



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Efecto del aceite de linaza (ácido alfa linolénico) sobre la fluidez membranal en células de ratas espontáneamente hipertensas con diabetes

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Ismael Herminio Pérez Hernández

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Ricardo Mejía Zepeda

COMITÉ TUTOR: Dr. Martín Palomar Morales  
Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder



MÉXICO D.F.

NOVIEMBRE 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 8 de agosto del 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **PÉREZ HERNÁNDEZ ISMAEL HERMINIO** con número de cuenta 300143188 con la tesis titulada **"Efecto del aceite de linaza (ácido alfa linolénico) sobre la fluidez membranal en células de ratas espontáneamente hipertensas con diabetes"**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA:**

Presidente: DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA  
Vocal: DR. MARTÍN PALOMAR MORALES  
Secretario: DR. OSCAR FLORES HERRERA  
Suplente: DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER  
Suplente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN

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

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de noviembre de 2011.

*M. del Coro Arizmendi*  
**Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga**  
**Coordinadora del Programa**

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

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado. 329213/233851

Al apoyo otorgado por PAPIIT No IN228610-3 otorgado al Dr Ricardo Mejía Zepeda

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) 11BCM0159-I

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Martin Palomar Morales,

Dr. Mohammed El Hafidi Bentlyakder

Dr. Ricardo Mejía Zepeda.

## **AGRADECIMIENTOS A TIULO PERSONAL**

A los miembros del jurado:

Dr. Rafael Villalobos Molina

Dr. Martín Palomar Morales

Dr. Oscar Flores Herrera

Dr. Mohammed El Hafidi Bentlyakder

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

*Agradezco a cada uno de ustedes por la paciencia y el tiempo invertido en la revisión de mi trabajo, cada una de sus observaciones han enriquecido esta tesis, gracias.*

## **DEDICATORIAS**

***A dios, por un día más de vida. Al cielo por cobijar mis sueños entre las nubes. A la luna, al mar y a cada manifestación de la grandeza de ese poder superior...***

***A mis padres***

***A mis hermanas Eira, Cynthia y Ceci.***

***A Ara por su amor y gran apoyo.***

***A mis 9 hermosos hijos (Bobby, Chino, Chata, Almendra, Nuna, Pantera, Soldado, Griselda, y por su puesto a Dona) por ser una fuente de amor incondicional y el más sincero que puede existir en este mundo.***

***Al Profesor Peter y a la Profesora Vikcos quienes han sido una parte importante en mi desarrollo profesional y sobre todo han aportado mucho a este ser humano, gracias por el café, las pláticas y las grandes enseñanzas.***

***A la química Elsa por su gran apoyo, gracias por escucharme, impulsarme y darme su gran ejemplo de perseverancia.***

***Al Dr Ricardo Mejía, por creer en mi nuevamente y brindarme su apoyo y sobretodo, su amistad. Es un placer trabajar con usted, agradezco los momentos de música, billar, ajedrez y buenas pláticas.***

***A Pilar, por tu hermosa amistad y por acompañarme una vez más por el camino de la ciencia.***

***A mis grandes amigos: Alan, Omar, Dous, Max Leo. Ustedes han dejado un legado en las páginas de mi historia y han enriquecido cada uno de mis días. Gracias amigos.***

***A mis amigos entrañables del glorioso CCH, Xandy, Alma, Victor, Fernando y Cesar.***

*A la UNAM por darme el privilegio de estudiar en sus aulas.*

*A la FES Iztacala, el lugar que me ha abierto las puertas durante todos estos años,  
brindandome un hogar, un refugio...*

***“Creo que sí mirásemos siempre al cielo acabaríamos por tener alas”.***  
***Gustave Flaubert***

*“La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica”.*

*Aristóteles*

*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.*

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	3
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
2.1 Diabetes mellitus.....	8
2.2 Clasificación de la diabetes mellitus.....	8
2.3 Diabetes mellitus tipo 1.....	9
2.4 Diabetes mellitus tipo 2.....	10
2.5 Factores de riesgo vascular en la diabetes.....	11
2.6 Glucotoxicidad y lipotoxicidad.....	12
2.7 Modelo experimental de la DM2.....	15
2.8 Hipertensión.....	16
2.9 Clasificación etiológica.....	17
2.10 Anomalías de los lípidos en la hipertensión.....	18
2.11 Ratas espontáneamente hipertensas (SHR); modelo de hipertensión experimental.....	18
2.12 Ácidos grasos membranales.....	19
2.13 Ácidos grasos omega 3 y 6.....	20
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	22
3.1 Membranas de eritrocitos.....	22
3.2 Órganos implicados en el desarrollo de la diabetes.....	23
3.3 Tratamiento de la diabetes y la hipertensión: participación de los ácidos grasos poliinsaturados.....	24
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	26
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	27
5.1 Química sanguínea.....	28
5.2 Fantasmas de eritrocitos.....	29
5.3 Cuantificación de fosfolípidos en membranas de eritrocitos por fósforo inorgánico.....	29
5.4 Incorporación del dipirenil propano (DPiP) a fantasmas de eritrocitos.....	30
5.5 Medición de fluorescencia del DPiP en fantasmas de eritrocitos.....	30
5.6 Extracción y transesterificación de lípidos de fantasmas de eritrocitos.....	30

5.7 Extracción de lípidos de tejidos.....	31
5.8 Metilación de ácidos grasos de hígado y riñón de SHR.....	31
5.9 Análisis de los ácidos grasos de órganos de SHR por cromatografía de gases.....	32
5.10 Microsomas de hígado y riñón.....	32
5.11 Extracción de ácidos grasos de microsomas y análisis por cromatografía de gases.....	32
5.12 Análisis estadístico.....	33
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
6.1 Glucosa y peso en SHR lactantes.....	34
6.2 Glucosa en SHR después del destete.....	36
6.3 Presión arterial en los grupos de SHR a diferentes edades.....	39
6.4 Colesterol y triglicéridos durante la diabetes y la hipertensión.....	42
6.5 Fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos.....	44
6.6 Composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos.....	44
6.7 Composición de ácidos grasos de hígados de SHR.....	57
6.8 Composición de ácidos grasos de riñón de SHR.....	64
6.9 Fluidez membranal en microsomas de hígado.....	70
6.10 Composición de ácidos grasos de microsomas de hígado en SHR.....	72
6.11 Fluidez membranal en microsomas de riñón.....	79
6.12 Composición de ácidos grasos de microsomas de riñón.....	80
<b>7. ANALISIS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
7.1 Desarrollo de diabetes tipo 2.....	87
7.2 Hipertensión.....	89
7.3 Metabolismo de los lípidos. ....	91
7.4 Aceite de linaza, efecto de los ácidos omega-3.....	93
7.5 Fluidez membranal y composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos....	98
7.6 Composición de ácidos grasos de hígado y riñón.....	102
7.7 Fluidez membranal y composición de ácidos grasos de microsomas.....	105
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>109</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>
<b>10. APÉNDICE.....</b>	<b>122</b>

## 1. RESUMEN

La diabetes y la hipertensión son enfermedades estrechamente relacionadas con la obesidad y el metabolismo de los lípidos. Ambas patologías, son dos de las principales causas de morbilidad y mortalidad que cobra cada vez mayor relevancia en el mundo, lo que ha generado interés por descifrar sus bases fisiopatológicas. Se conoce que hay una interacción significativa entre las alteraciones de las membranas y el desarrollo de estas patologías. A últimas fechas se ha recomendado la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs)  $\omega$ -3 para contrarrestar los efectos de la diabetes y la hipertensión. Sin embargo, no hay evidencias suficientes de un efecto benéfico del ácido  $\alpha$  linolénico (ALA) sobre el desarrollo de la diabetes, la hipertensión y la composición de ácidos grasos de membrana.

Se evaluó el efecto del aceite de linaza (rico en ácido  $\alpha$  linolénico) sobre la fluidez membranal de células de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y diabéticas a diferentes edades (1,3 y 6 meses). La inducción de la diabetes mellitus tipo 2 se realizó en neonatos de 48 hrs de vida mediante una inyección intraperitoneal con una dosis única de estreptozotocina (STZ) de 75 mg/kg de peso corporal en amortiguador de citratos pH 4.5. A las SHR control sólo se les inyectó amortiguador de citratos. Las ratas se destetaron a las 4 semanas de edad y cada grupo se dividió en dos, a uno de ellos se le dio aceite de linaza (AL) como suplemento, 5 días por semana (125 mg de aceite de linaza/kg de peso corporal), y al otro no. De esta manera quedaron cuatro grupos: A) SHR control; B) SHR con suplemento de aceite de linaza; C) SHR con STZ; y D) SHR con STZ y suplemento de aceite de linaza. Se hizo una determinación semanal de la glucosa sanguínea con tiras reactivas. Se midió la presión arterial por método pletismográfico. Se cuantificó el colesterol y los triglicéridos de suero por métodos enzimáticos. La fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos se midió con el monitor fluorescente dipirenil propano (DPiP). La composición de ácidos grasos de los fantasmas de eritrocitos, hígado y riñón se determinó por cromatografía de gases. Se obtuvieron microsomas de hígado y riñón, a estos se les midió la fluidez membranal utilizando el DPiP y se determinó su composición de ácidos grasos.

Se estableció un modelo de diabetes tipo 2 en SHR. Las SHR-STZ tuvieron concentraciones de glucosa que oscilaron entre 130 y 300 mg/dl durante todo el estudio, teniendo un patrón muy similar al que se observa en humanos con diabetes tipo 2 no controlados. En las SHR, incrementó la concentración sanguínea de colesterol y triglicéridos con la edad; sin embargo, en las SHR-STZ el aumento fue mayor. En el caso de las SHR-STZ-AL se observó un control de la glucosa sanguínea, manteniéndola en niveles basales hasta los 6 meses de edad. Además, el aceite de linaza disminuyó la concentración del colesterol y triglicéridos sanguíneos manteniéndolos en niveles basales hasta los 6 meses de vida.

Durante el estudio, se observó que la presión sistólica de las SHR-STZ fue de 140 mmHg a las 7 semanas de vida estableciéndose la hipertensión. Es probable que la hiperglicemia dañara el riñón y de esta manera incrementara la presión sistólica acelerando el proceso de hipertensión. En las SHR-AL y SHR-STZ-AL se controló la presión arterial, a las 14 semanas de edad las SHR-AL presentaron un valor inferior a 140 mm Hg en su presión sistólica, es importante mencionar que para esta cepa de animales se ha reportado que la hipertensión se establece entre las 12-14 semanas de edad

La estructura, dinámica y propiedades de la membrana han sido estudiadas utilizando diversas técnicas. En este estudio se utilizó el monitor de fluorescencia DPiP para determinar la fluidez en membranas de eritrocitos y microsomas de hígado y riñón. En las SHR y SHR-STZ la fluidez de fantasmas de eritrocitos tiende a disminuir durante el desarrollo de la diabetes y/o la hipertensión. En el caso de los animales suplementados se observó un aumento en la fluidez de las membranas a la edad de 6 meses, posiblemente como consecuencia del consumo del aceite de linaza. Por otro lado, al determinar la composición de ácidos grasos de los fantasmas de eritrocitos observamos que, en las SHR y SHR-STZ, el contenido de ácidos grasos poliinsaturados disminuyó notablemente a la edad de 6 meses y los ácidos grasos saturados aumentaron. En ratas con AL aumentó el contenido de AGPIs  $\omega$ -3. Además disminuyó el contenido de ácidos grasos saturados, en específico el ácido palmítico. Los resultados muestran que la fluidez membranal es principalmente dependiente de la composición de ácidos grasos.

En microsomas de riñón se observó que la fluidez reportada por el DPiP refleja un patrón similar al cociente de insaturación de ácidos grasos, siendo sensible a los cambios en la composición de ácidos grasos de estos microsomas. En el caso de SHR-AL, se observó que el porcentaje de ALA y ácido eicosapentaenoico (EPA) fue más abundante a los 3 meses de vida, además observamos un menor porcentaje de ácido esteárico (ácido graso saturado). Es posible que un alto contenido de AGPIs  $\omega$ -3, así como una disminución de ácidos grasos saturados hayan favorecido el aumento en la fluidez membranal de estos animales. Por su parte las SHR-STZ-AL tuvieron una alta proporción de ALA y ácido docosahexaenoico (DHA) a los 6 meses de vida. Es importante señalar que la fluidez membranal en los microsomas de hígado y riñón es distinta a lo reportado en los fantasmas de eritrocitos.

## 1. ABSTRACT

Diabetes and hypertension are diseases closely related to obesity and lipid metabolism. Both pathologies are two of the main causes of morbidity and mortality becoming increasingly important in the world, generating great interest for decoding their pathophysiological basis. It is known that there is a significant interaction between alterations of the membranes and the development of these pathologies. More recently it has been recommended intake of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)  $\omega$ -3 to counteract the effects of diabetes and hypertension. However, there is insufficient evidence of a beneficial effect of  $\alpha$  linolenic acid (ALA) on the development of diabetes, hypertension and the membrane fatty acid composition.

It was evaluated the effect of linseed oil (rich in  $\alpha$  linolenic acid) on cell membrane fluidity of spontaneously hypertensive rats (SHR) and diabetic at different ages (1, 3, and 6 months-old). Type 2 diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) in citrate buffer pH 4.5 (75 mg/kg of body weight) in 48 hours-old, newborn male rats. The control group was injected only with citrate buffer. The rats were weaned at 4 weeks-old and each group was divided into two, one of them was given flaxseed oil (AL) as a supplement, 5 days per week (125 mg flax oil/kg of body weight each day ) and the other does not. Thus, there were four groups: A) SHR control; B) SHR supplemented with linseed oil; C) STZ-SHR, and D) STZ-SHR and flaxseed oil supplement. Blood glucose was determined weekly with the glucose reactive strips. Systolic blood pressure was measured in the conscious state by tail cuff plethysmography method. Cholesterol and serum triglycerides were measured by enzymatic methods. Membrane fluidity of erythrocyte ghosts was measured with the fluorescent monitor dipyranylpropane (DPiP). Fatty acid composition of erythrocyte ghosts, liver and kidney was determined by gas chromatography. Microsomes were obtained from liver and kidney and determined the membrane fluidity (using DPiP) and fatty acid composition (by gas chromatography).

It was established a type 2 diabetes model in SHR. During the first days STZ-SHR had glucose concentrations ranged between 130 and 300 mg/dl, maintaining this way throughout the study, showing a very similar pattern to that seen in humans with uncontrolled type 2 diabetes. In SHR, blood levels of cholesterol and triglycerides increased with age, but in the STZ-SHR the increase was greater. In the case of SHR-STZ-AL, they showed almost normal blood glucose concentration, keeping basal levels until 6 months of age. In addition, flaxseed oil decreased the concentration of blood cholesterol and triglycerides.

During the study, it was observed that the SHR-STZ systolic blood pressure was 140 mmHg at 7 weeks-old, establishing the hypertension earlier. It is likely that hyperglycemia damaged the kidney and thus increased systolic blood pressure by speeding up the process of hypertension. In SHR-AL and SHR-STZ-AL blood pressure was controlled, at 14 weeks-old the SHR-AL had systolic pressure values below 140 mm Hg. It is important to mention that this strain of animals develop hypertension around 12-14 weeks-old.

The structure, dynamics and membrane properties have been studied using various techniques. In this study it was used the fluorescence monitor DPiP for determining membrane fluidity of erythrocyte, as well as liver and kidney microsomes. In SHR and SHR-STZ membrane fluidity of erythrocyte ghosts tend to decrease during the development of diabetes and/or hypertension. In the case of the supplemented animals showed an increase in membrane fluidity at the age of 6 months, likely due to the consumption of flaxseed oil. On the other hand, determining the fatty acid composition of erythrocyte ghosts we observed that in the SHR and SHR-STZ, the content of polyunsaturated fatty acids decreased markedly at the age of 6 months-old, whereas saturated fatty acids increased. In rats with LA, the content of  $\omega$ -3 PUFAs increased. The content of saturated fatty acids was reduced, specifically palmitic acid content. The results show that membrane fluidity is mainly dependent on the fatty acids composition.

In kidney microsomes it was observed that the fluidity reported by the DPiP reflects a pattern similar to the unsaturation fatty acids ratio, being sensitive to changes in fatty acid composition of these microsomes. In the case of SHR-AL, it was found that the percentage of ALA and eicosapentaenoic acid (EPA) was higher at 3 months-old, whereas stearic acid (saturated fatty acid) was lower. It is possible that a higher content of  $\omega$ -3 PUFAs, as well as a decrease in saturated fatty acids have led to an increase in membrane fluidity in these animals. By other side, SHR-STZ-AL had a high proportion of ALA and docosahexaenoic acid (DHA) at 6 months-old. It is important to note that membrane fluidity in liver and kidney microsomes is different from that reported in erythrocyte ghosts.

## 2. INTRODUCCIÓN

La diabetes y la hipertensión son enfermedades estrechamente relacionadas con la obesidad y el metabolismo de los lípidos. Ambas patologías, son de las principales causas de morbilidad y mortalidad que cobra cada vez mayor relevancia en el mundo, lo que ha generado interés por descifrar sus bases fisiopatológicas. En ese sentido, la comprensión de la regulación metabólica de los lípidos tiene gran importancia, especialmente la participación de los ácidos grasos en el desarrollo de dichas patologías (Mendivil y Sierra 2005). La Diabetes Mellitus (DM) es un grupo heterogéneo de trastornos metabólicos que se caracteriza por hiperglicemia crónica acompañada de alteración en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas (Kahn *et al.*, 2005).

La hipertensión es una enfermedad frecuente en la diabetes, responsable del desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV). Asimismo, los pacientes con hipertensión tienen más propensión a la diabetes que los pacientes normotensos. La hipertensión aumenta considerablemente el riesgo de enfermedad coronaria, retinopatía y nefropatía. Cuando la hipertensión coexiste con la diabetes, el riesgo de ECV se duplica y la posibilidad de padecer nefropatía aumenta considerablemente en comparación con el riesgo de los pacientes hipertensos sin diabetes (Kahn *et al.*, 2005).

La diabetes tipo 2 y la hipertensión suelen agruparse con otros componentes del síndrome metabólico como son; la obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemias e hiperuricemias. Se sabe también, que en pacientes diabéticos, la hipertensión suele ser una manifestación de la nefropatía diabética. Por otro lado, la resistencia a la insulina predispone al desarrollo de hiperglicemia, que a su vez ocasiona hiperinsulinemia que puede o no ser suficiente para disminuir la hiperglicemia. Esta concentración excesiva de insulina contribuye a incrementar la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el hígado y generar hipertrigliceridemia e incremento en 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 mencionadas, así como los factores que contribuyen al desarrollo de las mismas y las complicaciones crónicas que estas generan, por ello en la siguiente sección se abordarán algunos detalles e información básica para el manejo del presente trabajo.

## 2.1 Diabetes Mellitus

Desde los puntos de vista clínico y genético, la DM constituye un grupo heterogéneo de trastornos, caracterizados por una concentración anormalmente alta de glucosa en la sangre. Las causas de la hiperglicemia son deficiencia en la secreción de insulina o resistencia de las células a la acción de ésta. A menudo ocurren, además, alteraciones de carbohidratos, grasas y proteínas. (Leroith, 2003). El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la DM provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos (Powers, 2003). Existen diferentes factores que pueden favorecer el desarrollo de la diabetes, entre ellos se encuentra el factor genético y el factor ambiental.

La prevalencia mundial de la DM se ha incrementado en grado impresionante durante los dos últimos decenios (Risérus *et al.*, 2009). Aunque la prevalencia tanto de la DM de tipo 1 como de la DM de tipo 2 está aumentando en todo el mundo, cabe esperar que la de tipo 2 aumente con más rapidez en el futuro a causa de la creciente obesidad y la reducción de la actividad física. La posibilidad de padecer DM incrementa con la edad. En el año 2000 se estimaba que la prevalencia de la diabetes era de 0.19% en personas menores de 20 años y de 8.6% en mayores de 25 años. En los individuos de más de 65 años la prevalencia de la DM fue de 20.1%. La prevalencia es semejante en varones y mujeres dentro de la mayor parte de los grupos de edad, pero es ligeramente más elevada en los varones mayores de 60 años (Harrison, 2006).

## 2.2 Clasificación de la diabetes mellitus

Uno de los principales elementos para guiar la investigación tanto epidemiológica como clínica de la DM y el diagnóstico y terapéutica de esta enfermedad, es una clasificación apropiada. Además, un requisito para comprender las causas de la DM y estudiar su evolución natural es la capacidad de identificar y distinguir sus distintas variedades ubicándolas dentro de un marco etiopatológico racional. Pese a que se han postulado varios sistemas de clasificación y criterios para el diagnóstico de la DM, hasta fines de 1970, no existía una clasificación sistemática (Harris, 2003).

- En 1979 un grupo internacional, patrocinado por el National Diabetes Data Group (NDDG) de los National Institutes of Health, creó una clasificación de la DM y otras categorías de intolerancia a la glucosa basada en la investigación científica de este síndrome heterogéneo. Esta clasificación se basaba en los conocimientos actuales de la DM, sin embargo, tanto el NDDG como la OMS previeron que conforme avanzaran los conocimientos derivados de la investigación, era probable que esta

clasificación fuera revisada. En 1996 y 1997 la American Diabetes Association creó un comité de expertos que estudió los resultados de las investigación durante los últimos 20 años y propuso algunos cambios en la clasificación de la NDDG-OMS (Este sistema moderno se reseña en la Tabla 1).

**Tabla 1:** Clasificación de la Diabetes Mellitus según la NDDG-OMS

---

### **Clasificación de la diabetes mellitus**

---

**Diabetes Mellitus tipo 1:** causada por la destrucción de las células  $\beta$  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  $\beta$ , también comprende los casos en que no se conocen las causas de la destrucción de las células  $\beta$ ; representa entre el 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 la 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 casual 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  $\beta$  pancreáticas o la acción de la insulina, trastornos del páncreas exócrino, 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.

---

### **2.3 Diabetes Mellitus Tipo 1**

Anteriormente, a la diabetes mellitus tipo 1 se le denominaba diabetes mellitus insulínica y corresponde al 5-10% de los casos de DM. Es la variedad más frecuente de DM en niños y adolescentes, antes conocida como diabetes juvenil (o de inicio juvenil). En estas personas la enfermedad se caracteriza por el comienzo repentino de síntomas (poliuria, polidipsia y polifagia) la necesidad de administrar insulina exógena para conservar la vida y la tendencia a la cetosis incluso en estado basal, todo ello producido por una deficiencia absoluta de insulina (Leroith, 2003).

La diabetes de tipo 1 es consecuencia de la destrucción de las células beta, con desaparición casi completa de la secreción de insulina y deficiencia insulínica absoluta. Se distinguen dos subclases, una variedad autoinmunitaria y otra idiopática (Harris, 2003). La variedad autoinmunitaria es una enfermedad crónica, con un periodo prodrómico subclínico que se

caracteriza por destrucción autoinmunitaria de las células  $\beta$  productoras de insulina en los islotes pancreáticos. La velocidad y la magnitud de la destrucción de las células  $\beta$  son variables y en las primeras fases de la afección, los sujetos no son insulino dependientes (Eisenbarth, 2005).

La diabetes también comprende los casos en que no se conocen las causas de la destrucción de las células  $\beta$ , pero al parecer no es regida por mecanismos inmunitarios. Esta categoría comprende un grupo muy reducido de pacientes con DM1; probablemente es hereditaria pero no está ligada a los genes de histocompatibilidad. Los pacientes experimentan diversos grados de deficiencia insulínica (Reijnen y Connanon 2005).

Durante esta enfermedad, la lipólisis se encuentra favorecida por un menor transporte de glucosa a las células y un aumento relativo de glucagón en sangre, produciendo en exceso la salida de ácidos grasos de los adipocitos, parte de ellos son utilizados por otros tejidos y/o transformados a cuerpos cetónicos en el hígado, estos cuerpos cetónicos son una fuente de energía. En la forma más avanzada de la diabetes tipo 1, en donde hay una carencia casi total de insulina por la destrucción de las células  $\beta$ , el catabolismo del glucógeno, proteínas y en especial de lípidos, sobrepasa las necesidades nutricionales del organismo y ocasiona un exceso de cuerpos cetónicos, 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).

## **2.4 Diabetes mellitus tipo 2**

La diabetes mellitus de tipo 2 es la forma más frecuente de diabetes, se caracteriza por trastornos de la acción y la secreción de la insulina. Este tipo de diabetes comprende alrededor del 90% de los pacientes diabéticos (Bennet, 2003). Es un trastorno heterogéneo de etiología compleja que se desarrolla en respuesta a influencias genéticas o ambientales. Si bien se desconoce la etiología específica de esta forma de diabetes, no hay destrucción autoinmunitaria de las células  $\beta$  (Kahn *et al.*, 2005).

Las complicaciones de la DM tipo 2 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. Existe 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, 2001).

La mayoría de los pacientes con diabetes tipo 2 son obesos cuando desarrollan la enfermedad lo que agrava la resistencia a la insulina. De hecho se ha demostrado que existe alta correlación entre la obesidad de la parte superior del cuerpo (Obesidad central) y la prevalencia y frecuencia de la DM tipo 2. El depósito intraabdominal de grasa constituye el factor más importante en el riesgo de la diabetes de tipo 2. Otros son la edad, la alimentación hipercalórica, vida sedentaria y bajo peso al nacer (Bergstrom *et al.*, 1990).

Es frecuente que la diabetes tipo 2 pase desapercibida durante muchos años porque la hiperglicemia se desarrolla gradualmente y en los estadios iniciales no es lo suficientemente grave como para producir los síntomas clásicos de la enfermedad. Esta forma de diabetes se asocia a un fracaso progresivo de las células  $\beta$  conforme evoluciona la patología (Turner *et al.*, 1997).

La disminución de la insulina y el exceso relativo de glucagón produce en hígado un 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. El 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).

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 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  $\beta$  pancreáticas (LeRoith, 2003).

## **2.5 Factores de riesgo cardiovascular en la diabetes**

**Dislipidemia.** Los diabéticos pueden tener varias formas de dislipidemia. El patrón más común de consiste en hipertrigliceridemia y descenso en los valores de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL). La DM *per se* no aumenta las concentraciones de lipoproteínas de baja densidad (LDL), pero las pequeñas partículas densas de LDL que se encuentran en la DM de tipo 2 son más aterógenas porque experimentan glucosilación y oxidación con más facilidad (Rader *et al.*, 2003).

Los pacientes con diabetes tipo 2 suelen ser dislipidémicos aun cuando tengan un control satisfactorio de la glucosa. Las altas concentraciones de insulina y la resistencia a la acción de esta hormona que acompañan a la DM tipo 2 ejercen múltiples efectos en el metabolismo de las grasas:

- 1) Disminución de la actividad de la lipoprotein lipasa (LPL), con menor catabolismo de quilomicrones y de VLDL.
- 2) Aumento de la liberación de ácidos grasos libres por el tejido adiposo.
- 3) Incremento en la degradación de ácidos grasos libres por el tejido adiposo.
- 4) Mayor producción hepática de VLDL.

**Hipertensión.** La hipertensión puede acelerar otras complicaciones diabéticas, en especial la enfermedad cardiovascular y la nefropatía. La prevalencia de hipertensión en pacientes con DM tipo 2 quizá esté entre un 80 y 90%, esta cifra alta se explica parcialmente por la intervención de factores coexistentes como obesidad y vejez. 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 tempranas de la disfunción renal en la diabetes (Stern, 2003).

Se ha corroborado que la presión arterial disminuye con un control adecuado de la glucosa en pacientes diabéticos, a pesar de incrementos en el volumen plasmático. En contraste, durante la interrupción controlada del uso de insulina o fármacos secretágonos de insulina, la presión arterial aumentó (Randeree *et al.*, 1992).

## 2.6 Glucotoxicidad y lipotoxicidad

La glucotoxicidad y la lipotoxicidad son fenómenos metabólicos estrechamente relacionados con la patogénesis de la DM de tipo 2 (Durruty y García de los Rios, 2001). Se sabe que la hiperglicemia crónica también ejerce un efecto nocivo en la secreción de insulina (Robertson *et al.*, 2003), y en las acciones de dicha hormona, lo que se ha denominado toxicosis por glucosa o glucotoxicidad (Rosseti *et al.*, 1990). Por otro lado, la lipotoxicidad es el efecto adverso de un exceso de triacilglicerol (TG) sobre la función o la viabilidad de células que no son adipocitos (Lee *et al.*, 1994).

Las células  $\beta$  pancreáticas no sólo funcionan como una bomba de insulina, sino que poseen un sofisticado sistema sensor 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  $\beta$  pancreáticas, todo depende del tiempo en el que las células  $\beta$  están expuestas a las altas concentraciones de glucosa. En otras palabras, si las células  $\beta$  están sometidas a 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 situación 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 en animales y en células cultivadas, que la alta concentración de glucosa modifica la expresión del gen codificador del transportador de glucosa GLUT2 en las células  $\beta$  (Roche *et al.*, 1997).

Otro de los mecanismos propuestos es una menor actividad de la fosfolipasa C, enzima necesaria para la formación de inosítidos fosfatos, que participan en la secreción de insulina 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 (Rossetti, 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 alteraciones han dado sustento a la hipótesis de la glucotoxicidad, postulando efectos nocivos a nivel de las células  $\beta$  pancreáticas en altas concentraciones de glucosa (Roche *et al.*, 2000). En resumen, estudios in vivo en humanos y animales; en diversos sistemas de aislamiento celular, han aportado sólidas pruebas experimentales de una forma secundaria de resistencia a la insulina después de un incremento sostenido en la concentración de glucosa extracelular (Rossetti *et al.*, 2003).

Los lípidos son otro componente nutricional determinante en la regulación de la función de las células  $\beta$  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  $\beta$  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 por la acilación de determinadas proteínas que participan en el proceso excitotónico (Yajima *et al.*, 2000).

Hace más de 4 décadas que Randle y colaboradores (1963) describieron que el aumento de la oxidación de los ácidos grasos libres en músculo restringía tanto la captación como el uso de glucosa en 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. 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 incremento 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 liberación de glucosa. Como consecuencia de todo esto habría hiperglicemia e intolerancia a la glucosa (Unger y Grundy, 1997).

En las primeras fases de la obesidad inducida por la alimentación, son raras las complicaciones, lo que sugiere que las células que no son adipocitos se protegen de la esteatosis. Sin embargo, tras un periodo prolongado de obesidad durante el cual se elevan progresivamente las concentraciones de ácidos grasos libres (FFA) y de TG en el plasma, estos últimos comienzan a acumularse en los tejidos a un ritmo que sobrepasa la capacidad del sistema de homeostasis de FFA regulado por la leptina (Unger *et al.*, 1999). En ese sentido existe la certeza de que la grasa en los tejidos es un factor que contribuye a la resistencia a la insulina que a su vez antecede a la diabetes (Koyama *et al.*, 1997).

La exposición crónica de células  $\beta$  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.

## 2.7 Modelo experimental de DM2

La DM tipo 2 es una enfermedad heterogénea relacionada con susceptibilidad genética y estilo de vida, lo que dificulta el establecimiento de modelos experimentales que pudieran ayudar al entendimiento de la patogénesis y el desarrollo de nuevos tratamientos (Zhang *et al.*, 2003). Los modelos de roedores han sido de gran trascendencia para el entendimiento de dicha enfermedad, son un recurso para ampliar los conocimientos de la diabetes así como de la obesidad. Una de las aplicaciones de los modelos animales radica en el estudio de los aspectos fisiológicos del metabolismo energético y la acción de la insulina. Algunos aspectos de las enfermedades pueden reproducirse en células en cultivo, pero el conocimiento completo se obtendrá sólo en el animal vivo. Los modelos animales permiten identificar vías reguladoras y metabólicas (Reitman, 2003).

Los modelos de DM tipo 2 más utilizados son la pancreatectomía parcial y la destrucción química de las células beta del páncreas mediante el uso de fármacos como la estreptozotocina (STZ). Ambos métodos originan hipoinsulinemia, hiperglicemia y resistencia consecutiva a la insulina causada por un defecto en el transporte de la glucosa (Kahn *et al.*, 2005). La STZ ingresa a las células beta del páncreas a través del transportador GLUT 2. Una vez en el interior de las células se metaboliza vía xantina oxidasa y se libera óxido nítrico (NO), el cual es el principal responsable del efecto citotóxico de la STZ. Además del NO, se forman especies reactivas de oxígeno como peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo, todos ellos se encargan de inhibir el ciclo de Krebs y limitar la formación de adenosin trifosfato (ATP), además de contribuir a la fragmentación del DNA. Estos eventos dan como resultado la inhibición en la síntesis de insulina y su secreción y posteriormente darán lugar a la muerte celular (Szkudelski, 2001).

Se han realizado varias investigaciones utilizando la STZ para generar un modelo de diabetes tipo 2. Hemmings y Spafford (2000) trabajaron con ratas Fisher para obtener un modelo de DM 2, utilizaron diferentes dosis de STZ a distintos tiempos y tuvieron resultados óptimos con una dosis de 80 mg/Kg de peso corporal a las 36 h de vida. Con esta dosis fue como lograron inducir un modelo de diabetes mellitus tipo 2. Straczkowski *et al* (2000) utilizaron una dosis de 45 mg/kg en neonatos de 48 hrs de vida. Por otro lado, Cuman *et al* (2001) reportaron la inducción de diabetes en neonatos de ratas Wistar de 48 h de vida con una dosis de 160 mg/kg de peso. Por su parte Murali y Ramesh (2001) usaron una dosis de 70 mg/Kg en neonatos Wistar de 5 días de vida. En el caso de las ratas espontáneamente hipertensas (SHR), se reportó que con dosis de STZ de 50 mg/kg en animales de 200-250 g se generó un modelo de DM 2 (Shin *et al.*, 1995). En un estudio que realizamos (Pérez *et al.*, 2010) reportamos que con una dosis de STZ de 75 mg/Kg de peso corporal en SHR neonatos de 48 hrs de vida se generaban niveles elevados de glucosa, induciendo un modelo de DM tipo 2. En neonatos, dosis altas de STZ al parecer pueden generar

un daño casi total de células  $\beta$  pancreáticas, dependiendo de la dosis empleada; sin embargo, a esta edad los neonatos tienen la capacidad de regenerar o diferenciar células del páncreas en células  $\beta$ , de tal manera que hay recuperación parcial de dicha población celular, dando como resultado una secreción deficiente de insulina (Szkudelski, 2001).

## 2.8 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 es probablemente, el problema de salud pública más importante en los países desarrollados y sub-desarrollados. Es un enfermedad frecuente, asintomática, fácil de detectar, casi siempre sencilla de tratar y que con frecuencia tiene complicaciones letales si no recibe tratamiento (Naomi *et al.*, 2006). 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-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 cardíacos. 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.

## 2.9 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).

Otra explicación que se ha propuesto para la hipertensión sensible a la sal, es un defecto generalizado de la membrana celular, la mayor parte de los datos de esta hipótesis deriva de estudio sobre los elementos sanguíneos circulantes, especialmente de los eritrocitos, en los cuales se han descrito alteraciones del transporte de sodio a través de la membrana celular.

**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.

### 2.9.1 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 la 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 incrementará tanto el volumen de líquido intersticial como el volumen sanguíneo, este volumen mayor eleva la presión arterial (Guyton, 1987).

### 2.9.2 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, 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).

### 2.9.3 Resistencia a la insulina y diabetes.

Se ha sugerido que la resistencia a la insulina, hiperinsulinemia o ambas, son causantes del

aumento de la presión arterial en algunos hipertensos. En la actualidad esta característica se reconoce como parte del síndrome metabólico, que incluye además, obesidad, dislipidemias e hipertensión. La resistencia insulínica es frecuente en pacientes con DM tipo 2 y obesidad y estas dos enfermedades son ahora más comunes en hipertensos que en normotensos (Naomi *et al.*, 2006).

## **2.10 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 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 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).

## **2.11 Ratas espontáneamente hipertensas (SHR); modelo de hipertensión esencial**

Actualmente las SHR son consideradas como un buen modelo animal de hipertensión esencial humana y han sido ampliamente utilizadas para el estudio de enfermedades cardiovasculares. Al igual que en los seres humanos, en esta cepa de animales el desarrollo de la hipertensión es desconocida y una vez que incrementa la presión arterial esta se mantiene en aumento a través del tiempo. A juzgar por el número de publicaciones, es el modelo más estudiado de hipertensión esencial (Pinto *et al.*, 1998). La cepa SHR se obtuvo en la década de los 60s por Okamoto mediante la cría selectiva de ratas Wistar Kyoto (WKY) con presión arterial alta y por lo tanto las ratas WKY normotensas son utilizadas como controles de las SHR (Okamoto, 1963).

El aumento de la presión arterial inicia alrededor de la 6-7 semana de vida, sin embargo es hasta la 12-14 semana de edad cuando la presión sistólica alcanza valores de entre 140-200 mmHg en el adulto. A partir de esta edad (3 meses) los animales muestran un aumento constante en la presión arterial y se mantiene así hasta edades muy avanzadas. A partir de entre la 40-50 semana de edad las SHR desarrollan características de enfermedades cardiovasculares como hipertrofia del corazón y de los vasos sanguíneos (Conrad, 1995). Algunos de estos animales pueden desarrollar presiones arteriales elevadas así como muerte cerebral, este grupo se designa como SHR-SP (Stroke-Prone).

Como en el caso de la hipertensión humana, se ha considerado que el riñón es el principal sospechoso en la fisiopatología de la hipertensión arterial en SHR (Kawabe *et al.*, 1978). En ese sentido diferentes estudios han mostrado que el sistema renina-angiotensina, el óxido nítrico, así como las prostaglandinas juegan un papel importante en el desencadenamiento de dicha patología (Rettig, 1993).

## 2.12 Ácidos grasos membranales

Los lípidos forman parte de los tejidos de plantas y animales y son clasificados como esteroides, fosfolípidos, esfingomielinas, ceras y grasas (Carrero *et al.*, 2005). Los principales componentes de todas las grasas son los ácidos grasos, que pueden ser saturados, monoinsaturados y poliinsaturados. Los ácidos grasos son ácidos monocarboxílicos de cadena larga, que generalmente contienen un número par de átomos de carbono, normalmente entre 8 y 22. Esto se debe a que su síntesis biológica tiene lugar mediante la adición sucesiva de unidades de Acetil CoA. Los ácidos grasos se pueden encontrar en su forma libre (en una menor proporción), esterificados como triacilglicerol o formando parte de los fosfolípidos de las membranas celulares (Voet y Voet, 1990).

Diferentes investigaciones señalan que hay una interacción significativa entre la alteración de las membranas y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, entre ellas la diabetes y la hipertensión (Delachambre *et al.*, 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. 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, esta puede tener repercusiones en la síntesis de eicosanoides y generar alteraciones fisiológicas importantes (Vance y Vance 1985).

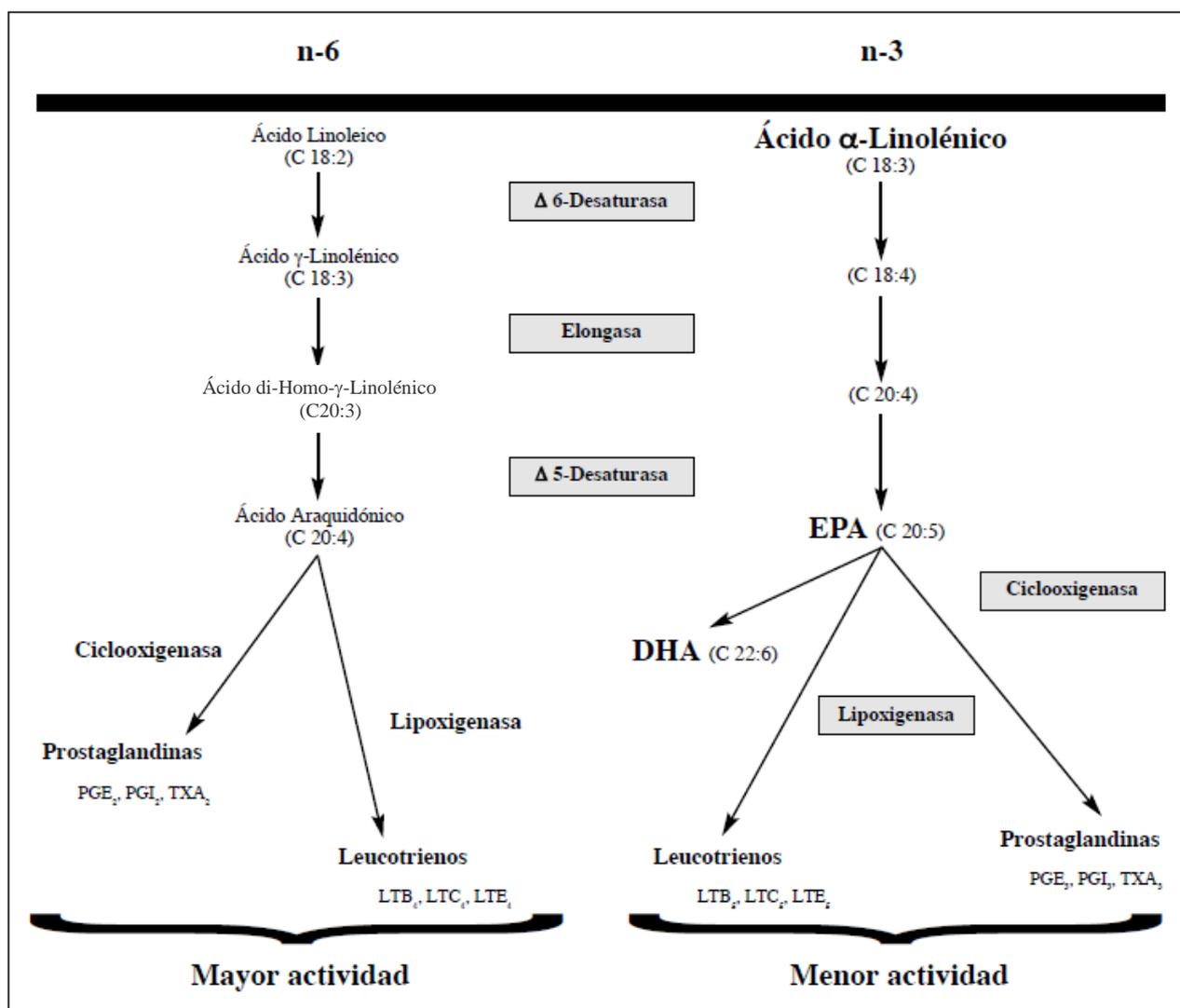
Cambios en la composición de la membrana sugieren una participación de los fosfolípidos en el desarrollo de la hipertensión, pues se ha reportado que en pacientes hipertensos se presentan anomalías en ácidos grasos y fosfolípidos de las membranas. En ese sentido, los fosfolípidos no sólo desempeñan un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

## 2.13 Ácidos grasos omega 3 y 6

Estudios epidemiológicos y nutricionales indican que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) omega 3 ( $\omega$ -3) de cadena larga, producen cambios asociados a efectos benéficos para la salud (Carrero *et al.*, 2005). El organismo humano sintetiza numerosos ácidos grasos denominados no esenciales, mientras que otros deben incorporarse al organismo a través de la dieta (Caballero *et al.*, 2006). Existen varias familias de AGPIs entre ellas: la familia de  $\omega$ -6 y la familia de  $\omega$ -3. La familia de los  $\omega$ -6 deriva del ácido linoleico mientras que la familia de los  $\omega$ -3 deriva del ácido  $\alpha$  linolénico (ALA). Ambos ácidos grasos se consideran como ácidos grasos esenciales ya que no pueden ser sintetizados por el organismo y, por tanto, deben ser aportados en la dieta (Sanders, 2000).

El ácido linoleico se metaboliza a ácido araquidónico y el ácido  $\alpha$  linolénico da lugar al ácido eicosapentaenoico (EPA) y al ácido docosahexaenoico (DHA) tal como se muestra en la figura 1. Todos ellos emplean las mismas rutas metabólicas y compiten por las mismas enzimas, elongasas y desaturasas. Los AGPIs  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, además de ser una fuente de energía, se incorporan a las membranas celulares, donde son precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), que intervienen en numerosos procesos fisiológicos (Carrero *et al.*, 2005).

Recientemente el aceite de linaza ha sido identificado como una fuente alternativa para la obtención de ácidos grasos omega-3. Entre los aceites vegetales, el aceite de linaza es considerado como la fuente más rica de ALA (57% de los ácidos grasos totales). La semilla de colza, la soja, el germen de trigo y las nueces contienen entre un 7% y 13% de ALA. Algunos autores consideran a las verduras como una buena fuente de ALA, aunque su contenido graso es bastante bajo (Rodríguez-Leyva *et al.*, 2009)



**Figura 1.** Ácidos grasos omega 3 y omega 6 y sus rutas metabólicas. Tomada de Carrero *et al.*, 2005.

La carne, particularmente la de rumiantes, y los productos lácteos también proporcionan ALA. Sin embargo, las técnicas agrícolas modernas han originado un descenso en el contenido de ácidos grasos  $\omega$ -3 de la carne debido al uso generalizado de concentrados de cereales ricos en ácidos grasos  $\omega$ -6 para alimentar al ganado (Trautwein, 2001).

El consumo de animales marinos provee una proporción más alta de grasas poliinsaturadas que la dieta occidental típica. Uno de los ácidos grasos que se encuentra mayoritariamente en los peces de agua fría es el EPA (Voet y Voet, 1990) el cual parece inhibir la formación de prostaglandinas de la serie 2, las cuales en su mayoría son potentes vasoconstrictoras y algunas estimuladoras de la agregación plaquetaria. Además el EPA disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos en plasma (Minami *et al.*, 2002).

El descubrimiento de que algunos ácidos grasos pueden actuar como ligandos de factores de transcripción indica que estos ácidos grasos no son meramente moléculas energéticas, sino que también son reguladores metabólicos. Además, el consumo de AGPIs puede ser benéfico en el control de ciertas enfermedades como la DM y la obesidad, en la que los AGPIs activan los proliferadores de peroxisomas PPARs (por sus siglas en inglés: peroxisome proliferator-activated receptor) estimulando la oxidación de lípidos y disminuyendo la resistencia a la insulina y la esteatosis hepática (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005). También se ha reportado que los ácidos grasos poliinsaturados pueden tener efectos benéficos en la hipertensión arterial de pacientes diabéticos, disminuyendo la presión arterial sistólica, diastólica y media (Nasiff-Hadad y Meriño-Ibarra, 2003).

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.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Membranas de eritrocitos

Para realizar mediciones de fluidez membranal se han utilizado diferentes células, entre ellas los eritrocitos. Las membranas de estas células han servido como un modelo para la medición de fluidez membranal, además de ser un modelo de fácil obtención. 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 (6 a 7 semanas de edad) las SHR mostraron una disminución en la deformabilidad de las membranas de los eritrocitos comparadas con las membranas 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).

En un estudio realizado en pacientes con DM tipo 2 o hipertensión y riesgo de accidente cerebro vascular, se determinó la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa y la fluidez membranal de plaquetas por fluorescencia. Utilizaron 2 fluoróforos: el trimetil amonio difenil hexatrieno (TMA-DPH) y el difenil hexatrieno (DPH). Observaron que en los pacientes diabéticos e hipertensos hubo una disminución en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa, además de un incremento en la fluorescencia del TMA-DPH lo cual refleja un decremento en fluidez membranal. Estos resultados sugieren que dichas modificaciones pueden estar involucradas en la patogénesis y el desarrollo de daño isquémico (Nanetti *et al.*, 2008).

Realizamos un estudio en donde analizamos la fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos de SHR con diabetes a diferentes edades, 1, 3 y 6 meses de edad. Para realizar las mediciones utilizamos el monitor de fluorescencia dipirenil propano (DPiP). Encontramos que durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión, disminuyó la fluidez membranal a partir del primer mes de edad, manteniéndose así hasta los 6 meses de vida. En las SHR normoglicémicas aumentó la fluidez membranal a los 3 meses de edad, sin embargo a los 6 meses de vida disminuyó. Al analizar la composición de ácidos grasos observamos que el cociente de insaturación (I/S) muestra un patrón similar al reportado por el DPiP, (Ie/Im). Concluimos que las modificaciones de la fluidez membranal reflejadas por el DPiP son derivadas principalmente, por los cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana (Perez *et al.*, 2010).

Los resultados de otro estudio en eritrocitos (Dorrance *et al.*, 2001) indican que el ácido araquidónico, ácido graso que da origen a prostaglandinas vasoconstrictoras principalmente, 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 al 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.

### **3.2 Órganos implicados en el desarrollo de diabetes e hipertensión**

Se ha mencionado que durante el desarrollo de la hipertensión algunos órganos sufren alteraciones que pueden aumentar el riesgo de muerte en quienes padecen dicha enfermedad. Por esta razón se han realizado investigaciones en riñón, hígado y corazón para determinar si en estos órganos se generan anomalías.

Se estudiaron las anomalías de fosfolípidos en corazón y riñón en SHR. Encontraron que en corazón de SHR la cardiopina y el plasmalógeno de fosfatidiletanolamina incrementaron significativamente a diferencia de las ratas WKY, pero la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina

disminuyeron en SHR. En riñón de SHR el porcentaje de fosfatidiletanolamina fue significativamente alto, mientras que la fosfatidiletanolamina plásmalógena y fosfatidilserina tuvieron un porcentaje bajo, concluyendo que la alteración en la composición de los fosfolípidos pudo contribuir al alto consumo 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 1,3 y 6 meses de edad. 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  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$ , contribuyendo a estos cambios. Se concluye que la composición de ácidos grasos poliinsaturados es modificada en diferentes tejidos en SHR con el paso del tiempo, relacionándolo con el desarrollo de la hipertensión (Delachambre *et al.*, 1998).

### **3.3 Tratamiento de la diabetes y la hipertensión: participación de los ácidos grasos poliinsaturados**

La ingesta de ácidos grasos poliinsaturados obtenidos de fuentes marinas ha demostrado reducir la incidencia de enfermedad cardiovascular (incluyendo la hipertensión), lo que refleja en parte, disminución de la agregación plaquetaria (Bonna *et al.*, 1990). Se ha sugerido que el EPA y el DHA pueden funcionar como protectores cardiovasculares, muy probablemente debido a la producción de eicosanoides con poca o nula potencia inflamatoria y ser moduladores de la agregación plaquetaria (Hirafuji *et al.*, 2003).

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 aceite de 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).

En un estudio sobre el efecto del EPA en un modelo de DM2 e hipertrigliceridemia, se observó una reducción de lípidos plasmáticos, triglicéridos hepáticos, además de mejorar la intolerancia a la glucosa. Estos datos muestran que la administración de una dieta prolongada de EPA puede ser efectiva en la prevención de la resistencia a la insulina (Minami *et al.*, 2002).

En un estudio se evaluó el efecto del ALA sobre la reactividad vascular en aorta de SHR. Al término de la dieta, la presión arterial sistólica disminuyó considerablemente a diferencia de ratas no suplementadas. Sin embargo, no hubo cambios en la respuesta vasorelajante en el endotelio. En conclusión los autores mencionan que la disminución de la presión sistólica no involucra un incremento en la sensibilidad a óxido nítrico o a un cambio en la morfología vascular de la aorta, además sugieren realizar otros estudios en los cuales se observe el efecto del ALA sobre la fluidez membranal y su posible participación en la disminución de la presión arterial (Ogawa *et al.*, 2009).

A últimas fechas se ha recomendado la ingesta de AGPIs de la familia de los  $\omega$ -3 para contrarrestar los efectos de la diabetes y la hipertensión, en específico los ácidos grasos de cadena larga como son EPA y el DHA. Sin embargo, no hay evidencias suficientes de un posible efecto benéfico del ALA sobre el desarrollo de la diabetes y la hipertensión, así como la composición de ácidos grasos de membrana. Hipotetizamos que el AL el cual contiene un porcentaje elevado de ácido alfa linolénico, tendrá efectos benéficos a diferentes niveles como son: la concentración de glucosa en sangre, la presión arterial y sobre la fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos y microsomas, pues al ser un ácido graso  $\omega$ -3 de 18 carbonos, servirá como precursor de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, como el EPA y DHA. El posible mecanismo puede ser derivado de una competencia simultánea con el ácido linoleico por las desaturasas y elongasas, disminuyendo la producción de ácidos grasos de cadena larga  $\omega$ -6 específicamente del ácido araquidónico, el cual se ha relacionado con el desarrollo de la hipertensión.

## 4. OBJETIVOS

### General

- El objetivo general de esta investigación es evaluar el efecto del aceite de linaza (mayoritariamente ácido  $\alpha$  linolénico), sobre la fluidez membranal durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión.

### Particulares

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

- Generar un modelo de diabetes tipo 2 en ratas espontáneamente hipertensas.
- Estudiar el efecto de un suplemento de aceite de linaza en SHR diabéticas, sobre la glicemia y la hipertensión.
- Estudiar el efecto de un suplemento del aceite de linaza (mayoritariamente ácido alfa linolénico) en SHR (control) sobre la glicemia y la hipertensión.
- Determinar la composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos y el efecto del aceite de linaza en el cociente de insaturación.
- Estudiar con el monitor fluorescente dipirenilpropano, la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos de ratas suplementadas y no suplementadas con aceite de linaza.
- Estudiar el efecto del aceite de linaza sobre la composición de ácidos grasos de hígado y riñón de SHR diabéticas y controles. Analizar el cociente de insaturación.
- Obtener microsomas de hígado y de riñón para hacer mediciones de la fluidez de esas membranas.
- Determinar la composición de ácidos grasos de microsomas de hígado y riñón de SHR

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos y solventes utilizados en este trabajo fueron grado reactivo y se adquirieron de J.T Baker, Merck y Sigma. Los reactivos para la cromatografía de gases fueron grado HPLC de la marca J.T. Baker. Los estándares de metil ésteres se adquirieron de Sigma-Aldrich con una pureza mínima del 98%.

Las cápsulas de aceite de linaza Flax seed oil que contienen al ácido  $\alpha$  linolénico fueron obtenidas de las tiendas de suplementos alimenticios General Nutrition Center (GNC) y se analizaron mediante cromatografía de gases para saber su composición exacta de ácidos grasos.

Se utilizaron ratas espontáneamente hipertensas (SHR), las cuales se mantuvieron en condiciones de bioterio (aprox. 22°C, 12h luz, 12h oscuridad). Se generó un modelo de diabetes tipo 2 en neonatos de 48 hrs de vida mediante inyección intraperitoneal con una dosis única de estreptozotocina (STZ) de 75 mg/kg de peso corporal en amortiguador de citratos pH 4.5. A las SHR control sólo se les inyectó amortiguador de citratos. Las ratas se destetaron a las 4 semanas de edad y cada grupo se dividió en dos, a uno de ellos se le dio aceite de linaza como suplemento 5 días por semana (125 mg de aceite de linaza/kg de peso corporal) y al otro no. De esta manera quedaron finalmente cuatro grupos de animales: A) SHR control; B) SHR con suplemento de aceite de linaza; C) SHR con STZ; y D) SHR con STZ y suplemento de aceite de linaza.

Se hizo un seguimiento semanal de la glucosa sanguínea mediante tiras reactivas en un glucómetro de la marca AccuChek®. Asimismo, se midió la presión arterial por método pletismográfico (pletismógrafo marca Letica) midiendo semanalmente la presión sistólica en la cola de las ratas. El sacrificio de al menos 4 animales para la toma de muestras se realizó a diferentes edades (1, 3 y 6 meses) con la intención de observar qué ocurre antes, durante y después del establecimiento de la hipertensión, ya que esta cepa de ratas se caracteriza por desarrollar la hipertensión a los 3 meses de edad.

Para la toma de muestras, las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital a una dosis de 40 mg/kg de peso, en ese momento se aisló el hígado y el riñón, toda la sangre se extrajo por punción cardiaca, para ello se utilizó agujas vacutainer, la sangre se depositó en tubos de 5 ml con EDTA para la obtención de los fantasmas de eritrocitos. Para la obtención de suero la sangre se depositó en tubos de química sanguínea de 10 ml, se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga marca Hermle Z383 K y un rotor Hermle 220.78. El suero obtenido se depositó en tubos eppendorf y se congeló a -70°C para su uso posterior en las cuantificaciones de colesterol, triglicéridos y proteína.

## 5.1 Química sanguínea

**Colesterol en suero:** Para determinar la concentración de colesterol total en suero se utilizó un kit enzimático de cuantificación de colesterol marca SpinReact. Se desarrolló una curva con estándar de colesterol en el intervalo de 0 a 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Se tomó, por duplicado, 10  $\mu\text{l}$  de suero y se adicionó 1 ml del reactivo para determinación de colesterol de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se permitió el desarrollo de color por incubación a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se determinó la absorbancia, tanto de la curva como de las muestras, a una longitud de onda de 505 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro de Amersham Biosciences.

La cuantificación de colesterol por esta técnica es posible debido a una colesterol esterasa que libera el colesterol de ácidos grasos esterificados y luego actúa una colesterol oxidasa que produce 4-colestenona +  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La reacción de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , junto con fenol + 4-aminofenazona, es catalizada por una peroxidasa que da lugar a un compuesto colorido.

**Triglicéridos en suero:** Para determinar la concentración de triacilgliceroles en suero se utilizó un kit de cuantificación de triglicéridos marca SpinReact. Se desarrolló una curva con estándar de triglicéridos en el intervalo de 0 a 20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ . Se tomó, por duplicado, 10  $\mu\text{l}$  de suero y se adicionó 1 ml del reactivo para determinación de triglicéridos de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se permitió el desarrollo de color por incubación a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se determinó la absorbancia, tanto de la curva como de las muestras, a una longitud de onda de 505 nm en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro de Amersham Biosciences.

La cuantificación de triglicéridos mediante 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 gliceraldehído 3 fosfato e hidroxiacetona fosfato a partir del glicerol de los triglicéridos.

**Proteína en suero:** La proteína se cuantificó por el método de Bradford (1976). Para ello se realizó la curva de proteína con albúmina (1 mg/ml) y agua bidestilada. Se tomaron 2  $\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{l}$ , 6  $\mu\text{l}$ , 8  $\mu\text{l}$ , y 10  $\mu\text{l}$  de albúmina respectivamente completando un volumen de 200  $\mu\text{l}$  con agua bidestilada. A continuación se les agregó 1 ml de reactivo de Bradford a la curva de albúmina y a las muestras. Finalmente, se midió la absorbancia de las muestras a 595 nm para determinar la concentración de proteína.

## 5.2 Fantasmas de eritrocitos

La obtención de los fantasmas de eritrocitos se realizó por la técnica descrita por Quinn y colaboradores (2005). Dicha técnica la desarrollamos de la siguiente forma: la sangre se obtuvo por punción cardiaca depositándola en tubos de 5 ml con solución de EDTA los cuales se agitaron suavemente para evitar la formación de coágulos. Se tomaron 3 ml de sangre y fueron vertidos en tubos de polipropileno de 40 ml para centrifuga. Después se adicionó a cada tubo 15 ml de solución isotónica de fosfatos y se realizaron 3 lavados de diez minutos en una centrifuga marca Hermle Z383 K a 3500 r.p.m. en un rotor Hermle 220.78 con la finalidad de obtener el paquete celular. Como paso siguiente a los lavados con la solución isotónica se obtuvieron los fantasmas de eritrocitos, para los tubos con los 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 utilizando el rotor SS-34. Una vez obtenidos los fantasmas de eritrocitos se almacenaron en tubos Eppendorf y se conservaron en refrigeración para su uso ulterior en la medición de fluidez y determinación de ácidos grasos.

## 5.3 Cuantificación de fosfolípidos en membranas de eritrocitos por fósforo inorgánico

Para estimar la cantidad de fosfolípidos contenidos en las membranas de los fantasmas de eritrocitos se procedió a la determinación de fósforo por el método de Bartlett (1959) como se describe a continuación: se tomaron 20  $\mu$ l de fantasmas de eritrocitos y se depositaron en tubos de ensayo. Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se agregaron 0.5 ml de  $H_2SO_4$  10 N por tubo con membranas. En cada experimento también se incluyeron blancos de mineralización (solamente  $H_2SO_4$ ). Se calentaron los tubos a 150-160  $^{\circ}C$  durante 4 horas. Se quitaron de la parrilla y una vez que estuvieron a la temperatura ambiente, se adicionaron 100  $\mu$ l de  $H_2O_2$  (30%). Posteriormente se continuó el calentamiento por otras 2 horas a la misma temperatura. A continuación se dejaron enfriar y se adicionaron 4.4 ml de  $H_2O$  + 0.2 ml de heptamolibdato de amonio al 5% + 0.2 ml del reactivo de Fiske-Subbarow. Entre el agregado de un reactivo y otro, se agitó vigorosamente. El reactivo de Fiske-Subbarow se preparó por la adición de 500 mg de ácido 1-amino 2-naftol 4-sulfónico a 200 ml de una solución de bisulfito de sodio anhidro al 15% ( $NaHSO_3$ ) bajo agitación mecánica, seguido por la adición de 1 g de sulfito de sodio anhidro ( $NaSO_3$ ). La solución se filtró y almacenó en frasco color ámbar a temperatura ambiente. Este reactivo se preparó cada semana. Para desarrollar el color, las muestras se calentaron en baño de agua hirviendo durante 7 minutos. Se enfriaron y se leyeron en un espectrofotómetro Ultrospec 3300 pro de Amersham Biosciences a 830 nm. Paralelamente al desarrollo de color en las muestras de membranas, se realizó una curva estándar con  $KH_2PO_4$  en el intervalo de 0 a 4  $\mu$ g de

fósforo con incrementos de 0.5  $\mu\text{g}$ . Los fosfolípidos de las membranas se cuantificaron a partir del contenido de fósforo.

#### **5.4 Incorporación del dipirenil propano (DPiP) a fantasmas de eritrocitos**

De las muestras de fantasmas de eritrocitos se tomó el volumen necesario y se depositaron en tubos eppendorf. A partir de una solución de DPiP 89  $\mu\text{M}$  en etanol se inyectaron 5  $\mu\text{l}$  del monitor fluorescente a las membranas, al mismo tiempo se mantenía en agitación con vortex, todo lo anterior se realizó en condiciones de poca luz, además las muestras se mantuvieron en hielo. Luego de adicionar el DPiP las membranas fueron sonicadas en baño a temperatura ambiente durante 1 minuto. Una vez inyectado el DPiP las muestras se mantuvieron en incubación en cuarto frío con agitación constante durante 24 horas para asegurar la incorporación del monitor fluorescente. Al día siguiente nuevamente se sonicaron las muestras en baño durante 1 minuto y se resuspendieron en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a un volumen final de 3 ml. La concentración final del DPiP fue de 0.15  $\mu\text{M}$ . Finalmente la relación molar mínima de fosfolípidos a DPiP fue de 2500:1

#### **5.5 Medición de fluorescencia del DPiP en fantasmas de eritrocitos**

Se utilizó un volumen de 3 ml de fantasmas de eritrocitos con el DPiP y 3 ml de fantasmas de eritrocitos sin DPiP (control) y se depositaron 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 379 nm y para excímero de 480 nm mientras que la longitud de excitación fue de 329 nm y fueron leídas utilizando el programa ratio data collection.

#### **5.6 Extracción y transesterificación de lípidos de fantasmas de eritrocitos**

Los lípidos de los fantasmas de eritrocitos fueron extraídos de acuerdo al procedimiento utilizado por Bligh y Dyer (1959) y Ames (1968) como se describe en Pérez-Hernández y colaboradores (2010). El procedimiento se describe a continuación: se tomaron alrededor de 300  $\mu\text{l}$  de los fantasmas de eritrocitos y se depositaron en un homogenizador, se adicionó una mezcla de metanol-cloroformo-agua (2:1:0.8 relación volumen) y se homogenizó por dos minutos. Cabe mencionar que el volumen de agua se tomó como el volumen procedente de los fantasmas.

Después de la adición de la mezcla de solventes a las muestras, mantenidas en hielo, se adicionó un volumen de cloroformo y uno de agua y se volvió a homogenizar brevemente. Después el homogenado obtenido se centrifugó a 2500 r.p.m a 8°C durante 5 minutos en una centrífuga marca Hermle Z383 K en un rotor Hermle 220.78 y se obtuvo un sistema de dos fases. Se eliminó la fase acuosa y se colectó la fase orgánica (clorofórmica). Después se evaporó el solvente bajo una corriente de nitrógeno. Una vez extraídos los lípidos, se realizó la transesterificación de los ácidos grasos, para obtener los metil ésteres correspondientes, utilizando trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) al 14% en metanol siguiendo el método descrito por Morrison y Smith (1964), como se describe más adelante. El análisis de la composición de ácidos, se realizó con un cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin-Elmer controlado por computadora.

### **5.7 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-Elvehjem 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. Los lípidos se depositaron en viales y se conservaron en congelación (-2 °C) hasta su uso ulterior.

### **5.8 Metilación de ácidos grasos de hígado y riñón 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<sub>3</sub>) 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 entre 50-200 µg de lípidos a sequedad bajo una corriente de gas nitrógeno.

Después de la adición de 0.5 ml del reactivo de trifluoruro de boro (BF<sub>3</sub>) al 14% en metanol, se le puso una atmósfera de nitrógeno y se cerró el vial con una tapa de rosca y disco inerte de silicón con cubierta de teflón. Se calentó por 30 min a aproximadamente 92 °C en baño de agua. La muestra se enfrió a temperatura ambiente, el vial se abrió y se añadieron dos volúmenes de hexano y un volumen de agua, después se agitó vigorosamente y se formó un sistema de dos fases, los metil ésteres se extrajeron de la fase orgánica. Se evaporó el hexano bajo una corriente

de nitrógeno y los metil ésteres de los ácidos grasos se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  y protegidos de la luz hasta su posterior análisis por cromatografía de gases.

### **5.9 Análisis de los ácidos grasos de órganos de SHR por cromatografía de gases**

Los ácidos grasos transesterificados se resuspendieron en n-hexano grado HPLC. 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.

### **5.10 Microsomas de hígado y riñón**

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

### **5.11 Extracción de ácidos grasos de microsomas y análisis por cromatografía de gases**

Los lípidos de los microsomas fueron extraídos de acuerdo al procedimiento utilizado por Bligh y Dyer (1959) y Ames (1968). Se tomaron alrededor de 500  $\mu\text{l}$  de los microsomas y se depositaron en un homogenizador, se adicionó una mezcla de metanol-cloroformo-agua (2:1:0.8 relación volumen) y se homogenizó por dos minutos. Después de la adición de la mezcla de solventes a las muestras, mantenidas en hielo, se adicionó un volumen de cloroformo y uno de

agua y se volvió a homogenizar brevemente. Después el homogenado obtenido se centrifugó a 2500 r.p.m a 8°C durante 10 minutos en una centrífuga marca Hermle Z383 K en un rotor Hermle 220.78 y se obtuvo un sistema de dos fases. Se eliminó la fase acuosa y se colectó la clorofórmica. Después se evaporó el solvente bajo una corriente de nitrógeno. Una vez extraídos los lípidos, se realizó la transesterificación de los ácidos grasos, para obtener los metil ésteres correspondientes, utilizando BF<sub>3</sub> al 14% en metanol siguiendo el método descrito por Morrison y Smith (1964). El análisis de la composición de ácidos, se realizó con un cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin-Elmer controlado por computadora.

### **5.12 Análisis estadístico**

Los resultados se analizaron mediante la prueba de anova simple seguida de una prueba de Fisher con una **P < 0.05**.

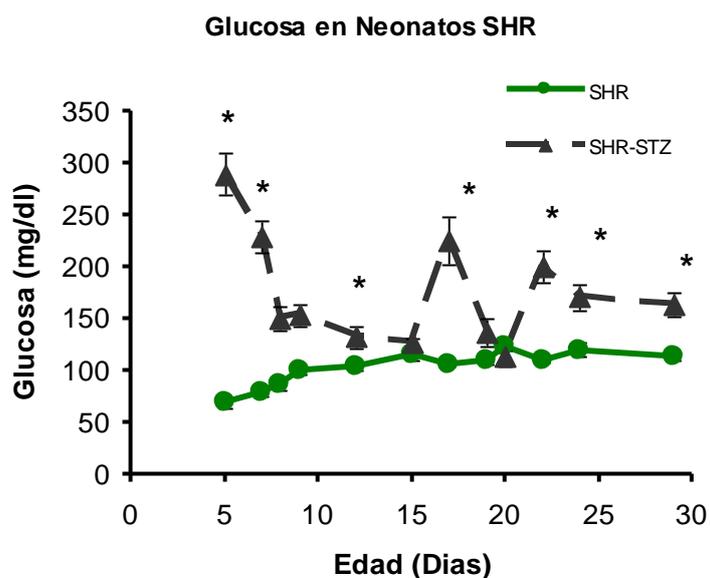
## 6. RESULTADOS

### 6.1 Glucosa y peso en SHR lactantes

#### 6.1.1 Glucosa

Para el desarrollo del modelo de diabetes experimental en SHR se utilizó una dosis única de estreptozotocina (STZ) de 75 mg/Kg de peso corporal. Esta dosis de STZ desarrolló concentraciones elevadas de glucosa en sangre (150-300 mg/dl) que se asemejan a un modelo de DM2. Se incluyó también un grupo de animales inyectados sólo con el amortiguador de citratos (grupo control).

Se puede ver en la figura 2 que en ratas inyectadas con el amortiguador de citratos (grupo control) se presentaron concentraciones de glucosa promedio de 100 mg/dl manteniéndose así hasta los 30 días. Al quinto día de vida las ratas mostraron 80 mg/dl en su concentración de glucosa, a los 15 días de nacidas la glicemia fue de 110 mg/dl. A partir de ese día hubo un ligero aumento mostrando una concentración de 123 mg/dl al día 20 y finalmente a los 30 días de vida se la glucosa fue de 114 mg/dl. En promedio, la glicemia osciló alrededor de los 100 mg/dl. Caso contrario a las SHR control, los animales inyectados con STZ mostraron un incremento considerable durante esos días en que las SHR mostraron una glicemia normal. Los niveles de glucosa en las SHR control eran predecibles ya que al ser inyectadas únicamente con el amortiguador de citratos, no se generó ningún daño en las células  $\beta$  pancreáticas y por esta razón la glicemia es constante.



**Fig. 2** Comparación de la concentración de glucosa en los grupos de ratas. SHR control y SHR inyectadas con STZ (SHR-STZ). n = 6 \*(P <0.05)

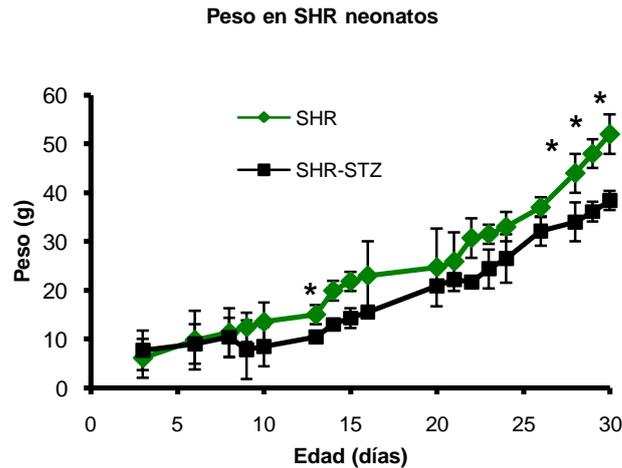
Por otro lado, en la figura 2 se observa que en ratas inyectadas con STZ, se logró establecer la hiperglicemia. Durante el primer mes de vida los niveles de glucosa oscilaron entre 130 y 300 mg/dl. La gráfica muestra que a los 4 días de vida (2 días después de la inducción), la glucosa sanguínea se elevó hasta 300 mg/dl. Posteriormente a los 14 días las ratas muestran una disminución en su glicemia (150 mg/dl). Sin embargo días después la glicemia aumentó nuevamente hasta 225 mg/dl manteniéndose así hasta los 30 días de vida (163 mg/dl).

De los resultados mostrados en la Fig. 2 podemos decir que posiblemente la STZ generó un daño parcial de las células  $\beta$  pancreáticas de las SHR-STZ, posteriormente hubo una regeneración de estas células tal como lo menciona Szkudelzki (2001). Por esa razón los animales mostraron un ligero control en la concentración de glucosa sanguínea, aunque sólo por un corto periodo de tiempo, esto también refleja que la inyección de STZ (75 mg/kg de peso) generó niveles de glucosa similares a los que se presentan durante DM2 en humanos no controlados, por ello este modelo puede ser confiable para observar los efectos de la hiperglicemia en un modelo de DM2. Estos datos apuntan a que desde la lactancia los animales inducidos tienen una concentración de glucosa elevada y consecuentemente una cinética diferente en lo que respecta a la glicemia.

### **6.1.2 Peso corporal**

En la figura 2 se observa que en las SHR-STZ, se generó un descontrol de la glicemia. Con el propósito de observar si la hiperglicemia tiene un efecto sobre el crecimiento de los animales, se registró el peso corporal y se determinó una posible alteración en el crecimiento de los animales reflejado en su peso corporal.

En los dos grupos de animales (Fig. 3) el peso corporal cambia al discurrir los días lo cual refleja el crecimiento de los animales. Sin embargo, en las SHR con hiperglicemia el peso se ve mermado con respecto al control, es decir, hay un rezago en la ganancia de peso, esto posiblemente como consecuencia de la hiperglicemia que presentaron las SHR-STZ.



**Fig 3.** Comparación del peso en los grupos de SHR lactantes. n = 12 \*(P <0.05)

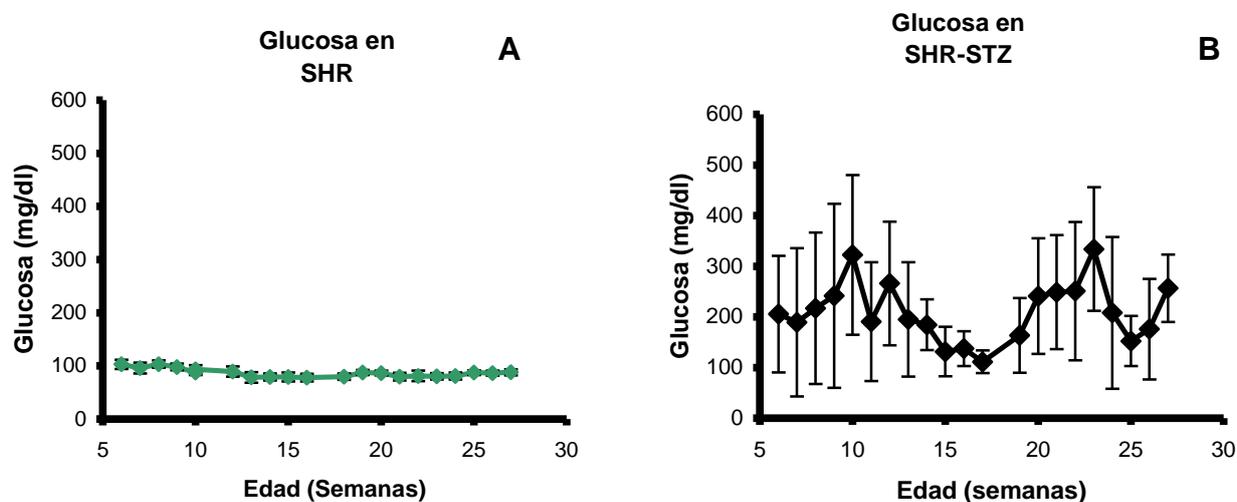
En la figura 3 se ve claramente la diferencia entre grupos. A los 15 días de nacidas, las ratas normoglicémicas alcanzaron un peso corporal promedio de 21.8 g mientras que en las ratas hiperglicémicas el peso promedio fue de 14.3 g (34.4% menor). Estos resultados podrían demostrar que la hiperglicemia generó una menor ganancia de peso corporal alterando el crecimiento de los animales. Se puede ver que al mes de edad las SHR control llegaron a un peso promedio de 52 g, mientras que las SHR hiperglicémicas alcanzaron un peso promedio de 38.4 g (26% menor que el control). Los resultados del peso corporal reflejan que en los primeros 10 días de vida los animales inducidos tuvieron una ganancia de peso similar al grupo control, sin embargo días después la hiperglicemia generó un rezago en el crecimiento de los animales, reflejada en el peso corporal.

## 6.2 Glucosa en SHR después del destete

En la figura 4A se puede observar que después del destete, las SHR control mantuvieron constantes sus valores de glucosa, sin mostrar grandes desviaciones. Los valores de glicemia oscilaron en promedio entre 80 y 100 mg/dl durante los 6 meses de edad.

En lo que respecta a las ratas diabéticas, se puede observar en la figura 4B que el descontrol de la concentración de glucosa continuó después del destete, mostrando una hiperglicemia similar a la observada en la Fig. 1B. A las 10 semanas de vida las SHR diabéticas superaron los 300 mg/dl de glucosa sanguínea en promedio, a las 15 semanas disminuyó, llegando a 125 mg/dl, sin embargo 3 semanas después la glucosa aumentó nuevamente a 163.5 mg/dl. Estos valores muestran grandes variaciones teniendo un patrón muy similar a la diabetes tipo 2 en

humanos no controlados, en donde se observa oscilación en la concentración de glucosa sanguínea.



**Fig. 4.** Registro de la glucosa después del destete hasta las 27 semanas de experimentación. **A)** Ratas control. **B)** Ratas SHR diabéticas inducidas con STZ 75 mg/Kg de peso. n = 6.

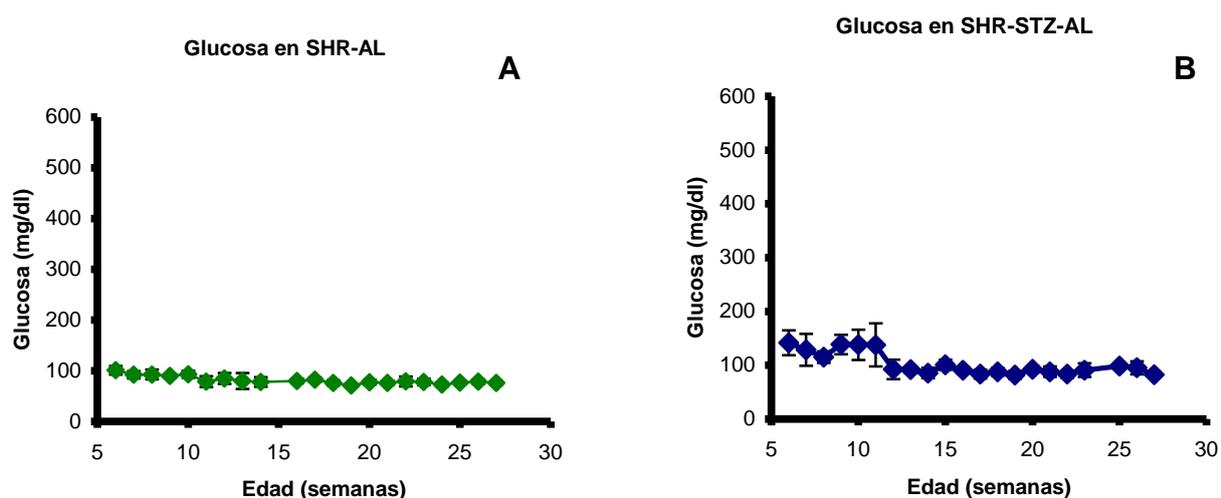
Los resultados de la gráfica 4B sugieren que la STZ posiblemente dañó parcialmente las células  $\beta$  pancreáticas y en consecuencia la insulina secretada por las células  $\beta$  restantes fuera insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo, esto afectó severamente el metabolismo de los carbohidratos y consecuentemente la hiperglicemia se mantuvo a lo largo del tiempo. Por lo anterior, podemos ver que con una dosis de STZ (75 mg/kg peso) se generó un modelo experimental de DM2 en SHR, sin llegar a una hiperglicemia extrema como ocurre en DM1 cuando no se administra insulina.

### 6.2.1 Suplemento de aceite de linaza y su efecto sobre la glicemia

Durante los últimos años se ha sugerido que la ingesta de suplementos alimenticios ricos en  $\omega$ -3 puede prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, entre las que se encuentra la diabetes y la hipertensión. En ese sentido algunos estudios han demostrado que el EPA y el DHA, provenientes del aceite de salmón, tienen efectos benéficos en la prevención y control de la diabetes y la hipertensión (Minami *et al.*, 2002). Sin embargo, no existen estudios suficientes que demuestren el efecto del AL rico en ALA y precursor de EPA y DHA, sobre el desarrollo de estas patologías en conjunto. Con el fin de contrarrestar los efectos de la hiperglicemia se administró un suplemento de AL a ratas inyectadas con STZ de 1 mes de edad.

En la figura 5A se muestra la cinética de la glicemia en SHR control suplementadas con el AL. La glucosa se mantuvo en niveles inferiores a 100 mg/dl a partir del destete y continuó así hasta los 6 meses de edad. Estas ratas *per se* mantuvieron sus niveles de glucosa basales ya que no sufrieron ningún daño en sus células  $\beta$  pancreáticas y el AL no tuvo alguna participación relevante en el control de la glucosa.

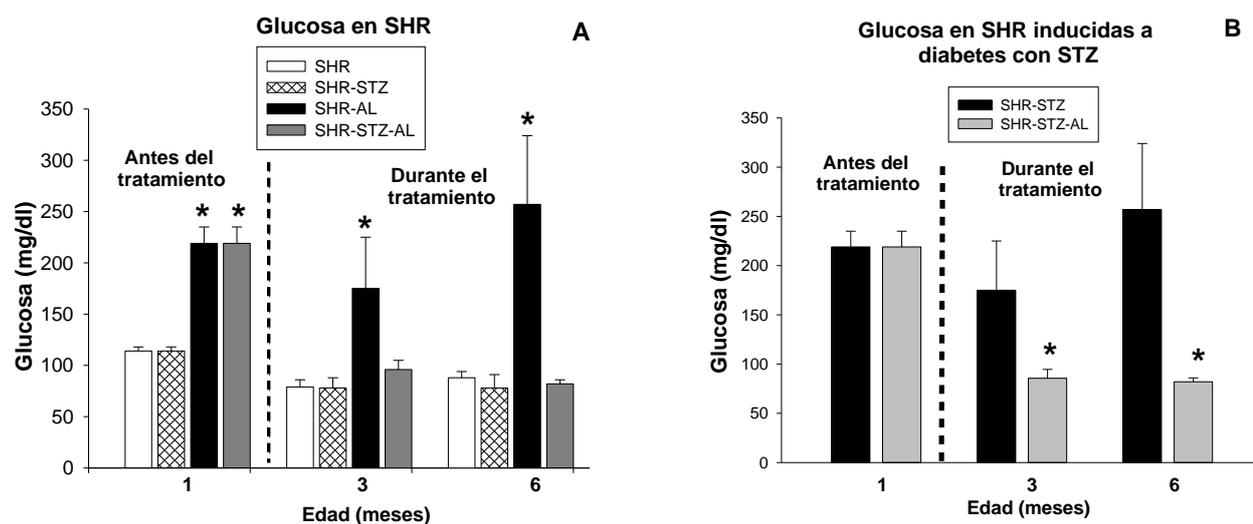
Respecto a las SHR con STZ y suplementadas con AL, es importante recordar que el AL se administró a partir del destete, 5 días a la semana. La Fig. 5B muestra que al inicio del tratamiento las SHR-STZ-AL tuvieron un ligero incremento en su glicemia (138 mg/dl), sin embargo, a la semana 12 de vida, la concentración de glucosa sanguínea disminuyó a 92 mg/dl y continuó disminuyendo en los días siguientes llegando a 82 mg/dl en la semana 19. Estos niveles no mostraron oscilaciones durante el tratamiento con el AL a partir de la 12<sup>a</sup> semana, lo cual muestra un control de la glicemia, debido al efecto del AL.



**Fig. 5** Seguimiento de la glucosa en SHR suplementadas con aceite de linaza (omega-3) **A)** Ratas control. **B)** Ratas SHR inducidas con 75 mg/Kg de STZ. n=6

En la figura 6A se muestran las concentraciones de glucosa sanguínea de los cuatro grupos de SHR a tres diferentes edades, 1, 3 y 6 meses. Las SHR-STZ tuvieron hiperglicemia durante todo el estudio (1,3 y 6 meses). En el caso de las SHR-STZ-AL vemos que al primer mes de edad presentaron una concentración elevada de glucosa (219 mg/dl), sin embargo a los 3 meses la glicemia fue de 96 mg/dl y a los 6 meses de edad llegaron a 82 mg/dl de glucosa, este valor es menor al de las SHR normoglicémicas las cuales presentaron una concentración de glucosa de 88 mg/dl. En el caso de las SHR-AL la concentración de glucosa fue de 78 mg/dl. Este grupo fue el que presentó la glicemia más baja.

En la figura 6B se muestran los dos grupos de ratas inducidas a diabetes con STZ. Como se mencionó, el grupo SHR-STZ-AL recibió el suplemento de AL, a los 3 meses de edad se observa el control de la glicemia, (96 mg/dl) y a partir de ese momento la glucosa mostró una concentración inferior a los 100 mg/dl hasta la edad de 6 meses.



**Fig 6 A)** Glucosa en los cuatro grupos de SHR a 1, 3 y 6 meses de edad. **B)** Comportamiento de la glucosa en SHR inducidas con STZ sin AL y con AL. n = 6. \*(P < 0.05).

### 6.3 Presión arterial en los grupos de SHR a diferentes edades

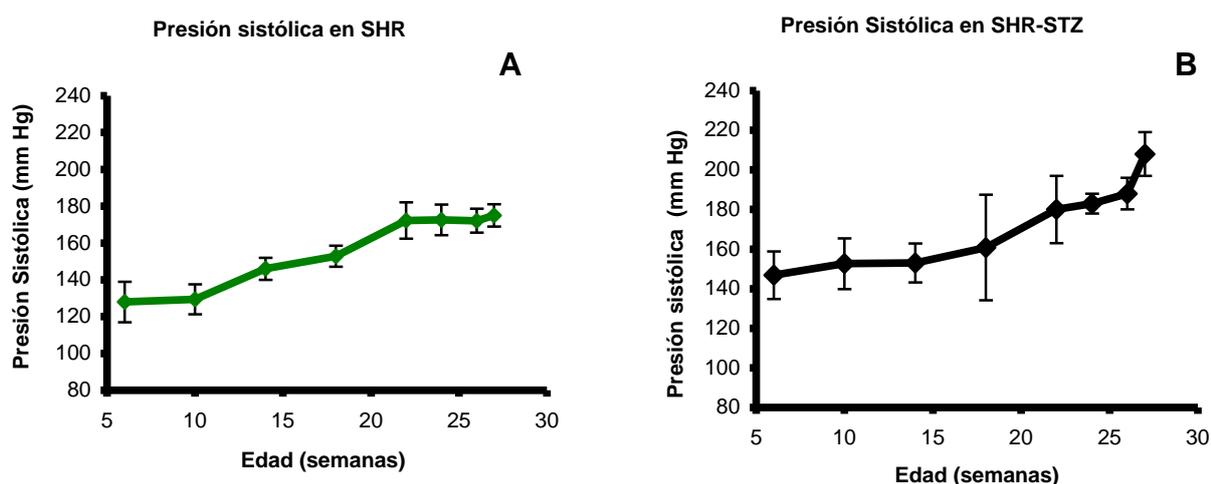
Para este estudio se utilizó como modelo de experimentación a las SHR, que se caracterizan por ser un modelo de hipertensión esencial. En la figura 7A se observa que en las SHR control la presión sistólica alcanzó los 146 mm Hg a las 14 semanas de vida, podemos decir que a esta edad se estableció la hipertensión. Estos resultados coinciden con diversos estudios realizados, los cuales han documentado que a esta edad la hipertensión se establece y a partir de ese momento sus valores de presión sistólica incrementan, lo cual también se observa en este estudio en donde las SHR control tienen un aumento en su presión sistólica a las 14 semanas de edad manteniendo esta presión hasta las 27 semanas de experimentación donde presentó una presión sistólica de 176 mm Hg.

En el caso de las SHR diabéticas (SHR-STZ) el desarrollo de la hipertensión se aceleró, estableciéndose a las 7 semanas de vida y, a diferencia de las SHR control, presentaron valores de presión sistólica que incrementaron severamente durante las siguientes semanas.

En la figura 7B se puede observar que la presión sistólica fue de 146 mm Hg, ligeramente superior a los 140 mm Hg, valor referido como límite superior de la presión sistólica normal. Por esta razón, se puede decir que en las SHR-STZ la hipertensión se estableció a partir de la 7ª semana de edad.

El valor de presión sistólica que presentaron las SHR-STZ a las 7 semanas de edad (146 mm Hg) coincide con una concentración alta de glucosa en sangre durante esa semana y días anteriores (Figura 4B), en donde los valores oscilaron entre 200 y 350 mg/dl. Posiblemente este descontrol de la glicemia contribuyó a que la hipertensión se estableciera en menor tiempo.

La hiperglicemia probablemente generó alteraciones en órganos blanco que regulan la presión arterial, como el riñón, y como consecuencia la hipertensión arterial se estableció en un periodo corto de tiempo, tal como se observa en la figura 7B.

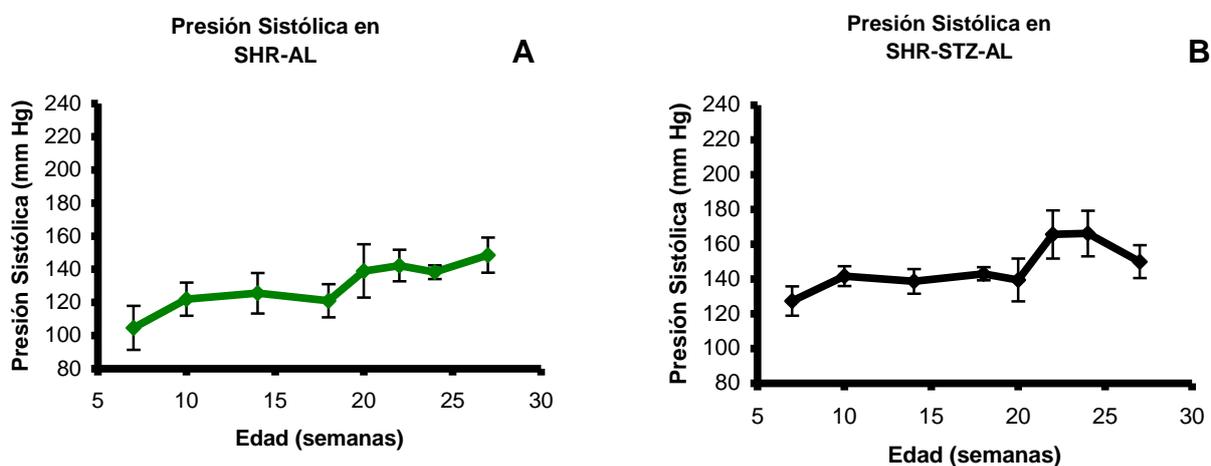


**Fig. 7** Seguimiento de la presión arterial durante las 27 semanas **A)** SHR Control **B)** SHR-STZ. n= 6.

### 6.3.1 Suplemento de aceite de linaza y su efecto sobre la presión arterial

En la figura 8A se muestran los valores de presión arterial en SHR suplementadas con AL. Cabe mencionar que a estas ratas se les administró el suplemento AL a partir del destete (1 mes de vida). A las 14 semanas de edad las SHR-AL presentaron un valor de 126 mm Hg en su presión sistólica, es importante mencionar que para esta cepa de animales se ha reportado que la hipertensión se establece a partir de las 14 semanas de edad; sin embargo en las ratas suplementadas con AL se presentó una presión arterial inferior a los 140 mm Hg, por lo que aún no se ha establecido dicha patología en este grupo de animales. De la semana 15 y hasta la 19 de edad, la presión sistólica osciló entre los 120 y 126 mm Hg, lo cual muestra un control de la presión

arterial y que posiblemente el AL contribuyó de manera eficiente en controlar y retrasar la aparición de la hipertensión. Se ve que a la semana 22 la presión sistólica fue de 142 mm Hg, estableciéndose finalmente la hipertensión. En resumen, el suplemento de AL retrasó el desarrollo de la hipertensión por un promedio de 8 semanas en las SHR.

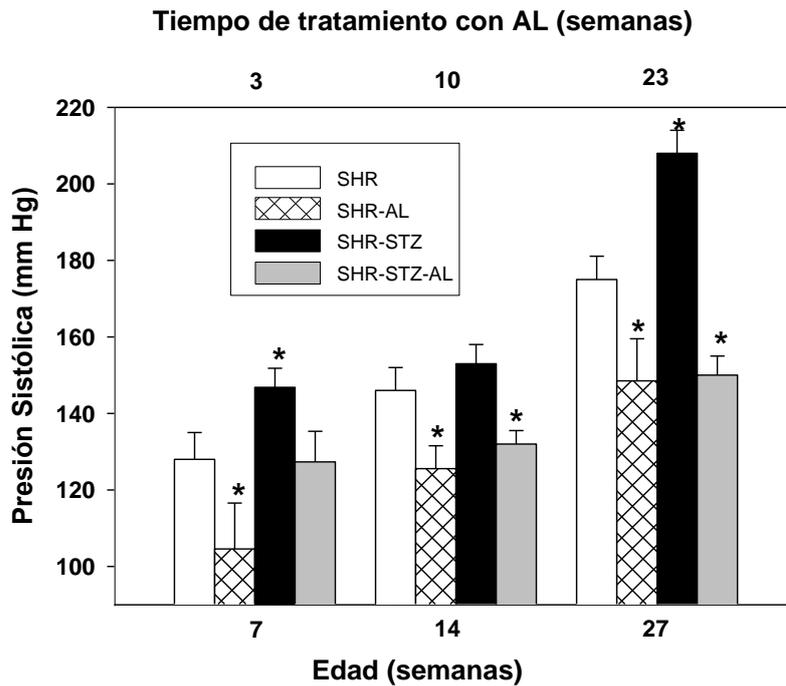


**Fig. 8** Seguimiento de la presión arterial durante las 27 semanas a SHR suplementadas con aceite de linaza **A)** SHR-AL **B)** SHR-STZ-AL. n = 6

En lo que respecta a la presión arterial de las SHR inyectadas con STZ y suplementadas con el AL (SHR-STZ-AL), la presión arterial se controló durante 20 semanas de edad. En la Fig 8B se observa que la presión sistólica de las SHR-STZ-AL fue inferior a los 140 mm Hg y se mantuvieron constantes hasta las 20 semanas de vida. A la edad de 7 semanas se registró una presión sistólica de 127 mm Hg, por lo tanto, en las SHR-STZ-AL aún no se ha establecido la hipertensión. A la semana 22 se muestra un incremento considerable de la presión arterial (166 mm Hg), no obstante, a la edad de 27 semanas la presión sistólica disminuyó nuevamente a un valor de 150 mmHg. Sin embargo, se considera que con la presión sistólica que se registró a la semana 27 en estos animales, la hipertensión se ha establecido.

En la Fig. 9 se observa la presión arterial de los 4 grupos de SHR a diferentes edades (7, 14 y 27 semanas de edad) y el tiempo de tratamiento (semanas de tratamiento). En esta gráfica se puede apreciar el aumento en la presión sistólica en las SHR-STZ a partir de la 7ª semana de edad y hasta las 27 semanas. Por otro lado se observa un control de la presión sistólica en las SHR-AL y SHR-STZ-AL desde la séptima semana de edad, manteniéndose así hasta las 14 semanas de edad. Posteriormente se ve un ligero aumento en la presión sistólica a las 27 semanas de edad en las SHR-AL y SHR-STZ-AL (149 mmHg y 150 mmHg respectivamente).

## Presión Arterial en grupos de SHR



**Fig. 9** Comparativo de la presión arterial a diferentes meses de edad y meses de tratamiento en los 4 grupos de SHR. n=6 \*(P <0.05).

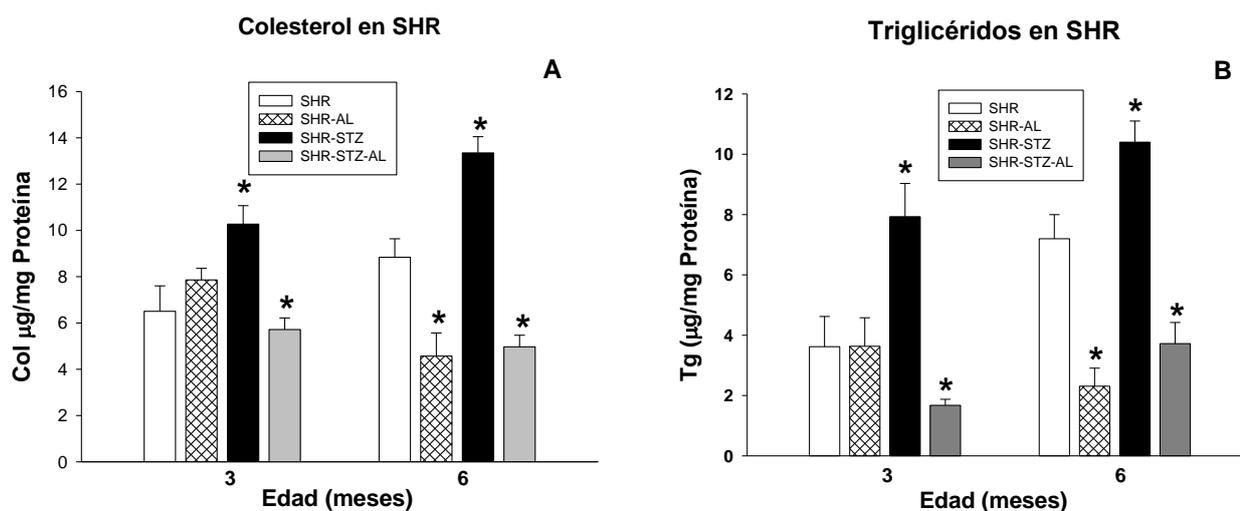
### 6.4 Colesterol y triglicéridos durante la diabetes y la hipertensión

#### 6.4.1 Colesterol

Para observar los efectos de la diabetes y la hipertensión en el metabolismo de los lípidos se cuantificó la concentración de colesterol y triglicéridos en suero de los grupos de SHR a diferentes edades (3 y 6 meses de edad). En la figura 10A se muestran los resultados obtenidos de las cuantificaciones de colesterol. A los 3 meses de edad las SHR control presentaron una concentración de colesterol de 6.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína (119 mg/dl). Por su parte las SHR-STZ alcanzaron una mayor concentración de colesterol (10.27  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína ó 144 mg/dl) a la misma edad. Esta concentración de colesterol que presentaron las SHR-STZ, posiblemente es derivada del descontrol de la glucosa que mostraron estos animales. Los cambios continuaron y a los 6 meses de edad las SHR-STZ presentaron una concentración de colesterol de 13.36  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína (191 mg/dl)

Por otro lado, las SHR-AL tuvieron una concentración de colesterol de 7.9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína (128 mg/dl) a los 3 meses de edad, sin embargo a los 6 meses disminuyó considerablemente (4.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína ó 102 mg/dl). Esta disminución en la concentración de

colesterol se debió probablemente al control de la presión arterial derivado del suplemento de AL el cual contiene ácidos grasos  $\omega$ -3 y que se han reconocido como un coadyuvante en el control del colesterol. Algo similar se observó en las SHR-STZ-AL en donde la concentración de colesterol fue de 5.7  $\mu$ g/mg de proteína (114 mg/dl) a los 3 meses, esta concentración fue menor en comparación con las SHR control y las SHR-AL (6.5  $\mu$ g/mg de proteína y 7.9  $\mu$ g/mg de proteína respectivamente). Las concentraciones de colesterol de las SHR-AL y SHR-STZ-AL sugieren una participación importante del aceite de linaza en el control del colesterol sanguíneo.



**Fig. 10** Metabolismo de lípidos durante la diabetes y la hipertensión en los grupos de SHR a diferentes edades. **A)** Concentración de colesterol en suero de SHR control, SHR-STZ, SHR-AL y SHR-STZ-AL. **B)** Concentración de triglicéridos en suero SHR control, SHR-STZ, SHR-AL y SHR-STZ-AL. Valores reportados en  $\mu$ g/mg de proteína. n=6 \*(P < 0.05).

#### 6.4.2 Triglicéridos

Con respecto a los triglicéridos, hubo un aumento en su concentración durante el desarrollo de la diabetes e hipertensión, así como una disminución en la concentración de triglicéridos al suplementar a las SHR con el AL. En la figura 10B se muestra la concentración de triglicéridos de los 4 grupos de SHR a diferentes edades (3 y 6 meses). En el caso de las SHR control y SHR-AL muestran una concentración similar de triglicéridos a los 3 meses de edad (3.6  $\mu$ g/mg de proteína ó 95 mg/dl) No obstante en ambos casos se presentan cambios relevantes a los 6 meses de vida. Las SHR control tuvieron un incremento en los triglicéridos sanguíneos, aumentando un 100% su concentración (7.2  $\mu$ g/mg de proteína ó 182 mg/dl); estos resultados pudieran tener una relación con el aumento de la presión sistólica que presentaron las SHR control a esta edad. Por su parte las SHR-AL tuvieron un decremento importante en su concentración de triglicéridos sanguíneos a los 6 meses de edad (2.3  $\mu$ g/mg de proteína ó 82 mg/dl). Es importante recordar que estos

animales fueron suplementados con AL y que posiblemente la disminución que muestran se debe al ácido  $\alpha$  linolénico ( $\omega$  -3) que contiene este suplemento.

En el caso de las SHR-STZ la concentración de triglicéridos fue de 7.9  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína (189 mg/dl) a los 3 meses de edad. En este grupo de animales la glucosa fue superior a los 150 mg/dl casi todo el estudio, además la hipertensión se estableció desde la 7 semana de edad, quizá por esta razón las SHR-STZ presentaron una mayor concentración de triglicéridos en comparación con los 3 grupos restantes. A los 6 meses de edad la tendencia a aumentar se mantuvo y la concentración de triglicéridos sanguíneos fue de 10.4  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína (206 mg/dl).

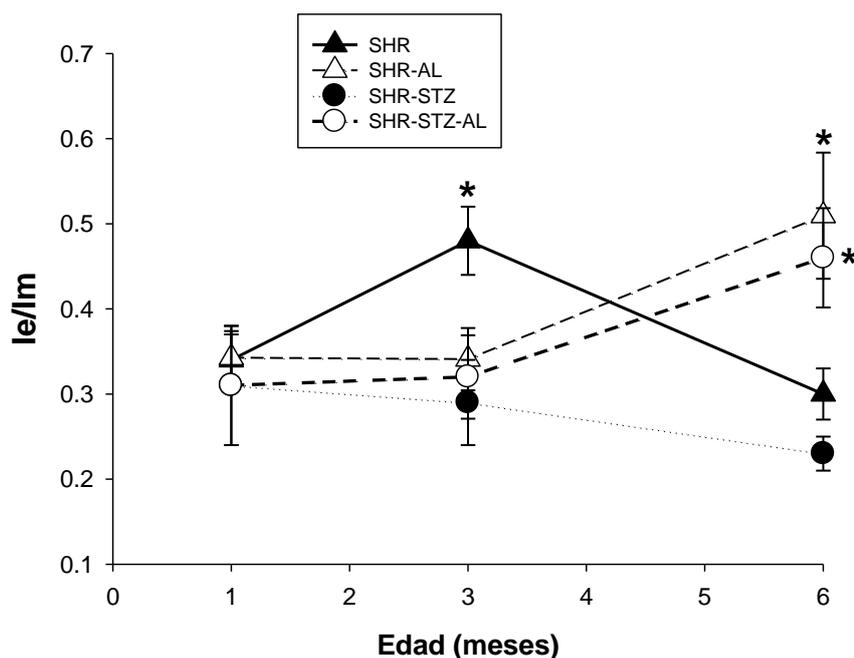
Por su parte las SHR-STZ-AL presentaron una menor concentración de triglicéridos a los 3 meses de vida (1.7  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína ó 74 mg/dl) incrementando ligeramente a la edad de 6 meses a 3.7  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína (98 mg/dl) Cabe señalar que este grupo presentó glicemia basal y un control en su presión arterial, consecuentemente la concentración triglicéridos también mantuvieron concentraciones óptimas, inclusive menor que las SHR control. De esta manera vemos que el AL no sólo controla la glucosa y retrasa la aparición de la hipertensión sino que además favorece el control y disminución de los lípidos sanguíneos.

## 6.5 Fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos

Para saber si ocurren cambios sobre la bicapa lipídica durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión realizamos mediciones de fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos. Los eritrocitos no presentan organelos, por lo tanto no hay interferencia de otras membranas y de esa manera aseguramos que las mediciones de fluidez membranal corresponden sólo a la membrana plasmática.

Como se mencionó, para este estudio se utilizó el monitor de fluorescencia DPiP, el cual es una molécula hidrofóbica que se ubica preferentemente en la parte intermedia de la monocapa, tiene la capacidad de formar excímeros intramoleculares y la probabilidad de formación depende de la fluidez del medio. A partir de las conformaciones de excímero (Ie) y monómero (Im) del monitor fluorescente de fluidez DPiP, se obtuvo el cociente Ie/Im que refleja en forma directa la fluidez membranal (Mejía *et al* 1995).

## Fluidez Membranal en Fantasma de Eritrocitos



**Fig. 11.** Fluidez membranal detectada por el monitor de fluorescencia DPiP en fantasmas de eritrocitos de SHR a 1,3 y 6 meses de edad.  $n=6$  \*( $P < 0.05$ ).

En la Fig. 11 se muestra la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos de SHR, la cual está dada por el cociente  $I_e/I_m$  del DPiP. Al primer mes de edad la fluidez de los 4 grupos de SHR es muy similar. Cabe señalar que a partir de esta edad (1 mes) se comenzó a suplementar en la dieta a 2 grupos de SHR (SHR-AL y SHR-STZ-AL) con el AL, por lo que a esta edad no hay efectos de los ácidos grasos  $\omega$ -3 sobre la fluidez membranal de estos grupos.

A los 3 meses de edad las SHR control presentaron un incremento en la fluidez membranal ( $I_e/I_m=0.48$ ). Por su parte las SHR-STZ muestran una discreta disminución en su fluidez ( $I_e/I_m=0.29$ ) al compararlas con el grupo control. En el caso de los grupos restantes (SHR-AL y SHR-STZ-AL) no se observan cambios, manteniendo una fluidez similar a la que presentaron al mes de edad.

A los 6 meses de vida, se observaron cambios muy notorios y por demás interesantes. Las SHR control presentaron una disminución en su fluidez membranal ( $I_e/I_m=0.3$ ). En el caso de las SHR-STZ la fluidez disminuyó aún más que a los 3 meses de edad ( $I_e/I_m=0.23$ ). Estos resultados indican que durante el desarrollo de la hipertensión ocurren modificaciones en la fluidez de las membranas de estos animales y que con la diabetes, estos cambios son todavía más evidentes.

En los animales suplementados con el AL la fluidez membranal aumentó de manera notoria. En el caso de las SHR-AL y SHR-STZ-AL a los 6 meses de edad los cocientes de  $I_e/I_m$  fueron 0.51 y 0.48, respectivamente. De esta manera se puede ver que el AL contribuyó al aumento de la fluidez membranal en estos animales.

Los resultados de fluidez membranal reportados por el cociente  $I_e/I_m$  del DPiP muestran que ocurrieron cambios durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión, en específico una disminución de la fluidez membranal. Asimismo, el suplemento de AL parece contribuir a un aumento de la fluidez membranal. Estas modificaciones pueden ser consecuencia de varios factores, uno de ellos es la composición de ácidos grasos que presentan las membranas. Para observar la posible participación de los ácidos grasos en la fluidez membranal analizamos la composición lipídica de los fantasmas de eritrocitos. De esta manera, se podrá determinar si el suplemento de AL (rico en ácido  $\alpha$  linolénico) contribuye al aumento en la fluidez membranal.

## **6.6 Composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos**

### **6.6.1 Grupo SHR**

Se analizó la composición de ácidos grasos de membranas de eritrocitos con el fin de observar los cambios que ocurren durante el crecimiento de los animales así como con el desarrollo de la diabetes y la hipertensión.

Al realizar las mediciones de fluidez en membranas de eritrocitos con el DPiP, se observa que las ratas suplementadas tuvieron un aumento en su fluidez. Este incremento, se deriva posiblemente de la composición de ácidos grasos membranales. Se sabe, que la membrana plasmática está compuesta de varios elementos como son las proteínas, colesterol y fosfolípidos, de estos últimos los ácidos grasos tienen un papel importante en el mantenimiento de la fluidez membranal. Por esta razón es interesante saber si la fluidez membranal detectada por el DPiP se correlaciona con los cambios en la composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos.

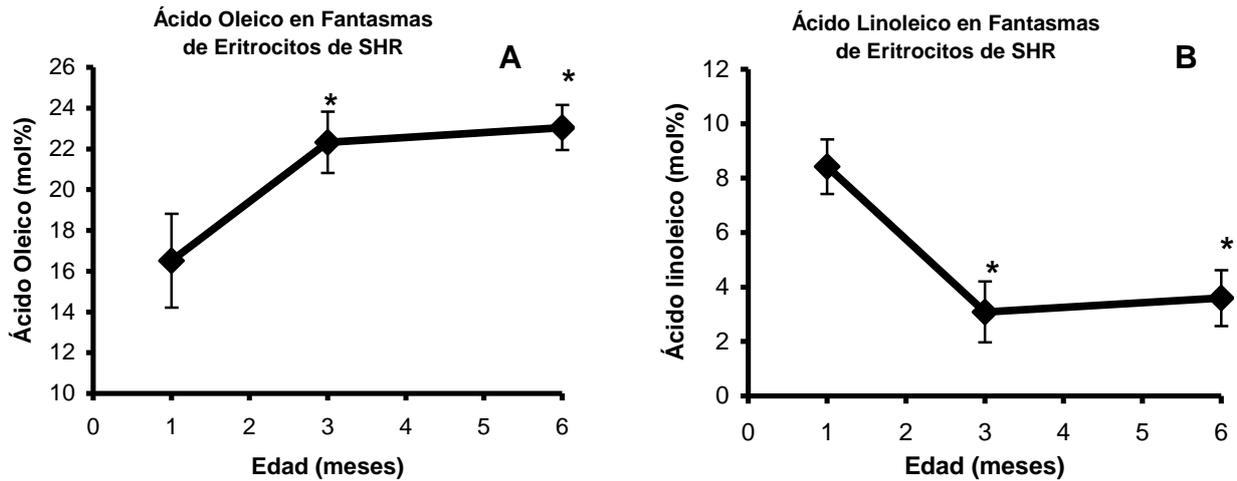
**Tabla 2. Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de SHR**

		1 mes	SHR 3 meses Mol %	6 meses
Ácidos Grasos		Promedio	Promedio	Promedio
Mirístico	C14:0	0.8 ±0.4	2.6* ±0.5	3.6* ±1.2
Miristoleico	C14:1	0 ±0	0.2 ±0.1	0.3 ±0.1
Palmítico	C16:0	36.6 ±2.1	29.8* ±1.1	31.6* ±1.9
Palmitoleico	C16:1	1.3 ±0.2	2.0* ±0.1	2.2* ±0.2
Esteárico	C18:0	17.5 ±0.9	15.8 ±0.7	15.5 ±0.9
Oleico	C18:1	16.5 ±2.3	22.3* ±1.5	23.0* ±1.1
Linoleico	C18:2	8.4 ±1.0	3.1* ±1.1	3.6* ±1.0
α linolénico	C18:3	0.2 ±0.0	0.5 ±0.3	1.0* ±0.5
CLA	C18:2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
Araquidónico	C20:4	14.3 ±2.1	4.3* ±1.7	1.3* ±0.8
EPA	C20:5	0.7 ±0.5	0.3 ±0.3	0.4 ±0.2
Erucato	C22:0	0.0 ±0.0	2.1 ±0.3	1.3 ±0.7
DHA	C22:6	2.3 ±0.8	9.2* ±1.3	8.6* ±2.9
NI		1.3 ±0.8	7.8 ±1.8	7.6 ±3.2
I/S		0.8 ±0.1	0.92 ±0.07	0.8 ±0.1

Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

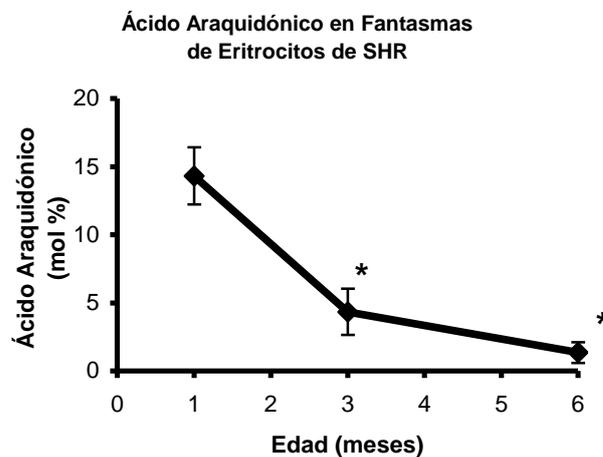
En la tabla 2 se observa la composición de ácidos grasos de las SHR a diferentes edades (1,3 y 6 meses). En ella se muestran las modificaciones que ocurren a través del tiempo, así como los cambios que se generan con el desarrollo de la hipertensión. El ácido palmítico, un ácido graso saturado, presentó un porcentaje elevado al primer mes de edad (36.6%), a los 3 meses de edad este porcentaje disminuyó (29.8%), e incrementó discretamente aunque no de manera significativa a los 6 meses de edad (31.6%). Este ácido graso es precursor del ácido palmitoleico, el cual muestra un ligero aumento a los 3 meses de edad, pasando de 1.3% a 2.0% coincidiendo con la disminución del ácido palmítico.

Otro ejemplo que ilustra las modificaciones de ácidos grasos se observa en el ácido oleico. En la figura 12A se ve claramente cómo el porcentaje de este ácido graso aumenta a los 3 meses de vida y se mantiene así hasta los 6 meses. Al mes de edad el contenido de ácido oleico fue de 16.5%, e incrementó a los 3 meses de edad a un porcentaje de 22.3%. A los 6 meses de vida no hubo cambios relevantes en el ácido oleico (23.0%).



**Fig. 12.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos de SHR a 1,3 y 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido oleico. **B)** Cambios del ácido linoleico. n=6 \*(P <0.05).

Por su parte, el ácido linoleico también mostró modificaciones a través del tiempo y/o con el desarrollo de la hipertensión. En la figura 12B se observa que el porcentaje de ácido linoleico fue de 8.4% durante el primer mes de edad. Asimismo, se ve un claro decremento de este ácido graso a los 3 meses de vida, en donde el porcentaje fue de 3.1% y se mantuvo así hasta los 6 meses de edad (3.6%).



**Fig. 13.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos de SHR a 1,3 y 6 meses de edad. n=6 \*(P <0.05).

Otro ácido graso que presentó cambios importantes es el ácido araquidónico. En la figura 13 se puede ver que al mes de edad el contenido de este ácido graso en las membranas de eritrocitos fue de 14.3%, sin embargo, a los 3 meses de edad disminuyó notablemente llegando a

4.3%. Los cambios continuaron a través del tiempo. A los 6 meses de edad el porcentaje disminuyó aun más, a esta edad el ácido araquidónico fue de 1.3%. Todos estos cambios, pueden ser derivados del envejecimiento de los animales y, por otro lado, influenciados por el desarrollo de la hipertensión.

### 6.6.2 Grupo SHR-STZ

Al parecer la edad, así como la hipertensión, generaron modificaciones en la composición de ácidos grasos de las membranas de eritrocitos y consecuentemente cambios en la fluidez membranal, al menos así lo reportó el DPiP (Fig. 11). También el DPiP mostró que las SHR con diabetes (SHR-STZ) tuvieron una menor fluidez desde el primer mes de edad y continuaron así hasta los 6 meses de edad. En las SHR-STZ se determinó la composición de ácidos grasos para conocer las posibles modificaciones que se generaron con el desarrollo de la diabetes y la hipertensión.

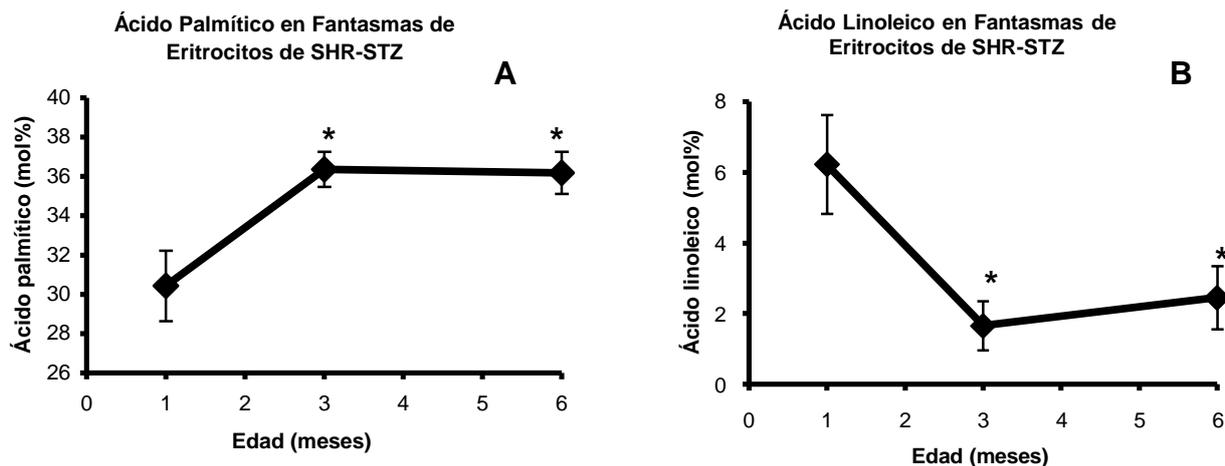
**Tabla 3. Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de SHR-STZ**

Ácidos Grasos	1 mes	SHR STZ 3 meses Mol%	6 meses
	Promedio	Promedio	Promedio
Mirístico C14:0	1.4 ±1.1	1.2 ±1.4	2.6 ±1.1
Miristoleico C14:1	0.8 ±0.2	0 ±0.0	0.1 ±0.1
Palmítico C16:0	30.4 ±1.8	36.4* ±0.9	36.2* ±1.1
Palmitoleico C16:1	4.5 ±3.5	3.1 ±2.2	1.9 ±1.0
Estearico C18:0	17.4 ±4.0	19.2 ±5.9	19.8 ±1.4
Oleico C18:1	10.9 ±4.2	13.8 ±2.8	18.6* ±2.7
Linoleico C18:2	6.2 ±1.5	1.7* ±0.7	2.5* ±1.8
α linolénico C18:3	0.5 ±0.3	0.9 ±1.4	0.4 ±0.2
CLA C18:2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
Araquidónico C20:4	8.6 ±1.4	11.0 ±1.2	1.4* ±0.5
EPA C20:5	4.2 ±1.1	0.1* ±0.1	0.4* ±0.3
Erucato C22:0	11.4 ±6.2	0.5 ±1.1	0.5 ±0.3
DHA C22:6	0.9 ±0.6	6.9* ±2.1	6.9* ±0.9
NI	3.0 ±1.5	5.3 ±2.6	8.7 ±4.0
I/S	0.97 ±0.03	0.67 ±0.08	0.56 ±0.05

Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

En la tabla 3 se puede ver la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos a diferentes edades (1, 3 y 6 meses). Ocurrieron cambios al paso del tiempo, estas modificaciones posiblemente estuvieron influenciadas por la diabetes y la hipertensión.

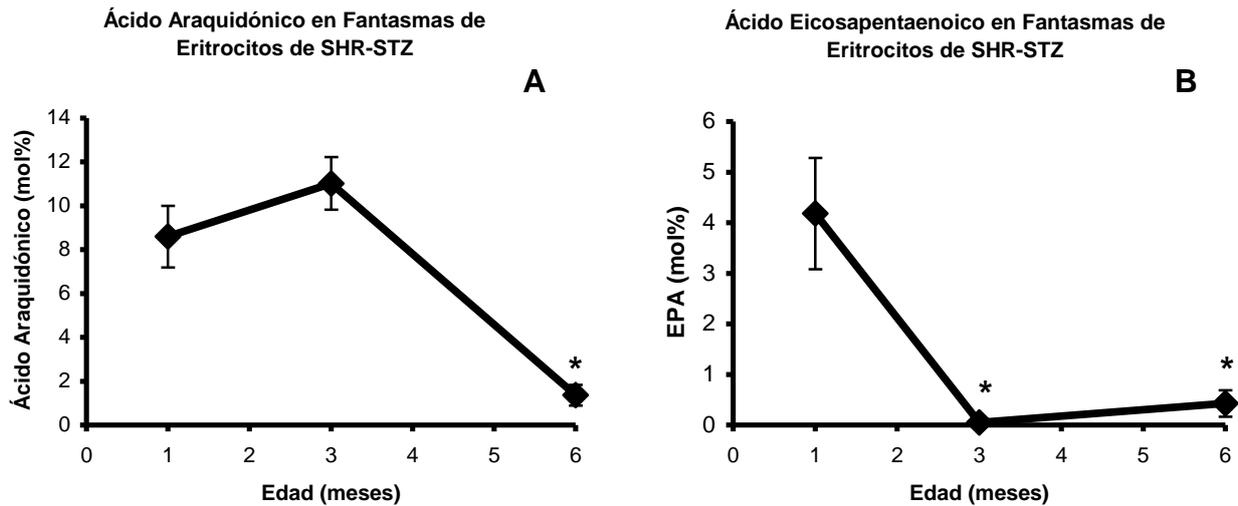
Como ejemplo de las modificaciones, tenemos al ácido palmítico (Fig. 14A). Al primer mes de edad el porcentaje fue de 30.4%, sin embargo a los 3 meses de edad el porcentaje de ácido palmítico incrementó llegando a un 36.4% y se mantuvo así hasta los 6 meses de edad (36.2%).



**Fig. 14.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos de SHR-STZ a 1,3 y 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido palmítico. **B)** Cambios del ácido linoleico. n=6 \*(P <0.05).

Por su parte el ácido linoleico, un ácido graso esencial, tuvo un porcentaje de 6.2% al primer mes de edad. Este porcentaje disminuyó considerablemente a los 3 meses de edad (1.7%) y, aunque se muestra un ligero aumento a los 6 meses de edad (2.5%), este incremento no es significativo.

Como se ha mencionado, varios ácidos grasos presentaron cambios en su porcentaje. Para seguirlos ejemplificando, tenemos al ácido araquidónico ( $\omega$ -6), este ácido graso mostró cambios por demás interesantes. En la figura 15A se ve que al mes de edad las SHR-STZ presentaron 8.6% de ácido araquidónico. Se observa también, que el contenido de este ácido graso aumentó a los 3 meses de edad (11%); sin embargo, el incremento no fue significativo. A los 6 meses de vida hubo un claro decremento y el porcentaje de este ácido graso fue de 1.4%.



**Fig. 15.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos de SHR-STZ a 1, 3 y 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido araquidónico. **B)** Cambios del ácido eicosapentaenoico. n=6 \*(P <0.05).

Por su parte el EPA ( $\omega$ -3) también muestra un decremento en su porcentaje a través del tiempo. Al mes de edad el contenido de EPA fue de 4.2%, sin embargo, a los 3 meses de edad las SHR-STZ muestran un drástico decremento de este ácido graso (0.1%) incrementando de manera discreta a los 6 meses de edad (0.4%)

De los resultados anteriores se puede decir que la diabetes y la hipertensión afectaron el contenido de ácidos grasos de los fantasmas de eritrocitos de SHR-STZ. Se observa que el porcentaje de ácidos grasos saturados como el ácido palmítico aumentó. Contrariamente, los ácidos grasos poliinsaturados de la familia  $\omega$ -6 (ácido linoleico, ácido araquidónico) disminuyeron considerablemente al igual que el EPA. Estas modificaciones pudieron afectar la fluidez de las membranas de eritrocitos y consecuentemente haber contribuido a la disminución de la fluidez membranal que reportó el DPiP.

### 6.6.3 Grupo SHR-AL

Es importante mencionar que en este grupo de animales, el AL tuvo efectos benéficos en el control de la presión arterial. Por otro lado, al realizar las mediciones de fluidez membranal utilizando el DPiP, observamos que la fluidez en fantasmas de eritrocitos aumentó considerablemente.

Se determinó la composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos de las SHR-AL para saber si el AL contribuyó a un aumento de los ácidos grasos  $\omega$ -3, además de observar si el aumento de la fluidez membranal pudiera ser consecuencia del aumento de los AGPIs.

**Tabla 4. Composición de ácidos grasos (mol%) de fantasmas de eritrocitos de SHR-AL**

Ácidos Grasos	1 mes	SHR-AL 3 meses	6 meses
	Promedio	Mol % Promedio	Promedio
Mirístico C14:0	0.8 ±0.4	1.2 ±0.6	4.4* ±2.2
Miristoleico C14:1	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	1.2 ±0.9
Palmítico C16:0	36.6 ±2.1	36.7 ±2.1	24.9* ±4.8
Palmitoleico C16:1	1.5 ±2.0	2.1 ±0.4	4.1 ±1.3
Esteárico C18:0	17.5 ±0.9	26.6* ±2.3	16.2 ±2.8
Oleico C18:1	16.5 ±5.6	8.6* ±1.0	9.1 ±2.2
Linoleico C18:2	8.4 ±1.9	9.1 ±0.5	12.2 ±3.6
$\alpha$ linolénico C18:3	0.2 ±0.0	2.3* ±0.2	8.5* ±0.9
CLA C18:2	0.0 ±0.0	1.7* ±0.0	2.1* ±0.4
Araquidónico C20:4	14.3 ±3.5	5.1* ±0.7	5.4* ±0.5
EPA C20:5	0.7 ±0.1	1.2* ±0.2	1.0* ±0.1
Erucato C22:1	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0	3.3 ±1.1
DHA C22:6	2.3 ±0.4	2.1 ±0.2	4.2 ±1.4
NI	1.3 ±0.8	3.3 ±0.7	4.4 ±0.7
I/S	0.8 ±0.1	0.50 ±0.03	1.2 ±0.3

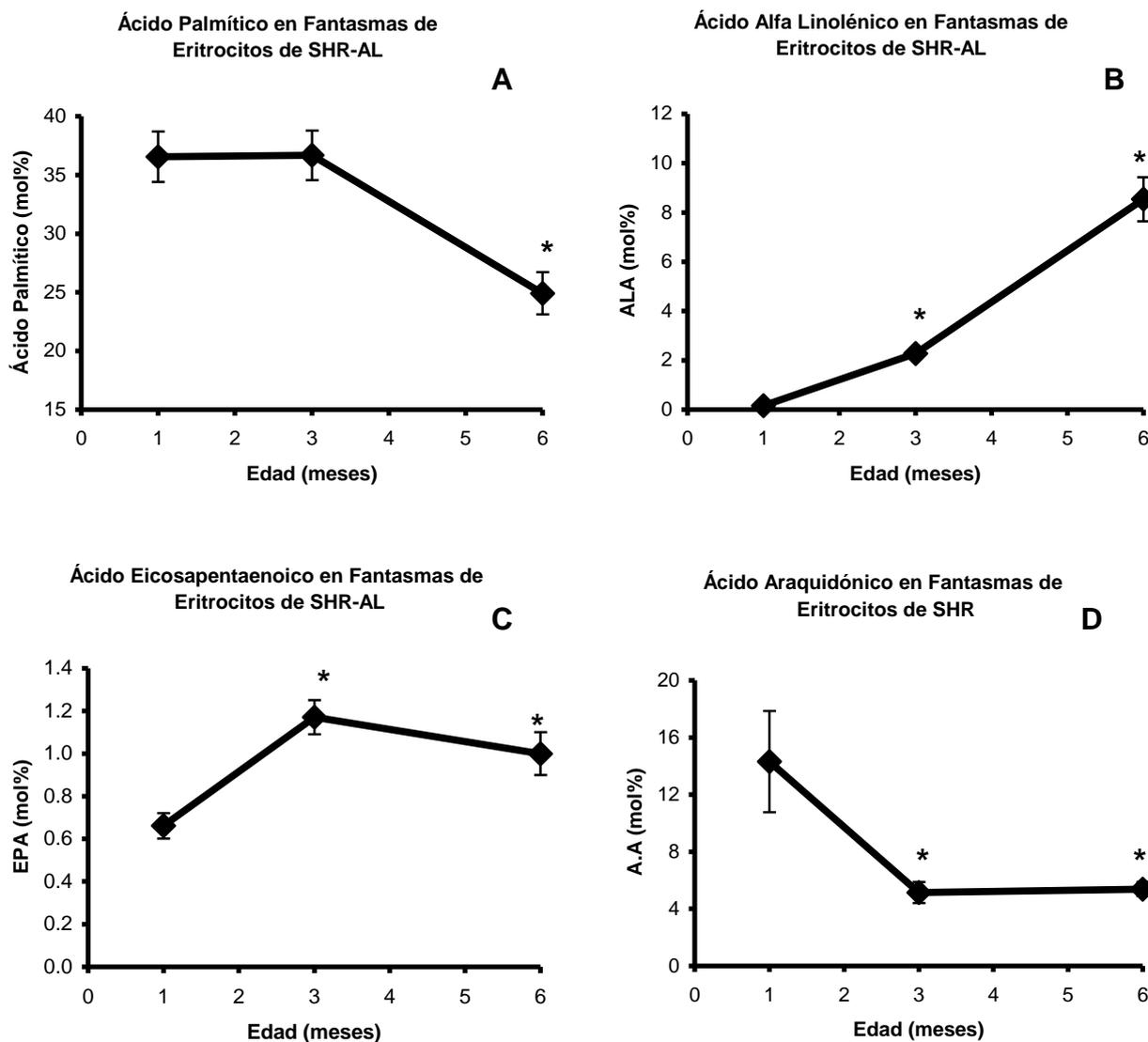
Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05)

En el grupo de animales SHR-AL ocurrieron modificaciones a las diferentes edades (tabla 4). Se observa que los ácidos grasos  $\omega$ -3 presentaron un porcentaje mayor que en los grupos anteriores. Además, se nota una disminución del porcentaje de ácidos grasos saturados.

En la gráfica 16A se puede ver el porcentaje de ácido palmítico a diferentes edades. Al primer mes de edad las SHR-AL presentaron 36.6% de este ácido graso manteniéndose así hasta los 3 meses de edad. Sin embargo, a los 6 meses de vida hubo un decremento considerable en el porcentaje de ácido palmítico (24.9%).

Como se mencionó, el aceite de linaza tiene un alto porcentaje de ALA, por esta razón se esperaba que el alto contenido de ALA se viera reflejado en las membranas de eritrocitos de las

SHR-AL. En la figura 16B se observa que el porcentaje de este ácido graso aumentó cerca de 11 veces a los 3 meses de edad (2 meses después de administrar el suplemento) pasando de 0.2% a 2.3%. A los 6 meses de vida continuó en aumento el contenido de ALA de las membranas de eritrocitos, a esta edad el porcentaje fue de 8.5% (más de 40 veces respecto al valor inicial a un mes de edad).



**Fig. 16.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos de SHR-AL a 1, 3 y 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido palmítico. **B)** Cambios del ácido  $\alpha$  linolénico. **C)** Cambios del ácido eicosapentaenoico **D)** Cambios del ácido araquidónico. n=6 \*(P < 0.05).

Como consecuencia del aumento del ALA el EPA también incrementó en las membranas de eritrocitos. Es importante señalar que el ALA es precursor de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga, como el ácido eicosapentaenoico. En la figura 16C se ve que al mes de edad el porcentaje de EPA

fue de 0.7% y a los 3 meses de edad (2 meses de suplemento) el contenido de este ácido graso aumentó llegando a 1.2%. A los 6 meses de vida el EPA mostró una ligera disminución, sin embargo no fue significativa. Por su parte el ácido araquidónico tuvo un 14.3% al primer mes de edad, sin embargo al paso del tiempo el porcentaje disminuyó considerablemente. A los 3 meses de edad las SHR-AL presentaron un 5.1% manteniéndose así hasta los 6 meses de edad.

El AL no sólo tuvo efectos a nivel fisiológico, también influyó en la composición química de la membrana de los eritrocitos, aumentando la composición de ácidos grasos  $\omega$ -3 y al parecer también favoreció el aumento de la fluidez membranal. En este grupo (SHR-AL) también hubo una disminución de los ácidos grasos saturados, en específico del ácido palmítico.

#### **6.6.4 Grupo SHR-STZ-AL**

En este grupo de animales el suplemento de aceite de linaza controló la glicemia y retrasó el desarrollo de la hipertensión. Además, disminuyó y controló los niveles de colesterol y triglicéridos. En lo que respecta a la fluidez en membranas de eritrocitos, el DPiP reportó un aumento en la fluidez membranal a los 6 meses de edad. Se determinó la composición de ácidos grasos (tabla 5) y se observa que los ácidos grasos  $\omega$ -3, en específico el ALA y el DHA aumentaron a través del tiempo.

En la figura 17A se puede ver que el ácido palmítico tuvo un 30.4% al primer mes de edad y aumentó ligeramente a los 3 meses de edad (33.2%), sin embargo, el contenido de este ácido graso en las membranas de eritrocitos disminuyó considerablemente a los 6 meses de edad (24.3%). Por su parte el ALA (Fig. 17B), aumentó a los 3 meses de edad pasando de 0.5% a 4.3%. Se debe recordar que el AL tiene un alto porcentaje de ALA y por esta razón se vio reflejado en el incremento de este ácido graso en las membranas de eritrocitos.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos (mol %) de fantasmas de eritrocitos de SHR-STZ-AL

Ácidos grasos	SHR STZ-AL		
	1 mes	3 meses	6 meses
	Promedio	Mol % Promedio	Promedio
Mirístico C14:0	1.4 ±1.1	1.2 ±0.7	1.0 ±0.3
Miristoleico C14:1	0.8 ±0.2	0.0 ±0.0	0.4 ±0.2
Palmítico C16:0	30.4 ±3.4	33.2 ±3.3	24.3* ±1.3
Palmitoleico C16:1	4.5 ±3.5	2.4 ±0.3	3.9 ±1.7
Esteárico C18:0	17.4 ±4.0	25.2 ±6.4	22.0 ±1.4
Oleico C18:1	10.9 ±4.2	9.1 ±2.2	9.6 ±2.8
Linoleico C18:2	6.2 ±2.4	7.8 ±2.5	10.7* ±1.6
α linolénico C18:3	0.5 ±0.3	4.3* ±1.6	7.1* ±0.9
CLA C18:2	0.0 ±0.0	2.2* ±1.6	2.2* ±0.5
Araquidónico C20:4	8.6 ±2.9	5.4* ±0.5	7.9 ±1.0
EPA C20:5	4.2 ±1.7	1.9* ±0.4	2.9 ±0.3
Erucato C22:1	11.4 ±6.2	0.0 ±0.0	0.0 ±0.0
DHA C22:6	0.9 ±0.6	3.8* ±0.8	6.5* ±1.2
NI	3.0 ±1.5	3.8 ±1.9	3.1 ±2.6
I/S	0.97 ±0.03	0.6 ±0.05	1.1 ±0.2

Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05)

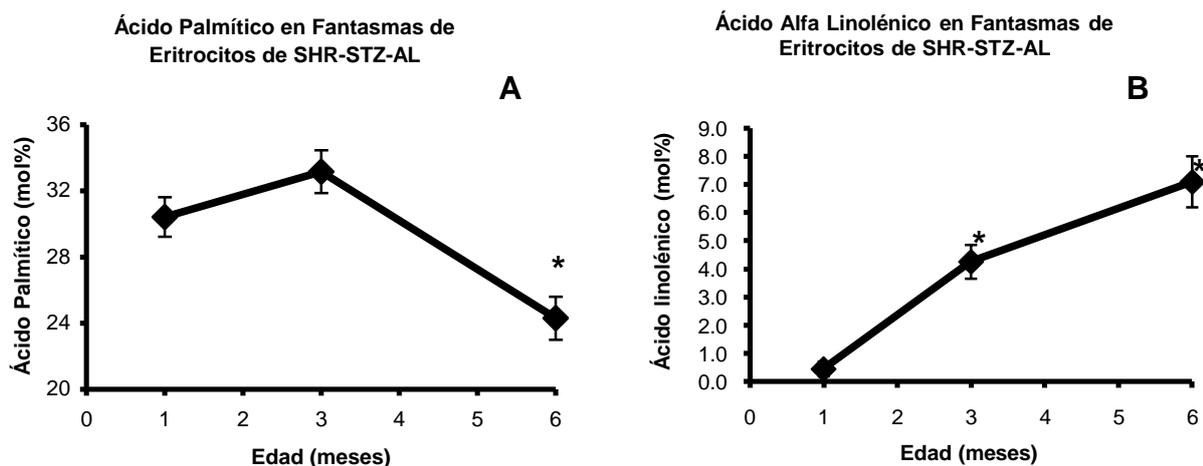
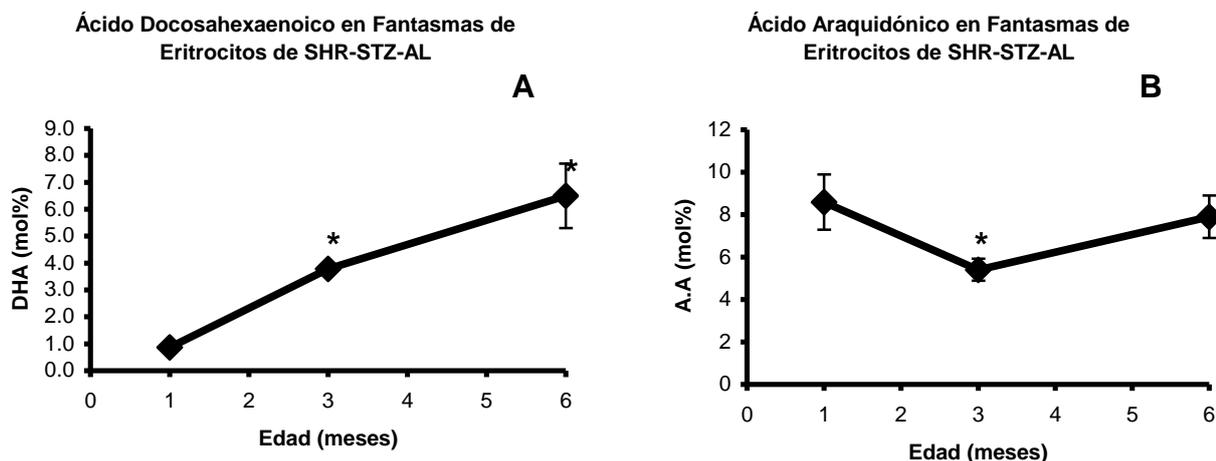


Fig. 17. Modificaciones en la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos de SHR-AL a 1, 3 y 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido palmítico. **B)** Cambios del ácido α linolénico. n=6 \*(P <0.05).

El DHA (Fig. 18A) un ácido graso  $\omega$ -3 de cadena larga tuvo un porcentaje de 0.9% al primer mes de vida y aumentó a los 3 meses de edad (3.8%). A los 6 meses de vida el contenido de DHA en las membranas de eritrocitos fue de 6.5%. Este incremento se puede relacionar con el aumento de ALA, precursor de EPA y DHA. Por lo tanto, el aceite de linaza también participó en el aumento de ácidos grasos  $\omega$ -3.



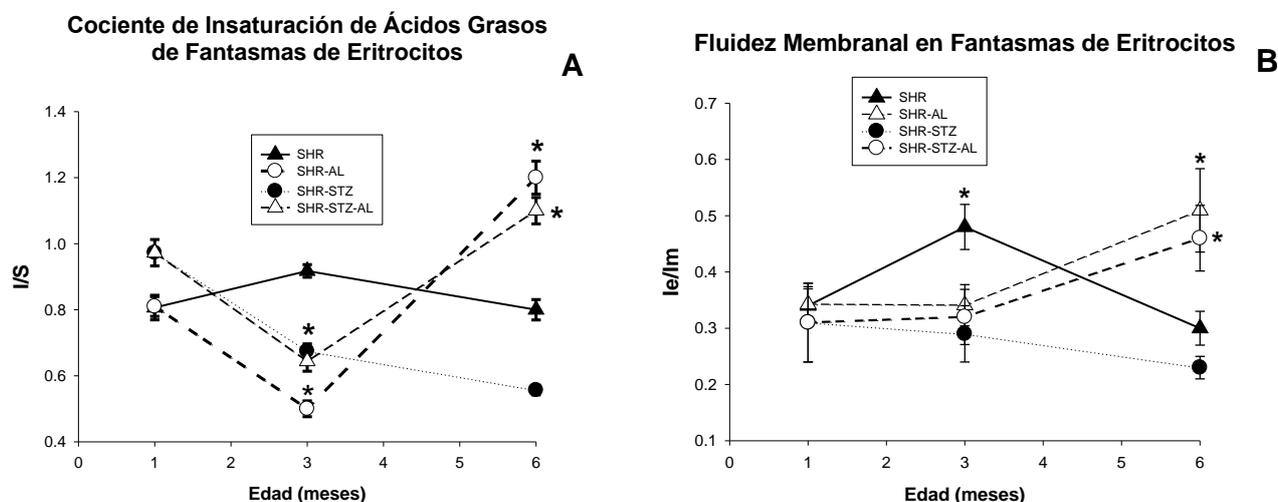
**Fig. 18.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en fantasmas de eritrocitos de SHR-AL a 1, 3 y 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido docosahexaenoico. **B)** Cambios del ácido araquidónico. n=6 \*(**P <0.05**).

El ácido araquidónico mostró un porcentaje de 8.6% al primer mes de vida, no obstante hubo un ligero decremento a los 3 meses de edad (5.4%), el porcentaje cambió nuevamente, esta vez incrementando ligeramente (7.9%) a los 6 meses de edad.

En este grupo de animales (SHR-STZ-AL) el contenido de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 aumentó debido al suplemento de AL. Por otro lado, el ácido palmítico disminuyó a los 6 meses de edad, posiblemente este decremento junto con el aumento de los  $\omega$ -3 favoreció el aumento de la fluidez membranal que mostró el DPiP.

Al analizar el cociente de insaturación de ácidos grasos insaturados sobre ácidos grasos saturados (I/S) se observa que a los 3 meses de edad, las SHR mostraron un aumento de este cociente (Fig.19A), mientras que las SHR-STZ, SHR-AL y SHR-STZ-AL tuvieron una disminución en el I/S. Sin embargo, en los grupos suplementados con el AL se ve claramente un aumento del I/S a los 6 meses de edad. También se puede ver que este cociente de insaturación tiene un comportamiento similar a la fluidez membranal reportada por el DPiP. Por lo tanto podemos decir

ue la fluidez en las membranas de eritrocitos es dependiente principalmente de la composición de ácidos grasos.



**Fig. 19. A)** Cociente de insaturación de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos de los grupos de SHR a 1,3 y 6 meses de edad **B)** Fluidez membranar detectada por el monitor de fluorescencia DPiP en fantasmas de eritrocitos de los grupos de SHR a 1, 3 y 6 meses de edad.  $n=6$   $^{*}(P < 0.05)$ .

## 6.7 Composición de ácidos Grasos de hígados de SHR

La diabetes y la hipertensión son enfermedades que generan daños a nivel fisiológico, metabólico y orgánico. En el caso del riñón, se ha observado que la hiperglicemia altera su hemodinamia. Asimismo, esta alteración desencadena daños secundarios como el desarrollo de la hipertensión. Por su parte, el hígado juega un papel importante en el metabolismo; sin embargo, se ha observado que durante el desarrollo de la diabetes existe un descontrol que favorece el aumento de lípidos sanguíneos, así como una disminución en el catabolismo de carbohidratos.

En este estudio se determinó la composición de ácidos grasos de hígado. Así, se observaron los cambios ocurridos durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión. En la tabla 6 se puede ver la composición de ácidos grasos de hígado de SHR y SHR-STZ. Al mes de vida, ambos grupos presentan pocas diferencias en la composición de ácidos grasos de hígado. En las SHR, el ácido esteárico fue de 20.6% mientras que en las SHR-STZ el contenido de este ácido graso fue de 23.8%. También, se puede ver que el ácido linoleico mostró variaciones en el grupo SHR-STZ con respecto a las SHR. El porcentaje de ácido linoleico en las SHR-STZ al mes de edad fue de 20.8% mientras que en las SHR fue de 16%. La hiperglicemia que presentaron las SHR-STZ pudo haber contribuido en aumentar el porcentaje de ácido linoleico en este grupo de

animales. Por otro lado, el ácido araquidónico mostró un 17.3% en hígados de SHR, en el caso de las SHR-STZ se ve un menor contenido de este ácido graso (15.2%) posiblemente la diabetes, aunado al desarrollo de la hipertensión, favorecieron un menor porcentaje en este grupo de animales.

**Tabla 6. Composición de ácidos grasos (mol%) de hígados de SHR**

Ácidos Grasos		Hígados 1 mes Mol%	
		SHR Promedio	SHR-STZ Promedio
Mirístico	C14:0	0.4 ±0.2	2.1* ±0.1
Palmítico	C16:0	21.6 ±0.5	21.4 ±0.0
Palmitoleico	C16:1	0.5 ±0.1	0.4 ±0.0
Esteárico	C18:0	20.6 ±1.9	23.8* ±1.6
Oleico	C18:1	12.1 ±1.1	10.6 ±1.8
Linoleico	C18:2	16.0 ±2.3	20.8* ±1.4
γ Linolénico	C18:3	0.2 ±0.2	0.5 ±1.3
α Linolénico	C18:3	0.2 ±0.1	0.5 ±0.0
Araquidato	C20:0	0.2 ±0.0	0.9 ±0.1
Araquidónico	C20:4	17.3 ±1.3	15.2 ±1.7
EPA	C20:5	0.4 ±0.3	0.5 ±0.2
DHA	C22:6	7.1 ±4.8	5.9 ±1.2
NI		2.9 ±1.7	0.72 ±1.8
I/S		1.25 ±0.08	1.17 ±0.03

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=8 \*(P <0.05).

Al paso de los meses, las SHR desarrollaron la hipertensión. Al parecer, la diabetes contribuyó a que se estableciera la hipertensión en las SHR-STZ en un periodo menor de tiempo. Lo anterior hace suponer que continuarán las alteraciones de los ácidos grasos en los diferentes órganos implicados en el desarrollo de estas enfermedades. Por otro lado, se ha sugerido el tratamiento a base de ácidos grasos poliinsaturados para prevenir y controlar enfermedades tales como la diabetes y la hipertensión, de tal manera que los órganos involucrados en dichas enfermedades muestren un menor impacto en su composición de ácidos grasos y, en el mejor de los casos, un aumento en el contenido de AGPIs.

En la tabla 7 se muestra la composición de ácidos grasos de hígados de los grupos de SHR a 3 meses de edad. Las modificaciones continuaron con el desarrollo de la diabetes y/o la hipertensión. Además, el contenido de ácidos grasos  $\omega$ -3 también se modificó en las ratas suplementadas con el AL, inclusive aumentó el porcentaje de dichos ácidos grasos, en específico el ALA y el EPA.

**Tabla 7. Composición de ácidos grasos (mol%) de hígados de SHR**

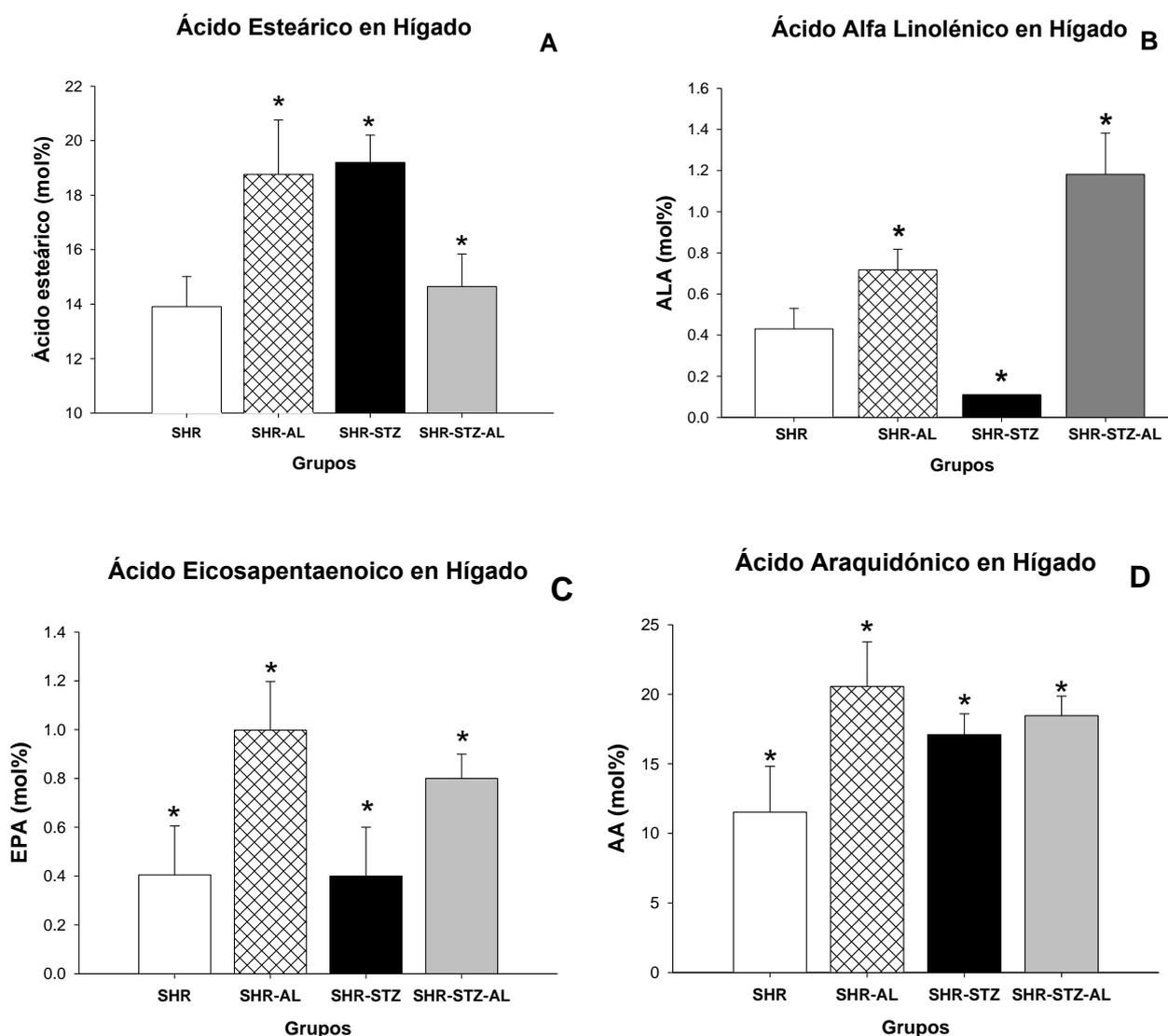
Ácidos Grasos		Hígados 3 meses Mol%			
		SHR Promedio	SHR-AL Promedio	SHR-STZ Promedio	SHR-STZ-AL Promedio
Mirístico	C14:0	0.7 ±0.4	0.3 ±0.0	0.0 ±0.0	0.8 ±0.2
Palmítico	C16:0	23.0 ±1.2	19.6 ±1.2	22.2 ±1.0	19.4 ±0.7
Palmitoleico	C16:1	1.8 ±1.0	0.7 ±0.2	0.5 ±1.0	0.8 ±0.1
Esteárico	C18:0	13.9 ±1.1	18.8* ±2.0	19.2* ±1.0	14.6 ±1.2
Oleico	C18:1	20.6 ±4.3	10.2* ±1.4	13.4* ±0.8	10.9* ±1.1
Linoleico	C18:2	20.0 ±1.3	21.8 ±1.4	19.5 ±2.0	25.7* ±2.1
$\gamma$ Linolénico	C18:3	0.1 ±0.1	0.0 ±0.0	0.2 ±0.0	0.0 ±0.0
$\alpha$ Linolénico	C18:3	0.4 ±0.1	0.7* ±0.1	0.1 ±0.0	1.2* ±0.2
CLA	C18:2	0.2 ±0.3	0.5 ±0.1	0.0 ±0.0	0.6 ±0.4
Araquidónico	C20:4	11.5 ±3.3	20.6* ±3.2	17.1* ±1.5	18.5* ±1.4
EPA	C20:5	0.4 ±0.2	1.0* ±0.2	0.4 ±0.2	0.8* ±0.1
DHA	C22:6	4.0 ±0.8	4.0 ±0.7	6.1 ±3.0	3.4 ±0.5
NI		3.0 ±0.9	2.3 ±1.1	7.0 ±4.0	3.1 ±0.6
I/S		1.56 ±0.06	1.5 ±0.03	1.38 ±0.04	1.8 ±0.04

Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

Para tener un panorama más claro de los cambios ocurridos a los 3 meses de edad, se ejemplifican dichas modificaciones con algunos ácidos grasos. En la figura 20A se muestra el contenido de ácido esteárico en los 4 grupos. En las SHR el porcentaje fue de 13.9% mientras que en las SHR-AL este ácido graso tuvo un mayor contenido (18.8%). Por su parte las SHR-STZ mostraron un porcentaje de ácido esteárico muy similar al de SHR-AL (19.2%). En el caso de las SHR-STZ-AL el contenido de ácido esteárico fue 14.6%.

En lo que respecta al ALA, podemos ver en la figura 20B el porcentaje de este ácido graso en hígado. Las SHR mostraron un 0.4% a los 3 meses de edad, por su parte las SHR-AL tuvieron un porcentaje más alto de ácido  $\alpha$  linolénico (0.7%), es importante recordar que el AL contiene un

elevado porcentaje de este ácido graso, por esta razón se observa una mayor proporción de ALA en este grupo de animales con respecto a las SHR. En las SHR-STZ el porcentaje fue de 0.1%, este valor probablemente se generó por la hiperglicemia que presentaron estos animales. Caso contrario, las SHR-STZ-AL tuvieron un contenido abundante de ALA, se puede ver que en este grupo de animales el porcentaje fue de 1.2%, nuevamente como consecuencia del suplemento de AL.



**Fig. 20.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en hígados de los grupos de SHR, SHR-AL, SHR-STZ y SHR-STZ-AL a 3 meses de edad. **A)** Cambios del ácido esteárico. **B)** Cambios del ácido  $\alpha$  linolénico. **C)** Cambios del ácido eicosapentaenoico. **D)** Cambios del ácido araquidónico. n=6 \*(P <0.05).

El EPA mostró variaciones del porcentaje entre los animales a los 3 meses de edad. En la gráfica 20C se observa que las SHR tuvieron un 0.4% de este ácido graso. En el caso de las SHR-

AL muestran un mayor contenido de EPA a esta edad. El alto porcentaje que presentaron estos animales se generó como consecuencia del ALA. Se ha mencionado, que el ALA es precursor de EPA, de tal manera que el aceite de linaza contribuyó en el alto contenido de los AGPIs  $\omega$ -3. Por su parte, las SHR-STZ muestran 0.4% de EPA. En este grupo de animales el contenido de ALA fue bajo y por lo tanto el ácido derivado del ALA (EPA) también presentó un menor porcentaje. A la misma edad pero en las SHR-STZ-AL, se observa un porcentaje más alto de ácido eicosapentaenoico (0.8%), nuevamente como consecuencia del suplemento administrado a este grupo de animales.

El ácido araquidónico mostró variaciones considerables entre los diferentes grupos. En la figura 20D se puede ver que en el grupo de SHR el contenido de ácido araquidónico fue de 11.5%, porcentaje bajo en comparación a los otros grupos. Por su parte, las SHR-STZ tuvieron un porcentaje de 17.1% de este ácido graso. En las ratas suplementadas con el aceite de linaza (SHR-AL) el contenido de araquidónico fue el más alto (20.6%) en comparación con el resto de los grupos. En las SHR-STZ-AL, también suplementadas, el contenido de ácido araquidónico fue de 18.5%.

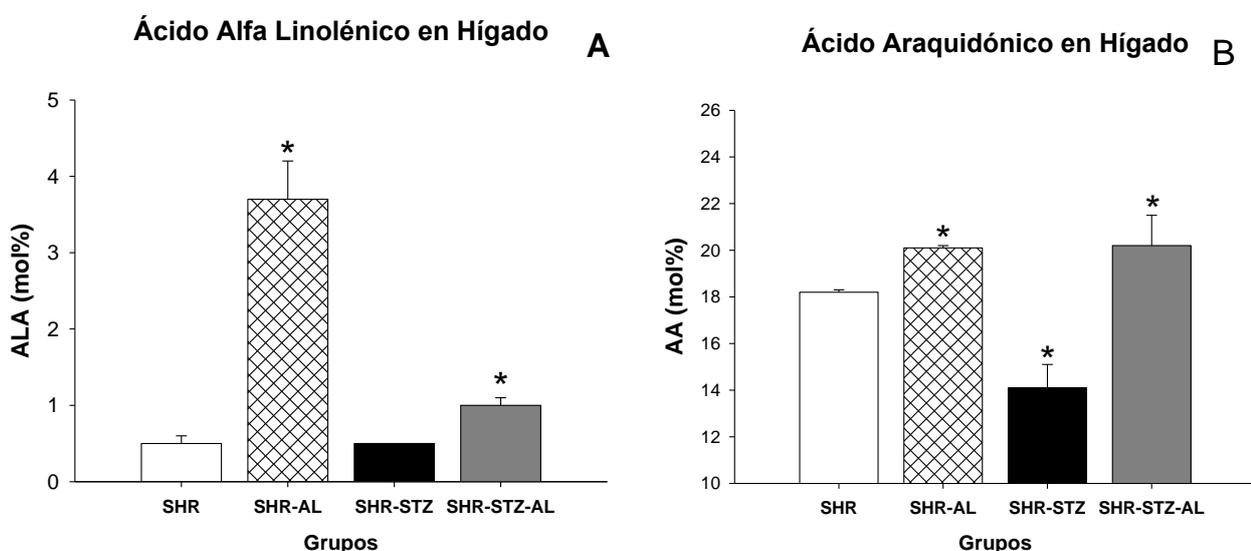
**Tabla 8. Composición de ácidos grasos (mol%) de hígados de SHR**

		Hígados 6 meses Mol%			
Ácidos Grasos		SHR Promedio	SHR-AL Promedio	SHR-STZ Promedio	SHR-STZ-AL Promedio
Mirístico	C14:0	0.2 ±0.0	1.3* ±0.7	0.0 ±0.0	0.4 ±0.2
Palmítico	C16:0	21.2 ±0.6	18.6* ±1.1	23.1 ±1.0	20.5 ±0.7
Palmitoleico	C16:1	0.7 ±0.1	0.6 ±0.1	4.0* ±0.6	0.7 ±0.2
Estearico	C18:0	13.6 ±1.0	15.1 ±0.7	12.4 ±1.3	15.8 ±1.3
Oleico	C18:1	12.5 ±0.7	11.3 ±1.8	16.4* ±1.2	10.8 ±0.8
Linoleico	C18:2	25.8 ±1.8	22.5 ±1.2	23.6 ±2.5	21.6* ±0.9
$\alpha$ Linolénico	C18:3	0.6 ±0.1	3.7* ±0.5	0.5 ±0.0	1.5* ±0.1
Araquidónico	C20:4	18.2 ±0.1	20.1* ±0.1	14.1* ±1.0	20.2* ±1.3
EPA	C20:5	0.3 ±0.0	1.0* ±0.2	0.4 ±0.0	0.8* ±0.0
DHA	C22:6	2.6 ±0.3	2.8 ±1.0	2.2 ±0.8	3.9* ±0.2
NI		2.9 ±0.8	1.8 ±0.3	7.6 ±2.0	3.0 ±1.6
I/S		1.7 ±0.04	1.7 ±0.03	1.73 ±0.05	1.6 ±0.02

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

Para saber si al paso del tiempo, aunado al desarrollo de la diabetes y la hipertensión continúan los cambios en la composición de ácidos grasos, se determinó el contenido de éstos en hígados de SHR a los 6 meses de edad. En la tabla 8 se observa el porcentaje de los diferentes ácidos grasos en los 4 grupos de SHR. Hubo algunas modificaciones importantes que surgieron a través del tiempo, además de la influencia que tuvo la diabetes y la hipertensión.

Como ejemplo de dichas modificaciones tenemos al ALA. En la gráfica 21A, se ve el contenido de este ácido graso en hígado. A los 6 meses de edad las SHR muestran un bajo porcentaje de este ácido graso. Es importante señalar que durante todo el estudio las SHR tuvieron porcentajes bajos y a los 6 meses no fue la excepción. A esta edad, los animales muestran un 0.5% de este ácido graso. Por su parte, las SHR-STZ tuvieron un porcentaje similar (0.6%) a la misma edad. Es posible que la hiperglicemia y la hipertensión hayan sido un factor importante para que las SHR-STZ presentaran un bajo contenido de este ácido graso a los 6 meses de vida. En el caso de las ratas suplementadas (SHR-AL) el porcentaje de ALA fue alto a los 6 meses de edad (3.7%) al igual que en las SHR-STZ-AL (1.5%). Estos porcentajes quizás son consecuencia del alto contenido de ALA en el aceite de linaza.

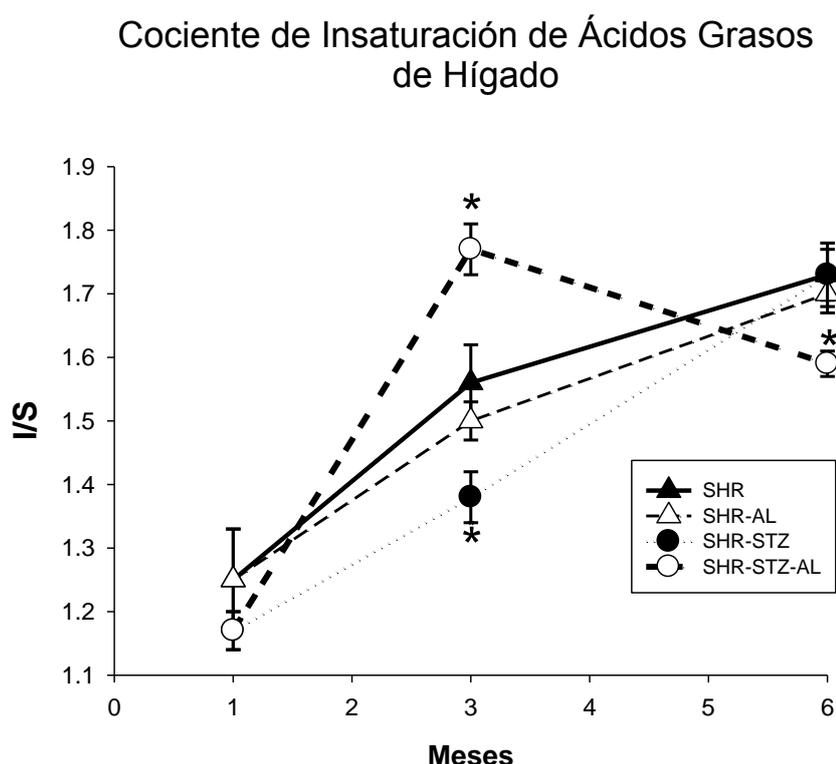


**Fig. 21.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en hígados de los grupos de SHR, SHR-AL, SHR-STZ y SHR-STZ-AL a 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido  $\alpha$  linolénico. **B)** Cambios del ácido araquidónico. n=6 \*(P <0.05).

En lo que respecta al ácido araquidónico, el contenido de este ácido graso en hígado fue similar en los grupos de animales, no obstante, las SHR-STZ presentaron el menor porcentaje en comparación a los grupos restantes. En las SHR, el ácido araquidónico fue de 18.2% a los 6 meses de vida. A la misma edad, las SHR-AL mostraron un contenido de 20.1%, un porcentaje

ligeramente más alto. Por su parte y como se había mencionado, las SHR-STZ tuvieron una menor proporción (14.1%) respecto a los otros grupos, caso contrario, las SHR-STZ-AL presentaron un porcentaje más alto (20.2%).

Se analizó el I/S de hígado a diferentes edades (Fig. 22B) y se observa que este cociente tiende a aumentar al paso del tiempo, sin embargo, en las SHR-STZ-AL el cociente fue mayor a los 3 meses de edad. Se puede decir, que el aceite de linaza contribuyó al aumento en el cociente de insaturación en este grupo de animales.



**Fig. 22.** Cociente de insaturación de ácidos grasos de hígados de los grupos de SHR a 1,3 y 6 meses de edad. n=6 \*(P <0.05).

A los 6 meses de edad, el I/S tiende a aumentar, sin embargo las SHR-STZ-AL no muestran la misma tendencia, en el caso de estos animales hubo un ligero decremento.

En términos generales, se observa que a las diferentes edades y durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión ocurren cambios en el contenido de ácidos grasos, en específico de los ácidos grasos poliinsaturados. Estos cambios pueden ser un factor importante en las complicaciones que surgen con el padecimiento de estas enfermedades. Sin embargo, cuando suministramos el AL se ve que el contenido de los ácidos grasos  $\omega$ -3 fue más alto, en concreto el

ALA y el EPA, de tal suerte que un alto porcentaje de estos ácidos grasos puede tener efectos benéficos previniendo las complicaciones de la diabetes y la hipertensión.

### 6.8 Composición de ácidos grasos de riñón de SHR

Las complicaciones de la DM2 afectan a varios órganos vitales, además de favorecer el desarrollo de diferentes padecimientos como arteriopatía coronaria, neuropatía e insuficiencia renal. Esta última complicación origina gran parte de los casos de morbilidad y exceso de mortalidad vinculados con la diabetes mellitus. Se ha propuesto que los ácidos grasos juegan un papel importante en la función del riñón. En ese sentido, se sabe que los ácidos grasos esenciales de 20 carbonos (EPA y ácido araquidónico) participan en la síntesis de los eicosanoides.

**Tabla 9. Composición de ácidos grasos (mol%) de riñones de SHR**

		Riñón 1 mes	
		Mol%	
Acidos Grasos		SHR Promedio	SHR-STZ Promedio
Mirístico	C14:0	1.4 ±0.7	1.6 ±0.2
Palmítico	C16:0	21.9 ±2.3	23.9 ±1.5
Palmitoleico	C16:1	2.0 ±0.5	0.5* ±0.0
Esteárico	C18:0	17.1 ±2.1	16.3 ±1.8
Oleico	C18:1	16.8 ±2.7	16.1 ±1.4
Linoleico	C18:2	14.8 ±2.0	17.6 ±1.5
γ Linolénico	C18:3	0.2 ±0.2	0.4 ±0.0
α Linolénico	C18:3	0.0 ±0.0	0.2 ±0.0
Araquidato	C20:0	0.0 ±0.0	0.6 ±0.1
Araquidónico	C20:4	14.6 ±0.4	16.5* ±1.0
EPA	C20:5	0.2 ±0.1	0.7* ±0.2
DHA	C22:6	5.2 ±2.1	4.8 ±1.2
NI		4.7 ±1.4	5.2 ±1.8
I/S		1.33 ±0.09	1.35 ±0.08

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

La composición de ácidos grasos en riñón de SHR y SHR-STZ se muestra en la tabla 9. Al mes de vida, hubo pocas diferencias entre ambos grupos, sin embargo se pueden observar algunas alteraciones. Ejemplo de ello se ve en el porcentaje de ácido araquidónico, ácido graso

$\omega$ -6 precursor de prostaglandinas de la serie 2 y leucotrienos de la serie 4. En las SHR el contenido de este ácido graso fue de 14.6%, en las SHR-STZ, el porcentaje de araquidónico fue ligeramente mayor (16.5%). Otro ácido graso que muestra diferencias es el EPA, ácido graso  $\omega$ -3 precursor de prostaglandinas de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5. En las SHR, el porcentaje de EPA fue de 0.2% mientras que en las SHR-STZ el contenido de este ácido graso fue más alto (0.7%). Los porcentajes anteriores muestran que el desequilibrio de los ácidos grasos mencionados, inicia desde las primeras semanas de vida, lo cual podría tener repercusión importante en el desarrollo de la diabetes y la hipertensión.

Al analizar la composición de ácidos grasos de riñón a los 3 meses de vida se observaron algunas modificaciones. Es posible que al paso del tiempo, el contenido de ácidos grasos sufra cambios, sin embargo también pueden deberse a la hipertensión y/o la diabetes que padecieron estos animales.

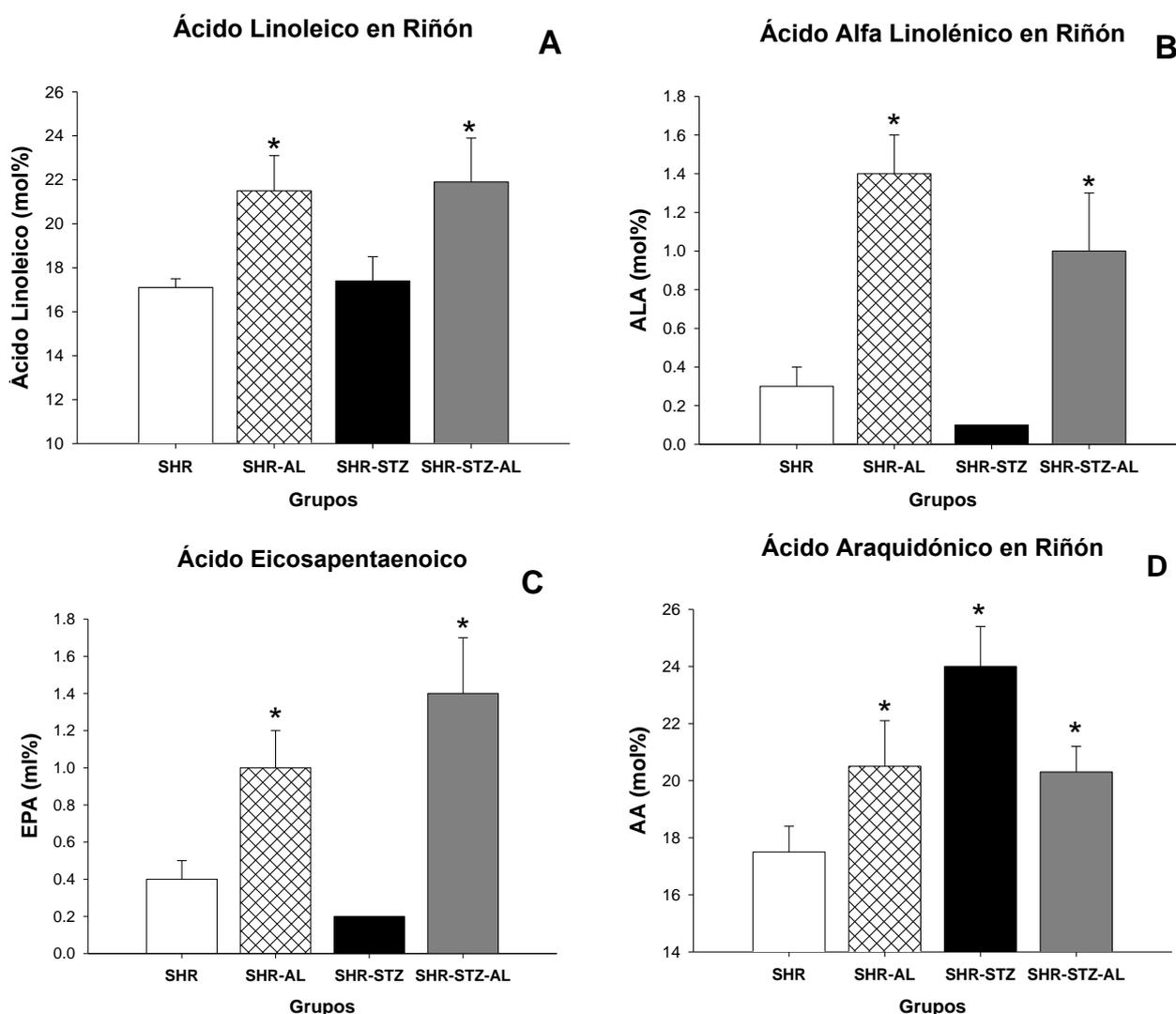
**Tabla 10. Composición de ácidos grasos (mol%) de riñones de SHR**

		Riñón 3 meses Mol%							
Ácidos Grasos		SHR Promedio		SHR-AL Promedio		SHR-STZ Promedio		SHR-STZ-AL Promedio	
Mirístico	C14:0	0.8	±0.2	0.8	±0.1	0.0	±0.0	1.1	±0.6
Palmítico	C16:0	22.9	±1.8	20.2	±1.3	19.9	±1.0	21.0	±1.6
Palmitoleico	C16:1	1.6	±0.4	1.3	±0.6	0.3*	±0.1	1.0	±0.5
Esteárico	C18:0	16.1	±0.7	15.1	±1.4	19.5	±2.0	16.5	±2.8
Oleico	C18:1	18.1	±2.4	14.2	±1.8	13.5*	±1.9	13.9	±3.1
Linoleico	C18:2	17.1	±0.4	21.5*	±1.6	17.4	±1.1	21.9*	±2.0
$\alpha$ Linolénico	C18:3	0.3	±0.1	1.4*	±0.2	0.1	±0.0	1.0*	±0.3
Araquidónico	C20:4	17.5	±0.9	20.5*	±1.0	24.0*	±1.4	20.3*	±0.6
EPA	C20:5	0.4	±0.1	1.0*	±0.2	0.2	±0.0	1.4*	±0.3
DHA	C22:6	1.8	±0.4	1.6	±0.4	1.9	±0.1	1.5	±0.5
NI		3.0	±1.4	2.4	±1.3	7.0	±2.5	2.3	±2.1
I/S		1.42	±0.04	1.72	±0.05	1.45	±0.05	1.57	±0.04

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

En la tabla 10 se muestra la composición de ácidos grasos del riñón a los 3 meses de edad. Entre los grupos, hubo variaciones en la proporción de los ácidos grasos. Un ejemplo, se observa en el ácido linoleico (Fig. 23A) el cual se presentó en un 17.1% en las SHR. En lo que respecta a

las SHR-STZ, este ácido graso tuvo un porcentaje muy similar al de las SHR (17.4%). En ambos grupos, la hipertensión ya se había establecido a los 3 meses de vida, es probable que la similitud que muestran en el menor contenido de ácido linoleico se deba al desarrollo de esta enfermedad. Por otro lado las SHR-AL tuvieron un contenido más abundante de dicho ácido graso, en la figura 23A se puede ver que en este grupos de animales el porcentaje de ácido linoleico fue de 21.5%, por su parte las SHR-STZ-AL tuvieron una proporción similar de este ácido graso 21.9%.



**Fig. 23.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en hígados de los grupos de SHR, SHR-AL, SHR-STZ y SHR-STZ-AL a 3 meses de edad. **A)** Cambios del ácido linoleico. **B)** Cambios del ácido  $\alpha$  linolénico. **C)** Cambios del ácido eicosapentaenoico. **D)** Cambios del ácido araquidónico. n=6 \*(P <0.05).

El ALA mostró variaciones en los grupos de animales a 3 meses de edad. El contenido de dicho ácido graso en riñón de los grupos se muestra en la figura 23B. Las SHR presentaron un

porcentaje muy bajo de ALA (0.3%), posiblemente, porque el contenido de este ácido graso en la dieta fue muy bajo, aunque también pudo haber contribuido el desarrollo de la hipertensión.

Las SHR-STZ, tuvieron una proporción todavía más baja de ALA (0.1%), este grupo cursó con la hipertensión desde la séptima semana de edad, además de presentar hiperglicemia. Aunado a las patologías, el alimento que consumieron presentó un bajo contenido de ALA. Estos factores, quizá influyeron para el bajo porcentaje de ALA que tuvieron los riñones de las SHR-STZ.

Caso contrario al de los grupos anteriores, las ratas SHR-AL y SHR-STZ-AL muestran un porcentaje alto de ALA. Las SHR-AL tuvieron un contenido de 1.4% de este ácido graso mientras que en las SHR-STZ-AL la proporción fue de 1.0%. En el caso de estos grupos, el aumento del ALA se debe al suplemento de AL, el cual como ya se ha dicho anteriormente, tiene una proporción elevada de  $\alpha$  linolénico y consecuentemente, este porcentaje se ve reflejado en el riñón de SHR-AL y SHR-STZ-AL.

En lo que respecta al EPA (Fig.23C) se observan diferencias entre grupos en el porcentaje de dicho ácido graso a los 3 meses de edad. Las SHR muestran una proporción baja de EPA (0.4%) al igual que las SHR-STZ las cuales tuvieron 0.2% del mismo ácido graso. Cabe señalar que el ácido graso precursor de EPA, ALA, también mostró un porcentaje bajo y por consecuencia, que el EPA presente en el riñón de estos animales tuviera una pequeña proporción. En los grupos suplementados con el AL vemos que el EPA fue más abundante. En las SHR-AL y SHR-STZ-AL el contenido de este ácido graso fue de 1.0 y 1.4% respectivamente. En estos grupos, el ALA tuvo un alto porcentaje y, por lo tanto, la proporción de EPA también fue alta.

El ácido araquidónico también se vio afectado con el paso del tiempo, aunado a la diabetes y la hipertensión. Éste ácido graso desempeña un papel importante en la función del riñón y en el desarrollo de la hipertensión. Por lo tanto, alguna modificación en el contenido de ácido araquidónico puede repercutir en la presión arterial. En la figura 23D se observa que las SHR presentaron la proporción más baja de ácido araquidónico en comparación a los grupos restantes. En estos animales el porcentaje fue de 17.5%. Por otro lado las SHR-STZ tienen el porcentaje más alto respecto a los otros grupos (24%).

En el caso de las SHR-AL y SHR-STZ-AL (Fig. 23D) el contenido de ácido araquidónico fue similar en ambos grupos (20.5 y 20.3% respectivamente). Cabe señalar que a esta edad (3 meses) aún no se había desarrollado la hipertensión en ambos grupos y la concentración de glucosa se mantuvo en un nivel basal. Tal vez por ese control de la glicemia, el porcentaje de ácido araquidónico que presentan estos animales sea similar a esta edad.

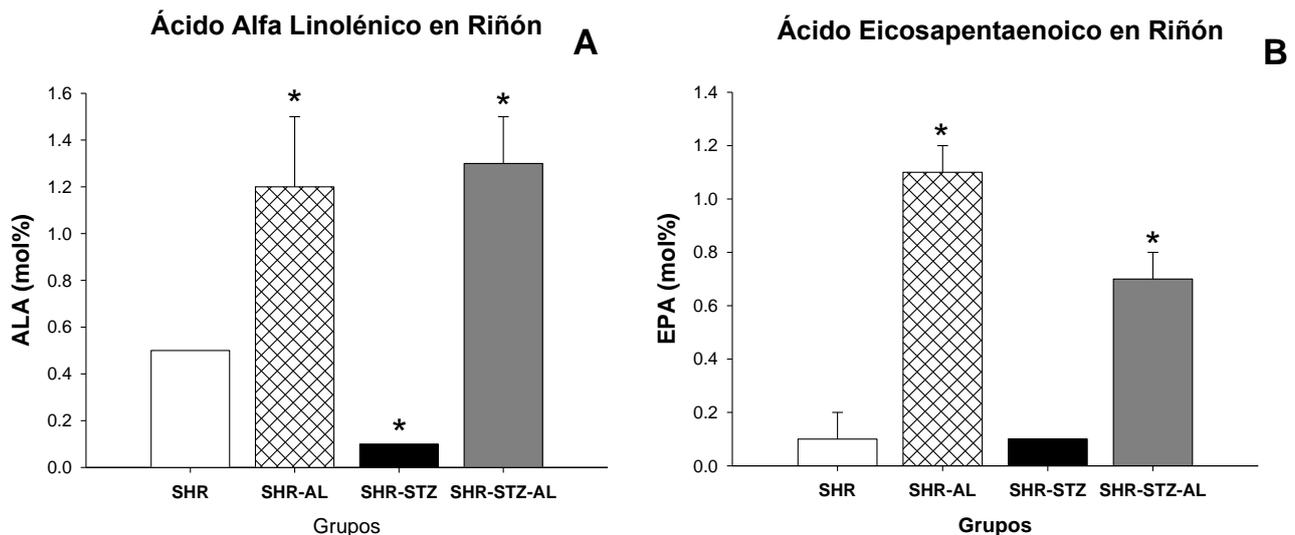
**Tabla 11. Composición de ácidos grasos (mol%) de riñones de SHR**

Ácidos Grasos		Riñón 6 meses Mol %							
		SHR		SHR-AL		SHR-STZ		SHR-STZ-AL	
		Promedio		Promedio		Promedio		Promedio	
Mirístico	C14:0	0.0	±0.0	0.6*	±0.2	0.0	±0.0	0.0	±0.0
Palmitico	C16:0	19.8	±0.2	18.7	±1.5	21.1*	±0.5	18.3*	±1.0
Palmitoleico	C16:1	1.3	±0.1	1.1	±0.5	0.5*	±0.3	0.9	±0.3
Esteárico	C18:0	12.3	±0.2	16.0*	±2.2	16.8*	±0.9	15.4*	±1.7
Oleico	C18:1	17.6	±0.7	14.1*	±1.2	15.9	±2.1	13.4*	±2.8
Linoleico	C18:2	27.6	±0.4	23.5*	±3.1	20.2*	±2.0	23.1*	±3.4
α Linolénico	C18:3	0.5	±0.0	1.2*	±0.3	0.1*	±0.0	1.3*	±0.2
Araquidónico	C20:4	15.1	±0.1	18.2*	±0.8	23.4*	±1.0	20.7*	±3.2
EPA	C20:5	0.1	±0.0	1.1*	±0.1	0.1	±0.0	0.7*	±0.1
DHA	C22:6	0.9	±0.1	1.1	±0.1	1.7	±0.8	1.4	±0.1
NI		2.8	±0.4	4.3	±2.0	4.8	±1.2	4.0	±2.1
I/S		1.96	±0.05	1.7	0.04	1.63	0.06	1.82	0.04

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

En la tabla 11 se muestra que al llegar a los 6 meses de edad, ocurrieron modificaciones en el contenido de ácidos grasos de riñón de los grupos de SHR. Para ejemplificar la modificación de dichos ácidos grasos en el riñón se muestra el contenido de ALA en la figura 24A. En las SHR este ácido graso tuvo un porcentaje de 0.5%, en el caso de las SHR-STZ la proporción fue todavía menor (0.1%). Se reporta que durante la diabetes y la hipertensión el contenido de los ácidos grasos esenciales y en específico los ácidos ω-3, sufre modificaciones reflejándose en un menor porcentaje (Delachambre *et al.*, 1998, Pérez *et al.*, 2010). Los resultados de este estudio son coherentes con lo antes referido ya que el ALA, un ácido graso ω-3, tuvo un bajo porcentaje.

En las SHR-AL y SHR-STZ-AL la proporción de ALA en riñón fue mayor. En las SHR-AL el contenido fue de 1.2%, mientras que las SHR-STZ-AL tuvieron un porcentaje de 1.3%. Se puede decir, que el AL favoreció un mayor contenido de ácido α linolénico en el riñón de estos animales. Es posible que el contenido relativamente alto de dicho ácido graso contribuyera a retrasar el desarrollo de la hipertensión.



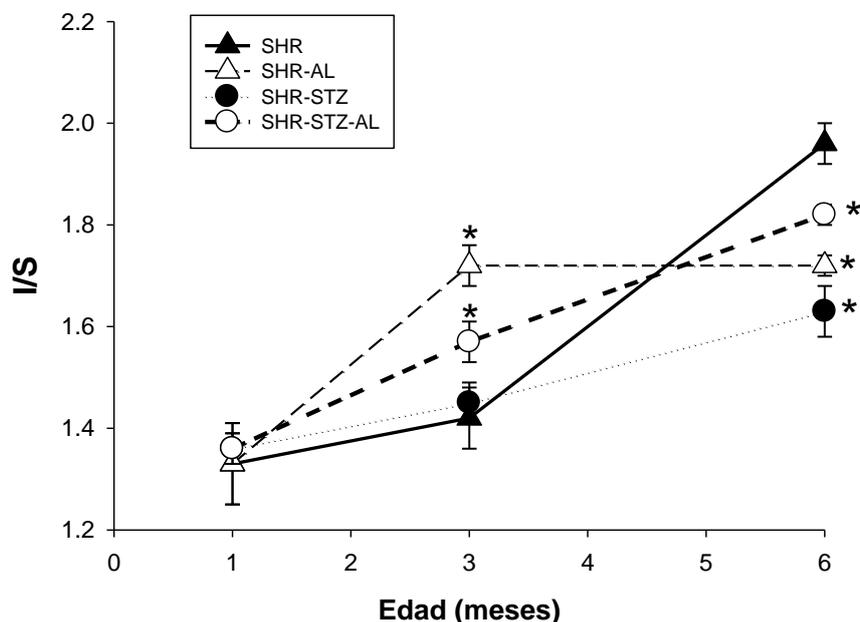
**Fig. 24.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en riñones de los grupos de SHR, SHR-AL, SHR-STZ y SHR-STZ-AL a 3 meses de edad. **A)** Cambios del ácido  $\alpha$  linolenico. **B)** Cambios del ácido eicosapentaenoico. n=6 \*(P <0.05).

Otro ácido graso  $\omega$ -3 que mostró una variación en su porcentaje fue el EPA. La figura 24B muestra el contenido de EPA en riñón de las SHR. En este grupo, al igual que en las SHR-STZ el contenido fue muy bajo (0.1%). Por su parte las SHR-AL presentaron un contenido más abundante (1.1%). En el caso de las SHR-STZ-AL también se ve un porcentaje alto en comparación de los grupos no suplementados (0.7%).

Una vez que se determinó la composición de ácidos grasos de riñón de los cuatro grupos de SHR, se obtuvo el I/S para observar el efecto de la disminución o en su caso un aumento de los ácidos grasos poliinsaturados durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión. En la figura 25 se puede ver que a los 3 meses de edad, las SHR y las SHR-STZ mostraron un cociente menor en comparación a las ratas suplementadas. Sin embargo en las SHR hubo un considerable aumento en el I/S a la edad de 6 meses.

Por su parte las ratas suplementadas con el AL tuvieron un aumento en el I/S a los 3 meses de edad siendo mayor en las SHR-AL y se mantuvieron así hasta los 6 meses de edad

### Cociente de Insaturación de Ácidos Grasos de Riñón



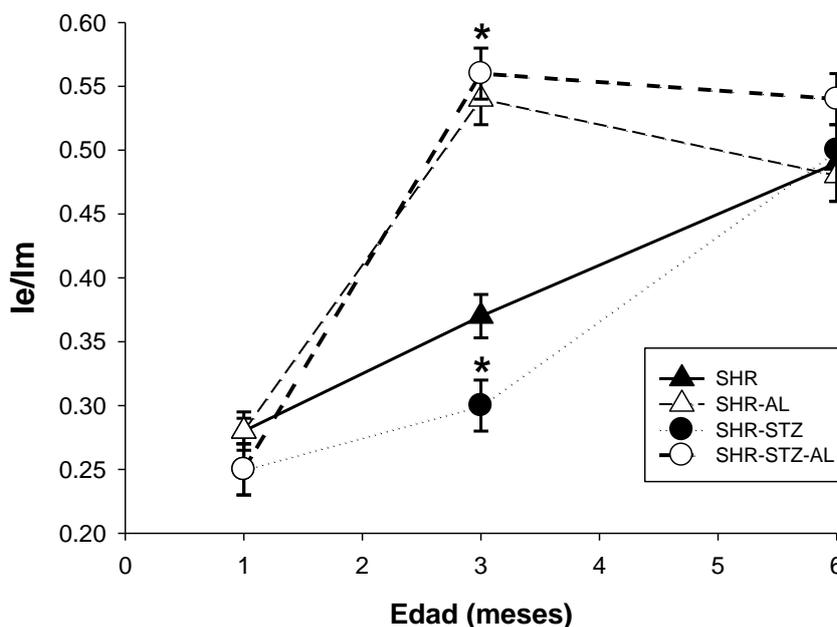
**Fig. 25.** Cociente de insaturación de ácidos grasos de riñón de los grupos de SHR a 1,3 y 6 meses de edad. n=6 \*(P <0.05).

#### 6.9 Fluidez membranal en microsomas de hígado

Para realizar mediciones de fluidez membranal se han utilizado diferentes modelos de membranas, como son los fantasmas de eritrocitos y los microsomas. Estos últimos, son utilizados como un referente de las modificaciones que ocurren en las membranas celulares de diferentes órganos. Es posible que durante el desarrollo de la diabetes e hipertensión ocurran cambios en la fluidez de la membrana de hígado y riñón a diferentes edades lo que contribuye a las complicaciones de estas enfermedades conforme progresan.

Por lo anterior se realizaron mediciones de fluidez membranal en microsomas de hígado para observar las modificaciones en estas membranas a través del tiempo, así como durante el desarrollo de la hipertensión y/o la diabetes.

## Fluidez membranal en Microsomas de Hígado



**Fig. 26.** Fluidez membranal detectada por el monitor de fluorescencia DPiP en microsomas de hígado de SHR a 1, 3 y 6 meses de edad.  $n=6$  \*( $P < 0.05$ ).

En la figura 26 se puede ver la fluidez membranal de microsomas de hígado de los 4 grupos de SHR, dada por el cociente  $le/lm$  del DPiP. Al mes de edad, la fluidez que presentaron los 4 grupos de animales fue similar, cabe señalar que en el caso de las SHR-AL y SHR-STZ-AL aun no se había administrado el suplemento de AL.

A los 3 meses de vida, la fluidez de los microsomas en los 4 grupos tiende a aumentar, sin embargo, en las SHR-AL y las SHR-STZ-AL el incremento fue mayor. Es probable que el AL favoreciera este aumento. Como una posible explicación se puede decir que el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados haya sido más abundante en las membranas de SHR-AL y SHR-STZ-AL y de esa manera favoreciera un aumento en la fluidez de estos animales. Por su parte, las SHR y SHR-STZ presentaron un ligero incremento en su fluidez membranal a la misma edad (3 meses).

A los 6 meses de vida, las SHR-AL mostraron un decremento discreto en la fluidez membranal de los microsomas mientras que, al medir la fluidez de las SHR-STZ-AL, el DPiP reportó la misma fluidez reportada a los 3 meses de vida. En lo que respecta a los microsomas de SHR y SHR-STZ, tuvieron un incremento en su fluidez, siendo igual a la reportada en los grupos suplementados con el aceite de linaza.

Los resultados de fluidez membranal reportados por el cociente  $le/lm$  del DPiP reflejan modificaciones en las membranas de microsomas de hígado durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión. Así mismo, el suplemento de aceite de linaza parece haber contribuido a un aumento de la fluidez membranal. En el caso de las ratas suplementadas con el AL se observa un mayor aumento en la fluidez de sus membranas a partir del mes de edad, después incrementó considerablemente a los 3 meses de edad y se mantuvo así hasta los 6 meses de vida. Se analizó la composición de ácidos grasos de las membranas microsomales de hígado en los diferentes grupos de SHR para saber si, al igual que en los fantasmas de eritrocitos, la fluidez membranal depende primordialmente de la composición de ácidos grasos.

### **6.10 Composición de ácidos grasos de microsomas de hígado en SHR**

En la tabla 12 se muestra el contenido de los diferentes ácidos grasos en microsomas de hígado de SHR y SHR-STZ al mes de vida. A esta edad, se observan cambios entre los dos grupos. Como ejemplo de las modificaciones se muestra al ácido palmítico. En las SHR la proporción de este ácido graso fue de 20.6%, por su parte las SHR-STZ tuvieron un mayor contenido de ácido palmítico (28.9%). Es importante mencionar que en el caso de este último grupo, se presentó hiperglicemia desde los primeros días de vida (Fig.2). Probablemente la diabetes de estos animales influyó el incremento de este ácido graso en las membranas microsomales.

En la tabla 12, se puede ver que el ácido araquidónico también mostró diferencias entre los dos grupos de animales al mes de edad. Los microsomas de hígado de las SHR tuvieron un contenido de 23.9%. Por su parte las membranas microsomales de SHR-STZ mostraron una menor proporción de este ácido graso a la misma edad (16.1%).

Tabla 12. Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de hígado (1 mes de edad)

		Microsomas Hígado 1 mes Mol%			
Ácidos Grasos		SHR Promedio		SHR-STZ Promedio	
Mirístico	C14:0	0.4	±0.2	0.4	±0.2
Palmítico	C16:0	20.6	±0.5	28.9*	±0.5
Palmitoleico	C16:1	2.6	±0.7	2.6	±0.7
Esteárico	C18:0	23.7	±1.2	23.7	±1.2
Oleico	C18:1	8.7	±0.8	4.2*	±0.8
Linoleico	C18:2	11.3	±0.7	15.4*	±0.7
γ Linolénico	C18:3	0.4	±0.0	0.4	±0.0
CLA	C18:2	0.2	±0.1	0.2	±0.1
α Linolénico	C18:3	0.0	±0.0	0.0	±0.0
Araquidónico	C20:4	23.9	±0.5	16.1*	±0.5
EPA	C20:5	0.1	±0.2	0.1	±0.2
DHA	C22:6	6.5	±0.2	6.5	±0.2
NI		1.5	±0.4	1.5	±0.4
I/S		1.2	±0.06	0.9	±0.09

Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

Al parecer la diabetes pudo haber modificado la composición de ácidos grasos de SHR-STZ desde el primer mes de edad. Es probable que al paso del tiempo, aunado a las patologías presentes en estos animales, continúen las modificaciones de los ácidos grasos de las membranas de microsomas.

Continuando con el análisis de los ácidos grasos de microsomas de hígado se observa que a los 3 meses de edad hubo diferencias entre los grupos de SHR. La edad, la hipertensión y en algunos casos la diabetes, parecen haber influido en los cambios que se presentaron a esta edad.

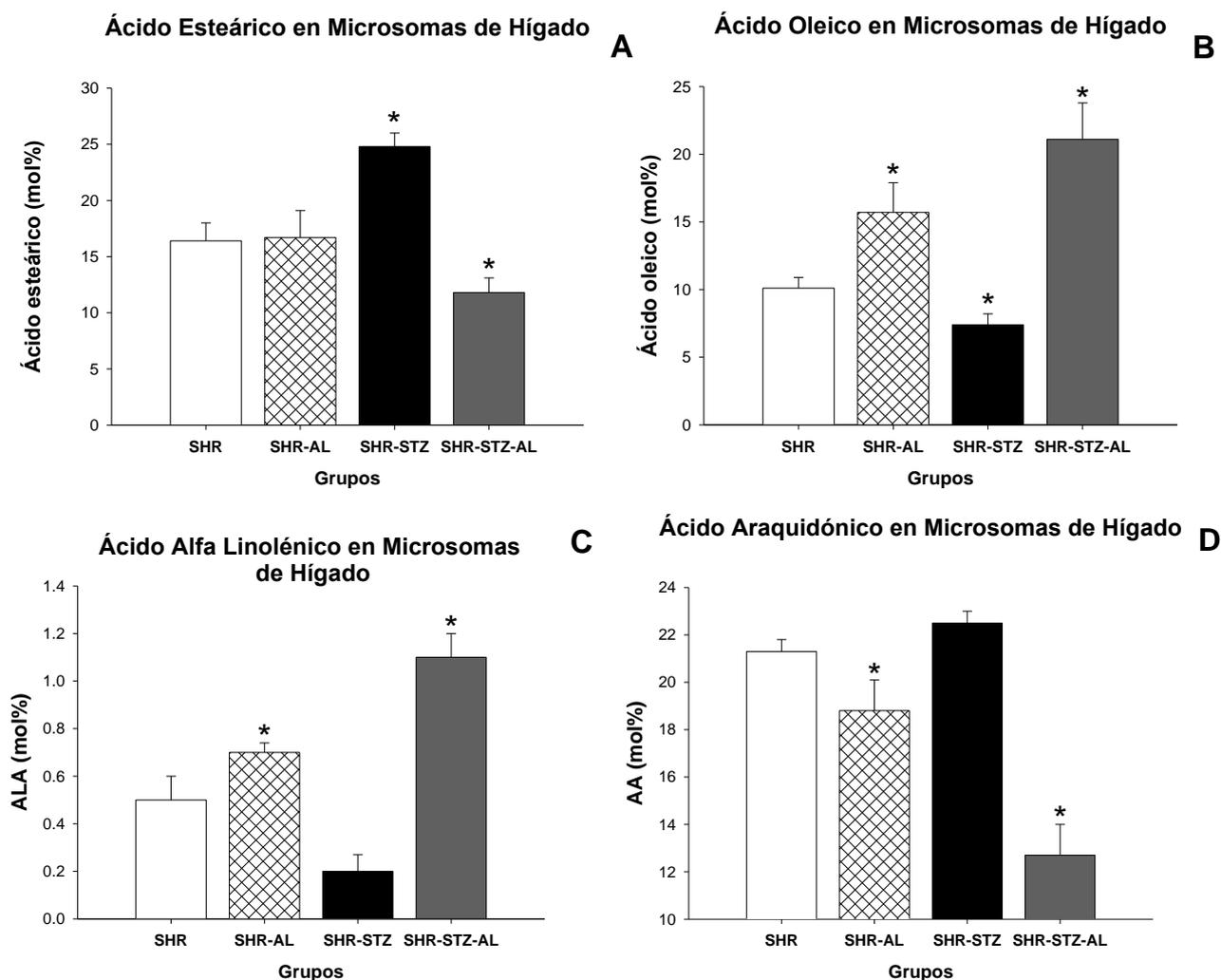
Tabla 13. Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de hígado (3 meses de edad)

		Microsomas Hígado 3 meses Mol%							
Ácidos Grasos		SHR Promedio		SHR-AL Promedio		SHR-STZ Promedio		SHR-STZ-AL Promedio	
Mirístico	C14:0	0.3	±0.2	0.4	±0.0	0.4	±0.2	0.3	±0.1
Palmítico	C16:0	21.8	±0.7	19.0	±2.6	19.5	±0.5	23.5	±1.1
Palmitoleico	C16:1	1.0	±0.7	0.4	±0.1	2.6*	±0.7	0.9	±0.1
Estearico	C18:0	16.4	±1.6	16.7	±2.4	24.8*	±1.2	11.8*	±1.3
Oleico	C18:1	10.1	±0.8	15.7*	±2.2	7.4*	±0.8	21.1*	±2.7
Linoleico	C18:2	19.2	±0.7	20.2	±0.8	12.7*	±0.7	24.6*	±0.6
γ Linolénico	C18:3	1.2	±0.2	0.3*	±0.2	0.4*	±0.0	0.2*	±0.2
CLA	C18:2	0.4	±0.1	0.7*	±0.04	0.2	±0.07	1.1*	±0.1
α Linolénico	C18:3	0.0	±0.0	0.6*	±0.2	0.0	±0.0	0.5*	±0.5
Araquidónico	C20:4	21.3	±0.5	18.8*	±1.3	22.5	±0.5	12.7*	±1.3
EPA	C20:5	0.3	±0.1	2.1*	±0.5	0.1	±0.1	0.3*	±0.0
DHA	C22:6	7.3	±0.2	3.3*	±0.3	7.6*	±0.2	2.3*	±0.2
NI		0.6	±0.4	1.1	±0.6	1.5	±0.4	1.0	±0.5
I/S		1.58	±0.3	1.70	±0.2	1.23	±0.1	1.74	±0.3

Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

En la tabla 13 se observa la composición de ácidos grasos en microsomas de hígado a los 3 meses de edad. Los 4 grupos presentan diferencias en el porcentaje de la composición lipídica de sus membranas. Como ejemplo de las modificaciones que se generaron a los 3 meses de edad se muestra al ácido esteárico. En la figura 27A se puede ver que las SHR tuvieron un porcentaje de 16.4%. En el caso de las SHR-STZ el contenido de este ácido graso fue abundante (24.8%), siendo mayor a diferencia de los grupos restantes.

En lo que respecta a los grupos suplementados con AL (SHR-AL), el contenido de ácido esteárico fue 16.7%, muy similar al porcentaje de las SHR. Por su parte, las SHR-STZ-AL tuvieron un 11.8%, en este grupo de animales, se presentó la menor proporción de ácido esteárico respecto a los otros grupos.



**Fig. 27.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en microsomas de hígado de los grupos de SHR, SHR-AL, SHR-STZ y SHR-STZ-AL a 3 meses de edad. **A)** Cambios del ácido esteárico. **B)** Cambios del ácido oleico. **C)** Cambios del ácido  $\alpha$  linolénico. **D)** Cambios del ácido araquidónico. n=6 \*(P <0.05).

El ácido oleico mostró variaciones entre los grupos de animales (Fig. 27B). Las SHR tuvieron un porcentaje de 10.1%, en el caso de las SHR-STZ presentaron una menor proporción de ácido oleico (7.4%). Las SHR-AL mostraron un contenido más abundante de dicho ácido graso, en estos animales la proporción fue de 15.7%. Asimismo, en las SHR-STZ-AL el porcentaje de ácido linoleico fue todavía más alta (21.1%) comparándolo con los otros grupos.

Una constante en la composición de ácidos grasos de los órganos analizados (hígado y riñón), así como en las membranas de eritrocitos, ha sido los bajos porcentajes de ALA que presentan los animales no suplementados con AL. En el caso de los microsomas no fue la excepción. En la figura 27C se observa que el contenido de ALA en las SHR fue de 0.4%, mientras

que en las SHR-STZ la proporción de este ácido graso fue de 0.2%, siendo el grupo con el menor contenido de ALA.

Las ratas suplementadas con AL (SHR-AL y SHR-STZ-AL) presentaron un contenido más abundante de ALA, En las SHR-AL la proporción de ácido  $\alpha$  linolénico fue de 0.7% mientras que en las SHR-STZ-AL el porcentaje fue de 1.1%.

Otro ácido graso que mostró diferencias en su porcentaje fue el ácido araquidónico (Fig. 27D). En las SHR el contenido fue de 21.3% por su parte las SHR-STZ tuvieron un contenido ligeramente mayor (22.5%). En el caso de las SHR-AL la proporción de ácido araquidónico, fue ligeramente menor (18.8%) respecto a los grupos anteriores. Sin embargo fueron las SHR-STZ-AL (12.7%) las que presentaron el menor contenido de dicho ácido graso.

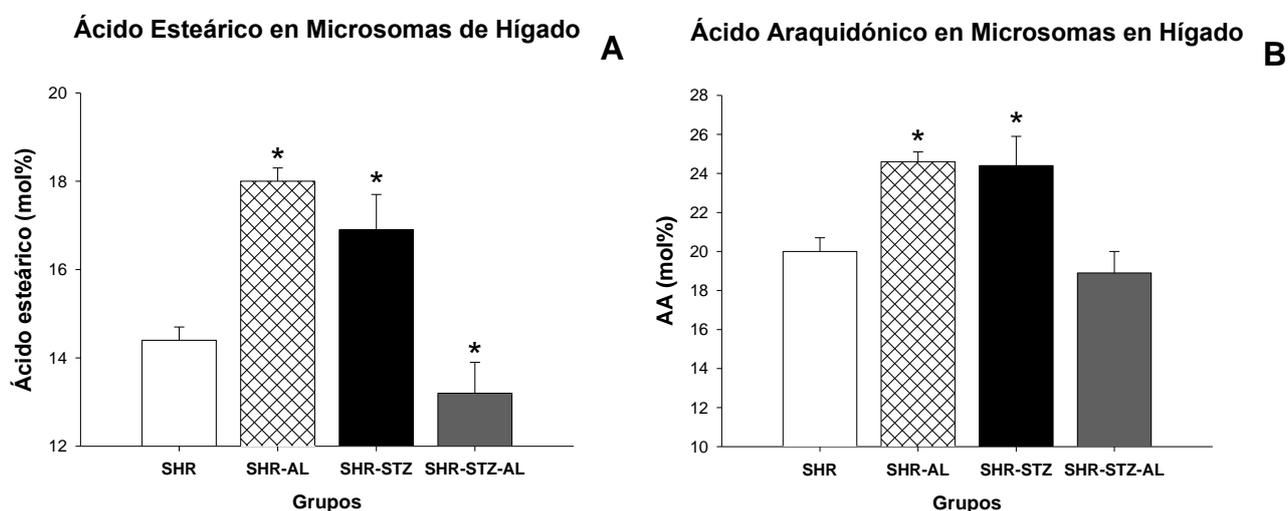
**Tabla 14. Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de hígado (6 meses de edad)**

		Microsomas Hígado 6 meses Mol%							
Ácidos Grasos		SHR Promedio		SHR-AL Promedio		SHR-STZ Promedio		SHR-STZ AL Promedio	
Mirístico	C14:0	0.3	±0.1	0.2	±0.1	0.2	±0.1	0.3	±0.1
Palmítico	C16:0	26.5	±1.3	20.5*	±1.1	23.5*	±1.3	24.1	±1.1
Palmitoleico	C16:1	0.8	±0.2	0.5	±0.1	0.7	±0.2	1.0	±0.1
Estearico	C18:0	14.4	±0.3	18.0*	±0.3	16.9*	±0.8	13.2*	±0.7
Oleico	C18:1	12.5	±1.0	9.3*	±0.1	11.4	±0.8	10.5	±3.4
Linoleico	C18:2	21.4	±0.3	20.9	±0.8	20.6	±2.4	25.3*	±1.5
$\gamma$ Linolénico	C18:3	0.5	±0.0	0.4	±0.1	0.6	±0.1	0.5	±0.1
CLA	C18:2	0.6	±0.1	0.6	±0.1	0.5	±0.1	1.1*	±0.2
$\alpha$ Linolénico	C18:3	0.5	±0.3	0.3	±0.2	0.5	±0.1	0.5	±0.2
Araquidónico	C20:4	20.0	±0.7	24.6*	±0.5	24.4*	±1.5	18.9	±1.1
EPA	C20:5	0.0	±0.0	0.4*	±0.1	0.1	±0.1	0.4*	±0.1
DHA	C22:6	2.3	±0.7	4.3*	±0.1	0.7	±0.4	3.7*	±0.9
NI		0.2	±0.0	0.1	±0.0	0.1	±0.0	0.1	±0.0
I/S		1.41	±0.2	1.58	±0.1	1.46	±0.1	1.64	±0.2

Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

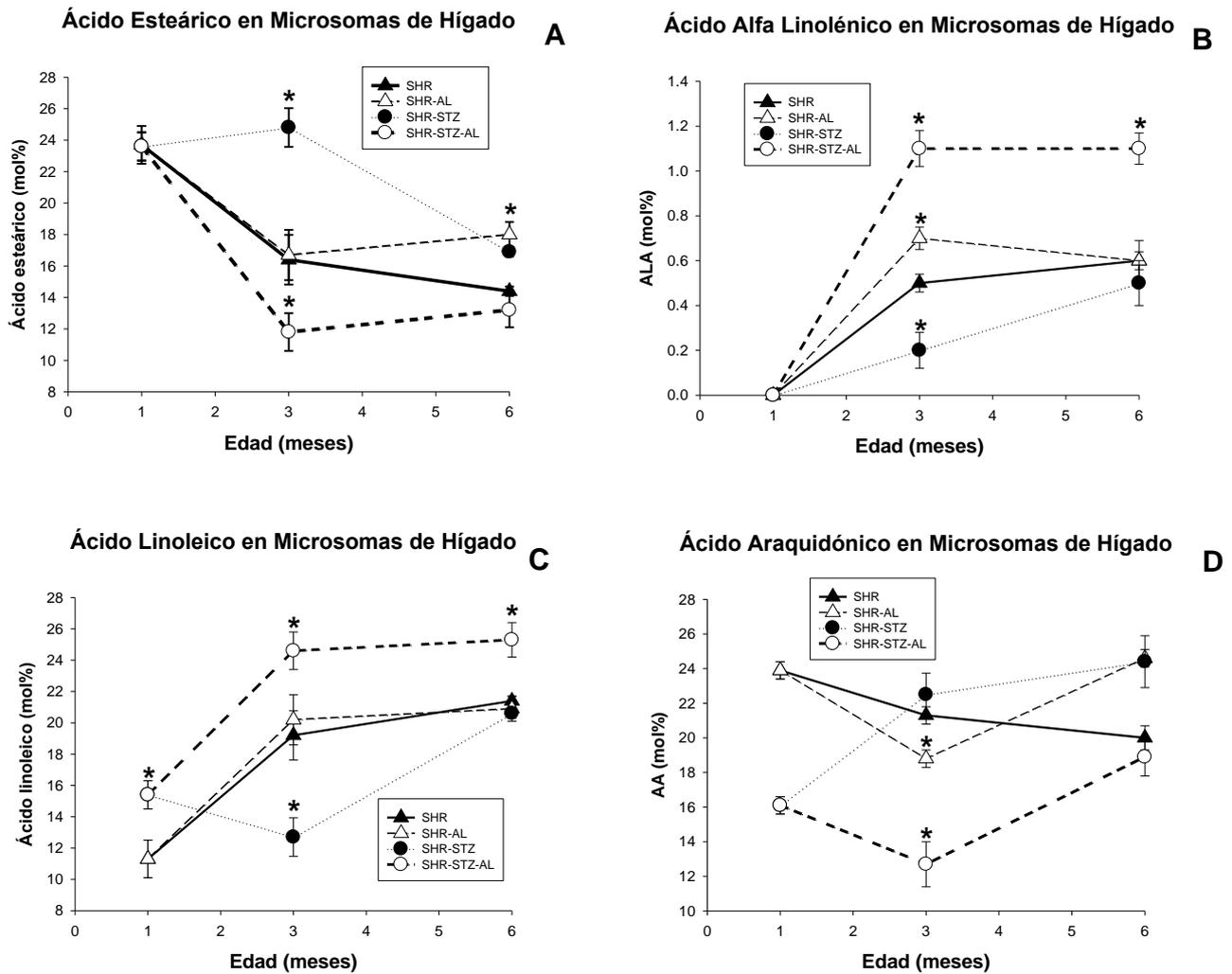
En la tabla 14 se observa la composición de ácidos grasos de microsomas de hígado de rata a los 6 meses de edad, se puede ver que ocurrieron modificaciones. Un ejemplo de estos cambios se observa en el ácido esteárico (Fig. 28A). En las SHR el contenido de este ácido graso fue de 14.4%. Por su parte las SHR-STZ tuvieron un 16.9%, un porcentaje más alto que el resto de los grupos. En el caso de las SHR-AL la proporción de ácido esteárico fue de 18%, mientras que en las SHR-STZ-AL el contenido fue menor (13.2%).

Otro ácido graso que muestra variaciones en su porcentaje fue el ácido araquidónico. En la figura 28B se puede ver que a los 6 meses de edad las SHR tuvieron un 20%, en el caso de las SHR-STZ la proporción fue mayor (24.4%). En lo que respecta a los animales suplementados con AL el contenido de este ácido graso fue de 24.6 y 18.9% (SHR-AL y SHR-STZ-AL respectivamente).



**Fig. 28.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en microsomas de hígado de los grupos de SHR, SHR-AL, SHR-STZ y SHR-STZ-AL a 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido esteárico. **B)** Cambios del ácido araquidónico. n=6 **\*(P <0.05)**.

Al paso del tiempo se observaron cambios importantes en el contenido de ácidos grasos de los diferentes grupos. No se descarta que las patologías involucradas (diabetes e hipertensión) hayan favorecido estas modificaciones. En algunos casos hubo ácidos grasos que mostraron un decremento a través del tiempo, como en el caso del ácido esteárico (Fig. 29A). Otros ácidos grasos como el ácido  $\alpha$  linolénico (Fig. 29B) tendieron a incrementar al paso de los meses. Sin embargo, aunque los cuatro grupos muestran un aumento de este ácido graso, fue en las SHR-AL y SHR-STZ-AL donde se vio un mayor incremento.



**Fig. 29.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en microsomas de hígado de SHR, SHR-AL, SHR-STZ y SHR-STZ-AL a 1, 3 y 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido esteárico. **B)** Cambios del ácido  $\alpha$  linoléico. **C)** Cambios del ácido linoleico **D)** Cambios del ácido araquidónico. n=6 \*(P <0.05).

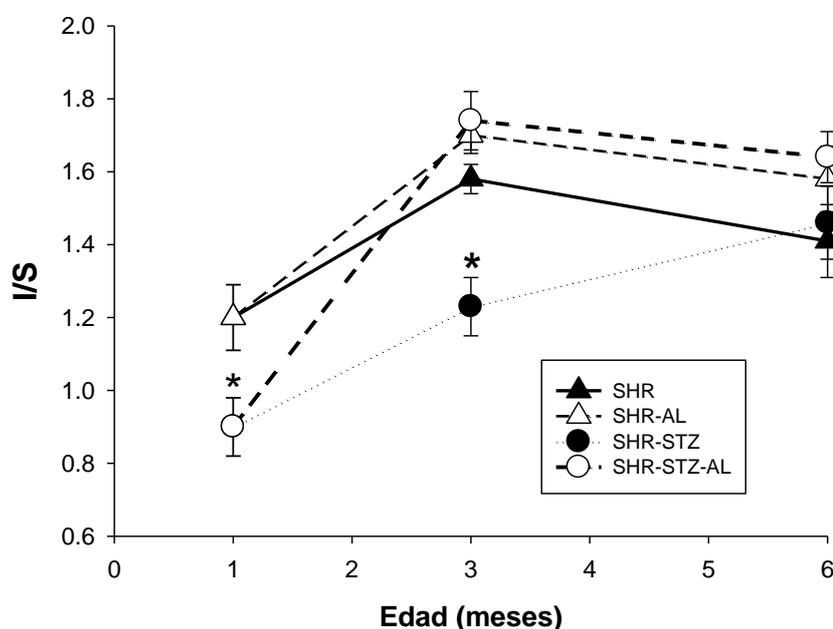
Al transcurso de los meses el ácido linoleico mostró una tendencia a aumentar a partir del primer mes de vida, exceptuando el grupo de las SHR-STZ, en este grupo, fue hasta los 3 meses de edad cuando mostraron un incremento en el porcentaje de ácido linoleico (Fig. 29C).

Por su parte el ácido araquidónico también mostró variaciones en su porcentaje en los grupos de animales a través del tiempo. En el caso de este ácido graso, su patrón fue un tanto irregular. Por ejemplo, en las SHR-AL el contenido disminuyó a los 3 meses de edad, sin embargo, aumentó a los 6 meses de vida. En el caso de las SHR-STZ-AL se observa que a los 3 meses de vida hubo un decremento en el porcentaje de araquidónico, sin embargo, aumentó considerablemente a los 6 meses.

Al analizar el I/S se puede ver que los grupos suplementados con el AL tuvieron un incremento en dicho cociente a partir del primer mes de edad y se estabilizó a partir de los 3 meses de vida. Es posible que el AL favoreciera el aumento en la fluidez de microsomas de SHR-AL y SHR-STZ-AL.

En el caso de los animales diabéticos (SHR-STZ) el I/S aumentó a partir del mes de vida y se mantuvo así hasta los 6 meses de edad; sin embargo, las membranas microsomales de estos animales no alcanzaron el mismo grado de insaturación que las ratas suplementadas.

### Cociente de Insaturación de Microsomas de Hígado



**Fig. 30.** Cociente de insaturación de microsomas de hígado de los grupos de SHR a 1,3 y 6 meses de edad. n=6 \*(P <0.05).

#### 6.11 Fluidez membranal en microsomas de riñón

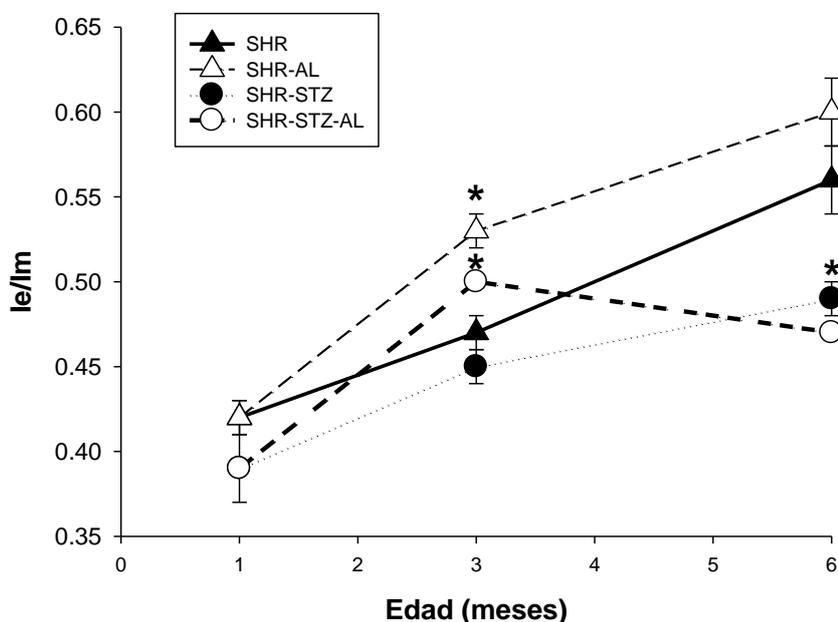
En resultados anteriores se mostró la fluidez reportada por el DPiP en microsomas de hígado (Fig. 26). En este apartado se describen los resultados que se obtuvieron en la medición de la fluidez en microsomas de riñón.

En la figura 31 se observa la fluidez que reportó el DPiP en microsomas de riñón. Podemos ver que los 4 grupos de animales muestran una tendencia a aumentar a partir del primer mes de vida. En el caso de los animales suplementados con aceite de linaza (SHR-AL), a los 3 meses de edad, el aumento en la fluidez de los microsomas fue mayor con respecto a los otros grupos, a los

6 meses de vida vemos que las membranas microsomales mantuvieron la tendencia a aumentar, mostrando una fluidez similar a las SHR.

Por su parte, las SHR-STZ-AL mostraron un incremento en la fluidez membranal al mes de edad, sin embargo, a partir de los 3 meses de vida tuvieron un drástico decremento en la fluidez microsomal. En las membranas de SHR-STZ hubo un aumento en su fluidez a partir del primer mes de vida y se mantuvieron con esta tendencia hasta los 6 meses de vida. No obstante, la fluidez reportada por el DPiP en estos animales a la edad de 3 meses fue inferior en comparación con los grupos suplementados con AL.

### Fluidez membranal en Microsomas de Riñón



**Fig. 31.** Fluidez membranal detectada por el monitor de fluorescencia DPiP en microsomas de riñón de SHR a 1, 3 y 6 meses de edad.  $n=6$  \*( $P < 0.05$ ).

#### 6.12 Composición de ácidos grasos de microsomas de riñón

Se midió la fluidez membranal con el monitor de fluorescencia DPiP. Se observa que esta se modifica al paso de los meses. En el caso de las ratas suplementadas con el aceite de linaza (SHR-AL) se vio un aumento en la fluidez de sus membranas a partir del mes de edad y se mantuvo así hasta los 6 meses de vida (Fig. 31). Se analizó la composición de ácidos grasos de las membranas microsomales de riñón en los diferentes grupos de SHR para saber si, al igual que en los fantasmas de eritrocitos, la fluidez membranal depende principalmente de la composición de ácidos grasos.

**Tabla 15. Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de riñón (1 mes de edad)**

Ácidos grasos		1 mes Microsomas Riñón Mol%			
		SHR Promedio		SHR-STZ Promedio	
Mirístico	C14:0	1.4	±0.7	1.6	±0.2
Palmitico	C16:0	27.6	±2.3	29.1	±1.5
Palmitoleico	C16:1	2.0	±0.5	0.5*	±0.0
Esteárico	C18:0	21.7	±2.1	22.3	±1.8
Oleico	C18:1	16.8	±2.7	16.1	±1.4
Linoleico	C18:2	14.4	±1.0	14.6	±0.1
γ Linolénico	C18:3	0.2	±0.0	0.0	±0.0
α Linolénico	C18:3	0.0	±0.0	0.2	±0.0
Araquidónico	C20:4	13.0	±0.8	13.5	±1.1
EPA	C20:5	0.4	±0.1	0.3	±0.2
DHA	C22:6	2.2	±0.1	1.8	±0.2
NI		0.0	±1.4	0	±1.8
I/S		0.97	±0.1	0.88	±0.1

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosaheptaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

En la tabla 15 se muestran los diferentes ácidos grasos de los microsomas de riñón a 1 mes de edad. Hubo pocas variaciones de los ácidos grasos entre ambos grupos de animales. Por mencionar un ejemplo, el ácido palmitoleico. En el caso de las SHR el porcentaje de dicho ácido graso fue de 2.0%. Por su parte las SHR-STZ mostraron una menor proporción de ácido palmitoleico (0.5%). Otro ácido graso que mostró diferencias fue el ALA. En las membranas microsomales de SHR no se presentó este ácido graso mientras que en las SHR-STZ el contenido de ALA fue de 0.2%. Parece ser que a esta edad, la diabetes tuvo efectos severos en la composición de ácidos grasos de las SHR-STZ, por ello no se ven cambios relevantes con respecto a las SHR.

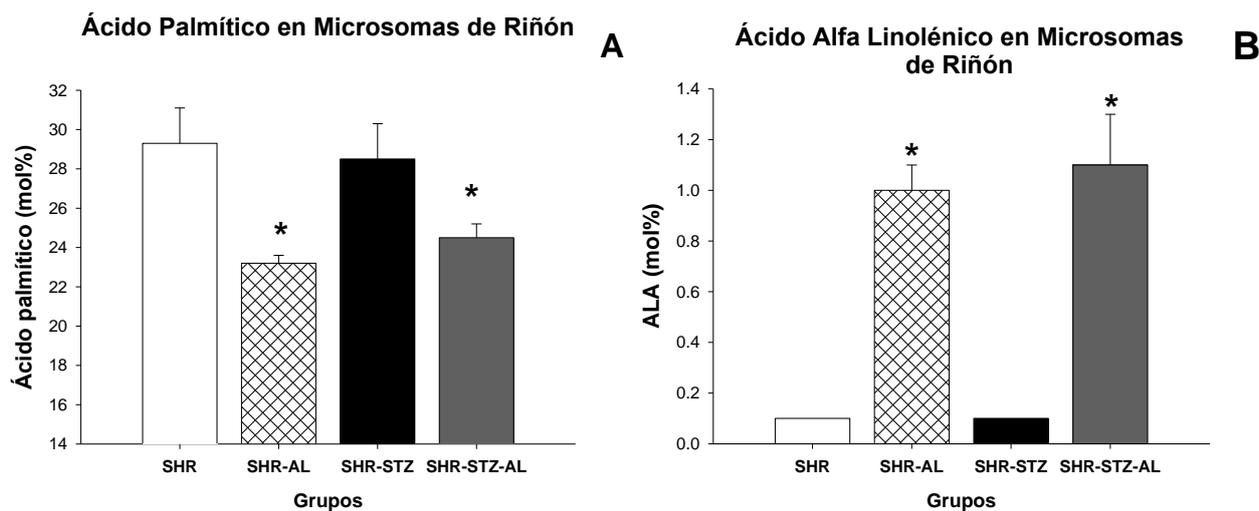
Al analizar la composición de ácidos grasos de microsomas de riñón a los 3 meses de vida, se observan algunas modificaciones que se generaron en los animales no suplementados: un mayor contenido de ácidos grasos saturados, además de un bajo contenido de AGPIs ω-3. Es posible que con la edad, el contenido de ácidos grasos cambie, sin embargo también puede ser consecuencia de la hipertensión y/o la diabetes que padecieron estos animales.

Tabla 16. Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de riñón (3 meses de edad)

Ácidos Grasos		Microsomas Riñón 3 meses Mol%							
		SHR Promedio		SHR-AL Promedio		SHR-STZ Promedio		SHR-STZ-AL Promedio	
Mirístico	C14:0	0.5	±0.0	0.8	±0.2	0.5	±0.0	0.5	±0.2
Palmítico	C16:0	29.3	±1.8	23.2*	±0.4	28.5	±1.8	24.5*	±0.7
Palmitoleico	C16:1	1.9	±0.2	1.4	±0.1	1.9	±0.2	0.7*	±0.1
Esteárico	C18:0	18.6	±1.1	16.0	±0.5	20.5	±1.1	16.5*	±0.6
Oleico	C18:1	14.8	±0.4	16.8	±2.3	14.8	±0.4	12.4*	±0.5
Linoleico	C18:2	12.7	±0.9	14.8	±0.7	12.9	±0.9	19.2*	±0.7
γ Linolénico	C18:3	0.0	±0.0	0.0	±0.0	0.0	±0.0	0.0	±0.0
CLA	C18:2	0.4	±0.1	0.2	±0.3	0.4	±0.1	0.0	±0.0
α Linolénico	C18:3	0.1	±0.0	1.0*	±0.1	0.1	±0.0	1.1*	±0.2
Araquidónico	C20:4	19.4	±1.8	21.2	±0.4	18.3	±1.8	21.5	±1.1
EPA	C20:5	0.0	±0.0	2.4*	±0.4	0.0	±0.0	0.3*	±0.1
DHA	C22:6	1.6	±0.1	1.4	±0.1	1.4	±0.2	1.7	±0.3
NI		0.9	±0.8	0.8	±1.0	0.9	±0.8	1.6	±0.7
I/S		1.04	±0.2	1.48	±0.1	1.00	±0.1	1.37	±0.1

Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

A la edad de 3 meses, ocurrieron varias modificaciones en el contenido de ácidos grasos de SHR y SHR-STZ (tabla 16). Ejemplo de estos cambios se observa en el ácido palmítico (Fig. 32A). En las SHR la proporción de este ácido graso fue de 29.3%, por su parte las SHR-STZ tuvieron un contenido similar de ácido palmítico (28.5%).



**Fig. 32.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en microsomas de riñón de los grupos de SHR, SHR-AL, SHR-STZ y SHR-STZ-AL a 3 meses de edad. **A)** Cambios del ácido palmítico **B)** Cambios del ácido  $\alpha$  linolénico.  $n=6$   $*(P < 0.05)$ .

En lo que respecta a las ratas suplementadas con AL el contenido de ácido palmítico fue menos abundante. Es probable que el aceite de linaza contribuyera al menor contenido de grasas saturadas, favoreciendo un aumento en la fluidez membranal de estos grupos a los 3 meses de edad (Fig. 31). Las SHR-AL presentaron un 23.2% de ácido palmítico mientras que las SHR-STZ-AL tuvieron un contenido ligeramente mayor (24.5%).

En la figura 32B se observa el porcentaje de ALA en los cuatro grupos de animales. En el caso de las SHR la proporción de ALA fue muy baja (0.1%). Asimismo, las SHR-STZ tuvieron el mismo contenido que las SHR (0.1%). En resultados anteriores se ha visto que al suplementar a los animales con el AL el porcentaje de AGPIs  $\omega$ -3, principalmente el ALA, aumenta considerablemente y en microsomas de riñón no fue la excepción. En las SHR-AL el porcentaje de este ácido graso fue de 1.0%, evidentemente un contenido más alto que en las SHR. Por su parte, las SHR-STZ-AL presentaron una proporción de 1.1% de ALA. Está reportado, que la ingesta de ácidos grasos  $\omega$ -3 puede tener efectos benéficos en la salud. De acuerdo a los datos aquí mostrados (Figs. 6A, 9 y 32), el aumento de este ácido graso contribuyó a retrasar el desarrollo de la hipertensión y un control de la glicemia de las SHR-STZ-AL.

Al continuar analizando la composición de ácidos grasos de microsomas de riñón, se observa que a la edad de 6 meses hubo cambios en el porcentaje de algunos ácidos grasos entre los 4 grupos de animales. En la tabla 17 se puede ver que el contenido de los ácidos grasos  $\omega$ -3 es mayor en los grupos suplementados con el AL.

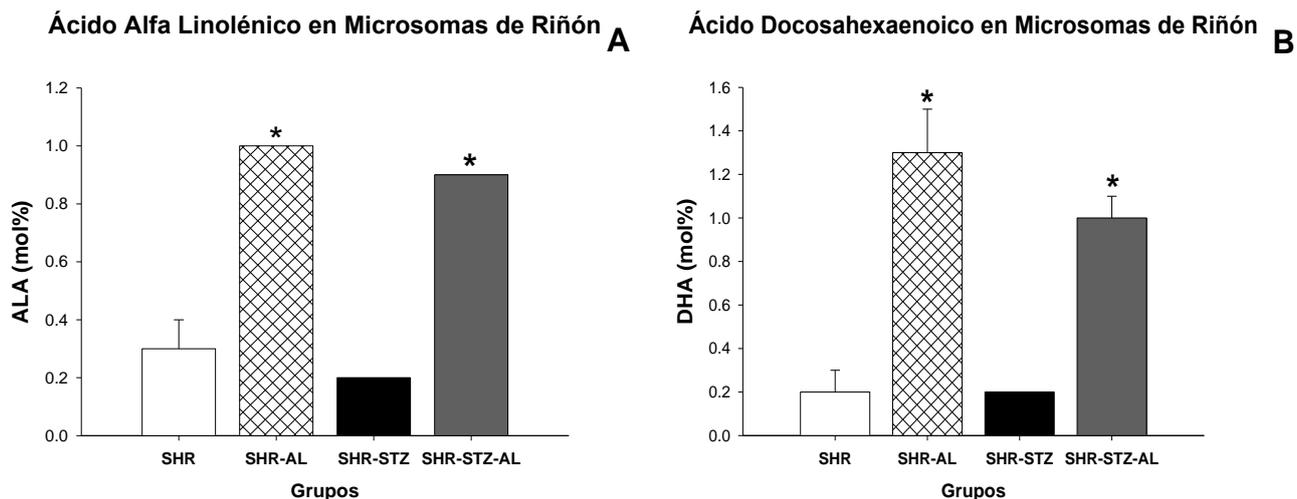
Tabla 17. Composición de ácidos grasos (mol%) de microsomas de riñón (6 meses de edad)

Ácidos Grasos		Microsomas de Riñón 6 meses Mol%							
		SHR		SHR-AL		SHR-STZ		SHR-STZ-AL	
		Promedio		Promedio		Promedio		Promedio	
Mirístico	C14:0	0.6	±0.3	0.7	±0.2	0.6	±0.0	0.6	±0.1
Palmitico	C16:0	23.7	±0.8	23.2	±1.4	25.1	±0.9	25.4	±0.2
Palmitoleico	C16:1	1.7	±1.0	1.0	±0.6	1.2	±0.2	0.7	±0.5
Esteárico	C18:0	15.0	±0.6	14.1	±0.3	16.4*	±0.1	16.8	±1.7
Oleico	C18:1	14.9	±1.3	15.4	±0.9	11.4*	±1.8	12.3*	±0.3
Linoleico	C18:2	18.2	±1.0	19.7	±1.2	16.6	±0.3	18.7	±0.3
γ Linolénico	C18:3	0.0	±0.0	0.0	±0.1	0.2*	±0.0	0.1	±0.1
CLA	C18:2	0.4	±0.3	0.5	±0.3	0.0	±0.0	0.1	±0.1
α Linolénico	C18:3	0.3	±0.1	1.0*	±0.0	0.2	±0.0	0.9*	±0.0
Araquidónico	C20:4	25.0	±1.4	22.5	±1.1	27.0	±1.2	23.4	±0.5
DHA	C22:6	0.2	±0.1	1.3*	±0.2	0.2	±0.0	1.0*	±0.1
NI		0.0	±0.0	0.0	±0.1	0	±0.0	0.0	±0.0
I/S		1.5	±0.1	1.6	±0.1	1.4	±0.1	1.3	±0.1

Abreviaturas: CLA, Ácido Linoleico Conjugado; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; I/S, insaturados sobre saturados. n=6 \*(P <0.05).

Como ejemplo de las modificaciones en el contenido de ácidos grasos ω-3 en microsomas se muestra el porcentaje de ALA (Fig 33A). Las SHR tuvieron un porcentaje bajo de dicho ácido graso. En microsomas de estos animales el contenido de ALA fue de 0.3%, asimismo en las SHR-STZ el porcentaje fue de 0.2%. Caso contrario, en los grupos suplementados con AL el contenido de ALA fue relativamente abundante. En las SHR-AL la proporción fue de 1.0%, mientras que en las SHR-STZ-AL el ALA tuvo un porcentaje de 0.9%.

Otro ácido graso que mostró diferencias entre los grupos, fue el DHA, el cual también pertenece a la familia de los ω-3. En la figura 33B se observa que en los animales no suplementados (SHR y SHR-STZ) el contenido de dicho ácido graso en las membranas microsomales fue bajo, en ambos grupos, la proporción del DHA fue de 0.2%.

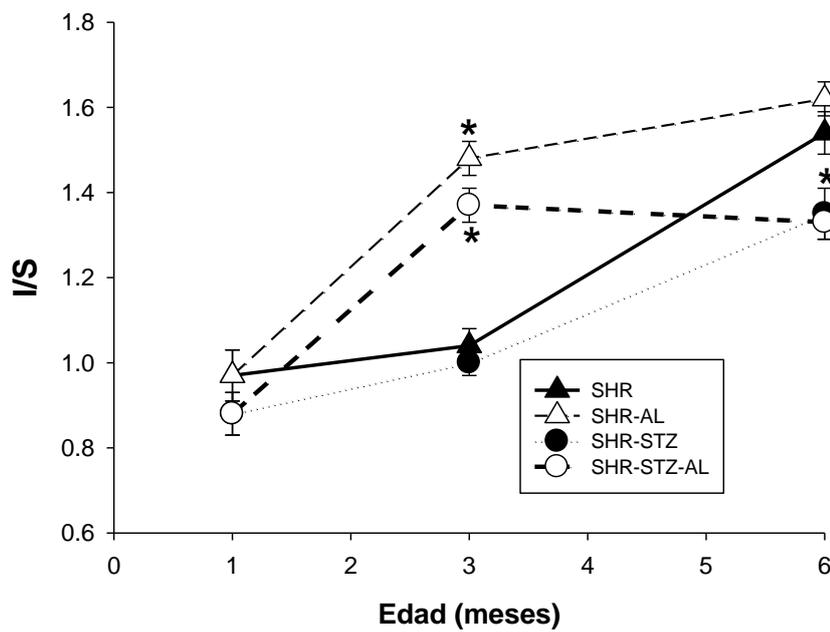


**Fig. 33.** Modificaciones en la composición de ácidos grasos en microsomas de riñón de los grupos de SHR, SHR-AL, SHR-STZ y SHR-STZ-AL a 6 meses de edad. **A)** Cambios del ácido  $\alpha$  linolénico **B)** Cambios del ácido docosahexaenoico. n=6 \*(P < 0.05).

En el caso de los grupos suplementados con AL, el contenido de DHA fue mayor. Es probable que al aumentar el ALA (ácido graso precursor de EPA y DHA) se favoreciera el aumento de DHA en los microsomas de SHR-AL y SHR-STZ-AL. En la figura 33B se muestra que las SHR-AL tuvieron un contenido abundante de DHA (1.3%). Por su parte las SHR-STZ-AL presentaron un contenido similar de dicho ácido graso (1.0%). El aceite de linaza, favoreció el aumento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3, en específico de ALA y DHA en las membranas microsomales de riñón. Quizá, este alto contenido de  $\omega$ -3 tuvo una participación importante en el retraso de la hipertensión así como en la magnitud de la misma.

Al analizar el I/S, se puede ver que en el caso de los grupos suplementados con AL, el I/S aumentó a los 3 meses de edad manteniéndose así hasta los 6 meses de vida. Cabe mencionar que a los 3 meses de edad, las SHR-AL y SHR-STZ-AL mostraron un cociente alto, mayor que en los grupos restantes (SHR y SHR-STZ). Es probable que el AL participara en el aumento del I/S a los 3 meses de vida y que participara de manera importante en el mantenimiento de la fluidez en los microsomas de SHR-AL y SHR-STZ-AL.

### Cociente de Insaturación de Microsomas de Riñón



**Fig. 34.** Cociente de insaturación de ácidos grasos de microsomas de riñón de los grupos de SHR a 1,3 y 6 meses de edad. n=6 \*(P <0.05).

## 7. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Desarrollo de diabetes tipo 2

Para el desarrollo de diabetes tipo 2 en SHR, en el presente estudio se realizó una inyección intraperitoneal con una dosis única de STZ a 75 mg/kg de peso corporal en neonatos de 48 hrs, de esta manera se generó con éxito un modelo experimental de diabetes mellitus tipo 2. A los 4 días de vida de los SHR neonatos (2 días después de la inyección intraperitoneal de la STZ), el aumento de la glicemia fue evidente. Este incremento se debió posiblemente a una deficiencia en la secreción de la insulina por parte de las células  $\beta$  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. 2), 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 (SHR) es más sensible a la STZ y por lo tanto desarrollaron la diabetes. 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-STZ a lo largo del estudio. Este modelo es atractivo para observar en un menor tiempo el conjunto de alteraciones que se generan con la DM2.

El desarrollo de este modelo de diabetes tipo 2 puede ser explicado de la siguiente manera: La STZ entra específicamente a las células  $\beta$ -pancreáticas a través de GLUT 2, ya dentro de la célula la STZ forma especies reactivas de oxígeno por la vía de la xantina oxidasa las cuales son responsables de la fragmentación del DNA y la posterior destrucción de dichas células  $\beta$  (Szkudelski, 2001). La dosis de 75 mg/kg de STZ, probablemente generó un daño severo en las células  $\beta$  pancreáticas. Orozco-Tapia (2008) analizó cortes histológicos del páncreas y reportó atrofia de los islotes pancreáticos generada por la STZ. Además, al realizar inmunohistoquímica de páncreas usando anticuerpos contra insulina, observó que las ratas inducidas con STZ tienen una menor cantidad de insulina en los islotes pancreáticos que las no inducidas o incluso que las suplementadas con ácidos grasos  $\omega$ -3 (EPA y DHA). Así, concluyó que en este modelo de ratas hay insulina, pero en menor cantidad que las normales. Determinaciones en suero por ELISA confirmaron esas observaciones (Orozco-Tapia 2008). Por esta razón, la secreción de insulina en estas ratas fue insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo y por lo tanto, hubo un marcado incremento de la glucosa sanguínea (Figura 2), lo cual es típico en la diabetes tipo 2 en humanos. Por todo ello, este modelo resultó interesante por la repercusión que tuvo en la alteración del 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 el control de la glicemia. En situaciones normales (exposición aguda a la glucosa), la subida posprandial de glucosa es el elemento inductor esencial de la secreción de insulina, equilibrando la concentración de glucosa extracelular con la del interior de la célula (Roche *et al.*, 2000).

Se ha observado que en los casos de hiperglicemia crónica, la glucosa es capaz de modificar diferentes moléculas y generar trastornos metabólicos. La exposición crónica a 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).

Por otro lado, la insuficiencia de insulina provoca en las células musculares y los adipocitos la disminución de GLUT 4, el cual se encuentra secuestrado intracelularmente en vesículas, pues es dependiente de la señal de insulina para migrar a la membrana plasmática (Cruz *et al.*, 2001). Como consecuencia, es mayor la necesidad intracelular de moléculas energéticas, así que en el hígado se activa la gluconeogénesis, además de exacerbarse la lipólisis elevándose los niveles de lípidos en suero, contribuyendo a la lipotoxicidad. Durruty y García de los Ríos (2001) reportaron que los ácidos grasos no esterificados ó ácidos grasos libres, formados a partir de lipólisis exacerbada (como consecuencia de la falta de insulina), funcionan como radicales libres y se unen a los transportadores GLUT, lo que provoca la disminución de su actividad. Además, estos lípidos al precipitarse bloquean los receptores de insulina.

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 y por consecuencia un déficit en la secreción de insulina e hiperglicemia. Es importante mencionar que la deficiencia en la secreción de insulina ocasionada por la STZ en estos

animales, fue mayor a lo que se esperaba. Estos resultados sugieren que la hiperglicemia crónica *per se* puede 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 el estrés oxidativo, pueden contribuir al aumento de la morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares durante el desarrollo de la diabetes (Baynes, 1991).

## 7.2 Hipertensión

La hipertensión suele agruparse con otros componentes del síndrome metabólico como son: la obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia e hiperuricemia. Se sabe también, que en personas con diabetes, la hipertensión arterial es más frecuente que en la población general; innumerables encuestas han demostrado una relación positiva entre la presión arterial y la concentración de glucosa plasmática (Stern y Tuc, 2003). La hipertensión suele ser una manifestación de la nefropatía diabética. 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 en el caso de la hipertensión humana, se ha considerado que el riñón es el principal responsable en la fisiopatología de la hipertensión arterial en SHR (Kawabe *et al.*, 1978). En ese sentido, diferentes estudios han mostrado que el sistema renina-angiotensina, el óxido nítrico, así como las prostaglandinas, desempeñan un papel importante en el desencadenamiento de dicha patología (Rettig, 1993).

Como se pudo observar en la figuras 7B y 9, en las SHR-STZ la hipertensión se estableció en un menor tiempo. En estos animales se observó un aumento de la glucosa sanguínea desde el cuarto día de vida (Fig. 2). Es posible que la hiperglicemia que presentaron estos animales haya generado un daño severo en diferentes órganos blanco. 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 concentración elevada de glucosa en forma crónica (glucotoxicidad) sus funciones se vieran alteradas, una de ellas y de gran importancia el 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 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 pérdida de la autorregulación; 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 plasmática, consecutivos a la hiperglicemia, alteran esta función y sobreviene microalbuminuria (Oparil y Weber, 2000).

Como ya se mencionó, el aumento de la presión arterial en las SHR inicia alrededor de la 6-7 semana de vida, sin embargo es hasta las 12-14 semanas de edad cuando la presión sistólica alcanza valores de entre 140-200 mm Hg en el adulto y que a partir de esta edad (3 meses) los animales muestran un aumento constante en la presión arterial y se mantiene así hasta edades muy avanzadas (Conrad, 1995). Esta información es consistente con los resultados obtenidos en nuestro estudio. En las figuras 7A y 9 se observa que las SHR tuvieron una presión de 129 mm Hg a la 10ª semana de vida, sin embargo, fue hasta la 14ª semana de edad cuando tuvieron un aumento considerable de la presión arterial (146 mm Hg); estableciéndose la hipertensión y los niveles de presión arterial incrementaron, manteniéndose así hasta los 6 meses de vida.

En el caso de las SHR-STZ, es probable que la hiperglicemia indujera una alteración en la hemodinamia renal, originando nefropatía diabética, contribuyendo al proceso de la hipertensión. Como en el caso de la hipertensión humana, se ha considerado que el riñón es el principal órgano implicado en la fisiopatología de la hipertensión arterial en SHR (Kawabe *et al.*, 1978). Además, como se ha mencionado, 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 7B.

Por otro lado, 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 estos 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 diabéticas (SHR-STZ).

### 7.3 Metabolismo de los lípidos en SHR

El papel de los lípidos en la fisiopatología de la DM2 ha dado lugar a varias hipótesis. Una de ellas plantea que el tejido adiposo libera señales que disminuyen la acción de la insulina en el músculo y en el hígado. Estas señales podrían ser los propios ácidos grasos liberados por la lipólisis intensa que ocurre en los adipocitos, propiciando un aumento crónico de los ácidos grasos libres y de triglicéridos en estos tejidos, lo que conduce al fenómeno de lipotoxicidad. En el páncreas, la lipotoxicidad se manifiesta como una pérdida de sensibilidad de las células  $\beta$  pancreáticas a la glucosa, ocasionando una disminución en la secreción de insulina en respuesta a este estímulo (Radziuk y Pye 2001).

La insulina permite la entrada de la glucosa a las células. Cuando la secreción de insulina es defectuosa o nula, la fisiología corporal se altera, generándose altas concentraciones de glucosa en sangre y sólo pequeñas cantidades de glucosa (~10%) entran a la célula (Chih-Hao *et al.*, 2003). En estas condiciones, la célula requiere energía de fuentes alternas debido a la baja 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; hay que recordar, 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 caso de las SHR-STZ, la diabetes promovió un incremento en los triglicéridos sanguíneos (Fig. 10B). En este grupo, la concentración de triglicéridos sanguíneos fue mayor que en los grupos restantes a la edad de 3 y 6 meses de vida. Es muy probable que la escasa secreción de insulina, de acuerdo a lo reportado por Orozco Tapia (2008), no permitiera el proceso de lipogénesis y por lo tanto se activó la lipólisis. Como consecuencia aumentó el transporte de los lípidos para su posterior oxidación y obtención de energía. Entre los múltiples efectos metabólicos de la insulina, la acción más potente es la supresión de la lipólisis del tejido adiposo. El aumento de

la concentración plasmática de insulina de sólo 5  $\mu$ U/ml inhibe la lipólisis en aproximadamente un 50% respecto a los valores basales (Flakoll *et al.*, 2003).

Durante la diabetes, los pacientes muestran promedios anormales del perfil lipídico, donde 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 anomalía 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. La síntesis hepática de triglicéridos y la subsecuente hipertrigliceridemia es la responsable de esta alteración metabólica (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.*, 1983) 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).

En la figura 10A se puede observar el incremento en el colesterol sanguíneo de las SHR-STZ. En este grupo los niveles de colesterol fueron elevados respecto a los grupos restantes de SHR. 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-STZ. 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. Las lesiones endoteliales producidas por las oLDL estimulan la agregación plaquetaria en el área de la lesión arterial, promoviéndose la liberación de tromboxano, un potente vasoconstrictor y proagregante plaquetario (Guerra *et al.*, 2005). 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 PGI<sub>2</sub> 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.

Está reportado tanto en animales como en humanos, 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  $\beta$  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 *et al.*, 1997).

## **7.4 Aceite de linaza, efecto de los ácidos grasos omega-3**

### **7.4.1 Glucosa**

Estudios epidemiológicos y nutricionales indican que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 de cadena larga producen cambios asociados a efectos benéficos para la salud y el control de ciertas enfermedades como la diabetes mellitus y la obesidad en la que los AGPIs activan a PPARs estimulando la oxidación de lípidos y la sensibilidad a la insulina (Rodríguez-Cruz *et al.*, 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, no hay evidencias suficientes de un posible efecto benéfico del ALA sobre el desarrollo de la diabetes y la hipertensión. En la figura 6B se observa que al suplementar con AL a los animales inducidos a

diabetes con STZ (SHR-STZ-AL) la concentración de glucosa disminuyó hasta llegar a niveles basales a la edad de 3 meses y se mantuvo así hasta los 6 meses de vida.

Se ha propuesto que los ácidos grasos poliinsaturados pueden tener un efecto benéfico en el control de la diabetes a través de diferentes mecanismos. Uno de ellos 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 membranas de las células, se mejora la respuesta de la insulina (Ginsberg *et al.*, 1987).

Se ha propuesto que un defecto en la actividad de la  $\Delta$ -6 desaturasa y la  $\Delta$ -5 desaturasa y en consecuencia una alteración en la composición de AGPIs, puede ser un factor que predispone a individuos al desarrollo de resistencia a la insulina y a la diabetes. Asimismo, que los AGPIs pueden incrementar la fluidez membranal, aumentar el número de receptores de insulina así como la afinidad de los mismos por la glucosa Incrementa el número de transportadores de glucosa tipo (GLUT 4) además de servir como un ligando endógeno de PPARs (Das *et al.*, 2005).

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 descenso en el contenido de AGPIs provoca un efecto contrario. También puede significar que no consumir ácidos grasos esenciales como el ALA, causa alteraciones metabólicas que se revierten al reestablecer su consumo. Otro de los beneficios encontrados en el consumo de AGPIs, es proteger a las células  $\beta$  pancreáticas del daño causado por el aumento de radicales libres producidos durante la diabetes (Caballero *et al.*, 2006).

Otro mecanismo de acción de los AGPIs se refiere a la capacidad de los ácidos grasos poliinsaturados para actuar como ligandos activadores de PPAR  $\gamma$  (Vamecq y Latruffe, 1999). Los PPARs 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 ( $\alpha, \gamma, \delta$ ) y se activan por concentraciones micromolares de AGPIs o por eicosanoides derivados del ácido araquidónico. PPAR  $\gamma$  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 funcionan como ligandos de los PPARs (Vamecq y Latruffe, 1999). 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  $\gamma$  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.*, 2002).

El suplemento de ALA que contiene ácido  $\alpha$  linolénico ( $\omega$ -3) suministrado a SHR-STZ 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. Es probable que en nuestros animales haya mejorado la funcionalidad de las células  $\beta$  al incrementar la síntesis de insulina logrando así satisfacer la demanda por esta hormona y llevando a un control de la glicemia tal como se observa en la figura 6B. Por otro lado, el ALA que es un AGPI, posiblemente funcionó como ligando de PPARs y por este mecanismo también favoreció la disminución y el control de la glucosa. De los resultados reportados en este estudio (Figs. 4B, 5B y 6B) se puede decir que el bajo consumo de AG esenciales al parecer contribuye significativamente al descontrol de la glucosa, favoreciendo el desarrollo de la diabetes y que al proporcionar un suplemento de ácidos grasos poliinsaturados como lo es el aceite de linaza, aparentemente se mejora la acción de la insulina.

#### 7.4.2 Lípidos

En diferentes estudios se ha demostrado que el consumo de ácidos grasos poliinsaturados como el EPA, puede disminuir los niveles de triglicéridos en sujetos sanos así como en sujetos diabéticos con hiperlipidemias (Williams *et al.*, 1992). En nuestro estudio utilizamos el AL el cual contiene ALA, ácido graso poliinsaturado precursor de EPA y DHA. En la figura 10B podemos ver que en las SHR-AL y las SHR-STZ-AL los niveles de triglicéridos fueron más bajos con respecto a las SHR y SHR-STZ. El decremento en los niveles de triglicéridos inducida por el ALA pudo ser debida a una reducción de la síntesis endógena de triglicéridos (VLDL), a un catabolismo acelerado de la LPL, o a una combinación de ambos efectos. En estudios cinéticos con VLDL radiomarcados se ha observado que los ácidos grasos  $\omega$ -3 reducen la síntesis de las VLDL (Harris *et al.*, 1990) incrementando la actividad de la LPL (Park y Harris 2003).

Actualmente se sabe que los ácidos grasos  $\omega$ -3, como el ALA, inducen la expresión génica de enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos y reprimen la expresión de enzimas lipogénicas (Clarke, 2001) a través de diferentes mecanismos. Uno de ellos es por las proteínas de unión a elementos regulatorios de esteroides (SREBP-1). Estas proteínas son parte de una familia de factores de transcripción formada por tres miembros: SREBP-1a, 1c y 2. La SREBP-2 regula genes involucrados en el metabolismo de colesterol, mientras que la SREBP-1a y 1c regulan genes involucrados en la lipogénesis. Se ha reportado que los AGPIs  $\omega$ -3 reducen la forma activa de SREBP-1, favoreciendo la disminución de la lipogénesis (Kim H *et al.*, 1999)

Otro posible mecanismo en la reducción de triglicéridos sanguíneos en las SHR suplementadas con el AL se explica por la activación de los PPARs por parte de los AGPIs. Como se explicó, los PPARs están relacionados con la síntesis de insulina, sin embargo, estos receptores nucleares también regulan la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de los lípidos. En general los ácidos grasos poliinsaturados funcionan como ligandos de más de un isotipo de PPARs, aunque las afinidades difieren (Alemán *et al.*, 2002). Se ha propuesto que la activación de los PPAR $\gamma$  en células de tejido adiposo mejora su capacidad de almacenar lípidos, disminuyendo la liberación de ácidos grasos libres y la acumulación de triglicéridos en sangre y en músculo, lo cual lleva a una mejora de la respuesta a insulina en estos tejidos. Asimismo, la activación de ambos PPAR $\alpha$  y PPAR $\gamma$ , se ha asociado con disminución del contenido de lípidos en hígado y músculo, además de disminuir la resistencia a insulina en la DM2 (Bergeron *et al.*, 2006).

Específicamente, se ha reportado que el tratamiento con rosiglitazona (ligando de PPAR $\gamma$ ) en ratas Zucker previno del desarrollo de la hiperglicemia. Las ratas tratadas con este ligando mostraron un alto contenido de insulina en páncreas y se conservó la morfología de dicho tejido. La activación del receptor PPAR $\delta$ , también se traduce en una importante reducción de los niveles de triglicéridos sanguíneos. Este efecto se ha probado tanto en roedores como en primates. La activación de este receptor induce genes relacionados con el almacenaje de lípidos y la termogénesis, tales como el de la proteína desacoplante 3 (UCP 3) (Oliver *et al.*, 2001). Además, se ha demostrado que los PPAR $\alpha$  están implicados en prácticamente cada etapa del metabolismo de los lípidos, incluyendo la movilización, el transporte, la esterificación en acil-CoA, su traslocación a la mitocondria y su catabolismo en la  $\beta$  oxidación (Gulick *et al.*, 1994). Al mismo tiempo, disminuye la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de lípidos como la ACP sintasa (Clarke, 2001).

### 7.4.3 Hipertensión

Se ha propuesto, que los ácidos grasos  $\omega$ -3 tienen la capacidad de influir de manera benéfica en la coagulación sanguínea y la trombosis, el perfil de los lípidos plasmáticos y la presión sanguínea. Algunos estudios reportan que el ALA puede prevenir y controlar el desarrollo de la hipertensión (Sekine *et al.*, 2007). En nuestro estudio observamos que la presión sistólica de los grupos suplementados con el AL (SHR-AL y SHR-STZ-AL) se mantuvo por debajo de los 140 mm Hg a los 3 meses de vida (Fig. 9). Recordemos que en esta cepa de animales, la hipertensión se establece a esta edad, superando los 140 mm Hg; sin embargo, en el caso de nuestros animales suplementados con AL se retrasó el desarrollo de esta patología así como la intensidad de la misma. Se han reportado varios mecanismos mediante los cuales los ácidos grasos  $\omega$ -3 ejercen su efecto en el control de la hipertensión, los cuales se describen a continuación.

Los efectos cardiovasculares derivados de la ingesta de AGPIs  $\omega$ -3 provienen principalmente de su incorporación a los fosfolípidos de las membranas celulares sustituyendo parcialmente al ácido araquidónico como sustrato inicial para la producción de eicosanoides (Von Schacky *et al.* 2001). Si recordamos, la biosíntesis de los AGPIs como el araquidónico y el EPA a partir del ácido linoleico y  $\alpha$  linolénico respectivamente, requiere la participación de desaturasas y elongasas; el ácido linoleico y ALA compiten por las mismas enzimas  $\Delta$ 5 y  $\Delta$ 6 desaturasas, además de utilizar la misma vía metabólica para la síntesis de araquidónico y EPA (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005). Cuando suplementamos a los grupos de SHR con AL el cual contiene una gran cantidad de ALA, compite con el ácido linoleico por las desaturasas para la formación de araquidónico y eicosapentaenoico, de esta manera se origina una mayor proporción de EPA. El ácido araquidónico, es precursor de eicosanoides (prostaglandinas y tromboxanos) de la serie 2 y de los leucotrienos de la serie 4, mientras que el EPA es el precursor de prostanooides de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5. Cuando se incrementa el cociente  $\omega$ -3/  $\omega$ -6, el EPA inhibe la formación de tromboxano de la serie 2 que se considera vasoconstrictor y estimulador de la agregación plaquetaria, así como la producción de prostaglandinas de la serie 2 normalmente considerada como mediador proinflamatorio (Hirafuji *et al.*, 2003).

Al analizar la composición de ácidos grasos de riñón de ratas suplementadas con AL (Tablas 10 y 11), observamos que el aumento de ALA en este órgano, favoreció el incremento del EPA. Es probable que un contenido más abundante de dicho ácido graso favoreciera la síntesis de eicosanoides vasodilatadores (prostanooides de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5) y de esta manera, se controló la presión arterial de animales suplementados con AL además de retrasar el desarrollo de la hipertensión. En el caso de los grupos no suplementados observamos que el contenido de EPA fue menor mientras que la proporción de ácido araquidónico (precursor de

prostaglandinas y tromboxanos de la serie 2 y de los leucotrienos de la serie 4) fue mayor, favoreciendo una mayor síntesis de prostanoides vasoconstrictores y por lo tanto, el establecimiento de la hipertensión. Cuando las células vasculares sufren algún daño, se desencadena el proceso de agregación plaquetaria. Como ya se describió, los intermediarios derivados del metabolismo de los ácidos grasos  $\omega$ -3 son menos protrombóticos y vasoconstrictores que los derivados procedentes del ácido araquidónico  $\omega$ -6. Por lo tanto al suplementar a los grupos de SHR con AL, aumenta el EPA, precursor de prostanoides vasodilatadores reduciendo por lo tanto, la agregación plaquetaria y la trombosis, así como el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión (Connor, 2000).

Durante la hipertensión se activa el endotelio, lo que a su vez origina la producción endotelial de moléculas de adhesión como ICAM-1 (Inter-Cellular Adhesion Molecule 1) VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule) y la infiltración de células sanguíneas a la pared vascular, contribuyendo al engrosamiento de la arteria y al desarrollo de la aterosclerosis (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005) Existen evidencias de que los ácidos grasos  $\omega$ -3 pueden estimular la producción endotelial de óxido nítrico (Harris, 1996). Esta molécula provoca la relajación de las células del músculo liso permitiendo la dilatación de los vasos sanguíneos que reduce a su vez la presión sanguínea y la activación endotelial (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005).

Otro posible mecanismo del ALA para disminuir la presión arterial en nuestros animales se relaciona con factores de transcripción PPARs. Se ha reportado que el ALA (agonistas de PPAR- $\alpha$ ) pueden tener efectos antiinflamatorios en células vasculares, incrementando la expresión de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS). PPAR $\alpha$  decrementa la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en células de músculo liso vascular mediante la inhibición de la función del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Asimismo, los agonistas de PPAR- $\gamma$  inhiben el receptor tipo 1 de angiotensina II en células del músculo liso vascular (Kota *et al.*, 2005). Todos estos fenómenos son benéficos en la hipertensión.

## **7.5 Fluidez membranal y composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos**

Diferentes investigaciones señalan que hay una interacción significativa entre la alteración de las membranas y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, entre ellas la diabetes y la hipertensión (Delachambre *et al.*, 1998, Dorrance *et al.*, 2001). 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, disminuye al paso del tiempo (Chi y Gupta, 1998, Tsuda, 2008, Nanneti *et al.*, 2008, Pérez *et al.*, 2010).

Para realizar mediciones de fluidez membranal se ha recurrido al uso de diferentes células, entre ellas los eritrocitos. Las membranas de estas células han servido como modelo para la medición de fluidez membranal. Por otro lado, la estructura, dinámica y propiedades de la membrana han sido estudiadas utilizando diferentes técnicas como la resonancia paramagnética nuclear (EPR) y la resonancia del spin del electrón. Empleando estas técnicas, Tsuda y colaboradores (2001), reportaron que la fluidez membranal en eritrocitos de SHR y pacientes con hipertensión esencial es menor al compararlas con sus contrapartes normotensas; propone que las anomalías en la fluidez membranal pueden contribuir al desarrollo de la hipertensión.

Utilizando polarización de fluorescencia del 1-6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) se ha reportado que la fluidez en membranas de eritrocitos disminuye con la diabetes (Waczulíková *et al.*, 2000). Sin embargo, en otras investigaciones el DPH reporta un incremento en la fluidez membranal durante la diabetes y la hipertensión, mientras que al utilizar el 1-4-trimethylaminophenyl-6-phenyl-1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH) se reportó un decremento en la fluidez (Moretti *et al.*, 2002, Nanneti *et al.*, 2008).

En este estudio, se utilizó el monitor de fluorescencia DPiP para medir la fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos. Se reportó que con el desarrollo de la hipertensión en las SHR, la fluidez membranal disminuyó (Fig. 11), tal como se ha reportado en otros estudios (Chi y Gupta, 1998, Tsuda, 2008). Por otro lado, se observó que en las SHR-STZ la diabetes alteró la fluidez membranal de manera severa. A los 3 y 6 meses de vida la fluidez reportada por el DPiP fue menor en estos animales, en comparación con las SHR, muy probablemente por un cambio en las propiedades fisicoquímicas de la membrana. Parece ser que estas modificaciones están asociadas con la diabetes y la hipertensión; sin embargo observamos que cuando ambas patologías se desarrollan en un mismo individuo los cambios son más severos.

Se ha propuesto el uso de algunos fármacos para el control de la diabetes y la hipertensión. Tsuda (2008) reportó que al utilizar la benidipina, esta incrementó de manera significativa la fluidez en membranas de eritrocitos de sujetos hipertensos, además de observar una ligera disminución en los niveles de presión sistólica (Tsuda, 2008). Por otro lado, Wiernsperberg (1999) propone que la metformina, fármaco utilizado para el tratamiento de la diabetes, aumenta la fluidez membranal en sujetos con esta enfermedad, restaurando la función de la membrana, regulando la entrada de glucosa para su posterior metabolismo. Wiernsperberg

especula que las anomalías en las membranas favorecen la resistencia a la insulina (Wiernsperberg y Bailey, 1999).

Por nuestra parte, administramos un suplemento de AL, el cual tiene un alto contenido de ALA, a ratas SHR y SHR-STZ. Observamos una disminución en los niveles de glucosa sanguínea así como un control y un retraso en el desarrollo de la hipertensión. Además, al realizar las mediciones de fluidez en membranas de eritrocitos de ambos grupos (SHR-AL y SHR-STZ-AL) notamos que el DPiP reportó un aumento significativo en la fluidez membranal de estos animales a los 6 meses de edad respecto a los grupos restantes (Fig. 11). Muy probablemente el ALA participó de manera relevante en el aumento de la fluidez membranal. Simultáneamente a las mediciones de fluidez membranal, determinamos la composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos para saber la participación de estas moléculas en la regulación de la fluidez.

La composición de la membrana determina las propiedades fisicoquímicas de la misma (Hulbert *et al.*, 2005). En ese sentido, la fluidez membranal es afectada por varios factores como son las proteínas de membrana, el colesterol y especialmente por la composición de ácidos grasos. La estructura y la función de las proteínas membranales como los receptores, enzimas y proteínas transportadoras, están altamente asociadas con la fluidez membranal (Bakan *et al.*, 2006). Por lo tanto, los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las membranas de eritrocitos pueden ser un factor que predispongan al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Pezeshk *et al.*, 2000).

En nuestro estudio el I/S en los grupos de animales (Fig. 19A), muestra un comportamiento similar a la fluidez membranal reportada por el DPiP (Fig. 19B). Notamos que cuando la fluidez de las SHR aumentó a los 3 meses de edad, también el cociente de insaturación incrementó. En el caso de las SHR-STZ, observamos que el DPiP reportó una disminución de la fluidez membranal a los 3 meses de vida, al analizar el I/S observamos que dicho cociente también mostró un decremento. Por su parte, los grupos suplementados con AL, mostraron un aumento en la fluidez membranal a la edad de 6 meses. Cuando analizamos I/S notamos que mostró el mismo comportamiento que reportó el DPiP. Los resultados de nuestro estudio muestran que la fluidez membranal es principalmente dependiente de la composición de ácidos grasos. Sin embargo, no se descarta la participación de otros componentes membranales como el colesterol o las proteínas en la regulación de la fluidez membranal.

Son varias las enzimas responsables en la regulación de la composición de ácidos grasos de las membranas, como son: elongasas, desaturasas, fosfolipasas, y las lisofosfolípido acil transferasas. Se ha propuesto que el mantenimiento de la fluidez es un proceso regulado por la

actividad de las desaturasas (Kates *et al.*, 1984). Asimismo, la afinidad de algunas enzimas involucradas en la remodelación de la membrana como es la acil-transferasa microsomal y las elongasas están estrechamente influenciadas por el ambiente lipídico que las rodea. Así, es probable que un cambio en la composición de las membranas (en específico del cociente de ácidos grasos  $\omega$ -3/  $\omega$ -6) pueda influir de manera relevante en el mantenimiento de la fluidez y la actividad enzimática (Hulbert *et al.*, 2005).

Al analizar la composición de ácidos grasos de los fantasmas de eritrocitos, observamos que la proporción de ácidos grasos  $\omega$ -3 en las SHR y SHR-STZ disminuyó con la edad, en específico el ALA y el EPA. En el caso de las SHR-STZ vemos que el porcentaje de ácido palmítico aumentó al paso del tiempo. Es importante señalar que el incremento de este ácido graso pudo haber influido de manera relevante en la disminución de la fluidez membranal. Aunado al aumento del ácido palmítico, observamos un decremento en el contenido de ácido araquidónico. Se ha mencionado que las 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 ésta se realizan generando anormalidades en la célula, contribuyendo al desarrollo de diferentes trastornos metabólicos (Delany *et al.*, 2000).

Es posible que un aumento en el contenido de ácidos grasos saturados en las membranas celulares de las SHR-STZ favoreciera el establecimiento de la hipertensión, así como el desarrollo de la diabetes. Se ha reportado que un decremento en la composición de ácidos grasos poliinsaturados de las membranas puede influir en la acción de la insulina, específicamente alterando las proteínas asociadas con la acción de esta hormona. Estudios *in vitro* muestran que al aumentar el contenido de ácidos grasos saturados en la célula, la afinidad de los receptores de insulina, así como el transporte de glucosa se puede alterar favoreciendo la resistencia a la insulina y el desarrollo de diabetes (Grunfeld *et al.*, 1981, Field *et al.*, 1988). Por el contrario, cuando aumentó el contenido de AGPIs de la familia  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 se observó una mayor afinidad de los receptores de insulina por dicha hormona (Clandinin *et al.*, 1993). En los animales suplementados con AL, observamos un aumento en el contenido de AGPIs  $\omega$ -3, es probable que al incrementar el porcentaje de estos ácidos grasos en las membranas celulares de las SHR-STZ-AL, la acción de la insulina fuera favorecida y que por ello la glicemia de estos animales se mantuvieran en concentraciones basales (Fig. 5B).

Está reportado que con el desarrollo de la hipertensión, disminuye la fluidez membranal (Pezeshk *et al.*, 2000); sin embargo, en este estudio observamos que la hipertensión en conjunto con la diabetes genera un decremento más severo en la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos. Además, observamos que el DPiP es sensible a los cambios en la composición de

ácidos grasos, mostrando que dicha composición es responsable de la fluidez membranal de los eritrocitos.

## 7.6 Composición de ácidos grasos de hígado y riñón

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. Se ha reportado que ocurren anomalías en la composición lipídica de hígado y riñón durante la diabetes y la hipertensión (Okamoto *et al.*, 1989). 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 (Rodríguez Leyva *et al.*, 2009).

Los ácidos grasos poliinsaturados esenciales, como son el ácido linoleico ( $\omega$ -6) y ácido  $\alpha$  linolénico ( $\omega$ -3), son precursores de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como son el araquidónico y el EPA, respectivamente (Rodríguez-Cruz *et al.*, 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), además de tener una participación relevante en el control de la presión arterial (Delachambre *et al.*, 1998).

Las células de mamíferos requieren de precursores exógenos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, de modo que la composición de ácidos grasos en los tejidos se debe en parte a los suministrados en la dieta (Holman *et al.*, 1983). Como se puede observar en la tabla 18 (apéndice 1), la dieta administrada a los grupos de animales contiene ácidos grasos esenciales como el linoleico (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  $\omega$ -3 como el ALA, eicosapentaenóico (EPA) y docosahexaenóico (DHA), aunque éstos últimos se encuentran en proporciones mucho menores (ALA 3.3% EPA 0.22%, DHA 0.05%). Hay que recordar que el ALA sirve como sustrato para la formación de EPA y DHA, lo cual puede contribuir a un aumento de estos dos últimos ácidos grasos.

Los AGPI  $\omega$ -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  $A_2$ , 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 y colaboradores (1989) reportó que la actividad de la PLA<sub>2</sub> aumenta con la edad, lo cual podría estar contribuyendo al desarrollo de la hipertensión.

En riñón de las SHR-STZ el contenido de ácido araquidónico fue más abundante con respecto a los grupos restantes, además se observó un incremento de este ácido graso a partir del mes de vida y se mantuvo así hasta los 6 meses de edad (Tablas 9, 10 y 11). Está reportado que un aumento en la proporción de araquidónico origina una mayor producción de prostaglandinas de la serie 2 y leucotrienos de la serie 4. Es probable que el alto contenido de AA en riñón sea consecuencia del elevado porcentaje de ácido linoleico (precursor de ácido araquidónico) en la dieta (tabla 18) dando como consecuencia 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 la proporción de ácido  $\alpha$  linolénico proveniente de la dieta fue escaso. Como sabemos, los AGPI  $\omega$ -6 pueden competir con los AGPI  $\omega$ -3 por enzimas como la  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasas. Considerando las proporciones de sustratos, es probable que la producción de mediadores protrombóticos y proinflamatorios originados del ácido linoleico aumentara (Delachambre, *et al.*, 1998). De hecho, una ingesta abundante de ácido linoleico puede reducir la capacidad del hígado para convertir al ALA en DHA (Carrero *et al.*, 2005). El riñón de estos animales (SHR-STZ) también mostró una menor cantidad de EPA y DHA en todas las edades, así un equilibrio a favor de AA en la distribución de AGPI en el riñón pudo contribuir al desarrollo y mantenimiento de la hipertensión.

En lo que respecta a la composición lipídica del hígado, encontramos que en SHR a los 3 meses de edad tuvieron un porcentaje abundante de ácido linoleico y una baja proporción de AA. Estos porcentajes puede ser consecuencia de una alteración en la desaturación y elongación del ácido linoleico, el cual se ve alterado con la edad y el desarrollo de la hipertensión. No obstante, a los 6 meses de vida el porcentaje de araquidónico en hígado aumentó. Nuestros resultados son coherentes con Delachambre *et al.* (1998) quienes reportaron que la actividad de la  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasa pudo haber sido activada y en consecuencia el metabolismo de A.A. se vio alterado (Delachambre *et al.*, 1998).

En la tabla 19 (apéndice 1) se puede ver la composición de ácidos grasos del AL. Presenta una alta proporción de ALA (56%). Como sabemos, este ácido graso es precursor de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga (EPA y DHA). Además, el AL contiene otros ácidos grasos  $\omega$ -6 y  $\omega$ -9 en menor proporción (ácido linoleico y oleico, respectivamente). Recordemos que en el caso de los animales suplementados con AL notamos una disminución en la glicemia así como un control de la presión arterial (Figs. 6A y 9).

Se evaluó el efecto del ALA sobre la reactividad vascular en aorta de SHR. Al término de la dieta, la presión arterial sistólica disminuyó considerablemente a diferencia de ratas no suplementadas; sin embargo, no explican el probable mecanismo por el cual el ALA mostró control sobre la presión arterial sugiriendo realizar otros estudios en los cuales se evalúe el efecto del ALA sobre la fluidez membranal y su participación en la disminución de la presión arterial (Ogawa *et al.*, 2009).

En nuestra investigación encontramos que el contenido de ácidos grasos  $\omega$ -3, en específico ALA y EPA, incrementó significativamente en riñón de los grupos suplementados (SHR-AL y SHR-STZ-AL) a la edad de 3 meses y se mantuvo así hasta los 6 meses de vida. Un factor importante en el incremento de dichos ácidos grasos fue el suplemento de AL, que presenta un abundante contenido de ALA, el cual contribuyó al aumento del EPA. Narce y colaboradores (1997) reportaron que el aumento en el contenido de EPA en la dieta de SHR modifica la actividad de la  $\Delta$ 5 y  $\Delta$ 6 desaturasa alterando el contenido de ácido linoleico así como del ácido araquidónico. Sin embargo, sus resultados muestran que la presión arterial no tuvo cambios significativos. Por el contrario, en nuestros resultados las SHR-AL y SHR-STZ-AL tuvieron una mejoría, hubo un control significativo en la presión arterial y un retraso en el establecimiento de esta enfermedad.

Considerando los datos reportados por Narce (1997) es importante mencionar que utilizaron animales adultos (13 semanas de edad), además, la dieta suplementada con EPA solo duró 9 semanas. Recordemos que el aumento de la presión arterial inicia alrededor de la 6-7 semana de vida y entre las 12-14 semanas de edad la presión sistólica alcanza valores de entre 140-200 mm Hg en el adulto, es probable que el momento en el cual inician el tratamiento no sea la edad adecuada debido a que los animales ya están desarrollando la patología (Narce *et al.*, 1997, Conrad, 1995). A diferencia de ellos, que administraron el suplemento a edades avanzadas cuando la enfermedad se empezó a establecer, en nuestra investigación iniciamos el tratamiento en ratas de 1 mes de vida y por un periodo de tiempo mayor (Fig. 9), es posible que al suplementar a los animales a edades tempranas, se previniera el desarrollo de la hipertensión. Por estas razones, probablemente nuestro modelo tuvo efectos benéficos en el control de la hipertensión. En hígado, observamos que el contenido de ALA y EPA de animales suplementados con el AL fue más abundante en comparación con los grupos restantes. Narce y colaboradores (1997) reportaron que en hepatocitos de SHR sólo el contenido de EPA aumentó significativamente.

## 7.7 Fluidez membranal y composición de ácidos grasos de microsomas

Medimos la fluidez de membranas microsomales de hígado y riñón de los cuatro grupos de SHR. Para realizar las mediciones de fluidez en estas membranas, utilizamos el DPiP, una molécula hidrofóbica que se ubica preferentemente en la parte intermedia de la monocapa, tiene la capacidad de formar excímeros intramoleculares y la probabilidad de formación depende de la fluidez del medio. A partir de las conformaciones de excímero (Ie) y monómero (Im) del monitor fluorescente de fluidez el Dipirenil propano, se obtuvo el cociente Ie/Im que refleja en forma directa la fluidez membranal (Mejía *et al.*, 1995). La figura 26 muestra que la fluidez en microsomas de hígado de los grupos de animales tuvo una tendencia a aumentar con el tiempo. Sin embargo, en el caso de las SHR-AL y SHR-STZ-AL el incremento en la fluidez fue más evidente a los 3 meses de edad. Al analizar la composición de ácidos grasos notamos que el contenido de ácido palmítico incrementó significativamente en las SHR-STZ, mientras que en las SHR-STZ-AL este ácido graso disminuyó significativamente. Es probable que el patrón de estos ácidos grasos en las membranas microsomales haya favorecido la disminución de la fluidez membranal en el caso de las SHR-STZ y el incremento en SHR-STZ-AL. Como hemos mencionado, son varias las enzimas responsables en la regulación de la composición de ácidos grasos de las membranas, entre ellas se encuentra la esteroil-CoA desaturasa (Kates *et al.*, 1984). La composición lipídica de las membranas celulares está regulada para mantener la fluidez membranal. Una enzima clave involucrada en este proceso es la esteroil-CoA desaturasa (SCD), enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados a partir de ácidos grasos saturados (Ntambi, 1999).

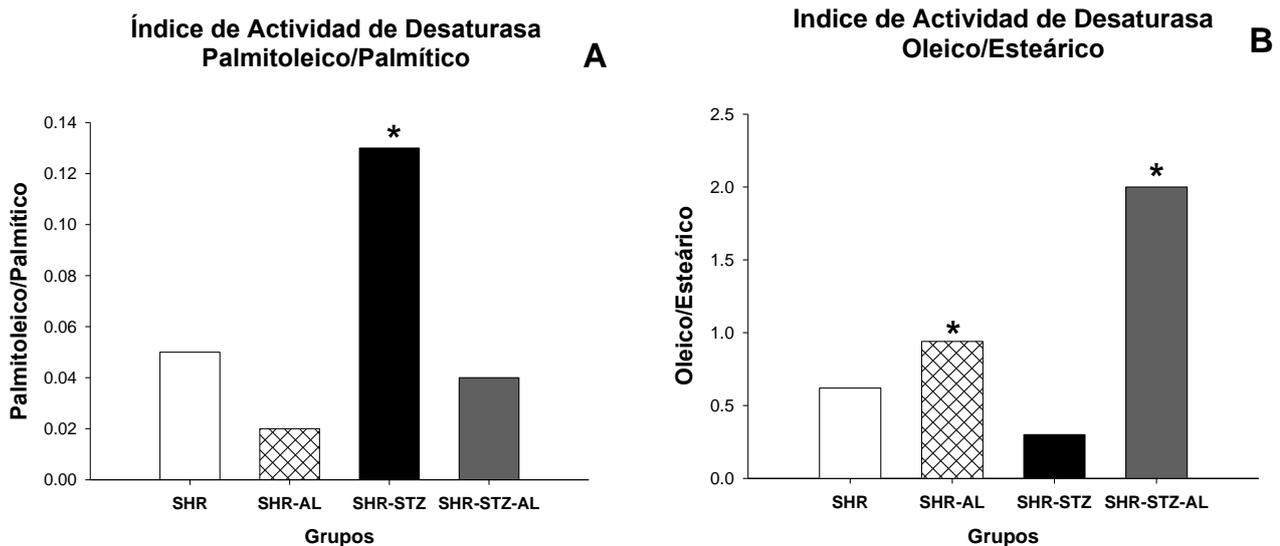
Las enzimas acil desaturasas catalizan la formación de dobles enlaces en ácidos grasos obtenidos de fuentes alimenticias o de síntesis *de novo* en el hígado. Los mamíferos sintetizan cuatro desaturasas de diferente especificidad por la longitud de la cadena, que catalizan la adición de dobles enlaces en las posiciones  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$ . Las SCD introducen un doble enlace en la posición  $\Delta 9$  de ácidos grasos saturados. Los sustratos son palmitoil-CoA (16:0) y esteroil-CoA (18:0), mostrando mayor afinidad por este último, convirtiéndolos en palmitoleoil-CoA (16:1) y oleoil-CoA (18:1), respectivamente. Los ácidos grasos monoinsaturados resultantes son sustratos para la incorporación en fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol (Kim *et al.*, 2000).

Analizando la conversión de ácido palmítico y ácido esteárico a sus respectivos ácidos grasos monoinsaturados (palmitoleico y oleico) derivados de la actividad de la esteroil-CoA  $\Delta 9$  desaturasa, observamos modificaciones en el índice de actividad de esta enzima a los 3 meses de edad en los diferentes grupos de animales. En la figura 35A podemos ver el análisis del cociente de ácido palmitoleico sobre ácido palmítico, observamos que en las SHR-STZ el cociente fue mayor con respecto a los grupos restantes. Es probable que la esteroil-CoA  $\Delta 9$  haya tenido mayor

afinidad por el ácido palmítico en los microsomas de hígado de las SHR-STZ para la síntesis de ácido palmitoleico; sin embargo, al analizar la desaturación del ácido esteárico para dar origen al ácido oleico vemos que la SCD aparentemente mostró una menor afinidad por este sustrato (ácido esteárico); cabe la posibilidad de que la hiperglicemia haya modificado la actividad de esa enzima.

Un estudio realizado por Nancy y colaboradores (1979) reportó que en ratas diabéticas inducidas con STZ y suplementadas con fructosa la actividad de la esteroil CoA desaturasa fue menor, lo cual se vio reflejado en la composición de ácidos grasos monoinsaturados de microsomas. Reportaron que la actividad de esta enzima se ve influida de manera importante por un alto contenido de carbohidratos en la dieta, así como una elevada concentración de glucosa sanguínea. En este mismo sentido, De Tomas *et al.*, (1973) encontraron que la actividad de la esteroil-CoA  $\Delta 9$  desaturasa se redujo durante la diabetes, y sugieren que esta enzima es controlada por la secreción de insulina, la cual se ve afectada durante la diabetes. Sin embargo, Waters y Ntambi (1994) reportaron que con la administración de insulina la esteroil CoA normaliza su actividad.

Una proporción adecuada de ácidos grasos saturados a monoinsaturados contribuye a la fluidez membranal. Se ha reportado que alteraciones en este cociente están asociados con varias enfermedades cardiovasculares como: obesidad, diabetes mellitus, hipertensión entre otras patologías; la regulación de la SCD es, por lo tanto, de importancia fisiológica (Kim *et al.*, 2000). Ntambi (1999) ha reportado que la actividad de esta enzima es sensible a los cambios en la dieta, variaciones hormonales, desarrollo de enfermedades y modificación de los PPARs. En ese sentido, también reporta que la actividad de la esteroil-CoA  $\Delta 9$  es inhibida durante la diabetes y la hipertensión (Ntambi, 1999). En nuestros resultados vemos que en microsomas de riñón de SHR-STZ la conversión de palmítico a palmitoleico, así como de esteárico a oleico se modificó y por lo tanto, la actividad de la esteroil-CoA pudo haber sido alterada. Es probable que la hiperglicemia modificara la afinidad por los sustratos, como lo observamos en la desaturación del ácido esteárico a oleico, mostrando mayor afinidad por el ácido palmítico para la síntesis de ácido palmitoleico.



**Fig. 35.** Actividad de la esteroil-CoA Δ9 en microsomas de hígado **A)** de palmítico a palmitoleico **B)** de esteárico a oleico. n=6 \*(P <0.05).

Por otro lado, en los animales suplementados con AL (en específico las SHR-STZ-AL), observamos que ocurrió lo contrario. El cociente palmitoleico/palmítico fue menor, lo que indica una menor actividad de la SCD, tal vez por una menor afinidad por el ácido palmítico como sustrato en las membranas microsomales de estos animales. No obstante, al analizar la conversión de ácido esteárico a ácido oleico, vemos que el AL normalizó la actividad de la esteroil-CoA Δ9 reflejándose en el cociente oleico/esteárico (Fig. 35B). Lo anterior parece significar que el AL no sólo contribuyó a “normalizar” la glicemia y la presión arterial, sino que paralelamente, también se “normalizó” la actividad de la esteroil-CoA Δ9. También cabe la posibilidad de que la actividad de la enzima se normalizara como consecuencia de “corregir” la hiperglucemia y/o la presión arterial. Cualquiera que sea el caso, es claro el efecto del AL sobre el metabolismo de los ácidos grasos.

Al analizar la fluidez membranal de microsomas observamos un aumento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados en ratas suplementadas con el AL. La fluidez membranal reportada por el DPiP de los microsomas de hígado, tuvo un patrón diferente de la fluidez de los fantasmas de eritrocitos que previamente investigamos y reportamos (Pérez-Hernández *et al.*, 2010). Sin embargo, al igual que en los fantasmas de eritrocitos, la fluidez membranal de microsomas parece depender principalmente de la composición de ácidos grasos, la cual cambio durante el desarrollo de la diabetes y la hipertensión.

En el caso de los microsomas de riñón, observamos que la fluidez aumentó al paso del tiempo; sin embargo, en las grupos suplementados con AL (SHR-AL y SHR-STZ-AL) vemos que a los 3 meses de edad, la fluidez reportada por el DPiP fue mayor que en los animales no

suplementados (SHR y SHR-STZ). Al analizar el I/S de los microsomas de riñón observamos que tuvo una cinética similar a la del DPiP. Estos resultados coinciden con lo reportado en microsomas de hígado así como en los fantasmas de eritrocitos en donde aparentemente la composición de ácidos grasos es responsable de regular la fluidez membranal.

Es importante recordar que el riñón es un órgano implicado en el desarrollo de la hipertensión, al respecto se ha reportado que al paso del tiempo y con el establecimiento de la patología ocurren modificaciones en la composición de ácidos grasos membranales (Chi y Gupta 1998). En ese sentido Savelli y colaboradores (2002) reportaron que en SHR se altera la composición de ácidos grasos de varios tejidos, incluyendo el riñón. Estas modificaciones parecen contribuir en la patogénesis de la hipertensión. Por su parte Delachambre *et al.* (1998) reportaron que en microsomas de riñón la actividad de la  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  desaturasa favoreció la síntesis de ácido araquidónico, contribuyendo a la síntesis de eicosanoides de la serie 2 y de los leucotrienos de la serie 4, ambos de acción vasoconstrictora principalmente. En este mismo sentido Okamoto (1989) sugirió que la actividad de la PLA<sub>2</sub> incrementó, liberando una mayor cantidad de AA para su posterior uso en la síntesis de eicosanoides. En nuestros resultados no observamos grandes cambios del ácido araquidónico, sin embargo, no descartamos que el AA presente en estas membranas haya sido utilizado para sintetizar prostaglandina y tromboxanos, participando en el establecimiento de la hipertensión.

Narce y Poisson (1995) reportaron una disminución en la actividad de las  $\Delta 6$ ,  $\Delta 5$  como consecuencia de la hipertensión, reflejándose en una menor cantidad de ácidos grasos  $\omega$ -3 (Narce y Poisson, 1995). En nuestro estudio reportamos que el contenido de ácidos grasos  $\omega$ -3 sufrió cambios en membranas microsomales de riñón. En el caso de los animales suplementados con el AL notamos un contenido más abundante de ALA con respecto a los grupos restantes a los 3 meses de edad (Fig. 32B). A los 6 meses vemos que el mismo ácido graso, así como el DHA, muestran una mayor proporción en los animales con AL (33A y B). En lo que respecta a las SHR y SHR-STZ notamos que estos ácidos grasos tienden a disminuir con el paso del tiempo, aunado a la diabetes y la hipertensión que padecieron estos animales. Ramesh *et al.*, (2007) reportaron que la insulina regula la actividad de la  $\Delta 6$  y  $\Delta 9$  desaturasas durante una condición normoglicémica, sin embargo, durante condiciones de diabetes, 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).

## 8. CONCLUSIONES

- El modelo de diabetes mellitus tipo 2 en ratas espontáneamente hipertensas mostró características propias de esta enfermedad tales como la hiperglicemia y un aumento en la concentración de colesterol y triglicéridos sanguíneos.
- Normalmente, la hipertensión se establece a los 3 meses de edad en esta cepa de animales. Aquí se encontró que la hiperglicemia aceleró el desarrollo de la hipertensión confirmando resultados previamente obtenidos en nuestro grupo.
- En ratas inducidas a diabetes (SHR-STZ-AL), el suplemento de aceite de linaza normalizó la concentración de glucosa. Además, retrasó el desarrollo de la hipertensión así como la intensidad de la misma.
- El suplemento de aceite de linaza redujo la concentración de colesterol y triglicéridos sanguíneos.
- Con el tiempo, en las ratas diabéticas (SHR-STZ) la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos tiende a disminuir, asimismo, el cociente de ácidos grasos insaturados a saturados (I/S) mostró el mismo comportamiento, como ya lo hemos reportado.
- En ratas suplementadas con el aceite de linaza observamos un aumento en la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos a la edad de 6 meses. De la misma forma, el cociente de ácidos grasos insaturados a saturados aumentó en estos animales.
- El contenido de ácidos grasos omega 3, como el ácido  $\alpha$  linolénico, el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico, aumentó a los 3 y 6 meses de edad en las membranas de eritrocitos de las ratas suplementadas con el aceite de linaza.
- Al analizar el cociente de insaturación (I/S) de fantasmas de eritrocitos notamos el mismo comportamiento que la fluidez reportada por el DPiP. Por lo tanto, este estudio muestra que la fluidez membranal es principalmente dependiente de la composición de ácidos grasos.

- Al analizar la composición de ácidos grasos de microsomas de hígado y riñón de SHR y SHR-STZ, se observó que el desarrollo de diabetes y/o hipertensión induce varios cambios en su composición, alterando el cociente I/S.
- En microsomas de hígado y riñón, el aceite de linaza aumentó el cociente de insaturación de ácidos grasos a los 3 meses de edad y se mantuvo así hasta los 6 meses de vida.
- En microsomas de hígado y riñón, la fluidez membranal detectada por el DPiP refleja un comportamiento similar al cociente de insaturación de ácidos grasos lo cual significa que también en microsomas, el DPiP es sensible a los cambios en la composición de ácidos grasos.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Ames G. Lipids of salmonella typhimurium and Escherichia coli: structure and metabolism. *J Bacteriol*. 1968. 95: 833-843.
- Avendaño-Flores Y.S. Efecto de los ácidos grasos  $\omega$ -3 en un modelo de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con diabetes mellitus tipo 2. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 2008. Pp 151.
- Bakan E, Yildirim A, Kurtul N, Polat M, Dursun H, Cayir K. Effects of type 2 diabetes mellitus on plasma fatty acids composition and cholesterol content of erythrocyte and leukocyte membranes. *Acta Diabetol*. 2006. 8: 109-113.
- Bartlett G. Phosphorus assay in column chromatography. *J Biol Chem*. 1959. 234: 466-468.
- Baynes J. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991. 40: 405-412.
- Bennett, H. "Aspectos epidemiológicos de la diabetes mellitus de tipo 2". En LeRoith D., Taylor, S., Olefsky, J. "Diabetes Mellitus, Texto Básico y Clínico". Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. 2003. Pp. 1331.
- 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.
- Bergeron R, Yao J, Woods J, Zycband E, Liu C, Li Z, Adams A, Berger J, Zhang B, Moller D, Doebber T. "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- $\alpha$  Agonism Prevents the Onset of Type 2 Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats: A Comparison with PPAR $\gamma$  Agonism." *Endocrinology*. 2006. 147(9): 4252-4262.
- Bergstrom R, Morris N, Leonetti D. Association of elevated fasting C-peptide level and increased intra-abdominal fat distribution with development of NIDDM in Japanese-American men. *Diabetes*. 1990. 39: 104-111
- Bilan P, Klip A. Glycation of the human erythrocyte glucose transporter in vitro and its functional consequences. *Biochem J*. 1990. 268: 661-667.

- Bligh E, Dyer W. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Phys.* 1959. 37: 911-917.
- 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: 795-801.
- 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: 248-254.
- Bucala R, Mitchell R, Arnold K, Innerarity 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: 1082-1089
- Caballero R, Gomez R, Nuñez L, Vaquero M, Tamargo J, Delpon E. Farmacologia 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. Efectosc 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 <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance. *Lipids.* 1998. 33:1023-1030.
- Chih-Hao L, Olson P, Evans R. Minireview: Lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology.* 2003. 6: 2201-2207.
- 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.
- Clandinin T, Cheema S, Field C, Baracos V. Dietary lipids influence insulin action. *Annals of the New York Acad Scie.* 1993. 683: 151–163.
- Clarke S. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: A molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr.* 2001. 131. 1129-1132.
- Connor W. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 2000. 71:171-175.
- Conrad C. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation.* 1995. 91: 161–70.

- Cruz, M., Velasco, E., Kumate, J. "Señales intracelulares que intervienen en el control de la glucosa". Gac. Med. Mex. México, D.F. 2001. Vol. 137(2): 135-146.
- Cuman R. Bsersani-Amado A, Fortes B. influence of type 2 diabetes on the inflammatory response in rats. *Inflamm. Res.* 2001. 50: 460-465
- Das UN. A defect in the activity of  $\Delta 6$  and  $\Delta 5$  desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. *Prostagl Leukot Essent Fat Acids.* 2005. 72: 343-50.
- De Tomas M. Peluffo R. Mercuri, O. Effect of dietary glycerol on the stearic acid and linoleic acid desaturation of normal and diabetic rats. *Biochim Biophys Acta.* 1973. 306, 149-155.
- Delachambre M, Narce M, Asdrúbal P, Poisson. Changes in Tissue Polyunsaturated Fatty Acids with Age, in Spontaneously Hypertensive rats. *Lipids.* 1998. 33: 795-801.
- Delany J, Windhauser M, Champagne C, Bray G. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Amer J of Clin Nutr.* 2000. 72: 905–911.
- Donath M, Gross D, Cerasi E, Kaiser N. Hyperglycemia-induced  $\beta$ -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: 377-384.
- 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: 671-679.
- Eisenbarth G. "Diabetes mellitus tipo 1" en Kahn R, Weir G, King G, Moses A, Smith R, Jacobson A. *Diabetes Mellitus 14<sup>a</sup> edición.* Editorial Internacional ediciones médicas. 2005. Barcelona España. Pp 1207.
- Ferris J, O'Hare J, Kelleher C. Diabetic control and the renin angiotensin system, catecholaminas and blood pressure. *Hypertension* 1985. 7: 1158-1162.
- Field C, Ryan E, Thomson A, Clandinin M. Dietary fat and the diabetic state alter insulin binding and the fatty acyl composition of the adipocyte plasma membrane. *Biochem J.* 1988. 253: 417-424.
- 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, Chatterjee P, Yorek M. Increased membrane fluidity is associated with greater sensitivity to insulin. *Diabetes*. 1987. 36 1-5
- Grunfeld C, Baird K, Kahn C. Maintenance of 3T3-L1 cells in culture media containing saturated fatty acids decreases insulin binding and insulin action. *Biochem and Biophys Res Commun*. 1981. 103: 219-226.
- 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.
- Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore D, Kelly D. The peroxisome proliferator activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994. 91: 11012-11016.
- Guyton, A. C. *Fisiología humana*. 6a edición. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. 1987.
- Harris W, Connor W, Illingworth R, Rothrock D, Foster D. Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans. *J Lipid Res*. 1990. 31:1549-1558.
- Harris W. n-3 fatty acids and lipoproteins: comparison of results from human and animal studies. *Lipids*. 1996. 31:243-252.
- 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. "Principios de Medicina Interna" 15ª Edición. Vol. I y II. Editorial Mc Graw Hill. 2006. Pp: 2467.
- Hemming J, Spafford D. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the fisher 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 2000. 32: 905-919.
- Hirafuji M, Machida T, Hamanue, Minami M. Cardiovascular protective effects of n-3 polyunsaturated fatty acids with special emphasis on docosahexaenoic acid. *J Pharmacol Sci*. 2003. 92: 308-316.
- 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*. 1983. 80: 2375-2379.
- Hulbert A, Turner N, Storlien L, Else P. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev*. 2005. 80: 155-169.
- Jacobs D, Mebane I, Bangdiwala S, Criqui M, Tyroler H. 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 R, Weir G, King G, Moses A, Smith R, Jacobson A. Diabetes Mellitus 14a edición. Editorial Internacional ediciones médicas. 2005. Barcelona España. Pp 1207.
- Kates M, Pugh E, Ferrante G. Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. *Biomembranes*. 1984. 12: 379-395.
- Kawabe K, Watanabe TX, Shiono K, Sokabe H. Influence on blood pressure of renal isografts between spontaneously hypertensive and normotensive rats, utilizing the F1 hybrids. *Jpn. Heart J*. 1978. 19: 886–894.
- Kawamura M, Heinecke J. Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of LDL by superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 1994. 94:771-778.
- Kim, Y. C., Gomez, F. E., Fox, B. G. & Ntambi, J. M. Differential regulation of the stearyl-CoA desaturase genes by thiazolidinediones in 3T3-L1 adipocytes. *J. Lipid Res*. 2000. 41: 1310-1316.
- Kim H, Takahashi M, Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. *J Chem*. 1999. 274: 25892-25898.
- Koch-Weser J. Correlation of pathophysiology and pharmacotherapy in primary Hypertension. *Am J Cardiol*. 1973. 32: 499-510.
- Kota B, Huang W, Roufogalis D. An overview on biological mechanism of PPARs. *Pharmacol Res*. 2005. 51: 85-94.
- Koyama K, Chen G, Lee Y, Unger R. Tissue triglycerides, insulin resistance and insulin production: implications for hyperinsulinemia of obesity. *Am J Physiol*. 1997. 273: 708.
- 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*. 1997. 27:780-787.
- Lawrence M, Tyrney Jr, Stephen J. Diagnostico clínico y tratamiento. 38 edición, editorial manual moderno. México, DF. 2003. Pp 1171-1179.
- 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.
- Lee Y, Hirose H, Ohneda M. Beta-cell lipotoxicity in the patogénesis of obese rats: impairment in adipocyte beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci Usa*. 1994. 91: 10878.
- LeRoith, D. Taylor, S. Olefsky, J. Diabetes Mellitus Texto básico y clínico. 2ª edición. Editorial Mc Graw-Hill. México. D.F. 2003. Pp: 1331.
- 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.

- 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.
- Mejía R, Gomez-Eichelman M, Fernandez M. Membrane fluidity of *Escherichia coli* during heat-shock. *Biochim Biophys Acta* 1995. 1239: 195-200.
- 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.
- Minami A, Ishimura N, Sakamoto S, Takishita E, Mawatari K, Okada K and Nakaya Y. Effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester v. oleic acid-rich safflower oil on insulin resistance in type 2 diabetic model rats with hypertriglycerolaemia. *J of Nutri.* 2002. 87: 157–162
- Moragrega A. Definición, clasificación, epidemiología, estratificación del riesgo, prevención primaria. *Rev Mex Cardiol* 2005. 1: 7-13
- Moretti N, Rabin R, Nanetti L, Grechi G, Curzi M, Cester N, Tranquilli L, Mazzanti L. Sialic acid content in erythrocyte membranes from pregnant women affected by gestational diabetes. *Metabolism.* 2002. 51: 605-608.
- 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.
- Murali B y Ramesh K. Improvement insulin sensitivity by losartan in non-insulin-dependent diabetic rats. *Pharmacol Res.* 2001. 44 (5): 385-389.
- Nancy A, Worcester A, Bruckdorfer T, Hallinan T, Wilkins A, Jane A. the influence of diet and diabetes on stearoyl coenzyme A desaturasa activity and fatty acid composition in rat tissues. *J Nutr.* 1979. 41: 239-251
- Nannetti L, Virgini A, Rafaelli F, Moroni C, Silvestrini M, Provinciali L, Mazzanti L. Platelet membrane fluidity and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity in acute stroke. *Brain Research.* 2008. 1205: 21-26
- Naomi D, Fisher H, Williams H. Vasculopatía hipertensiva. En Harrison T. "Principios de Medicina Interna" 15ª Edición. Vol. I y II. Editorial Mc Graw Hill. 2006. Pp: 2467.
- Narce M, Frenoux J, Dardel V, Foucher C, Germain S, Delachambre M, Poisson J. Fatty acid metabolism, pharmacological nutrients and hypertension. *Biochimie.* 1997. 79: 135-138.
- Narce M, Poisson P. Age-related depletion of linoleic acid desaturation in liver microsomas from young spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1995. 53: 59-63.
- Nasiff-Hadad A, Meriño-Ibarra E. "Ácidos grasos omega-3: pescados de carne azul y concentrados de aceites de pescado". *Rev Cubana Med.* 2003. 42(2). 38-45

- Ntambi J. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Research*. 1999. 40: 1549-1568.
- Ogawa A, Suzuki Y, Toshiaki A, Hiroyuki T. Effect of dietary alpha-linolenic acid on vascular reactivity in aorta of spontaneously hypertensive rats. *J. Oleo Sci*. 2009. 58: 221-225.
- Okamoto A. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap. Circ J*. 1963. 27: 282–293.
- 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.
- Oliver W, Shenk I, Snaith M, Russell C, Plunket K, Bodkin N, Lewis M, Winegar D, Sznaidman M, Lambert M, Xu H, Sternbachdd, Kliewer S, Hansen B, Willson T: A selective peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001. 98: 5307-5311.
- Orozco-Tapia R. Efecto de los ácidos grasos omega 3 (FA  $\omega$ -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.
- Park Y, Harris W. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res*. 2003. 44: 455-63.
- Pérez I, Avendaño Y, Mejía R. Analysis of the membrane fluidity of erythrocytes ghosts in diabetic, spontaneously hypertensive rats. *Acta diabetol*. 2010. 47 (Suppl 1): 47-55.
- 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.
- Pinto Y, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovasc Res*. 1998. 39: 77-88.
- 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:1331
- 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. *Biochim et Biophys Acta*. 2005. 1713: 5-14.

- Rader D, Raper S, Wilson J. Terapéutica génica de enfermedades metabólicas. 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.
- Radziuk J, Pye S. Hepatic glucose uptake, gluconeogenesis and the regulation of glycogen synthesis. Diabetes Metab Res Rev. 2001. 17: 250-272.
- 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.
- Randeree H, Omar M, Motala A, Seedat M. Effect of insulin therapy on blood pressure in NIDDM patients with secondary failure. Diabet Care. 1992. 15: 1258-1264.
- 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.
- Reijonen H y Concannon P. "Genética de la diabetes tipo 1" en Kahn R, Weir G, King G, Moses A, Smith R, Jacobson A. Diabetes Mellitus 14a edición. Editorial Internacional ediciones médicas. 2005. Barcelona España. Pp 1207.
- Reitman M. Modelos genéticos de obesidad y diabetes mellitus En LeRoith, D. Taylor, S. Olefsky, J. Diabetes Mellitus Texto básico y clínico. 2ª edición. Editorial Mc Graw-Hill. México. D.F. 2003. Pp: 1331.
- Rettig, R. Does the kidney play a role in the aetiology of primary hypertension? Evidence from renal transplantation studies in rats and humans. J. Hum Hypertens. 1993. 7:177-180
- Risérus U, Willer W, Hu F. Dietary fats and prevention of type 2 diabetes. Lipid Research. 2009. 48: 44-51.
- Ritz E, Hasslacher C, Guo J, Mann J. Role of hipertensión in diabetic nephropathy. Diabetic and the kidney. 1989. 91: 111-115
- Robertson P, Harmon J, Oanh P, Tanaka Y, Takashi H. Glucose Toxicity in b cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and glutathione connection. Diabetes. 2003. 52: 584-587.
- 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  $\beta$ -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  $\beta$ -cell dysfunction. J Physiol Biochem 2000. 56: 119-128.
- Roche E. Type 2 diabetes: gluco-lipo-toxicity and pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. Ars Pharma. 2003. 44: 313-332.
- Rodriguez-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.

- Rodriguez-Leyva D, Basset C, McCullough R, Pierce G. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *J. Cardiol.* 2009. 26: 489-496.
- 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- $\alpha$  gene in the pancreatic  $\beta$ -cell. *J Biol Chem* 2000; 275: 35799-35806.
- Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo R. Glucose Toxicity. *Diabetes Care.* 1990. 13: 610-618
- Rossetti L. Glucose toxicity: the implications of hyperglycemia in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Clin Invest Med* 1995; 18: 255-260.
- Rossetti P, Pampanelli S, Fanelli C, Porcellati F, Costa E, Torlone E, Scionti L, Bolli G. Intensive replacement of basal insulin in patients with type 1 diabetes given rapid-acting insulin analog at mealtime: a 3-month comparison between administration of NPH insulin four times daily and glargine insulin at dinner or bedtime. *Diab Care* 2003. 26:1490-1496.
- Sanders T. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am. J. clinic Nutr.* 2000. 71: 176-180.
- Savelli J, Narce M, Fustier V, Poisson P. Desaturase activities are depleted before and after weaning in liver microsomes of spontaneously hypertensive rats. *Prostag Leuko and Essen Fatty Acids.* 2002. 66: 541-547.
- 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.
- Sekine S, Sasanuki S, Aoyama T, Takeuchi H. Lowering systolic blood pressure and increases in vasodilator levels in SHR with oral alpha-linolenic acid administration. *J Oleo Sci.* 2007. 56: 341-345.
- Shin C, Lee M, Park K, Kim S, Cho B, Lee H, Koh C, Min H. Insulin restores fatty acid composition earlier in live microsomes than erythrocyte membranes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diab Res and Clin Pract.* 1995. 29: 93-98.
- Stern N, Tuck M. 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.
- Straczkowski M, Kowalska I, Gorski J, Kinalska I. The effect of a single bout of exhaustive exercise on muscle carbohydrate and lipid metabolism in rat model of type 2 diabetes mellitus. *Acta diabetol.* 2000. 37: 47-53.
- Szkudelski, T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in  $\beta$ -cells of the rat pancreas. *Physiol Res.* 2001; 50: 536-546.
- Trautwein E. n-3 fatty acids-physiological and technical aspects for their use in food. *Eur. J. Lipid Sci Technol.* 2001. 103: 45-44.

- Tsuda K, Kinoshita Y, Nishio I. Hyperinsulinemia is a determinant of membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension . 2001. Am J Hypertens. 14: 419-423.
- Tsuda K. Electron paramagnetic resonance investigation on modulatory effects of benidipine on membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension. Heart Ves. 2008. 23: 134-139.
- Turner R, Stratton I, Horton V. UKPDS 25: autoantibodies to islet-cell cytoplasm and glucotamic acid decarboxylase for prediction of insulin requirement in type 2 diabetes. UK Prospec Diab Study Group. Lancet. 1997. 350: 1288-1296.
- 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.
- Unger R, Zhou Y, Orci L. Regulation of fatty acids homeostasis in cells: novel role of leptin. Proc Natl Acad Sci Usa. 1999. 96: 2327.
- Vamecq J, Latruffe N. Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. Lancet. 1999. 354: 141-148.
- Vance, E.D. and Vance, E. Jean. Biochemistry of Lipids and Membranes. The Benjamin/Cummings publishing Company. INC. 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.
- Von Schacky C, Baumann K, Angerer P. The effect of n-3 fatty acids on coronary atherosclerosis: results from SCIMO, an angiographic study, background and implications. Lipids. 2001. 36: 99-102.
- Waczulíková I, Sikurová L, Cársky J, Strbová L, Krahulec B. Decreased fluidity of isolated erythrocytes membranes in type 1 and type 2 diabetes. The effect of resocylidine aminoguanidine. Gen Physiol Biofys. 2000. 19: 381-392.
- Waters K, Ntambi J. Insulin and dietary fructose induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in liver of diabetic mice. J Biol Chem. 1994. 269: 27773-27777.
- 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. Diab Care 1983. 6: 361
- WHO. Multinational study of vascular disease in diabetes. Diabetol. 2001. 44: 14-21.
- Wiernsperger N, Bailey C. The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanism. Drugs. 1999. 58 (suppl-1) 31-39.
- Williams CM, Moore F, Morgan L, Wright J. Effects of n-3 fatty acids on postprandial triacylglycerol and hormone concentrations in normal subjects. Br J Nutr. 1992. 68: 655-666.

- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J clin invest 1991. 88: 1785.
- 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.
- Zeisel, S.H. Choline Phospholipids: signal transduction and carcinogenesis. Faseb J. 1993. 7: 551-557.
- Zhang, F., Ye, C., Li, Guo., et. al. "The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters. Exp. Anim. 2003. 52(5), 401-407
- 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.

## 10. APÉNDICE 1

Tabla 18. Composición de ácidos grasos (mol%) de la dieta

<b>Mirístico</b>	<b>0.25%</b>
<b>Palmítico</b>	<b>14.55%</b>
<b>Palmitoleico</b>	<b>0.21%</b>
<b>Estearico</b>	<b>4.33%</b>
<b>Oléico</b>	<b>15.75%</b>
<b>Linoleico</b>	<b>30.03%</b>
<b><math>\alpha</math> Linolénico</b>	<b>3.11%</b>
<b>CLA</b>	<b>1.53%</b>
<b>Erucato</b>	<b>0.05%</b>
<b>Eicosanoato</b>	<b>7.27%</b>
<b>Araquidónico</b>	<b>0.38%</b>
<b>EPA</b>	<b>0.22%</b>
<b>DHA</b>	<b>0.05%</b>
<b>Compuestos de 20:3</b>	<b>14.75%</b>
<b>Otros</b>	<b>7.51%</b>

**Tabla 19. Composición de ácidos grasos (mol%) del aceite de linaza**

<b>Palmítico</b>	<b>6%</b>
<b>Oléico</b>	<b>21%</b>
<b>Linoleico</b>	<b>17%</b>
<b>Linolénico</b>	<b>56%</b>
<b>Otros</b>	<b>0%</b>