



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

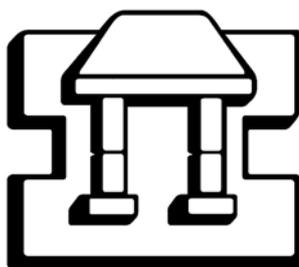
“Cambios en lípidos durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)”

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

PRESENTA:

ISMAEL HERMINIO PEREZ HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO MEJIA ZEPEDA



TLALNEPANTLA DE BAZ, EDO. DE MEXICO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

DEDICATORIAS

Más que dedicar este trabajo quiero agradecer sinceramente a cada una de las personas que contribuyeron a la realización de esta tesis pues sin su apoyo cariño y comprensión nada de esto hubiera sido posible. De verdad gracias por todo....

A dios por cuidar de mí darme la oportunidad y la inspiración de escribir cada día una historia diferente.

A mi abuelo Vicente Hernández (q.e.p.d) por guiar mis pasos, de cualquier parte del universo donde tú estés lograste que mi mundo flote libre.

A mis padres el Sr Ismael y la Sra Sofía quienes me brindaron amor y apoyo en todo momento y que con su sacrificio me regalaron un gran tesoro como fue mi formación profesional. Gracias Mamita pues eres mi gran ejemplo de constancia y lucha mostrándome que las metas se pueden lograr cuando uno lucha por alcanzarlas. Gracias Pa por tus enseñanzas por tus consejos y por todo tu apoyo durante estos años me siento orgulloso de ser tu hijo, este logro es algo que soñaste algún día y procuraste dar vida, ahora es una realidad.

A mis 3 bellas hermanas. Eira gracias hermanita por tu apoyo incondicional por estar ahí conmigo durante todos estos años este es un pequeño logro y un gran sueño que juntos hemos construido es sin duda "el final de un gran principio". A ti Cynthia (pequeño mo) gracias por hacerme los días más alegres, llenos de vida reconfortándome al llegar a casa y por creer siempre en mí aun en las adversidades. Y a Ceci, gracias pequeño sapito por llegar a unir nuevamente a la familia, eres un motivo más para disfrutar de la vida.

A mis tres tesoros: Bobby Chino y Chata sin duda mis grandes amigos quienes con solo una mirada logran transmitir una paz y tranquilidad indescriptible.

A mis padrinos José Luis y Blanca. Gracias padrino por guiarme y mostrarme la calidez humana, el perdón y la sabiduría para vivir a plenitud, usted me enseñó que existe un nuevo amanecer y que la vida

nos brinda una segunda oportunidad para corregir nuestros errores. Madrina blanquita por sus palabras de aliento cuando sentía que el mundo se venía encima usted estuvo ahí para reconstruirme y fortalecer las estructuras de mi ser gracias por mostrarme el otro lado de la luna. Con respeto y admiración les dedico este pequeño logro.

A mi Guru académico El Dr Ricardo Mejía quien me mostró la gran calidad humana, la profunda ética de un excelente investigador y la satisfacción de hacer ciencia. Gracias Doc por todas sus enseñanzas, por ser mi amigo, de verdad es un privilegio y un placer trabajar a su lado, usted sabe la profunda admiración que le tengo y como se lo dije una vez: algún día seré como usted.

A mi carnal de grandes batallas y con quien he compartido grandes momentos de alegría y tristezas "Súper Leo" gracias hermano por estar ahí y ser mi aliado, por las noches de desvelo estudiando, por las platicas interminables, por los conocimientos que a diario me compartes y por ser mi amigo tu sabes lo importante que eres para mi y que este logro es tuyo también. "Hasta la victoria siempre"

Pequeña Sara gracias por tu cariño, amistad y por el apoyo que me has brindado, por los buenos momentos durante los tours en el centro histórico y por cada instante que compartimos son mágicos e inolvidables.

A Gabi por acompañarme en muchas de mis andanzas Estela, Mayra, Rosibel, Josseline, José Luis, Dous, Carlos (Crisna). gracias por cada uno de los detalles que han tenido para conmigo,

Para mi amiga Pilar, gracias por los buenos momentos compartidos durante la carrera sabes que eres como una hermana con la que he tenido grandes vivencias, gracias por compartir buenos momentos tristezas alegrías y por crecer conmigo durante este tiempo.

A la Q.F.B. Elsa Guillen por todo su apoyo para la realización de esta tesis, por darme su gran ejemplo, cariño y por abrirme las puertas en su laboratorio, gracias química por sus buenos consejos los cuales fueron de gran utilidad durante toda la carrera.

A la Maestra Yolanda Ramos quien dio pauta para que yo lograra salir adelante durante mis estudios, gracias maestra pues con cada regaño suyo y cada "jalón de patilla" se me acomodaron las ideas,

aun recuerdo con mucho cariño cada una de sus clases muchas gracias por los fuertes cimientos que logro en mi maestra.

A mis profesores de biología, Arnulfo, Antonio Cisneros, Gilberto, Arturo Tovar, Luis Barbo, Ángel Lara, Carmen, Teresa Ramírez, Saúl flores, Leonor Abundiz. A cada uno de los profesores que contribuyeron en mi formación académica

A Luisa, Guillian Eva y toda la comunidad de PROCAN por esa noble tarea de dar una vida digna a cada perrito que llega a la fes iztacala, gracias por su apoyo y por integrarme en tan noble tarea.

A mis compañeros de laboratorio Rita, Emmanuel, Carmen, Jaime, Martha, Vicky Reynaldo. De cada uno de ustedes aprendí algo, además de compartir grandes experiencias, gracias por hacer más amenos los días. Gracias Fernando por las clases de bicho y las tardes de música y lucha libre Bien Bien Bien Bien... Gracias Yeeesica por tus palabras de aliento y soportar a este neuras que encontró en ti una gran mujer y una buena amiga.

A mí buen amigo Alan, Gracias hermano pues de ti aprendí la pasión por la ciencia y las artes la buena musica, fuiste parte fundamental para alcanzar este sueño, gracias carnal.

Y a mis amigos de Gravedad Zero: Omar, Miguel, Jonathan, Paco, por las buenas tocadás de rock, y su apoyo.

“Vivir es aprender para ignorar menos; es amar para vincularnos a una parte mayor de humanidad; es admirar para compartir las excelencias de la naturaleza y de los hombres; es un esfuerzo por mejorarse un incesante afán de elevación hacia ideales definidos; muchos nacen pocos viven” (José Ingenieros)

INDICE

ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCION.....	6
Diabetes.....	7
Clasificación de la diabetes mellitus.....	7
Diabetes mellitus tipo 1.....	8
Diabetes mellitus tipo 2.....	9
Glucotoxicidad y Lipotoxicidad.....	10
Biosíntesis secreción y acción de insulina.....	12
Obesidad.....	13
Síndrome Metabólico.....	14
Hipertensión.....	15
Clasificación etiológica.....	16
Anomalías de los lípidos en la hipertensión.....	17
Ácidos grasos.....	17
Antecedentes.....	19
OBJETIVOS.....	22
MATERIAL Y METODOS.....	23
Modelo experimental en ratas espontáneamente hipertensas.....	23
Química sanguínea.....	24
Fantasmas de eritrocitos.....	25
Incorporación del Dipirenil propano (DPiP) a fantasmas de eritrocitos.....	25
Medición de fluorescencia a fantasmas de eritrocitos.....	25
Extracción de lípidos de tejidos.....	26
Metilación de ácidos grasos de riñón e hígado de SHR.....	26
Análisis de los ácidos grasos de órganos de SHR por cromatografía de gases.....	26
Análisis estadístico.....	27
RESULTADOS.....	28
Glucosa en SHR lactantes.....	28
Peso de SHR lactantes.....	29
Glucosa en SHR después del destete.....	30

Presión en SHR a diferentes edades.....	32
Metabolismo de lípidos durante la diabetes y la hipertensión.....	34
Fluidez membranal.....	46
Tratamiento con aceite de linaza para el control de la glucosa y la presión arterial en SHR.....	48
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.....	52
Desarrollo de la diabetes tipo 2.....	52
Metabolismo de los lípidos.....	53
Hipertensión.....	56
Composición de ácidos grasos.....	57
Fluidez membranal.....	60
Suplemento omega-3.....	62
CONCLUSIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66

RESUMEN

La diabetes y la hipertensión, patologías estrechamente asociadas a la obesidad, constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad que cobra cada vez mayor relevancia en el mundo, lo que ha generado en la comunidad científica un interés sin precedentes por descifrar sus bases fisiopatológicas. En ese sentido, la comprensión de la regulación metabólica de los lípidos reviste una gran importancia, incluyendo el entendimiento de los mecanismos moleculares de acción hormonal que intervienen en su metabolismo. En este estudio analizamos los cambios en los lípidos durante la diabetes y la hipertensión a diferentes edades 1, 3 y 6 meses. Para nuestro estudio utilizamos ratas espontáneamente hipertensas (SHR). La inducción de diabetes mellitus tipo 2 se realizó mediante una inyección intraperitoneal con diferentes dosis de estreptozotocina (STZ) 50 mg/kg y 75 mg/kg, con la intención de generar un modelo con hiperglicemia ligera (<200 mg/dl) y otro con hiperglicemia severa (>200 mg/dl). Se hizo un seguimiento de la glucosa sanguínea, del peso y de la presión arterial, esta última por método pletismográfico. Se realizó la cuantificación del colesterol y triglicéridos en suero, también se analizó la composición de ácidos grasos de hígado y riñón. La fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos se midió utilizando el monitor fluorescente Dipirenil Propano (DPIP). Para contrarrestar los efectos de la diabetes y la hipertensión administramos un suplemento de aceite de linaza.

El modelo de diabetes con hiperglicemia ligera y severa se estableció en las SHR. Durante los primeros días las SHR con hiperglicemia severa mostraron valores que oscilaron entre 200 y 280 mg/dl, los fluctuaron durante todo el estudio, con un comportamiento muy similar al que se observa en humanos siendo un modelo confiable de diabetes. Durante la diabetes se promueve un incremento en la concentración sanguínea de colesterol y triglicéridos. En SHR con hiperglicemia severa la concentración de triglicéridos fue mayor que en los otros grupos a la edad de 3 meses.

Durante el estudio se observa que las ratas con hiperglicemia severa desarrollaron la hipertensión semanas antes que las SHR normoglicémicas. A las 6 semanas de vida, la presión sistólica en SHR con hiperglicemia severa fue de 140 mmHg, la diabetes contribuyó en acelerar el proceso de hipertensión y a mantener la presión arterial alta. La hiperglicemia pudo haber generado daño en órganos implicados en el control de la presión sanguínea; el riñón tiene un papel importante en la regulación de la presión sanguínea y posiblemente existió un daño en la hemodinamia renal que produjo nefropatía y establecimiento de la hipertensión.

Se observa que la composición de ácidos grasos en hígado y riñón de SHR cambió con la edad. Durante la diabetes la composición es notoriamente influenciada directamente por el grado de hiperglicemia. En riñón de las SHR normoglicémicas, el ácido araquidónico (AA) aumentó con la

edad. Un incremento en la cantidad de AA da origen a una mayor producción de prostaglandinas de la serie 2 y leucotrienos de la serie 4, con propiedades vasoconstrictoras principalmente, favoreciendo el desarrollo de la hipertensión. El alto contenido de AA en riñón sugiere que existe una mayor actividad de la $\Delta 6$ desaturasa y con ello una mayor conversión del ácido linoleico a araquidónico. En hígado, se encontró que en SHR normoglicémicas el AA disminuyó a la edad de 3 meses, sin embargo a los 6 meses de edad aumentó, esto sugiere que la actividad de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa pudo ser inhibida. El ácido araquidónico aumentó de manera considerable en riñón de SHR diabéticas en comparación con las SHR normoglicémicas, en las ratas diabéticas el incremento fue casi el doble. Estudios en animales y humanos sugieren que la actividad de la $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas es alterada con la hiperglicemia, la alteración de estas enzimas pudo ser responsable de la modificación en la composición de ácidos grasos durante la diabetes.

La estructura, dinámica y propiedades de la membrana han sido estudiadas utilizando diferentes técnicas. En este estudio utilizamos el monitor fluorescente DPiP para determinar la fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos. Encontramos que en SHR normoglicémicas la fluidez se modificó con la edad, esto sugiere que los cambios en la fluidez membranal pueden estar relacionados con la hipertensión. También observamos que la hiperglicemia severa tiende a reducir la fluidez membranal de los fantasmas de eritrocitos.

Se administró aceite de linaza a ratas normoglicémicas y diabéticas. En las SHR inducidas a diabetes con STZ, la concentración de glucosa sanguínea fue normal cuando se dio el suplemento de aceite de linaza que contiene alfa-linolénico, un ácido graso omega-3 y así se mantuvo hasta los 6 meses de edad.

INTRODUCCION

La diabetes y la hipertensión, patologías estrechamente asociadas a la obesidad, constituyen una de las principales causas de morbilidad y mortalidad que cobra cada vez mayor relevancia en el mundo, lo que ha generado en la comunidad científica un interés sin precedentes por descifrar sus bases fisiopatológicas. En ese sentido, la comprensión de la regulación metabólica de los lípidos reviste una gran importancia, incluyendo el entendimiento de los mecanismos moleculares de acción hormonal que intervienen en su metabolismo (Mendivil y Sierra, 2005).

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) se puede generar por varios mecanismos, uno de ellos ocurre cuando las necesidades del organismo por insulina sobrepasan la capacidad de las células β pancreáticas para producirla. Se sabe que la hiperglucemia y los altos niveles de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés), favorecen la acumulación de triacilgliceroles en las células, con lo que aumenta la tasa de apoptosis y disminuye el contenido y la secreción de insulina. Estas alteraciones producen glucotoxicidad y lipotoxicidad; la glucotoxicidad genera cambios en la expresión génica y aumento en la cantidad de radicales libres y de productos de glicación avanzada; la lipotoxicidad es más compleja, ya que además de los altos niveles de FFA hay alteraciones en otras vías, como la de ceramidas y las lipoproteínas plasmáticas (Harrison, 2002).

Por otro lado, la resistencia a la insulina predispone a desarrollar hiperglicemia, que a su vez ocasiona hiperinsulinemia que puede o no alcanzar la magnitud suficiente como para corregir la hiperglucemia. Esta concentración excesiva de insulina contribuye a incrementar la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado y generar la hipertrigliceridemia e incremento de la retención de sodio por los túbulos renales y, de este modo, contribuir al desarrollo de la hipertensión (Lawrence *et al.*, 2003).

Es importante conocer las características de las patologías antes mencionadas, así como los factores que contribuyen al desarrollo de las mismas y las complicaciones crónicas que estas generan, por lo cual en la siguiente sección se abordarán algunos detalles e información básica para el manejo del presente trabajo.

Diabetes

Desde los puntos de vista clínico y genético, la diabetes mellitus (DM) está constituida por un grupo heterogéneo de trastornos, caracterizados por una concentración anormalmente alta de glucosa en sangre. Las causas de la hiperglicemia son deficiencia en la secreción de insulina o resistencia de las células del cuerpo a la acción de esta. Además, a menudo ocurren alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (LeRoith, 2003). Existen diferentes factores que pueden desencadenar la DM, entre ellos se encuentra el factor genético y el ambiental.

Dependiendo de la causa de la DM, los factores que contribuyen a la hiperglicemia pueden comprender una disminución de la secreción de insulina, un menor consumo de glucosa y un aumento de la producción de glucosa. El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos (Powers, 2003).

Los avances recientes respecto a la etiología y la patogenia de la diabetes han hecho que se revise su clasificación. Aunque todas las formas de DM se caracterizan por la hiperglicemia, los mecanismos por los que ésta se produce son muy diversos. Algunas formas de DM se caracterizan por un déficit absoluto de insulina o un defecto genético que provoca una secreción defectuosa de insulina, mientras que otras formas tienen en común la resistencia a la insulina (Harrison, 2002).

Clasificación de la diabetes mellitus.

Diabetes mellitus tipo 1: Causada por la destrucción de células β pancreáticas, a menudo de tipo inmunitario, que origina la pérdida de la secreción de insulina y deficiencia insulínica absoluta. Aún no se conocen los elementos causales del proceso autoinmunitario y la destrucción de las células β , también comprende los casos en que no se conocen las causas de la destrucción de las células β ; representa entre 5 y 10% de los casos del síndrome diabético.

Diabetes mellitus tipo 2: producida por una combinación de factores genéticos y no genéticos cuyas consecuencias son la resistencia insulínica y la deficiencia de insulina. No se conocen los genes específicos, pero se les investiga de manera intensiva. Algunos de los factores no genéticos son edad avanzada, consumo excesivo de calorías, sobrepeso, adiposidad central, vida sedentaria y bajo peso al nacer. Corresponde el 90 - 95% de los casos de síndrome diabético.

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

Diabetes mellitus gestacional: ocasionada por resistencia a la insulina y deficiencia relativa de insulina durante el embarazo. Ocurre entre el 3 a 5% de los embarazos.

Diabetes tipo 1

Anteriormente se denominaba diabetes mellitus insulino dependiente o diabetes juvenil. Los factores de riesgo para el desarrollo de la diabetes tipo 1 pueden ser factores autoinmunes, genéticos o ambientales. La diabetes tipo 1 se desarrolla cuando el sistema inmunológico del cuerpo destruye las células β del páncreas, las que producen la hormona insulina que regula la concentración de la glucosa en la sangre. La diabetes de tipo 1 se caracteriza por la falta total de insulina, a medida que la destrucción de las células β progresa, los niveles de insulina decrecen produciendo un aumento de la concentración de glucosa en la sangre (LeRoith, 2003).

En el hígado la disminución de la insulina y el exceso relativo de glucagón produce aumento en la degradación del glucógeno y un aumento de la glucogénesis, por lo que se produce de esta manera un aumento adicional de glucosa sanguínea. Un exceso de glucosa en sangre sobrepasa la capacidad de reabsorción en el riñón y como consecuencia se elimina la glucosa en orina (glucosuria) arrastrando consigo sales y agua, esta pérdida produce los síntomas de poliuria y polidipsia característicos de la enfermedad (Harris, 2003).

Por otro lado, la lipólisis se encuentra favorecida por la falta de entrada de glucosa al adipocito y el aumento relativo de glucagón, produciendo en exceso la salida de ácidos grasos, parte de ellos son utilizados por otros tejidos como combustible y/o transformados a cuerpos cetónicos en el hígado, estos cuerpos cetónicos representan una fuente de energía. En la forma más avanzada de la diabetes tipo 1, en la que la destrucción de las células β produce la carencia casi total de insulina, el catabolismo del glucógeno, proteínas y en especial de lípidos, sobrepasa las necesidades

nutricionales del organismo y ocasiona un exceso de cuerpos cetónicos los cuales captan el sodio del bicarbonato plasmático provocando cetoacidosis, responsable del coma diabético. La cetoacidosis es una característica clínica diferencial entre la diabetes tipo 1 y 2; la diferencia radica en la cantidad de insulina producida entre los dos subtipos del padecimiento, aparentemente la pequeña cantidad de insulina producida en la diabetes de tipo 2 es capaz de bloquear la degradación de ácidos grasos a partir de la lipólisis evitando la sobreproducción de cuerpos cetónicos (Chipkin *et al.*, 1994)

Diabetes mellitus tipo 2

La DM de tipo 2 es un trastorno heterogéneo de etiología compleja que se desarrolla en respuesta a influencias genéticas o ambientales. En su desarrollo son claves la resistencia a la insulina y la secreción anormal de insulina. Aunque existe controversia respecto al defecto primario, la mayoría de los estudios apoyan el punto de vista de que la resistencia a la insulina es previa a los defectos de la secreción de insulina (Harrison, 2003).

El tipo 2 es la forma más común de la diabetes mellitus. Sus complicaciones afectan primordialmente al aparato vascular y originan cifras excesivas de arteriopatía coronaria, neuropatía e insuficiencia renal, retinopatía y ceguera, enfermedad vascular periférica, neuropatías y amputaciones. Estas complicaciones originan gran parte de los casos de morbilidad y exceso de mortalidad vinculados con la diabetes mellitus. Se ha acumulado información considerable respecto a las características epidemiológicas de la diabetes mellitus tipo 2, en particular desde que se adoptaron criterios internacionales para su diagnóstico (WHO, 1985).

Este tipo de diabetes, llamado antes no insulino dependiente, es la forma más común de la enfermedad; esta se caracteriza por perturbaciones de la actividad y la secreción de insulina, de las cuales una u otra pueden ser el signo predominante, y que por lo común ya están establecidas en la fecha en que el trastorno se manifiesta clínicamente (LeRoith, 2003).

Una teoría propone que los niveles elevados de ácidos grasos libres, una característica frecuente en la obesidad, puede contribuir a la patogenia de la DM de tipo 2 de muchas maneras diferentes. Los ácidos grasos pueden alterar la utilización de glucosa en el músculo esquelético, promover la producción de glucosa por el hígado y alterar la función de las células β pancreáticas (LeRoith, 2003).

Glucotoxicidad y lipotoxicidad.

La glucotoxicidad y la lipotoxicidad son fenómenos metabólicos estrechamente relacionados con la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2 (Durruty y García de los Rios 2001).

Las células β pancreáticas no sólo funcionan como una bomba de insulina, sino que poseen un sofisticado sistema censor que adapta la cantidad de hormona secretada a la demanda glucosídica. Aunque la glucosa es el nutriente esencial desencadenante de dicha respuesta, otros nutrientes como los ácidos grasos y ciertos aminoácidos también son capaces de regular respuestas secretoras dependientes de glucosa (Prentki *et al.*, 1997).

La glucosa puede tener, en este sentido un doble papel ejerciendo un efecto benéfico o deletéreo sobre las células β pancreáticas, todo depende del tiempo en el que las células β están expuesta a las altas concentraciones de glucosa. En otras palabras, si las células β están sometidas a una hiperglicemia aguda (situación fisiológica) o crónica (situación patológica). Esta última situación es típica de la diabetes tipo 2 y de patologías relacionadas con la obesidad (Roche *et al.*, 2003).

En los casos de hiperglicemia crónica la historia se complica y la glucosa es capaz de modificar directa e indirectamente diversos programas génicos que desembocan en la producción de profundos cambios fenotípicos. Se ha observado en diversos modelos experimentales animales y de células cultivadas, que la alta concentración de glucosa modifica los niveles de expresión del gen codificador del transportador de glucosa GLUT2 en las células β (Roche *et al.*, 1997). Otro de los mecanismos propuestos es el de una menor actividad de la fosfolipasa c, enzima necesaria para la formación de inosítidos fosfatos, que participan en la secreción insulínica al aumentar la concentración de calcio intracelular. Además, un mecanismo poco fundamentado es el de una glicosilación de insulina, que disminuiría la acción de la hormona (Rosetti, 1995). Estos cambios van acompañados de otros cambios metabólicos y funcionales, como es una alteración en la curva de secreción de insulina, deposición de glucógeno, flujo glucolítico aumentado, al igual que una marcada producción de triglicéridos y lípidos complejos. En conjunto, estas profundas alteraciones han dado pie a la hipótesis de la glucotoxicidad, postulando efectos nocivos a nivel de las células β pancreáticas a altas concentraciones de glucosa (Roche *et al.*, 2000).

Los lípidos son otro componente nutricional determinante en la regulación de la función de las células β pancreáticas. Al igual que la glucosa, presentan 2 papeles en función del tipo de exposición al que la célula se vea sometida. La exposición aguda de las células β a altas concentraciones de ácidos grasos potencia el proceso de secreción inducido por glucosa, sugiriendo que estos

nutrientes tendrían un efecto como factores de acoplamiento transduccional. Este efecto podría ser vía activación de determinadas isoformas de la proteína Kinasa C (PKC) (Alcazar *et al.*, 1997), mediante la regulación de canales de calcio necesarios para inducir el proceso secretor o mediante la acilación de determinadas proteínas que participan en el proceso exocitótico. (Yajima *et al.*, 2000).

Hace más de 4 décadas que Randle y colaboradores (1963) postularon que el aumento de la oxidación de los ácidos grasos libres en músculo restringía tanto la captación como la utilización de glucosa por este tejido (competencia de sustratos), secundaria a una inhibición de enzimas clave involucradas en la cascada de la vía oxidativa y no oxidativa de la glucosa, es decir, se observaba una incapacidad para oxidar la glucosa como energía y almacenarla como glucógeno. Este ciclo ha sido denominado “ciclo de la glucosa-ácido graso” (Randle *et al.*, 1963).

En la actualidad se acepta la hipótesis de Randle y colaboradores (1963), quienes demostraron la relación entre lipotoxicidad y resistencia a la insulina. El aumento de ácidos grasos libres, aumenta su captación y oxidación, usándose estos como fuente de energía en los distintos tejidos en competencia con la glucosa. Además los ácidos grasos libres reducen la afinidad insulina-receptor, disminuyendo la acción de la insulina en los tejidos insulino-dependientes, favoreciendo así la resistencia a la insulina. Se ha encontrado que en músculo se inhibe la captación y oxidación de la glucosa con la consiguiente disminución de la síntesis de glucógeno. En el hígado se produce gluconeogénesis con mayor producción de glucosa. Como consecuencia de todo esto habría hiperglicemia e intolerancia a la glucosa (Unger y Grundy 1997).

La exposición crónica de células β pancreáticas a altas concentraciones extracelulares de ácidos grasos produce también profundos cambios fenotípicos. Así, la célula pierde la sensibilidad a la glucosa mostrando un patrón de hiperinsulinemia a bajas concentraciones de glucosa y una incapacidad de adaptar la respuesta secretora a incrementos en la glucemia (Segall *et al.*, 1999). La síntesis de insulina se ve severamente disminuida y se observa además una deposición exagerada de lípidos, cuya degradación se ve retardada incluso tras varios días en condiciones normoglucémicas.

Biosíntesis, secreción y acción de la insulina

La glucosa es el regulador esencial de la secreción de la insulina por las células β pancreáticas, aunque los aminoácidos también ejercen influencia, así como las cetonas, diversos nutrientes, péptidos gastrointestinales y neurotransmisores. Además, la secreción de insulina también es modulada por la acción de diversas hormonas (Harrison, 2002).

La glucosa estimula la secreción de insulina a través de una serie de pasos reguladores que empiezan con su transporte al interior de la célula β , por el transportador de glucosa GLUT2, el cual tiene una K_m para la glucosa de 17 mM. La ruta glucolítica continúa hasta la formación de piruvato que es convertido en acetil-coenzima A en la mitocondria, en donde es oxidado en el ciclo de Krebs. La última fase es la transferencia de electrones a la cadena respiratoria, la cual está acoplada a la síntesis de ATP, proceso conocido como fosforilación oxidativa. El ATP es exportado al citosol y el incremento en la relación de ATP/ADP en la célula β inicia la actividad eléctrica. (Fig. 1) (Cruz-Cruz *et al.*, 2005).

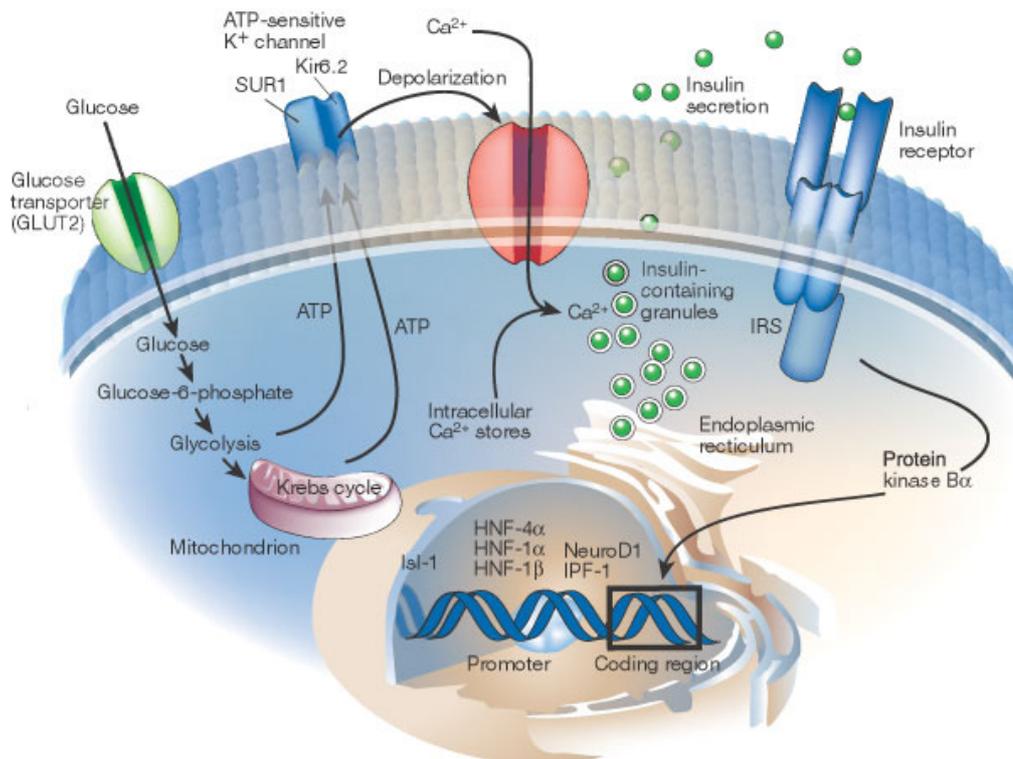


Fig. 1 Síntesis y secreción de insulina. Figura tomada de Mears 2004

La insulina, una vez secretada a la vena porta, se elimina y degrada en un 50% en el hígado. La insulina no extraída penetra en la circulación venosa sistémica y se une a su receptor en los lugares de acción. El receptor de insulina pertenece a la clase tirosina cinasa de receptores unidos a la membrana. La unión de la insulina al receptor estimula la actividad intrínseca de la tirosina cinasa, lo que provoca la autofosforilación del receptor y el reclutamiento de moléculas de señalización intracelular como los sustratos del receptor de insulina (IRS; *insulin receptor substrates*) 1 y 2. Estas proteínas adaptadoras y otras inician una cascada compleja de reacciones de fosforilación y defosforilación, que en último término provocan los amplios efectos metabólicos de la insulina (Harrison, 2002).

La activación de las vías de señalización del receptor de insulina induce la síntesis de glucógeno, la síntesis de proteínas, la lipogénesis y la regulación de diversos genes en las células que responden a la insulina. En ayunas, los bajos niveles de insulina promueven la gluconeogénesis y la glucogenólisis hepática para evitar la hipoglucemia. Los bajos niveles de insulina disminuyen la síntesis de glucógeno y la captación de glucosa en los tejidos sensibles a la insulina, y promueven la movilización de los precursores almacenados. Los niveles reducidos de insulina tienen también un efecto permisivo sobre la capacidad del glucagón para estimular la glucogenólisis y la gluconeogénesis por el hígado y la médula renal. Estos procesos son de gran importancia para asegurar un suministro adecuado de glucosa al cerebro (Mears, 2004).

Obesidad

La palabra obesidad proviene del latín: *obesitas*, que significa a “causa de que yo como” y es la acumulación generalizada y excesiva de grasa corporal. La obesidad es una enfermedad crónica cuya prevalencia va en aumento y plantea un serio riesgo porque promueve el desarrollo de la diabetes mellitus, hipertensión arterial, cardiopatías, enfermedades de la vesícula biliar y ciertas formas de cáncer. Se puede considerar a la obesidad como una consecuencia de la interacción de las fuerzas ambientales con el genotipo del individuo, concretamente con genes de susceptibilidad (Harrison 2002).

La obesidad es considerada una enfermedad por dos motivos principales:

- A) Acorta la expectativa de vida, de tal modo que no puede establecerse, en la obesidad mórbida, una predicción razonable, los obesos cuyo peso es superior al 30% de lo normal pueden ver reducida esta expectativa de vida a la mitad.
- B) Provoca, complica o agrava otras patologías. La obesidad en si puede ser motivo para que aparezcan: insuficiencia respiratoria, insuficiencia cardiaca, hipertensión arterial, hiperlipoproteinemia, y tolerancia anormal a la glucosa (Kahn y Flier 2000).

Además de la mayor sobrecarga de trabajo para el corazón, la obesidad se asocia también a un riesgo de la muerte súbita, debido probablemente a arritmias cardíacas y a mayor riesgo de aterosclerosis lo que es probablemente consecuencia de un perfil de lípidos anormal, caracterizados por unos valores bajos de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y unos valores altos del colesterol unidos a las lipoproteínas de baja densidad, especialmente de las que están en forma de partículas VLDL poco densas. También hay más prevalencia de hipertensión arterial, cuyo mecanismo no está aclarado. Una hipótesis sugiere que la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina favorecen la reabsorción de sodio por el túbulo renal y aumenta los impulsos simpáticos eferentes que acentúan la constricción arterial (Harrison 2002).

Síndrome metabólico

Hace 19 años, Reaven describió la asociación entre hiperinsulinemia y enfermedad cardiovascular (Reaven, 1988). Los pacientes presentaban lo que denominó síndrome X, formado por un conjunto de alteraciones patológicas, destacando entre ellas la intolerancia a la glucosa y la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión arterial y una dislipidemia caracterizada por hipertrigliceridemia y niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL). En los últimos años, este síndrome ha recibido diversas denominaciones, siendo la más aceptada la de síndrome metabólico. Se le han agregado otros atributos: obesidad vísceroabdominal, aumento de lipoproteínas de baja densidad LDL pequeñas y densas, hiperuricemia, aumento del factor inhibidor del activador del plasminógeno y del fibrinógeno, hiperandrogenismo y ovario poliquístico en mujeres en edad fértil, hígado graso con esteato-hepatitis no alcohólica, marcadores pro-inflamatorios y de disfunción endotelial (Bonora *et al.*,2003)

En la actualidad, podemos definir el síndrome metabólico como una condición patológica asociada a resistencia a la insulina e hiperinsulinemia que presenta un alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad cardiovascular aterosclerótica. (Fig 2.)

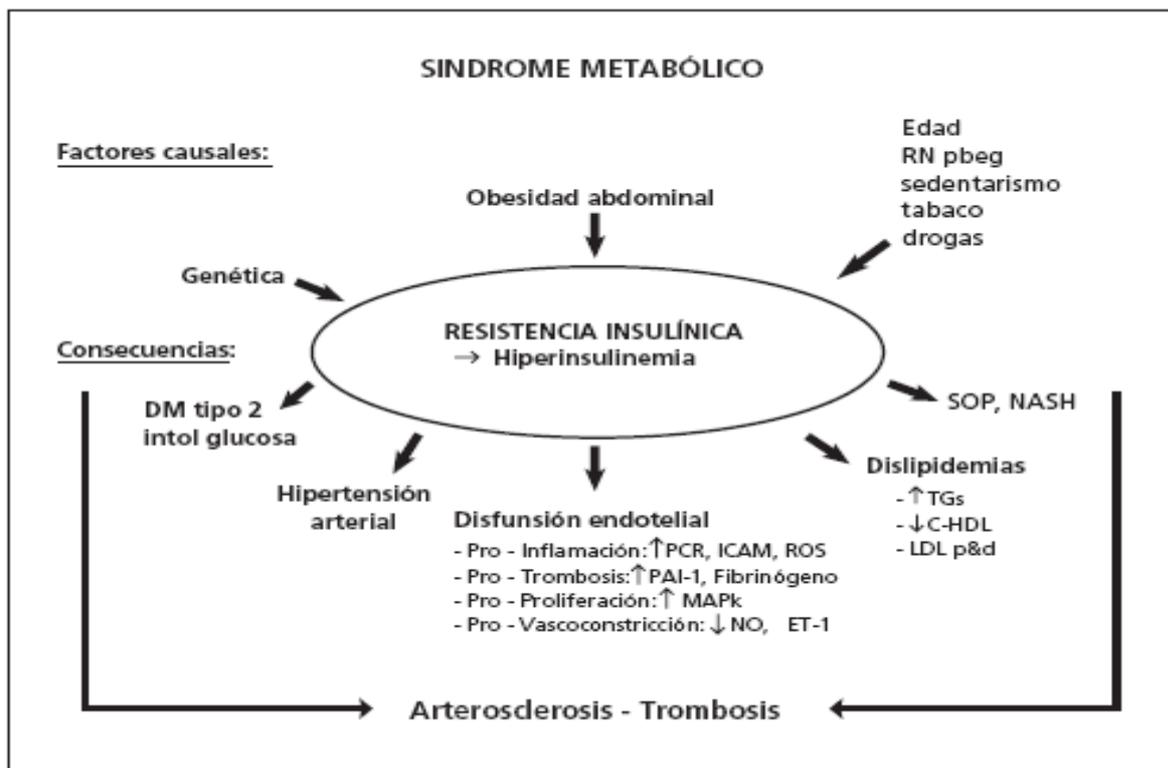


Fig. 2 Esquema del síndrome metabólico. Tomado de Maiz 2005.

La resistencia a la insulina se define como una condición caracterizada por una menor actividad biológica de la hormona que se expresa en sus diferentes acciones metabólicas, siendo la más evidente en el metabolismo de la glucosa. Esto se manifiesta en órganos y tejidos como el hígado, tejido adiposo y muscular además del endotelio. Un cierto grado de resistencia a la insulina es fisiológico durante la pubertad, en el embarazo y con el envejecimiento, siendo normalmente compensada por una mayor secreción de insulina por las células β del páncreas. La resistencia a la insulina puede ser secundaria a defectos del receptor de insulina o por trastornos de su acción a nivel post-receptor (Maiz, 2005). La obesidad juega un papel importante en el síndrome de resistencia a la insulina, aumentando el riesgo a contraer enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensión.

Hipertensión

La regulación de la presión sanguínea es una de las funciones fisiológicas más complejas; depende de las acciones integradas del sistema cardiovascular renal, neural y endócrino. La hipertensión es un trastorno del valor promedio al que está regulada la presión sanguínea y, si bien tiene importancia clínica debido a que cuando está crónicamente elevada lesiona el corazón, los

vasos sanguíneos, y los riñones, por lo menos en las etapas iniciales la hipertensión no causa alteraciones obvias de la función cardiovascular (Oparil y Weber 2000).

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es un problema de salud pública en México. Tiene una prevalencia ascendente y se distribuye ampliamente entre la población (Velásquez *et al.*, 2000). Se le reconoce como una enfermedad con morbilidad y mortalidad propias y como elemento causal de la aterosclerosis. Su efecto nocivo se potencia cuando se asocia a factores que incrementan el riesgo (Koch y Weser 1973).

La hipertensión, término que significa “presión arterial elevada”, se produce en aproximadamente una de cada cinco personas antes del final de la vida, por lo general durante la madurez o la senectud. La hipertensión es un padecimiento multifactorial, caracterizado por un aumento sostenido de la presión arterial, igual o mayor a 140/90 mmHg. La presión arterial excesiva en la hipertensión puede romper vasos sanguíneos en el cerebro con producción de accidentes vasculares cerebrales; en el riñón produce insuficiencia renal y en otros órganos vitales produce ceguera, sordera, ataques cardiacos. Por estas razones, uno de los problemas más importantes de la fisiología es conocer las causas de la hipertensión (Moragrega, 2005).

La hipertensión puede clasificarse principalmente desde dos puntos de vista: por su etiología y según las cifras de presión arterial.

Clasificación etiológica

Primaria: en la mayoría de los casos no existe causa identificable. Además de la herencia, los mecanismos fisiopatológicos mejor conocidos son las alteraciones en el sistema nervioso, en el volumen sanguíneo, en el gasto cardíaco, en el estado de las resistencias arteriolas periféricas; en el sistema renina angiotensina aldosterona, en la sensibilidad a la sal y en la resistencia a la insulina (Moragrega, 2005).

Secundaria: se le denomina así a la hipertensión generada como consecuencia de otra patología o producida por un funcionamiento anormal de diferentes mecanismos reguladores de la presión, a continuación se señalan algunas alteraciones identificadas.

Hipertensión renal. Muchas alteraciones que lesionan el riñón pueden producir hipertensión renal. Por ejemplo, la constricción de las arterias renales hace que se incremente la presión arterial, y cuanto mayor el grado de constricción, mayor el aumento de presión. La elevan también las enfermedades renales, como infecciones, esclerosis de las arteriolas, inflamación renal, etc. Un mecanismo de la hipertensión renal es el desarrollo de un volumen sanguíneo excesivo cuando la función renal se vuelve anormal. Desde luego si la excreción renal se reduce como enfermedad del

riñón o riego sanguíneo insuficiente del mismo, sería de esperarse que la retención de sal y agua incrementara tanto el volumen de líquido intersticial como el volumen sanguíneo, este volumen mayor eleva la presión arterial (Guyton, 1987).

Función del sistema renina angiotensina en la hipertensión renal. A veces el riñón lesionado secreta grandes cantidades de renina, que a su vez produce formación de angiotensina y ésta vasoconstricción y aumento de la resistencia periférica total. Esta sucesión de eventos ocurre especialmente en el trastorno llamado hipertensión maligna. La vasoconstricción actúa de manera manifiesta con el efecto excesivo del volumen sanguíneo que se produce en la enfermedad renal para causar hipertensión muy grave (Guyton, 1987).

Anomalías de los lípidos en la hipertensión

Las personas con hipertensión, en especial si también manifiestan obesidad y resistencia a la insulina, tienen anomalías en el metabolismo de los lípidos como son valores elevados de lipoproteínas de muy baja densidad VLDL (Afonso *et al.*, 1997). Las cifras elevadas de VLDL se deben en parte a la liberación portal aumentada de ácidos grasos libres al hígado, estimulando con ello la síntesis hepática de esas partículas de triglicéridos. Con resistencia a la insulina hay menor actividad de la LPL (lipoprotein lipasa) unida al endotelio en el músculo esquelético y adipocitos, y esta LPL es la causante del metabolismo normal de las VLDL rica en triglicéridos y partículas de quilomicrones (Jensen *et al.*, 1989).

Ácidos grasos

Diferentes investigaciones señalan que hay una interacción significativa entre la alteración de las membranas y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, entre ellas la diabetes e hipertensión (Stier *et al.*, 1988, Okamoto *et al.*, 1989, Chi-Gupta 1998, Dorrance *et al.*, 2001). Por su parte, los ácidos grasos son constituyentes importantes de las membranas. En específico los ácidos grasos esenciales que son precursores de las prostaglandinas.

El organismo humano sintetiza numerosos ácidos grasos denominados no esenciales, mientras que otros deben incorporarse a través de la dieta, razón por la que se denominan esenciales. Estos últimos incluyen a los ácidos grasos de las familias omega-3 y omega-6 (Caballero *et al.*, 2006).

Además de ser una fuente de energía, los ácidos grasos omega-3 y omega-6 se incorporan a las membranas de las células donde son precursores de los eicosanoides que intervienen en numerosos procesos fisiológicos tales como la coagulación de la sangre o las respuestas inflamatorias e inmunológicas. Los ácidos grasos esenciales han formado parte de la dieta humana desde la remota antigüedad y se calcula que el cociente entre omega-3 y omega 6 consumido en la dieta era de 1:1 (Simopoulos, 1999). Sin embargo, en la actualidad este cociente se ha modificado de forma muy importante en los países occidentales siendo de hasta 1:30, esto debido a que cada vez se consumen mayores cantidades de omega-6 por la ingesta de aceites vegetales (maíz, girasol, soja) y la carne de origen animal, particularmente la de rumiantes.

Cambios en la composición de la membrana sugieren una participación de los fosfolípidos en el desarrollo de la hipertensión, pues se ha reportado que en pacientes hipertensos se presentan anomalías en los fosfolípidos de las membranas (Chi y Gupta, 1998). Los fosfolípidos no sólo juegan un papel esencial en el mantenimiento de la estructura y función normal de las células, sino que también dan origen a segundos mensajeros en la señalización celular, un mecanismo mediante el cual las hormonas y otras sustancias transmiten señales del exterior al interior de las células (Zeisel, 1993).

La ingesta de ácidos grasos poliinsaturados obtenidos de fuentes marinas ha demostrado reducir la incidencia de enfermedad cardiovascular (incluyendo hipertensión), lo que refleja en parte, agregación plaquetaria disminuida (Bonna *et al.*, 1990). Lahoz y colaboradores estudiaron los efectos de las grasas de la dieta, que difirieron en su grado de saturación, sobre sujetos normales. Concluyeron que las grasas monoinsaturadas (enriquecidas con aceite de oliva) y poliinsaturadas (enriquecidas con pescado azul) alteraron la producción de eicosanoides, la agregación plaquetaria y la presión sanguínea. Los máximos efectos de los cambios en ácidos grasos de la dieta, se registraron en sujetos hipertensos con complicaciones ateroscleróticas (Lahoz *et al.*, 1997).

Los ácidos grasos son constituyentes importantes de las membranas, entre ellos los ácidos grasos esenciales, que son precursores de las prostaglandinas. La síntesis de los eicosanoides es regulada por la cantidad de ácido araquidónico disponible en los fosfolípidos membranales por lo que si la composición de ácidos grasos en la membrana se altera, ésta puede tener repercusiones en la síntesis de los eicosanoides (Vance y Vance, 1985).

Antecedentes

Se estudió la actividad de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) y la síntesis de prostaglandinas en corteza renal y médula de ratas espontáneamente hipertensas con propensión a infarto (SHRSP) y sus contrapartes normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 10 y 50 semanas de edad. Los resultados muestran un incremento en la actividad de la PLA₂ con la edad en SHRSP pero no en las WKY. Además, la proporción de prostaglandinas E₂ y Tromboxano B₂ (PGE₂/TXB₂) y de la alfa 6-ceto-prostaglandinas F₁ (PGF₁ α), tromboxano B₂ (TXB₂) disminuyó en SHRSP. Como resultado de estos cambios se puede producir un aumento de la vasoconstricción e incremento de la resistencia vascular en SHRSP. Estos datos sugieren que la síntesis de prostaglandinas y la actividad creciente de la PLA₂ tienen un papel importante en el desarrollo y el mantenimiento de la hipertensión en SHRSP (Kawaguchi *et al.*, 1987). En otro trabajo en ratas SHRSP se encontró que el tromboxano A₂, prostanoides que tiene propiedades vasoconstrictoras, tiene un papel importante en la elevación de la presión arterial de estas ratas, además de ser un estimulador de la agregación de las plaquetas (Stier *et al.*, 1988).

En un estudio realizado en células renales de SHRSP se observó que la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina disminuyen con la edad, lo cual no ocurre con las ratas normotensas. También se encontró que disminuye la cantidad de ácido araquidónico en los fosfolípidos, además de tener un incremento en la actividad de la PLA₂. Los cambios estructurales de las membranas renales pueden proporcionar una explicación no sólo para las anomalías funcionales tales como el decremento en la fluidez membranal sino también en el progreso de la hipertensión (Okamoto *et al.*, 1989).

Para realizar mediciones de fluidez membranal se han utilizado diferentes células, entre ellas los eritrocitos. Mediante el uso de micropipetas, en un estudio se observaron los efectos de la edad sobre la elasticidad y deformabilidad de eritrocitos de SHR y sus contrapartes WKY de 3 a 23 semanas de edad. En la fase del desarrollo de la hipertensión (3 a 5 semanas de edad) las SHR mostraron una disminución en la deformabilidad de las membranas de los eritrocitos comparadas a las de las WKY. Sin embargo la deformabilidad de las membranas de eritrocitos de SHR mejoró y llegó a ser comparable con las membranas de eritrocitos de las WKY. Estos resultados indican que la anomalía en la elasticidad de membranas de eritrocitos en SHR es un evento que se desarrolla a edad temprana y que gradualmente se va recuperando, lo cual puede ser por un proceso adaptativo durante la hipertensión (Chabanel *et al.*, 1987).

Los resultados de otro estudio en eritrocitos indican que el ácido araquidónico, un ácido graso metabólicamente activo, aumenta en las membranas de los animales hipertensos comparados al control normotenso. Se concluye que la fluidez reducida de la membrana observada en la hipertensión, puede ser debida a un aumento en la proporción de esfingomielina en la membrana de la célula, y reportan que la composición y la fluidez de la membrana de la célula se alteran durante la hipertensión (Dorrance *et al.*, 2001).

En otro trabajo se estudio las anomalías de fosfolípidos en corazón y riñón en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Encontraron que en corazón de SHR la cardiolipina y el plasmalógeno de fosfatidiletanolamina incrementaron significativamente a diferencia de las WKY, pero la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina disminuyeron en SHR. En riñón de SHR el porcentaje de fosfatidiletanolamina fue significativamente alto, mientras que fosfatidiletanolamina plásmalógena y fosfatidilserina tuvieron un porcentaje bajo, concluyendo que la alteración en la composición de los fosfolípidos pudo contribuir al consumo más alto de oxígeno en el corazón hipertenso y a las anomalías en las concentraciones intracelulares de iones y del transporte de los iones en el corazón y el riñón durante la hipertensión (Chi y Gupta 1998).

En otro estudio se analizaron los cambios en la composición de ácidos grasos de corazón, aorta, riñón y hepatocitos de ratas SHR y WKY a diferentes edades: 1,3 y 6 meses de edad, respectivamente. Encontraron que el ácido araquidónico fue significativamente mayor en riñón de SHR a la edad de 1 mes a diferencia de las WKY, sin embargo fue disminuyendo a los 3 y 6 meses de edad. Por otro lado el porcentaje de ácido eicosapentanoico (EPA) fue menor en riñón de SHR. Los resultados en aorta fueron similares con una marcada disminución del ácido linoleico y EPA. Reportes previos muestran resultados similares, lo que hace suponer que durante la hipertensión existe una menor actividad de las desaturasas contribuyendo a estos cambios. Concluyen que la composición de ácidos grasos poliinsaturados PUFA es modificada en diferentes tejidos en SHR con el paso del tiempo, relacionándolo con el desarrollo de la hipertensión (Delachambre *et al.*, 1998).

Modificaciones en la composición de ácidos grasos, fosfolípidos y en el cociente entre omega-3 y omega-6 en la membrana puede afectar la fluidez y su función en la regulación de los diferentes procesos bioquímicos que en esta se realizan, de tal suerte que se generan anomalías en la célula. Dichos cambios, en algún momento pueden contribuir al desarrollo de diferentes trastornos metabólicos. Es posible que durante el desarrollo de la diabetes e hipertensión ocurran cambios en la composición de la membrana a diferentes edades lo que contribuye a las complicaciones de estas enfermedades conforme progresan.

Por lo anterior nuestro estudio se basa en investigar que cambios ocurren en lípidos membranales a diferentes edades (1, 3 y 6 meses de edad), además de medir la fluidez membranal y conocer si existe una alteración en el metabolismo de los lípidos durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión.

OBJETIVOS

General:

- Estudiar cambios de lípidos membranales durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

Particulares:

- Generar un modelo de diabetes tipo 2 en ratas SHR con hiperglicemia ligera (< 200 mg/dl) y otro con hiperglicemia severa (> 200 mg/dl).
- Hacer un seguimiento del desarrollo de la hipertensión arterial por método pletismográfico y de la diabetes por niveles de glucosa en sangre.
- Determinar la composición de ácidos grasos del hígado y riñón de ratas SHR diabéticas tipo 2, con hiperglicemia ligera o severa, así como de sus contrapartes no diabéticas y normotensas de 1, 3 y 6 meses de edad.
- Evaluar el contenido de proteínas, triglicéridos y colesterol en suero de ratas SHR diabéticas tipo 2 con hiperglicemia ligera o con hiperglicemia severa.
- Medir la fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos de SHR a diferentes edades.
- Evaluar el efecto de una dieta con suplemento de ácidos grasos omega-3, en la prevención del desarrollo de la diabetes y la hipertensión en ratas SHR.

MATERIAL Y METODOS

Modelo experimental de diabetes en ratas espontáneamente hipertensas.

Se utilizaron ratas espontáneamente hipertensas (SHR), las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio (aprox. 22°C, 12h luz, 12h oscuridad). La diabetes fue inducida en neonatos machos. Para generar el modelo de diabetes tipo 2 se inyectó estreptozotocina (STZ) intraperitonealmente a ratas neonatas de 48 h. Para generar una diabetes tipo 2 con hiperglicemia ligera se inyectó STZ a 50 mg/Kg de peso, y para una hiperglicemia severa se inyectó 75 mg/Kg de peso. El destete se realizó a las 4 semanas de nacidas.

Tabla 1: Grupos de ratas

EDAD	Ratas SHR neonatos Hipertensión normoglicémicas	Ratas SHR neonatos hipertensión Hiperglicemia ligera	Ratas SHR neonatos Hipertensión. Hiperglicemia severa
1 MES	18 ratas	18 ratas	18 ratas
3 MESES	12 ratas	12 ratas	12 ratas
6 MESES	6 ratas	6 ratas	6 ratas

Se llevó un registro semanal de la presión arterial por método pletismográfico (pletismógrafo marca Letica), midiendo la presión sistólica, diastólica y media en la cola de las ratas. Asimismo, se registró semanalmente la glucosa, medida con tiras reactivas en un glucómetro (Marca AccuChek®). Para seguir su crecimiento, las ratas se pesaron diariamente hasta el destete, después 3 veces por semana

El sacrificio de los animales se efectuó a diferentes edades: 1, 3 y 6 meses de edad (Tabla 1). Para ello las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital a una dosis de 40 mg/kg de peso, luego se extrajo la sangre por punción cardíaca utilizando una aguja vacutainer, la sangre se depositó en tubos con EDTA para la preparación de los fantasmas de eritrocitos. Para la obtención de suero se depositó la sangre en tubos de vidrio de 10 ml, luego se mantuvo 15 minutos en baño maría a 37°C hasta la formación del coágulo. Una vez formado el coágulo los tubos se centrifugaron en una

centrífuga marca Hermle Z383K a 2500 r.p.m. después el suero se depositó en tubos eppendorf para uso ulterior en las cuantificaciones de colesterol triglicéridos y proteína. Finalmente se aislaron riñón e hígado, para analizar la composición de los ácidos grasos por cromatografía de gases.

Química sanguínea

Colesterol en suero: Se desarrolló una curva con estándar de colesterol en el intervalo de 0 a 20 $\mu\text{g/dl}$. Se tomó por duplicado 10 μl de suero y se adicionó 1 ml del reactivo para determinación de colesterol de acuerdo a las especificaciones del fabricante (SpinReact). Se permitió el desarrollo de color por incubación a temperatura ambiente por 10 min. Finalmente, se leyó la absorbancia, tanto de la curva como de las muestras, a una longitud de onda de 505 nm. La cuantificación de colesterol por esta técnica es posible gracias a una colesterol esterasa que libera el colesterol de ácidos grasos esterificados y luego actúa una colesterol oxidasa que produce 4-colestenona + H_2O_2 . La reacción de H_2O_2 , junto con fenol + 4-aminofenazona, es catalizada por una peroxidasa que da lugar a un compuesto colorido.

Triglicéridos en suero: Se desarrolló una curva con estándar de colesterol en el intervalo de 0 a 20 $\mu\text{g/dl}$. Se tomó por duplicado 10 μl de suero y se adicionó 1 ml del reactivo para determinación de triglicéridos de acuerdo a las especificaciones del fabricante (SpinReact). Se permitió el desarrollo de color por incubación a temperatura ambiente por 10 min. Finalmente, se leyó la absorbancia, tanto de la curva como de las muestras, a una longitud de onda de 505 nm. La cuantificación de triglicéridos usando esta técnica se basa en el mismo principio de formación de hidroperóxidos y desarrollo de una reacción colorida que el descrito para colesterol, con la diferencia de formación de gliceraldehido 3 fosfato e hidroxiacetona fosfato a partir del glicerol de los triglicéridos.

Proteína en suero: La proteína se cuantificó por el método de Bradford. Se realizó la curva de proteína con albúmina (1 mg/ml) y agua bidestilada. Se tomaron 10 μl , 8 μl , 6 μl , 4 μl y 2 μl de albúmina respectivamente completando un volumen de 200 μl con agua bidestilada. A continuación se les agregó 1 ml de reactivo de Bradford con azul de coomasie G-250 a la curva de albúmina y a las muestras. Finalmente para determinar la concentración, se midió la absorbancia a 595 nm.

Fantasmas de eritrocitos.

La obtención de los fantasmas de eritrocitos se realizó siguiendo la técnica descrita por Quinn y colaboradores (2005) de la siguiente forma: Se obtuvo sangre por punción cardiaca recibéndola en tubos de 5 ml con solución de EDTA, los cuales se agitaron suavemente para evitar formación de coágulos. Se tomaron 3 ml de sangre y fueron vertidos en tubos de polipropileno de 40 ml para centrifuga. A cada tubo se le adicionaron 15 ml de una solución isotónica de fosfatos y se realizaron 3 lavados de 10 minutos en una centrifuga Marca Hermle Z383a 3500 r.p.m con la finalidad de obtener el paquete celular. Luego de los lavados con la solución isotónica se procedió a obtener los fantasmas de eritrocitos, para ello a los tubos con eritrocitos se les adicionó 30 ml de una solución hipotónica de fosfatos 0.150 mM y posteriormente se centrifugaron varias veces a una velocidad de 13600 r.p.m en una centrifuga Sorvall Evolution con rotor SS-34. Una vez obtenidos los fantasmas de eritrocitos se almacenaron en tubos eppendorf y se conservaron en refrigeración (no más de 1 mes) para uso ulterior.

Incorporación del Dipirenil Propano (DPiP) a fantasmas de eritrocitos.

De las muestras de fantasmas de eritrocitos se tomaron 200 μ l y se depositaron en tubos eppendorf. A partir de una solución de DPiP 89 μ M en etanol se inyectaron 5 o 10 μ l del monitor fluorescente a las membranas al mismo tiempo se mantenía en agitación con vortex, todo lo anterior se realizó en condiciones de poca luz y las muestras se mantuvieron en hielo. Luego de adicionar el DPiP las membranas fueron sonicadas en baño a temperatura ambiente durante 1 minuto por cada muestra. Una vez inyectado el DPiP las muestras se incubaron en cuarto frío con agitación constante durante 24 horas para asegurar la incorporación del monitor fluorescente. Al día siguiente nuevamente se sonicaron las muestras en baño durante 1 minuto y se resuspendieron en PBS a un volumen final de 3 ml. La concentración final del DPiP fue de 0.3 μ M. Finalmente la relación molar mínima de fosfolipido a DPiP fue de 5000:1

Medición de fluorescencia del DPiP en de fantasmas de eritrocitos.

Tomamos un volumen de 3 ml de fantasmas de eritrocitos con DPiP y 3 ml de fantasmas de eritrocitos sin DPiP (Control) en celdas de cuarzo. Se colocaron en un portaceldas de un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS55 controlado por computadora para realizar las mediciones. En este aparato, las fluorescencias del DPiP para monómero fueron de (379nm) y para excímero de (480nm) y fueron leídas utilizando el programa Wavelength.

Extracción de lípidos de tejidos.

Los lípidos se obtuvieron utilizando el método de Folch y colaboradores (1957) como a continuación se describe: Se homogeneizó 1 g de tejido con 19 ml de solución de cloroformo:metanol (2:1). El homogenado se realizó en frío con un homogenizador Potter-Elvehjeim con pistilo de vidrio un par de minutos. Después se filtró el homogenizado en un papel filtro libre de grasas, se adicionó 0.2 de su volumen de agua o solución salina, se separaron en dos fases por centrifugación y se recolectó la fase clorofórmica.

Metilación de ácidos grasos de riñón e hígado de SHR.

La composición de ácidos grasos de los lípidos en los órganos se determinó por cromatografía de gases después de transesterificación en presencia de trifluoruro de boro (BF_3) al 14% en metanol. Los metil ésteres de los ácidos grasos se prepararon esencialmente como describen Morrison y Smith (1964). Las reacciones de derivatización se realizaron en viales de vidrio de 4 ml en los cuales se evaporaron los lípidos a sequedad bajo una corriente de nitrógeno, entre 50-200 μg de lípidos.

Después de la adición de 0.5 ml del reactivo de trifluoruro de boro 14% en metanol, se cerró el vial con una tapa de rosca y disco inerte de silicón con cubierta de teflón. Se calentó por 30 min a aproximadamente 92°C en baño de agua. La muestra se enfrió a temperatura ambiente, el vial se abrió y los metil ésteres se extrajeron por agitación vigorosa con dos volúmenes de hexano. Después de la adición de un volumen de agua se formó un sistema de dos fases que se centrifugó y se colectó la fase orgánica. Se evaporó el hexano bajo una corriente de nitrógeno y los metil ésteres de los ácidos grasos se almacenaron a -70°C hasta su posterior análisis por cromatografía de gases.

Análisis de los ácidos grasos de los órganos de SHR por cromatografía de gases

Los ácidos grasos transesterificados se resuspendieron en n-hexano. Los metil ésteres se analizaron en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 500 controlado por computadora, equipado con un inyector capilar "split/splitless" y detector de ionización de flama (FID). Los metil ésteres de los ácidos grasos se separaron en una columna capilar Omegawax (0.25 mm de diámetro interno) de 30 metros de longitud. Se utilizó nitrógeno de alta pureza como gas de acarreo. Se determinaron los tiempos de retención de cada uno de los estándares de metil ésteres de ácidos grasos y se hicieron curvas de calibración para cada uno de ellos. La composición de ácidos grasos

de las muestras se determinó por comparación de los tiempos de retención y por análisis de las áreas bajo los picos.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante la prueba de anova simple seguida de la prueba de Fisher con una $P < 0.05$. En las gráficas, letras diferentes (ej. *a* vs *b*) indican diferencia significativa; letras acompañadas (ej. *ab*, *ac* o *bc*) indican diferencias no significativas con dos grupos.

RESULTADOS

Glucosa en SHR lactantes

Para el desarrollo de nuestros modelos de diabetes experimental en ratas espontáneamente hipertensas se utilizaron dos dosis de estreptozotocina (STZ), una de 50 mg/kg de peso en un grupo de animales y otra de 75 mg/kg de peso en otro grupo con la finalidad de obtener un grupo con hiperglicemia ligera (<200 mg/dl) y otro con hiperglicemia severa (>200mg/dl). También un grupo de animales inyectados sólo con amortiguador de citratos (grupo control).

En la figura 3A se observa que en el grupo control de SHR lactantes, inyectados con amortiguador de citratos sin estreptozotocina, la glucosa se mantiene normal durante los primeros 30 días de nacidas. Se aprecia que al 5º día de vida, la concentración promedio de glucosa es de 68 mg/dl llegando a un máximo de 115 mg/dl al día 20 y de 108 mg/dl al día 30. Estos niveles de glucosa en sangre eran los esperados ya que al ser inyectadas sólo con el amortiguador de citratos, no se generó daño en las células β pancreáticas que pudiera llevar al desarrollo de hiperglicemia.

La figura 3B muestra que en ratas SHR inyectadas con 50 mg/kg de STZ se logró establecer una hiperglicemia ligera en la cual los valores oscilan entre los 150 y 200 mg/dl. Se puede observar que al 5º día de vida (3 días después de la inducción) la concentración de glucosa es de 190 mg/dl, posteriormente descende, llegando a la concentración de 96 mg/dl en el décimo día. Sin embargo, días después la concentración de glucosa vuelve a aumentar llegando a un nivel de 152 mg/dl, manteniéndose así los días ulteriores. Podemos predecir con ello que la destrucción de las células β pancreáticas fue parcial, como se esperaba en este modelo de diabetes tipo 2 con 50 mg/Kg de STZ. Algo similar ocurrió en las ratas inyectadas con 75 mg/Kg de STZ, en las cuales el nivel de glucosa al 3er día de inducción fue de 250 mg/dl, disminuyendo el 8vo día de nacimiento a 162 mg/dl y elevándose nuevamente a 221 mg/dl a los 13 días. Después se observa la misma tendencia en la fluctuación de los valores de glicemia pero con valores de glicemia más altos que los mostrados en la figura 3B. Esto sugiere que la destrucción de las células β pancreáticas fue más severa con esta dosis de STZ pero sin llegar a ser una destrucción total. Estos datos apuntan que desde la lactancia, se generaron dos niveles de hiperglicemia en este modelo de ratas. Las diferencias en los valores de glucosa se pueden observar claramente en la figura 3D, en la que por momentos los valores se superponen, no obstante la cinética es diferente en cada grupo.

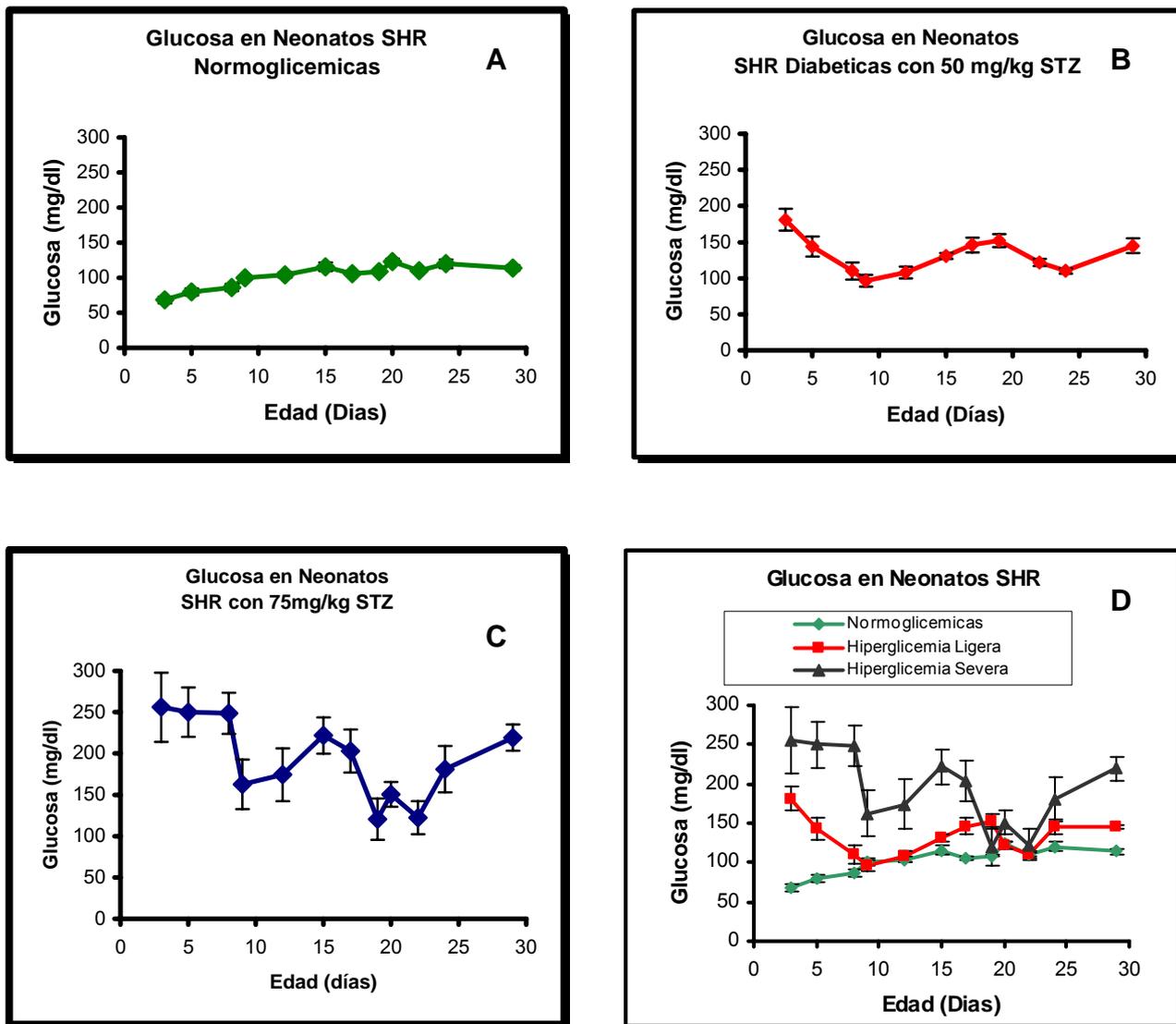


Fig. 3. Seguimiento de la glucosa en ratas lactantes **A)** SHR control, inyección de amortiguador de citratos **B)** inducción de DM2 con 50 mg/Kg de STZ **C)** inducción de DM2 con 75 mg/Kg de STZ. **D)** Comparación de la concentración de glucosa en los grupos de SHR lactantes. n = 6

Peso de SHR lactantes

En la fig 4 se puede ver que respecto al peso en SHR lactantes después de la inducción de la DM2, aunque las hiperglicémicas (ligeras y severas) tienen menor peso, en realidad no se observan diferencias significativas con los controles dentro de los primeros 25 días, sin embargo al llegar al mes de edad las SHR normoglicémicas muestran una diferencia significativa en comparación de los grupos de ratas diabéticas. El peso de las SHR normoglicémicas llega a los 52 g mientras que las SHR con hiperglicemia ligera es de 40.7 g y en SHR con hiperglicemia severa es de 41.3 g. Estos resultados

muestran que en un principio los animales mantuvieron su peso, pero al discurrir los días la diabetes generó un rezago en el crecimiento de los animales.

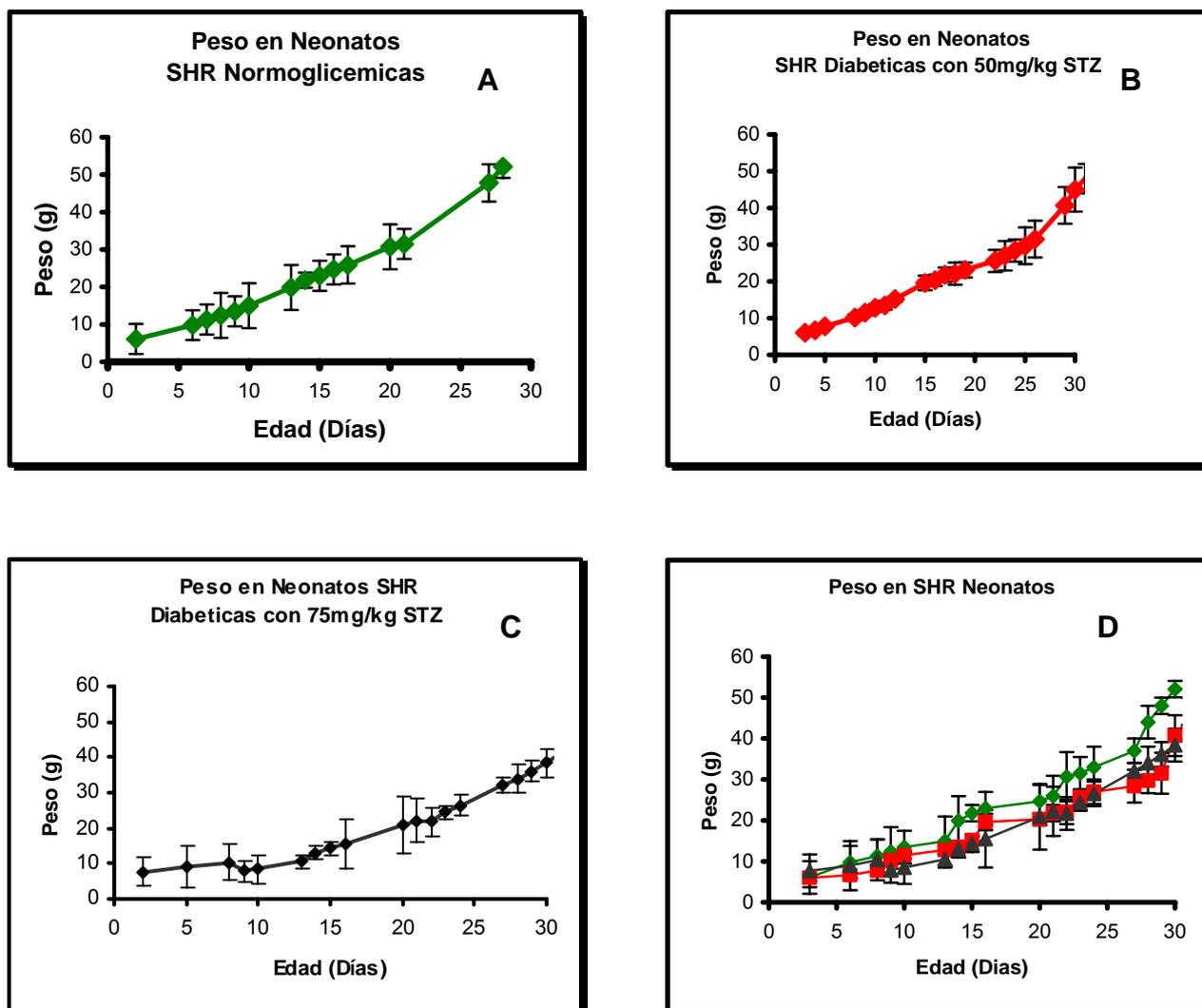


Fig 4. Seguimiento del peso de ratas lactantes **A)** SHR control (normoglicemicas), **B)** SHR con hiperglicemia ligera, **C)** SHR con hiperglicemia severa, **D)** Comparación del peso en los grupos de SHR lactantes. n = 6

Glucosa en SHR después del destete.

En la figura 5A se puede observar que la glucosa se mantuvo constante y sin grandes desviaciones en las SHR normoglicemicas, sus valores se mantuvieron entre los 80 y 100 mg/dl en sangre durante los 6 meses de edad. Por otra parte, las SHR que desarrollaron diabetes mantuvieron fluctuando sus niveles de glucosa. Las ratas con una hiperglicemia ligera (Figura 5B) llegaron a niveles inferiores a los 200 mg/dl y con pocas variaciones, tal como se observa en las desviaciones las cuales son pequeñas y significan un control parcial de la glicemia.

Las células β pancreáticas pudieron satisfacer momentáneamente las necesidades de insulina del animal y con ello mantener niveles relativamente bajos de glucosa, de hasta 116 mg/dl, sin embargo no fue suficiente y en general se ve un descontrol de la glucosa.

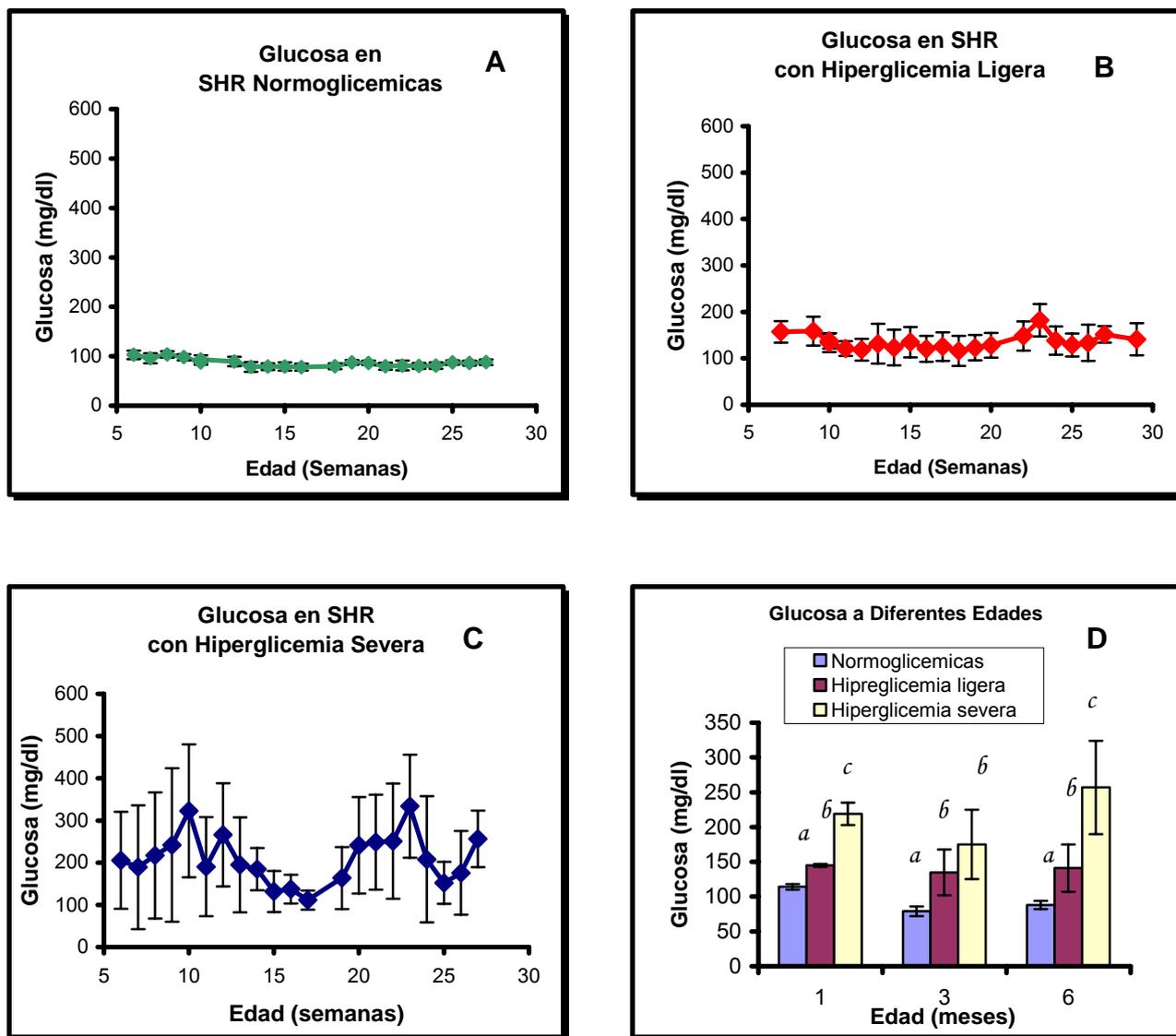


Fig. 5. Seguimiento de la glucosa después del destete. **A)** Ratas control. **B)** ratas SHR inducidas con 50 mg/Kg de STZ, **C)** ratas SHR inducidas con 75 mg/Kg de STZ. **D)** Glucosa de los tres grupos anteriores a 1, 3 y 6 meses de edad. n = 6 (P <0.05).

Respecto a las SHR con hiperglicemia severa, se puede ver en la figura 3C que el descontrol de la glucosa es aún mayor, en forma similar a la cinética que se observó en lactantes. Con el paso del tiempo, la glucosa aumentó hasta alcanzar una concentración en plasma de 334 mg/dl, nivel muy superior al que presentaron las SHR con 50 mg/dl de STZ. Además, las variaciones que se muestran son mayores y con grandes desviaciones, lo cual es un comportamiento similar a la diabetes tipo 2 en

humanos, en la que el descontrol por la falta de insulina mantiene oscilando los niveles de glicemia. En este caso, la insulina secretada por las células β restantes después de la inyección de 75 mg/Kg de STZ, es insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo de tal suerte que hay un mayor descontrol y consecuentemente la hiperglicemia se mantiene alta a lo largo del tiempo. Por lo anterior, se puede establecer que con 75 mg/dl de STZ se genera con éxito un modelo experimental de diabetes tipo 2 en SHR, sin llegar a hiperglicemia tan extrema como en la diabetes tipo 1. En la figura 5D se muestra que con 75 mg/Kg de STZ, la hiperglicemia se mantiene más elevada a 1, 3 y 6 meses de edad que en las SHR control y con hiperglicemia ligera. También podemos observar que las ratas inyectadas con 50 mg/kg de STZ mantienen niveles intermedios de glucosa, es decir no llega a ser tan alto como las SHR con 75 mg/Kg de STZ pero tampoco llega a niveles de las SHR normoglicémicas

Presión arterial en SHR a diferentes edades

Podemos observar en la figura 6A que en las SHR normoglicémicas a la edad de 14 semanas se estableció la hipertensión y a partir de ese momento sus valores de presión sistólica se incrementaron a lo largo de las 27 semanas de experimentación. Cabe destacar que llegó un momento en el cual los valores no variaron mucho, a la edad de 22 semanas y hasta las 27 semanas oscilaron entre 172 a 175 mmHg. En cuanto a las SHR con hiperglicemia ligera (Figura 6B) la presión sistólica elevada se estableció a la décima semana con un valor de 140 mmHg. Podemos observar que a diferencia de las SHR normoglicémicas, desarrollaron la hipertensión 4 semanas antes, lo cual puede ser una consecuencia del trastorno metabólico en el que se encontraban las ratas al tener un descontrol de la glicemia. También se observa que a las 14 semanas de edad este valor desciende a 136 mmHg, sin embargo semanas después incrementa llegando a la semana 18 a un valor de 144 mmHg y a partir de ahí se mantiene en incremento gradual y sostenido de la presión arterial. Durante las últimas semanas los valores siguieron fluctuando entre los 180 y 192 mmHg lo cual podría ser un reflejo del estado patológico avanzado en el que se encontraban los animales a esta edad. En cuanto a las ratas con hiperglicemia severa (Figura 6D) el desarrollo de la hipertensión se vio acelerado y con valores que fueron incrementando severamente a diferencia de los grupos anteriores. Se puede observar que a la sexta semana de edad la hipertensión se estableció en estos animales, teniendo un valor promedio de 146 mmHg en lo que respecta a la presión sistólica. Este valor coincide con una concentración alta de glucosa en sangre durante esa semana y días anteriores (Figura 3C y 5C) en donde los valores oscilaron entre 219 y 205 mg/dl. Con ello se puede ver que existe una relación estrecha en el desarrollo de la hipertensión y una hiperglicemia severa, de tal manera que un descontrol marcado de la glicemia genera estos daños secundarios activándolos en un menor tiempo. Además, durante las últimas semanas de vida la presión arterial siguió incrementando de 180 a 208 mmHg, mostrando un posible daño mayor en estos animales. En la Figura 6D se observan las presiones de los diferentes grupos a la

edad de 1, 3 y 6 respectivamente, en la que se muestra como las ratas con hiperglicemia severa desarrollaron la hipertensión en un menor tiempo a diferencia de los otros grupos y no sólo eso, sino que además con un marcado aumento conforme transcurren las semanas.

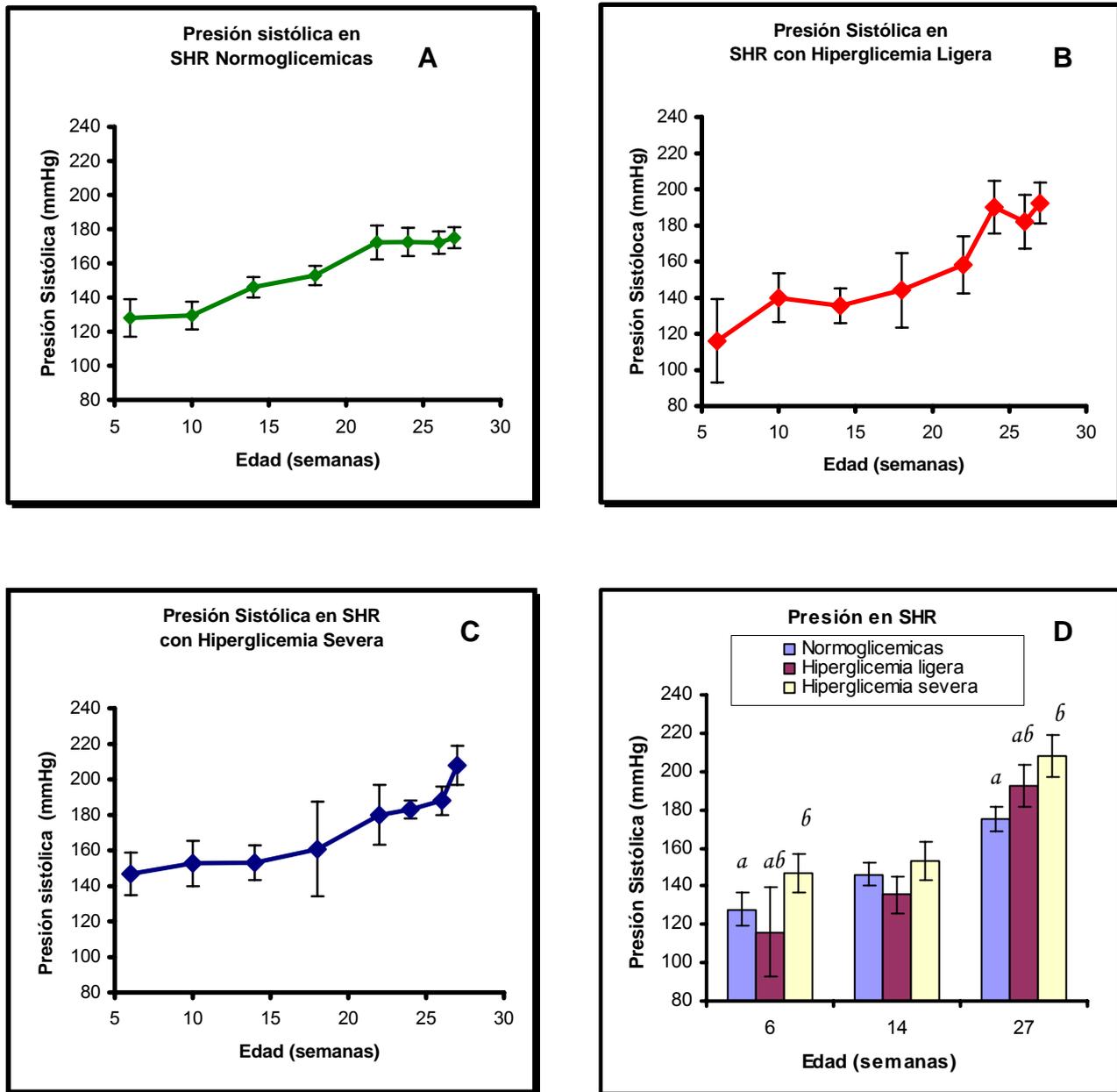


Fig. 6 Seguimiento de la presión arterial A) SHR normoglicémicas B) SHR con hiperglicemia ligera C) SHR con hiperglicemia severa. n=6 (P <0.05).

Los datos anteriores (gráfica 3D) muestran que se logró establecer con éxito el modelo de diabetes tipo 2 con hiperglicemia ligera y severa, por ello un descontrol en la glicemia el cual contribuyó

al desequilibrio de diferentes parámetros. Uno de ellos fue la presión arterial, si bien es cierto las ratas SHR generan hipertensión a una edad establecida (3 meses aproximadamente) la diabetes contribuyó a que este proceso se acelerara e incrementara en los valores de la presión sistólica.

Metabolismo de lípidos durante la diabetes y la hipertensión

En los resultados presentados se ve que la diabetes y la hipertensión tienen una estrecha relación. Por otro lado, también se estudiaron las posibles alteraciones en el metabolismo de los lípidos y se cuantificaron colesterol y triglicéridos de suero y órganos a diferentes edades. Como se puede ver en la grafica 7A, la concentración de colesterol en los grupos de SHR, las ratas normoglicémicas muestran un contenido de 6.67 µg/mg de proteína a los 3 meses de edad el cual comparativamente hablando es menor que el de las ratas con hiperglicemia severa las cuales tienen un valor de 10.27 µg/mg de proteína a esta misma edad, en las ratas con hiperglicemia ligera se observa un valor intermedio de 8.4 µg/mg de proteína. A la edad de 6 meses en los tres grupos de SHR aumenta la concentración de colesterol en suero, podemos observar que en ratas normoglicémicas la concentración es de 8.84 µg/mg de proteína, mientras que en las ratas con hiperglicemia el valor es de 10.4 µg/mg de proteína; en ratas con hiperglicemia severa la concentración fue mayor en comparación con los grupos anteriores llegando a un valor de 13.35 µg/mg de proteína. Estos resultados muestran que sí existe una alteración en el metabolismo de los lípidos, en este caso del colesterol.

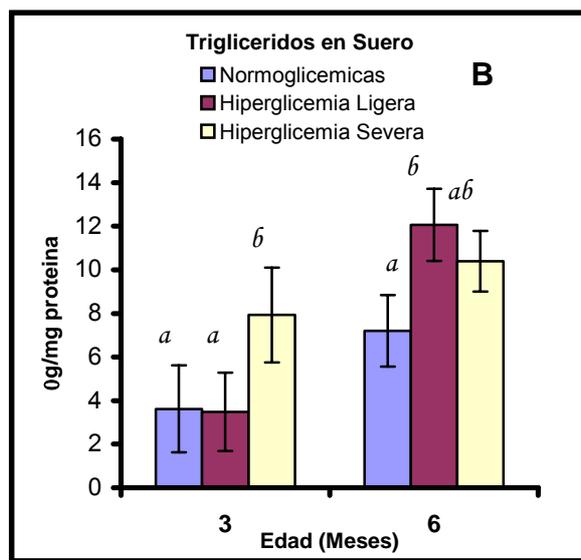
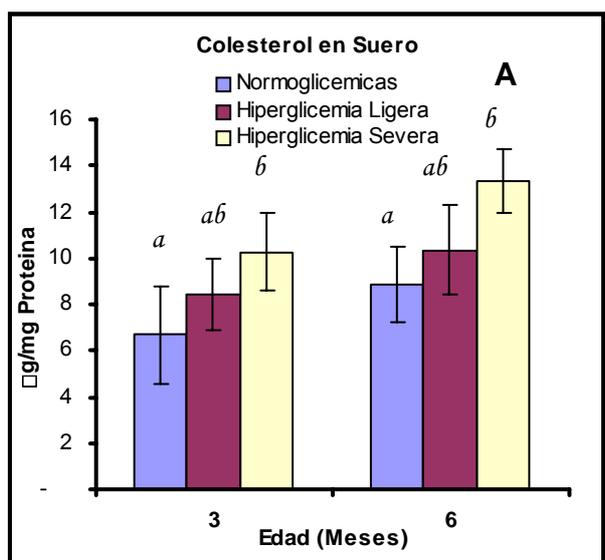


Fig. 7 Cuantificación del colesterol en SHR Normoglicémicas y con hiperglicemia ligera o severa. **A)** Colesterol en suero a la edad de 3 y 6 meses de edad **B)** Triglicéridos en suero a 3 y 6 meses de edad. n=6 (P <0.05)

En cuanto a la concentración de triglicéridos (figura 7B), observamos algo similar al colesterol en donde las ratas con hiperglicemia incrementan sus niveles de triglicéridos en suero. La concentración de triglicéridos en suero de ratas normoglicémicas es de 3.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína a los 3 meses de edad y de 7.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína a los 6 meses de edad, mientras que en las ratas con hiperglicemia ligera fueron de 3.49 y 12.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína a los 3 y 6 meses de edad respectivamente; en ratas con hiperglicemia severa la concentración llegó a un valor de 7.3 y 10.4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína. Podemos observar que las SHR con hiperglicemia severa tuvieron una concentración de triglicéridos al doble con respecto a los otros grupos a la edad de 3 meses. Estos resultados podrían mostrar una hiperlipidemia pues incrementan los niveles de triglicéridos y colesterol en plasma, es posible que estos efectos pudieran generar una resistencia a la insulina, lo cual contribuyó a mantener un descontrol más severo de la glucosa.

Como podemos observar, la diabetes contribuye al trastorno en el metabolismo de los lípidos, por ello decidimos analizar la composición de ácidos grasos en 2 órganos importantes que se ven implicados en el desarrollo de la diabetes y la hipertensión: el hígado y riñón, estudiando así los posibles cambios que ocurren en la composición de estos órganos.

Se analizó la composición de ácidos grasos de SHR en riñón e hígado por cromatografía de gases. Se encontró que en ratas normoglicémicas y con hiperglicemia ocurren diferentes cambios conforme transcurre la edad y que además la diabetes contribuyó a que estos cambios fueran más relevantes en estas ratas. Como se observa en la tabla 2, al mes de nacidas hay pocos cambios en la composición de ácidos grasos de riñón entre los tres grupos, sin embargo, se pueden detectar algunas alteraciones. Por ejemplo, se puede ver que el ácido araquidónico, ácido graso omega-6 precursor de prostaglandinas de la serie 2 y leucotrienos de la serie 4, es ligeramente mayor en ratas con hiperglicemia severa que en ratas normoglicémicas o con hiperglicemia ligera. Otro caso interesante ocurre con el ácido docosahexanoico (DHA), ácido graso omega-3 precursor de prostaglandinas de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5, que es del 5% en ratas control normoglicémicas y de 4.8% en ratas con hiperglicemia severa, pero es de sólo 2% en ratas con hiperglicemia ligera. De esta manera observamos que hay diferencias en composición de ácidos grasos, posiblemente inducidas por la diabetes. Cabe señalar que en los tres grupos de ratas los ácidos grasos precursores de omega 3 y omega 6 tienen una proporción desigual, el ácido alfa linolénico en SHR normoglicémicas tiene un valor de 0.4%, mientras que en las SHR con hiperglicemia ligera y severa es de 1 y 0.2%, respectivamente. Otro caso es el ácido linoleico, precursor de omega-6 de cadena larga, que es de 14.8% en controles y en las ratas con hiperglicemia ligera y severa es de 16 y 17.6% respectivamente, dando como resultado un mayor potencial para la biosíntesis de araquidónico. Con ello observamos que el desequilibrio en estos ácidos grasos antes mencionados inicia desde las primeras semanas de vida, lo cual podría tener repercusión en el desarrollo de la diabetes y la hipertensión.

Tabla 2. Composición porcentual de ácidos grasos de riñón de SHR a 1 mes de edad

Ácido Graso	Normoglicémicas		Hiperglicemia Ligera		Hiperglicemia Severa	
Mirístico	1.3	±0.6	2	±0	1.5	±0.2
Palmítico	21.9	±2.3	21	±1	24	±0.7
Palmitoleico	1.0	±0.5	1	±0	0.5	±0.1
Estearico	17.1	±2.1	14	±1	16.2	±0.3
Oleico	16.8	±1.6	13	±2	16.1	±1.1
Linoleico	14.8	±2.9	16	±0	17.6	±1
Gamma Linoleico	0.2	±0	0	±0	0.4	±0
Linolénico	0.4	±0.1	1	±0	0.2	±0.2
Araquidato	0.3	±0	5	±0	0	±0
CLA	0.6	±0	5	±2	0	±0
Araquidónico	14.5	±0.8	14	±1	16.4	±1
EPA	0.4	±0.1	1	±0	0.7	±0.2
DHA	5.2	±2	2	±1	4.8	±0.9
NI	4.7	±1.4	6	±3	5.2	±1.1

NI: No identificados

En la tabla 3 se puede observar que a los tres meses de vida, es decir dos meses más de cursar el desarrollo de la hipertensión (SHR control) y de la hipertensión con diabetes (SHR con hiperglicemia ligera o severa), se han producido más cambios en la composición de ácidos grasos del riñón. Por ejemplo, con la edad las ratas SHR control aumenta el contenido de araquidónico de 14.5 a 17%, las SHR con hiperglicemia ligera pasan de 14 a 16% y donde se observa el cambio más dramático es en las SHR con hiperglicemia severa, las cuales aumentan de 16.4 a 24% su ácido araquidónico. Es claro que dicho ácido aumentó con la edad, pero al parecer la diabetes es la que indujo el mayor incremento en el contenido de ácido araquidónico a los 3 meses de edad. También podemos observar que el porcentaje de ácido oleico disminuye con la diabetes. En ratas normoglicémicas el oleico es de

18%, con hiperglicemia ligera es de 15.7% y en ratas con hiperglicemia severa es de 13.5%. Respecto al DHA, al parecer tanto la edad como la diabetes tienden a disminuir su contenido.

Tabla 3. Composición porcentual de ácidos grasos en riñón de SHR a 3 meses de edad

Ácido Graso	Normoglicémicas		Hiperglicemia Ligera		Hiperglicemia Severa	
Mirístico	0.84	± 0.2	0.8	±3	0	± 0
Palmítico	22.94	± 1.8	24.9	±1.5	20	± 0.9
Palmitoleico	1.56	± 0.4	1.9	±4	0.3	± 0.1
Esteárico	16.12	± 0.7	14.2	±0.7	19.5	± 0.2
Oleico	18.07	± 1.4	15.7	±1.4	13.5	± 1.9
Linoleico	17.06	± 0.4	20.1	±1.6	17.3	± 1.7
Gamma Linoleico	0.16	± 0	0.3	±0.1	0.13	± 0.1
Linolénico	0.30	± 0.1	0.5	±0.2	0	± 0
CLA	0	±0	0.3	±1	0	±0
Araquidónico	17.5	± 2	16	±1.4	24	± 1.4
EPA	0.42	± 0	.3	±0.3	0.2	± 0.1
DHA	1.75	± 0.4	2.4	±0.1	1.8	± 0.1
NI	3	± 1.4	2.4	±1	10	± 2.2

NI: No identificados

En la tabla 4 se muestra que al llegar a los 6 meses de edad ocurrieron cambios importantes en la composición de ácidos grasos, podemos observar que en ratas normoglicémicas el contenido de ácido araquidónico es menor (15.1%) que en ratas con hiperglicemia ligera y severa (21.6% y 23.5% respectivamente). Otro ácido graso que mostró cambios relevantes es el ácido linoleico, el cual muestra una disminución en las ratas con hiperglicemia ligera (20.8%) y severa (20%) mientras que en ratas normoglicémicas el porcentaje alcanzó un 27.6%. En lo que respecta a los ácidos grasos saturados podemos observar que también ocurrieron cambios, como se puede ver el ácido palmítico tuvo un discreto cambio en su porcentaje, mientras que el ácido esteárico se incrementó en las SHR

diabéticas llegando a 16% en SHR con hiperglicemia ligera y 16.7% con hiperglicemia severa en cuanto a las ratas normoglicémicas el contenido fue de 12.3%.

Tabla 4. Composición porcentual de ácidos grasos en riñón de SHR a 6 meses de edad.

Ácido Graso	Normoglicemicas		Hiperglicemia Ligera		Hiperglicemia Severa	
Mirístico	0	±0	0.4	±.2	0	±0
Palmítico	20	± 0.2	19.8	±2	21.1	± 0.5
Palmitoleico	1.3	± 0	0.5	±.1	0.5	± 0.3
Esteárico	12.3	± 0.1	16	±2.1	16.7	± 0.9
Oleico	17.6	± 0.7	13.5	±0.5	16	± 2.1
Linoleico	27.6	± 0.3	20.8	±1.1	20	± 2
Gamma Linoleico	0.2	± 0	0.3	±0.2	0.6	± 0.3
Linolénico	1.1	± 0	0.1	±0	0.1	± 0
Araquidónico	15.1	± 0.1	21.6	±1	23.5	± 2.2
EPA	0.1	± 0	0.2	±0.1	0.8	± 0.2
DHA	1	± 0	1.3	±.5	1.7	± 0.1
NI	2.8	± 0.3	5.1	±2.2	4.8	± 1.2

NI: No identificados

Un ácido graso que fue escaso durante las tres edades fue el ácido eicosapentanoico (EPA) un ácido graso poliinsaturado, el cual es precursor de prostaglandinas de acción vasodilatadora mayoritariamente. Si bien a la edad de 6 meses el porcentaje en SHR con hiperglicemia severa es mayor, el contenido es muy poco en todos los grupos, lo cual era de esperarse, ya que la dieta sólo proporciona muy pequeñas cantidades de ácido alfa linolénico (ALA) como precursor inicial y EPA.

Tomando en cuenta los cambios descritos y considerando que son de riñón, un órgano importante en el desarrollo de la hipertensión y la diabetes, podemos suponer que pudieron influir de

manera importante para que dichas enfermedades se desarrollaran. Caso concreto el ácido araquidónico, el cual como se muestra en la figura 6 se mantuvo en porcentajes altos y dada su importancia en el desarrollo de la hipertensión como agente vasoconstrictor pudo haber favorecido el establecimiento de la hipertensión. Podemos ver que, con el paso del tiempo, ocurren cambios en la composición de ácidos grasos del riñón, pero la diabetes influye aún más sobre estas modificaciones.

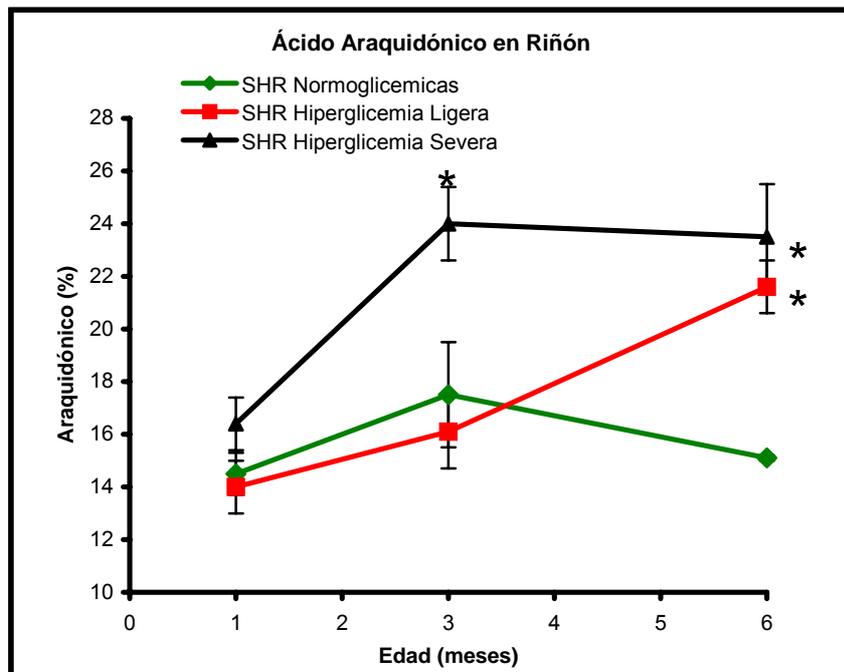


Fig. 8 Ácido araquidónico en SHR normoglicémicas, con hiperglicemia ligera o con hiperglicemia severa. n=6 (*P <0.05).

La Tabla 5 muestra la composición de ácidos grasos en hígado, en donde al igual que en riñón ocurren cambios durante el desarrollo de la diabetes. El ácido esteárico muestra un discreto aumento en SHR con hiperglicemia severa (23.7%) mientras que en SHR con hiperglicemia ligera y SHR normoglicémicas los valores fueron muy similares (20 y 20.5% respectivamente). Podemos observar que el ácido linoleico incrementó en ratas con hiperglicemia severa (20.8%) y disminuye en ratas con hiperglicemia ligera (13.7%) en comparación con las SHR normoglicémicas en donde el porcentaje es de 16%. Por su parte, el ácido araquidónico muestra una ligera disminución en SHR diabéticas, respecto a las SHR normoglicémicas donde el contenido es de 17.3%. Las ratas con hiperglicemia ligera tienen un porcentaje de 15.5% y las ratas SHR con hiperglicemia severa tienen un contenido de 15.2% de ácido araquidónico.

Tabla 5. Composición porcentual de ácidos grasos en Hígado de SHR a 1 mes de edad.

Ácido Graso	SHR Normoglicemicas		SHR Hiperglicemia Ligera		SHR Hiperglicemia Severa	
Mirístico	0.41	±0.1	0.5	±0	0	±0
Palmítico	21.6	±0.5	19.6	±1.8	21.4	±1.2
Palmitoleico	0.46	±0	0.5	±0.2	0.3	±0.1
Estearico	20.5	±1.8	20	±1.5	23.7	±1
Oleico	12.1	±1	10	±0.9	10.6	±1
Linoleico	16	±2.3	13.7	±0.6	20.8	±2
Linolénico	0.18	±1	0.4	±0.2	0.5	±0.1
Araquidato	0	±0	0	±0	0.94	±0.1
CLA	0.3	±0.2	0.9	±0.1	0	±0
Araquidónico	17.3	±1.3	15.5	±1.9	15.2	±1
EPA	0.4	±2	0.4	±0.2	0.5	±0.3
DHA	7.2	±3	10.1	±1.8	5.8	±1.2
NI	2.8	±1.5	7.4	±4.5	1.72	±1

NI: No identificados

Al paso de los meses las SHR siguen con el desarrollo de la diabetes y la hipertensión. A la edad de 14 semanas la hipertensión se ha establecido en los tres grupos de SHR, lo cual hace suponer que bajo este contexto continúen las alteraciones en los ácidos grasos de los diferentes órganos implicados en estas enfermedades. En la tabla 6 podemos observar que a los 3 meses de edad, en hígado, el ácido esteárico aumenta en SHR con hiperglicemia severa, en estas el porcentaje es de 19.2% y en ratas con hiperglicemia ligera es de 14%, porcentaje similar con respecto a las ratas normoglicémicas el cual es de 13.9%. El ácido oleico disminuyó de 20.5% en ratas normoglicémicas, a 14% en SHR con hiperglicemia ligera y a 13.4% en SHR con hiperglicemia severa. El ácido araquidónico en SHR normoglicémicas fue de 11.5%, en ratas con hiperglicemia ligera hubo un discreto aumento en

su contenido llegando a un 13.6%, pero el incremento más crítico tuvo lugar en las ratas con hiperglicemia severa, donde llegó a un 19%. De los ácidos grasos poliinsaturados pertenecientes a la familia de los omega-3 podemos observar que el DHA fue el que presentó un mayor porcentaje, sin embargo del total de ácidos grasos sólo alcanzó un porcentaje de 3.95% en ratas normoglicémicas, 4.8% en ratas con hiperglicemia ligera y 6.1% en ratas con hiperglicemia severa.

Tabla 6. Composición porcentual de ácidos grasos en Hígado de SHR a 3 meses de edad.

Ácido Graso	SHR Normoglicemicas		SHR Hiperglicemia Ligera		SHR Hiperglicemia Severa	
Mirístico	0.71	±0	0.4	±0.1	0	±0
Palmítico	23	±1.2	24.6	±0.7	22.2	±1
Palmitoleico	1.8	±0.9	1.7	±0.4	0.49	±1
Esteárico	13.9	±1.1	14	±1.6	19.2	±2
Oleico	20.5	±4	14	±2.5	13.4	±0.8
Linoleico	20	±1.2	23	±2	19.5	±2
Gamma Linoleico	0.1	±0	0.5	±0.1	0.21	±0
Linolénico	0.4	±0.1	0.1	±0	0.1	±0
Araquidato	0	±0	0.2	±0.1	0	±0
CLA	0.2	±0.1	0.3	±0.1	0	±0
Eicosanoato	0.5	±0.2	0.1	±0	0	±0
Araquidónico	11.5	±3	13.6	±2.4	17.1	±1.5
EPA	0.4	±0.1	0.5	±0.1	0.4	±0.4
DHA	3.95	±0.8	4.8	±1.7	6.1	±3
NI	3	±1	1.9	±0.5	7.5	±3

NI: No identificados

En la tabla 7 observamos que a la edad de 6 meses el ácido oleico aumentó en las SHR con hiperglicemia severa con un porcentaje de 16.3%. El ácido araquidónico tuvo cambios importantes en los tres grupos de ratas, en ratas con hiperglicemia severa el porcentaje disminuyó de manera considerable llegando a 14%, en ratas con hiperglicemia ligera el porcentaje fue de 17.9% muy similar al de SHR normoglicémicas donde el contenido fue del 19%. Como se mostró en la tabla 5 el ácido araquidónico aumento en SHR diabéticas a los 3 meses de edad y la edad de 6 meses ocurrió lo contrario. Respecto al DHA los porcentajes no tuvieron variaciones y podemos ver que a los 6 meses de experimentación el contenido fue similar en los tres grupos.

Tabla 7. Composición porcentual de ácidos grasos en Hígado de SHR a 6 meses de edad

Ácido Graso	SHR Normoglicemicas		SHR Hiperglicemia Ligera		SHR Hiperglicemia Severa	
	Valor	±	Valor	±	Valor	±
Laurico	0.15	±0.1	0	±0	0	±0
Mirístico	0.24	±0	0.4	±0.1	0	±0
Palmítico	21.2	±0.6	21.9	±3.7	23.1	±1
Palmitoleico	0.67	±0	1	±0.2	4	±0.6
Estearico	13.6	±0.9	15.1	±2.4	12.4	±1.3
Oleico	12.5	±0.7	12.3	±0.8	16.3	±1.2
Linoleico	25.7	±1.8	23	±2.3	23.6	±2.5
Gamma Linoleico	0.5	±0	0	±0	0	±0
Linolénico	0.8	±0.1	0.2	±0.1	0.48	±0
Araquidato	0	±0	0.3	±0.2	0	±0
CLA	0	±0	0.4	±0.1	0	±0
Araquidónico	19	±0.1	17.9	±0.7	14.0	±1
EPA	0.31	±0	0.3	±0.1	0.35	±0
DHA	2.6	±0.2	2.2	±1	2.2	±0.8
NI	2.8	±0.8	4.7	±3	7.6	±2

NI: No identificados

Como se pudo observar en los resultados anteriores, las alteraciones en la composición de ácidos grasos de hígado ocurren al paso de los meses, sin embargo la diabetes también influyó de manera importante en la composición lipídica del hígado. En la figura 6 se muestra cómo el ácido araquidónico en hígado sufrió alteraciones durante las 3 edades (1,3 y 6 meses). Podemos ver que en ratas con hiperglicemia severa el ácido araquidónico muestra un comportamiento totalmente diferente a las SHR normoglicémicas, lo cual refleja que la diabetes *per se* genera cambios importantes en estas ratas. También se muestra que el comportamiento del ácido araquidónico en SHR con hiperglicemia ligera es muy similar a las SHR normoglicémicas.

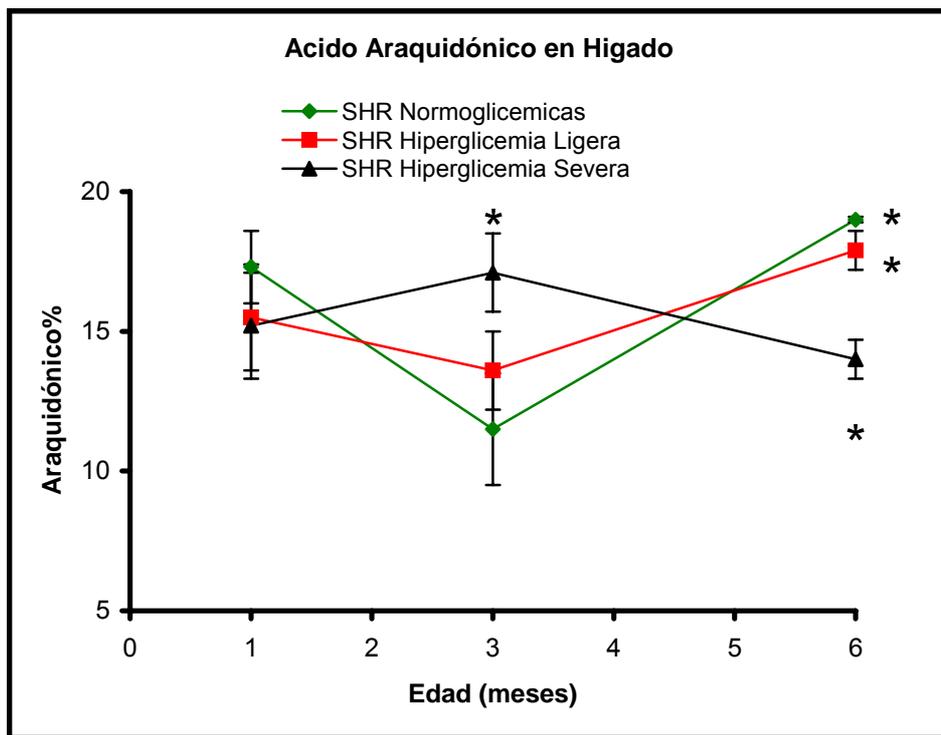


Fig. 9 Ácido araquidónico en SHR normoglicémicas, con hiperglicemia ligera y con hiperglicemia severa en hígado. n=6 (*P <0.05).

Fluidez membranal

Los datos mostrados en las tablas de composición de ácidos grasos indican que durante la diabetes y la hipertensión se generan anomalías en la composición lipídica de hígado y riñón, lo cual podría llevar a una alteración en las propiedades fisicoquímicas de la membrana. Por ello decidimos medir la fluidez membranal en un modelo de fantasmas de eritrocitos, debido a que en estas células no hay interferencia con otras membranas, además es relativamente sencillo obtener los fantasmas de eritrocitos y de fácil manipulación. Para las mediciones utilizamos el monitor fluorescente Dipirenil Propano (DPiP).

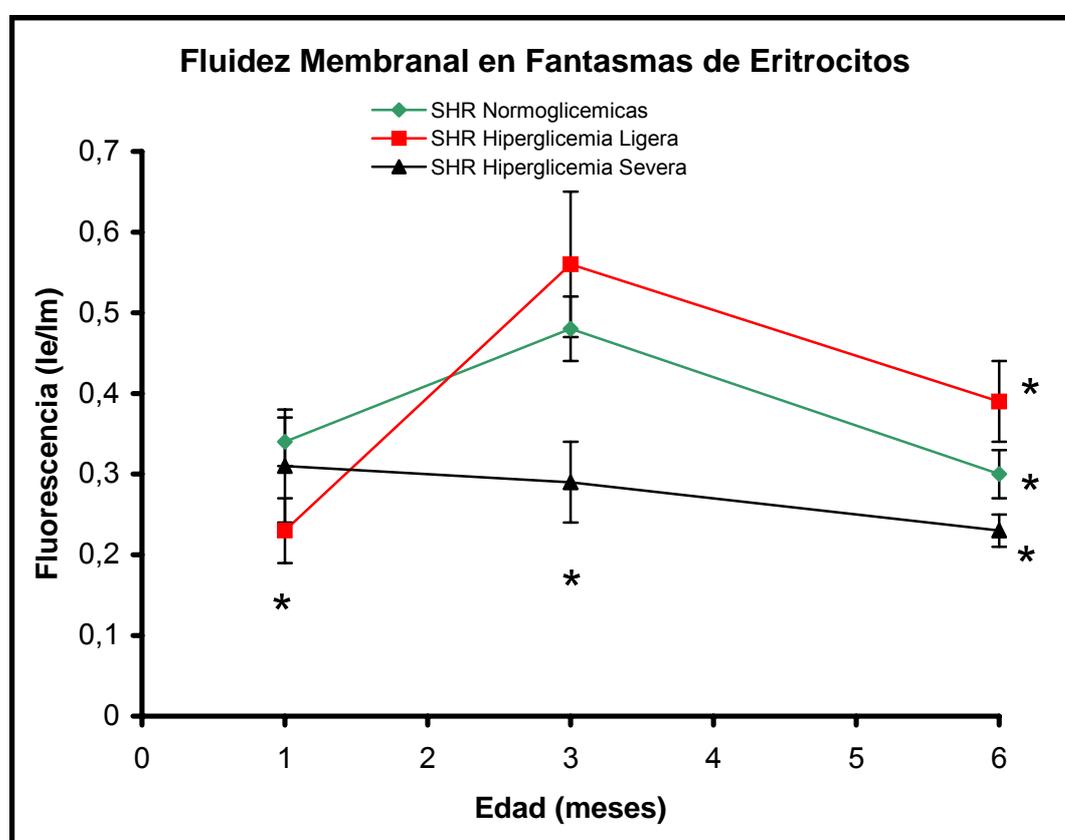


Fig. 10. Fluidez Membranal de fantasmas de eritrocitos a 1, 3 y 6 meses de edad. $n=6$ (* $P < 0.05$).

A partir de las conformaciones de excímero (le) y monómero (lm) del monitor fluorescente de fluidez, el dipirenil propano, se obtuvo el cociente le/lm que refleja en forma directa la fluidez membranal (Mejía *et al* 1995). Como se puede observar en la figura 10, al mes de edad, los tres grupos tienen valores de fluidez membranal similares, sin embargo a los tres meses de edad se muestran algunas diferencias. Mientras que las normoglicémicas y las ratas con hiperglicemia ligera aumentan su fluidez

membranal, las ratas con hiperglicemia severa tienden a mantener o incluso disminuir ligeramente su fluidez. A los 6 meses de edad, cuando ha progresado más la diabetes y la hipertensión, la fluidez del grupo con hiperglicemia severa es mucho menor que los otros dos grupos.

Los resultados muestran que durante el desarrollo de la hipertensión hay modificaciones en la fluidez membranar, sin embargo la diabetes con hiperglicemia severa influye para que estas modificaciones sean más evidentes.

Tratamiento con aceite de linaza para el control de la glucosa y la presión arterial en SHR

Resultados anteriormente mostrados en la figura 3 reflejan un descontrol en la concentración de la glucosa a causa de la inyección con STZ generándose así un modelo de diabetes tipo 2. Esta alteración en los niveles de glucosa contribuyó a acelerar el desarrollo de la hipertensión en SHR (Figura 6). Con el fin de contrarrestar los efectos de la hiperglicemia y la hipertensión se administró a SHR un suplemento con aceite de linaza el cual contiene ALA que es un precursor de EPA y DHA, dichos ácidos grasos han sido reportados como una alternativa en el tratamiento de la diabetes y la hipertensión,

En la figura 11D se muestran los niveles de glucosa de ratas diabéticas tratadas con aceite de linaza (ω -3), los cuales son similares a la glucosa del grupo control, lo que indica que el suplemento con ALA contribuyó al control de la glicemia. Podemos observar que en las primeras semanas de tratamiento la glicemia en SHR con 75 mg/kg STZ aumentaron discretamente (138 mg/dl) sin embargo a las semanas subsecuentes estos niveles llegaron a ser de 92 mg/dl y hasta 82 mg/dl durante la semana 19. En ratas con 50 mg/kg STZ la glucosa también fue disminuyendo con el aceite de linaza conforme transcurrían las semanas, si bien a la semana 8 de vida la concentración de glucosa en suero fue alta (170 mg/dl), cuatro semanas después esta concentración disminuyó hasta llegar a un valor de 92 mg/dl (semana 12).

Respecto a las SHR inyectadas con amortiguador de citratos la glucosa se mantuvo a un nivel inferior a los 100 mg/dl desde el inicio del tratamiento, cabe señalar que estas ratas *per se* mantuvieron sus niveles de glucosa normales ya que no sufrieron daño en sus células β y el aceite de linaza no tuvo alguna función relevante en el control de la glucosa. Al mes de edad y aún sin tratamiento, las SHR con 75 mg/kg de STZ, muestran un valor de glucosa en sangre de 219 mg/dl, mientras que ratas con una dosis de 50 mg/kg de STZ, la glucosa fue de 145 mg/dl y en ratas normoglicémicas de 114 mg/dl. A los 3 meses de edad (2 meses de suplemento con aceite de linaza) los valores de glucosa en sangre fueron de 78, 94 y 96mg/dl en SHR normoglicémicas, SHR con 50 mg/kg STZ y 75 mg/kg STZ, respectivamente, lo que refleja una mejoría en el control de la glucosa. A los 6 meses de edad estos niveles de glucosa son constantes lo cual muestra un control de la glicemia sanguínea.

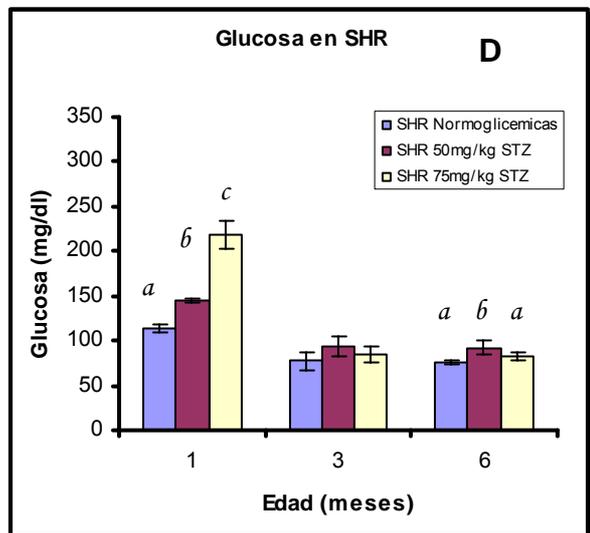
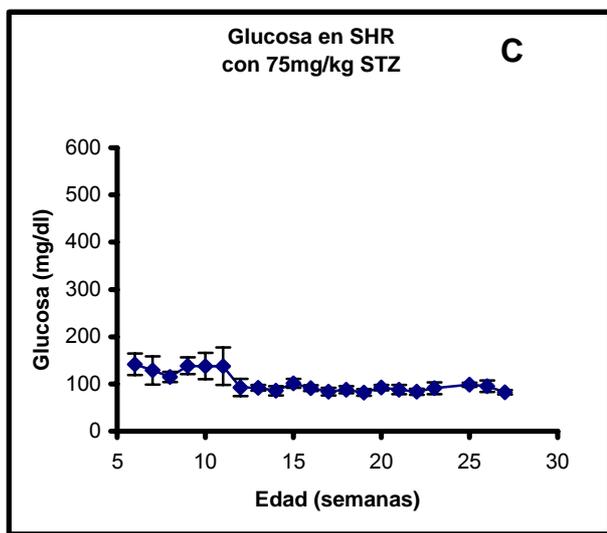
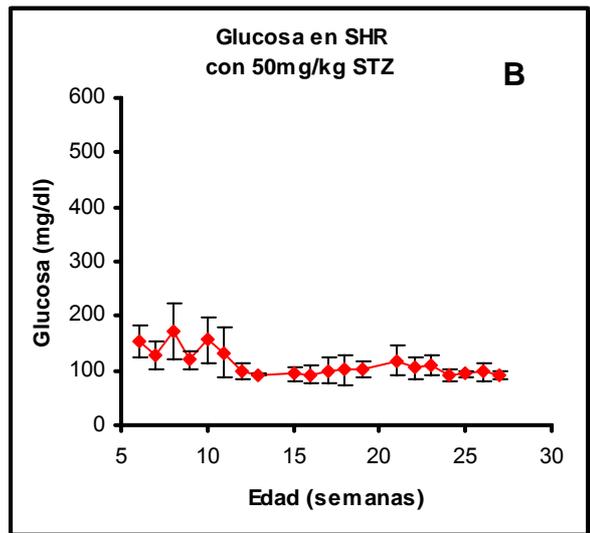
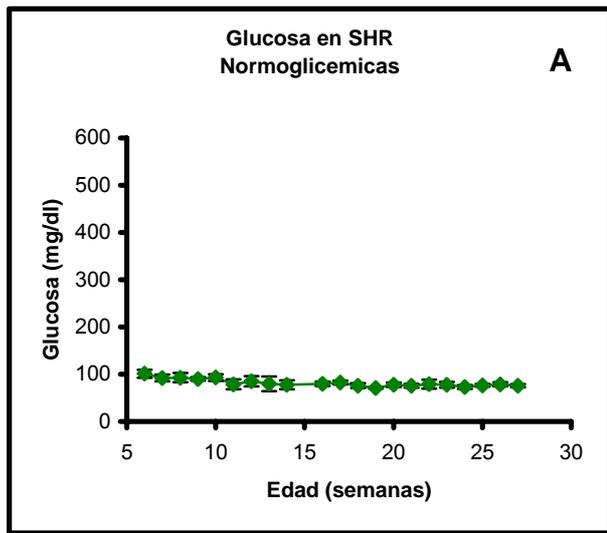


Fig. 11 Seguimiento de la glucosa en SHR suplementadas con aceite de linaza (omega-3) **A)** Ratas control. **B)** ratas SHR inducidas con 50 mg/Kg de STZ, **C)** ratas SHR inducidas con 75 mg/Kg de STZ. **D)** Glucosa de los tres grupos anteriores a 1, 3 y 6 meses de edad. n=6 (P <0.05).

Podemos ver en la figura 12 los valores de la presión sistólica en SHR normoglicémicas control y con STZ. En las ratas normoglicémicas la presión arterial a las 14 semanas de edad fue de 126 mmHg. Se ha reportado que a esta edad se establece la hipertensión en las SHR, sin embargo en estas ratas aún no había desarrollo de la misma. Las siguientes semanas la presión sistólica sigue oscilando entre 120 y 126 mmHg lo que refleja un control en la presión arterial. Es a la semana 22 cuando la hipertensión aparece en estas ratas llegando a un valor de 142 mmHg de presión sistólica (Fig. 12A). En ratas inyectadas con STZ los niveles de presión arterial fueron aparentemente controlados por el suplemento de aceite de linaza. En primera, la glucosa de estas ratas fue disminuyendo hasta compararse con las SHR normoglicémicas, lo cual tiene repercusiones en la presión sistólica de estas ratas. Podemos observar en la figura 12C que a la edad de 7 semanas la presión sistólica fue de 127 mmHg en ratas inyectadas con 75 mg/kg STZ, si recordamos en la figura 6C se muestra que en ratas inyectadas con la misma dosis de STZ pero sin suplemento, la presión arterial a la edad de 6 semanas era de 142 mmHg lo cual refleja que el aceite de linaza contribuyó a mantener estable la presión arterial. A la edad de 14 semanas la presión sistólica fue de 139 mmHg y tuvo un ligero incremento a las 18 semanas llegando a un valor de 143 mmHg, sin embargo 2 semanas después la presión arterial registrada fue de 139 mmHg nuevamente. La semana 22 muestra un incremento considerable de la presión arterial (166 mmHg) no obstante, a la edad de 27 semanas disminuyó nuevamente la presión sistólica a un valor final de 150 mmHg.

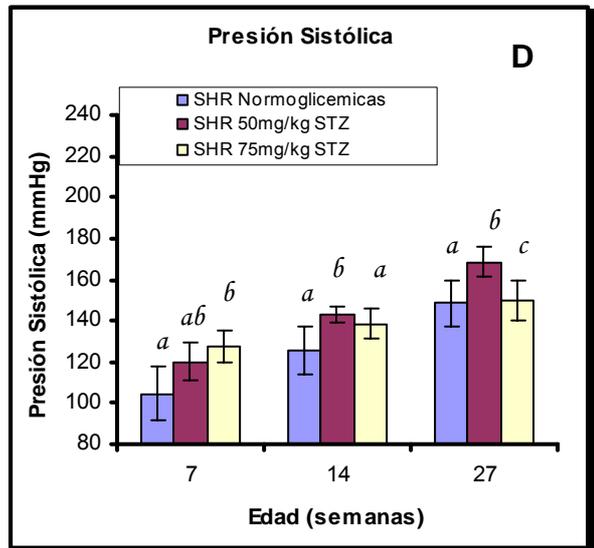
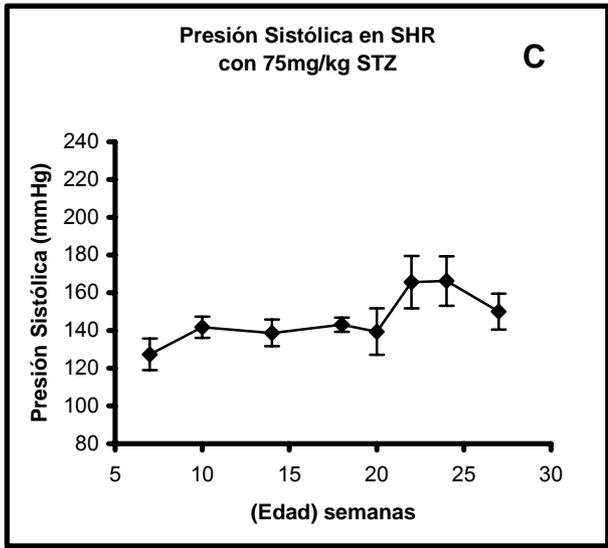
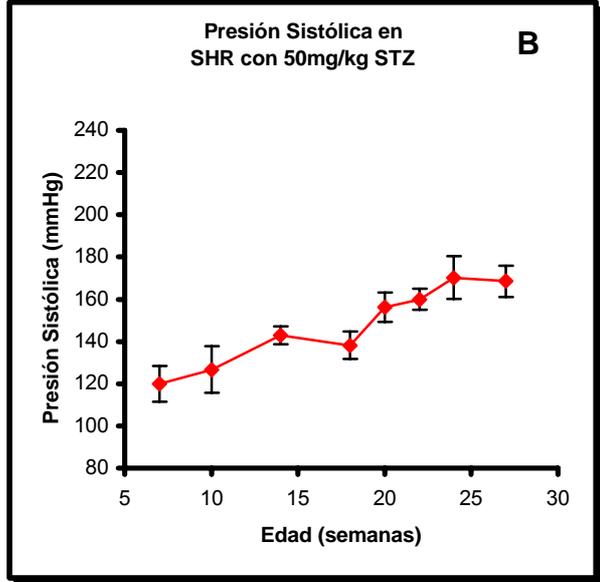
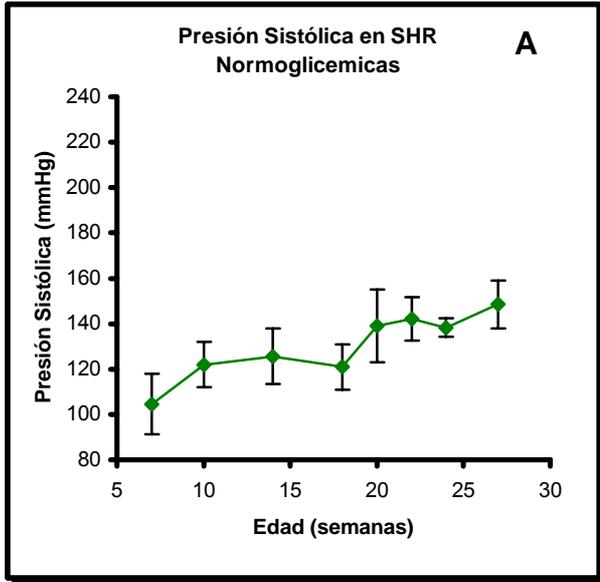


Fig. 12 Seguimiento de la presión arterial en SHR suplementadas con aceite de linaza **A)** SHR normoglicémicas **B)** SHR con 50 mg/kg de STZ **C)** SHR con 75 mg/kg STZ **D)** Gráfica comparativa de la presión arterial en SHR tratadas con aceite de linaza. n=6 (P <0.05).

ANALISIS Y DISCUSION

Desarrollo de diabetes tipo 2

Para el desarrollo de diabetes tipo 2, en el presente estudio se realizó una inyección intraperitoneal de STZ 50 mg/kg ó 75 mg/kg en neonatos de 48 hrs, de esta manera se generó con éxito un modelo de DM2: un grupo con hiperglicemia ligera (<200 mg/dl) y otro con hiperglicemia severa (>200 mg/dl). A los 4 días de vida de las SHR neonatos (2 días después de la inyección intraperitoneal de la STZ), el descontrol de la glucosa es evidente, este cambio en la concentración de la glucosa refleja las anormalidades en la función de las células β causadas por la STZ. En estas SHR neonatas se observa que una vez que se desarrolla la hiperglicemia, ésta se mantiene elevada durante la mayor parte de la lactancia (Fig. 3C), a diferencia de las ratas Wistar en donde se observa hiperglicemia sólo durante los primeros 7 días y después tiende a normalizarse (Orozco-Tapia 2008), indicando que el modelo de ratas aquí utilizado es más sensible a la STZ y al desarrollo de la DM2. Esta particularidad permite estudiar un modelo que muestra gran similitud a la DM2 en humanos, en donde la glucosa sanguínea fluctúa a lo largo de la enfermedad, lo cual ocurrió en las SHR con hiperglicemia severa a lo largo del estudio, lo cual hace atractivo a este modelo para observar en un menor tiempo el conjunto de alteraciones que se generan con la diabetes.

El desarrollo de este modelo de diabetes tipo 2 puede ser explicado de la siguiente manera: La STZ entra específicamente a las células β -pancreáticas a través de GLUT 2, ya dentro de la célula forma especies reactivas de oxígeno las cuales son responsables de la fragmentación del DNA y la posterior destrucción de las células β (Szkudelski, 2001). La dosis de 75 mg/kg de STZ, generó el mayor daño en las células β de esta manera la escasa secreción de insulina no pudo satisfacer las necesidades del organismo por dicha hormona y en general se ve un marcado descontrol de la glucosa (Figura 3C), lo cual es típico en la diabetes tipo 2 en humanos, por ello este modelo resultó interesante por las consecuencias que tuvo en el desarrollo de la hipertensión y la alteración en el metabolismo de los lípidos, lo cual se abordará más adelante. Es conveniente mencionar que la dosis de STZ es dependiente de la cepa de ratas utilizada, y una dosis de 100 mg/Kg de peso en ratas Wistar, genera hiperglicemia ligera (Orozco-Tapia 2008), mientras que la misma dosis en SHR causa una mortalidad mayor al 90% e hiperglicemia más parecida a la diabetes tipo 1 (Avendaño-Flores 2008).

La insulina cumple una función importante en el metabolismo de los carbohidratos ya que estimula la captura de la glucosa por parte de la mayoría de las células manteniendo controlados los niveles de glicemia. En situaciones normales (exposición aguda a la glucosa), la subida posprandial de glucosa es el elemento inductor esencial de la secreción de insulina, equilibrando la concentración de glucosa extracelular con la del interior de la célula (Roche, 2000).

Se ha observado que en los casos de hiperglicemia crónica, la glucosa es capaz de modificar diferentes moléculas y generar trastornos metabólicos. La exposición crónica a niveles altos de glucosa produce la unión de ésta última a los grupos amino terminales de las proteínas, fenómeno llamado glicación. Esta unión química modifica la estructura de las moléculas alterando sus funciones, como la de los transportadores de glucosa, lo que lleva a una menor captación de dicha molécula en los tejidos periféricos (Bilan y Klip 1990). Así, se ha observado en diferentes modelos experimentales con animales y células cultivadas, que la alta concentración de glucosa modifica la expresión del gen codificador del transportador de glucosa (GLUT2), activa la primera enzima de la vía glucolítica la Glucosa Kinasa (GK) y causa una inducción coordinada de genes que codifican enzimas de la lipogénesis (Roduit *et al.*, 2000).

Varios autores han estudiado en forma experimental el efecto deletéreo sistemático de la hiperglicemia crónica sobre la función de la célula (Rossetti, 1995, Donath *et al.*, 1999). En ratas wistar de 6 semanas de edad tratadas con STZ se produjo una destrucción parcial de los islotes de Langerhans, por ende un déficit en la secreción de insulina e hiperglicemia. Es importante destacar que la reducción de la capacidad secretora de insulina fue sustancialmente mayor que la que se podría atribuir exclusivamente a la destrucción de la masa de células β por la STZ utilizada. Estos resultados sugieren que los niveles crónicamente elevados de la glucosa *per se* pueden inducir un defecto funcional en la liberación de la insulina (Leahy *et al.*, 1992). Las pruebas clínicas en pacientes diabéticos sugieren que la hiperglicemia y la consiguiente tensión oxidativa, pueden contribuir al aumento de la morbilidad y mortalidad de las enfermedades cardiovasculares observadas en la diabetes (Baynes, 1991).

Metabolismo de los lípidos

La insulina vuelve permeables a las células para la glucosa. Cuando hay falta de insulina y altas concentraciones de glucosa en sangre, pequeñas cantidades de glucosa (~10%) entran a la célula. En estas condiciones la célula requiere energía de otras fuentes alternas debido a la poca disponibilidad de glucosa. Como el hígado no recibe las señales de la insulina, para tratar de compensar la “aparente falta” de glucosa en sangre, libera más glucosa a través de la degradación del glucógeno hepático y la

gluconeogénesis; recordemos que los principales precursores de la gluconeogénesis son el glicerol procedente de la movilización de los triacilglicéridos, el lactato y la alanina procedentes del tejido muscular, y los aminoácidos glucogénicos procedentes de la dieta y en el caso de la diabetes de las proteínas corporales. Las principales reservas utilizables por el organismo están constituidas por el glucógeno del hígado y los triacilglicéridos del tejido adiposo (Harrison, 2002)

En el modelo de diabetes en SHR se promueve un incremento en colesterol y triglicéridos sanguíneos (Fig. 7A y 7B). En SHR con hiperglicemia severa la concentración de triglicéridos fue mayor que en los otros grupos a la edad de 3 meses. La escasa secreción de insulina no permite la activación de la lipogénesis y por lo tanto se activa la lipólisis, como consecuencia se observa un aumento en el transporte de los lípidos para su posterior oxidación. Entre los múltiples efectos metabólicos de la insulina, la acción más potente es la supresión de la lipólisis del tejido adiposo. Un aumento de la concentración plasmática de insulina de sólo 5 $\mu\text{U/ml}$ inhibe la lipólisis en aproximadamente un 50% respecto a los valores basales (Flakoll *et al.*, 2003).

Durante la diabetes, los pacientes que la padecen muestran promedios del perfil lipídico anormales, en lo cual destaca el aumento del colesterol y disminución de las HDL y de las ApoA-I. Los desordenes metabólicos y hormonales en la DM2 son reflejados no sólo en la síntesis y utilización de los carbohidratos y de aminoácidos, sino también en la movilización de los lípidos. La anormalidad más común es un alto nivel de las VLDL, las cuales cursan con triglicéridos plasmáticos de origen endógeno aumentados; esta dominancia en la diabetes ha dirigido la atención a las lipoproteínas como posibles factores de riesgo cardiovascular. Esta alteración metabólica de los lípidos es la responsable del incremento de la síntesis hepática de triglicéridos y la subsecuente hipertrigliceridemia (Guerra *et al.*, 2005).

Durante la hiperglicemia crónica se ha observado que existen incrementos en la glicosilación de las lipoproteínas y de otras proteínas séricas (López-Virella *et al.*, 1996). La glicosilación de las LDL y formación de LDL modificada u oxidada, hace que disminuya su afinidad por el receptor LDL, esto ocasiona un incremento en la síntesis de ésteres de colesterol y su posterior acumulación, originándose así células espumosas con desarrollo de la placa de ateroma, lo cual inicia el proceso aterosclerótico que podría llevar a daños endoteliales y desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión (Jacobs *et al.*, 1990). Las HDL también pueden experimentar glicosilación y oxidación, lo que conduce a una menor captación del colesterol en los tejidos periféricos por deterioro de su capacidad para unirse a receptores y/o depurar los ésteres de colesterol acumulados (Duell *et al.*, 1991)

El incremento en el nivel de colesterol se puede observar en la figura 7A. En dicha figura se muestra que las SHR con hiperglicemia severa mantienen niveles elevados de colesterol en

comparación con las SHR normoglicémicas; este aumento de colesterol puede estar acompañado de un aumento de las LDL. Se postula que el incremento de las LDL y el colesterol sanguíneo reside en defectos de los receptores periféricos presentes en las superficies celulares (fibra muscular lisa, adipocitos, células endoteliales e incluso de los fibroblastos), por lo cual, la captación de las LDL se dificulta, esto ocurre posiblemente por la glicosilación de las LDL (West *et al.*, 1983).

Durante la diabetes ocurrieron diferentes trastornos que aceleraron el desarrollo de la hipertensión en las SHR con hiperglicemia. La modificación de las LDL por glicación es la transformación estructural más importante, pero también es frecuente en el paciente diabético la LDL oxidada (oLDL) y la LDL pequeña y densa (sLDL), ambas con elevado potencial aterogénico (Witztum y Steinberg 1991). En la hiperlipidemia crónica, el incremento de las lipoproteínas plasmáticas y principalmente de las oLDL genera como resultado una lesión endotelial o el daño funcional de la pared arterial. Se ha demostrado que la glucosa intensifica de manera directa la oxidación de LDL *in vitro*. Se ha propuesto que esa lipoproteína de baja densidad oxidada interviene en la aceleración de múltiples fenómenos en la cascada aterógena, que incluye citotoxicidad, síntesis de citocinas y de factor de crecimiento, inhibición de los efectos del óxido nítrico, de la síntesis de PGI₂ y formación de células espumosas (Kawamura *et al.*, 1994). Existen evidencias que muestran que la alteración en óxido nítrico y prostaglandinas favorecen el desarrollo de la hipertensión en SHR, es muy probable que en nuestro modelo de diabetes en SHR hayan ocurrido estas anomalías las cuales jugaron un papel importante en el aumento de la presión arterial.

Existen evidencias tanto en animales como en humanos, que permiten establecer que los niveles crónicamente aumentados de FFA y triglicéridos, disminuyen la secreción de insulina al estímulo con glucosa (Carpentier *et al.*, 1999, Zhou y Grill 1994). Si bien no se conoce el mecanismo preciso mediante el cual los FFA producen una menor secreción de insulina, se ha postulado que ésta se debería a una menor actividad de los glucotransportadores GLUT2 y cambios en las vías metabólicas de los lípidos. La hipótesis señala que el aumento de los FFA debido a una lipólisis exacerbada y la inhibición de la acetil CoA carboxilasa, tiene como consecuencia una disminución de la malonil Coenzima A. Por otra parte, la activación de la acetilcarnitina transferasa 1 que favorece la degradación de los FFA intensifica la β oxidación con disminución de los derivados acilos de la CoA (metabolitos que estimulan la secreción de insulina), lo que se traduce en una menor liberación de insulina (Mason *et al.*, 1999, Prentki, 1997).

Hipertensión

La hipertensión arterial es más frecuente en personas con DM2 que en la población general. Innumerables encuestas han demostrado una relación positiva entre la presión arterial y el valor de glucosa plasmática (Stern y Tuc 2003). Asimismo, se refiere que la presión arterial disminuye con un mejor control de la glucosa en diabéticos, a pesar de incrementos en el volumen plasmático y en el sodio intercambiable (Ferris *et al.*, 1985).

Como se pudo observar en la figura 6B y 6C, las SHR con hiperglicemia desarrollaron la hipertensión semanas antes que las SHR normoglicémicas. El descontrol de la glucosa en estos animales muestra un comportamiento típico de la DM2, sin embargo en SHR con 75 mg/kg de STZ el descontrol fue muy severo, alcanzado niveles muy altos de hiperglicemia, además de que en estas ratas la hipertensión se desarrolló a la edad de 6 semanas. La hiperglicemia pudo haber generado glucotoxicidad de tal suerte que el daño en diferentes órganos blanco fue más crítico y en un menor tiempo, posiblemente es el caso del riñón, un órgano vital en el control de la presión arterial (Oparil y Weber 2000) y que al estar expuesto a una mayor concentración de glucosa, sus funciones se vieron alteradas, una de ellas la del control de la presión arterial

Diversos factores como la resistencia a la insulina y la hiperglicemia, contribuyen a la patogenia de la hipertensión en la diabetes mellitus. Estos factores favorecen la lesión vascular y de los órganos blanco en una persona con predisposición genética al desarrollo de la nefropatía (Beretta-Piccoli *et al.*, 1976). La hipertensión es el signo característico de la nefropatía diabética y ocurre en 90% de los diabéticos con trastornos y deficiencia de la función renal. A diferencia de lo que se pensaba, la hipertensión no es una complicación tardía de la nefropatía diabética, más bien puede haber incremento de la presión arterial desde etapas incipientes de la disfunción renal en la diabetes (Ritz *et al.*, 1989). Los cambios en la hemodinamia intrarrenal en los diabéticos comprenden una pérdida de la autorregulación; un aumento en el tono arteriolar eferente consecutivo a la angiotensina II y posiblemente a la vasopresina; y aumentos en el tono arteriolar aferente consecutivos a hiperglicemia. En conjunto, estas alteraciones aumentan la presión capilar intraglomerular (Perna y Ramuzzi 1996). Además, aumenta la reactividad vascular a las catecolaminas y a la angiotensina II. En condiciones normales, la pared de los capilares glomerulares constituye una barrera eficiente al paso de proteínas, incluida la albúmina. Sin embargo, los incrementos en la presión capilar y en la permeabilidad de la membrana consecutivos a la hiperglicemia alteran esta función y sobreviene microalbuminuria (Oparil y Weber 2000).

En el modelo de diabetes con hiperglicemia severa la glucosa pudo haber generado una alteración en la hemodinamia renal, originándose así nefropatía diabética, esta última juega un papel

importante en el proceso de la hipertensión. Además de que las SHR tienen predisposición genética para desarrollar la hipertensión, es posible que la nefropatía estuviese favoreciendo el acelerado proceso de hipertensión y los niveles altos en la presión sistólica tal como se muestra en la figura 6C. En altas concentraciones, la glucosa circulante reacciona por mecanismos no enzimáticos con las proteínas, y así se forman productos fuertemente reactivos de adición tardía llamados productos finales de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en Inglés). Los AGEs permanecen unidos irreversiblemente a proteínas en múltiples sitios, en particular en las proteínas de la membrana basal subendotelial; durante la diabetes se depositan con ritmo acelerado. Los AGEs también se ligan a LDL, cerca del dominio de unión de su receptor, y bloquean la captación de dichas LDL modificadas (Bucala *et al.*, 1995). Los AGEs desencadenan innumerables efectos que estimularían la aparición de vasculopatía e hipertensión arterial en las ratas con hiperglicemia severa.

Composición de ácidos grasos

Existe una estrecha relación entre la biosíntesis e ingesta de ácidos grasos y su distribución en órganos blanco relacionados con la diabetes y la hipertensión. Además, se ha observado que ocurren anomalías en la composición lipídica de hígado y riñón durante la diabetes y la hipertensión. Los ácidos grasos tienen un papel importante en la estructura y función de la membrana, ellos modulan propiedades importantes tales como la fluidez y la permeabilidad, además del transporte de iones, y la acción de algunas enzimas (Okamoto, 1989).

El organismo sintetiza numerosos ácidos grasos denominados no esenciales, mientras que otros deben incorporarse a través de la dieta, razón por la que se les denomina esenciales. Los ácidos grasos poliinsaturados esenciales, como son el ácido linoleico n-6 y ácido linolénico n-3, son precursores de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como son el araquidónico y el EPA respectivamente (Rodríguez-Cruz 2005). En el ser humano los AGPI además de ser una fuente de energía, son importantes para mantener la estructura de las membranas celulares, regular el metabolismo del colesterol y la producción de eicosanoides, los cuales regulan múltiples procesos celulares (Caballero *et al.*, 2006).

Las células de mamíferos requieren de precursores exógenos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, de modo que la composición de ácidos grasos en tejidos de animales diabéticos se debe en parte a los suministrados en la dieta (Holman *et al.*, 1983). Como se puede observar en la Tabla 8, la dieta administrada a los animales contiene ácidos grasos esenciales como el linoléico (30.03%) el cual es precursor para la formación del ácido araquidónico, un ácido graso cuyos derivados tienen propiedades vasoconstrictoras principalmente. Esta dieta también incluye ácidos grasos ω -3 como el linolénico, eicosapentaenóico (EPA) y docosahexaenóico (DHA), aunque éstos últimos se encuentran en

proporciones mucho menores (EPA 0.22%, DHA 0.05%). Hay que recordar que el ácido linolénico sirve como sustrato para la formación de EPA y DHA, lo cual puede contribuir a un aumento de estos dos últimos ácidos grasos.

Tabla 8. Contenido Porcentual de ácidos grasos de la dieta

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

Los AGPI n-6 se originan a partir del ácido linoleico del cual deriva el AA. El AA liberado a partir de los fosfolípidos de la membrana por acción de la fosfolipasa A₂ recibe la acción de las ciclooxigenasas y lipooxigenasas para dar origen a las prostaglandinas de la serie 2 y leucotrienos de la serie 4, estos actúan como mensajeros celulares y aumentan la agregación plaquetaria, la frecuencia cardiaca y presentan propiedades vasoconstrictoras y proinflamatorias, aunque dichas funciones dependen del tipo celular. En un estudio realizado en SHR, Okamoto (1989) reporta que la actividad de la PLA₂ aumenta con la edad, lo cual podría estar contribuyendo al desarrollo de la hipertensión.

En riñón de las SHR el ácido araquidónico aumentó con la edad, un incremento en la cantidad de AA da origen a una mayor producción de prostaglandinas de la serie 2 y leucotrienos de la serie 4. El alto contenido de AA en riñón sugiere que existe una mayor actividad de la $\Delta 6$ desaturasa con ello una mayor conversión del ácido linoleico a ácido araquidónico. El problema se acentúa si consideramos que los AGPI n-6 pueden competir con los AGPI n-3 por enzimas como la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas, lo que aumenta la producción de mediadores protrombóticos y proinflamatorios (Delachambre, *et al.*, 1998). De hecho, una ingesta abundante de ácido linoleico puede reducir la capacidad del organismo para convertir al ácido alfa-linolenico en DHA. (Carrero *et al.*, 2005). El riñón mostró también una menor cantidad de EPA y DHA en todas las edades, así un desequilibrio en la distribución de AGPI en el riñón pudo contribuir al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión.

Respecto a la composición lipídica del hígado, se encontró que en SHR normoglicémicas el ácido araquidónico disminuyó a la edad de 3 meses de edad, sin embargo a los 6 meses de edad aumentó, estos resultados coinciden con lo reportado por Delachambre *et al.*, (1998). Ellos sugieren que la actividad de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasa pudieron ser inhibidas. Los resultados que obtuvimos son coherentes con lo reportado por Delachambre, *et al.*, (1998) ya que encontramos una gran cantidad de ácido linoleico y una baja proporción de AA, lo cual indicaría que la desaturación y elongación del ácido linoleico se ve alterado con la edad y con ello el metabolismo del AA.

Se han reportado cambios en la composición de ácidos grasos tanto en humanos como en animales con diabetes (Holman *et al.*, 1983). La diabetes generó una alteración en el metabolismo de los lípidos, esto se pudo observar en los niveles de colesterol y triglicéridos en suero de SHR, donde las ratas con hiperglicemia incrementaron sus niveles de lípidos en suero. Al analizar la composición de ácidos grasos de hígado y riñón se observó diferentes cambios a lo largo de este estudio. Con la edad la proporción de ácidos grasos que están relacionados con la estructura de la membrana, o en la regulación de la presión sanguínea (ácido linoleico, ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico) es modificada en las SHR normoglicémicas. En las ratas con diabetes los cambios en la composición de ácidos grasos fueron aún más notorios y claramente influenciados por la hiperglicemia.

Estudios en animales y humanos sugieren que la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa es deteriorada durante la diabetes (Arisaka *et al.*, 1991). Esta anomalía está asociada a la alteración en la composición de fosfolípidos de la membrana (Holman, 1983). Ramesh *et al.*, (2007) reportan que la insulina regula la actividad de la $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas durante una condición normoglicémica, sin embargo, durante condiciones de diabetes y la consecuente hiperglicemia, la regulación de estas enzimas es deficiente. La alteración de estas enzimas es responsable de la modificación en la composición de ácidos grasos en la

diabetes (Holman *et al* 1983). Otros trabajos demuestran que la composición de ácidos grasos de varios tejidos se ve alterada tanto en humanos como en animales diabéticos. En ratas Wistar diabéticas los niveles de ácido palmítico, ácido esteárico y el ácido oleico aumentan, mientras que el ácido araquidónico disminuye (Mercuri *et al.*, 1967).

Holman y colaboradores (1983) reportan que durante el desarrollo de la diabetes inducida por STZ existe una alteración en el metabolismo de los ácidos grasos, en específico del AA, del cual reporta una disminución en el porcentaje de diferentes órganos, entre ellos el riñón, sugiriendo una alteración de la $\Delta 5$ desaturasa principalmente. Cabe señalar que su estudio lo realizó en ratas Sprague-Dawley, y que la diabetes fue inducida a la edad de 49 días (7 semanas de vida aproximadamente). En nuestro estudio encontramos algo totalmente distinto, el AA aumentó de manera considerable en riñón de SHR diabéticas en comparación con las SHR normoglicémicas, en las ratas diabéticas el porcentaje fue de casi el doble. Es importante señalar que las SHR tienen predisposición al desarrollo de la hipertensión debido a factores genéticos, lo cual podría explicar que el AA no disminuyera pese a la diabetes. Se ha reportado que el AA (un ácido graso, cuyos derivados tienen principalmente propiedades vasoconstrictoras), juega un papel importante durante la hipertensión y en esta cepa de ratas por lo regular se mantiene en porcentajes altos (Delachambre *et al.*, 1998).

Fluidez Membranal

Las membranas funcionan en la organización de los procesos biológicos (Voet y Voet 1990) determinan la estructura celular y una variedad de funciones que tienen lugar en ella (Pezeshk Y Dalhouse 2000). Un número de investigadores que ha estudiado la fluidez de membranas de eritrocitos en SHR y en pacientes con hipertensión esencial, reportan que la fluidez membranal tanto de animales como de personas hipertensas, es menor que en sus controles normotensos (Tsuda *et al.*, 1987, Chi y Gupta, 1988). En este trabajo encontramos que la fluidez membranal decrece aún más cuando hay hiperglicemia severa.

La estructura, dinámica y propiedades de la membrana han sido estudiadas utilizando diferentes técnicas como resonancia magnética nuclear, resonancia del spin del electrón y polarización de fluorescencia utilizando el monitor difenil hexatrieno, el cual se incorpora en el núcleo de la bicapa preferencialmente (Melnick *et al.*, 1981). En este estudio utilizamos el monitor fluorescente DPIP para determinar la fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos. Encontramos que en SHR normoglicémicas la fluidez disminuyó con la edad, tal como se ha reportado en otros estudios (Tsuda, 1987, Chi-Gupta, 1998), esto sugiere que la reducción en la fluidez membranal puede estar relacionada con la hipertensión, sin embargo no sabemos si esta es una causa o una consecuencia del desarrollo de esta

patología. También observamos que con la diabetes la fluidez es alterada de manera más severa. Desde el primer mes de edad la fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos de ratas diabéticas es menor que en SHR normoglicémicas mostrando un cambio más severo en las propiedades fisicoquímicas de la membrana. Si bien es cierto que no podemos explicar si la disminución de la fluidez membranal es una causa o una consecuencia del desarrollo de la diabetes y la hipertensión, es claro que está estrechamente relacionada con estas patologías y que se disminuye más rápidamente cuando hay diabetes.

La fluidez de la membrana puede ser influenciada por diferentes factores como son la composición lipídica, las proteínas de membrana y el colesterol; este último juega un papel importante ya que genera un estado de fluidez intermedia. Owen y colaboradores realizaron un estudio en el cual enriquecieron con colesterol las membranas de eritrocitos por incubación y encontraron que un incremento en el contenido de colesterol pudo ser el responsable de la disminución en la fluidez membranal, asimismo reportan que al remover el colesterol la fluidez regresó a valores normales, las mediciones de fluidez fueron hechas con el monitor difenilhexatrieno (Owen *et al.*, 1982). Paradójicamente, estos resultados con el difenilhexatrieno no son coherentes con la localización molecular preferencial de este monitor fluorescente en el núcleo de la bicapa y la función del colesterol en la generación de un estado fluido intermedio. Un aumento de colesterol debería aumentar la fluidez detectada con el difenilhexatrieno en el núcleo de la bicapa, y no haber causado una disminución. En un enfoque como el de Owen y colaboradores (1982), un monitor como el DPiP sería de mayor utilidad para contestar el efecto del colesterol por localizarse preferencialmente en la región media de cada monocapa, detectando precisamente en la región en donde el colesterol se esperaría que tuviese mayor efecto. También se ha encontrado que los ácidos grasos de fosfolípidos de animales hipertensos son alterados. La proporción de AA y ácido esteárico en eritrocitos disminuye mientras que el ácido palmítico aumenta (Owen, 1982). Estos cambios en la composición lipídica de la membrana de eritrocito pueden afectar su estructura, su forma y por consecuencia su deformabilidad (Chabanel *et al.*, 1987).

Borochoy *et al.*, (1979) encontraron que una disminución en el contenido de fosfatidilcolina y esfingomielina generan una disminución de la fluidez de membrana de riñón. Shinitzky (1985) demostró que los fosfolípidos, en especial la fosfatidilcolina y fosfatidietanolamina contribuyen a una mejor fluidez, mientras que las proteínas, el colesterol y la esfingomielina tienen un efecto contrario.

En este trabajo aún no se puede concluir si la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos reportada por el DPiP está determinada principalmente por alguno de los factores mencionados en los diferentes estudios que se han reportado (proteínas, fosfolípidos, ácidos grasos, colesterol, etc), por esta razón estamos realizando las cuantificaciones pertinentes para descifrar la relación cuantitativa existente entre el monitor fluorescente y los componentes membranales. Con ello, queremos saber si la fluidez

está determinada principalmente por la composición de ácidos grasos, como suponemos, o por otros elementos. Nuestra hipótesis radica en el hecho de que durante la hipertensión se generan ciertas alteraciones en el metabolismo de los lípidos y desde luego en la composición de ácidos grasos, de tal suerte que los ácidos grasos saturados aumentan y los ácidos grasos poliinsaturados disminuyen confiriéndole una menor fluidez a la membrana. Esto a su vez podría alterar la sensibilidad a la insulina de las células implicadas, indicando indirectamente que un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados podría mejorar la fluidez y con ello mejorar la sensibilidad a la insulina. Por ello decidimos administrar un suplemento de AGPIs, principalmente el ALA el cual es precursor de AGPIs de cadena larga como son el EPA y DHA.

Suplemento omega-3

Se ha reportado que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados puede ser benéfico en el control de ciertas enfermedades como la diabetes mellitus y la obesidad, en la que los AGPIs activan a PPARs estimulando la oxidación de los lípidos y mejoran la sensibilidad a la insulina (Rodríguez-Cruz, 2005). Existen evidencias de que el consumo de EPA y DHA tiene efectos benéficos en dislipidemias, presión sanguínea y el control de la glucosa, sin embargo hay pocas evidencias publicadas de efectos benéficos con el uso del ALA en el control de la glucosa y la hipertensión. La figura 13 construida a partir de las gráficas 3, 5 y 11 muestra que en SHR con un suplemento de aceite de linaza el cual contiene ALA, controló la glicemia. En las SHR con 75 mg/kg de STZ, la hiperglicemia fue severa llegando hasta 249 mg/dl durante el primer mes, sin embargo al suministrarles el suplemento de omega 3 esta concentración de glucosa disminuyó hasta llegar a niveles basales a la edad de 3 meses y se mantuvo así hasta los 6 meses.

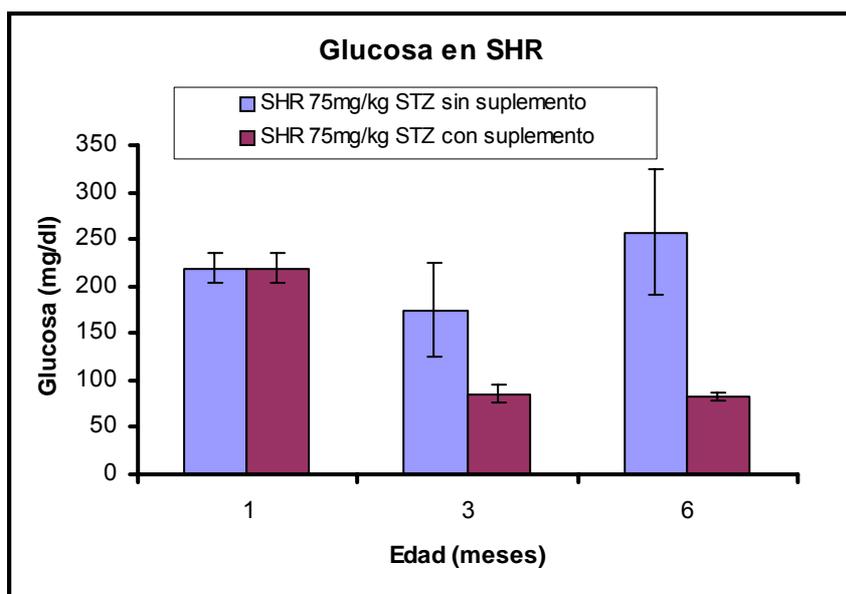


Fig. 13 Comparación de la glucosa en SHR con 75 mg/kg de STZ con o sin suplemento de aceite de linaza (omega-3).

Se ha propuesto que los AGPIs pueden tener un efecto benéfico en el desarrollo o control de la diabetes a través de diferentes mecanismos. Uno de ello se relaciona con la composición lipídica de la membrana. Las propiedades fisicoquímicas de las membranas están determinadas por la naturaleza de los ácidos grasos que las componen, especialmente en la fracción fosfolipídica y esto puede influir en diferentes funciones celulares. Por ejemplo, parece ser que la composición de la membrana celular del miocito puede influir en la acción de la insulina; al incrementar los ácidos grasos poliinsaturados en la membrana de las células se mejora la respuesta de la insulina (Ginsberg *et al.*, 1987). Lo anterior sugiere que la composición de los ácidos grasos altera la sensibilidad a la insulina, indicando que un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática mejora la sensibilidad a la insulina y un desequilibrio de estos ácidos provoca un efecto contrario. También puede significar que no consumir ácidos grasos esenciales como el alfa linolénico omega 3, causa alteraciones metabólicas que se revierten al restablecer su consumo. Para los propósitos de este trabajo, no consumir AG esenciales al parecer contribuye significativamente al desarrollo de la diabetes y que al proporcionar un suplemento de AGPIs, entre otras cosas se mejora la acción de la insulina (Pérez, 2004). Otro de los beneficios encontrados en el consumo de los AGPIs, es proteger a las células β pancreáticas del daño causado por el aumento en radicales libres producidos durante la diabetes (Suresh y Das 2003).

Otro mecanismo de acción de los AGPIs se refiere a la capacidad de los ácidos grasos poliinsaturados para actuar como ligandos activadores de PPAR γ . Los proliferadores de peroxisomas PPARs (por sus siglas en inglés: proliferator peroxisome activator receptor) son receptores nucleares que pertenecen a la familia de factores de transcripción involucrados en la regulación de la homeostasis

de los lípidos. Los PPARs presentan tres isoformas (α , γ , δ) y se activan por concentraciones micromolares de AGPIs o por eicosanoides derivados del ácido araquidónico. PPAR γ activo estimula la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos, lo que genera en esta célula un aumento en los receptores para insulina reduciendo de esta manera la resistencia a la insulina (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005). Se ha demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados además de ser moléculas proveedoras de energía también son ligandos de los PPARs. Esto indica que los AGPIs incrementan la actividad transcripcional de genes regulados por PPARs de una manera directa y pueden ser reguladores metabólicos. Otros ligandos importantes de PPARs son las tiazolidinedionas (TZDs) que son medicamentos utilizados para el tratamiento de la diabetes. La activación de los PPAR γ por las TZD acelera la velocidad de la diferenciación celular, incrementa la expresión del transportador de glucosa GLUT 4 y de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo. Lo mismo se ha observado en el músculo esquelético, lo que explica que los PPARs incrementan la sensibilidad a la insulina, aceleran el metabolismo de la glucosa disminuyendo su concentración sanguínea y simultáneamente disminuyen la concentración de triglicéridos en sangre (Alemán *et al.*, 2004).

El suplemento de aceite de linaza que contiene ALA (omega-3) suministrado a SHR diabéticas posiblemente contribuyó a mejorar la fluidez membranal y de esta manera a mejorar la sensibilidad de la célula y de los receptores a la insulina, también es probable que haya mejorado la funcionalidad de las células β al incrementar la síntesis de insulina (Orozco-Tapia, 2008) logrando así satisfacer la demanda de insulina lo que finalmente conlleva a un control de la glicemia.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló con éxito diabetes tipo 2 en ratas espontáneamente hipertensas, un modelo con hiperglicemia ligera (< 200 mg/dl) y otro modelo con hiperglicemia severa (> 200 mg/dl).
- En términos generales, la diabetes contribuyó al desarrollo de la hipertensión, pero entre mayor sea la hiperglicemia, más pronto se desarrolla la hipertensión y mayor es la presión arterial.
- En este modelo de ratas, la diabetes alteró el metabolismo de los lípidos en forma similar a como ocurre en humanos. Entre más alta fue la hiperglicemia, mayores fueron los niveles de triglicéridos y colesterol en suero.
- En ratas espontáneamente hipertensas la composición de ácidos grasos de hígado y riñón cambia con la edad, pero la diabetes induce modificaciones aun más severas sobre dicha composición.
- En ratas espontáneamente hipertensas la fluidez de fantasmas de eritrocitos cambia a lo largo de la vida de los animales, pero la hiperglicemia severa induce disminución de la fluidez membranal.
- El suplemento de omega-3 normalizó los niveles de glucosa en ratas diabéticas y retrasó la aparición de la hipertensión, así como la intensidad de la misma.

ABREVIATURAS

- (AA) Ácido Araquidónico
- (AG) Ácidos Grasos
- (AGEs por sus siglas en inglés) Productos Finales de Glicación Avanzada
- (AGPi) Ácidos Grasos Poliinsaturados
- (ALA) Ácido Alfa Linolénico
- (BF₃) Trifluoruro de Boro
- (DHA) Ácido Docosahexaenoico
- (DM) Diabetes Mellitus
- (DPiP) Dipirenilpropano
- (EPA) Ácido Eicosapentaenoico
- (FFA por sus siglas en inglés) Ácidos Grasos Libres
- (FID) Detector de Ionización de Flama
- (GLUT) Glucotransportadores
- (HAS) Hipertensión Arterial Sistémica
- (HDL por sus siglas en inglés) Lipoproteínas de Alta Densidad
- (IRS por sus siglas en inglés) Sustratos Receptores de Insulina
- (oLDL por sus siglas en inglés) Lipoproteínas de Baja Densidad Oxidadas
- (PGE₂) Prostaglandina E₂
- (PGF_{1α}) Prostaglandina F_{1α}
- (PKC) Proteína Cinasa C
- (PLA₂) Fosfolipasa A₂
- (PPARs por sus siglas en inglés) Proliferadores Activados por Peroxisomas
- (SHR por sus siglas en inglés) Ratas Espontáneamente Hipertensas
- (SHRSP por sus siglas en inglés) Ratas Espontáneamente Hipertensas Propensas a Infarto
- (sLDL por sus siglas en inglés) Lipoproteínas de Baja Densidad Pequeña
- (STZ) Estreptozotocina
- (TXB₂) Tromboxano B₂
- (TZDs) Tiazolidinedionas
- (VLDL por sus siglas en inglés) Lipoproteína de Muy Baja Densidad
- (WKY) Ratas Wistar Kyoto

BIBLIOGRAFIA

- Afonso L, Edelson G, Sowers J. Metabolic abnormalities in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; 6: 219-223.
- Alcazar O, Qiu-yue Z, Gine E, Tamarit-Rodríguez J. Stimulation of islet protein kinase C translocation by palmitate requires metabolism of the fatty acid. *Diabetes* 1997; 46: 1153-1158.
- Alemán G, Torres N, Tovar A. Los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) en el desarrollo de la obesidad y resistencia a la insulina. *Revista de Investigación Clínica*. 2002; 3: 351-367.
- Arisaka M, Arisaka O, Yamashiro Y, Fatty acids and prostaglandins metabolism in children with diabetes mellitus. The effect of evening primrose oil supplementation on serum fatty acid and plasma prostaglandin levels. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty acids* 1991; 43: 197-201
- Avendaño-Flores J. Evaluación del efecto antihipertensivo y antidiabético de los ácidos grasos ω -3: Uso de un modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con diabetes tipo 2. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2008. (en proceso)
- Baynes J. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405.
- Beretta-Piccoli C, Weidmann P, De Chatel R, Reubi FC. Hypertension associated with early stage kidney disease: Complementary roles of circulating renin. The body sodium/volume state and duration of hypertension. *Am J med* 1976; 61: 739-747
- Bilan P, Klip A. Glycation of the human erythrocyte glucose transporter in vitro and its functional consequences. *Biochem J*; 1990: 268: 661-667.
- Bonna K, Bjerve K, Straume B. Effect of eicosapentanoic and docosahexanoic acids on blood pressure in hypertension. A population-based intervention trial from the Tromso Study. *N Engl J Med* 1990; 322: 795.
- Bonora E, Kiechl S, Willeit J et al. Metabolic syndrome: epidemiology and more extensive phenotypic description. Cross-sectional data from the Bruneck Study. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; 27: 1283-1289.
- Borochoy H, Abbott E, Schachter D, Shinitzky M. Modulation of erythrocyte membrane proteins by membrane cholesterol and fluidity. *Biochemistry*. 1979; 18: 251-255.
- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248-54.

- Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarit T, Vlassara H, Cerami A. Identification of the major site of apolipoprotein B modification by advanced glycosylation end products blocking uptake by the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 1995; 270: 1082
- Caballero R, Gomez R, Nuñez L, Vaquero M, Tamargo J, Delpon E. Farmacología de los ácidos grasos omega 3. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2006; 6: 3-19.
- Carpentier A, Mittelman SD, Lamarche B, Bergman RN, Giacca A, Lewis GF. Acute enhancement of insulin secretion by FFA in humans is lost with prolonged FFA elevation. *Am J Physiol* 1999; 276: 1055-1066.
- Carrero J, Bautista L, Baró J, Fonolla J, Jimenez J, Boza J, Lopez E. Efectos cardiovasculares de los ácidos grasos omega-3 y alternativas para incrementar su ingesta. *Nutr: Hosp.* 2005; 20; 63-69.
- Chabanel A, Schachter D, Chien S. Increased rigidity of red blood cell membrane in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1987; 6: 603-607
- Chi Y, Gupta R. Alterations in heart and kidney membrane phospholipids in hypertension as observed by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Lipids* 1998; 33: 1023-1030.
- Chipkin S, Kelly L, Ruderman N. Hormone-fuel interrelationships; fed state starvation, and diabetes mellitus. En: Khan CR, Weir CG, eds. *Joslin's Diabetes Mellitus.* 13 ed., Philadelphia:Lea & Febiger, 1994; 97-115.
- Cruz-Cruz R. Salgado A, Sánchez-Soto C, Vaca L, Hiriart M. A thapsigargin-sensitive cationic current leads to membrane depolarization, calcium entry and insulin secretion in rat pancreatic beta cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2005;289: E439-45.
- Delachambre M, Narce M, Asdrúbal P, Poison. Changes in Tissue Polyunsaturated Fatty Acids with Age, in Spontaneously Hypertensive rats. *Lipids.* 1998; 33: 795-801.
- Donath M, Gross D, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced β -cell apoptosis in pancreatic islets of *Psammomys obesus* during development of diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 738-744
- Dorrance A, Graham D, Webb R, Fraser R, Dominiczak A. Increased membrane sphingomyelin and arachidonic acid in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Hypertens* 2001; 14: 1149-1153.
- Duell P, Oram J, Bierman E. Nonenzymatic glycosilation of HDL and impaired HDL receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes* 1991; 40: 377.
- Durruty P, García de los Ríos M. Glucose and lipid toxicity in the pathogenesis and evolution of type 2 diabetes. *Rev. Med. Chile.* 2001; 129: 671-9.
- Ferris J, O'Hare J, Kelleher C. Diabetic control and the renin angiotensin system, catecholaminas and blood pressure. *Hypertension* 1985; 7: 1158-1162

- Flakoll P, Carlson M, Cherrington A. Acción fisiológica de la insulina. En LeRoith D, Taylor S, Olefsky J. Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003. Pp 1331.
- Folch, J. Lees, M. and Sloane-Stanley, H..A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. 1957; 226: 497-509.
- Ginsberg B, Chaterjee P, Yorek M. Increased membrane fluidity is associated with greater sensitivity to insulin. Diabetes. 1987; 36 1-5
- Guerra M., Lujan D, Alvarado M, Moreno D, Silva M.. Estudio del perfil lipídico en sujetos con diabetes mellitus tipo 2 en Bogotá. Revista de la facultad de ciencias 2005; 10: 81-89.
- Guyton, A. C. Fisiología humana. 6ª edición. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. 1987.
- Harris M. Definición y clasificación de la diabetes mellitus y criterios actuales para su clasificación. En LeRoith, D. Taylor, S. Olefsky, J. Diabetes Mellitus Texto básico y clínico. 2ª edición. Editorial Mc Graw-Hill. México. D.F. 2003. Pp: 1331
- Harrison T.R. "Principios de Medicina Interna" 15ª Edición. Vol. I y II. Editorial Mc Graw Hill. 2002. Pp: 2467.
- Holman R, Johnson S, Gerrard J, Mauer M, Kupcho-Sandberg S, Brown D. Arachidonic acid deficiency in streptozotocin-induced diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Medical Sciences. 1983; 80: 2375-2379.
- Jacobs D, Mebane I, Bangdiwala SI, Criqui MH, Tyroler HA. High density cholesterol as a predictor of cardiovascular disease mortality in men and woman : the follow-up study of the lipid research clinics prevalence study. Am J Epidemiol. 1990; 131: 32
- Jensen M, Haymond M, Rizza R. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. J clin invest 1989; 83: 1168-1173.
- Kahn B, Flier J. Obesity and insulin resistance. J Clin Invest 2000;106: 473-81.
- Kawaguchi H, Saito H, Yasuda H. Renal prostaglandins and phospholipase A2 in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 1987; 5: 299-304
- Kawamura M, Heinecke J. Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of LDL by superoxide-dependent pathway. J clinic invest 1994; 94:771
- Koch-Weser J. Correlation of pathophysiology and pharmacotherapy in primary Hypertension. Am J cardiol 1973; 32: 499-510
- Lahoz C, Alonso R, Ordovas JM, et al. Effects of dietary fat saturation on eicosanoid production, platelet aggregation and blood pressure. Eur J Clin Invest 27:780, 1997.
- Lawrence M, Tyrney Jr, Stephen J. Diagnostico clínico y tratamiento. 38 edición, editorial manual moderno. México, DF. 2003. Pp 1171-117.

- LeRoith, D. Taylor, S. Olefsky, J. Diabetes Mellitus Texto básico y clínico. 2ª edición. Editorial Mc Graw-Hill. México. D.F. 2003. Pp:164-174.
- Leahy J, Bonner-Weir S, Weir G. Beta cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia: current ideas on the mechanism of the impaired glucose-induced insulin secretion. Diabetes Care 1992; 15: 442-455
- Lopes-Virella M, Wohltmann H, Mayfield R, Loadholt C, Colwell J. Effect of metabolic control on lipid, lipoprotein, and apolipoprotein levels in 55 insulin-dependent diabetic patients. Diabetes 1983; 32: 20
- Maiz Alberto. El síndrome metabólico y riesgo cardiovascular. Boletín de escuela de med. 2005; 1: 25-30
- Mason T, Goh T, Techipashvili V. Sandhu H, Gupta N. Lewis G. Prolonged elevation of plasma free Fatty Acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. Diabetes 1999; 48: 524-530.
- Mears D. Regulation of insulin secretion in islets of Langerhans by Ca²⁺ channels. J. Membr. Biol. 2004; 200: 57-66.
- Mejía R, Gomez-Eichelman M, Fernandez M. Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock. Biochim. Biophys Acta 1995; 1239: 195-200.
- Melnick R, Haspel H, Goldenberg M, Greenbaum L, Weinstein S. Use of fluorescence probes that form intramolecular excimers to monitor structural changes in model and biological membranes. Biophys. J. 1981; 34: 499-515.
- Mendivil, A. C. Sierra. A. I. Acción insulínica y resistencia a la insulina: aspectos moleculares. Rev Fac Med Univ Nac Colomb. 2005; 53: 104-110.
- Mercuri O, Peluffo R, Brenner R. Effect of insulin on the oxidative desaturation of alpha linolenic, oleic and palmitic acids. Lipids 1967; 2: 284-285.
- Moragrega A. Definición, clasificación, epidemiología, estratificación del riesgo, prevención primaria. Rev Mex Cardiol 2005; 1: 7-13
- Morrison, W.R. and Smith, L. M.. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. J. Lipid res. 1964; 5: 600-608.
- Okamoto, H. Kawaguchi H, Minami M, Saito H, Yasuda H. Lipid alterations in renal membrane of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Hypertension 1989; 13: 456-62.
- Oparil S, Weber M. Hipertensión EL riñón de Brenner y Rector. Ed McGraw-Hill Interamericana. México. 2000. Pp 815.
- Orozco-Tapia. 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.

- Owen J, Bruckdorfer R, Richard C, McIntyre N. Decreased erythrocyte membrane fluidity and altered lipid composition in human liver disease. *J of Lipid Research*. 1982; 23: 124-131
- Pérez C, Guerrero C. Ácidos grasos en la dieta, diabetes mellitus e insulinoresistencia. *Rev fac Med Uni Nac Col* 2006; 54: 134-142.
- Perna A, Ramuzzi G. Abnormal permeability to proteins and glomerular lesions: A meta-analysis of experimental and human studies. *Am J kidney Dis* 1996; 27: 34-41
- Pezeshk A, Dalhouse A. Vitamin E, membrane fluidity, and blood pressure in hypertensive and normotensive rats. *Life Sciences* 2000; 67: 1881-1889
- Powers A. Diabetes mellitus. En LeRoith, D. Taylor, S. Olefsky, J. *Diabetes Mellitus Texto básico y clínico*. 2ª edición. Editorial Mc Graw-Hill. México. D.F. 2003. Pp:164-174
- Prentki M, Tornheim K, Corkey B. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia*. 1997; 40: S32-S41.
- Quinn P, Tessier C, Dominique R, Koumanov K, Wolf C. Structure and thermotropic phase behaviour of detergent-resistant membrane raft fractions isolated from human and ruminant erythrocytes. *Biochimica et biophysica acta* 2005; 1713: 5-14.
- Ramesh B, Viswanathan P, Viswanathan-Pugalendi K. Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 2007; 566: 231-239.
- Randle P, Garland P, Hales C, Newsholme E. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 7: 785-789.
- Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988; 3: 1595-1607.
- Ritz E, Hasslacher C, Guo J, Mann J. Role of hipertensión in diabetic nephropathy. *Diabetic and the kidney*. 1989;91: 111-115
- Rodríguez-Cruz M, Tovar A, Del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de Investigación Clínica*. 2005; 3: 457-472.
- Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Witters LA, Perruchoud B, Yaney G, Corkey B. Induction by glucose of genes coding for glycolytic enzymes in a pancreatic β -cell line (INS-1). *J Biol Chem* 1997; 272: 3091-3098.
- Roche E, Maestre I, Martín F, Fuentes E, Casero J, Reig J. Nutrient toxicity in pancreatic β -cell dysfunction. *J Physiol Biochem* 2000; 56: 119-128.
- Roche E, Maestre I, Martín F, Fuentes E, Casero J, Reig JA et al. Nutrient toxicity in pancreatic β -cell dysfunction. *J Physiol Biochem* 2003; 56: 119-128.

- Roduit R, Morin J, Massé F, Segall L, Roche E, Newgard CB et al. Glucose down-regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- α gene in the pancreatic β -cell. *J Biol Chem* 2000; 275: 35799-35806.
- Rossetti L. Glucosetoxicity: the implications of hyperglycemia in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 1995; 18: 255-260.
- Shinittzky m. Physiology of membrane fluidity.. CRS Press, Inc. Florida. 1985: 5-7
- Segall L, Lameloise N, Assimacopoulos-Jeannet F, Roche E, Corkey P, Thumelin S. Lipid rather than glucose metabolism is implicated in altered insulin secretion caused by oleate in INS-1 cells. *Am J Physiol* 1999; 277: 521-528.
- Simopoulos AP. Essential PUFAs in health and chronic disease. *Am J Clinic Nutr.* 1999; 70: 560-569.
- Stern N, Tuck ML. Mecanismos de la hipertensión en la diabetes mellitus. En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. *Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico.* Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003. Pp 1331.
- Stier C Jr, Benter I, Levine S. Thromboxane A₂ in severe hypertension and stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke.* 1988; 19: 1145-1150.
- Suresh Y, Das U. Long chain polyunsaturated fatty acids and chemically induced diabetes mellitus: Effect of w-3 fatty acids. *Nutrition* 2003; 19: 213-218.
- Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in β -cells of the rat pancreas. *Physiol. Res.* 2001; 50: 536-546.
- Tsuda K, Iwashita H, Minatogawa Nishino I, Kido R, Masuyama Y. Electron spin resonance studies of erythrocytes from spontaneously hypertensive rats and humans with essential hypertension. *Hypertension.* 1987; 9: 19-24.
- Unger R, Grundy S. Hyperglycemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetología* 1997; 28: 119-21.
- Vance, E.D. and Vance, E. Jean. *Biochemistry of Lipids and Membranes.* The Benjamin/Cummings publishing Company, INC. United States of America. California. 1985. Pp: 593.
- Velásquez M, Rosas P, Lara, Pastelín H. Grupo ENSA 2000. Hipertensión arterial en Mexico: resultados de la encuesta nacional de salud. *Arch Cardiol. Mex* 2002; 72: 71-84.
- Voet, D. Voet, J. G. 1990. *Bioquímica.* Ediciones Omega. Barcelona. España. Pp: 1315.
- Yajima H, Komatsu M, Yamada S, Straub SG, Kanako T, Sato Y et al. Cerulenin, an inhibitor of protein acylation, selectively attenuates nutrient stimulation of insulin release: a study in rat pancreatic islets. *Diabetes* 2000; 49:712-717.

- West K, Ahuaja M, Bennett P. The role of circulating glucose and triglyceride concentrations and their interactions with other risk factors as determinants of arterial disease in nine diabetic population samples from the WHO multinational study. *Diabetes care* 1983; 6: 361
- WHO. Definition, diagnosis and classification of diabetes. Report of a WHO consultation. 1985.
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J clin invest* 1991; 88: 1785.
- Zeisel, S.H. Choline Phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. *FASEB J.* 1993; 7: 551-557.
- Zhou Y, Grill VE. Long term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid circle. *J Clin Invest* 1994; 48: 577-583