reducción del 31.5% de proteína con respecto al grupo control y el grupo PTT/ ω -3.

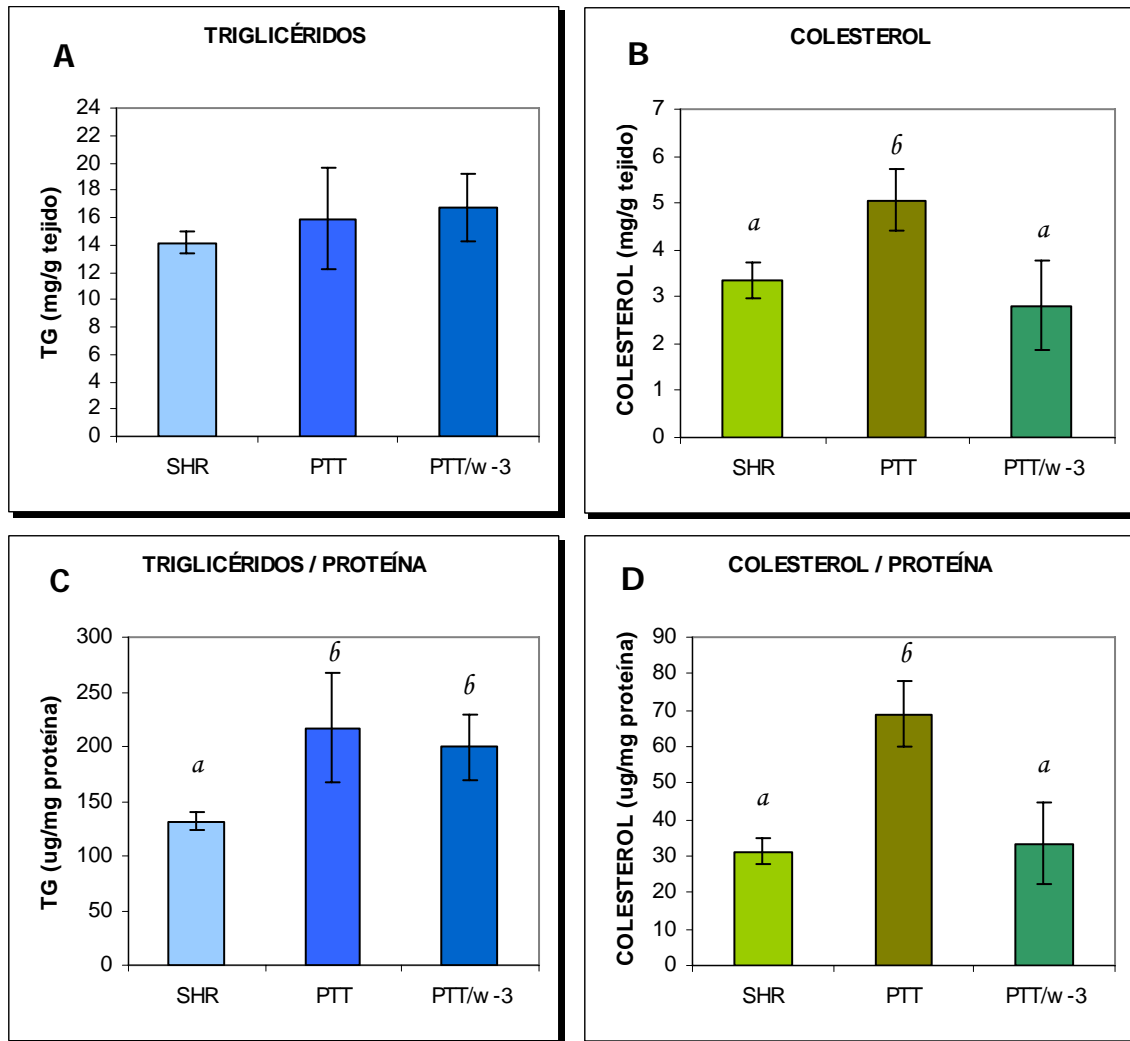


Figura 57. Cuantificaciones de triglicéridos y colesterol en hígado a los 8 meses de edad de SHR, PTT y PTT/ω-3. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cocientes triglicéridos/proteína. D) Cocientes colesterol/proteína.

La cuantificación de triglicéridos y colesterol en hígado se presenta en la figura 62. Con relación a triglicéridos (Figura 57A), los grupos SHR, PTT y PTT/ω-3 no tuvieron diferencias. En el caso del colesterol (Figura 57B), el grupo PTT fue 51% más elevado comparado con el grupo SHR, mientras que el grupo PTT/ω-3 tuvo una reducción de 45% en el colesterol con respecto al grupo PTT, comportándose de la misma forma que el grupo control. Los cocientes TG/proteína indican que tanto el grupo PTT como el PTT/ω-3 tienden a elevar la cantidad de TG en 64.5% y 51.4% respectivamente (Figura 57C). Los cocientes colesterol/proteína en hígado se observan en la figura 57D, se aprecia que la PTT eleva la

cantidad de colesterol en 120.8% con respecto al grupo SHR control, mientras que en el grupo PTT/ ω -3 no tuvo diferencias con el grupo SHR.

Proteína y Lípidos en Riñón

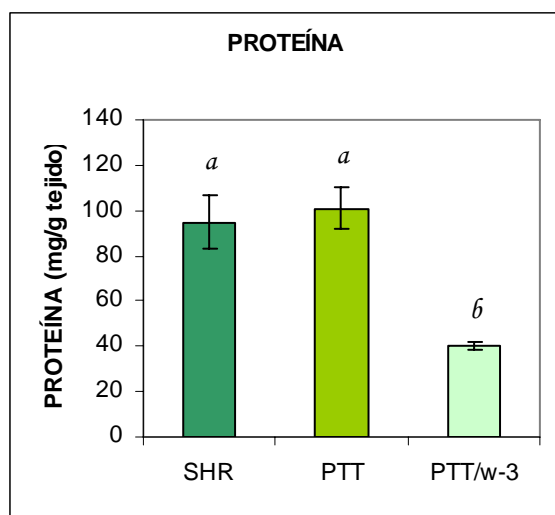


Figura 58. Proteína en riñón a los 8 meses de edad de los grupos SHR, PTT y PTT/ ω -3.

Los resultados de proteína en riñón se presentan en la figura 58, podemos apreciar que la PTT no modificó la cantidad de proteína en las SHR, sin embargo en el grupo PTT/ ω -3 (40.2 mg/g tejido) se registró una pérdida de 58% de proteína con respecto al grupo SHR (94.8 mg/g tejido). En lo que concierne a lípidos, las cuantificaciones de TG se presentan en la figura 59A y observamos que el grupo PTT tuvo un incremento de 96% comparado con el grupo control, en tanto que las ratas PTT/ ω -3 (12.4 mg/g tejido) también mostraron una mayor cantidad de TG que el grupo SHR (7.5 mg/g tejido), sin embargo, esta cantidad fue menor que la del grupo con PTT (14.7 mg/g tejido). La cuantificación de colesterol en riñón se aprecia en la figura 59B, los grupos PTT y PTT/ ω -3 tuvieron incrementos en la cantidad de colesterol en 54% y 51%, respectivamente, con relación al grupo SHR control. Esto nos indica que la PTT induce aumento en el colesterol y los ω -3 no tienen efecto sobre colesterol en estas ratas con PTT.

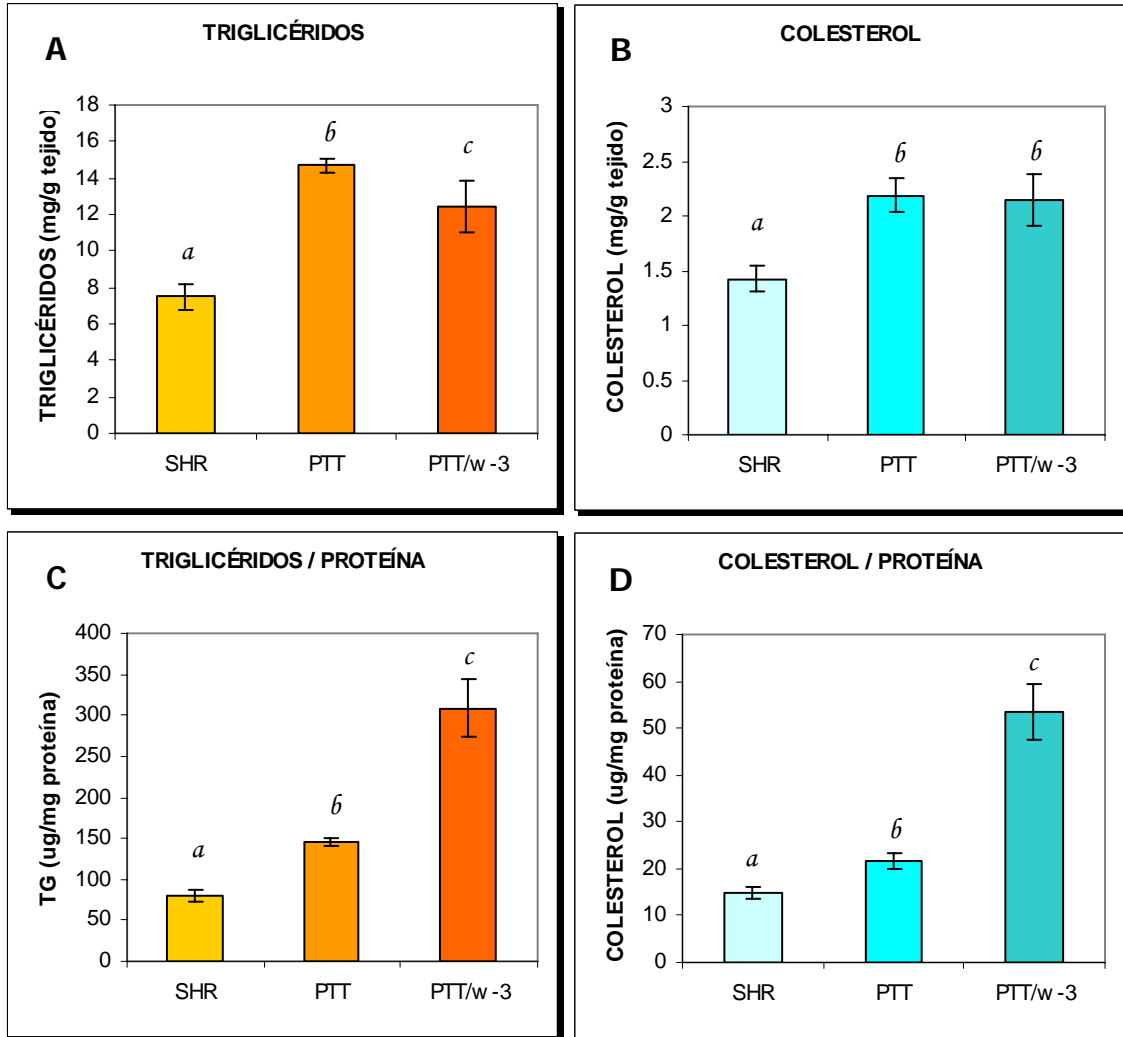


Figura 59. Cuantificaciones de triglicéridos y colesterol en riñón a los 8 meses de edad de SHR, PTT y PTT/ ω -3. A) Cuantificación de triglicéridos. B) Cuantificación de colesterol. C) Cocientes triglicéridos/proteína. D) Cocientes colesterol/proteína.

Los cocientes TG/proteína se aprecian en la figura 59C, las ratas con PTT tienen 83.8% más TG que las SHR, mientras que el grupo PTT/ ω -3 muestra un cociente 290% más alto que las SHR, sin embargo recordemos que la proteína en el grupo PTT/ ω -3 estaba muy reducida, lo cual incrementa la proporción lípidos/proteína. En la figura 59D vemos los cocientes colesterol/proteína, las ratas con PTT tienen 45% más colesterol que las SHR control, mientras que las ratas con PTT/ ω -3 tienen un cociente colesterol/proteína 255% más alto que el grupo SHR, sin embargo, como ocurrió con el cociente TG/proteína, el incremento está relacionado con la pérdida de proteína principalmente.

Composición de ácidos grasos de SHR con PTT y PTT/ ω -3

Tabla 14. Composición porcentual de los ácidos grasos de hígado a los 8 meses de edad de SHR, PTT y PTT/ ω -3.

Ácido graso	SHR	PTT	PTT/ ω -3
Mirístico	0.58% \pm 0.04	0.36% \pm 0.15	0.23% \pm 0.04
Palmítico	27.57% \pm 1.94	22.81% \pm 1.33	21.41% \pm 0.94
Palmitoléico	1.30% \pm 0.05	1.43% \pm 0.15	<u>0.92%</u> \pm 0.20
Esteárico	18.18% \pm 1.41	13.96% \pm 0.61	<u>16.30%</u> \pm 1.78
Oléico	15.69% \pm 1.12	13.53% \pm 1.32	13.86% \pm 1.14
Linoléico	20.88% \pm 0.19	20.07% \pm 1.09	18.98% \pm 2.04
γ Linoléico	0.31% \pm 0.02	0.31% \pm 0.07	0.27% \pm 0.05
Linoléico	0.44% \pm 0	0.45% \pm 0.05	0.31% \pm 0.11
Linoléico conjugado	0.29% \pm 0.08	N.D.	N.D.
Eicosaenóico	0.40% \pm 0	0.39% \pm 0.15	0.62% \pm 0.30
Araquidónico	10.67% \pm 3.73	14.89% \pm 1.18	15.65% \pm 1.41
Eicosapentaenóico	0.20% \pm 0.01	1.06% \pm 0.09	1.03% \pm 0.40
Docosahexaenóico	1.34% \pm 0.50	7.45% \pm 0.32	7.04% \pm 0.69
Compuestos de 20:3	0.76% \pm 0.11	1.47% \pm 0.16	1.51% \pm 0.25
AG no identificados	1.43% \pm 0.04	1.71% \pm 0.26	1.88% \pm 0.12
I / S	1.13 \pm 0.16	1.65 \pm 0.15	1.59 \pm 0.07

Nota: Las diferencias con el grupo SHR se encuentran en negritas y las diferencias respecto al grupo PTT están subrayadas.

La composición de ácidos grasos de hígado se puede ver en la tabla 14. El grupo PTT a pesar de no haber desarrollado hiperglicemia, sí mostró cambios en su composición de ácidos grasos. Entre los cambios ocurridos está la disminución de los ácidos grasos saturados mirístico de 0.58% a 0.36%, palmítico de 27.57% a 22.81% y esteárico de 18.18% a 13.96%, con respecto al grupo SHR. En PTT también se incrementaron algunos AGPI's como EPA, DHA y los compuestos de 20:3, lo cual se vio reflejado en el cociente I / S que fue diferente al de las ratas control. El grupo PTT/ ω -3 se comportó de manera muy similar al grupo con PTT, los únicos cambios registrados respecto a este, fueron la disminución en el ácido palmitoléico de 1.43% a 0.92% y el incremento en el esteárico de 13.96% a 16.3%. El

cociente I / S de las ratas PTT/ ω -3 se mostró diferente al del grupo control, mas no al del grupo PTT.

Tabla 15. Composición porcentual de los ácidos grasos de riñón a los 8 meses de edad de SHR, PTT y PTT/ ω -3.

Ácido graso	SHR	PTT	PTT/ ω -3
Mirístico	0.82% \pm 0.04	0.65% \pm 0.44	0.68% \pm 0.35
Palmítico	28.19% \pm 0.38	23.73% \pm 3.09	20.30% \pm 1.83
Palmitoléico	1.36% \pm 0.02	1.32% \pm 0.63	1.29% \pm 0.64
Esteárico	25.54% \pm 0.05	17.76% \pm 2.72	15.63% \pm 2.08
Oléico	19.54% \pm 0.14	11.04% \pm 2.10	16.95% \pm 3.05
Linoléico	12.54% \pm 0.13	14.57% \pm 4.28	17.68% \pm 1.98
γ Linoléico	0.13% \pm 0	0.18% \pm 0.03	<u>0.13%</u> \pm 0.01
Linolénico	0.36% \pm 0.04	0.21% \pm 0.14	0.38% \pm 0.16
Linoléico conjugado	0.04% \pm 0	0.44% \pm 0.35	<u>N.D.</u>
Eicosaenóico	0.69% \pm 0.09	0.94% \pm 0.33	0.90% \pm 0.21
Araquidónico	6.28% \pm 0.16	6.61% \pm 2.11	<u>18.21%</u> \pm 4.40
Eicosapentaenoico	0.33% \pm 0.22	0.57% \pm 0.26	0.63% \pm 0.13
Docosahexaenóico	0.88% \pm 0.29	1.34% \pm 0.99	2.07% \pm 0.30
Compuestos de 20:3	0.91% \pm 0.10	1.69% \pm 0.45	1.40% \pm 0.27
AG no identificados	2.42% \pm 0.26	1.92% \pm 0.18	1.69% \pm 0.34
I / S	0.79 \pm 0.01	1.06 \pm 0.46	1.69 \pm 0.17

Nota: Las diferencias con el grupo SHR se encuentran en negritas y las diferencias respecto al grupo PTT están subrayadas.

En lo que respecta a la composición de AG de riñón (Tabla 15), la PTT causó menos modificaciones que en hígado, en el grupo PTT se redujeron los porcentajes de ácido palmítico de 28.19% a 23.73%, de esteárico de 25.54% a 17.76% y de oléico de 19.54% a 11.04%, todos ellos respecto al grupo SHR; por otra parte, incrementó el linoléico conjugado y los compuestos de 20:3, el cociente I / S también es diferente al del grupo SHR. El grupo PTT/ ω -3 tuvo algunas diferencias importantes respecto al grupo control como el decremento en los ácidos palmítico y esteárico, y el aumento en el linoléico y DHA; así mismo, tuvo pocas diferencias respecto al grupo PTT, pero la más importante radica en el ácido araquidónico que aumentó de manera importante.

Con estos resultados podemos decir que la PTT sí modifica la composición de ácidos grasos en hígado y en riñón, a pesar de no haber generado hiperglicemia. El suplemento de ω -3 proporcionado a las ratas con PTT no induce cambios significativos en estas ratas.

REFERENCIAS CITADAS

Agrest, A. 1992. *Hipertensión arterial*. Intermédica. Buenos Aires. 182 pp.

Aguila, M. B., A. R. Pinheiro, J. C. F. Aquino, A. P. Gomes y C. A. Mandarim-de-Lacerda. 2005. Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*. 76: 74-85.

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

Anderson G.H., N. L. Catherine, D. M. Woodend y T. M. S. Wolever. 2002. Inverse association between the effect of carbohydrates on blood glucose and subsequent short-term food intake in young men. *Am J Clin Nutr*. 76:1023-1030.

Aschner, M. P. 1992. Anormalidades de las lipoproteínas en pacientes diabéticos: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. En: Rull, J. A., E. Zorrilla, M. N. Jadzinsky y J. V. Santiago. *Diabetes Mellitus. Complicaciones crónicas*. Interamericana, Mc Graw-Hill. México. 379 pp.

Bastos, A. A., B. R. González, O. G. Molinero y A. Salguero del Valle. 2005. Obesidad, nutrición y actividad física. *Revista Internacional de Medicina y Ciencias de la Actividad Física y el Deporte*. 5(18):40-153.

Belfiore, F. y S. Iannello. 2000a. Etiological classification, pathophysiology and diagnosis. En: Belfiore F., C. E. Mogensen (eds). *New Concepts in Diabetes and Its Treatment*. Basel, Karger. p. 3-19.

Belfiore, F. y S. Iannello. 2000b. Lipid abnormalities and lipid lowering in diabetes. En: Belfiore F. y C. E. Mogensen (eds). *New Concepts in Diabetes and Its Treatment*. Basel, Karger. p. 178-181.

Bellenger-Germain, S., J. P. Poisson, M. Narce. 2002. Antihypertensive effects of a dietary unsaturated fatty acid mixture in spontaneously hypertensive rats. *Lipids* 37: 561-567.

Bellenger, J., S. Bellenger, L. Clément, S. Mandard, C. Diot, J. P. Poisson, M. Narce. 2004. A new hypotensive polyunsaturated fatty acid dietary combination regulates oleic acid accumulation by suppression of stearoyl-coA desaturase 1 gene expression in the SHR model of genetic hypertension. *FASEB J*. 18: 773-775.

Bolzán, A. D. y M. S. Bianchi. 2002. Genotoxicity of Streptozotocin. *Mutation Research*. 512: 121-134.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-254.

Clark, W. F., A. Parbtani, D. Philbrick. 1990. Comparative efficacy of dietary treatments on renal function in rats with sub-total nephrectomy: renal polyunsaturated fatty acid incorporation and prostaglandin excretion. *Clin Nephrol.* 33: 25.

Comte, C., S. Bellenger, J. Bellenger, C. Tessier, J. P. Poisson y M. Narce. 2004. Effects of streptozotocin and dietary fructose on delta-6 desaturation in spontaneously hypertensive rat liver. *Biochimie.* 86: 799-806.

Covarrubias, R. M. E. y M. K. L. Ortega. 2002. Informe de residencia: Ácidos grasos omega 3 y omega 6. Tesis. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Agronomía. Santiago de Chile. 60 pp.

Díaz, H. D. P. y L. C. H. Burgos. 2002. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular?. *Iatreia.* 15(3):179-189.

Dominiczak, A. F. y D. F. Bohr. 1990. Cell membrane abnormalities and regulation of intracellular calcium concentration in hypertension. *Clin Sci.* 79: 415-423.

Durruty, A. P. y M. A. García de los Ríos. 2001. Glucotoxicidad y lipotoxicidad: factores en la patogénesis y evolución de la diabetes tipo 2. *Rev Med Chile.* 129(6): 671-679.

Elliott, S. S., N. L. Keim, J. S. Stern, K. Teff y P. J. Havel. 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr.* 76: 911-922.

Engler, M. B. y M. M. Engler. 2000. Docosahexaenoic acid-induced vasorelaxation in hypertensive rats: Mechanisms of action. *Biological Research for Nursing.* 2(2): 85-95.

Fernández-Mejía, C. 2001. Nuevo panorama para el entendimiento de los vínculos moleculares entre la obesidad y la diabetes tipo 2. *Rev Invest Clin.* 53(2): 209-211.

Ferré, P. 2004. The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes.* 53(Supl.1): S43-S48.

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

Foster, D. W. Diabetes Mellitus. 1994. En: Isselbacher, K. J., E. Braunwald, J. P. Wilson, J. B. Martin, A. S. Fauci y D. L. Kasper (eds). *Harrison: Principios de medicina interna.* 3ª ed. Vol. 1-2. Interamericana McGraw-Hill. p. 2281-2313.

Frenoux, J. M. R., E. D. Prost, J. L. Belleville y J. L. Prost. 2000. A polyunsaturated fatty acid diet lowers blood pressure and improves antioxidant status in Spontaneously Hypertensive Rats. *J Nutr.* 131(1): 39-45.

Gagliardino, J. J. y O. R. Rebolledo. 1992. Glucosilación no enzimática de proteínas y complicaciones crónicas de la diabetes. En: Rull, J. A., E. Zorrilla, M. N. Jadzinsky y J. V. Santiago. *Diabetes Mellitus. Complicaciones crónicas.* Interamericana, Mc Graw-Hill. México. 379 pp.

González, C. A., R. E. G. Alexánder, R. R. Alvarado, M. A. Ayub, J. A. Camacho, E. G. M. Cardona, C. A. Cobo, G. C. Fabian, A. M. Frati, H. A. García, D. B. González, J. G. G. González, H. Hernández y Hernández, M. A. C. Herrera, F. J. G. Lavallo, A. G. Lifshitz, R. I. Quibrera, J. G. Ríos, E. R. Romero y J. P. Verdejo. 1999. Consenso Mexicano de Resistencia a la Insulina y Síndrome Metabólico. *Rev Mex Cardiol*. 10(1): 3-19.

Guerra, M., D. Luján, M. Alvarado, D. Moreno y M. Silva. 2005. Estudio del perfil lipídico en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 de Bogotá. *Universitas Scientiarum*. 10: 81-89.

Guyton, A. C. 1987. *Fisiología humana*. 6a ed. Interamericana-Mc Graw-Hill. México. 704 pp.

Harris, M. I. 2003. Definición y clasificación de la diabetes mellitus y criterios actuales para el diagnóstico. En: LeRoith, D., S. I. Taylor y J. M. Olefsky. *Diabetes mellitus. Texto básico y clínico*. 2ª ed. Mc Graw-Hill. México. 1131 pp.

Hirafuji, M., T. Machida, N. Hamaue y M. Minami. 2003. Cardiovascular protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids with special emphasis on Docosahexaenoic Acid. *J Pharmacol Sci*. 92: 308-316.

Hwang, I. S., H. Ho, B. B. Hoffman y G. M. Reaven. 1987. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*. 10(5): 512-516.

Imig, J. D. 2006. Eicosanoids and renal vascular function in diseases. *Clinical Science*. 111: 21-34.

Iwase, M., M. Kikuchi y K. Nuno. 1987. Diabetes induced by neonatal streptozotocin treatment in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Metabolism*. 36: 654-657.

Iwase, M., K. Nuno, M. Wakisaka, M. Kikuchi, Y. Maki, S. Sadoshima y M. Fujishima. 1991. Spontaneous recovery from non-insulin-dependent diabetes mellitus induced by neonatal streptozotocin treatment in spontaneously hypertensive rats. *Metabolism*. 40(1): 10-14.

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

Kissebah, A. H., S. Alfarsi, D. J. Evans y P. W. Adams. 1982. Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein-B kinetics in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*. 31: 217-225.

Klahr, S. 1997. Oxygen radicals and renal diseases. *Miner Electrolyte Metab*. 23: 140.

Kota, B. P., T. H. W. Huang y B. D. Roufogalis. 2005. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*. 51: 85-94.

Liu, Y. Q., P. W. Nevin y J. L. Leahy. 2000. β -Cell adaptation in 60% pancreatectomy rats that preserves normoinsulinemia and normoglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278: E68-E73.

MacDonald, M. J., F. W. R. Chaplen, C. K. Triplett, Q. Gong y H. Drought. 2006. Stimulation of insulin release by glyceraldehyde may not be similar to glucose. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 447: 118-126.

Malmström, R., C. J. Packard, M. Caslake y M. R. Taskinen. 1999. Fisiopatología de la dislipidemia diabética: Nuevas ideas. *Cardiovascular Risk Factors*. 8(6): 311-315.

Martínez, C. M. J., M. T. L. Martínez y M. R. Serrano. 2003. Síndrome de resistencia a la insulina y síndrome metabólico: similitudes y diferencias. Síndrome metabólico: concepto, fisiopatología y epidemiología. *Cardiovascular Risk Factors*. 12(2):89-96.

Mayes, P. A. 1993. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr*. 58: 754S-765S.

Mendivil, A. C. O. y A. I. D. Sierra. 2005. Acción insulínica y Resistencia a la insulina: Aspectos moleculares. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb*. 53(4): 235-243.

Morrison, W. R. y L. M. Smith. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res*. 5: 600-608.

Nikkilä, E. A. y M. Kekki. 1973. Plasma triglyceride transport kinetics in diabetes mellitus. *Metab Clin Exp*. 22: 1-22.

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

O'Meara, N., R. Devery, D. Owens, P. Collins, A. Johnson y G. H. Tomkin. 1991. Serum lipoproteins and cholesterol metabolism in two hypercholesterolaemic rabbit models. *Diabetología*. 34: 139-143.

Organización Mundial de la Salud. 2006a. *Obesidad y sobrepeso*. Nota descriptiva No. 311. En: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/index.html. Consultado el 4 de febrero de 2008.

Organización Mundial de la Salud. 2006b. *Diabetes*. Nota descriptiva No. 312. En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/index.html>. Consultado el 4 de febrero de 2008.

Organización Mundial de la Salud. 2008. Prevalence of diabetes worldwide. En: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/. Consultado el 4 de febrero de 2008.

Orozco-Tapia, R. I. Efecto de los ácidos grasos omega 3 (FA ω -3) y linoleico conjugado (CLA) en la Diabetes Mellitus 2 (DM2) en ratas Wistar. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2008. pp. 110.

Pérez-Hernández, I. H. Cambios en lípidos durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2008. pp 77.

Randle P.J., P. B. Garland, C. N. Hales y E. A. Newsholme. 1963. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet*. 1: 785-789.

Ríos, T. J. M. y J. A. Rull. El síndrome clínico de diabetes mellitus. En: Rull, J. A., E. Zorrilla, M. N. Jadzinsky y J. V. Santiago. 1992. *Diabetes Mellitus. Complicaciones crónicas*. Interamericana, Mc Graw-Hill. México. 379 pp.

Robertson, P. R., J. Harmon, P. T. Oanh, Y. Tanaka y H. Takahashi. 2003. Glucose toxicity in β -cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 52: 584-587.

Rodríguez, E. Y. 2002. Interpretaciones recientes sobre el metabolismo lipídico en la resistencia a la insulina. *Rev Cub Aliment Nutr*. 16(1): 54-62.

Rodríguez-Cruz, M., A. R. Tovar, M. Del Prado y N. Torres. 2005. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev Invest Clin*. 57(3): 457-472.

Ros, E. y J. C. Laguna. 2006. Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3. *Rev Esp Cardiol Supl*. 6:52D-61D.

Sáez, A. M. y M. V. Serarols. 2007. Curso de Experto Universitario en Enfermería Nefrológica. Escuela Universitaria de Ciencias de la Salud. Universidad de Málaga. En: <http://www.carloshaya.net/biblioteca/contenidos/docs/nefrologia/predialisis/pedroaranda.pdf>. Consultado el 27 de febrero de 2008.

Sepúlveda, J. (ed.) 2000. Encuesta Nacional de Salud 2000. Tomo 2. Instituto Nacional de Salud Pública y Secretaría de Salud. En: http://www.insp.mx/ensa/ensa_tomo2.pdf. Consultado el 27 de febrero de 2008.

Sindelar, D. K., P. J. Havel, R. J. Seeley, C. W. Wilkinson, S. C. Woods y M. W. Schwartz. 1999. Low plasma leptin levels contribute to diabetic hyperphagia in rats. *Diabetes*. 48: 1275-1280.

Skov, K., J. R. Nyengaard, N. Korsgaard y M. J. Mulvany. 1994. Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 12: 1373.

Spector, A. A. y M. A. Yorek. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *Journal of Lipid Research*. 26: 1015-1035.

Stern, N. y M. L. Tuck. 2003. Patogenia de la hipertensión en la diabetes mellitus. En: LeRoith, D., S. I. Taylor y J. M. Olefsky. *Diabetes mellitus. Texto básico y clínico*. 2ª ed. Mc Graw-Hill. México. 1131 pp.

Storlien, L. H., A. B. Jenkins y D. J. Chisholm. 1991. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes*. 40: 280.

Szkudelski, T. 2001. The mechanism of Alloxan and Streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 50: 536-546.

Teff, K. L., S. S. Elliott, M. Tschöp, T. J. Kieffer, D. Rader, M. Heimen, R. R. Townsend, N. L. Keim, D. D'Alessio y P. J. Havel. 2004. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of gherlin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(6): 2963-2972.

Torres, H. S. 1999. Obesidad, resistencia a la insulina y características del músculo esquelético. *Acta Científica Venezolana.* 50: 34-41.

Villa, A. R., H. M. Escobedo y N. Méndez-Sánchez. 2004. Estimación y proyección de la prevalencia de obesidad en México a través de la mortalidad por enfermedades asociadas. *Gac Méd Méx.* 140 (Supl. 2): S21-S26.

Voet, D. y J. G. Voet. 1992. *Bioquímica.* Omega. Barcelona. 1315 pp.

Watanabe, Y., Y. S. Huang, V. A. Simmons y D. F. Horrobin. 1989. The Effect of Dietary n-6 and n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Blood Pressure and Tissue Fatty Acid Composition in Spontaneously Hypertensive Rats. *Lipids.* 24(7): 638-644.

Waters, K. M. y J. M. Ntambi. 1994. Insulin and dietary fructose feeding induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice. *J Biol Chem.* 269: 27773-27777.

Williams, G. H. Vasculopatía hipertensiva. 1994. En: Isselbacher, K. J., E. Braunwald, J. P. Wilson, J. B. Martin, A. S. Fauci y D. L. Kasper. *Harrison: Principios de medicina interna.* 3ª ed. Vol. 1-2. Interamericana McGraw-Hill. p. 1287-1303.