



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas
en diabetes mellitus tipo-2:
efecto de ácidos grasos omega-3**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RAMIRO PERUSQUIA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Ricardo Mejía Zepeda



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 4 de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, bajo la tutoría del Dr. Ricardo Mejía Zepeda y la asesoría de la Dra. María del consuelo Figueroa García

Al Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT No. IN-215917-3 otorgado al Dr. Ricardo Mejía Zepeda. UBIMED. FESI-UNAM.

A los miembros del sínodo por ayudarme a mejorar.

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.

Dr. Martín Palomar Morales.

M en C. Irma Elena Dueñas García.

Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro.

A los integrantes del laboratorio 4 por el apoyo brindado, tanto académico como personal.

DEDICATORIAS

A mis padres por el apoyo brindado durante toda mi formación académica. Los quiero demasiado, son los pilares que me mantienen de pie, aquellos que le dan un sentido a mi día.

A mis hermanas, son mis segundas madres, ustedes fueron la razón de mi conciencia, abogando siempre por mi bienestar de manera incondicional.

Isaac, eres el lado luminoso de nuestra amistad, siempre fuiste mi conciencia en mis momentos más oscuros y desesperados, sin ti no estaría en donde estoy, gracias por compartir años de tu vida académica y personal conmigo, por algo fuiste, eres y serás mi mejor amigo, espero poder conservar tu amistad hasta el final de todo. ~May the force be with us~

Faride, no sé cómo expresarte lo importante que eres para mí, a pesar de que tenemos nuestras fricciones y hay momentos en los que desconocemos al otro. Siempre ocuparás un lugar muy especial en mi corazón, te considero mi mejor amiga y quiero seguir considerándote así, gracias a ti logré superar muchos obstáculos personales, creciendo como persona, espero poder conservar tu amistad hasta el final del tiempo y la existencia. ~Little kitten~

Danae, tú me demostraste que cualquier problema es pequeño, todo se puede superar si se tiene la determinación necesaria, me has enseñado mucho, quizá no logro demostrarlo, pero es una realidad que llevo conmigo día a día. ~Pettit lapin~

Dra. Figueroa, mi madre académica, no tengo palabras para demostrar todo lo que hizo por mí, literalmente no sé cómo expresarme, la palabra "gracias" no basta, mucho menos todos los elogios del mundo, quiero que tenga en mente que usted marcó el antes y el después en esta tesis, me abrió los ojos en múltiples aspectos, espero algún momento poder llamarla amiga. ~Es mucho más difícil juzgarse a sí mismo que juzgar a los otros. Si consigues juzgarte rectamente es que eres un verdadero sabio~

Dr. Ricardo, mi padre académico, usted ya puso las bases como investigador en mí, es un gran ser humano que comprende a los demás por lo que son, personas que se pueden equivocar y/o triunfar, esa característica lo pone en un plano superior a todos los demás académicos que conozco, me gustaría en algún momento ser colega suyo y posiblemente llamarlo mi amigo. Usted dejó una marca en mí, la apreciaré y conservaré como el tesoro más preciado en la existencia.

Fly as high as possible,

but remember...

Never too close to the sun

ÍNDICE

I.	ÍNDICE DE TABLAS	IV
II.	ÍNDICE DE FIGURAS	VII
III.	ABREVIATURAS	VIII
1	RESUMEN	IX
	ABSTRACT	XI
2	INTRODUCCIÓN	1
2.1	Diabetes mellitus.....	1
2.1.1	Tipos de diabetes.....	2
2.1.2	Diabetes mellitus tipo 2.....	3
2.2	Hígado	4
2.3	Ácidos grasos	5
2.4	Ácidos grasos omega-3	5
2.5	Membranas biológicas	7
2.6	Mitocondria	8
2.7	Estrés oxidativo.....	8
2.8	Peroxidación lipídica	9
3	ANTECEDENTES	11
4	JUSTIFICACIÓN	13
5	HIPÓTESIS	14
6	OBJETIVOS	15
6.1	Objetivo general.....	15
6.2	Objetivos particulares	15
7	MATERIAL Y MÉTODOS	16

7.1	Modelos animales	16
7.1.1	Grupos control	16
7.1.2	Grupos inducidos a DM2	17
7.2	Parámetros fisiológicos	17
7.3	Procesamiento de los organismos, obtención de tejido y mitocondrias hepáticas	18
7.3.1	Oximetría	19
7.3.2	Obtención de metil-esteres	19
7.4	Cromatografía de gases	20
7.5	Cuantificación de lipoperóxidos	21
7.6	Análisis estadístico	22
8	RESULTADOS	23
8.1	Composición de ácidos grasos de tejido hepático de ratas Wistar	23
8.2	Composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar	32
8.3	Cociente de fluidez de tejido hepático comparado con sus respectivas mitocondrias	41
8.4	Efecto de los ácidos grasos omega-3 en la lipoperoxidación en mitocondrias hepáticas de ratas Wistar	44
8.5	Correlación lipoperoxidación – coeficiente de fluidez de mitocondrias hepática	47
9	DISCUSIÓN	49
9.1	Composición de ácidos grasos de hígado	49
9.2	Composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas.....	54
9.3	Fluidez tejido-mitocondria.	63

9.4	Lipoperoxidación.....	65
9.5	Correlación entre índice de fluidez (I/S) y lipoperoxidación	68
10	CONCLUSIONES	70
11	PERSPECTIVAS	72
12	LITERATURA CITADA	73
13	ANEXO I	83

I. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de ácidos grasos de acuerdo al número de átomos.	8
Tabla 2	Clasificación de ácidos grasos por grado de insaturaciones.	8
Tabla 3	Preparación de la curva con tetrametoxipropano.	22
Tabla 4	Preparación de las muestras de mitocondria.	22
Tabla 5	Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), a 1 mes de edad.	24
Tabla 6	Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), a 3 meses de edad.	24
Tabla 7	Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar normoglucémicas (CN), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.	26
Tabla 8	Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.	27
Tabla 9	Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), a 6 meses de edad.	28
Tabla 10	Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar normoglucémicas (CN) tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 6 meses de edad.	30

Tabla 11	Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 6 meses de edad.	31
Tabla 12	Composición de ácidos grasos (mol %) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ y normoglucémicas (CN), a 1 mes de edad.	33
Tabla 13	Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ y normoglucémicas (CN), a 3 meses de edad.	33
Tabla 14	Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar normoglucémicas (CN), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.	35
Tabla 15	Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ), tratadas con ácidos grasos omega 3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.	36
Tabla 16	Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), a 6 meses de edad.	37
Tabla 17	Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar normoglucémicas (CN), tratadas con ácidos grasos omega 3 (AG ω -3), a 6 meses de edad. (AG ω -3).	38
Tabla 18	Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ), tratadas con ácidos grasos omega 3 (AG ω -3), a 6 meses de edad.	40

Tabla 19	Coeficiente de correlación de la lipoperoxidación en función de el cociente de fluidez (insaturados entre saturados) de mitocondrias, todos los grupos experimentales.	48
Tabla 20	Comparación entre el cociente de insaturación (I/S) y la fluidez detectada por el monitor fluorescente (DPH). A) comparación I/S contra la energía de activación fase gel; B) comparación I/S contra la energía de activación fase liquido cristalino.	62
Tabla 21	Correlación entre lipoperoxidación y los ácidos grasos linolénico, EPA y DHA de todos los grupos experimentales.	83

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Reacción química de daño por radicales libres.	10
Figura 2	Cociente de fluidez (I/S) de tejido hepático (TEJ) comparado con sus respectivas mitocondrias (MIT), grupo normoglucémico CN y grupo inducido a diabetes (STZ), a un mes de edad.	41
Figura 3	Cociente de fluidez (I/S) de tejido hepático (TEJ), mitocondrias (MIT) de hígado y sus respectivos tratamientos.	42
Figura 4	Cociente de fluidez (I/S) de tejido hepático (TEJ), mitocondrias (MIT) de hígado y sus respectivos tratamientos.	43
Figura 5	Lipoperoxidación, evaluada como cantidad de MDA (nmol/mg proteína) en mitocondrias hepáticas, grupo normoglucémico (CN) e inducido a diabetes (STZ), a 1 mes de edad.	44
Figura 6	Lipoperoxidación, evaluada como cantidad de MDA (nmol/mg proteína) en mitocondrias hepáticas, grupo normoglucémico (CN) e inducido a diabetes (STZ), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.	45
Figura 7	Lipoperoxidación, evaluada como cantidad de MDA (nmol/mg proteína) en mitocondrias hepáticas, grupo normoglucémico (CN) e inducido a diabetes (STZ), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 6 meses de edad.	46
Figura 8	Es quema de la localización preferencial de los monitores fluorescentes. TMA-DPH; Trimetil Amonio difenil hexatrieno; DPiP, Dipirenil Propano; DPH, Difenil hexatrieno.	59

III. ABREVIATURAS

ADA	American Diabetes Association (Asociación americana de Diabetes).
AG	Ácidos grasos.
AGI	Ácidos grasos insaturados.
AGL	Ácidos grasos libres.
AGS	Ácidos grasos saturados.
AG ω -3	Ácidos grasos omega-3.
ATP	Adenosin trifosfato.
DM	Diabetes mellitus.
DM1	Diabetes mellitus tipo 1.
DM2	Diabetes mellitus tipo 2.
DME	Otros tipos de diabetes mellitus específicos.
DMG	Diabetes mellitus gestacional.
ETC	cadena transportadora de electrones.
GLC	Glucosa.
GLCS	Glucosa en sangre.
IDF	International Diabetes Federation (Federación Internacional de Diabetes).
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática.
INS	Insulina.
ISR	Insulinorresistencia.
MAM	Membrana asociada a mitocondria.
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud/World Health Organization.
PPARs	Receptores Asociados a Proliferación Peroxisomal.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
STZ	Grupo inducido a diabetes.
TG	Triglicéridos.

1 RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2, es un síndrome, que se caracteriza por hiperglucemia crónica, un déficit parcial en producción y síntesis de insulina y/o por el desarrollo de resistencia a la insulina, además, por un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y cambios en el metabolismo, incluido el metabolismo de lípidos. En general, se acepta que durante el desarrollo de la diabetes mellitus se reduce la fluidez de la membrana. Los ácidos grasos omega-3 han sido estudiados por sus supuestos efectos benéficos en contra del desarrollo de la diabetes. Se ha reportado que: reducen la concentración de glucosa en sangre y previenen el desarrollo de insulinoresistencia, además que los ácidos grasos omega-3 pueden regular la fluidez de la membrana. Por las razones anteriormente mencionadas, se decidió analizar el efecto de diferentes esquemas de dosificación de ácidos grasos omega-3 en: la composición de ácidos grasos de tejido hepático y mitocondrias hepática (por la importancia del hígado en el metabolismo de lípidos) y, además, analizar su efecto en la producción de lipoperóxidos en mitocondria durante el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 2. Se analizó la composición de ácidos grasos de la mitocondria y tejido hepático por cromatografía de gases, y se estimó la fluidez de la membrana por el cociente de ácidos grasos insaturados y ácidos grasos saturados (I/S), además, se cuantificó la lipoperoxidación por el método de TBARS. Nuestros hallazgos indican que la diabetes *per se*, cambia la composición de ácidos grasos tanto en mitocondria como en tejido hepático completo. El cociente I/S fue diferente entre tejido hepático completo y sus respectivas mitocondrias. Ni en la edad, ni los tratamientos generaron diferencias significativas en el cociente I/S en el hígado. Los diferentes esquemas de dosificación (esporádico, regular y crónico) de ácidos grasos omega-3, cambian la proporción de ácidos insaturados y saturados en mitocondria. La edad de 3 meses, representa un estado muy heterogéneo en las ratas, esto posiblemente se deba a la proximidad que tiene esta edad con el surgimiento de la madurez sexual de las ratas. A los 6 meses de edad, los tratamientos no afectan la proporción I/S en hígado, pero en mitocondria de las ratas normoglucémicas si lo hace, reduciendo la

proporción insaturado/saturado conforme aumenta la dosis de ácidos grasos omega-3, sin embargo, en las mitocondrias de ratas diabéticas, aumenta la proporción I/S conforme aumenta el consumo de ácidos grasos omega-3. En general, en la condición diabética aumenta la lipoperoxidación. El tratamiento en las ratas normoglucémicas de 3 meses de edad, incrementa la producción de lipoperóxidos por encima de la concentración encontrada en las diabéticas sin tratamiento. En las ratas de seis meses de edad, en apariencia, los tratamientos tuvieron un efecto positivo en contra de la peroxidación lipídica, disminuyendo la concentración de malondialdehído en ambos grupos. Los resultados obtenidos, demostraron que los ácidos grasos omega-3 tienen un efecto benéfico en los organismos con diabetes, pero en las normoglucémicas, en apariencia, favorece el desarrollo de diabetes.

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus, is a syndrome characterized by a chronic hyperglycemia, a partial deficit in the synthesis or production of insulin and/or a development of insulin resistance, as well as enhanced production of reactive oxygen species, and changes in the whole metabolism, including lipid metabolism. In general, it is accepted that the developmental process of diabetes decreases membrane fluidity. The Omega-3 fatty acids have been studied because of their supposed beneficial effects against diabetes mellitus. It has been reported that: they can control the blood glucose concentration and prevent the development of insulin resistance, also, in some studies, it is reported that they can regulate the membrane fluidity. Because of these reasons we decide to analyze the effect of different dosing schemes of omega 3 fatty acids on fatty acid composition of liver mitochondria and liver tissue since they have an important role in lipid metabolism, and also, the effect of these fatty acids on production of lipoperoxides in mitochondria during the development of type 2 diabetes. We analyzed the fatty acids composition of both whole liver and hepatic mitochondria by gas chromatography, and estimated the membrane fluidity by the unsaturated to saturated fatty acids ratio (U/S). Additionally, we measured the lipoperoxidation by the method of TBARS. Our findings indicate that diabetes *per se*, changes fatty acid composition in both liver and mitochondria. The U/S ratio was different between whole liver and hepatic mitochondria. In liver, there were no major differences in the U/S ratio either by age or by the treatments. The different dosing schemes (sporadic, regular, and chronic) of omega 3 fatty acids change the U/S ratio in mitochondria. The age of three months-old represents a heterogeneous state in the rats, possibly by the proximity with their sexual maturity. At 6 months-old rats, the treatments don't affect the U/S ratio in liver, but, in mitochondria, it does, in addition, this ratio decreased as the doses of omega-3 increases in normoglycemic rats, however in diabetic state, it seems to increase such ratio. The lipid peroxidation increases by diabetes. At three months-old, in diabetic rats, the treatments controlled the lipoperoxidation in mitochondria, but in non-diabetic rats with treatment the lipoperoxidation increased above the level of

diabetic without treatment. At six months-old rats, the treatments apparently had a positive effect against lipid peroxidation, decreasing the concentration of malondialdehyde in both groups. All of these data together demonstrate that omega-3 fatty acid has beneficial effects in diabetic rats, but in the normoglycemic ones, there is not such beneficial effect and, in appearance, leads to the development of diabetes.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Diabetes mellitus

La Diabetes mellitus (DM) es un desajuste metabólico con la peculiaridad de presentar hiperglucemia (Baynes, 2015), junto con relativa o absoluta deficiencia en la secreción de insulina (INS) y/o resistencia a la acción de la misma (Islas y Revilla, 2013). La DM afecta aproximadamente a 415 millones de personas en el mundo, la International Diabetes Federation (IDF) estima que esta cifra podría aumentar hasta 642 millones de personas para el 2040 (IDF, 2015), este padecimiento es una de las principales causas de muerte en el mundo, tan sólo en México 98 mil 521 muertes fueron atribuidas a complicaciones derivadas de la DM en el 2015, esto de acuerdo a cifras reportadas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía e Informática (INEGI) (INEGI, 2017).

La DM es considerada como un síndrome “silencioso” puesto que es asintomática en etapas tempranas. Cuando la DM se complica resulta en alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas y a su vez se asocia con daño a largo plazo, disfunción o falla de varios órganos (ojos, riñones, corazón) y vasos sanguíneos (American Diabetes Association [ADA], 2014; World Health Organization [WHO o por sus siglas en español OMS], 2016). Para los propósitos de este trabajo, es importante mencionar que, a nivel celular, una característica de la diabetes es el aumento en la rigidez de las membranas, lo cual documentaremos más adelante.

2.1.1 Tipos de diabetes

El Comité de Especialistas en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes, tipifica a la DM en; diabetes mellitus tipo 1 (DM1) diabetes mellitus tipo 2 (DM2), diabetes mellitus gestacional (DMG) y otros tipos de diabetes mellitus específicos (DME) (The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2003). Las características principales de cada tipo de DM de acuerdo a diferentes autores son:

- DM1: Se caracteriza por la destrucción de células beta-pancreáticas por procesos autoinmunes; se genera una absoluta deficiencia en la producción de insulina (Kumar y Clark, 2002) y al dejar de producirla, se pierde en gran parte la regulación de glucosa en sangre (GLCS).
- DM2: Se caracteriza por hiperglucemia crónica causada por la producción inadecuada de insulina o la falta de respuesta del cuerpo a la misma (Insulinorresistencia [ISR]) (IDF, 2017).
- DMG: Se presenta alrededor de la 24^a semana del embarazo, en este periodo, las mujeres desarrollan una ISR y por consecuencia un aumento en la glucemia, dicha ISR se cree que es por la carga hormonal de la mujer (IDF, 2013).
- DME: Se genera por defectos en las células beta pancreáticas, defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades que afecten el sistema exocrino del páncreas, por fármacos, infecciones y otros síndromes asociados con diabetes (The Expert committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2003).

2.1.2 Diabetes mellitus tipo 2

La DM2 es considerada el tipo más abundante de acuerdo a la ADA (2015) ya que es responsable del 90 al 95% de los casos de DM en el mundo. La DM2 es una condición que se desarrolla a través múltiples factores, como puede ser el envejecimiento (aunque también se han reportado casos en niños y adolescentes), una mala dieta, factores genéticos y/o ISR, etc. (ADA, 2007). También se caracteriza por un descontrol en la glucemia, anormalidades en la secreción-producción de INS, ISR en algunos tejidos (hepático, muscular y adiposo), alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Lyra *et al.*, 2009), cambios en el índice aterogénico asociado a cambios en la concentración de triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de alta densidad, y lipoproteínas de baja densidad (Costa *et al.*, 2016) y en la plasticidad de las membranas celulares (Weijers, 2012), esto último debido a que altera el metabolismo de lípidos y genera un aumento en la concentración de ácidos grasos saturados (AGS), siendo estos promotores de rigidez en la membrana lo cual es coherente los trabajos previos de por Borkman *et al.* (1993), Ruiz-Gutierrez *et al.* (1993), Clifton y Nestel (1998) y Bakan *et al.* (2006), que demuestran que durante el desarrollo de DM2, se presenta una baja en la fluidez de la membrana (reducción de ácidos grasos con insaturaciones), ya que dicha patología como se mencionó, promueve la rigidez en sistemas membranosos. Una de las propuestas para mitigar los signos anteriormente mencionados es el uso de ácidos grasos omega-3 (AG ω -3) como complemento en las dietas de los pacientes ya que presentan propiedades que aparentemente ayudan a mitigar algunas de las consecuencias generadas por la DM2 y a la prevención de la misma.

2.2 Hígado

El hígado es el órgano más grande en humanos, puesto que ocupa aproximadamente de un 2% a 3% del peso total del cuerpo (Abdel-Misih y Bloomston, 2010). El hígado regula la salida de glucosa (GLC) al torrente sanguíneo por medio de un ciclo dinámico entre el hígado y las células beta del páncreas (Matthews, 2010). La insulina (secretada por las células beta del páncreas) regula la secreción de GLC por parte del hígado al torrente sanguíneo y estimula la absorción de GLCS por músculo, tejido adiposo y el mismo hígado, resultando en una baja en la glucemia. La hipoglucemia nuevamente estimula al hígado a producir GLC por medio de la glucogenólisis y gluconeogénesis y la libera al torrente sanguíneo, regulando así las concentraciones de GLCS (Wasserman, 2008). Además, se sabe que el hígado cumple diversas funciones en el humano, como son:

- Almacenamiento: Glucógeno, vitaminas (A, B₁₂, D, E y K) y minerales (hierro y cobre).
- Metabolismo de hidratos de carbono: El hígado puede sintetizar GLC a partir de fructosa, galactosa, ciertos aminoácidos y ácido láctico o liberar GLC por la ruptura de glucógeno
- Metabolismo proteico: Los hepatocitos desaminan los aminoácidos para poder ser utilizados en la producción de adenosin trifosfato (ATP), hidratos de carbono o grasas, también sintetizan proteínas plasmáticas como alfa y beta globulinas y albúmina.
- Metabolismo de lípidos: Almacenamiento y degradación de TG para sintetizar ATP, sintetizan lipoproteínas para el transporte de AG y colesterol para otras células del organismo.

2.3 Ácidos grasos

Los ácidos grasos (AG) son cadenas de hasta 24 carbonos con un grupo carboxilo terminal, el cual les confiere propiedades anfipáticas. Estas moléculas son sintetizadas a partir del acetil-CoA y generalmente se encuentran en forma de ésteres de glicerol, aunque también se pueden encontrar en forma de ácidos grasos libres (AGL), acilgliceroles, glicerofosfolípidos y ésteres de colesterol. Los AG se clasifican de acuerdo a la longitud de la cadena (tabla 1) y al grado de insaturaciones que presenten (tabla 2). Dentro de la clasificación de los AG se encuentra un grupo denominado “ácidos grasos esenciales”, que no son sintetizados por el humano y deben ser consumidos en la dieta, estos AG son los omega-6 (derivados del ácido linoleico) y AG ω -3 (derivados del alfa-linolénico) (Martínez *et al.*, 2013). Los AG cumplen muchas funciones en el humano, tales como: almacén y fuentes de energía, reguladores de procesos genéticos y componentes esenciales de estructuras celulares, como son las membranas biológicas.

2.4 Ácidos grasos omega-3

Los AG ω -3 presentan una doble ligadura en el tercer carbono de la cadena contando del metilo terminal hacia el carboxilo terminal. Sus dobles enlaces siempre están en posición *cis*. Los AG ω -3 son esenciales, lo que significa que el ser humano no los puede sintetizar y debe obtenerlos de los alimentos; las principales fuentes de estos AG son mariscos, pescados, mamíferos marinos y en aceites en plantas, en particular esta última fuente es importante en el caso del ácido graso alfa-linolénico (Thorseng *et al.*, 2009) y en algunas semillas como las nueces. Los AG ω -3 han sido popularizados por sus múltiples efectos benéficos, en contra de algunas enfermedades y síndromes. Estudios realizados por Kraegen *et al.* (1986), Storlien *et al.* (1987), Oakes *et al.* (1997), demostraron en modelos animales que el uso de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados, previenen el desarrollo de ISR y disminuyen la concentración de TG en sangre (Farmer *et al.*, 2001). También se conoce que los AG ω -3 participan en la estimulación de los Receptores Asociados a

Proliferación Peroxisomal (PPAR por sus siglas en inglés), como es el caso del PPAR α (Göttlicher *et al.*, 1992). Los PPARs participan en la regulación de múltiples funciones metabólicas, como son la oxidación de ácidos grasos en mitocondria y la síntesis de TG en hígado (Scorletti y Byrne, 2013). Por ello, los AG ω -3 han sido utilizados como una alternativa en el tratamiento o para la atenuación de los síntomas generados por la DM2.

Tabla 1. Clasificación de ácidos grasos de acuerdo al número de átomos.

Tipo de cadena	No. Átomos de carbono
Corta	4 a 6
Media	8 a 12
Larga	14 a 18
Muy larga	20 o más carbonos

Tabla 2. Clasificación de ácidos grasos por grado de insaturaciones

Insaturaciones	Insaturaciones
Saturados	Sin dobles enlaces
Insaturados	Una insaturación: Monoinsaturado Más de un doble enlace: Poliinsaturado

2.5 Membranas biológicas

Las membranas biológicas son bicapas constituidas por proteínas y lípidos (fosfolípidos, glucolípidos y colesterol), los cuales constituyen aproximadamente el 70 % de su masa total. Los lípidos de las membranas confieren fluidez a la membrana, una de las principales características fisicoquímicas, la cual es regulada tanto por la relación de lípidos y proteínas que la componen, como por factores ambientales como la temperatura (Voet y Voet, 2006).

Las membranas biológicas son estructuras vitales para la vida de las células, pues las protege del entorno exterior y forma los límites entre las diferentes células y compartimientos intracelulares donde tienen lugar procesos particulares como el metabolismo (Stöckl y Herrmann, 2010). Como se mencionó, las membranas están constituidas por fosfolípidos, los cuales contienen un grupo fosfato, un glicerol y a su vez, el glicerol está esterificado con ácidos grasos. Los ácidos grasos de la membrana pueden ser saturados, monoinsaturados o poliinsaturados. Los fosfoglicéridos a menudo contienen tanto una cadena insaturada como una saturada. Esta composición le confiere a la membrana características y propiedades fisicoquímicas que pueden afectar sus funciones de las membranas celulares (Karp, 2013), además, dependiendo del orgánulo, la composición de la membrana cambia. Por ejemplo, en la membrana mitocondrial, presenta mayor densidad proteica que otros sistemas membranosos en la célula, siendo las membranas de suma importancia ya que participan en algunas de las funciones regulatorias más importantes de las células (Shinitzky, 1984).

2.6 Mitocondria

La mitocondria es un orgánulo de doble membrana y está compuesta de 4 fracciones: la membrana externa, el espacio intermembranal, la membrana interna y la matriz mitocondrial. Cada sección de la mitocondria tiene características particulares y distintas entre ellas. La membrana externa contiene porinas que permiten la difusión libre de moléculas al espacio entre las dos membranas. El espacio intermembranal contiene proteínas (como el citocromo C) que cumplen diversas funciones, tales como el control de procesos apoptóticos y la regulación energética, así como el gradiente iónico necesario para la función mitocondrial (cadena transportadora de electrones). La membrana interna tiene cerca de un 20% de las proteínas totales de la mitocondria, de entre las cuales se encuentran transportadores hacia la matriz mitocondrial y las responsables de generar energía, en forma de ATP, durante la cadena transportadora de electrones. La matriz mitocondrial contiene la mayoría de las enzimas necesarias para el funcionamiento de rutas metabólicas tales como el ciclo de Krebs (McCarron *et al.*, 2013; Wattenberg, 2016).

2.7 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo está definido como un desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) incluidos los que son radicales libres y los sistemas antioxidantes (Halliwell, 1994). Los radicales libres se forman en grandes cantidades como subproductos de muchas reacciones bioquímicas, procesos metabólicos, en ocasiones de manera deliberada y durante el envejecimiento. Los radicales libres pueden ser generados por el cuerpo como respuesta a la sobreexposición a radiación (rayos-X), ozono, contaminantes aéreos y químicos industriales (Bagchi y Puri, 1998), por procesos enzimáticos como son la cadena respiratoria, durante los procesos de fagocitosis, síntesis de prostaglandinas y por los citocromos P-450 (Liu *et al.*, 1999). Los radicales libres potencialmente pueden

afectar todo tipo de biomoléculas como son las proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (peroxidación lipídica) (McCord, 2000).

2.8 Peroxidación lipídica

Los lípidos están sujetos a un daño constante por el estrés oxidativo por su participación activa en el metabolismo, esto se hace evidente en la mitocondria, que es el principal orgánulo productor de moléculas generadoras de radicales libres (átomos o moléculas sin un electrón apareado), como es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual se disocia en el radical hidroxilo OH^* e ión hidroxilo (OH^+). Durante los procesos metabólicos realizados dentro de la mitocondria los lípidos más expuestos son aquellos que cuentan con insaturaciones, principalmente los AG ω -3 por sus múltiples dobles enlaces. Estas moléculas de AG al tener las dobles ligaduras, conducen a que los carbonos con dichas dobles enlaces tengan una reactividad mayor con los radicales al estar expuestos (figura 1) (Halliwell y Gutteridge, 2015A).

Se conoce que durante el desarrollo de la diabetes y el aumento en la glucemia, aumenta el estrés oxidativo, esto debido a una mayor producción de ROS por la mitocondria (Brownlee, 2001), se genera mayor glicación de proteínas (Brownlee, 2000), la misma oxidación de la glucosa genera radicales libres (Wolff *et al.*, 1991) y a su vez un aumento de AGL promueven el estrés oxidativo, generando un desacoplamiento de las mitocondrias e induciendo a la beta oxidación (Evans *et al.*, 2002).

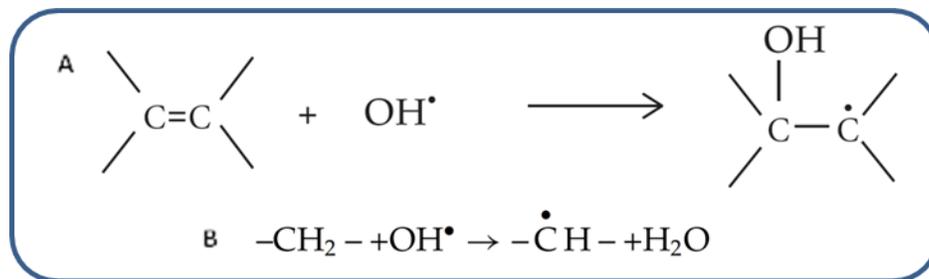


Figura 1. Reacción química de daño por radicales libres.

A) El grupo OH* reacciona por adición en los dobles enlaces, saturando un carbono y generando un desapareamiento de electrones en el carbono adyacente de la doble ligadura. B) El grupo OH* reacciona en los carbonos saturados, sustrayendo un H+ por abstracción (Obtenido de Halliwell y Gutteridge, 2015B).

3 ANTECEDENTES

Como ya se mencionó, durante el desarrollo de la diabetes se altera el metabolismo no sólo de carbohidratos sino también de proteínas y lípidos. Estos últimos, en lo particular, son de nuestro interés y materia de este trabajo de Tesis. Desde finales del siglo pasado, se reportó que durante el desarrollo de la diabetes disminuía la actividad de las desaturasas (Ntambi, 1999), lo cual traía como consecuencia que disminuyera la proporción de ácidos grasos insaturados (AGI) y aumentara la de saturados. Estos cambios traerían como consecuencia que la fluidez de las membranas de las células afectadas, disminuiría, lo cual es apoyado por varios estudios que así lo demuestran. Por ejemplo, Bakan *et al.* (2006), al analizar la composición de ácidos grasos de eritrocitos y leucocitos de pacientes diabéticos, reportaron que estaba incrementada la proporción de ácidos grasos saturados. Posteriormente Pérez-Hernández *et al.* (2010), en un modelo de diabetes tipo 2 en ratas espontáneamente hipertensas (SHR por sus siglas en inglés: Spontaneously Hypertensive Rats), midieron la fluidez membranal con un monitor fluorescente y adicionalmente se analizó la composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos; los resultados indicaron que el desarrollo de la diabetes conducía a una menor fluidez membranal aparentemente derivada de la disminución de la proporción de AGI.

A la fecha hay investigadores que afirman categóricamente que, con el desarrollo de la diabetes, disminuye la fluidez de la membrana (Pilon, 2016). Sin embargo, al parecer no siempre ocurre de esa forma. Por ejemplo, Waczulikova *et al.* (2007), trabajando en ratas con diabetes tipo 1, encontraron que la fluidez membranal de mitocondrias de corazón aumentaba por la diabetes y simultáneamente disminuía el potencial de membrana. En forma similar Figueroa-García *et al.* (2015), encontraron en mitocondrias de placenta de ratas inducidas a diabetes tipo 2 con hiperglucemia ligera, que la fluidez membranal aumentaba, así como la proporción de ácidos grasos insaturados, aunque la respiración mitocondrial disminuía y aumentaba la lipoperoxidación lipídica. En un estudio más

reciente (Pérez-Hernandez *et al.*, 2017) trabajando con mitocondrias de hígado, se encontró que en etapas tempranas del desarrollo de diabetes mellitus (inducida en ratas a los pocos días de nacer), hay un incremento en la fluidez membranal, atribuida al incremento en el cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados y esto, repercute en un aumento en el control respiratorio, pero aún no hay un aumento significativo en la lipoperoxidación mitocondrial. Es interesante mencionar que en estos trabajos (Figuroa *et al.*, 2015, Pérez *et al.*, 2017) también se encontró que contrario a lo que podría esperarse, la composición de ácidos grasos de la mitocondria (de placenta o de hígado, respectivamente) no siempre se comportan igual que la composición de ácidos grasos del tejido de donde fueron extraídas. Lo anterior hace pensar en la posibilidad de que exista algún mecanismo por el que las mitocondrias, de alguna forma, regulen su composición de ácidos grasos y sean diferentes del tejido.

Así, con la información aquí expuesta, queda claro que no siempre hay una disminución de la fluidez membranal, sino que es probable que haya varias etapas y respuestas en las membranas biológicas dependiendo del grado de avance del desarrollo de la diabetes y que es necesario hacer una exploración en diferentes momentos del desarrollo de la diabetes, así como por diferentes tratamientos en contra de la misma.

4 JUSTIFICACIÓN

Los ácidos grasos tienen un rol importante en la célula, teniendo amplias implicaciones metabólicas y son componentes esenciales de las estructuras membranales, cuyas propiedades fisicoquímicas dependen de la composición química de las mismas. Desafortunadamente la composición de ácidos grasos de mitocondria no ha sido estudiada ampliamente y menos en una condición donde el metabolismo se ve alterado por un síndrome y dicho síndrome se ha combatido con moléculas como los ácidos grasos omega 3. Teniendo en cuenta esto, es importante estudiar el efecto que tiene la suplementación en diferentes concentraciones de ácidos grasos omega-3 en la composición de ácidos grasos de mitocondrias. Para este estudio se propone el uso de mitocondrias de hígado ya que dicho órgano tiene un rol importante en el desarrollo y progresión de la diabetes mellitus tipo 2.

Anteriormente se han mencionado que los ácidos grasos omega 3 tienen un efecto benéfico durante el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 a través de mecanismos que posiblemente modifican la composición de ácidos grasos de sistemas membranosos, teniendo en cuenta esto, es importante estudiar el efecto que tiene la suplementación en diferentes esquemas de dosificación de ácidos grasos omega-3 sobre la composición de ácidos grasos de mitocondrias.

5 HIPÓTESIS

La hiperglucemia modifica el metabolismo de los lípidos, lo que genera un cambio en la composición de los ácidos grasos de las membranas biológicas y a su vez, estos cambios alterarán las características fisicoquímicas de esta estructura, por lo tanto, si los ácidos grasos omega-3 tienen efectos benéficos en contra de la diabetes mellitus tipo-2, tal vez sea, al menos en parte, por la modificación de la composición de ácidos grasos en las membranas.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

- Evaluar la composición de los ácidos grasos de tejido y mitocondrias de hígado, así como la producción de lipoperóxidos por parte de la mitocondria, en un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar, con distintos esquemas de dosificación de ácidos grasos omega-3.

6.2 Objetivos particulares

- Analizar el efecto de diferentes esquemas de dosificación de ácidos grasos omega-3 en la composición de ácidos grasos durante el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, así como en hígado de ratas control (normoglucémicas), en:
 - a. Tejido hepático.
 - b. Mitocondrias de hígado.
- Establecer si el uso de ácidos grasos omega-3 afecta el cociente de fluidez de mitocondrias y tejido hepático durante el desarrollo de diabetes mellitus tipo-2 y sus controles normoglucémicas.
- Determinar el efecto de diferentes dosis de ácidos grasos omega-3 sobre la producción de lipoperóxidos en mitocondrias de hígado.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

Esta tesis se desarrolló en el contexto de un proyecto de investigación que involucra la participación de varios colaboradores para obtener respuesta sobre varios aspectos relacionados con el metabolismo de lípidos, la importancia de las propiedades fisicoquímicas de las membranas y el desarrollo de la diabetes, así como el efecto de los AG ω -3 sobre dicha patología. Así, aunque se dio cabal seguimiento al desarrollo de la diabetes en los modelos animales (Vicenteño 2018), en esta tesis se reportan principalmente los efectos observados sobre la composición de ácidos grasos en mitocondrias hepáticas, tejido hepático y formación de lipoperóxidos en membranas.

7.1 Modelos animales

Se usaron 72 ratas Wistar macho, asignados al azar en dos grupos:

7.1.1 Grupos control

Para estos grupos, se tuvieron 36 ratas normoglucémicas. Para tal fin, a ratas macho de 48 horas de edad se les inyectó intraperitonealmente 50 μ L de amortiguador de citratos (pH 4.5) y se mantuvieron con las madres. Los organismos fueron destetados a las 4 semanas. A partir de este momento se dio inicio a los tratamientos con los AG ω -3: aceite de linaza rico en AG ω -3 a una dosis de 125 mg/kg de peso corporal en cuatro esquemas de dosificación: 0, 1, 3 ó 7 días/semana. El aceite de linaza se suministró vía oral con micropipeta repetidora. Se realizaron sacrificios a 1, 3 y 6 meses de edad para extracción de tejido hepático e inmediata obtención de sus mitocondrias.

7.1.2 Grupos inducidos a DM2

Para la inducción de la DM2, a este grupo de animales de 36 ratas se les inyectó intraperitonealmente estreptozotocina (Szkudelski 2012) (a una dosis de 125 mg/kg de peso corporal) disuelta en 50 μ L de amortiguador de citratos (pH 4.5) a las 48 horas de nacidas. Este esquema de tratamiento produce un modelo de diabetes tipo 2 con hiperglucemia ligera. Las crías se mantuvieron con las madres y posteriormente fueron destetadas a las 4 semanas de edad. A partir de este momento se dio inicio a los tratamientos con los ácidos grasos ω -3, específicamente de aceite de linaza rico en AG ω -3 a una dosis de 125 mg/kg de peso corporal en cuatro esquemas de dosificación: 0, 1, 3 ó 7 días/semana. El aceite de linaza se suministró vía oral con micropipeta repetidora. Se realizaron sacrificios a 1, 3 y 6 meses de edad para extracción de mitocondrias hepáticas.

7.2 Parámetros fisiológicos

La concentración de glucosa sanguínea fue cuantificada semanalmente con tiras reactivas con ayuda del equipo Accu-Chek® active. El colesterol y los TG se midieron mensualmente con tiras reactivas en un equipo Accutrend de Roche. (Vicenteño 2018).

7.3 Procesamiento de los organismos, obtención de tejido y mitocondrias hepáticas

Al llegar la fecha de sacrificio (1, 3 ó 6 meses), los organismos fueron anestesiados por inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/kg de peso corporal; durante el efecto del fármaco fueron sacrificados por exsanguinación hasta la muerte. El tejido hepático fue cortado en trozos pequeños, los cuales se suspendieron en medio H (sacarosa 0.07 M, manitol 0.21 M, HEPES 20 mM y albúmina de suero de bovino 0.5 g/L [2 mM], pH 7.4). Posteriormente, los tejidos, fueron homogenizados manualmente y de manera individual con un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio hasta obtener una consistencia lechosa, se colectó una alícuota de 1mL del tejido homogenizado el cual se depositó en microtubos tipo Eppendorf de 1.5 mL y se adicionó hidroxitolueno butilado (concentración final de 0.2%) como un antioxidante y por último se almacenó a -20°C para su posterior análisis por cromatografía de gases. El resto del homogenizado fue sometido a centrifugaciones diferenciales (centrifuga Sorvall ST 16 R, Thermo Scientific con rotor F15-6x100) a 2500 rpm por 10 min dos veces de donde se colectaron los sobrenadantes. Al término de esas centrifugaciones, se hizo otra centrifugación de 10 min a 7500 rpm, de donde se colectó la pastilla y se incubó 30 min en presencia de medio H con albúmina a 0.5 g/L. Finalmente, se centrifugó a 9000 rpm por 10 minutos. Se resuspendió la pastilla en el menor volumen posible de medio H y se colectó en microtubos tipo Eppendorf de 1.5 mL. Todo el procedimiento se realizó a una temperatura de 4 °C para mantener la integridad y funcionalidad de las mitocondrias.

7.3.1 Oximetría

Una vez obtenidas las mitocondrias, se cuantificaron las proteínas por el método de Bradford (1976) y se midió la respiración mitocondrial en cámara aislada con capacidad para un volumen de 1.5 mL y electrodo tipo Clark en un oxímetro YSI 5300a (Biological Oxygen Monitor). La actividad basal de las mitocondrias (estado 4) se midió en presencia del medio de respiración (succinato 10 mM, sacarosa 250 mM, MgCl₂ 10mM, H₃PO₄ 5 mM, EGTA 1.1 mM, albúmina 0.1%, pH 7.4) y el estado activo en fosforilación (estado 3) por la adición de 2 µL de ADP (100 nM en solución TRIS 10 mM, pH 7.4) a la cámara aislada (Martíñon 2018).

7.3.2 Obtención de metil-esteres

Las muestras se transesterificaron con trifluoruro de boro 14% en metanol, como describen Morrison y Smith (1964) con algunas modificaciones: No se hizo extracción previa de los lípidos de las mitocondrias, sino que se tomaron 50 µL de mitocondrias y se colocaron en un vial. Posteriormente se adicionó 1 mL del reactivo de trifluoruro de boro-metanol, se puso una atmósfera de nitrógeno, se cerró el vial y se dejó durante 30 minutos en baño maría a 92 °C, con la finalidad de acelerar la formación de los metil-ésteres. Posteriormente los metil-ésteres fueron extraídos por la adición de dos volúmenes de hexano y uno de agua. La muestra se centrifugó la muestra a 1000 rpm por 3 min y se colectó la fase hexánica (superior). Se evaporó el solvente con nitrógeno gaseoso y se almacenaron los metil-ésteres a -20°C, protegida de la luz, este procedimiento fue realizado tanto para las muestras de mitocondrias como las de tejido hepático. La modificación principal a la técnica de Morrison y Smith (1964) consistió en que no se hizo extracción previa de los lípidos de las mitocondrias (u homogenizado de tejido hepático), sino que se hizo la transesterificación directamente de las muestras. Para comprobar que esta modificación no afectaba los resultados, se hizo la extracción de lípidos de algunas muestras (de mitocondrias y tejido hepático) de acuerdo a la técnica de Bligh y Dyer (1959) y posteriormente se hizo la transesterificación de los lípidos extraídos. Por

ambas técnicas se obtienen los mismos resultados, pero se ahorra más tiempo y solventes, por lo cual, se optó por la transesterificación directa.

7.4 Cromatografía de gases

La composición de ácidos grasos de las mitocondrias y el tejido fue determinada por cromatografía de gases en un equipo Clarus 500 de Perkin Elmer, equipado con detector de ionización de flama (FID) y controlado por computadora. Se utilizó una columna Omegawax de 30 m de largo con 0.25 mm de diámetro interno y recubrimiento interno de 0.25 mm. El programa de temperaturas utilizado para la separación de los ácidos grasos en la columna fue el siguiente: se inició la inyección a 180°C por 5 minutos, se hizo una rampa de 5°C por minuto hasta llegar a 240°C y así se mantuvo por otros 18 minutos para completar un tiempo total de 35 minutos. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 250°C. Los tiempos de retención de los ácidos grasos fueron determinados por inyección de metil ésteres estándares de ácidos grasos. Los estándares fueron adquiridos de Sigma-Adrich Chemical Co. Para la inyección de la muestra los metil-esteres se suspendieron en 50 μL de hexano, se homogenizó y se inyectó 4 μL en el equipo mencionado, cada muestra fue procesada por triplicado. El contenido de cada ácido graso se obtuvo por integración de las áreas bajo la curva de cada uno de los picos y los resultados se presentan en mol%.

7.5 Cuantificación de lipoperóxidos

La cuantificación de lipoperóxidos se realizó por la formación de malondialdehído (MDA) mediante la reacción al ácido tiobarbitúrico, esencialmente como se describe en el método de Ohkawa *et al.* (1979), con ligeras modificaciones. Se utilizaron fracciones mitocondriales conteniendo 1 mg de proteínas. La curva estándar se realizó utilizando tetrametoxipropano (TMP) en un intervalo de 0 a 20 nM. Tanto para la curva como para las muestras se adicionaron 0.1 mL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 8.1%, 0.75 mL de ácido acético al 20% pH 3.5 y 0.75 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.8% y agua bidestilada para completar un volumen de 8.4 mL. La preparación de la curva se realizó de acuerdo a la tabla 3 (el blanco se hizo por triplicado) y para las muestras de mitocondria se utilizó lo correspondiente en la tabla 4, empleando los datos adquiridos en la cuantificación de proteína por el método de Bradford (1976). Se colocaron en arena a 95°C por 4 horas y media con la finalidad de acelerar la formación de MDA, al término de esto, se dejaron enfriar. Al día siguiente tanto a la curva como a las muestras se les adicionó 1 mL de agua bidestilada y 2.5 mL de solución n-butanol-piridina (15:1), se homogenizó con un agitador de tubos vórtex durante 5 segundos, se realizó una centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se midió en un espectrofotómetro a 532 nm. Los resultados se presentan en nmol/mg proteína.

Tabla 3. Preparación de la curva con tetrametoxipropano.

nmoles	H ₂ O (mL)	TMP (20 nM) (mL)	SDS 8.1% (mL)	Ácido Acético 20% pH 3.5 (mL)	Ácido tiobarbitúrico (0.8%) (mL)
0	8.4	0	0.1	0.75	0.75
1	8.35	0.05	0.1	0.75	0.75
2	8.3	0.1	0.1	0.75	0.75
3	8.25	0.15	0.1	0.75	0.75
4	8.2	0.2	0.1	0.75	0.75
5	8.15	0.25	0.1	0.75	0.75
10	7.90	0.50	0.1	0.75	0.75
15	7.65	0.75	0.1	0.75	0.75
20	7.4	1.0	0.1	0.75	0.75

Tabla 4. Preparación de las muestras de mitocondria.

Muestra (μL)	H ₂ O (mL)	SDS 8.1% (mL)	Ácido Acético 20% pH 3.5 (mL)	Ácido tiobarbitúrico (0.8%) (mL)
X + H ₂ O = 100 μL	8.3	0.1	0.75	0.75

X es el equivalente en μL de muestra que contenga 1 mg de proteína

7.6 Análisis estadístico

Se realizó el análisis de las medidas de tendencia central: promedio (\bar{x}) y desviación estándar (σ) de los datos obtenidos para ver su distribución. Así mismo la prueba de Shapiro-Wilk para probar normalidad de los datos. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con prueba de Tukey con un intervalo de confianza de 0.95 ($p > 0.05$) en el programa SigmaPlot 12.3 (2013) con una n=4 por grupo experimental repetido por triplicado.

Se realizó un coeficiente de correlación entre la variable “cociente de fluidez” y MDA para evaluar si existe alguna cercanía entre dichas variables.

8 RESULTADOS

8.1 Composición de ácidos grasos de tejido hepático de ratas Wistar

Se analizó la composición de ácidos grasos de tejido hepático con la finalidad de observar posibles cambios entre los organismos normoglucémicos, los inducidos a diabetes mellitus tipo 2 y organismos con tratamiento de AG ω -3 durante el crecimiento de los animales y el desarrollo de la diabetes.

Durante el primer mes de edad, las ratas Wistar no contaron con tratamiento de AG ω -3, indicando que los primeros valores de la composición de AG y la concentración de AG ω -3 obtenidos son de origen materno. En la tabla 5, se observa el cambio generado por inducir DM2 en las ratas Wistar. En el grupo inducido a diabetes (STZ) las concentraciones de los AG láurico, mirístico y palmítico presentan un aumento significativo respecto al control ($p < 0.05$). Los demás AG presentan diferencias ligeras respecto al control y un incremento del doble en el caso del AG linolénico, dichas diferencias se ven reflejados en el cociente de fluidez (I/S), el cual se ve reducido en el grupo STZ.

A los tres meses de edad, los grupos experimentales ya tenían AG ω -3 como complemento en sus dietas. La tabla 6 refleja los datos obtenidos de la composición de AG a dicha edad, se observa que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos normoglucémicos (CN) y STZ sin tratamiento, teniendo solamente un aumento numérico en las mol % de algunos AG y la reducción en otros los cuales destacan por ser AGI, estos cambios aparentemente no significativos se ven reflejados en el I/S, el cual nuevamente se ve reducido respecto al grupo normoglucémico.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), a 1 mes de edad.

Tratamientos	CN		STZ	
Láurico	0.11	± 0.06	0.31	± 0.08 *
Mirístico	0.45	± 0.04	1.26	± 0.10 *
Miristoleico	0.33	± 0.13	0.24	± 0.14
Palmítico	19.58	± 1.01	21.86	± 1.11 *
Palmitoleico	1.64	± 0.52	1.52	± 0.48
Estearico	13.13	± 1.45	13.75	± 0.81
Oleico	22.30	± 1.12	21.74	± 1.40
Linoleico	18.85	± 1.90	18.20	± 1.74
Linolénico	0.31	± 0.20	0.66	± 0.17
Araquidónico	12.82	± 0.97	12.20	± 2.55
EPA	1.00	± 0.72	1.08	± 0.42
DHA	5.80	± 0.79	7.32	± 1.98
NI	3.69	± 0.65	2.07	± 0.50
I/S	1.91	± 0.19	1.73	± 0.24

EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados).

* p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico. n=4.

Tabla 6. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), a 3 meses de edad.

Tratamientos	CN		STZ	
Láurico	0.08	± 0.05	0.10	± 0.03
Mirístico	0.28	± 0.05	0.27	± 0.04
Miristoleico	0.14	± 0.07	0.21	± 0.09
Palmítico	19.19	± 1.70	19.67	± 1.17
Palmitoleico	1.57	± 0.52	1.91	± 0.42
Estearico	16.28	± 2.67	16.42	± 1.38
Oleico	16.30	± 2.59	15.92	± 1.12
Linoleico	18.39	± 2.05	18.16	± 1.52
Linolénico	0.33	± 0.17	0.33	± 0.06
Araquidónico	19.15	± 2.26	18.51	± 0.52
EPA	0.57	± 0.20	0.66	± 0.11
DHA	5.23	± 0.51	5.08	± 0.35
NI	2.49	± 0.18	2.76	± 0.46
I/S	1.73	± 0.20	1.67	± 0.09

EPA, ácido Eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico; NI, no identificado; I/S cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados).

No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. n=4.

La tabla 7 contiene los datos del grupo normoglucémico y sus respectivos tratamientos con AG ω -3 por 1, 3 y 7 días por semana; el tratamiento con AG ω -3 por 1 día/semana no mostró ninguna diferencia significativa respecto al control, por otra parte, se ve una reducción en algunos AGI como son los AG miristoleico, palmitoleico, oleico, linoleico y EPA, que repercute en el I/S, ya que es menor que el CN, esto último a pesar de no ser significativo; el tratamiento de 3 días por semana con AG ω -3, muestra diferencias significativas ($p < 0.05$) en el AGS mirístico y el AG DHA, los demás AG tiene valores similares respecto al CN; finalmente el tratamiento crónico (AG ω -3 con 7 días por semana) únicamente presentan una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el AG linolénico, el cual es mayor al grupo CN. Este grupo, en apariencia, es similar en la composición de AG de acuerdo al estadístico, pero, se notan cambios numéricamente hablando en el AG linolénico, lo que denota un cambio y a su vez acumulación del AG ω -3 en los grupos con tratamiento y éste comportamiento se ve en el I/S, el cual presenta el mismo patrón que el AG linolénico, el cual se ve reducido con el consumo de un día por semana y va aumentando gradualmente en conjunto con el aumento de AG ω -3 por semana, sin ser significativos.

La tabla 8 contiene los datos del grupo STZ a los 3 meses con sus respectivos tratamientos de AG ω -3: El tratamiento de STZ AG ω -3 1 día/semana, presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los dos grupos (CN y STZ en los AG EPA y DHA y el cociente I/S; el uso de STZ AG ω -3 por 3 días/semana presenta diferencias ($p < 0.05$) respecto a STZ en los AG linoleico, araquidónico y el cociente de fluidez, siendo éste último, distinto tanto para STZ como CN; el último tratamiento (STZ AG ω -3 7 días/semana) genera diferencias ($p < 0.05$) únicamente en el AG linolénico. Los demás AG sólo tienen diferencias numéricas, cabe resaltar, que en todos los tratamientos el AG láurico no se presenta en ningún caso, por otra parte, los AG poliinsaturados aumentan en conjunto con el aumento en las dosis, lo que afecta al cociente de fluidez el cual es mayor en todos los casos que el grupo STZ sin tratamiento, aunque solo es significativo para el grupo con 1 día de tratamiento

Tabla 7. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar normoglucémicas (CN), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.

Tratamientos	CN		CN		CN		CN	
			AG ω -3 1 día/semana		AG ω -3 3 días/semana		AG ω -3 7 días/semana	
Láurico	0.08	± 0.05	0.07	± 0.04	0.05	± 0.01	0.09	± 0.04
Mirístico	0.28	± 0.05	0.21	± 0.03	0.19	± 0.01 *	0.25	± 0.06
Miristoleico	0.14	± 0.07	0.13	± 0.06	0.07	± 0.05	0.11	± 0.06
Palmítico	19.19	± 1.70	19.72	± 0.99	18.63	± 0.54	18.30	± 1.15
Palmitoleico	1.57	± 0.52	1.22	± 0.49	1.34	± 0.45	1.39	± 0.29
Esteárico	16.28	± 2.67	17.16	± 0.74	15.35	± 0.70	14.70	± 1.33
Oleico	16.30	± 2.59	14.88	± 2.52	16.63	± 1.72	17.65	± 1.88
Linoleico	18.39	± 2.05	16.28	± 2.64	16.52	± 0.92	18.21	± 1.09
Linolénico	0.33	± 0.17	0.27	± 0.04	0.29	± 0.06	0.70	± 0.18 *
Araquidónico	19.15	± 2.26	20.76	± 1.63	19.73	± 0.83	19.10	± 1.25
EPA	0.57	± 0.20	0.49	± 0.26	0.82	± 0.50	1.02	± 0.33
DHA	5.23	± 0.51	6.18	± 0.54	7.40	± 1.06 *	5.50	± 0.32
NI	2.49	± 0.18	2.61	± 0.33	2.97	± 0.28	2.66	± 0.39
I/S	1.73	± 0.20	1.62	± 0.10	1.84	± 0.07	1.93	± 0.15

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados).

* p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico sin tratamiento. n=4.

Tabla 8. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.

Tratamientos	CN	STZ	STZ		STZ	
			AG ω -3 1 día/semana	AG ω -3 3 días/semana	AG ω -3 7 días/semana	
Láurico	0.08 ± 0.05	0.10 ± 0.03	ND	ND	ND	
Mirístico	0.28 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.21 ± 0.07	0.27 ± 0.11	0.22 ± 0.08	
Miristoleico	0.14 ± 0.07	0.21 ± 0.09	ND	ND	0.18 ± 0.11	
Palmítico	19.19 ± 1.70	19.67 ± 1.17	20.30 ± 3.91	19.89 ± 3.38	18.18 ± 1.44	
Palmitoleico	1.57 ± 0.52	1.91 ± 0.42	1.23 ± 0.91	0.95 ± 0.78	0.97 ± 0.44	
Estearico	16.28 ± 2.67	16.42 ± 1.38	11.34 ± 3.02	15.64 ± 2.03	16.47 ± 1.52	
Oleico	16.30 ± 2.59	15.92 ± 1.12	14.79 ± 3.74	17.19 ± 3.08	16.65 ± 1.00	
Linoleico	18.39 ± 2.05	18.16 ± 1.52	19.29 ± 3.68	20.32 ± 3.17	α 20.30 ± 1.11	
Linolénico	0.33 ± 0.17	0.33 ± 0.06	0.36 ± 0.10	0.67 ± 0.41	1.55 ± 0.92 $^{*\alpha}$	
Araquidónico	19.15 ± 2.26	18.51 ± 0.52	20.47 ± 1.64	15.37 ± 3.69	α 16.39 ± 2.18	
EPA	0.57 ± 0.20	0.66 ± 0.11	3.70 ± 0.82 $^{*\alpha}$	5.04 ± 2.90 $^{*\alpha}$	1.23 ± 0.45	
DHA	5.23 ± 0.51	5.08 ± 0.35	5.32 ± 2.09 $^{*\alpha}$	4.28 ± 1.25	5.14 ± 0.82	
NI	2.49 ± 0.18	2.76 ± 0.46	4.26 ± 1.49	3.79 ± 1.50	2.69 ± 0.73	
I/S	1.73 ± 0.20	1.67 ± 0.09	2.13 ± 0.44 $^{*\alpha}$	1.83 ± 0.33	1.79 ± 0.08	

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados); ND, no detectado.

* $p < 0.05$ diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico. α $p < 0.05$ diferencia significativa respecto al grupo STZ. $n = 4$.

En la tabla 9 se observan los cambios en la composición de AG a los 6 meses de edad en el grupo inducido a diabetes con respecto al control, ambos sin tratamiento, teniendo una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el AG palmítico. Este grupo tiene un aparente incremento en el I/S, lo cual puede deberse al aumento respecto al control de los AG oleico, EPA, DHA y un decremento en algunos AGS.

Tabla 9. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), a 6 meses de edad.

Tratamientos	CN	STZ
Láurico	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Mirístico	0.22 ± 0.04	0.28 ± 0.05
Miristoleico	0.14 ± 0.04	0.04 ± 0.01
Palmítico	20.60 ± 0.69	18.95 ± 0.96 *
Palmitoleico	1.80 ± 0.43	1.51 ± 0.81
Estearico	13.88 ± 1.92	14.52 ± 3.25
Oleico	18.15 ± 1.48	19.03 ± 1.49
Linoleico	19.91 ± 1.69	18.56 ± 2.22
Linolénico	0.34 ± 0.11	0.29 ± 0.24
Araquidónico	17.13 ± 1.67	17.38 ± 2.42
EPA	0.90 ± 0.20	1.10 ± 0.29
DHA	4.75 ± 0.60	5.86 ± 0.68
NI	2.10 ± 0.22	2.46 ± 0.37
I/S	1.83 ± 0.17	1.90 ± 0.20

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados).

* $p < 0.05$ diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico. $n = 4$.

En la tabla 10 se presenta el grupo normoglucémico de 6 meses de edad y los diferentes tratamientos con los ácidos grasos omega 3 (por 0, 1, 3 ó 7 días/semana). En dicha tabla se observa que el suministro de AG ω -3 por 1 y 3 días a la semana presenta diferencias significativas ($p < 0.05$) en el AG mirístico, además estos dos grupos son muy similares en cuanto a su composición, ya que presentan pequeñas variaciones numéricas que no repercuten en el cociente I/S. El tratamiento de AG ω -3 por 7 días/semana tiene diferencias ($p < 0.05$) en los AG mirístico, palmítico y palmitoleico con respecto al grupo control. Estos datos apuntan a que el metabolismo de lípidos del hígado es bastante constante y tiende a mantener su composición de ácidos grasos bastante cercana, lo cual es demostrado no sólo por

cada uno de los ácidos grasos analizados, sino que el cociente de insaturaciones (I/S) también es aproximado entre los diferentes grupos. O bien podría significar que el suplemento de ácidos grasos omega 3, en ninguno de los esquemas de dosificación utilizados, causa modificaciones significativas en el metabolismo de lípidos del hígado de ratas normoglucémicas.

En la tabla 11 se puede observar el grupo STZ con sus respectivos tratamientos y el CN a una edad de 6 meses. El tratamiento de AG ω -3 1 día/semana tiene diferencias ($p < 0.05$) en los AG miristoleico y araquidónico, el primero respecto al STZ y el segundo respecto al CN. Por otra parte, el tratamiento con AG ω -3 de 3 días/semana tiene diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al CN en los AG láurico y miristoleico; finalmente el tratamiento con AG ω -3 de 7 días/semana presenta diferencias ($p < 0.05$) el AG miristoleico y linolénico, el primero con el grupo STZ y el segundo tanto al grupo STZ como el normoglucémico. La respuesta a la edad de 6 meses fue muy heterogénea y eso se ve reflejado en las variaciones numéricas del grupo, aunque estas diferencias no son significativas. Estas variaciones se observan con mayor claridad en el cociente I/S en el cual se pueden observar las variaciones en la composición de AG. En el grupo se puede ver una acumulación del AG linolénico (fuente de omega 3 usada para el experimento) conforme al aumento en los días por semana del mismo tratamiento.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar normoglucémicas (CN) tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 6 meses de edad.

Tratamientos	CN	CN		CN		CN	
		AG ω -3 1 día/semana	AG ω -3 3 días/semana	AG ω -3 7 días/semana	AG ω -3 7 días/semana		
Láurico	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02			
Mirístico	0.22 ± 0.04	0.34 ± 0.06 *	0.40 ± 0.06 *	0.48 ± 0.09 *			
Miristoleico	0.14 ± 0.04	0.20 ± 0.10	0.18 ± 0.06	0.15 ± 0.09			
Palmítico	20.60 ± 0.69	20.58 ± 1.29	21.19 ± 1.15	22.41 ± 1.19 *			
Palmitoleico	1.80 ± 0.43	2.73 ± 0.63	2.65 ± 0.48	3.23 ± 0.61 *			
Estearico	13.88 ± 1.92	12.67 ± 1.80	12.41 ± 1.66	11.50 ± 1.23			
Oleico	18.15 ± 1.48	20.33 ± 1.71	19.23 ± 2.06	19.50 ± 1.97			
Linoleico	19.91 ± 1.69	19.14 ± 2.16	18.23 ± 2.30	17.54 ± 1.07			
Linolénico	0.34 ± 0.11	0.43 ± 0.11	0.46 ± 0.08	0.60 ± 0.05			
Araquidónico	17.13 ± 1.67	14.69 ± 2.05	15.41 ± 1.32	15.01 ± 1.06			
EPA	0.90 ± 0.20	0.85 ± 0.30	0.75 ± 0.28	0.67 ± 0.15			
DHA	4.75 ± 0.60	4.93 ± 1.03	5.45 ± 0.62	5.44 ± 0.54			
NI	2.10 ± 0.22	3.03 ± 0.41	3.60 ± 0.78	3.41 ± 0.32			
I/S	1.83 ± 0.17	1.89 ± 0.14	1.84 ± 0.13	1.81 ± 0.12			

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados).

* p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico sin tratamiento. n=4.

Tabla 11. Composición de ácidos grasos (mol %) de tejido hepático de ratas Wistar diabéticas tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 6 meses de edad.

Tratamientos	CN		STZ		STZ AG ω -3 1 día/semana		STZ AG ω -3 3 días/semana		STZ AG ω -3 7 días/semana	
Láurico	0.06	± 0.01	0.02	± 0.01	0.04	± 0.03	0.03	± 0.01 *	0.06	± 0.03
Mirístico	0.22	± 0.04	0.28	± 0.05	0.31	± 0.06	0.28	± 0.10	0.27	± 0.04
Miristoleico	0.14	± 0.04	0.04	± 0.01	0.11	± 0.09 α	0.03	± 0.02 *	0.22	± 0.04 α
Palmítico	20.60	± 0.69	18.95	± 0.96 *	19.01	± 1.54	18.89	± 1.20	19.53	± 0.66
Palmitoleico	1.80	± 0.43	1.51	± 0.81	2.42	± 1.15	1.58	± 0.67	1.83	± 0.88
Estearico	13.88	± 1.92	14.52	± 3.25	12.61	± 0.97	14.12	± 1.99	15.22	± 2.48
Oleico	18.15	± 1.48	19.03	± 1.49	18.86	± 1.24	18.25	± 3.12	16.67	± 2.53
Linoleico	19.91	± 1.69	18.56	± 2.22	21.03	± 1.56	21.13	± 1.14	18.64	± 2.32
Linolénico	0.34	± 0.11	0.29	± 0.24	0.84	± 0.58	0.52	± 0.18	1.47	± 0.95 α
Araquidónico	17.13	± 1.67	17.38	± 2.42	14.35	± 1.35 *	14.95	± 2.00	17.23	± 1.25
EPA	0.90	± 0.20	1.10	± 0.29	1.06	± 0.35	0.90	± 0.45	0.94	± 0.33
DHA	4.75	± 0.60	5.86	± 0.68	5.20	± 0.67	6.09	± 0.79	5.12	± 0.56
NI	2.10	± 0.22	2.46	± 0.37	4.18	± 2.74	3.23	± 0.20	2.80	± 0.26
I/S	1.83	± 0.17	1.90	± 0.20	2.01	± 0.19	1.91	± 0.11	1.78	± 0.18

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados).

* p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico. α p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo STZ. n=4.

8.2 Composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar

Se analizó la composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas con la finalidad de observar si existen cambios entre los organismos normoglucémicos, los inducidos a diabetes mellitus tipo 2 y organismos con tratamiento de AG ω -3 (alfa-linolénico) durante el crecimiento de los animales y el desarrollo de la diabetes.

En la tabla 12 se puede ver la composición de AG de mitocondrias de hígado a un mes de edad, tanto del grupo normoglucémico (CN) como del inducido a diabetes (STZ) durante el primer mes de edad. En este grupo hay diferencias significativas ($p < 0.05$) en la concentración del AG esteárico, con respecto al primero. En la tabla se ven los cambios generados por la DM2, de entre los cuales destaca la disminución en el cociente de fluidez, la ausencia de los AG láurico y linolénico y un aumento en los AGS, además de presentar una heterogeneidad muy alta entre los organismos del grupo STZ.

La tabla 13 muestra la composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas de los grupos CN y STZ a 3 meses de edad. En dicha tabla se puede observar que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en el AG láurico, ya que se observa un aumento respecto al CN. También se presenta un aumento (de manera numérica) en la concentración de AG saturados en el grupo STZ, principalmente en los AG mirístico y palmítico, también hay una reducción discreta en los AG insaturados en todo el grupo, lo cual se ve reflejado en el cociente I/S, con una reducción de casi todo el grupo STZ respecto al CN y una disminución en el cociente de fluidez (I/S).

Tabla 12. Composición de ácidos grasos (mol %) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ y normoglucémicas (CN), a 1 mes de edad.

Tratamientos	CN	STZ
Láurico	0.04 ± 0.03	ND
Mirístico	0.30 ± 0.11	0.46 ± 0.24
Miristoleico	0.12 ± 0.06	0.16 ± 0.07
Palmítico	18.51 ± 0.83	18.96 ± 1.81
Palmitoleico	1.23 ± 0.62	0.92 ± 0.52
Esteárico	20.05 ± 0.72	22.64 ± 1.23 *
Oleico	13.44 ± 1.01	12.98 ± 0.97
Linoleico	17.06 ± 1.19	16.21 ± 1.61
Linolénico	0.09 ± 0.01	ND
Araquidónico	16.65 ± 1.75	15.74 ± 1.74
EPA	0.27 ± 0.10	0.36 ± 0.25
DHA	8.22 ± 0.75	8.67 ± 1.28
NI	4.01 ± 2.04	2.44 ± 0.85
I/S	1.47 ± 0.11	1.33 ± 0.15

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados); ND, no detectado.

* p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico. n=4.

Tabla 13. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ y normoglucémicas (CN), a 3 meses de edad.

Tratamientos	CN	STZ
Láurico	0.09 ± 0.02	0.16 ± 0.05 *
Mirístico	0.22 ± 0.05	0.25 ± 0.04
Miristoleico	0.15 ± 0.07	0.11 ± 0.06
Palmítico	16.90 ± 1.18	17.26 ± 1.18
Palmitoleico	0.55 ± 0.34	0.45 ± 0.32
Esteárico	23.68 ± 0.81	23.48 ± 1.09
Oleico	13.34 ± 1.80	14.07 ± 1.33
Linoleico	15.69 ± 0.88	16.37 ± 0.91
Linolénico	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.04
Araquidónico	21.97 ± 1.93	20.06 ± 2.14
EPA	0.42 ± 0.24	0.31 ± 0.19
DHA	5.52 ± 0.42	5.33 ± 0.31
NI	1.30 ± 0.42	1.98 ± 0.75
I/S	1.41 ± 0.07	1.39 ± 0.10

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados).

* p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico. n=4.

En la tabla 14 se encuentran los datos del grupo CN y sus respectivos tratamientos a los 3 meses de edad. El suplemento de AG ω -3 por 1 día/semana cambia la composición de manera significativa ($p < 0.05$) del AG palmítico, aumentando los mol % comparado al grupo sin tratamiento (CN), además el cociente I/S tiene una reducción por debajo del grupo CN; el tratamiento con AG ω -3 por 3 días/semana es significativamente diferente ($p < 0.05$) en los AG linoleico, araquidónico y DHA respecto al grupo CN, siendo mayor los AG araquidónico y DHA. Numéricamente todos los AG insaturados de cadena larga presentan una mayor cantidad de mol % que CN, por otra parte, el coeficiente de fluidez es menor comparado con el grupo sin tratamientos; finalmente el grupo AG ω -3 por 7 días/semana presenta diferencias ($p < 0.05$) en los AG láurico y oleico siendo estos menores respecto al grupo CN. La mayoría de los AG insaturados tienen reducción en los mol % respecto al control. Lo anterior se refleja en el cociente I/S que es menor que en el grupo sin tratamiento, aunque no de manera significativa.

La tabla 15 muestra la composición de ácidos grasos del grupo STZ y sus tratamientos (STZ con AG ω -3 por 1 día/semana, 3 días/semana o 7 días/semana) a los 3 meses de edad y a su vez una comparación de los 4 grupos (STZ y sus tratamientos) con el CN del respectivo mes. El grupo STZ con AG ω -3 por 1 día/semana tiene diferencias significativas ($p < 0.05$) tanto para el CN como STZ (sin tratamiento) en los AG mirístico, esteárico, linoleico y en el cociente de fluidez, además de no haber sido detectado el AG láurico; el suministro de AG ω -3 por 3 días/semana tiene diferencias significativas ($p < 0.05$) en el AG araquidónico, éste grupo también tiene ausencia de un AG, en éste caso el EPA; el grupo STZ con AG ω -3 por 7 días/semana es diferente ($p < 0.05$) respecto a CN y STZ en el AG láurico y mirístico, por otra parte, el oleico con el grupo STZ y el linoleico con CN. La edad de 3 meses es muy heterogénea tanto en los grupos normoglucémicos como en los inducidos a diabetes, ya que tiene muchas variaciones numéricas el cociente de fluidez el cual en apariencia marca una reducción conforme al aumento de los AG ω -3; si bien tales variaciones no constituyen diferencias estadísticas.

Tabla 14. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar normoglucémicas (CN), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.

Tratamientos	CN	CN		CN	
		AG ω -3 1 día/semana	AG ω -3 3 días/semana	AG ω -3 7 días/semana	CN
Láurico	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.06	ND	0.03 ± 0.02	*
Mirístico	0.22 ± 0.05	0.18 ± 0.03	0.14 ± 0.04	0.12 ± 0.01	
Miristoleico	0.15 ± 0.07	0.19 ± 0.07	0.07 ± 0.04	0.10 ± 0.04	
Palmítico	16.90 ± 1.18	18.79 ± 0.63 *	18.13 ± 1.30	15.85 ± 0.76	
Palmitoleico	0.55 ± 0.34	0.77 ± 0.51	0.66 ± 0.40	0.26 ± 0.11	
Estearico	23.68 ± 0.81	23.12 ± 1.52	20.92 ± 2.95	25.29 ± 0.58	
Oleico	13.34 ± 1.80	13.71 ± 1.40	12.33 ± 1.40	10.27 ± 1.17	*
Linoleico	15.69 ± 0.88	15.57 ± 1.02	17.94 ± 0.90 *	15.11 ± 1.53	
Linolénico	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.08	0.22 ± 0.12	0.18 ± 0.03	
Araquidónico	21.97 ± 1.93	20.21 ± 2.35	19.27 ± 2.13	24.79 ± 1.49	
EPA	0.42 ± 0.24	0.26 ± 0.16	1.02 ± 0.47	0.41 ± 0.23	
DHA	5.52 ± 0.42	5.62 ± 0.84	7.28 ± 1.08 *	5.96 ± 0.67	
NI	1.30 ± 0.42	1.30 ± 0.37	1.97 ± 0.29	1.63 ± 0.47	
I/S	1.41 ± 0.07	1.34 ± 0.07	1.52 ± 0.25	1.38 ± 0.05	

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados); ND, no detectado.

* p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico sin tratamiento. n=4.

Tabla 15. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ), tratadas con ácidos grasos omega 3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.

Tratamientos	CN	STZ	STZ		STZ		STZ	
			AG ω -3 1 día/semana	AG ω -3 3 días/semana	AG ω -3 7 días/semana	AG ω -3 7 días/semana		
Láurico	0.09 ± 0.02	0.16 ± 0.05 *	ND	0.09 ± 0.06	0.03 ± 0.01 * α			
Mirístico	0.22 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.14 ± 0.02 * α	0.23 ± 0.11	0.08 ± 0.01 * α			
Miristoleico	0.15 ± 0.07	0.11 ± 0.06	0.10 ± 0.02	0.14 ± 0.05	0.20 ± 0.03			
Palmítico	16.90 ± 1.18	17.26 ± 1.18	16.95 ± 1.48	17.33 ± 1.85	16.28 ± 1.14			
Palmitoleico	0.55 ± 0.34	0.45 ± 0.32	1.00 ± 0.58	0.91 ± 0.75	0.85 ± 0.09			
Estearico	23.68 ± 0.81	23.48 ± 1.09	19.98 ± 0.94 * α	22.55 ± 0.83	24.68 ± 1.19			
Oleico	13.34 ± 1.80	14.07 ± 1.33	13.72 ± 1.42	13.24 ± 1.34	11.54 ± 0.74 α			
Linoleico	15.69 ± 0.88	16.37 ± 0.91	19.49 ± 1.76 * α	18.51 ± 2.60	18.04 ± 1.34 *			
Linolénico	0.15 ± 0.03	0.17 ± 0.04	0.14 ± 0.08	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.06			
Araquidónico	21.97 ± 1.93	20.06 ± 2.14	20.68 ± 2.05	18.52 ± 2.11 *	20.54 ± 1.88			
EPA	0.42 ± 0.24	0.31 ± 0.19	0.37 ± 0.30	ND	0.52 ± 0.23			
DHA	5.52 ± 0.42	5.33 ± 0.31	5.25 ± 0.50	5.13 ± 0.37	4.32 ± 1.57			
NI	1.30 ± 0.42	1.98 ± 0.75	2.12 ± 0.50	2.68 ± 0.43	2.76 ± 2.33			
I/S	1.41 ± 0.07	1.39 ± 0.10	1.64 ± 0.12 * α	1.43 ± 0.12	1.37 ± 0.15			

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados); ND, no detectado.

* p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico. α p<0.05 diferencia significativa respecto al grupo STZ. n=4.

En la tabla 16 se puede observar la comparación en la composición de AG entre el grupo normoglucémico y el inducido a diabetes a los seis meses de edad. En ella se ven diferencias significativas ($p < 0.05$) en los AG láurico y linoleico. En este grupo se ve una característica de la diabetes sobre la membrana, la cual es reducir la fluidez, reflejado en el cociente I/S.

Tabla 16. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ) y normoglucémicas (CN), a 6 meses de edad.

Tratamientos	CN	STZ
Láurico	0.09 ± 0.04	0.02 ± 0.01 *
Mirístico	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.05
Miristoleico	0.08 ± 0.05	0.11 ± 0.05
Palmítico	16.50 ± 0.91	18.97 ± 1.69
Palmitoleico	ND	0.51 ± 0.43
Estéarico	21.34 ± 1.25	21.80 ± 3.72
Oleico	12.43 ± 0.79	14.54 ± 1.59
Linoleico	18.09 ± 0.92	14.88 ± 1.17 *
Linolénico	0.10 ± 0.05	0.13 ± 0.04
Araquidónico	23.00 ± 1.40	21.19 ± 1.88
EPA	0.21 ± 0.09	0.36 ± 0.26
DHA	5.34 ± 0.86	5.29 ± 0.44
NI	1.99 ± 0.41	1.82 ± 0.40
I/S	1.57 ± 0.14	1.39 ± 0.17

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados).

* $p < 0.05$ diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico. $n=4$.

El grupo normoglucémico de 6 meses de edad con sus respectivos tratamientos (tabla 17) se comporta de manera similar con los tratamientos de 1 y 3 días por semana con AG ω -3, por otra parte, el suministro de AG ω -3 por 7 días a la semana muestra diferencias ($p < 0.05$) en los AG palmítico, linoleico y araquidónico. En este grupo se puede observar una tendencia a la reducción del I/S conforme aumentan las dosis por semana de AG ω -3.

Tabla 17. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar normoglucémicas (CN), tratadas con ácidos grasos omega 3 (AG ω -3), a 6 meses de edad. (AG ω -3).

Tratamientos	CN		CN		CN		CN		
			AG ω -3 1 día/semana	AG ω -3 3 días/semana		AG ω -3 7 días/semana			
Láurico	0.09	± 0.04	0.10	± 0.02	0.08	± 0.03	0.12	± 0.02	
Mirístico	0.25	± 0.04	0.24	± 0.03	0.27	± 0.08	0.31	± 0.05	
Miristoleico	0.08	± 0.05	0.09	± 0.05	0.11	± 0.07	0.16	± 0.12	
Palmítico	16.50	± 0.91	17.72	± 1.91	17.86	± 0.81	19.62	± 1.03	*
Palmitoleico	ND		0.73	± 0.42	0.81	± 0.47	1.26	± 0.69	
Esteárico	21.34	± 1.25	19.78	± 1.68	20.39	± 1.55	21.30	± 2.29	
Oleico	12.43	± 0.79	12.42	± 3.41	13.64	± 1.41	13.82	± 0.87	
Linoleico	18.09	± 0.92	17.73	± 1.66	15.94	± 2.05	14.79	± 1.29	*
Linolénico	0.10	± 0.05	0.14	± 0.07	0.20	± 0.04	0.16	± 0.08	
Araquidónico	23.00	± 1.40	21.38	± 2.66	20.67	± 1.59	19.44	± 2.12	*
EPA	0.21	± 0.09	0.35	± 0.20	0.28	± 0.13	0.40	± 0.11	
DHA	5.34	± 0.86	5.65	± 1.01	5.89	± 0.64	5.92	± 0.51	
NI	1.99	± 0.41	3.68	± 2.28	3.85	± 2.04	2.71	± 0.48	
I/S	1.57	± 0.14	1.55	± 0.05	1.50	± 0.12	1.36	± 0.16	

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados); ND, no detectado.

* $p < 0.05$ diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico sin tratamiento. $n = 4$.

Finalmente, la tabla 18 contiene los datos de la composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas de ratas de 6 meses de edad correspondientes al grupo STZ con sus respectivos tratamientos, comparados contra el control STZ (sin AG ω -3) y el CN. En el tratamiento de AG ω -3 por 1 día a la semana se puede observar que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) en los AG mirístico y linoleico respecto a los grupos STZ y CN, el porcentaje de composición del AG mirístico es menor que ambos grupos y el linoleico es mayor que ambos grupos. El AG araquidónico es significativamente diferente ($p < 0.05$) al grupo CN. El AG palmítico y el cociente I/S son significativamente ($p < 0.05$) diferentes al grupo CN. En éste grupo los AG ω -3 aumentan discretamente respecto a CN y STZ; el tratamiento con AG ω -3 por 3 días/semana tiene diferencias significativas ($p < 0.05$) en los grupos STZ y CN en los AG mirístico, linoleico y el araquidónico respecto al grupo normoglucémico y el palmítico y el cociente de fluidez respecto al grupo STZ; la dosis de AG ω -3 por 7 días a la semana genera un cambio significativo ($p < 0.05$) en los AG láurico y linoleico con STZ, el AG mirístico y linolénico son diferentes ($p < 0.05$) al grupo CN y STZ, finalmente el AG EPA y el cociente I/S presentan diferencias significativas con respecto al grupo normoglucémico. A los 6 meses, los tratamientos con AG ω -3 cambian la composición de las membranas mitocondriales, ya que se observa que el cociente I/S, tiene valores similares a los encontrados en el grupo CN.

Tabla 18. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias hepáticas de ratas Wistar diabéticas (STZ), tratadas con ácidos grasos omega 3 (AG ω -3), a 6 meses de edad.

Tratamientos	CN	STZ	STZ		STZ		STZ	
			AG ω -3 1 día/semana	AG ω -3 3 días/semana	AG ω -3 7 días/semana	AG ω -3 7 días/semana		
Láurico	0.09 ± 0.04	0.02 ± 0.01 *	0.06 ± 0.05	0.04 ± 0.03	0.08 ± 0.03 α			
Mirístico	0.25 ± 0.04	0.25 ± 0.05	0.16 ± 0.03 * α	0.18 ± 0.06 *	0.16 ± 0.02 * α			
Miristoleico	0.08 ± 0.05	0.11 ± 0.05	0.13 ± 0.09	0.10 ± 0.06	0.11 ± 0.03			
Palmítico	16.50 ± 0.91	18.97 ± 1.69	16.36 ± 0.85 α	17.96 ± 1.42	16.23 ± 1.43			
Palmitoleico	ND	0.51 ± 0.43	0.71 ± 0.51	1.19 ± 0.70	0.63 ± 0.53			
Esteárico	21.34 ± 1.25	21.80 ± 3.72	20.52 ± 1.80	20.37 ± 1.11	21.55 ± 1.41			
Oleico	12.43 ± 0.79	14.54 ± 1.59	13.88 ± 1.08	13.56 ± 1.24	12.45 ± 1.73			
Linoleico	18.09 ± 0.92	14.88 ± 1.17 *	21.66 ± 1.31 * α	20.14 ± 1.32 α	20.01 ± 1.87 α			
Linolénico	0.10 ± 0.05	0.13 ± 0.04	0.16 ± 0.08	0.14 ± 0.04	0.27 ± 0.11 * α			
Araquidónico	23.00 ± 1.40	21.19 ± 1.88	18.48 ± 2.68 *	18.20 ± 1.86 *	20.64 ± 1.34			
EPA	0.21 ± 0.09	0.36 ± 0.26	0.38 ± 0.15	0.53 ± 0.22 *	0.43 ± 0.11 *			
DHA	5.34 ± 0.86	5.29 ± 0.44	5.39 ± 0.36	5.48 ± 1.82	5.90 ± 0.62			
NI	1.99 ± 0.41	1.82 ± 0.40	2.10 ± 0.57	2.09 ± 0.80	1.54 ± 0.72			
I/S	1.57 ± 0.14	1.39 ± 0.17	1.64 ± 0.14 α	1.55 ± 0.08 α	1.59 ± 0.10			

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, cociente de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados); ND, no detectado.

* $p < 0.05$ diferencia significativa respecto al grupo normoglucémico. α $p < 0.05$ diferencia significativa respecto al grupo STZ. n=4.

8.3 Cociente de fluidez de tejido hepático comparado con sus respectivas mitocondrias

Con la finalidad de saber qué tanto variaba la composición de AG entre el tejido hepático total y las mitocondrias hepáticas, se realizó un análisis comparando los cocientes de fluidez de tejido.

La figura 2 muestra dicha comparación a un mes de edad, en la cual se ve que en ambos grupos (A y B) las mitocondrias son significativamente diferentes ($p < 0.05$) respecto al tejido. En el grupo STZ se puede notar que el cociente es menor tanto para hígado como para mitocondrias, el cual es un comportamiento normal en dicho grupo, ya que como se sabe la diabetes altera la fluidez de la membrana.

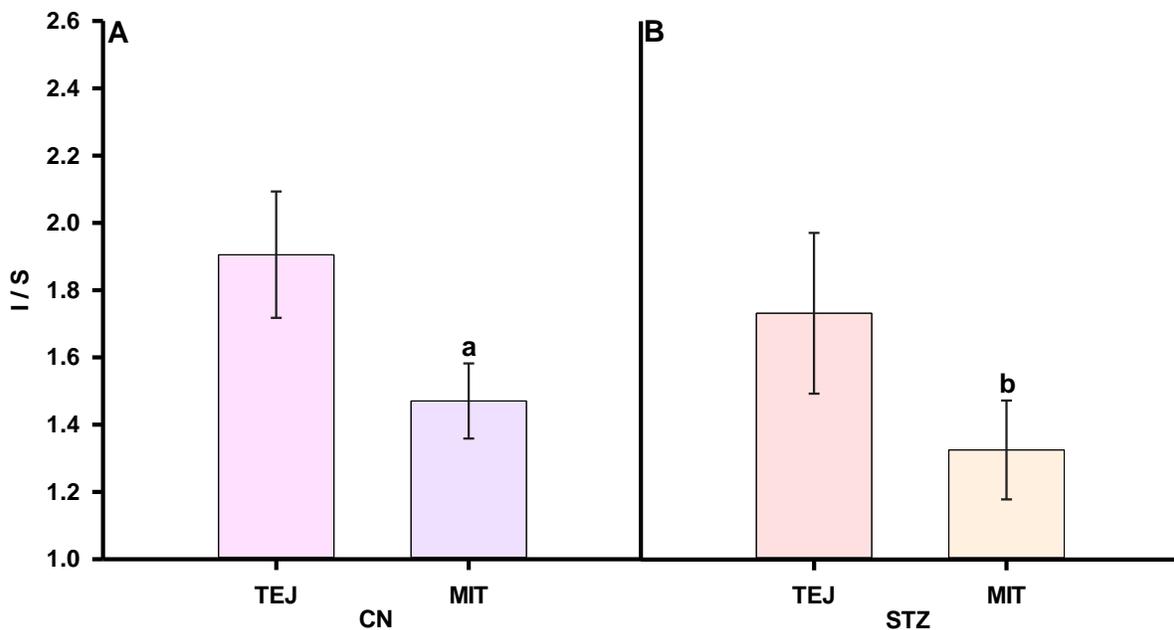


Figura 2. Cociente de fluidez (I/S) de tejido hepático (TEJ) comparado con sus respectivas mitocondrias (MIT), grupo normoglucémico CN y grupo inducido a diabetes (STZ), a un mes de edad.

A) a, $p < 0.05$ respecto al tejido de procedencia; B) b, $p < 0.05$ respecto al tejido de procedencia. $n = 4$.

Los cocientes de fluidez del grupo de 3 meses de edad, tanto normoglucémicos e inducidos a diabetes y los respectivos tratamientos de cada grupo se pueden observar en la figura 3. En el caso de los normoglucémicos, todos los tratamientos en mitocondrias presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) con sus respectivos al tejido de procedencia. En el tejido, se ve una tendencia a aumentar la fluidez conforme aumenta el suministro de los AG ω -3, mientras que en las mitocondrias se ve mucha heterogeneidad entre tratamientos; en el caso de los organismos inducidos a diabetes (STZ), todas las mitocondrias presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) con sus respectivos grupos de tejido, y aún más, se ve una misma tendencia, el tratamiento de AG ω -3 1 día por semana, aumenta el cociente I/S muy por encima del grupo 0 y a partir de éste aumento, se denota una disminución en el mismo cociente conforme aumentan las dosis.

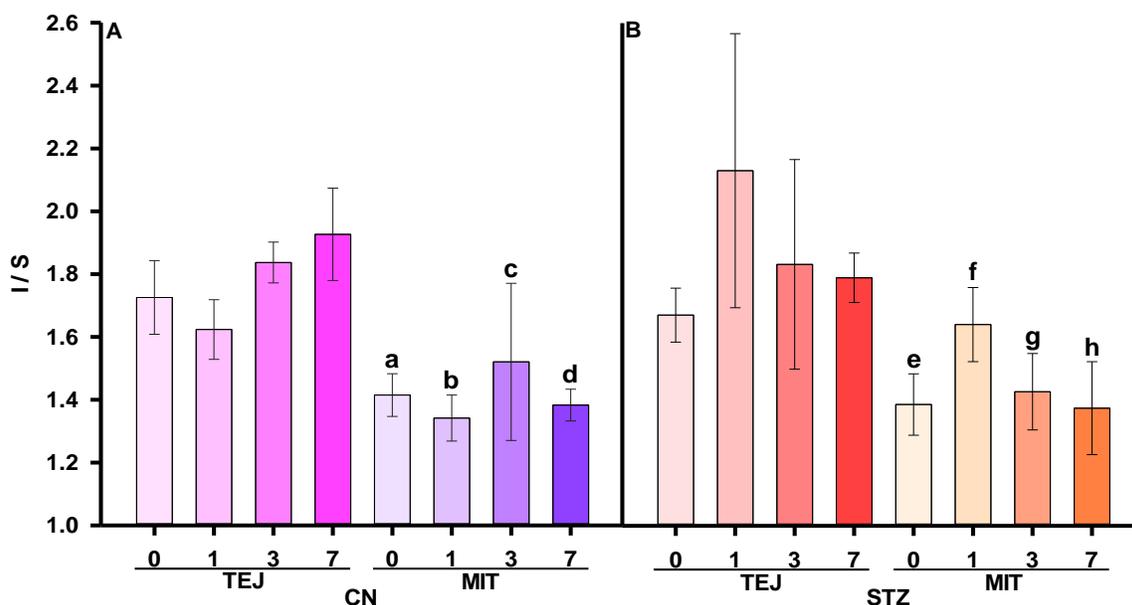


Figura 3. Cociente de fluidez (I/S) de tejido hepático (TEJ), mitocondrias (MIT) de hígado y sus respectivos tratamientos.

0: Sin tratamiento 1: AG ω -3 1 día/semana; 3: AG ω -3 3 días/semana; 7: AG ω -3 7 días/semana. Grupo normoglucémico CN y grupo inducido a diabetes (STZ) a tres meses de edad.

A) a, b, c y d, $p < 0.05$ respecto al tejido de procedencia; B) e, f, g y h, $p < 0.05$ respecto al tejido de procedencia. $n = 4$.

En el tratamiento por de 6 meses (figura 4), a su vez, las mitocondrias y sus tratamientos presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los tejidos de donde proceden. El grupo normoglucémico presenta un comportamiento similar en mitocondria y en tejido, aumentando el cociente en el primer esquema de tratamiento (grupo 1), dicho cociente disminuye conforme aumenta la dosis de AG ω -3, dicho “patrón” también se presenta en las mitocondrias; el grupo TEJ de STZ muestra una tendencia similar a las mitocondrias del grupo CN, en el cual, el tratamiento de 1 día por semana genera un aumento en el I/S y el consumo con más frecuencia de AG ω -3 genera una disminución en el mismo, por otra parte, en las mitocondrias de STZ el efecto de los AG ω -3 es muy variado, se observa un aumento en todos los tratamientos (0, 1, 3 y 7).

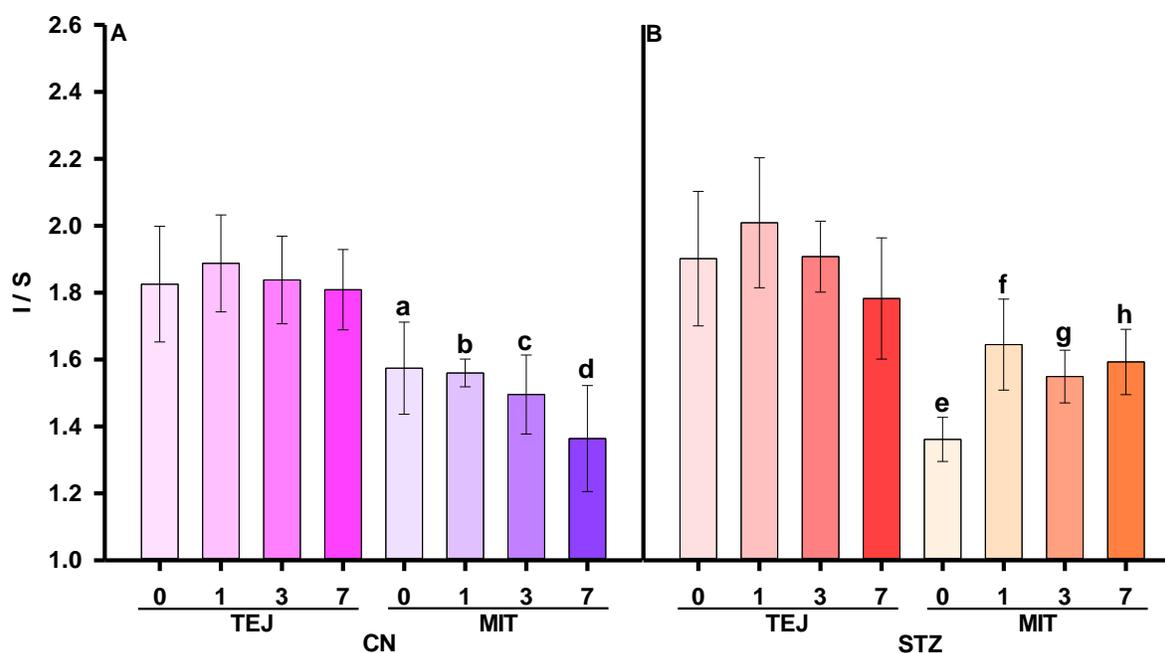


Figura 4. Cociente de fluidez (I/S) de tejido hepático (TEJ), mitocondrias (MIT) de hígado y sus respectivos tratamientos.

0: Sin tratamiento 1: AG ω -3 1 día/semana; 3: AG ω -3 3 días/semana; 7: AG ω -3 7 días/semana. Grupo normoglucémico CN y grupo inducido a diabetes (STZ) a seis meses de edad.

A) a, b, c y d, $p < 0.05$ respecto al tejido de procedencia; B) e, f, g y h, $p < 0.05$ respecto al tejido de procedencia. n=4.

8.4 Efecto de los ácidos grasos omega-3 en la lipoperoxidación en mitocondrias hepáticas de ratas Wistar

La lipoperoxidación en el grupo STZ a un mes de edad (figura 5) es significativamente diferente ($p < 0.05$) al normoglucémico, dejando en claro que la diabetes aumenta la producción de radicales libres y por ende la lipoperoxidación en las ratas, el aumento es casi el doble del CN

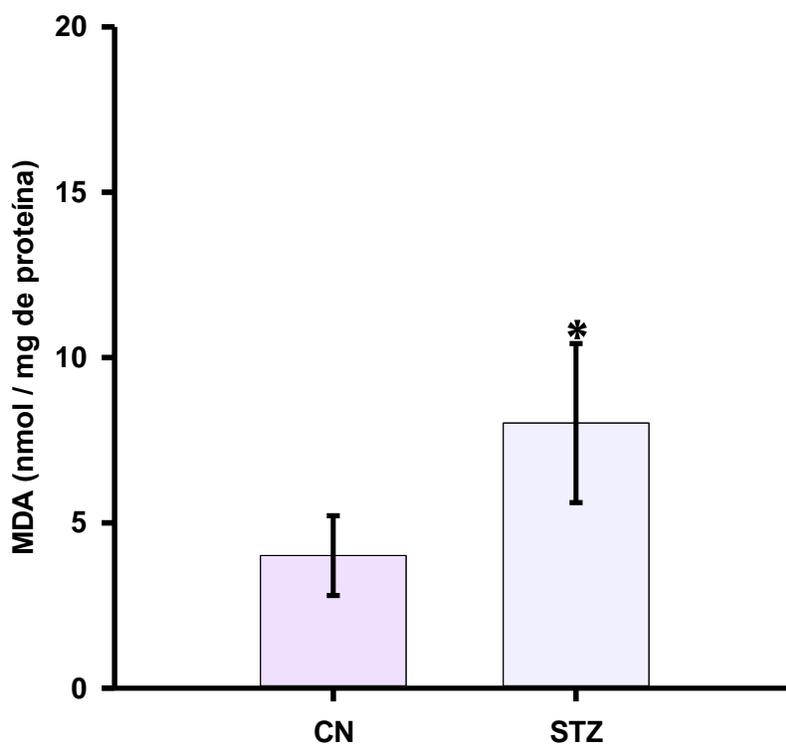


Figura 5. Lipoperoxidación, evaluada como cantidad de MDA (nmol/mg proteína) en mitocondrias hepáticas, grupo normoglucémico (CN) e inducido a diabetes (STZ), a 1 mes de edad.

* $p < 0.05$. $n=4$.

MDA: malondialdehído.

A los tres meses de edad (figura 6) en el grupo normoglucémico aumenta la lipoperoxidación conforme aumentan las dosis por semana de AG ω -3, son significativamente diferentes ($p < 0.05$) los tratamientos con 3 y 7 días por semana. Cabe destacar que el tratamiento con AG ω -3 3 días/semana genera mayor producción de lipoperóxidos; en el caso de los inducidos a diabetes, los AG ω -3 generan una menor producción de lipoperóxidos, el tratamiento de 1 día por semana es significativamente distinto ($p < 0.05$) al control diabético (STZ 0) y al normoglucémico sin tratamiento (CN 0), por otra parte el tratamiento con AG ω -3 de 7 días por semana únicamente es diferente ($p < 0.05$) con el tratamiento 0 de CN.

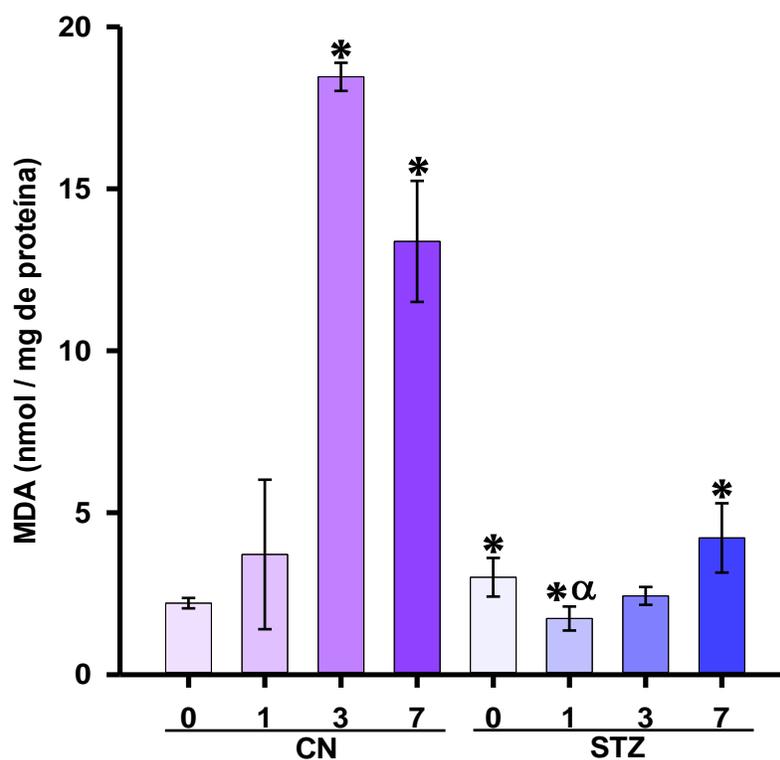


Figura 6. Lipoperoxidación, evaluada como cantidad de MDA (nmol/mg proteína) en mitocondrias hepáticas, grupo normoglucémico (CN) e inducido a diabetes (STZ), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 3 meses de edad.

1: AG ω -3 1 día/semana; 3: AG ω -3 3 días/semana; 7: AG ω -3 7 días/semana.

* $p < 0.05$ diferencia significativa respecto a CN; α $p < 0.05$ diferencia significativa respecto al grupo STZ. $n = 4$.

MDA: malondialdehído.

A los 6 meses (figura 7) se puede observar que los tratamientos con AG ω -3 sin importar el grupo, disminuyen la cantidad de MDA. En el grupo CN, el tratamiento 7, es significativamente diferente ($p < 0.05$) respecto al tratamiento 0; en el caso del grupo STZ, el suministro de AG ω -3 en todos los esquemas de dosificación, presentan diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto al grupo sin tratamiento (0 de STZ), a su vez, este grupo (0 de STZ) es diferente al grupo normoglucémico sin tratamiento. De forma general a los 6 meses los AG ω -3 se reduce la lipoperoxidación sin importar si el organismo es normoglucémico o diabético. Cabe resaltar que en el grupo diabético el consumo de AG ω -3 restablece a valores “normales” sin importar cuantas veces se consume a la semana ya que no presenta diferencias significativas respecto al grupo 0 de CN.

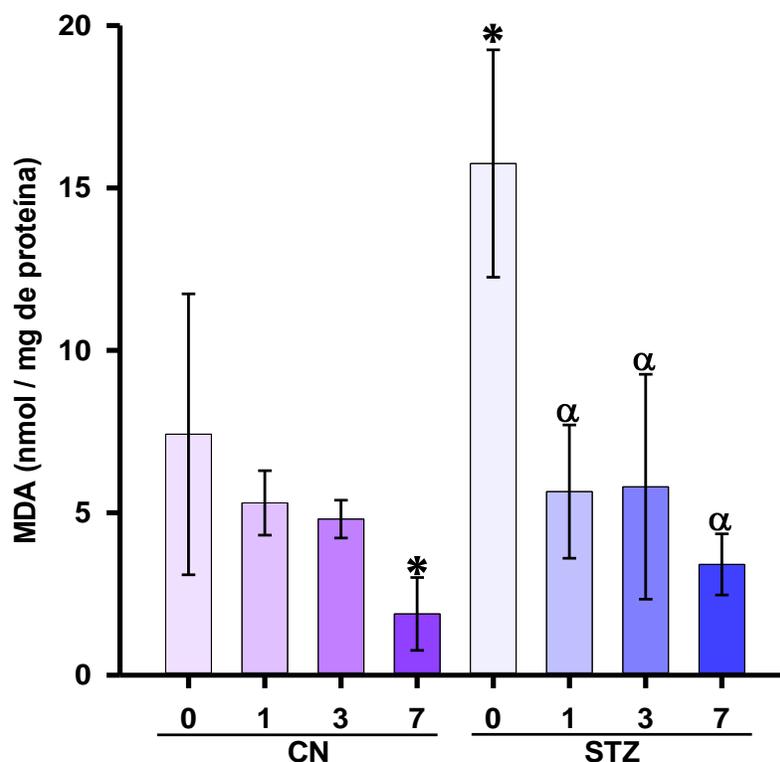


Figura 7. Lipoperoxidación, evaluada como cantidad de MDA (nmol/mg proteína) en mitocondrias hepáticas, grupo normoglucémico (CN) e inducido a diabetes (STZ), tratadas con ácidos grasos omega-3 (AG ω -3), a 6 meses de edad.

0: Sin tratamiento 1: AG ω -3 1 día/semana; 3: AG ω -3 3 días/semana; 7: AG ω -3 7 días/semana.

* $p < 0.05$ diferencia significativa respecto a CN; α $p < 0.05$ diferencia significativa respecto al grupo STZ. $n=4$.

MDA: malondialdehído.

8.5 Correlación lipoperoxidación – coeficiente de fluidez de mitocondrias hepática

Durante el primer mes de vida de las ratas Wistar, la correlación entre I/S y MDA en nmol/mg de proteína (tabla 19) se comporta de manera negativa para el CN y positiva para las ratas inducidas a DM2, indicando que la composición de ácidos grasos a esta edad en particular tiene una alta relación con el daño por radicales libres a los lípidos en los organismos del grupo STZ

A los 3 meses de edad, en el grupo CN, las ratas sin tratamiento muestran aún una correlación negativa, pero en menor cantidad que a un mes, y los tratamientos aumentan dicha correlación a valores positivos, cabe destacar que el tratamiento de AG ω -3 por 3 días por semana presenta una correlación positiva de casi 1. En el caso de las ratas con DM2 (STZ) es muy heterogéneo el comportamiento en las correlaciones, predominando los valores negativos en todos los casos menos la de 3 días por semana.

Finalmente en los grupos de 6 meses las ratas normoglucémicas, son muy heterogéneas, teniendo una correlación positiva cuando no consumen los AG ω -3 y cuando consumen 7 días por semana los mismos, éste último es una correlación cercana 1.0, indicando que hay un mayor daño por radicales libres en lípidos, por otra parte, en las ratas del grupo STZ predomina una correlación muy cercana a 0 en todos los casos, indicando que la lipoperoxidación y el cociente de fluidez tienen algo que ver, pero no en gran medida.

Tabla 19. Coeficiente de correlación de la lipoperoxidación en función de el cociente de fluidez (insaturados entre saturados) de mitocondrias, todos los grupos experimentales.

Edad	Tratamientos con AG ω -3	CN	STZ
1 mes	ST	-0.45	0.86
3 meses	0 días/semana	-0.20	-0.64
	1 días/semana	0.15	-0.13
	3 días/semana	0.87	0.38
	7 días/semana	0.21	-0.24
6 meses	0 días/semana	0.19	-0.35
	1 días/semana	-0.63	0.20
	3 días/semana	-0.20	-0.04
	7 días/semana	0.89	-0.36

Eje de las X el cociente de fluidez y el eje Y la concentración MDA (nmol/mg proteína).
 CN: Grupo normoglucémico; STZ: Grupo inducido a diabetes mellitus tipo 2; ST: Sin tratamiento.

9 DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el efecto del desarrollo de la diabetes tipo 2 sobre la composición de ácidos grasos de la mitocondria, así como el efecto de diferentes esquemas de dosificación de ácidos grasos omega-3 (esporádico, regular y crónico) durante el desarrollo de la diabetes y desde luego, su efecto sobre la composición de ácidos grasos de las mitocondrias de hígado. Asimismo, se hizo una evaluación del estrés oxidativo, medido a través de MDA, que se obtuvo en cada uno de los grupos experimentales referidos en la sección de resultados. Para este trabajo se generó un modelo de diabetes tipo 2 que ya ha sido descrito previamente (Vicenteño, 2018). Los resultados aquí mostrados son parte de un proyecto con objetivos más amplios y que necesitó la participación de varios miembros del equipo de trabajo para cubrirlos todos.

9.1 Composición de ácidos grasos de hígado

La composición de lípidos de las membranas es de suma importancia ya que como se sabe tiene un papel importante en la regulación de la función celular, además de que determinan muchas propiedades a dicha membrana (como la fluidez) y son indispensables para el funcionamiento adecuado de casi todos los tipos celulares (Triall y Wick, 1984). Dichos lípidos (principalmente fosfolípidos), tienen como característica principal la presencia de AG como uno de los componentes principales. En nuestro estudio encontramos que la composición de AG del tejido hepático es similar en los grupos CN y STZ (individualmente hablando). Este comportamiento es consistente con el modelo de diabetes que desarrollamos el cual es de hiperglucemia ligera, que reproduce las etapas iniciales del desarrollo de la diabetes (Vicenteño, 2018). Además, conocemos que el hígado es uno de los órganos con mayor plasticidad y resistencia a las alteraciones metabólicas, razón por la cual el hecho de que tengan composiciones de ácidos grasos similares es comprensible.

Durante el desarrollo de la DM2, la composición de AG es relativamente la misma, sin embargo, los AGS de cadena media y larga (láurico, mirístico y palmítico) del grupo STZ presentan un aumento (ver tablas 5, 6 y 9), lo cual es coherente con una disminución en la actividad de desaturasas como ha sido postulado previamente por Ntambi (1999). Estos cambios pueden atribuirse a la alteración del metabolismo de los lípidos generados por la DM2 y como consecuencia, cambia la composición AG de las ratas Wistar, dichos cambios pueden observarse de mejor manera en las características fisiológicas de las ratas, destacando entre ellas la pérdida de peso, pérdida del control de la glucemia y aumento de los TG en plasma (Vicenteño, 2018). Estos cambios (en nuestro caso la composición de los AG) repercuten en el cociente de fluidez (I/S), el cual de manera general se ve reducido en los animales inducidos a DM2, debido a que la diabetes mellitus *per se* genera una disminución en la fluidez de las membranas (incluyendo citoplasmática) y aumenta la cantidad de ácidos grasos saturados en los sistemas membranosos, coincidiendo con lo propuesto por Pilon (2016).

Los cambios en la composición de AG de la membrana citoplasmática, pueden generar múltiples efectos a nivel celular, como puede ser la reducción en la sensibilidad a la insulina por parte de sus receptores. Grunfeld *et al.* (1981), Borkman *et al.* (1993) y Ginsberg *et al.* (2005), trabajaron con músculo esquelético y demostraron que la composición de AG de los fosfolípidos repercute en la sensibilidad a la insulina, cambia las propiedades fisicoquímicas de la membrana, y, además, el mismo cambio generado por la DM en la membrana, altera la propia integración y funcionamiento de los glucotransportadores.

Las alteraciones en el metabolismo de lípidos generadas por la DM incluyen la acción de la insulina, ya que, de forma normal, la insulina bloquea la producción de glucosa, inhibe la gluconeogénesis y la glucogenólisis (Saltiel, 2001) dando pie a la glucólisis.

Una de las funciones de la insulina en el hígado es el cambio en el metabolismo de lípidos pasando de oxidación a síntesis cuando se tiene un exceso de los nutrientes de la dieta (Stryer *et al.*, 2015), siendo esto esencial para la homeostasis energética. Estas variaciones en la regulación energética producida por la diabetes se pueden seguir a través de la concentración de glucosa sanguínea, en el cual se puede observar que la glucemia aumenta conforme pasa el tiempo en el grupo STZ, en adición, en el mismo trabajo de Saltiel (2001), se puede ver otra alteración en el metabolismo de lípidos en la concentración de triglicéridos en sangre, en el cual, se observa el mismo comportamiento (un aumento en la concentración). De tal manera que al estar alterado el metabolismo de lípidos y estos al ser componentes esenciales la célula y por ende para las membranas, afectarán a éstas.

Otro posible cambio es en la función de las enzimas desaturasas, como son la $\Delta 6$ y $\Delta 9$, se sabe que la insulina regula la actividad de esas enzimas en los organismos normoglucémicos y en condiciones donde la glucemia aumenta, dichas enzimas pierden eficiencia (Ramesh *et al.*, 2007). Nuestros resultados apuntan a una baja actividad en la enzima $\Delta 9$ -desaturasa ya que de manera general se ve un aumento en la concentración de AG saturados de cadena media en las ratas inducidas a diabetes sin tratamiento (ver tablas 5, 6 y 9), lo cual indica que la enzima $\Delta 9$ -desaturasa se está viendo afectada de algún modo. Estos cambios en la proporción de AGS y los AGI tienen como consecuencia un cambio en las propiedades fisicoquímicas de las membranas, uno de esos cambios se puede teorizar por el cociente de fluidez, el cual se ve reducido a edades tempranas y juveniles de las ratas diabéticas.

En los organismos normoglucémicos sometidos a los tratamientos (1, 3 y 7 días/semana de AG ω -3) de 3 meses de edad (tabla 7) se puede observar una reducción aparente en los AG de cadena larga (mirístico y palmítico), esto puede deberse a que los AG ω -3, generan de alguna forma que los AG de cadena larga se vean modificados por la enzima $\Delta 9$ -desaturasa (Ramesh *et al.*, 2007) que en el

grupo STZ, aparentemente perdía afinidad. Sin embargo, en las ratas inducidas a diabetes (tabla 8) se observa lo opuesto, mostrando un comportamiento que apunta a la reducción de los mismos AG de cadena media (láurico) y de cadena larga (mirístico, miristoleico, palmítico y palmitoleico) y en adición, el AG araquidónico también se ve una reducción conforme va aumentando el consumo de los AG ω -3. La reducción en los AGI de cadena media se puede explicar por la misma pérdida de afinidad de la Δ 9-desaturasa puesto que aún existe el sustrato para convertir un AGS a uno insaturado. En el caso del AG araquidónico, como se sabe, es precursor de muchas moléculas de gran importancia metabólica y a su vez, es una molécula estimuladora en algunos procesos de expresión génica por medio de PPARs, en el caso particular de ácido araquidónico se conoce de manera extensa que estimula la liberación de insulina de los islotes de Langerhans (Jones *et al.*, 2004), por lo tanto si no existe dicha estimulación para la liberar insulina al medio, la glucemia debería de tener un aumento, dicha suposición coincide con las lecturas de la glucemia realizadas (Vicenteño, 2018).

La composición de los ácidos grasos insaturados de la membrana ha sido ampliamente estudiada, y se da a notar que los AG generan un cambio en las propiedades de la membrana, mejorando la señalización por parte de la célula a la insulina y por ende tener una regulación energética mejor. En ratas Goto-Kakizaki dosificadas con AG araquidónico, se demostró que se mejoraba drásticamente la sensibilidad a la insulina por parte de los receptores (Song *et al.*, 2003) y en particular con los AG ω -3, la reducción en la concentración de los mismos en el tejido se asocia con la pérdida de sensibilidad a la insulina (Storlien *et al.*, 1991) y en otros experimentos se ha encontrado que los ácidos grasos insaturados (AG ω -3) promueven la síntesis de insulina, como reporta Orozco-Tapia (2008) en sus resultados de inmunohistoquímica en ratas diabéticas, sugiriendo que los AG ω -3 promueven la síntesis de esa hormona. Dichas afirmaciones coinciden con los resultados obtenidos en esta tesis y esto es reafirmado en la composición de AG de las ratas inducidas a diabetes de 6 meses de edad con los tratamientos (tabla 11), estas ratas muestran una composición de AG muy similar al control

normoglucémico, presenta un aumento en los AGI de cadena larga, dando pauta a que los tratamientos con los AG ω -3 regulan positivamente la conversión de AGS a AGI acercándolos a valores normales y aunado a lo anterior, el resto de la composición es muy similar a las ratas normoglucémicas de la misma edad.

Lo expresado anteriormente se puede extrapolar con las curvas de tolerancia a la glucosa (Vicenteño, 2018). En esas curvas de tolerancia ya se nota un control en la glucemia, lo que puede significar que los tratamientos con AG ω -3 (en particular el tratamiento de 3 días/semana y aún más en particular el de 7 días/semana) regulan de alguna manera la secreción y/o síntesis de insulina y consecuentemente se da una regulación metabólica que repercute en los tejidos como es el hígado. Esta regulación metabólica, en el hígado implicaría una regulación en el manejo energético de la célula, ya que los ácidos grasos poliinsaturados pueden modular la preferencia metabólica en la obtención de energía de la célula, ya que regulan la expresión genética, aumentando la expresión de los genes involucrados en la oxidación de los AG y silenciando la expresión de los genes codificantes de enzimas lipogénicas (Baillie *et al.*, 1999; Jump y Clarke, 1999; Clarke, 2000).

Los tratamientos aquí aplicados pueden llegar a tener efectos a distintos niveles celulares, dado que las alteraciones generadas por los AG repercuten en el control de la glucemia y por ende en una mejor regulación metabólica (en cuanto a producción de energía), lo cual nos lleva a cuestionarnos si los efectos llegan realmente hasta la mitocondria, puesto que este orgánulo es el productor energético principal y de casi toda la oxidación de AG por β -oxidación se da en él.

9.2 Composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas

La mitocondria es un organelo altamente activo que tiene a su cargo la mayor producción de energía (en forma de ATP) de la célula a través de la β -oxidación, el ciclo de Krebs, la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. La mitocondria está sujeta a constantes cambios y aún más en condiciones anómalas como una patología, que cambian las características celulares y estas repercuten en otros órganos y desde luego, en la producción de ATP. En esta fase del estudio se pueden observar algunos de los cambios por los que se somete la mitocondria por la condición especial que generamos (diabetes mellitus tipo 2), el envejecimiento (mediciones a diferentes edades) y por el tratamiento al que fueron sometidos los grupos experimentales (el consumo esporádico, regular o crónico, de ácidos grasos omega 3).

En general, la composición de ácidos grasos de mitocondria hepática en las ratas diabéticas se comporta de manera similar a la composición de AG del tejido hepático completo, presenta el mismo aumento en los AGS de cadena media como son láurico, mirístico y palmítico; una reducción en los AGI de cadena larga (miristoleico y palmitoleico) y además una reducción en los cocientes de fluidez en todos los casos (ver: tabla 12, 13 y 19). El cambio en el cociente I/S puede deberse a dicho aumento en los AGS anteriormente mencionados y a la reducción de algunos AGI, coincidiendo con lo planteado por Pilon en el 2016. Este cambio apoya la idea de que las enzimas desaturasas sí están siendo afectadas por la diabetes y que los procesos regulatorios en la esterificación de los AG en los fosfolípidos, genera una mayor presencia de los AGS (Ramesh *et al.*, 2007). Al mes de edad (tabla 12) se puede observar que el AG láurico no es detectado en la cromatografía, esto puede deberse a que fue utilizado para el metabolismo energético o para la síntesis de otras moléculas, como puede ser la elongación para dar lugar a otros ácidos grasos de mayor longitud. Una peculiaridad en los resultados es la falta del AG linolénico en la mitocondria (tabla 12), pero sí están los AG ω -3 que se sintetizan a partir de él, esto podría explicarse al observar la tabla 5, en la cual se ve un cúmulo

del AG linolénico, lo cual indica que la integración de los fosfolípidos con AG linolénico a la mitocondria no está ocurriendo en este punto y de alguna manera, un proceso regulatorio podría estar determinando la esterificación de fosfolípidos con EPA y DHA como AG ω -3, la hipótesis más reciente plantea un intercambio de fosfolípidos entre la membrana mitocondrial y el retículo Endoplásmico (RE) por medio de las “membranas asociadas a mitocondrias (MAM), ya que al estar en un sistema acuoso el transporte de los lípidos sería muy lento/ineficiente; se ha propuesto que en las MAM se da el intercambio de los fosfolípidos entre el RE y las mitocondrias (Vance, 2014).

A los 3 meses de edad (tabla 13), la diabetes mellitus en apariencia no genera muchos cambios, sólo las mismas características anteriormente mencionadas y que ya existe una concentración del AG linolénico, el cual coincide con la normalización del mismo AG en tejido (tabla 6). Por otra parte, en ratas juveniles normoglucémicas (tabla 14), los tratamientos de 1 día/semana, 3 días/semana y 7 días/semana de AG ω -3 en apariencia no parecen tener mayor efecto, pero todos presentan la característica de reducir los AGS de cadena larga y sus contrapartes con una insaturación conforme aumenta el consumo de los AG ω -3 y a su vez, se ve un aumento de los AGI de cadena larga y muy larga. La reducción en los AG de cadena larga podría deberse a que los lípidos hepáticos al acumularse promueven la oxidación de los AG en la mitocondria (Mantena, 2009), dando lugar a que los AGI tomen los lugares de dichos AG. Por otra parte, las ratas de la misma edad pero diabéticas (tabla 15) tienen un comportamiento peculiar, en el cual se ve un menor cúmulo de los AGI, repercutiendo en el I/S de cada uno de los grupos experimentales, indicando un aumento en la fluidez en el tratamiento de 1 día/semana pero mostrando una tendencia a reducir la fluidez conforme aumenta el consumo de los AG ω -3, la progresión es la siguiente 1.64 (AG ω -3 1 día/semana)>1.43 (AG ω -3 3 días/semana)>1.37 (AG ω -3 7 días/semana). Los cambios en el grupo diabético pueden deberse a la pérdida en el control de la glucemia (ver Vicenteño, 2018), ya que al perderse dicho control, la célula requiere una fuente de energía alterna, siendo la ruta metabólica más viable la β -oxidación,

además, al tratarse de la mitocondria, los lípidos (especialmente los fosfolípidos) se ven afectados de múltiples formas, por ejemplo por especies reactivas de oxígeno (discutido en un subtema más adelante) y por la oxidación de los ácidos grasos (β -oxidación) y un factor activador de la β -oxidación es la acumulación de lípidos hepáticos, y esto a su vez, aumenta la producción de ROS, promoviendo el daño al DNA mitocondrial, a las proteínas y a los lípidos (Mantena, 2009), como se sabe, este síndrome (DM2) va empeorando conforme aumenta el tiempo, una explicación es que la mitocondria funciona de manera anómala (puede ser una actividad excesiva o una poca actividad), dicha actividad es inducida por la glucemia misma en estado basal, producción de ROS, daño oxidativo y por un aumento en la glucemia de manera crónica (Green *et al.*, 2004).

Koves *et al.* (2005), evaluaron el efecto de una dieta alta en grasas de músculo esquelético, simulando una condición de ejercicio-entrenamiento, y encontraron que las grasas inducían la activación de PPAR γ inducien la β -oxidación en peroxisomas y en mitocondria. Esto podría coincidir con nuestros resultados ya que los ácidos grasos se ven acumulados en el tejido (ver tabla 8), posiblemente causar un incremento en la β -oxidación en mitocondria.

Finalmente, a los 6 meses de edad, las ratas normoglucémicas con los tratamientos presentan las características mencionadas varias veces anteriormente (aumento de los AGS de cadena larga), lo peculiar de estos aumentos es que se presentan conforme aumenta el consumo de los ácidos grasos omega-3 y a su vez, están afectando el cociente I/S. Lo anterior se puede interpretar como una disminución en la fluidez hasta un valor similar a las ratas diabéticas de un mes (ver tabla 12 y 17). ¿Cómo puede ocurrir que en los animales diabéticos el suministro de ácidos grasos omega 3 tenga en apariencia un efecto benéfico, pero no en animales no diabéticos? Suponemos que no pueden tener mecanismos de acción molecular diferentes, así que el principio por el que se genera un efecto benéfico en diabéticos tipo 2, tendría que ser el mismo por el que se observa un efecto nocivo en los controles normoglucémicos. ¿Y cuál podría ser ese mecanismo? Para hacer una

explicación razonable, es necesario recurrir al trabajo que se ha desarrollado previamente en el grupo de trabajo y que ha servido de antecedente para llevar a cabo este proyecto. El modelo de diabetes tipo 2 que utilizamos en esta tesis es originado por deficiencia de insulina; la inyección de STZ a los neonatos les provoca la destrucción total o casi total de las células beta pancreáticas, pero gracias a su estado de desarrollo, los neonatos aún tienen la capacidad de regenerar y/o diferenciar células para restituir cierta población de células beta pancreáticas (Szkudelski, 2001). Así, hemos visto cómo los neonatos, en el transcurso de los primeros 7 días, pueden regresar a tener glucemias casi normales o ligeramente arriba de lo normal, dependiendo de la dosis utilizada (Orozco-Tapia, 2008; Pérez-Hernández, 2008; Pérez-Hernández *et al.*, 2017).

Durante las primeras semanas y casi hasta tres meses de vida, este modelo presenta glucemias cercanas a la normalidad, pero posteriormente vemos que la glucemia empieza a aumentar significativamente (ver Vicenteño, 2018), tesis que es parte de este proyecto), presumiblemente por procesos de glucotoxicidad y lipotoxicidad. En el trabajo de Vicenteño (2018) se puede apreciar en las curvas de tolerancia a la glucosa de animales inducidos a diabetes, cómo se va perdiendo el control de la glucemia conforme pasa el tiempo. Los animales control mantienen su comportamiento normal y los animales inducidos a diabetes con STZ y tratados con ácidos grasos omega 3, entre mayor sea la frecuencia de administración de dichos ácidos grasos, mejor es el control de la glucemia, al grado de casi normalizarse cuando se les dio un suministro diario de los ácidos grasos omega 3. Sin embargo, los animales control (normoglicémicos) con suministro de ácidos grasos omega 3, se encontró que con el paso del tiempo y a mayor suministro de estos ácidos grasos, empezaban a mostrar descontrol en sus curvas de tolerancia a la glucosa y a mostrar concentraciones basales de glucosa en sangre arriba de lo normal (alrededor de 140 mg/dl), indicadores de desarrollo de hiperglucemia o diabetes. Mediante inmunohistoquímicas, en el grupo de trabajo se ha encontrado que el suministro de ácidos grasos omega 3 promueve la síntesis de insulina o posiblemente eviten la degradación de la misma en las células beta pancreáticas

(Orozco-Tapia, 2008), y que el suministro de esos ácidos grasos a ratas control, las lleva a una mayor síntesis de insulina (50% más) que las ratas sin administración alguna. Así, suponemos que los ácidos grasos suministrados en forma crónica, deben llevar a las ratas a una hiperinsulinemia, lo cual es el primer paso para el desarrollo de resistencia a la insulina y generación de diabetes por resistencia a la insulina, esto respaldado por los trabajos de Simoneau y Kelley (1997) y Ukropcova *et al.* (2007). Así, creemos que los cambios en la composición de ácidos grasos tendientes a disminuir el cociente I/S pueden ser indicadores de esas primeras etapas de desarrollo de diabetes por resistencia a la insulina. Este no es el modelo de diabetes que pretendíamos generar, pero tampoco el resultado que se podría esperar de estos ácidos grasos omega 3.

Los efectos observados anteriormente coinciden con los resultados obtenidos en las ratas diabéticas (tabla 18). Todos los tratamientos mejoran de manera significativa la composición de AG, regulando de manera progresiva (conforme aumenta el consumo de AG ω -3) la fluidez a valores muy similares al control normoglucémico de la misma edad. Además, los AGS de cadena larga se ven reducidos en todos los casos, por lo cual, se puede suponer que la actividad de las desaturasas se normalizó. Esto nos lleva a pensar que los AG ω -3 tienen un efecto en apariencia benéfico en los organismos con un metabolismo anómalo y que, en los organismos sanos, generan condiciones “dañinas” que pueden llevar al desarrollo de un síndrome metabólico.

Nuestro parámetro de fluidez, como ya se ha mencionado anteriormente, está limitado a un cociente realizado con la composición de los AG, lo cual genera un dato que nos podría indicar el parámetro o una posible expectativa de cómo estaría la fluidez de la membrana, sin embargo, gracias a los resultados obtenidos por una colaboradora del mismo proyecto (Martíñon, 2018, tesis en elaboración) en el cual utilizó el monitor de fluorescencia 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) tenemos la oportunidad de comparar la información química contra la información física que dicho monitor de fluidez membranal proporciona. De hecho, en esas membranas

mitocondriales se hizo un análisis termotrópico para obtener las energías de activación de dichas membranas. Como se puede observar en la tabla 20, hay varias coincidencias entre los dos parámetros (I/S y energía de activación), esto puede ser generado por el tipo de monitor fluorescente que se utilizó, el cual se encuentra localizado preferencialmente en el núcleo de la membrana (figura 8). Esta posición preferente del monitor implica que se integraría en lugares donde hay más espacio entre las monocapas de la membrana. Cabe resaltar que la membrana puede estar siendo afectada por ROS y estos ROS podrían generar una alteración en la composición de los fosfolípidos, cambiando el arreglo estérico de las cadenas hidrocarbonadas de los AG, lo cual, podría dar como resultado una baja en el cociente de fluidez.

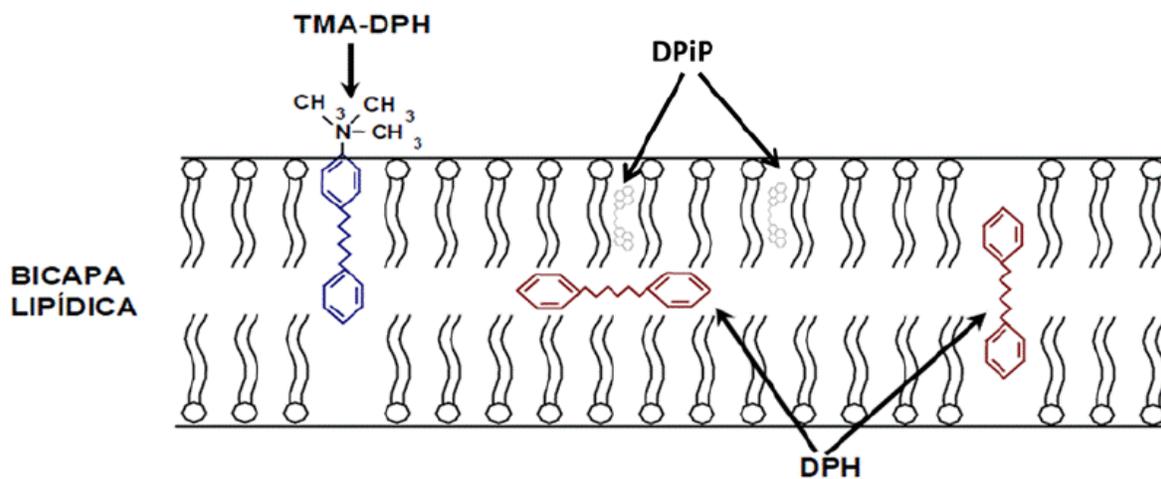


Figura 8. Esquema de la localización preferencial de los monitores fluorescentes. TMA-DPH; trimetil amonio difenil hexatrieno; DPiP, dipirenil propano; DPH, difenil hexatrieno (obtenido de Figueroa, 2013).

Investigaciones realizadas por Pérez-Hernández *et al.* (2017), en un modelo de DM2, analizaron mitocondrias hepáticas y reportan que la fluidez no es la misma a todas las profundidades de la membrana. Utilizaron DPiP, TMA-DPH y DPH, este último monitor en apariencia no detectó la transición de fase, aunque sí diferencias significativas entre la fluidez de mitocondrias de ratas diabéticas y de controles. Con todos los monitores se encontró que la fluidez de las membranas mitocondriales de las ratas diabéticas era mayor que la fluidez de las mitocondrias de las ratas control. El análisis termotrópico con cada uno de los monitores de fluidez dio los mismos resultados, en todos los casos fue menor la energía de activación en las mitocondrias de ratas diabéticas. Resultados similares se obtuvieron con mitocondrias de placenta en un modelo de hiperglucemia ligera usando el monitor DPiP (Figuroa *et al.*, 2015), es decir que la fluidez membranal de mitocondrias de placenta de ratas inducidas a diabetes tipo 2 con hiperglucemias ligeras, era mayor que las mitocondrias de placenta de ratas normoglucémicas. Los datos anteriores coinciden con los resultados obtenidos en este proyecto por Martiñon (2018, tesis en elaboración), demostrando que el cociente de fluidez (I/S) es un parámetro directamente relacionado con la fluidez membranal y que puede ser un buen indicador. Es claro que las membranas están formadas por más moléculas que sólo los lípidos, es decir, sabemos que las proteínas son constituyentes importantes de las membranas (Voet y Voet, 2006) y también se ha demostrado que pueden participar en la regulación de la fluidez membranal (Almeida *et al.*, 1982; Rossy *et al.*, 2014), pero también el daño generado a las membranas mitocondriales por especies reactivas de oxígeno (Choe, 1995) son factores que podrían estar participando en la regulación de la fluidez membranal.

En la tabla 20 se muestra una comparación entre el índice de fluidez I/S y la energía de activación (de la Tesis de Martiñon) de las membranas de mitocondrias de los diferentes grupos que analizamos. Para comprender mejor esta tabla, es importante tener en mente que la energía de activación obtenida indica la energía necesaria para que la molécula que funge como monitor pueda desplazarse o tener movimiento. Así, eso significa que entre mayor sea la energía de activación, menor

será la fluidez del medio en el que se encuentre, en este caso, la membrana mitocondrial. Una segunda consideración a tener en mente y que ya apuntamos previamente, es que el DPH reporta principalmente la fluidez del núcleo de la bicapa, no de todas las profundidades de la membrana. Así, es claro que los resultados de la tabla 20 deben ser analizadas bajo estas indicaciones para entender su significado. Las flechas de la tabla indican el comportamiento de la fluidez con respecto a su grupo control correspondiente, sin embargo, no debemos olvidar que los ácidos grasos omega 3, especialmente cuando se suministran en forma crónica, no parecen ser tan inocuos, sino que generan ciertas anomalías en el metabolismo de las ratas. Por ejemplo, a los 6 meses de edad, las ratas control con suministro de ácidos grasos omega 3 por 7 días a la semana muestran un aumento de la glucemia, alteración en la curva de tolerancia a la glucosa y aumento de TG (Vicenteño, 2018), síntomas todos ellos de una diabetes incipiente. En ese caso, tanto el cociente I/S como la energía de activación, muestran esa anomalía en consistencia con los datos fisiológicos de esos animales.

Tabla 20. Comparación entre el cociente de insaturación (I/S) y la fluidez detectada por el monitor fluorescente (DPH). A) comparación I/S contra la energía de activación fase gel; B) comparación I/S contra la energía de activación fase líquido cristalino.

A) GRUPOS		I/S		ENERGÍA DE ACTIVACIÓN FASE GEL	
Edad	Tratamiento	CN	STZ	CN	STZ
1 mes	0	1.47 ± 0.1	1.33 ± 0.15 ↓	5.7 ± 1.4	2.3 ± 0.5 ↑
3 meses	0	1.41 ± 0.1	1.39 ± 0.1	6.4 ± 2.0	5.4 ± 0.6 ↑
	1	1.34 ± 0.1	1.64 ± 0.12 ↑	3.8 ± 0.6	8.8 ± 2.1 ↓
	3	1.52 ± 0.3	1.43 ± 0.12 ↓	4.9 ± 0.8	6.7 ± 1.4 ↓
	7	1.38 ± 0.1	1.37 ± 0.15	4.6 ± 1.3	6.1 ± 1.8 ↓
6 meses	0	1.57 ± 0.1	1.39 ± 0.17 ↓	5.8 ± 1.9	6.2 ± 2.4 ↓
	1	1.55 ± 0.1	1.64 ± 0.14 ↑	6.7 ± 3.0	7.1 ± 0.9 ↓
	3	1.50 ± 0.1	1.55 ± 0.08	5.2 ± 2.1	5.2 ± 3.2
	7	1.36 ± 0.2	1.59 ± 0.1 ↑	6.9 ± 2.4	10.4 ± 2.7 ↓

B) GRUPOS		I/S		ENERGÍA DE ACTIVACIÓN FASE LIQUIDO CRISTALINO	
Edad	Tratamiento	CN	STZ	CN	STZ
1 mes	0	1.47 ± 0.1	1.33 ± 0.15 ↓	5.5 ± 0.8	2.2 ± 0.3 ↑
3 meses	0	1.41 ± 0.1	1.39 ± 0.1	4.1 ± 1.4	2.9 ± 1.4 ↑
	1	1.34 ± 0.1	1.64 ± 0.12 ↑	2.7 ± 0.6	7.4 ± 2.6 ↓
	3	1.52 ± 0.3	1.43 ± 0.12 ↓	4.9 ± 1.1	5.4 ± 1.2 ↓
	7	1.38 ± 0.1	1.37 ± 0.15	3.9 ± 1.0	4.0 ± 2.5
6 meses	0	1.57 ± 0.1	1.39 ± 0.17 ↓	4.3 ± 1.8	5.3 ± 1.9 ↓
	1	1.55 ± 0.1	1.64 ± 0.14 ↑	6.7 ± 4.0	6.5 ± 2.3
	3	1.5 ± 0.1	1.55 ± 0.08	4.2 ± 1.1	4.3 ± 2.8
	7	1.36 ± 0.2	1.59 ± 0.1 ↑	5.1 ± 1.9	4.4 ± 1.5 ↑

Las flechas indican: ↓ Menor fluidez; ↑, mayor fluidez con respecto a su grupo control, las coincidencias en la posición de la flecha indican similitud en resultados entre ambas pruebas.

I/S cociente de fluidez; CN: Control normoglucémico; STZ, Inducido a diabetes mellitus tipo 2.

9.3 Fluidéz tejido-mitocondria.

Los ácidos grasos son componentes muy importantes de las membranas biológicas; no sólo confieren la hidrofobicidad que genera la separación de dos medios hidrofílicos (interno y externo), sino que los puntos de fusión de los diversos ácidos grasos en conjunto determinan un importante factor que es la fluidéz membranal. En general se conoce que los ácidos grasos saturados tienen puntos de fusión altos; los principales ácidos grasos saturados que encontramos son el mirístico (52°C), palmítico (63.1°C) y esteárico (69.6°C). Por otro lado, los ácidos grasos insaturados y poliinsaturados, tienen puntos de fusión mucho más bajos, por ejemplo, el palmitoleico [16:1] (-0.5°C), oleico [18:1] (9°C), linolénico [18:3] (-17°C) y EPA [20:5] (-54°C) (Voet y Voet, 2006), sólo por mencionar algunos de los principales componentes de las membranas. Juntos, los ácidos grasos saturados e insaturados determinan la fluidéz membranal, así que en este trabajo determinamos la composición de ácidos grasos para tener un parámetro de referencia que nos indique cómo puede modificarse esa propiedad fisicoquímica de las membranas que es la fluidéz. Si representamos este parámetro como un cociente de los ácidos grasos insaturados (I) entre los saturados (S), entonces tenemos una ecuación que está directamente relacionada con la fluidéz membranal. Así, el cociente I/S es un índice de la fluidéz membranal en lo que a lípidos se refiere. Los resultados de nuestros análisis los discutiremos a continuación.

Los resultados en esta investigación referentes a la comparación del cociente fluidéz entre el tejido hepático y sus respectivas mitocondrias, indican que los grupos CN y los STZ son diferentes entre ellos, en el caso de los grupos sin tratamiento, se puede observar que de manera general los grupos inducidos son menos fluidos que los normoglucémicos y de nueva cuenta coincide con la “norma” que discutimos anteriormente en la cual las membranas de los organismos diabéticos tienden a una pérdida de fluidéz (Pilon, 2016).

Al analizar los tejidos contra sus respectivas mitocondrias, podemos observar que en todos los casos (ratas con tratamiento sin importar cual o sin tratamiento), la fluidez es distinta, a los tejidos, esto puede deberse a que la mitocondria es un orgánulo que no es estático, de hecho, es altamente dinámico, está en constante cambio de tamaño, forma y ubicación dentro de la célula y esto podría conferirle la plasticidad que obtuvimos en el cociente (Rovira-Llopis, 2017). Otra posible explicación sería que las mitocondrias presentan una característica especial llamada “membrana asociada a la mitocondria” (MAM) la cual es un punto de contacto entre la mitocondria y el retículo endoplasmático, este último se ha postulado como la fuente principal de fosfolípidos importados hacia la membrana (Fagone y Jackoski, 2009), otra teoría es que las mitocondrias al ser de origen bacteriano, al ser sometidas a estrés por la DM2 o alguna otra especie de daño, modifican la composición de los AG, hipótesis propuesta por Figueroa *et al.* (2015).

9.4 Lipoperoxidación

El estrés oxidativo ocurre cuando la concentración intracelular de las especies reactivas de oxígeno sobrepasa la capacidad de los sistemas antioxidantes como resultado de una mayor producción de dichas especies de oxígeno y/o cuando los procesos antioxidantes se ven comprometidos. El daño resultante a moléculas de la célula promueve el mal funcionamiento de la misma y dicho daño puede conllevar a desarrollar algunas patologías. La mitocondria es uno de los productores principales de ROS, puesto que muchos sub productos de la cadena transportadora de electrones (por sus siglas en ingles [ETC]) son peróxidos (Brownlee, 2001), la producción de ROS es un factor natural durante el desarrollo de los organismos, de hecho, el envejecimiento está altamente relacionado con el aumento de las especies reactivas de oxígeno; además, la diabetes *per se* es conocida por ser uno de los desórdenes que producen una mayor cantidad de radicales libres y por ende un mayor estrés oxidante (Hinokio *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 1999). Se han realizado estudios donde se cree que la composición de AG puede influir en la producción de ROS y en la susceptibilidad que tienen a ser lipoperoxidados (Hulbert *et al.*, 2007). El proceso por el cual la mitocondria genera tanta producción de ROS es por su actividad metabólica, claros ejemplos de los productores de radicales son el complejo II que es oxidado directamente por un oxígeno di atómico, desapareando un electrón de dicho O₂, generando al radical superóxido ⁻O₂ (Chance *et al.*, 1979; Cadenas y Davies, 2000), otro factor que produce ROS en el incremento en la actividad mitocondrial es que se produce mucho ATP pero se reduce la capacidad en la ETC conllevando a un aumento en la producción de ROS (Korshunov *et al.*, 1997).

En este estudio evaluamos la lipoperoxidación en mitocondrias de hígado en organismos normoglucémicos e inducidos a diabetes y esos mismos en conjunto con tratamientos de AGω-3 por medio de la cuantificación de malondialdehído. Durante el desarrollo de la diabetes mellitus, se puede ver el incremento de la producción de lipoperoxidos en mitocondrias (figuras 5, 6 y 7 *p<0.05), esto se debe

a que la diabetes *per se* aumenta la producción de radicales libres ya que el metabolismo se ve activado de manera anómala, conllevando a la producción en grandes cantidades de ROS (Harrison *et al.*, 2003).

Ohkuwa *et al.* (1995) demostraron en un modelo de ratas inducidas a diabetes con estreptozotocina y Frances *et al.* (2010) en hígado de rata, que el “estado” de diabetes produce mucho radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y esto está correlacionado con la lipoperoxidación. Dicha producción de radicales libres se puede deber al exceso de glucosa en torrente sanguíneo, generado por los cambios de la DM, cambian el metabolismo del organismo, lo que tiene como consecuencia un incremento en la producción de ROS (Kohnert *et al.*, 2012) y por consecuencia se da una activación en exceso de la ETC ya que se ha demostrado que durante dicha activación la NADPH oxidasa unida a la membrana es una de las fuentes principales de ROS (Kamal *et al.*, 1994). Otro factor que influye en el aumento en los lipoperóxidos es el aumento en los AG EPA y DHA, estos al tener muchas insaturaciones, son más susceptibles a la oxidación. En estudios realizados por Pollette *et al.* (1996) y Lamaitre *et al.* (1997), en plaquetas de humanos, encontraron que un enriquecimiento de fosfolípidos de membrana con EPA y/o DHA inducen lipoperoxidación, por la formación significativamente mayor de MDA y una concentración menor de vitamina E.

En nuestra investigación, encontramos que la composición de AG EPA y DHA cambia en sentido a lo reportado por Pollette *et al.* (1996) y Lamaitre *et al.* (1997) El grupo CN de 3 meses (figura 6) tiene un aumento considerable en los AGPI y se ve un aumento similar en la concentración de lipoperóxidos conforme aumentan los tratamientos, siendo el tratamiento de 3 días por semana el que presenta mayor concentración de los mismos y de AGPI, en contraste, Croset *et al.* (1990) y Véricel *et al.* (1999), en estudios clínicos en personas mayores, demostraron que un bajo consumo de DHA y/o EPA (de entre 100 mg a 180 mg al día durante 6 a 8 semanas) reduce la producción de MDA e incrementa la concentración de alfa y gama tocoferol. Esto podría indicar que un consumo alto en AGPI puede generar un efecto

adverso. En nuestro caso, todos los tratamientos en las ratas diabéticas, en apariencia disminuyen los lipoperóxidos, apoyando de cierta manera lo reportado por Croset *et al.* (1990) y Véricel *et al.* (1999), pero en ratas normoglucémicas presenta una tendencia a aumentar los lipoperóxidos conforme va aumentando el consumo de AG ω -3.

A los 6 meses de edad (figura 7), en ambos casos (grupo CN y STZ) se obtuvo un resultado particularmente interesante, en el cual se puede observar que los tratamientos (todos) tienden a disminuir la producción de lipoperóxidos y a manera de suposición, el estrés oxidativo. Otro factor a resaltar es que los tratamientos de 1 día/semana, 3 días/semana y 7 días/semana, presentan diferencias significativas respecto al control diabético y una similitud con el control normoglucémico, esto da pauta a suponer que los AG ω -3 aminoran la producción de radicales libres en los grupos inducidos a diabetes y por ende menos daño, aunque también puede deberse a un recambio de los AG de la membrana a manera de homeorresis.

Se conoce que los productos finales de la peroxidación lipídica (como es el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal) reducen la actividad de todos los complejos de la ETC (Chen *et al.*, 1998; Picklo *et al.*, 1999; Lashin *et al.*, 2005; Kaplan *et al.*, 2007; Long *et al.*, 2009). En el caso de las ratas de 1 mes de edad hay un decremento en el control respiratorio (CR) de las ratas diabéticas en comparación de las normoglucémicas (Martíñon 2018, tesis en elaboración). En las ratas normoglucémicas de 3 meses los tratamientos (todos) disminuyen el CR y aumentan los LPOs. En las ratas diabéticas de la misma edad, el CR aumenta con el primer tratamiento y disminuye conforme aumentan las dosis, esto coincide con la concentración de MDA, en la cual el primer tratamiento disminuye la concentración de MDA por debajo del control normoglucémico y conforme aumentan los tratamientos, aumenta la concentración de LPOs. Lo anterior podría deberse a que las membranas al estar constituidas en su mayoría por AGS y AG monoinsaturados (Tuller *et al.*, 1999), adquieren cierta resistencia a la peroxidación (Yin *et al.*, 2011).

A los seis meses de edad (figura 8) el grupo diabético presenta el mismo patrón que los 3 meses de edad, lo peculiar es que el grupo CN, a pesar de que los lipoperóxidos presentan una tendencia a reducirse, el CR se reduce de la misma manera, esto podría deberse a que hay una mayor incorporación de AGI durante el desarrollo de las ratas control, incrementan la susceptibilidad a daño por ROS (figura 7) y esto genera a largo plazo un desacoplamiento de la ETC (Aguilar-Toral *et al.*, 2014) y por ende una pobre actividad mitocondrial, la cual coincide de nueva cuenta con lo reportado por Martiñon (2018 tesis en elaboración).

9.5 Correlación entre índice de fluidez (I/S) y lipoperoxidación

El análisis de correlación generó resultados muy heterogéneos (tabla 19). Al mes de edad se da a notar que el cociente de fluidez de las ratas diabéticas tiene una correlación positiva muy cercana a uno, indicando que la baja en la fluidez está directamente relaciona con la cantidad de LPOs, dando a entender que la baja en dicho cociente se deba al cambio generado por ROS en los AG. A los tres meses de edad, la correlación positiva más cercana a 1 del control con tratamientos, fue el tratamiento de AG ω -3 por 3 días por semana, cabe destacar que es el grupo más fluido. De acuerdo a Tuller *et al.* (1999), la presencia de más AGS y AG monoinsaturados “protege” de cierta manera de la lipoperoxidación, y en el caso particular de las ratas del grupo anterior mencionado, los AG ω -3 de dicho grupo son mayores que el CN sin tratamiento, de manera contraria, en las ratas inducidas a DM2, la correlación en su mayoría es negativa y aún más, la concentración de MDA es menor que los controles con y sin tratamiento, lo cual, de cierta manera, no apoya lo anteriormente mencionado. Finalmente a los 6 meses de edad la correlación en los grupos es nuevamente heterogénea, pero, la correlación del tratamiento con AG ω -3 por 7 días a la semana muestra una similitud con la correlación de las ratas diabéticas a un mes de edad, lo que coincide en gran parte con la composición de los AG, y, del lado del grupo inducido a diabetes, la correlación y composición de

AG que presenta el mismo tratamiento (AG ω -3 7 días/semana) son similares al control de un mes de edad.

La heterogeneidad en los datos nos lleva a plantearnos la siguiente pregunta: ¿realmente es válido hacer la relación de la producción de lipoperóxidos con el cociente de fluidez? Esta pregunta nos llevó a ver la correlación con los AG ω -3, ya que es el principal factor en este proyecto (tabla 21, anexo 1). Los resultados encontrados fueron igual de heterogéneos, por lo cual nos planteamos una segunda pregunta: ¿Será que el tratamiento no sea lo único que se requiera tomar en consideración para analizar la relación con los lipoperóxidos? La respuesta idónea sería que no, ya que como se sabe la DM es un síndrome multifactorial (ADA, 2007), de lo cual destaca la hiperglucemia, anomalía derivada de la secreción y/o síntesis de insulina, resistencia a la insulina y alteración en el metabolismo energético (Lyra *et al.*, 2009), y por lo tanto no podríamos llegar a una respuesta concreta tomando un parámetro único para hacer un análisis de correlación. Los resultados obtenidos en este proyecto deben ser analizados en conjunto con los parámetros fisiológicos (Vicenteño, 2018) y los parámetros físicos (Martíñon 2018 tesis en elaboración), los cuales podrían generar una concepción amplia del cómo se vieron afectadas las ratas con el tratamiento y las repercusiones reales en todos los niveles del estudio (químico, físico y fisiológico).

10 CONCLUSIONES

❖ En el modelo de diabetes mellitus tipo 2 con hiperglucemia ligera utilizado en este trabajo, se generaron cambios en la composición de ácidos grasos del hígado y de sus mitocondrias.

❖ A un mes de edad, la diabetes cambió la composición ácidos grasos ya que causó una reducción en el cociente I/S del tejido hepático y de sus mitocondrias.

❖ En todos los casos, el cociente I/S de tejido hepático, es mayor que el de sus mitocondrias.

❖ Los tratamientos con los diferentes esquemas de dosificación de ácidos grasos omega 3, esporádico, regular o crónico, no generaron un efecto tipo farmacológico en el cociente I/S; ni en animales inducidos a diabetes ni en los normoglucémicos.

❖ Alrededor de la edad en que los sujetos experimentales alcanzan la madurez sexual (3 meses de edad), los cambios en el cociente I/S son más heterogéneos, tanto en animales control como inducidos a diabetes.

❖ A edad adulta (6 meses), los tratamientos con los ácidos grasos omega 3 no parecen tener efecto claro sobre el cociente I/S en tejido hepático; sin embargo, en mitocondria es diferente. En animales control el cociente I/S desciende entre mayor sea la dosis de ácidos grasos omega 3, mientras que, en inducidos a diabetes, parece aumentarlo.

❖ En general, la diabetes mellitus tipo 2 aumentó la lipoperoxidación en mitocondrias de hígado.

❖ A 3 meses de edad, los tratamientos con los ácidos grasos omega 3 ayudaron parcialmente a controlar la lipoperoxidación en mitocondrias de animales inducidos a diabetes, pero aumentaron la lipoperoxidación en mitocondrias de animales control.

❖ A 6 meses de edad, los tratamientos con ácidos grasos omega 3 parecen tener efecto en contra de la lipoperoxidación en mitocondrias tanto en animales control como inducidos a diabetes.

❖ El análisis de correlación muestra que los ácidos grasos omega 3 no son simples componentes estructurales que pueden o no aumentar la lipoperoxidación, sino que tienen una participación mucho más compleja con el organismo en general.

11 PERSPECTIVAS

De acuerdo a lo obtenido en esta investigación, junto con los resultados obtenidos por Vicenteño (2018) y Martiñon (2018 tesis en desarrollo), se puede observar que los tratamientos con ácidos grasos omega-3 en apariencia son benéficos en las ratas inducidas a diabetes mellitus tipo 2. Los tratamientos en las ratas normoglucémicas generan alteraciones que llevan de alguna manera a condiciones diabéticas, por lo cual es recomendado que el experimento se siga hasta 1 año, y observar si en efecto, los esquemas de tratamientos podrían conllevar las ratas a un desarrollo de diabetes.

Por otra parte, se desconoce mucha información acerca de la membrana de la mitocondria, desde su síntesis hasta su composición. Esto nos plantea la duda de si la composición y la fluidez de membrana interna y externa son diferentes entre ellas, de serlo, por qué lo son y que determina que lo sean.

12 LITERATURA CITADA

Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin N Am*. 2010; 90(4):643-653.

Aguilar-Toral R, Fernández-Quintero M, Ortiz-Ávila O, de la Paz LH, Calderón-Cortés E, Rodríguez-Orozco AR, Saavedra-Molina A, Calderón-Torres M, Cortés-Rojo C. Characterization of the effects of a polyunsaturated fatty acid (PUFA) on mitochondrial bioenergetics of chronologically aged yeast. *J Bioenerg Biomembr*. 2014; 46(3):205-220.

Almeida ML, Vaz WL, Zachariasse KA, Madeira VM. Fluidity of sarcoplasmic reticulum membranes investigated with dipyranylpropane, an intramolecular excimer probe. *Biochemistry*. 1982; 21(23):5972-5977.

American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diab Care*. 2015 38(1):S8-S16.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab Care*. 2014; 37:S81-S90

American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diab Care*. 2007; 30(1):S4-S41.

Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease: a review. *EMRO Mediterr Health J*. 1998; 4(2):350-60.

Baillie RA, Takada R, Nakamura M, Clarke SD. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1999; 60(5-6):351-356.

Bakan E, Yildirim A, Kurtul N, Polat MF, Dursun H y Cayir K. Effects of type 2 diabetes mellitus on plasma fatty acid composition and cholesterol content of erythrocyte and leukocyte membranes. *Acta Diabetol*. 2006; 43(4):109-113.

Baynes HW. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab*. 2015; 6(5):1000541-1000541.

Bligh EG y Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physio*. 1959; 37(8):911-917.

Borkman M, Storlien LH, Pan DA, Jenkins AB, Chisholm DJ, Campbell LV. The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids. *N Engl J Med.* 1993; 328(4):238-244.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72(1):248-254.

Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; 414(6865):813-820.

Brownlee M. Negative consequences of glycation. *Metabolism.* 2000; 49(2 Suppl 1):9-33.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med.* 2000; 29(3-4):222-230.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59(3):527-605.

Chen J, Schenker S, Frosto TA, Henderson GI. Inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal (HNE). Role of HNE adduct formation with the enzyme subunits. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1380(3):336-344.

Choe M, Jackson C, Yu BP. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18(6):977-984.

Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br J Nutr.* 2000; 83(Suppl. 1):S59-S66.

Clifton PM, Nestel PJ. Relationship between plasma insulin and erythrocyte fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1998; 59(3): 191-194.

Costa J, Borges M, David C, Vaz-Carneiro A. Efficacy of lipid lowering drug treatment for diabetic and non-diabetic patients: meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ.* 2016; 332(7550):1115-1124.

Croset M, Véricel E, Rigaud M, Hanss M, Courpron P, Dechavanne M, Lagarde M. Functions and tocopherol content of blood platelets from elderly people after low intake of purified eicosapentaenoic acid. *Thromb Res.* 1990; 57(1):1-12.

Evans JL, Goldfine TD, Maddux BA, Grodsky GD. Oxidative stress and stress activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev.* 2002; 23(5):599-622.

Fagone P, Jackowski S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res.* 2009; 50(Suppl):S311-S316.

Farmer A, Montori V, Dinneen S, Clar C. Fish oil in people with type 2 diabetes mellitus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2001; (3):CD003205.

Figuroa GMC. Análisis de las Alteraciones Morfológicas y Funcionales por Peroxidación de Lípidos de la Membrana Mitocondrial de la Placenta en Ratas Gestantes inducidas a Diabetes Mellitus Tipo 2 con STZ. [Tesis de Doctorado]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.

Figuroa-García MdelC, Espinosa-García MT, Martínez-Montes F, Palomar-Morales M, Mejía-Zepeda R. Even a Chronic Mild Hyperglycemia Affects Membrane Fluidity and Lipoperoxidation in Placental Mitochondria in Wistar Rats. *PLoS One.* 2015; 10(12):e0143778.

Frances DE, Ronco MT, Monti JA, Ingaramo PI, Pisani GB, Parody JP, Pellegrino JM, Martín SP, Carrillo MC, Carnovale EC. Hyperglycemia induces apoptosis in rat liver through the increase of hydroxyl radical: new insights into the insulin effect. *J Endocrinol.* 2010; 205(2):187-200.

Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res.* 2005; 36(3):232-240.

Göttlicher M, Widmark E, Li Q, Gustafsson JA. Fatty acids activate a chimera of the clofibric acid-activated receptor and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89(10):4653-4657.

Green K, Brand MD, and Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004; 53(Suppl 1):S110-S118.

Grunfeld C, Baird KL, Kahn CR. Maintenance of 3T3-L1 cells in culture media containing saturated fatty acids decreases insulin binding and insulin action. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981; 103(1):219-26.

Halliwell B, Gutteridge MCJ (2015). Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. En *Free radicals in biology & medicine*, 5ª Reino Unido: Oxford University Press; 2015A. 199-283.

Halliwell B, Gutteridge MCJ. *Free radicals in biology & medicine*, 5ª Ed. Reino Unido: Oxford University Press; 2015B. 257.

Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence?. *Lancet*. 1994; 344(8924):721-724.

Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2003; 91(3A):7A-11A.

Hinokio Y, Suzuki S, Hirai M, Chiba M, Hirai A, Toyota T. Oxidative DNA damage in diabetes mellitus: its association with diabetic complications. *Diabetologia*. 1999; 42(8):995-998.

Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev*. 2007; 87(4):1175-1213.

IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation. 6ª ed. 2013.

IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation. 7ª ed. 2015.

IDF Diabetes Atlas. International Diabetes Federation. 8ª ed. 2017.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. Estadísticas a propósito del día de muertos (2 de noviembre). 2017. [Consultado el 11 de abril de 2018].

Disponible en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf

Islas AAS, Revilla MMC. Diabetes mellitus, concepto y clasificación. En: *Diabetes mellitus: actualizaciones*. México: Alfi; 2013. 4-6.

Jones PM, Burns CJ, Belin VD, Roderigo-Milne HM, Persaud SJ. The role of cytosolic phospholipase A2 in insulin secretion. *Diabetes*. 2004; 53(Suppl 1):S172-S178.

Jump DB, Clarke SD. Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu Rev Nutr*. 1999; 19:63-90.

Kamal M, Mohazzab BH, Pawel M, Kaminski M, Wolin SM. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol.* 1994; 266(6):H2568-H2572.

Kaplan P, Tatarkova Z, Racay P, Lehotsky J, Pavlikova M, Dobrota D. Oxidative modifications of cardiac mitochondria and inhibition of cytochrome c oxidase activity by 4-hydroxynonenal. *Redox Rep.* (2007) 12(5):211-218.

Karp G. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*, 7ª ed, México: Mc Graw Hill; 2013. 178-210.

Kohnert KD, Freyse EJ, Salzsieder E. Glycaemic variability and pancreatic β -cell dysfunction. *Curr Diabetes Rev.* 2012; 8(5):345-354.

Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 1997; 416(1):15-18.

Koves TR, Li P, An J, Akimoto T, Slentz D, Ilkayeva O, Dohm GL, Yan Z, Newgard CB, Muoio DM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 α -mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. *J Biol Chem.* 2005; 280(29):33588-33598.

Kraegen EW, Clark PW, Jenkins AB, Daley EA, Chisholm DJ, Storlien LH. In vivo insulin resistance in individual peripheral tissues of the high fat fed rat: assessment by euglycemic clamp plus deoxyglucose administration. *Diabetologia.* 1986; 29(3):192-198.

Kumar PJ, Clark M (2002). *Textbook of Clinical Medicine* 8th ed. Inglaterra: Saunders; 2002. 1099-1121.

Lashin OM, Szweda PA, Szweda LI, Romani AM. Decreased complex II respiration and HNE-modified SDH subunit in diabetic heart. *Free Radic Biol Med.* 2005; 40(5):886-896.

Lemaitre D, Véricel E, Polette A, Lagarde M. Effects of fatty acids on human platelet glutathione peroxidase: possible role of oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 1997; 53(4):479-486.

Liu T, Stern A, Roberts LJ, Morrow JD. The isoprostanes: novel prostaglandin-like products of the free radical-catalyzed peroxidation of arachidonic acid. *J Biomed Sci.* 1999; 6(4):226-35.

Long J, Liu C, Sun L, Gao H, Liu J. Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria. *Neurochem Res.* 2009; 34(4):786-794.

Lyra R, Galindo V, Cavalcanti N. Definición, diagnóstico y clasificación de las alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono. En: Rosas GJ, Lyra R, Cavalcanti N. Diabetes Mellitus visión latinoamericana. México: Intersistema; 2009. 28-37.

Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM, Bailey SM. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradient and mitochondrial function in vivo. *Biochem J.* 2009; 417(1):183-193.

Martínez MA, Yago TMD, Martínez de Victoria ME. Lípidos de los alimentos. En: Gil A y Serra L. Libro blanco de los Omega-3. España: Panamericana; 2013. 3-32.

Martiñon RDA. Efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre la actividad mitocondrial hepática de ratas con diabetes mellitus tipo 2. [Tesis de Licenciatura en desarrollo]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.

Matthews RD. Regulation of homeostasis: glucose and other substrates. En Serrano RM, Gutiérrez FJA. Type 2: Diabetes Mellitus. España: Elsevier; 2010. 89-104.

McCarron GJ, Wilson C, Sandison EM, Olson LM, Girkin MJ, Saunter C, Chalmers S. From Structure to Function: Mitochondrial Morphology, Motion and Shaping in Vascular Smooth Muscle. *J Vasc Res.* 2013; 50(5):357–371.

McCord JM1. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 108(8):652-659.

Morrison RW, Smith ML. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lip Res.* 1964; 5:600-608.

Ntambi JM. Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res.* 1999; 40(9):1549-1558.

Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes.* 1997; 46(11):1768-1774.

Ohkawa H, Ohishi N y Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95(2):351-358.

Ohkuwa T, Sato Y, Naoi M. Hydroxyl radical formation in diabetic rats induced by streptozotocin. *Life Sci.* 1995; 56(21):1789-1798.

Orozco-Tapia RI. Efecto de los ácidos grasos omega 3 (FA ω -3) y linolénico conjugado (CLA) en la Diabetes Mellitus 2 (DM2) en rata Wistar. [Tesis de Licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2008.

Pérez-Hernández IH, Avendaño-Flores YS, Mejía-Zepeda R. Analysis of the membrane fluidity of erythrocyte ghosts in diabetic, spontaneously hypertensive rats. *Acta Diabetol.* 2010; 47(1):S47-S55.

Pérez-Hernández IH, Domínguez-Fuentes JM, Palomar-Morales M, Zazueta-Mendizabal AC, Baiza-Gutman A, Mejía-Zepeda R. Liver mitochondrial membrane fluidity at early development of diabetes and its correlation with the respiration. *J Bioenerg Biomembr.* 2017; 49(3):231-239.

Pérez-Hernández IH. Cambios en los ácidos grasos y fosfolípidos durante el desarrollo de la diabetes e hipertensión en ratas espontáneamente hipertensas (SHR). [Tesis de Licenciatura]. México: Universidad nacional Autónoma de México; 2008.

Picklo MJ, Amarnath V, McIntyre JO, Graham DG, Montine TJ. 4-Hydroxy-2(E)-nonenal inhibits CNS mitochondrial respiration at multiple sites. *J Neurochem.* 1999; 72(4):1617-1624.

Pilon M. Revisiting the membrane-centric view of diabetes. *Lipids Health Dis.* 2016; 15(1):167.

Pollette A, Lemaitre D, Lagarde M, Véricel E. N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins. *Thromb Haemost.* 1996; 75(6):945-949.

Ramesh B, Viswanathan P, Pugalendi KV. Protective effect of Umbelliferone on membranous fatty acid composition in streptozotocin-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2007; 566(1-3):231-239.

Rossy J, Ma Y, Gaus K. The organisation of the cell membrane: do proteins rule lipids?. *Curr Opin Chem Biol.* 2014; 20:54-59.

Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Hernandez-Mijares A, Rocha M, Victor MV. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* 2017; 11:637-645.

Ruiz-Gutierrez V, Stiefel P, Villar J, García-Donas MA, Acosta D y Carneado J. Cell membrane fatty acid composition in Type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: relationship with sodium transport abnormalities and metabolic control. *Diabetologia.* 1993; 36(9):850-856.

Saltiel AR. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell.* 2001; 104(4):517-529.

Scorletti E, Byrne CD. Omega-3 fatty acids, hepatic lipid metabolism, and nonalcoholic fatty liver disease. *Annu Rev Nutr.* 2013; 33:231-248.

Shinitzky M. Membrane fluidity and cellular functions. Physiology of membrane fluidity. Estados Unidos: CRC Press; 1984. 1-184.

Simoneau, JA, Kelley DE. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol.* 1997; 83(1):166-171.

Song MK, Hwang IK, Rosenthal MJ, Harris DM, Yamaguchi DT, Yip I, Go VL. Antidiabetic actions of arachidonic acid and zinc in genetically diabetic Goto-Kakizaki rats. *Metabolism.* 2003; 52(1):7-12.

Stöckl MT, Herrmann A. Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1798(7):1444-1456.

Storlien LH, Jenkins AB, Chisholm DJ, Pascoe WS, Khouri S, Kraegen EW. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes.* 1991; 40(1):280-289.

Storlien LH, Kraegen EW, Chisholm DJ, Ford GL, Bruce DG, Pascoe WS. Fish oil prevents insulin resistance induced by high fat feeding in rats. *Science*. 1987; 237(4817):885-888.

Stryer L, Berg MJ, Tymoczko LJ. Bioquímica con aplicaciones clínicas. 7ª Ed. España: Reverté; 2015. 639-672.

Suzuki S, Hinokio Y, Komatu K, Ohtomo M, Onoda M, Hirai S, Hirai M, Hirai A, Chiba M, Kasuga S, Akai H, Toyota T. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 1999; 45(2-3):161-168.

Szkudelski T. Streptozotocin–nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med*. 2012; 237(5):481-490.

Szkudelski T. The Mechanism of alloxana and streptozotocin action in B cells of rat páncreas. *Physiol Res*. 2001; 50(6):536-544.

The expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab Care*. 2003; 26(1):S5-S20.

Thorseng T, Witte DR, Vistisen D, Borch-Johnsen K, Bjerregaard P, Jørgensen ME. The association between n-3 fatty acids in erythrocyte membranes and insulin resistance: the Inuit Health in Transition Study. *Int J Circumpolar Health*. 2009; 68(4):327-336.

Triall KN, Wick G. Lipids and lymphocyte function. *Immunol Today*. 1984; 5(3):70-76.

Tuller G, Nemec T, Hrastnik C, Daum G. Lipid composition of subcellular membranes of an FY1679-derived haploid yeast wild-type strain grown on different carbon sources. *Yeast*. 1999; 15(14):1555-1564.

Ukropcova B, Sereda O, de Jonge L, Bogacka I, Nguyen T, Xie H, Bray GA, Smith SR. Family history of diabetes links impaired substrate switching and reduced mitochondrial content in skeletal muscle. *Diabetes*. 2007; 56(3):720-727.

Vance JE. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1841(4):595-609.

Véricel E, Calzada C, Chapuy P, Lagarde M. The influence of low intake of n-3 fatty acids on platelets in elderly people. *Atherosclerosis*. 1999; 147(1):187-192.

Vicenteño MUA. Análisis de diferentes dosis de omega 3 (alfa-linolénico) en fantasmas de eritrocitos de ratas diabéticas tipo 2. [Tesis de Licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2018.

Voet D y Voet GJ. Bioquímica, 3ª Ed. México. Médica Panamericana; 2006. 1776.

Waczulikova I, Habodaszova D, Cagalinec M, Ferko M, Ulicna O, Mateasik A, Sikurova L, Ziegelhöffer A. Mitochondrial membrane fluidity, potential, and calcium transients in the myocardium from acute diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2007; 85(3-4):372-81.

Wasserman HD. Four grams of glucose. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 296(1):E11-E21.

Wattenberg WB. Introduction to the special issue of the journal of bioenergetics and biomembranes: "mitochondrial lipids: essential roles in physiology and disease". *Bioenerg Biomembr*. 2016; 48(2):97.

Weijers NMR. Lipid Composition of Cell Membranes and Its Relevance in Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Diab Rev*. 2012; 8(5):390-400.

Wolff SP, Jiang ZY, and Hunt JV. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med*. 1991; 10(5):339-352.

World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation. Editores: World Health Organization, International Diabetes Federation. Suiza: WHO Press; 2016. 56.

Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*. 2011; 111(10):5944-5972.

13 ANEXO I

Tabla 21. Correlación entre lipoperoxidación y los ácidos grasos linolénico, EPA y DHA de todos los grupos experimentales.

Edad	Tratamientos con AG ω -3	Linolénico		EPA		DHA	
		CN	STZ	CN	STZ	CN	STZ
1 mes	0 días/semana	-0.16	-0.28	0.42	-0.47	-0.15	0.44
	0 días/semana	-0.05	0.24	-0.44	0.24	0.11	0.13
3 meses	1 días/semana	-0.11	-0.02	-0.18	-0.02	0.08	0.26
	3 días/semana	0.25	0.71	0.83	NT	-0.52	-0.28
	7 días/semana	0.41	0.03	0.29	0.34	0.59	-0.08
	0 días/semana	0.61	-0.24	0.51	-0.11	0.33	-0.48
6 meses	1 días/semana	-0.77	-0.01	-0.04	0.04	-0.18	-0.28
	3 días/semana	0.29	0.33	0.01	-0.14	-0.57	-0.16
	7 días/semana	0.58	-0.43	0.19	-0.31	0.85	0.78

Eje de las X el cociente de fluidez y el eje Y la concentración MDA (nmol/mg proteína).
 CN: grupo normoglucémico; STZ, grupo inducido a diabetes; AG ω -3: ácidos grasos omega-3; EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosaheptaenoico; NT: No detectado.