



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE MITOCONDRIA Y RETÍCULO  
ENDOPLÁSMICO EXTRAÍDOS DE TEJIDO HEPÁTICO DE RATAS  
DIABÉTICAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**Jorge Escutia Martínez**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Ricardo Mejía Zepeda**

**Tlalnepantla de Baz, Edo de México, 2019**





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 dirección del Dr. Ricardo Mejía Zepeda.

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

A mis sinodales por su apoyo, sugerencias y sobre todo por su tiempo, para ayudarme a mejorar.

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Dr. Hugo Virgilio Perales Vela

Dr. Ismael Herminio Pérez Hernández

Dra. Edaena Benítez Rangel

A la Dr. Consuelo Figueroa por brindarme un poco de su conocimiento y ayudarme a ser metódico.

Si es que quieres ser tan bueno, si lo sueñas de verdad; inténtalo, empiézalo, seguro y veloz.

Yo no hacia la tarea jamás, pero, eso se ha quedado muy atrás.

Todo, comenzó por curiosidad, porque yo, quiero entenderlo todo.

En todas partes tropecé, fue doloroso, yo lo sé, se bien cómo te sientes!

Algo interior me impulsó y volví a estar de pie tome la oportunidad.

Sueña siempre, sueña inventa, y así pronto triunfarás:

Hazlo todo con amor y pon mucha atención.

Confío en ti lo lograras, no pares de correr.

## ÍNDICE

1. Resumen.....	9
2. Introducción.....	10
2.1 Mitocondria y Retículo endoplásmico.....	11
2.2 Composición de membranas biológicas.....	13
2.3 Formación de membranas.....	14
2.4 Transporte de fosfolípidos.....	15
2.5 Condición estresante.....	16
2.6 Alteración en composición de membranas mitocondriales.....	19
2.7 Justificación.....	21
2.8 Hipótesis.....	21
3. Objetivo general.....	22
3.1 Objetivos particulares.....	22
4. Material y métodos.....	22
4.1 Animales de experimentación.....	23
4.1.1 Inducción a diabetes experimental tipo 1.....	23
4.1.2 Sacrificio de los organismos.....	24
4.3 Obtención de organelos.....	24
4.4 Cuantificación de proteínas.....	25
4.5 Respiración mitocondrial.....	25
4.6 Transesterificación de ácidos grasos.....	25
4.7 Análisis de la composición de ácidos grasos.....	26
4.8 Análisis estadístico.....	26
5. Resultados.....	27
5.1 Concentración de glucosa en sangre (glucemia).....	27
5.2 Peso de ratas Wistar control e inducidas a los 3 meses de edad aproximada. ....	28
5.3 Control Respiratorio.....	28
5.4 Correlación control respiratorio – glucemia.....	29
5.5 Composición de ácidos grasos de tejido hepático, microsomas y mitocondrias de ratas Wistar.....	31
5.5.1 Composición de ácidos grasos tiempo 1.....	32

5.5.1.1 Diferencias de tejido, microsomas y mitocondrias entre organismos control y organismos inducidos .....	32
5.5.2.2 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas control.....	33
5.5.2.3 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas inducidas.....	34
5.5.3 Composición de ácidos grasos tiempo 2 .....	36
5.5.3.1 Diferencias de tejido, microsomas y mitocondrias entre organismos control y organismos inducidos .....	36
5.5.3.2 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas control.....	36
5.5.3.3 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas inducidas.....	37
5.5.4 Composición de ácidos grasos tiempo 3 .....	39
5.5.4.1 Diferencias de tejido, microsomas y mitocondrias entre organismos control y organismos inducidos .....	39
5.5.4.2 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas control.....	39
5.5.4.3 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas inducidas.....	40
5.5.5 Composición de ácidos grasos tiempo 4 .....	42
5.5.5.1 Diferencias de tejido, microsomas y mitocondrias entre organismos control y organismos inducidos .....	42
5.5.5.2 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas control.....	42
5.5.4.3 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas inducidas.....	43
5.6 Análisis de ácidos grasos individuales por tiempo .....	45
5.6.1.1 Porcentaje de ácido palmítico en tejido de ratas control y de ratas inducidas	45
5.6.1.2 Porcentaje de ácido palmítico en microsomas de ratas control y de ratas inducidas.....	46
5.6.1.3 Porcentaje de ácido palmítico en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas.....	47
5.6.2.1 Porcentaje de ácido esteárico en tejido de ratas control y de ratas inducidas	47
5.6.2.2 Porcentaje de ácido esteárico en microsomas de ratas control y de ratas inducidas.....	48
5.6.2.3 Porcentaje de ácido esteárico en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas.....	49
5.6.3.1 Porcentaje de ácido linoleico en tejido de ratas control y de ratas inducidas .	50
5.6.3.2 Porcentaje de ácido linoleico en microsomas de ratas control y de ratas inducidas.....	51
5.6.3.3 Porcentaje de ácido linoleico en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas.....	52

5.6.4.1 Porcentaje de ácido araquidónico en tejido de ratas control y de ratas inducidas .....	53
5.6.4.2 Porcentaje de ácido araquidónico en microsomas de ratas control y de ratas inducidas .....	54
5.6.4.3 Porcentaje de ácido araquidónico en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas .....	55
5.6.5.1 Porcentaje de DHA en tejido de ratas control y de ratas inducidas .....	55
5.6.5.2 Porcentaje de DHA en microsomas de ratas control y de ratas inducidas .....	56
5.6.5.3 Porcentaje de DHA en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas .....	57
5.7 Relación I/S.....	58
5.7.1 Relación I/S por tiempos en tejido, microsomas y mitocondrias.....	60
5.7.2 Comparación de la relación I/S de tejido, microsomas y mitocondrias.....	62
6. Discusión .....	68
6.1 Control respiratorio .....	68
6.2 Composición de ácidos grasos.....	70
6.2.1 Composición de ácidos grasos al tiempo 0.....	70
6.2.2 Composición de ácidos grasos al tiempo 1 .....	71
6.2.3 Composición de ácidos grasos al tiempo 2.....	71
6.2.4 Composición de ácidos grasos al tiempo 3.....	72
6.2.5 Composición de ácidos grasos al tiempo 4.....	73
6.3. Porcentaje de ácidos grasos por separado .....	74
6.4 Relación I/S.....	75
Conclusiones.....	80
Bibliografía.....	81

## **Abreviaturas**

Ác: ácido

ADP: adenosín difosfato

AG: ácido graso

AGs: ácidos grasos

ANOVA: análisis de varianza

ATP: adenosín trifosfato

BHT: hidroxitoluenobutilado

CLA: ácido linoleico conjugado

CR: control respiratorio

DE1: diabetes experimental tipo 1

DHA: ácido docosaheptanoico

DM1: diabetes mellitus tipo 1

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

DNA: ácido desoxirribonucleico

E3: estado 3

E4: estado 4

EPA: ácido eicosapentaenoico

FID: detector de ionización de flama

Fig: figura

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: ácido fosfórico

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia

I/S: ácidos grasos insaturados sobre saturados

M: molaridad

min: minutos

MgCl<sub>2</sub>: cloruro de magnesio

mg/dL: miligramo sobre decilitro

mg/kg: miligramo sobre kilogramo

mL: mililitros

Mm: milímetros

mM: milimolar

µg: microgramos

n: muestra

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

ND: no detectado

NI: no identificado

O: oxígeno

p: valor de probabilidad

RE: retículo endoplásmico

ROS: especies reactivas de oxígeno

STZ: estreptozotocina

Xg: gravedades

°C: grados centígrados

## 1. Resumen

Introducción. Las mitocondrias son organelos de células eucariotas. Están encargadas de suministrar energía para la actividad celular. Para su funcionamiento es importante la estructura de sus membranas. Se sugiere que el retículo provee los fosfolípidos a la mitocondria y así se renuevan sus membranas. De ser este el mecanismo, entonces la composición de ácidos grasos (AGs) de ambas fracciones sería similar. Sin embargo, bajo determinadas condiciones patológicas, se han reportado diferencias entre la composición de AGs en mitocondrias y el tejido hepático total. El análisis de la composición de ácidos grasos, así como la medición de la fluidez de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar inducidas a una diabetes mellitus tipo 2 (DM2), indicó que la fluidez aumentó en mitocondrias, esto provocado por un incremento en el porcentaje de AGs insaturados, pero en el tejido total se mostró un aumento en la concentración de AGs saturados. Eso hace preguntarse ¿Por qué la mitocondria tuvo una proporción de AGs insaturados mayor que el tejido de dónde procede?. Si una ¿DM2? resultó suficiente como condición estresante para inducir esa respuesta de la mitocondria, una diabetes más severa y con mayor efecto glucotóxico podría ser más estresante e inducir la misma respuesta o aún mayor. Si la composición de AGs en mitocondrias es diferente a la del retículo endoplásmico, se podría pensar que la composición de AGs de la mitocondria no depende solamente del retículo endoplásmico, como se considera actualmente.

Objetivo. Investigar si los cambios en composición de AGs de mitocondrias durante el estrés inducido por estreptozotocina e hiperglucemia son similares o diferentes a los experimentados por retículo endoplásmico, en el desarrollo de diabetes experimental tipo 1, además de analizar la importancia del retículo endoplásmico en determinar la composición de AGs de la mitocondria.

Metodología. Se obtuvieron 27 ratas Wistar y 3 se sacrificaron en el tiempo 0, 12 ratas fueron inducidas a diabetes experimental tipo 1 (DE1), con una inyección intraperitoneal de estreptozotocina y 12 fueron utilizadas como control, se

programaron sacrificios cada semana; en la última semana, en las ratas inducidas se indujo una mayor hiperglucemia por una segunda administración de estreptozotocina. De todos los animales se obtuvo tejido hepático, microsomas y mitocondrias por centrifugaciones diferenciales. La composición de AGs se evaluó por cromatografía de gases y para el análisis estadístico se realizó una prueba ANOVA de dos vías. Resultados. La hiperglucemia severa modificó el control respiratorio en la semana 4 posterior a la inducción, la composición de AGs de mitocondrias es diferente a tejido y a retículo endoplásmico aun en organismos control, la hiperglucemia severa modifica la manera en la que se regula porcentaje de DHA, en mitocondrias existieron diferencias en el índice de fluidez desde la primera semana en condiciones normales y también bajo una condición estresante. Conclusiones. Existe relación entre la hiperglucemia y el control respiratorio, las mitocondrias son más sensibles a una condición estresante ligera, la composición de AGs de mitocondrias no está del todo controlada por retículo, las evidencias obtenidas nos indican que podría existir una manera no descrita de regulación de AGs en mitocondrias.

## **2. Introducción**

Las membranas biológicas contienen una asombrosa variedad de lípidos, estas tienen múltiples funciones para la célula, por ejemplo en la duplicación y división celular, en la regulación de la actividad de enzimas de membrana como las implicadas en la fosforilación oxidativa, en los receptores de membrana plasmática o los receptores nucleares, siendo las más importantes mantener estable la permeabilidad de la célula y mantener la comunicación celular por medio de proteínas de membrana (intracelular y extracelular) (Vance y Vance, 1985). Por lo tanto, comprender los mecanismos que actúan en la regulación de su formación y composición es de gran importancia para saber si están relacionados con su función. La síntesis de los lípidos tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE) y se asume que de ahí se distribuyen a toda la célula sin sufrir modificaciones, pero no

se sabe de manera puntual qué ocurre en las membranas de los demás organelos, por ejemplo en las mitocondrias. En este trabajo estamos interesados en generar información relacionada con la regulación de los lípidos, especialmente de la composición de los ácidos grasos, de las membranas mitocondriales.

## **2.1 Mitocondria y Retículo endoplásmico**

Las mitocondrias son organelos intracelulares presentes en células eucariotas, éstas muestran muchas similitudes con los organismos procariotas de vida libre, por ejemplo, se parecen a menudo a las bacterias en cuanto a tamaño y forma, contienen DNA circular, fabrican proteínas y se reproducen dividiéndose en dos (Voet 2006). Las mitocondrias son las responsables de la respiración y este proceso no se produce en ninguna otra parte de la célula eucariota. Muchas bacterias actuales respiran igual que las mitocondrias y es probable que las células eucariotas sean descendientes de organismos anaeróbicos primitivos que sobrevivieron en un mundo que había pasado a ser rico en oxígeno, incorporando bacterias y manteniéndolas en simbiosis, debido a su capacidad de consumir oxígeno atmosférico y producir energía (Alberts *et al* 2002).

Las mitocondrias están encargadas de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, sintetizan ATP a expensas de piruvato, ácidos grasos y aminoácidos por medio de la fosforilación oxidativa (Alberts *et al* 2002).

La fosforilación oxidativa depende del flujo de electrones que tiene lugar en cuatro complejos proteicos que se encuentran embebidos en la membrana interna mitocondrial, que en su conjunto se denomina cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones. La reacción global es exergónica. Tres de los complejos de la cadena de transporte electrónico utilizan la energía liberada por el flujo de electrones para bombear protones de la matriz mitocondrial al espacio intermembranal. La acumulación de los protones genera un gradiente de los mismos y un potencial eléctrico transmembranal que crea una fuerza protón- motriz. El

ATP se sintetiza cuando los protones vuelven a la matriz mitocondrial mediante el complejo enzimático de la ATP sintasa (Stryer *et al* 2013).

La mitocondria posee un sistema de doble membrana, una externa y una interna, que separan tres espacios bien definidos, un espacio externo que no forma parte del organelo, denominado citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Las membranas mitocondriales se caracterizan por presentar bajas concentraciones de ciertos lípidos, tales como el ácido fosfatídico, las esfingomielinas y los glicolípidos característicos de las membranas de las células eucariotas. La membrana externa presenta un bajo porcentaje de colesterol entre el 7%- 11% en comparación con la membrana de algunas células que pueden llegar a presentar entre el 25%-34% (Lodish 2006). El alto contenido de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, cardiolipinas y la escasa cantidad de fosfatidilserina, hacen que la membrana mitocondrial sea semejante a las membranas de ciertas bacterias. Al igual que las membranas plasmáticas, las mitocondriales poseen una asimetría en la distribución de los lípidos, de modo que una alteración en esta distribución tiene consecuencias en su función (Geydan 2006).

La membrana interna de la mitocondria difiere en su organización ya que posee 80% de proteínas y 20% de lípidos. Además, se caracteriza por formar repliegues que se denominan crestas y que incrementan el área total de la superficie interna. Estas crestas aparecen como estructuras lamelares o tubulares, cuyo número está relacionado con las demandas energéticas de la célula (Lodish 2006). La membrana interna es impermeable a muchos solutos; todo paso a través de ella se realiza gracias a proteínas transportadoras, que en su mayoría son hidrofóbicas. También tiene un bajo contenido de colesterol y un alto contenido de cardiolipina (difosfatidil glicerol), lo cual permite que los lípidos que se encuentran en el citosol y sirven para llevar a cabo la  $\beta$ -oxidación entren a la matriz mitocondrial (Lehninger y Cox 2002). La matriz mitocondrial es el compartimento interno de la mitocondria que presenta una sustancia tipo gel, que alberga altas concentraciones de enzimas solubles del metabolismo oxidativo, la matriz también

contiene la maquinaria genética mitocondrial, que sólo expresa unas pocas proteínas de la membrana mitocondrial interna (Voet 2006).

El retículo endoplásmico es el organelo con la membrana más extensa descrita en la célula por Porter en 1945, forma un compartimento laberíntico. El retículo endoplásmico cuenta con dos regiones bien definidas, una región grande denominada como retículo endoplásmico rugoso, que se caracteriza por tener una gran cantidad de ribosomas asociados, encargados de la síntesis de proteínas, para su uso en la membrana o para secreción. La otra región denominada retículo endoplásmico liso desprovista de ribosomas, es el sitio de síntesis de lípidos (Alberts *et al* 2002).

## **2.2 Composición de membranas biológicas**

Las membranas celulares son cruciales para la vida celular. La membrana plasmática rodea a la célula, definiendo su extensión y manteniendo las diferencias esenciales entre su contenido y su entorno. Dentro de la célula eucariota, las membranas del retículo endoplásmico, del complejo de Golgi, de las mitocondrias y otros orgánulos mantienen las diferencias características de cada uno de estos organelos (Stöckl *et al* 2010). Aunque realicen diferentes funciones, todas las membranas biológicas tienen una estructura básica común, una bicapa de fosfolípidos y proteínas, que se mantienen unidas fundamentalmente por interacciones no covalentes. Sin embargo, la bicapa lipídica no está compuesta exclusivamente por fosfolípidos; habitualmente contienen además colesterol y glicolípidos, lo que permite que las membranas celulares sean estructuras dinámicas y fluidas (Voet, 2006).

La fluidez de las membranas celulares es biológicamente importante, ya que, algunos procesos de transporte y actividades enzimáticas pueden detenerse cuando la viscosidad de la membrana aumenta. La fluidez de una bicapa depende tanto de la composición como de la temperatura (Alberts *et al* 2002).

### 2.3 Formación de membranas

La formación de membranas mitocondriales depende de la síntesis de fosfatidilcolina (PC), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI), que se generan en el retículo endoplasmático (RE) (Kornmann *et al* 2009). Un componente esencial para la síntesis de fosfolípidos son los ácidos grasos, cadenas hidrocarbonadas con un grupo carboxilo terminal, con lo cual ganan su característica principal de ser anfipáticos, estos AGs se pueden clasificar como no esenciales (los que sintetiza el organismo) y esenciales, estos últimos no pueden ser sintetizados y se obtienen de la dieta, los AGs provenientes de la dieta son digeridos en el intestino delgado y transportados al hígado (Sáyago-Ayerdi *et al* 2008) (Figura 1).

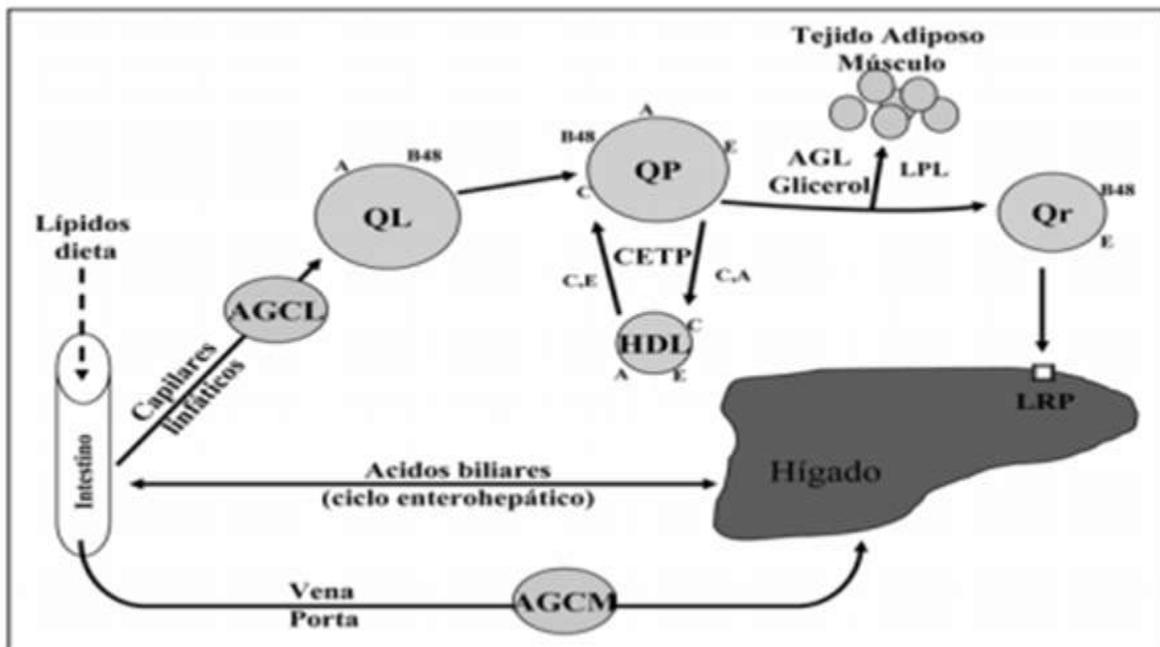


Figura 1. A, C, E, B48: apolipoproteínas; AGCL: Ácidos grasos de cadena larga; AGCM: Ácidos grasos de cadena media; AGL: Ácidos grasos libres; CETP: transferidor de los esteres de

colesterol de las lipoproteínas; HDL: Lipoproteínas de alta densidad; LPL: Lipoprotein lipasa; LRP: Receptor de quilomicrón; QL: Quilomicrón linfático; QP: Quilomicrón plasmático; QR: Quilomicrón remanente (Sáyago-Ayerdi *et al* 2008).

El principal fosfolípido sintetizado es la PC, que puede formarse en tres etapas a partir de dos ácidos grasos, glicerolfosfato y colina. Cada etapa está catalizada por enzimas de la membrana del RE que tienen sus lugares activos dispuestos hacia el citosol, donde se encuentran los metabolitos necesarios. En la primera etapa, las acil transferasas añaden dos ácidos grasos al glicerofosfato produciendo ácido fosfatídico, este compuesto ya es suficientemente hidrofóbico para permanecer en la bicapa lipídica. Esta etapa es la que hace crecer la bicapa lipídica, las etapas posteriores determinan el grupo de cabeza de la molécula lipídica y por lo tanto su naturaleza química, pero no suponen un crecimiento neto de la membrana (Stryer *et al* 2013).

Después de la síntesis del fosfolípido, el siguiente paso consiste en transportarlos a las membranas mitocondriales externas e internas, algunos de estos fosfolípidos al momento del transporte se mantienen en la membrana de RE por lo que se sugiere que la composición de ácidos grasos de la membrana de este organelo es similar a la composición de ácidos grasos de la mitocondria (Alberts *et al* 2002).

## **2.4 Transporte de fosfolípidos**

Originalmente se creyó que los fosfolípidos eran transportados entre el RE y la mitocondria vía transporte vesicular o por proteínas de intercambio de fosfolípidos que tienen la capacidad de transferir moléculas individuales de fosfolípidos entre membranas, cada proteína reconoce sólo determinados tipos específicos de fosfolípidos (Figura 2). Actualmente se cree que los sitios de contacto entre el RE y las mitocondrias nombrado, mitochondria-associated ER membrane (MAM's)

parecen ser responsables de la mayor parte del transporte de lípidos entre estos dos organelos (Kornmann *et al* 2009).

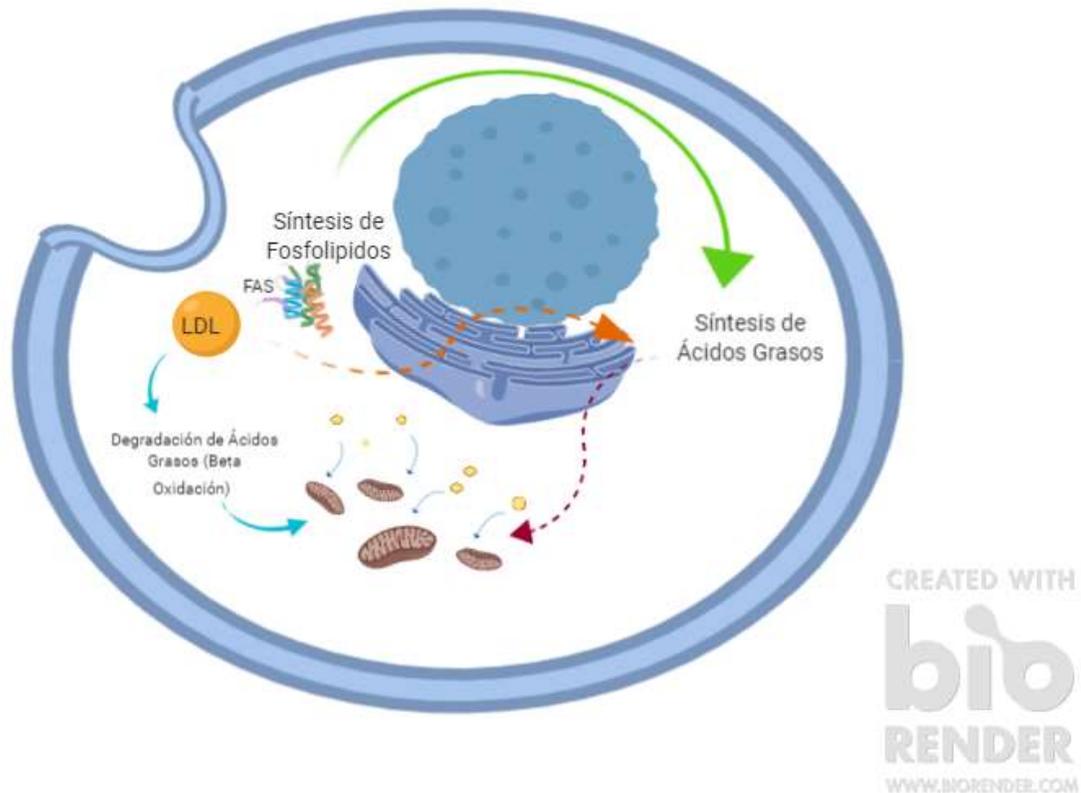


Figura 2. Síntesis y transporte de fosfolípidos vía vesicular (clásica).

## 2.5 Condición estresante

Desajustes metabólicos como los que se presentan en la diabetes derivados de la deficiencia de insulina y causas que conducen a alteraciones en la composición de membranas por ejemplo:

En la diabetes tipo 1 la producción de insulina es insuficiente por causa de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas. En consecuencia, la relación glucagón/insulina está en concentraciones superiores a los normales. En esencia, la persona diabética, a pesar de la elevada concentración sanguínea de glucosa, permanece en un estado de ayuno bioquímico. Debido a la deficiencia de insulina se deteriora la entrada de glucosa a las células del músculo y del tejido

adiposo (Stryer *et al* 2013). El hígado adopta permanentemente un estado gluconeogénico y cetogénico. El estado gluconeogénico se caracteriza por una producción excesiva de glucosa. El exceso de la concentración del glucagón con respecto a la de insulina conduce a una reducción de la cantidad de fructosa 1,6 – bisfosfatasa. En esencia, la respuesta de las células a la ausencia de insulina es aumentar la concentración de glucosa en sangre. La elevada relación glucagón/insulina por la diabetes también induce la degradación del glucógeno. Por tanto en el hígado se produce una cantidad excesiva de glucosa que se libera a la sangre. Cuando la concentración de glucosa en sangre supera la capacidad de absorción de los túbulos renales, la glucosa se excreta en la orina, además se modifica la membrana lipídica y por consecuencia la fluidez de la misma (Gennis 1989).

La deficiente utilización de los carbohidratos en ausencia de insulina origina una lisis incontrolada de lípidos y proteínas, provocando un estado cetogénico. Se producen grandes cantidades de acetil- CoA por la  $\beta$  oxidación. Sin embargo, gran parte del acetil-CoA no puede entrar al ciclo del ácido cítrico porque escasea el oxalacetato para la etapa de condensación. Los mamíferos pueden sintetizar oxalacetato a partir de piruvato, pero no a partir de acetil-CoA; en vez de ello, el acetil-CoA se transforma en cuerpos cetónicos. Una característica llamativa de la diabetes es el cambio de utilización de combustibles, de los carbohidratos a las grasas. A concentraciones elevadas los cuerpos cetónicos desbordan la capacidad renal para mantener el equilibrio ácido-base. Un paciente diabético no tratado puede entrar en coma por un descenso del pH sanguíneo y deshidratación (Stryer *et al* 2013).

También existe la teoría del aumento del sorbitol por la hiperglucemia, la que nos habla de la mayor actividad de la enzima aldosa reductasa, cuya función normal es reducir aldehídos tóxicos para la célula en alcoholes inactivos. Al estar elevado el sorbitol intracelular se produce más fructosa y se consume mayor cantidad de NADH, lo cual hace que se disminuya el glutatión reducido que es un potente antioxidante natural de la célula, eso altera el mecanismo óxido-reductor con

aumento en la osmolalidad celular y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), con el consiguiente daño tisular y disfunción celular (Guzmán *et al* 2009).

En condiciones fisiológicas normales cuando la concentración de ADP aumenta, la velocidad de la fosforilación oxidativa se incrementa para cubrir las necesidades de ATP. La regulación de la velocidad de la fosforilación oxidativa por la concentración de ADP se conoce como control respiratorio. Cuando la regulación de la velocidad de la fosforilación oxidativa se descontrola, se pierde el CR y se dice que la respiración está desacoplada. Algunos organismos poseen la capacidad de desacoplar la fosforilación oxidativa bajo condiciones estresantes, una de las condiciones estresantes más estudiadas es el frío, se conoce que existen proteínas desacoplantes cuyo efecto final es la generación de calor (Stryer *et al* 2013).

Estos problemas raramente se presentan en la diabetes tipo 2 porque en ella la insulina está lo suficientemente activa como para evitar la lipólisis excesiva en el hígado y el tejido adiposo. Además de que esta carencia de insulina está relacionada con el desarrollo de complicaciones como la neuropatía, nefropatía y la retinopatía (Guzmán *et al* 2009).

La disfunción mitocondrial está estrechamente relacionada con desórdenes metabólicos (Sorriento *et al* 2014) y es considerada como uno de los factores para el desarrollo de la resistencia a la insulina. Se ha reportado que pueden existir modificaciones en la cadena de transporte de electrones (Raza *et al* 2011), además se ha demostrado que bajo estas condiciones hay un incremento de la concentración de especies reactivas de oxígeno en diversos tejidos, disminuye la capacidad de respiración mitocondrial, disminuye la producción de ATP y aumenta la oxidación de ácidos grasos (Short *et al* 2005).

## 2.6 Alteración en composición de membranas mitocondriales

En un estudio realizado en mitocondrias de placenta (Figueroa-García *et al* 2015) se encontró que el cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados (I/S), es mayor al cociente I/S derivado de la composición de ácidos grasos del tejido placentario total en ratas inducidas a diabetes. En ratas control (normoglicémicas), el cociente I/S del tejido y las mitocondrias era igual. De hecho, en las ratas diabéticas se encontró que mientras el cociente I/S del tejido disminuía, como cabría esperar con el desarrollo de la diabetes, en las mitocondrias de dicho tejido el cociente I/S aumentaba, contrario a lo que se esperaría tanto por el desarrollo de la diabetes como por el comportamiento de los ácidos grasos del tejido placentario. Las mediciones de la fluidez membranal mitocondrial con un monitor fluorescente fueron consistentes con el cociente I/S. Como resultado, hubo una disminución en el control respiratorio (CR) y un aumento en la lipoperoxidación de las mitocondrias de la placenta.

En otro trabajo realizado en mitocondrias de hígado de ratas jóvenes inducidas a diabetes desde recién nacidas (Pérez-Hernández *et al* 2017), también se encontró el mismo fenómeno, es decir que el cociente de ácidos grasos I/S disminuye en los lípidos totales del hígado de ratas inducidas a diabetes, pero aumenta en sus mitocondrias hepáticas. Adicionalmente se vio que el aumento en la fluidez membranal, medido con tres diferentes monitores de fluidez, así como indicado por el cociente I/S, llevó a un mayor CR, pero aún no hay aumento significativo en la lipoperoxidación membranal. Así, es claro que de alguna manera, la composición de ácidos grasos de esas mitocondrias, hepáticas y de placenta, no sólo no son iguales a las de sus respectivos tejidos de donde proceden, sino que además, su respuesta ante una condición patológica como es la diabetes, las llevó a tener una composición de ácidos grasos cuyo cociente I/S indica que su fluidez

membranal aumentó, y no disminuyó como está descrito para membranas plasmáticas en la diabetes (Pilon 2016).

Estos reportes indican que la diabetes mellitus tipo 2 es una condición estresante capaz de modificar esta velocidad de la fosforilación oxidativa y provocar un desacoplamiento de la mitocondria.

Finalmente en el trabajo realizado por Kamat y Roy en 2016 realizado con tejido hepático (además de otros tejidos) con ratas macho de 25g de peso aproximado y llevadas a un mes con la condición estresante de diabetes mellitus tipo 1 (DM1), muestran que las concentraciones de fosfolípidos en este tejido se ven alteradas al transcurso de un mes, también muestran que se modifica la composición de ácidos grasos donde se reduce la concentración de AGs insaturados en organismos inducidos a DM1, por lo tanto señalan que con esta condición estresante disminuye la fluidez de las membranas en tejido hepático.

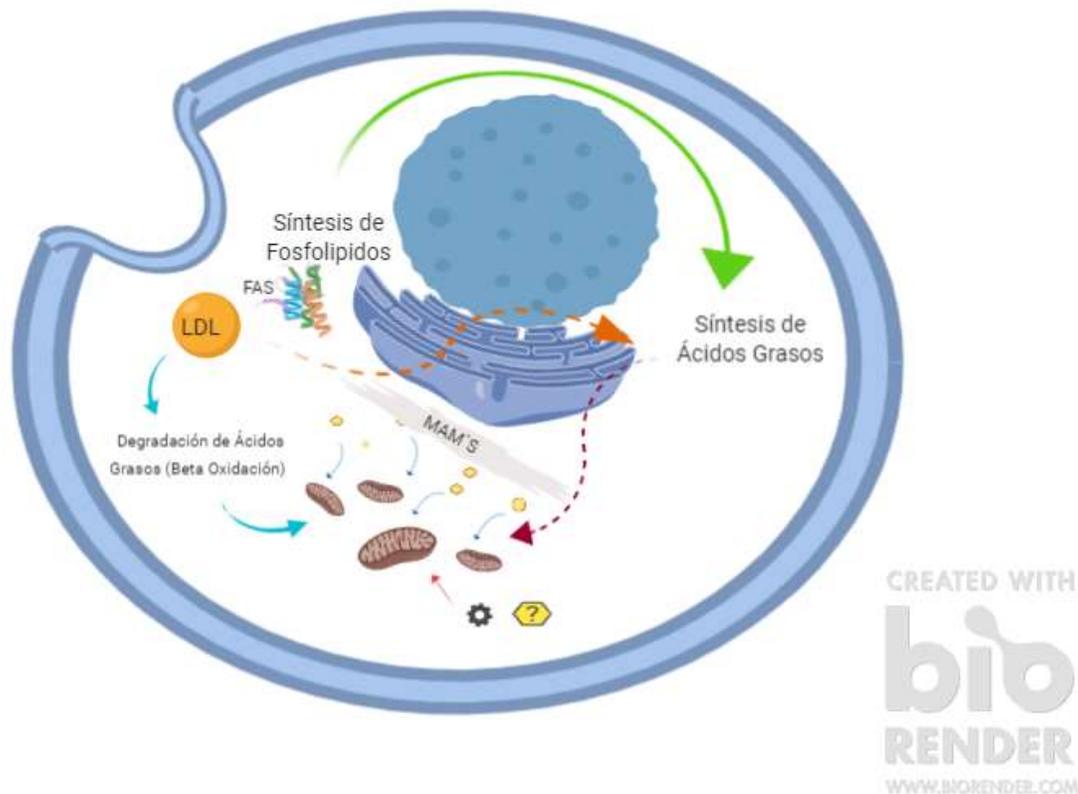


Figura 3. Síntesis y transporte de fosfolípidos por contacto con las MAM's y postulado de que no toda la regulación de ácidos grasos de membranas mitocondriales proviene de un mismo sitio (RE).

## **2.7 Justificación**

La mayor parte de la información existente sobre el origen de los fosfolípidos de las mitocondrias asume que los ácidos grasos al estar esterificados en los fosfolípidos, son parte inherente del transporte de fosfolípidos desde el RE hasta la mitocondria (Böttinger *et al.*, 2015, Kornmann *et al* 2009, Mejia y Hatch, 2015), pero que no tienen mecanismo de regulación alguno. De hecho, no se conoce que las mitocondrias tengan un mecanismo independiente de síntesis de ácidos grasos o de algún mecanismo de regulación de la composición de ácidos grasos de sus membranas.

## **2.8 Hipótesis**

Si la composición de ácidos grasos de las mitocondrias se encuentra bajo control del retículo endoplásmico, entonces la composición de dichos organelos tendría que ser similar. Sin embargo, si por alguna razón, como algún agente estresante, como la hiperglucemia ligera o severa, la composición de ambos organelos es significativamente diferente, entonces se podría pensar en un mecanismo por el cual se regularía la composición de ácidos grasos de la mitocondria.

### **3. Objetivo general**

-Investigar si la composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas, presenta cambios diferentes a los que ocurren en el retículo endoplásmico, durante el desarrollo de una condición estresante como la diabetes experimental tipo 1 (DE1).

#### **3.1 Objetivos particulares**

-Obtener mitocondrias y retículo endoplásmico de tejido hepático a diferentes tiempos del progreso de la diabetes

-Analizar la composición de ácidos grasos de RE, mitocondrias y tejido completo con el progreso de la DE1

-Analizar los ácidos grasos que son mayormente responsables de la fluidez de membrana como el ácido (ác) palmítico, esteárico, oleico (no esenciales), linoleico, araquidónico y DHA (esenciales) con el progreso de la DE1 en tejido total, microsomas y mitocondrias

-Analizar el control respiratorio con el progreso de la DE1

-Realizar pruebas de correlación entre la glucemia y el control respiratorio

### **4. Material y métodos**

Los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron grado reactivo y se adquirieron de J.T Baker, Merck y Sigma. Los solventes para la cromatografía de

gases fueron grado HPLC de la marca J.T Baker. La STZ, así como los estándares de metil ésteres, con una pureza mínima de 98%, se adquirieron de Sigma-Aldrich.

#### **4.1 Animales de experimentación**

Se obtuvieron 27 ratas Wistar con un mes de edad proporcionadas por el bioterio de la FES Iztacala y se mantuvieron bajo condiciones controladas (12h de luz, 12h de oscuridad, a 22 ° C), con agua y alimento *ad libitum*.

Los animales se pesaron cada siete días en una balanza electrónica, la glucosa en sangre también se midió cada siete días con un glucómetro digital de la marca AccuChek® tomando una gota de sangre de la cola de las ratas y colocándola sobre tiras reactivas para su lectura. Como tiempo cero (control "0"), se sacrificaron 3 organismos aproximadamente de dos meses de edad, con un peso de  $237 \pm 20$ g.

##### **4.1.1 Inducción a diabetes experimental tipo 1**

Las ratas fueron inducidas a diabetes experimental tipo 1, a partir de una edad aproximada de 2 meses por medio de una inyección intraperitoneal de STZ a 45mg/kg de peso disuelta en amortiguador de citrato, pH 4.5. y se les asigno el nombre a los grupos como tiempo 1 (una semana posterior a la inducción), tiempo 2 (dos semanas posteriores a la inducción), tiempo 3 (tres semanas posteriores a la inducción) y tiempo 4 (cuatro semanas posteriores a la inducción). Para el desarrollo de la hiperglucemia severa se aplicó una segunda inducción al tiempo 3 por medio de una inyección intraperitoneal de STZ a 65mg/kg de peso disuelta en amortiguador de citrato, pH 4.5.

Las glucemias normales fueron tomadas de los controles (ratas no inducidas) y estas no sobrepasaban los 120mg/dL; arriba de esta cifra los organismos se consideraron con diabetes experimental.

#### **4.1.2 Sacrificio de los organismos**

Los organismos se sacrificaron en grupos de 3 cada 7 días (control y diabéticas);, se anestesiaron por inyección intraperitoneal de pentobarbital (40mg/kg peso corporal) hasta la pérdida total de sensibilidad; posteriormente se realizó la exsanguinación, extrayendo la sangre del corazón con vacutainer, para sacrificar a los animales sin causar dolor. De cada organismo se obtuvo el hígado, se sometió a dos enjuagues con agua bidestilada y se homogeneizó en medio H (sacarosa 0.07 M, manitol 0.21 M, HEPES 20mM, albúmina bovina 2 mM, pH 7.4) con un homogeneizador de vidrio Potter Elvehjem para la obtención de organelos por centrifugaciones diferenciales como se describe adelante.

#### **4.3 Obtención de organelos**

Retículo endoplásmico y mitocondrias de hígado fueron obtenidos por centrifugaciones diferenciales, las cuales constan de una primera centrifugación a 700 Xg por 10 minutos. Se recupera el sobrenadante para continuar con la siguiente centrifugación a 6300 Xg por 10 min, el sobrenadante se recupera para llevarlo a una última centrifugación 120500 Xg por 90 minutos para la obtención de RE, por otra parte la pastilla resultante de la centrifugación a 6300 Xg se incubó con albúmina por 30 min para después someterla a una centrifugación final de 9000 Xg por 10 minutos para la obtención de las mitocondrias, a las muestras obtenidas se les agregó 30µl de hidroxitoluenobutilado(BHT) como antioxidante para mantenerlos en congelación.

#### **4.4 Cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de proteínas en mitocondrias se utilizó el método de Bradford (1976).

#### **4.5 Respiración mitocondrial**

Se midió la velocidad consumo de O<sub>2</sub> mitocondrial con un oxímetro de la marca YSI 5300 A, con un electrodo tipo Clark, con una cámara de incubación de 1.5 mL que contenía medio de respiración (Succinato 10mM, sacarosa 250 mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5mM, EGTA 1.1 mM, albúmina 0.1%) y cerrada con una tapa de vidrio esmerilada, a una temperatura de 37°C mantenida mediante un baño termostatizador de circulación y con agitación constante. A esta cámara de incubación con medio se le agregó la concentración de mitocondrias calculada previamente a 500 µg. Se registró el consumo de oxígeno y se calculó la velocidad basal de consumo de oxígeno (estado 4) y la velocidad de consumo de oxígeno o respiración activa, en presencia de exceso de substrato, en este caso ADP (estado 3), para obtener el índice de control respiratorio se dividió el estado 3/estado 4.

#### **4.6 Transesterificación de ácidos grasos**

La transesterificación de ácidos grasos se llevó a cabo por el método de Morrison y Smith (1964). Las fracciones celulares fueron colocadas en viales de 4 mL, se colocaron 50 µL de muestra y se agregó 1 mL de trifluoruro de boro al 14% en metanol, estos fueron sometidos a una atmósfera de nitrógeno y posteriormente se colocaron los viales en baño maría a ebullición durante 30 min. Al pasar este tiempo, se dejaron estabilizar a temperatura ambiente y se agregaron 2 mL de

hexano HPLC y 1 mL de agua bidestilada, la muestra se agitó fuertemente y se centrifugó por 5 minutos a 1000 rpm, se colectó la fracción hexánica, la cual contiene los metil ésteres. Finalmente la muestra fue evaporada con nitrógeno y se almacenó protegida de la luz a -20°C.

#### **4.7 Análisis de la composición de ácidos grasos**

Los metil ésteres de ácidos grasos fueron resuspendidos en 50 µL de hexano HPLC, se inyectaron por triplicado 2 µL de muestra en el cromatógrafo de gases. Se utilizó un cromatógrafo de gases Clarus 500 (Perkin Elmer) controlado por computadora, equipado con un detector de ionización de flama (FID), una columna capilar omegawax de Supelco de 30 m de largo y un diámetro interno de 0.25 mm. La flama se mantuvo encendida con una mezcla de hidrógeno y aire; como gas de arrastre se utilizó nitrógeno de alta pureza, con un flujo de 14 mL/min. El programa utilizado fue diseñado de la siguiente forma: inicio a 180° C por 5 min, con una rampa de 5° C/min hasta 240° C es mantenido durante 18 minutos, para un tiempo total de 35 min. La identidad de los ácidos grasos se obtuvo por comparación de los tiempos de retención de los metil ésteres estándar. Para la cuantificación de ácidos grasos se hizo una integración del área bajo la curva de cada uno de los picos detectados.

#### **4.8 Análisis estadístico**

Se realizó el análisis de las medidas de tendencia central: Promedio y de los datos obtenidos para observar su distribución. Para probar la normalidad de los datos se realizó la prueba Shapiro-Wilk. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías seguida de la prueba de Tukey con un intervalo de confianza de 0.95 ( $p < 0.05$ ) con el programa SigmaPlot 12.3 (2013) con una  $n=3$  por grupo experimental repetido por triplicado.

Se realizó la prueba de coeficiente de correlación entre la variable “control respiratorio” y “glucemia” para evaluar la cercanía entre estas variables.

## 5. Resultados

### 5.1 Concentración de glucosa en sangre (glucemia)

Se obtuvo el parámetro de glucemia para comprobar que la STZ tuvo efecto y así saber si existe la condición estresante esperada.

Las glucemias de los organismos inducidos no fueron tan elevadas como se esperaba, pero dado a que sobrepasaron los 120 mg/dL, se consideró que existía una condición estresante, esto se puede observar de manera más marcada en el tiempo uno y en el tiempo cuatro (**Figura 4**). En cada grupo existían organismos que presentaron glucemias un poco bajas pero no se eliminaron por haber presentado glucemias elevadas en tiempos anteriores.

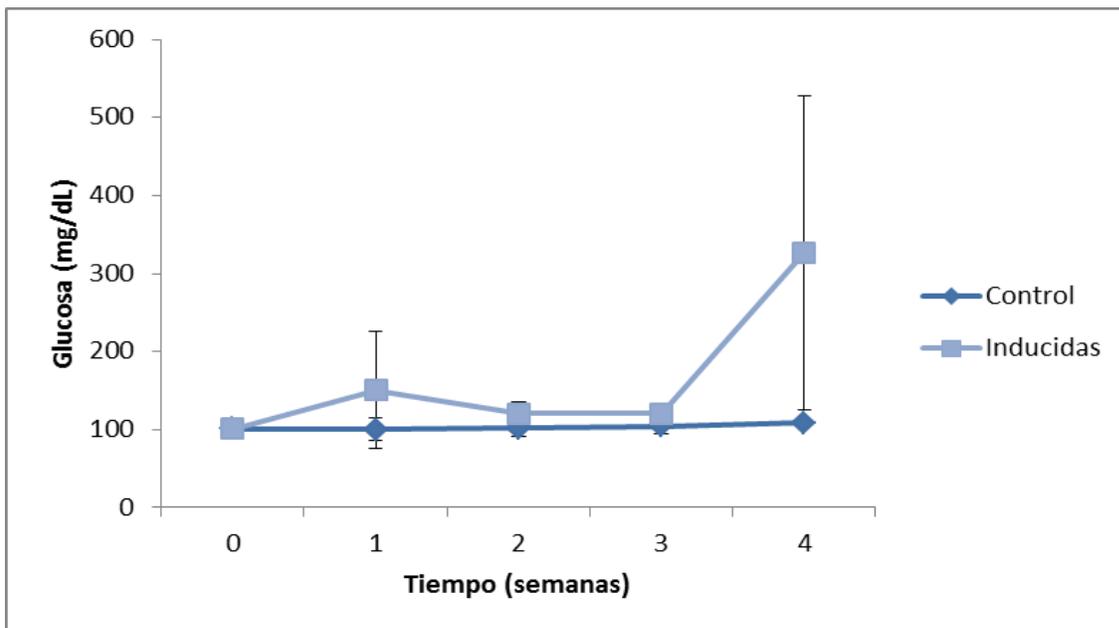


Figura 4. Concentración de glucosa sanguínea (mg/dL) de ratas Wistar, obtenidas a distintos tiempos.  $p < 0.05$   $n=3$ .

## 5.2 Peso de ratas Wistar control e inducidas a los 3 meses de edad aproximada.

Se obtuvo el peso de las ratas, para observar si la condición estresante DE1 tiene un efecto que modifique el metabolismo y por consecuencia el peso corporal.

No se encontraron diferencias significativas con respecto al peso de ratas control comparados con ratas inducidas, aunque en el último tiempo se logra apreciar una pérdida de peso o nula ganancia de este, sin embargo por la desviación de los datos no se consideran como diferentes estadísticamente.

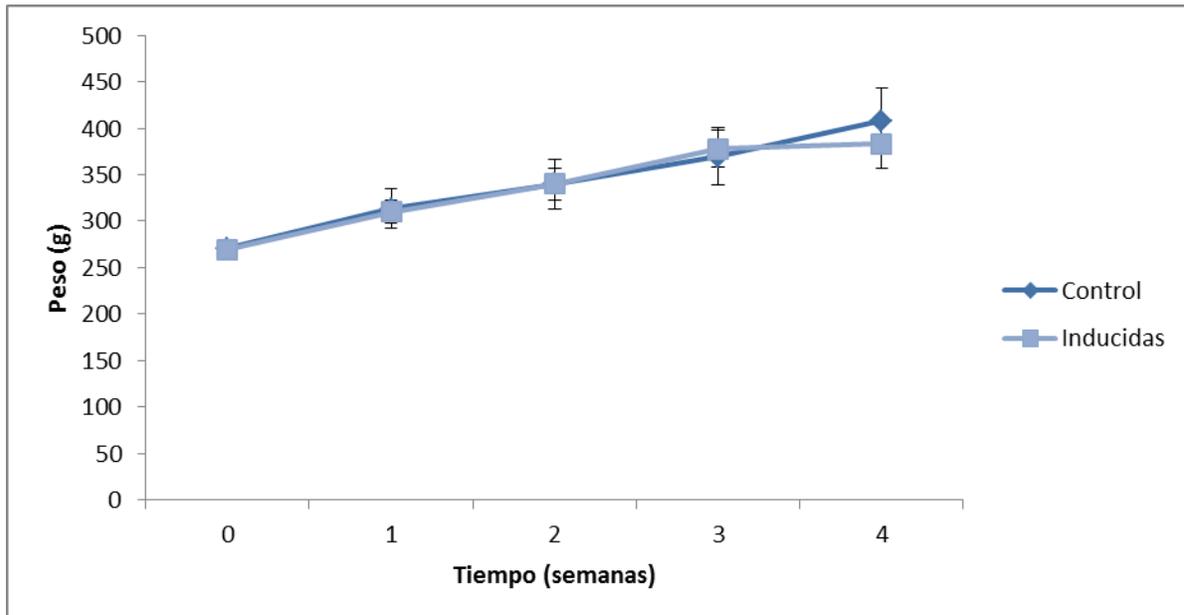


Figura 5. Ganancia de peso de ratas control y diabéticas hasta el momento del sacrificio por semanas a partir de la semana de inducción (semana 3).  $p < 0.05$   $n=3$ .

## 5.3 Control Respiratorio

El índice de control respiratorio se obtuvo con el fin de conocer el estado en el que se encuentran las mitocondrias, esto se logró al medir el consumo de oxígeno en el estado 4 (E4) basal y el estado 3 (E3) de activación al agregar un sustrato en

este caso ADP, con esto se sabe si una mitocondria está acoplada o desacoplada. Al tiempo uno el CR en ratas control aumenta mientras que en ratas inducidas este disminuye. En el tiempo 4 tanto ratas control como inducidas muestran una disminución de este índice, pero siendo mayor esta disminución estadísticamente significativa en ratas inducidas. En los tiempos 2 y 3 este índice no muestra diferencias, todo esto comparando ratas control con inducidas ya que comparando ratas control con el paso del tiempo y ratas inducidas con el mismo parametro, no existe diferencia estadística significativa, aunque claramente en ratas inducidas se muestra una disminución del CR (**Fig. 6**).

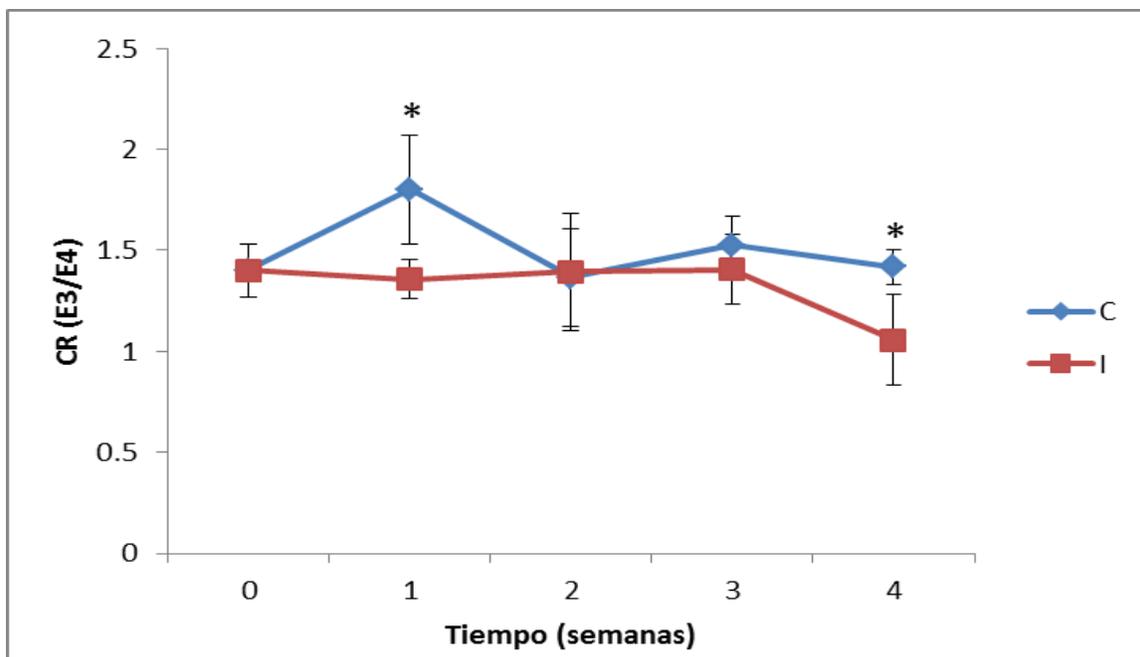


Figura 6. Comparación del control respiratorio de ratas control e inducidas, durante 4 semanas. Tiempo 1 y 4 \*  $p < 0.05$ , tiempo 0 2 y 3  $p > 0.05$ .  $n = 3$ .

#### 5.4 Correlación control respiratorio – glucemia

Durante los cuatro tiempos en los que se obtuvo registro de esto dos parámetros, CR y glucemia en organismos control se muestra una correlación positiva (Fig. 7). De manera contraria en organismos inducidos la correlación de estos dos

parámetros fue negativa indicando así que existe relación entre una glucemia elevada y la pérdida de control respiratorio (Fig. 8)

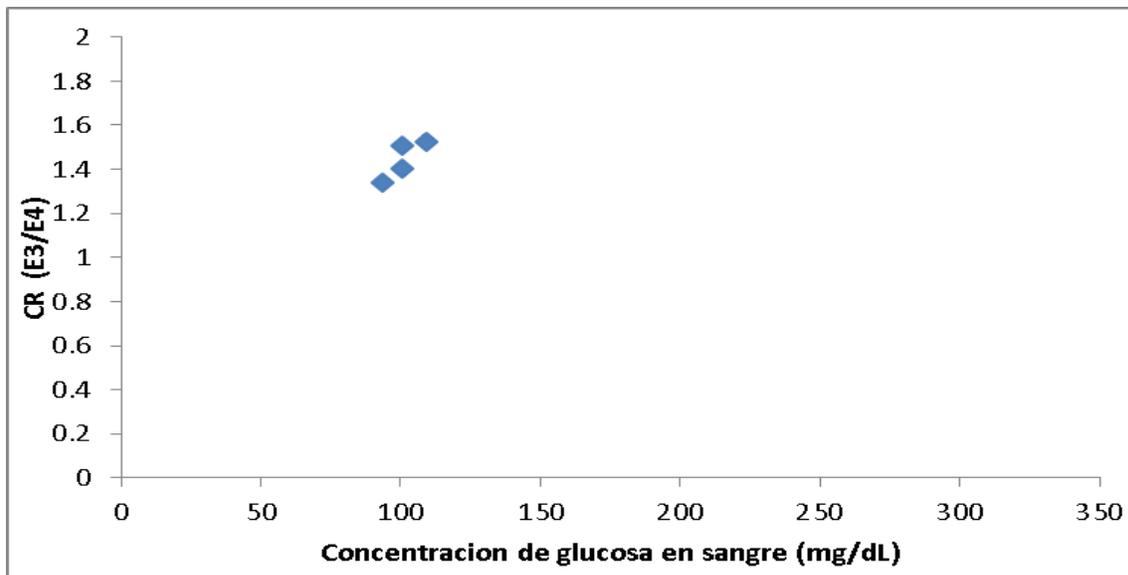


Figura 7. Correlación positiva (0.84) entre control respiratorio (E3/E4) y la concentración de glucosa en sangre (mg/dL), de ratas control.

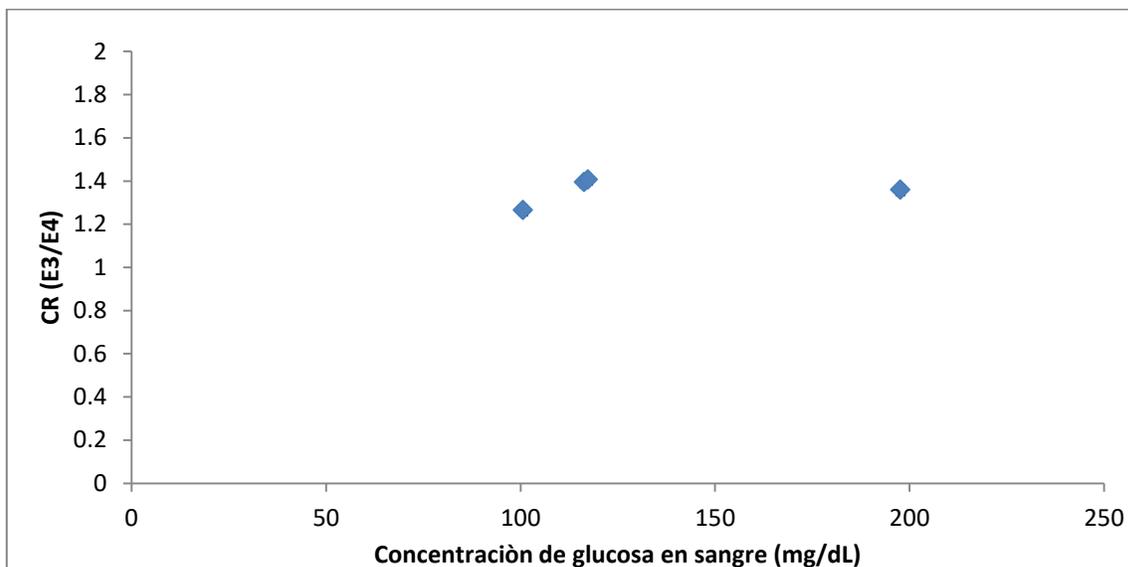


Figura 8. Correlación negativa (-0.96) entre control respiratorio (E3/E4) y la concentración de glucosa en sangre (mg/dL), de ratas inducidas.

## 5.5 Composición de ácidos grasos de tejido hepático, microsomas y mitocondrias de ratas Wistar

Se analizó la composición de ácidos grasos de tres fracciones de hígado para observar posibles cambios entre tejido total hepático y fracciones subcelulares provenientes de este tejido en específico microsomas y mitocondrias, a la vez detectar posibles cambios entre la misma fracción pero de organismos no inducidos y organismos inducidos, todo esto a diferentes tiempos 0, 1, 2, 3 y 4.

El tiempo cero es un indicador de cómo se encuentran las membranas de tejido, microsomas y mitocondrias al comienzo del experimento para poder dilucidar los cambios que pudieran existir. Los organismos son completamente normales y sin ningún tipo de modificación. En la **tabla 1**, se observa que en los microsomas y las mitocondrias se encuentran en menor proporción los ácidos grasos mirístico y palmitoleico, con respecto al tejido, pero de manera contraria el ácido esteárico se encuentra aumentado en ambas fracciones, con respecto al tejido. El cociente I/S no muestra diferencia significativa entre las fracciones pero muestra mayor semejanza entre tejido y mitocondrias.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos (mol %) de tres fracciones de tejido hepático (Tejido, microsomas y mitocondrias) de ratas Wistar normoglicémicas a 2 meses de edad.

Tiempo 0			
Ácido graso	Tejido	Microsomas	Mitocondrias
Cáprico	0.34 ±0.50	ND	ND
Láurico	0.01 ±0.01	ND	ND
Mirístico	0.57 ±0.20	0.29 ±0.02 *	0.37 ±0.19 *
Miristoleico	0.06 ±0.09	0.01 ±0.01	ND
Pentadecanoico	2.10 ±2.52	0.44 ±0.19	0.43 ±0.11
Palmitico	21.22 ±2.33	22.14 ±2.52	20.15 ±1.46
Palmitoleico	1.92 ±1.01	1.03 ±0.42 *	0.75 ±0.50 *
Margárico	0.75 ±0.32	0.74 ±0.13	0.78 ±0.11
Esteárico	8.79 ±2.33	14.09 ±2.63 *	13.71 ±3.54 *
Oleico	11.45 ±3.51	11.58 ±6.05	9.95 ±4.41
Linoleico	18.73 ±2.01	16.49 ±3.41	18.21 ±3.19
Gamma linolénicc	ND	0.07 ±0.07	ND
CLA3	0.18 ±0.27	ND	ND
Araquídico	ND	ND	0.28 ±0.56
Araquidónico	19.65 ±1.86	21.51 ±6.70	22.41 ±4.52
EPA	0.48 ±0.60	0.32 ±0.46	1.12 ±0.43
Behénico	0.61 ±0.91	ND ND	0.18 ±0.27
DHA	8.41 ±2.08	9.03 ±1.67	9.62 ±1.53
Lignocérico	0.76 ±0.54	0.36 ±0.10	0.56 ±0.19
NI	3.97 ±3.62	1.88 ±0.41	1.57 ±0.32
I/S	1.75 ±0.23	1.58 ±0.14	1.74 ±0.33

CLA, ácido linoleico conjugado; EPA ácido eicosapentaenoico; DHA ácido docosahexaenoico; ND, no detectado; NI, no identificado; I/S, índice de fluidez (ácidos grasos insaturados sobre saturados). \*p< 0.05 diferencia significativa respecto al tejido, n=3.

## 5.5.1 Composición de ácidos grasos tiempo 1

Las diferencias estadísticamente significativas encontradas al tiempo uno se encuentran señaladas en la tabla 2.

### 5.5.1.1 Diferencias de tejido, microsomas y mitocondrias entre organismos control y organismos inducidos

Se muestra que el porcentaje de ácido graso (AG) mirístico tiende a incrementar en organismos inducidos con respecto a organismos control, incluso en mitocondrias aumenta casi al doble esta concentración, lo que señala que este ácido graso incrementa su concentración en caso de existir una condición estresante, aunque esta sea ligera.

El porcentaje de ácido palmítico aumenta 50% en microsomas de ratas inducidas con respecto al control y se mantiene sin cambios en tejido y mitocondrias.

Los AGs esteárico y oleico muestran un comportamiento similar ya que ambos disminuyen hasta 37% solo en microsomas y el ácido linoleico solo disminuye en mitocondrias, lo anterior ocurre en organismos inducidos con respecto a su control.

El porcentaje de ácido araquidónico aumenta de 21.33 a 29.16 (mol %) en microsomas y por el contrario la concentración de DHA disminuye 24% en microsomas de ratas inducidas comparadas con el control.

El cociente I/S disminuye de 2.24 a 1.67 (mol %) sólo en mitocondrias de ratas inducidas con respecto a su control, esto sugiere una disminución en la fluidez de las membranas mitocondriales por el aumento en la concentración de ácidos grasos saturados y la disminución del porcentaje de insaturados.

#### **5.5.2.2 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas control**

La concentración de AG palmítico se encuentra disminuida hasta en un 21% en microsomas y mitocondrias con respecto al tejido, el AG palmitoleico no muestra diferencias pero se encuentra a mayor concentración en microsomas lo cual se explicaría por qué el ácido palmítico que es su precursor disminuyó su concentración en esta fracción subcelular.

El porcentaje del ácido esteárico se muestra heterogéneo ya que incrementa en microsomas pero disminuye hasta un 43% en mitocondrias con respecto a la fracción microsomal, lo cual contribuye a la disminución y aumento de fluidez de los microsomas y mitocondrias control respectivamente.

La concentración de ácido linoleico se ve modificada en microsomas en donde disminuye 24% con respecto al tejido y disminuye 29% con respecto a las mitocondrias, esto quizá se deba a su carácter de precursor del ácido

araquidónico ya que tejido y mitocondrias muestran una proporción similar de estos AGs y por el contrario en microsomas se muestra incrementada la concentración de ácido araquidónico con respecto a su precursor.

El índice de fluidez se ve aumentado en mitocondrias 25% con respecto al tejido y hasta un 61% con respecto a los microsomas, esto muestra que aún en organismos control es diferente la composición de microsomas comparadas con mitocondrias.

### **5.5.2.3 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas inducidas**

La concentración del AG palmítico se encuentra disminuida 24 % en mitocondrias con respecto a los microsomas y la proporción del ácido palmitoleico incrementa en estas mitocondrias (palmítico-palmitoleico). Lo cual es razonable debido a que el ácido palmítico es precursor de ácido palmitoleico.

La concentración de ácido esteárico es 68% mayor en mitocondrias con respecto al tejido, por otra parte la concentración del ácido linoleico se encuentra disminuida hasta un 28% en microsomas con respecto a tejido y a las mitocondrias, esto concuerda con la concentración de ácido araquidónico en microsomas ya que presenta un aumento de la mitad del valor con respecto al tejido, esto es un ejemplo de las modificaciones que tienen los ácidos grasos precursores.

El cociente I/S bajo la condición estresante muestra diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias, este índice en mitocondrias se encuentra aumentado un 18% con respecto a microsomas pero disminuye un 14% con respecto a tejido, esto refleja que con una condición estresante son más los cambios que se presentan entre tejido, microsomas y mitocondrias.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos (mol%) de tres fracciones de tejido hepático (Tejido, microsomas y mitocondrias) de ratas Wistar a dos meses y una semana de edad.

Ácido graso	Tiempo 1					
	Tejido		Microsomas		Mitocondrias	
	Control	Inducidas	Control	Inducidas	Control	Inducidas
Cáprico	0.01 ±0.01	0.04 ±0.06	0.48 ±0.76	0.12 ±0.14	ND	0.24 ±0.26
Mirístico	0.26 ±0.07	0.36 ±0.07 Ω	0.18 ±0.12	0.31 ±0.03 Ω	0.18 ±0.02	0.34 ±0.17 Ω
Pentadecanoico	0.25 ±0.07	0.28 ±0.03	0.15 ±0.09 *	0.26 ±0.03 Ω	0.20 ±0.02	0.65 ±0.52 **Ω
Palmitico	21.79 ±1.85	22.30 ±2.38	17.52 ±2.56 *	25.20 ±2.75 Ω	17.25 ±1.71 *	19.22 ±4.17 °*
Palmitoleico	0.49 ±0.25	1.02 ±0.73	0.62 ±0.36	0.49 ±0.56	0.49 ±0.31	0.54 ±0.45
Margárico	0.61 ±0.08	0.51 ±0.05 Ω	0.53 ±0.24	0.68 ±0.06	0.53 ±0.07	0.46 ±0.27 °*
Estearico	12.13 ±4.49	9.91 ±2.41	21.49 ±1.63 **	13.59 ±4.29 Ω	12.34 ±4.05 °*	15.89 ±3.93 *
Oleico	12.17 ±3.96	11.66 ±4.14	10.73 ±0.96	6.92 ±3.69 Ω	11.82 ±2.97	9.45 ±5.36
Linoleico	21.69 ±3.44	21.43 ±2.80	16.44 ±3.17 *	15.49 ±2.32 **	23.31 ±1.38 °*	19.31 ±3.34 °*Ω
Gamma linolénico	ND	0.20 ±0.15	0.09 ±0.12	0.03 ±0.05	ND	0.04 ±0.05
Araquídico	ND	ND	0.46 ±1.28	ND	ND	ND
Araquidónico	20.44 ±4.04	24.35 ±2.19 Ω	21.33 ±2.49	29.16 ±3.04 * Ω	23.60 ±4.54	25.49 ±3.13
EPA	0.35 ±0.57	ND	0.68 ±0.55	ND	0.13 ±0.37	ND
DHA	7.43 ±0.62	6.37 ±1.17 Ω	7.22 ±1.14	5.48 ±0.88 Ω	8.00 ±1.67	6.87 ±1.94
Lignocérico	0.34 ±0.12	0.20 ±0.04 Ω	0.51 ±0.71	0.84 ±0.55 **	0.55 ±0.23	0.23 ±0.13 °*Ω
NI	2.05 ±0.31	1.38 ±0.26	1.60 ±0.39	1.45 ±0.42	1.61 ±0.51	1.30 ±0.41
I/S	1.79 ±0.23	1.95 ±0.18	1.39 ±0.11	1.42 ±0.17 **	2.24 ±0.52 **	1.67 ±0.07 **Ω

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

Ω p < 0.05 Diferencia entre Control- Inducidas, \* p < 0.05 Diferencia con tejido, \*\* p < 0.05 Diferencia con las dos fracciones, °\* p < 0.05 Diferencia de mito con micro. n=3.

### **5.5.3 Composición de ácidos grasos tiempo 2**

La tabla 3 muestra las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre organismos control y organismos inducidos, las cuales se señalan a continuación.

#### **5.5.3.1 Diferencias de tejido, microsomas y mitocondrias entre organismos control y organismos inducidos**

Al tiempo dos podemos observar que el porcentaje de AG mirístico aumento más de la mitad de su concentración inicial en tejido, en microsomas aumenta un 71% y finalmente en mitocondrias aumenta el doble, esto indica que ante una condición estresante este AG aumenta de manera posiblemente regulada ya que el organismo es capaz de sintetizarlo.

La concentración de ácido esteárico disminuyó 29% en tejido, el ácido linoleico incrementa 39% en tejido y 37% en microsomas.

El porcentaje de los AGs Araquidónico y DHA muestra una tendencia a disminuir en mitocondrias ya que se mostró una pérdida de hasta el 52% de estos AGs, esto se podría explicar por la pérdida de eficiencia que sufren las desaturasas y elongasas durante la diabetes.

El índice de fluidez sólo muestra diferencia significativa para las mitocondrias de ratas inducidas comparadas con su control ya que disminuye 16%, esto las hace diferentes a microsomas que tienden a incrementar su fluidez.

#### **5.5.3.2 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas control**

Como se muestra en la tabla 3 la concentración del AG mirístico está disminuida en mitocondrias con respecto al tejido en un 52%, el porcentaje de AG esteárico se encuentra disminuido en mitocondrias con respecto a los microsomas en un 31%. Lo anterior indica que posiblemente el control de

ácidos grasos no esenciales en la mitocondria puede ser diferente al tejido y al retículo.

El porcentaje de AG araquidónico aumento 31% en microsomas y 26% en mitocondrias ambos con respecto al tejido, el DHA aumenta una cuarta parte en mitocondrias con respecto al tejido, también muestra un aumento del 13% con respecto a los microsomas aunque esto no fue significativo, esto indica una tendencia de regular de alguna manera la fluidez mitocondrial (tabla3).

### **5.5.3.3 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas inducidas**

En la tabla 3 se observa que el porcentaje de AG linoleico se redujo en mitocondrias hasta en un 20% con respecto a tejido y a microsomas. Los cambios mínimos reflejan un posible estado de aclimatación entre tejido y las fracciones celulares (microsomas y mitocondrias).

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (mol%) de tres fracciones de tejido hepático (Tejido, microsomas y mitocondrias) de ratas Wistar a dos meses y dos semanas de edad.

Ácido graso	Tiempo 2					
	Tejido		Microsomas		Mitocondrias	
	Control	Inducidas	Control	Inducidas	Control	Inducidas
Caprílico	ND	0.03 ±0.71	ND	ND	ND	0.61 ±1.65
Cáprico	ND	0.60 ±1.62	0.64 ±1.03	0.30 ±0.47	0.15 ±0.22	1.23 ±4.74
Láurico	ND	ND	ND	0.05 ±0.05	ND	ND
Mirístico	0.31 ±0.05	0.51 ±0.10 Ω	0.21 ±0.03	0.36 ±0.09 Ω	0.15 ±0.11 *	0.31 ±0.21 Ω
Miristoleico	ND	0.01 ±0.01	ND	0.04 ±0.05	ND	ND
Pentadecanoico	0.25 ±0.03	0.43 ±0.08 Ω	0.23 ±0.01	0.34 ±0.04 Ω	0.18 ±0.13	0.64 ±0.32 Ω
Palmítico	26.19 ±4.63	24.44 ±2.39	21.67 ±1.88 *	23.31 ±3.08	22.64 ±2.06	22.99 ±6.25
Palmitoleico	0.93 ±0.48	1.16 ±0.49	0.84 ±0.45	1.27 ±0.40	0.52 ±0.28	0.37 ±0.40 **
Margárico	0.72 ±0.10	0.69 ±0.04	0.70 ±0.04	0.67 ±0.09	0.78 ±0.03 °*	0.75 ±0.37
Esteárico	14.07 ±3.92	10.05 ±2.21 Ω	14.96 ±4.71	11.46 ±1.36	10.39 ±2.95 °*	13.24 ±5.68
Oleico	9.69 ±4.50	10.58 ±4.04	6.30 ±4.23	7.97 ±2.26	6.77 ±3.06	9.35 ±4.14
Linoleico	17.60 ±5.37	24.53 ±2.04 Ω	17.52 ±2.07	23.93 ±2.44 Ω	20.77 ±2.19	19.60 ±2.48 **
Gamma linol	0.10 ±0.13	0.04 ±0.10	0.08 ±0.06	0.16 ±0.24	ND	ND
CLA2	ND	ND	ND	ND	ND	0.20 ±0.53
Araquidónico	20.72 ±2.56	20.61 ±3.66	26.96 ±2.44 *	22.99 ±5.56	26.12 ±2.037 *	22.28 ±6.03 Ω
EPA	0.33 ±0.61	ND	0.13 ±0.38	ND	0.09 ±0.28	0.45 ±2.14
Behénico	ND	0.06 ±0.11	ND	ND	ND	ND
Erúxico	ND	0.15 ±0.21	ND	ND	ND	ND
DHA	7.18 ±1.01	4.41 ±1.08 Ω	7.93 ±0.89	5.34 ±1.27 Ω	9.01 ±1.06 *	4.73 ±1.72 Ω
Lignocérico	0.21 ±0.04	0.15 ±0.09	0.22 ±0.07	0.18 ±0.05	0.47 ±0.22 **	0.22 ±0.17 Ω
NI	1.72 ±0.20	1.36 ±0.44	1.62 ±0.28	1.64 ±0.55	1.95 ±0.47	3.02 ±6.28
I/S	1.41 ±0.39	1.63 ±0.26	1.57 ±0.23	1.71 ±0.25	1.80 ±0.16	1.33 ±0.37 Ω

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

Ω p< 0.05 Diferencia entre Control- Inducidas, \* p< 0.05 Diferencia con tejido, \*\* p< 0.05 Diferencia con las dos fracciones, °\* p< 0.05 Diferencia de mito con micro, n=3.

### **5.5.4 Composición de ácidos grasos tiempo 3**

La tabla 4 muestra la composición de ácidos grasos al tiempo 3 y las diferencias estadísticamente significativas encontradas.

#### **5.5.4.1 Diferencias de tejido, microsomas y mitocondrias entre organismos control y organismos inducidos**

El porcentaje del ácido graso mirístico aumenta más del doble en mitocondrias de ratas inducidas en comparación con su control, la concentración de AG esteárico se encuentra incrementada 14% en microsomas y de manera contraria en mitocondrias esta concentración se reduce en un 38% lo cual muestra que puede existir una forma distinta de regulación de membranas en retículo y mitocondrias.

El porcentaje de AG linoleico aumenta en microsomas en un 30% en ratas inducidas, mientras que en mitocondrias de ratas inducidas aumenta más del doble, el ácido araquidónico disminuye en microsomas aunque no fue estadísticamente significativo, pero concuerda con el carácter de precursor del AG linoleico, de manera contraria en mitocondrias el AG araquidónico incrementa un 86%, esto es un indicador de que la regulación de ácidos grasos en mitocondrias no parece estar regulada por retículo. El porcentaje de DHA incrementa casi al doble (92%) en mitocondrias de ratas inducidas.

El índice de fluidez aumenta un 28 % en mitocondrias de ratas inducidas, esto causado por el aumento de AG insaturados en comparación con tejido y microsomas, esto es otro indicador de que las mitocondrias no se encuentran totalmente bajo la regulación de retículo bajo una condición estresante.

#### **5.5.4.2 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas control**

La concentración del AG mirístico en mitocondrias se encuentra disminuida hasta un 61% con respecto al tejido y a los microsomas. El ácido palmítico en

mitocondrias se encuentra hasta un 20 % menos que en tejido y microsomas, la concentración del ácido esteárico en mitocondrias aumenta hasta en un 50% con respecto a tejido y microsomas, lo cual indica que aún en condiciones normales las mitocondrias son distintas a tejido y a los microsomas.

La concentración de AG linoleico se ve disminuida en microsomas en un 32% y en mitocondrias en un 53% ambos con respecto al tejido, el porcentaje de AG araquidónico se incrementa en microsomas 43% con respecto al tejido, por otra parte la concentración de este AG en mitocondrias disminuye un 53% con respecto a los microsomas, por último la concentración de DHA se encuentra disminuida en mitocondrias hasta en un 56% con respecto al tejido y a los microsomas, lo anterior apoya que aun en condiciones normales las membranas mitocondriales no se regulan solamente por retículo.

#### **5.5.4.3 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas inducidas**

El porcentaje de AG mirístico se encuentra disminuido de 0.30 a 0.23 (mol %) lo cual representa un cuarto del valor total que disminuye en microsomas con respecto al tejido, de manera contraria la concentración de ácido esteárico aumenta 57% y 40% en microsomas comparados con tejido y mitocondrias respectivamente.

El porcentaje de ácido linoleico se reduce en microsomas un 18% y 16% comparado con tejido y mitocondrias respectivamente.

El cociente I/S disminuye hasta un 19% en microsomas comparados con tejido y mitocondrias. Esto muestra que, aunque no existe gran cantidad de cambios la composición de las membranas es diferente y no precisamente regulada sólo por retículo.

Tabla 4. Composición de ácidos grasos (mol%) de tres fracciones de tejido hepático (Tejido, microsomas y mitocondrias) de ratas Wistar a dos meses y tres semanas de edad.

Ácido graso	Tiempo 3					
	Tejido		Microsomas		Mitocondrias	
	Control	Inducidas	Control	Inducidas	Control	Inducidas
Caprílico	ND	ND	ND	ND	ND	0.11 ±0.30
Cáprico	ND	0.46 ±0.82	ND	0.28 ±0.22	ND	0.49 ±0.51
Mirístico	0.28 ±0.03	0.30 ±0.07	0.22 ±0.01 **	0.23 ±0.04 *	0.11 ±0.06 **	0.27 ±0.02 Ω
Pentadecano	0.23 ±0.05	0.36 ±0.04 Ω	0.58 ±0.39 **	0.25 ±0.04 **Ω	0.10 ±0.06 °*	0.35 ±0.06 °*Ω
Palmitico	19.75 ±1.45	19.19 ±1.53	18.70 ±2.00	17.77 ±1.68	15.99 ±0.76 **	17.25 ±1.76
Palmitoleico	1.21 ±0.52	0.86 ±0.47	0.92 ±0.76	0.62 ±0.25	24.30 ±21.96 **	0.71 ±0.57 Ω
Margárico	0.46 ±0.03	0.48 ±0.06	0.55 ±0.04 **	0.52 ±0.04	0.37 ±0.08 **	0.53 ±0.06 Ω
Estearico	12.59 ±2.97	10.53 ±2.25	14.45 ±1.18	16.54 ±2.35 **Ω	18.92 ±3.25 **	11.79 ±2.75 °*Ω
Oleico	12.56 ±4.02	11.22 ±4.66	10.12 ±4.14	8.79 ±5.97	8.02 ±4.39	9.09 ±5.37
Linoleico	22.36 ±2.50	24.05 ±4.39	15.11 ±2.93 *	19.68 ±2.41 **Ω	10.46 ±6.95 *	23.51 ±1.57 °*Ω
Gamma linol	0.51 ±0.22	0.35 ±0.53	0.05 ±0.05	0.06 ±0.05	0.07 ±0.15	0.04 ±0.06
Linolenico	ND	ND	ND	ND	ND	0.02 ±0.06
Araquídico	ND	ND	ND	ND	1.01 ±1.17	ND
CLA3	ND	ND	ND	ND	1.07 ±1.41	ND
Eicosanoico	ND	ND	ND	ND	1.17 ±1.27	0.02 ±0.05
Araquidónico	20.54 ±3.56	22.32 ±4.00	29.41 ±1.86 **	26.33 ±4.37	13.89 ±7.23 **	25.89 ±3.90 Ω
EPA	0.09 ±0.28	0.76 ±0.49	ND	0.08 ±0.16	ND	0.56 ±0.51
Behénico	ND	0.02 ±0.07	ND	ND	ND	0.00 ±0.01
DHA	7.53 ±1.50	6.90 ±1.15	8.31 ±1.10	6.86 ±1.63	3.68 ±1.99 **	7.10 ±2.01 Ω
Lignocérico	0.16 ±0.03	0.26 ±0.07 Ω	0.09 ±0.07	0.20 ±0.03 Ω	0.10 ±0.13	0.28 ±0.09
NI	1.84 ±0.42	1.91 ±0.36	1.51 ±0.34	1.79 ±0.64	0.77 ±0.86	2.06 ±0.56
I/S	1.94 ±0.20	2.12 ±0.23	1.85 ±0.14	1.75 ±0.15 **	1.70 ±0.20	2.17 ±0.21 °*Ω

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

Ω p < 0.05 Diferencia entre Control- Inducidas, \* p < 0.05 Diferencia con tejido, \*\* p < 0.05 Diferencia con las dos fracciones, °\* p < 0.05 Diferencia de mito con micro, n=3.

### **5.5.5 Composición de ácidos grasos tiempo 4**

La tabla 5 muestra la composición de ácidos grasos al tiempo 4 y las diferencias estadísticamente significativas encontradas.

#### **5.5.5.1 Diferencias de tejido, microsomas y mitocondrias entre organismos control y organismos inducidos**

El porcentaje de AG esteárico disminuyó 50% en mitocondrias de ratas inducidas, esto indica que bajo una condición estresante incluso la concentración de los ácidos grasos no esenciales se ve modificada y es diferente en mitocondrias.

El porcentaje de AG oleico disminuye un 50% en microsomas mientras que disminuye un 53% en mitocondrias, la concentración de AG araquidónico disminuye un 37% en microsomas, el porcentaje de DHA muestra una tendencia a incrementar ya que el tejido aumentó casi al doble (93%), en microsomas 157% y en mitocondrias 117%.

El cociente I/S se ve disminuido un 25% en microsomas de ratas inducidas, en mitocondrias este índice aparenta estar incrementado, se puede observar que existe una forma diferente en la que se regulan esas fracciones con respecto a una condición estresante.

#### **5.5.5.2 Diferencias entre tejido, microsomas y mitocondrias de ratas control**

La proporción del AG mirístico se encuentra disminuido en microsomas un 46% y en mitocondrias un 43%, el porcentaje de AG palmítico se comporta de manera similar ya que microsomas y mitocondrias muestran una diferencia a la baja del 12% con respecto al tejido, en cuanto al AG esteárico ambos organelos tienden a aumentar el porcentaje de este con respecto al tejido,

microsomias en un 32% y mitocondrias en un 36%, esto podría indicar que posiblemente con el paso del tiempo el retículo se encarga de regular la composición de ácidos grasos de membranas mitocondriales.

Para el caso de los ácidos grasos esenciales la situación parece ser la misma ya que la concentración de AG oleico se reduce 34% y en mitocondrias un 32%, de igual manera el porcentaje de AG linoleico desciende un 24% en microsomias y un 20% en mitocondrias, lo anterior señalado es con respecto al tejido.

El caso del AG araquidónico este aumenta en microsomias y en mitocondrias con respecto al tejido, sin embargo la presencia de este es 20 % mayor en microsomias con respecto a las mitocondrias. Esto apoya lo dicho anteriormente ya que se ve claramente una mayor influencia del retículo sobre las mitocondrias en respuesta al paso del tiempo.

El índice de fluidez es 15 % menor en mitocondrias con respecto al tejido y no muestra diferencias con los microsomias, apoyando así lo dicho anteriormente, parece que existe mayor influencia del RE.

#### **5.5.4.3 Diferencias entre tejido, microsomias y mitocondrias de ratas inducidas**

Los ácidos grasos no esenciales parecen no verse afectados por la condición estresante sin embargo se observa que el AG oleico disminuye hasta un 65% en microsomias y mitocondrias con respecto al tejido, para el caso de los ácidos grasos esenciales el porcentaje de AG araquidónico aumenta 29% en mitocondrias con respecto al tejido, lo anterior concuerda con lo propuesto sobre que al pasar del tiempo la composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales podría estar mayormente influenciada por retículo.

El cociente I/S muestra un aumento en la fluidez de las mitocondrias del 61% con respecto a los microsomias, esto muestra que aunque parece existir cierta influencia del retículo sobre las mitocondrias bajo una condición estresante existe aún otro mecanismo de regulación para mitocondrias.

Tabla 5. Composición de ácidos grasos (mol%) de tres fracciones de tejido hepático (Tejido, microsomas y mitocondrias) de ratas Wistar a tres meses de edad.

Ácido graso	Tiempo 4					
	Tejido		Microsomas		Mitocondrias	
	Control	Inducidas	Control	Inducidas	Control	Inducidas
Cáprico	ND ND	0.14 ±0.25	ND	0.10 ±0.08	ND	0.62 ±0.71
Mirístico	0.33 ±0.10	0.27 ±0.06	0.18 ±0.03 *	0.25 ±0.07	0.19 ±0.06 *	0.14 ±0.16
Pentadecanoico	0.21 ±0.07	0.23 ±0.06	0.22 ±0.02	0.27 ±0.07	0.37 ±0.30	0.29 ±0.01
Palmitico	18.82 ±1.12	21.71 ±3.09	16.50 ±1.48 *	23.52 ±2.93 Ω	16.65 ±0.91 *	21.32 ±0.75 Ω
Palmitoleico	1.49 ±0.89	0.88 ±0.46	0.91 ±0.55	0.39 ±0.53	0.57 ±0.25	0.43 ±0.60
Margárico	0.40 ±0.04	0.51 ±0.10 Ω	0.47 ±0.04	0.69 ±0.13 Ω	0.40 ±0.06	0.62 ±0.16 Ω
Esteárico	14.17 ±2.05	13.46 ±4.06	18.74 ±0.84 *	18.57 ±4.52	19.28 ±1.72 *	9.67 ±5.55 Ω
Oleico	14.71 ±1.65	13.27 ±5.30	9.38 ±0.69 *	4.72 ±0.96 * Ω	10.05 ±2.37 *	4.68 ±0.66 * Ω
Linoleico	21.66 ±1.75	20.17 ±2.61	15.98 ±1.73 *	18.91 ±3.13	17.43 ±2.83 *	23.22 ±5.48
Gamma linolénico	ND	ND	0.05 ±0.01	ND	0.20 ±0.22	ND
Araquídico	0.08 ±0.03	ND	0.02 ±0.04	ND	ND	ND
CLA3	ND	ND	ND	ND	0.12 ±0.19	ND
Araquidónico	19.05 ±2.27	19.19 ±2.28	28.88 ±2.53 **	18.14 ±7.59 Ω	23.08 ±1.83 **	24.71 ±1.11 *
EPA	0.94 ±0.50	ND	1.51 ±2.41	ND	0.56 ±0.77	ND
DHA	5.29 ±0.22	10.20 ±1.12 Ω	4.80 ±2.37	12.32 ±2.09 Ω	5.60 ±0.91	12.16 ±1.02 Ω
Lignocérico	0.09 ±0.01	0.04 ±0.05	0.09 ±0.05	0.17 ±0.01 Ω	0.11 ±0.10	0.24 ±0.22
NI	2.82 ±0.57	1.62 ±0.50	2.27 ±0.23	1.98 ±0.46	5.18 ±4.14	1.90 ±0.53
I/S	1.85 ±0.09	1.71 ±0.13	1.70 ±0.08	1.27 ±0.26 Ω	1.57 ±0.17*	2.05 ±0.51 <sup>0*</sup>

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

Ω p< 0.05 Diferencia entre Control- Inducidas, \* p< 0.05 Diferencia con tejido, \*\* p< 0.05 Diferencia con las dos fracciones, <sup>0\*</sup> p< 0.05 Diferencia de mito con micro, n=3.

## 5.6 Análisis de ácidos grasos individuales por tiempo

Los ácidos grasos se analizaron de manera individual por tiempos para dilucidar de manera más clara el posible efecto de la condición estresante y también porque son mayormente responsables de la fluidez de membrana como el ác. palmítico, esteárico, oleico (no esenciales), linoleico, araquidónico y DHA (esenciales), esto en tejido total, microsomas y mitocondrias.

### 5.6.1.1 Porcentaje de ácido palmítico en tejido de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 6 se muestra el porcentaje de AG palmítico en tejido hepático obtenido a 5 tiempos distintos, podemos observar que en organismos control al tiempo 2 existe un aumento en la concentración de este AG del 20%, sin embargo al tiempo 3 este porcentaje decae un 24% con respecto al tiempo 2 y al parecer se estabiliza en el tiempo, esto ejemplificaría un comportamiento normal que se ve afectado por la edad.

Para el caso de los organismos que fueron inducidos se muestra que el porcentaje de este AG se reduce un 21% al tiempo 3 en comparación del tiempo 2, esto parece ser provocado de nuevo por la edad ya que parece que la condición estresante no tiene efectos sobre este AG.

Tabla 6. Porcentaje de ácido graso palmítico (mol %) a 5 tiempos en tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Palmítico	Tejido	
	Control	Inducidas
T 0	21.2 ±2.3	21.2 ±2.3
T 1	21.8 ±1.9	22.3 ±2.4
T 2	26.2 ±4.3 **	24.4 ±2.4
T 3	19.8 ±1.5 °°*	19.2 ±1.5 °*
T 4	18.8 ±1.1 °°*	22.2 ±0.3

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, °\*p<0.05 diferencia con el tiempo 1, °°\*p<0.05 diferencia con el tiempo 2, °°°\*p<0.05 diferencia con el tiempo 3, °°°°\*p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.1.2 Porcentaje de ácido palmítico en microsomas de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 7 se muestra el porcentaje de AG palmítico en microsomas obtenidos a 5 tiempos distintos, podemos observar que en organismos control la concentración disminuye con el paso del tiempo y al tiempo 4 se encuentra un 25% menor al tiempo 0, esto muestra que en condiciones normales la tendencia de este ácido graso es a descender su concentración en microsomas.

En microsomas de organismos inducidos se muestra algo diferente ya que al tiempo 3, este AG palmítico se encuentra disminuido hasta un 30% con respecto a los tiempos 0,1 y 2, esto ocurre bajo una condición estresante ligera y es algo parecido a lo que ocurre en organismos control, pero al hacer más agresiva esa condición estresante esta concentración aumenta un 30%, por lo que parece que el retículo es más susceptible a cambios derivados por una condición estresante severa.

Tabla 7. Porcentaje de ácido graso palmítico (mol %) a 5 tiempos en microsomas de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Palmítico	Microsomas	
	Control	Inducidas
T 0	22.1 ±2.5	22.1 ±2.5
T 1	17.4 ±2.4 *	25.2 ±2.7
T 2	21.7 ±1.9 °*	23.3 ±3.1
T 3	18.7 ±2.0 *	17.8 ±1.7 ****
T 4	16.5 ±1.5 *°*	23.2 ±3.3 °°°*

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, °\*p<0.05 diferencia con el tiempo 1, °°\*p<0.05 diferencia con el tiempo 2, °°°\*p<0.05 diferencia con el tiempo 3, °°°°\*p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.1.3 Porcentaje de ácido palmítico en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 8 podemos observar que en organismos control al tiempo 1 la concentración del AG palmítico disminuyó 15% con respecto al tiempo 0, al tiempo 2 aumentó hasta 31% con respecto al tiempo 0 y 1, al tiempo 3 y 4 disminuye hasta un 27% con respecto al tiempo 0 y 2, esto indica que la tendencia de este AG en mitocondrias es a disminuir, el incremento que sucede en el tiempo 2 podría estar explicado por la edad del animal.

Para el caso de las mitocondrias de organismos inducidos podemos observar que en el tiempo 2 existe un incremento en el porcentaje de este AG palmítico de hasta un 20% con respecto al tiempo 0 y 1, al tiempo 3 disminuye lo que es muy parecido a las ratas control, esto bajo una hiperglucemia moderada, pero al tiempo 4 bajo una hiperglucemia severa parece cambiar de tendencia aumentando la concentración.

Tabla 8. Porcentaje de ácido graso palmítico (mol %) a 5 tiempos en mitocondrias de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Palmítico	Mitocondrias	
	Control	Inducidas
T 0	20.2 ±1.4	20.2 ±1.4
T 1	17.2 ±1.7 *	19.2 ±4.2
T 2	22.6 ±2.0 **	23.0 ±6.3 **
T 3	16.6 ±1.6 * <sup>o</sup> *	17.2 ±1.8 <sup>oo</sup> *
T 4	16.6 ±0.9 * <sup>oo</sup> *	21.3 ±0.8

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>o</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>oo</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>ooo</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>oooo</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.2.1 Porcentaje de ácido esteárico en tejido de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 9 se muestra el porcentaje de AG esteárico en tejido hepático, podemos observar que en organismos control a los tiempos 2 y 4 incrementa

61% con respecto al tiempo 0, por lo que podemos dilucidar que la tendencia de este AG es a incrementar su concentración en tejido

Mientras que en organismos inducidos incrementa esta concentración de ácido esteárico al tiempo 4 en un 62% con respecto al tiempo 0, de nuevo parece que en el tejido lo que está afectando es el tiempo más que la condición estresante.

Tabla 9. Porcentaje de ácido graso esteárico (mol %) a 5 tiempos en tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Esteárico	Tejido	
	Control	Inducidas
T 0	8.8 ±2.3	8.8 ±2.3
T 1	12.1 ±4.4	9.9 ±2.4
T 2	14.2 ±3.7 *	10.0 ±2.2
T 3	12.6 ±3.0	10.5 ±2.3
T 4	14.2 ±2.0 *	14.3 ±4.2 *

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, \*p<0.05 diferencia con el tiempo 1, \*\*p<0.05 diferencia con el tiempo 2, \*\*\*p<0.05 diferencia con el tiempo 3, \*\*\*\*p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.2.2 Porcentaje de ácido esteárico en microsomas de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 10 podemos observar el porcentaje de AG esteárico en microsomas, en organismos control al tiempo 1 aumenta un 50%, casi la mitad con respecto al tiempo 0, al tiempo 2 y tres disminuye hasta un 31% con respecto al tiempo 1 y finalmente al tiempo 4 aumenta 33% comparado con el tiempo 1, estos cambios son más marcados en microsomas y parecen ser más heterogéneos por la edad, esto podría explicarse por los cambios hormonales que ocurren en los organismos a partir de los dos meses y parece ser que los microsomas son más sensibles que el tejido a estos cambios.

En organismos inducidos se incrementa esta concentración de ácido esteárico al tiempo 3 en un 43% con respecto al tiempo 2, al tiempo 4 incrementa 67%

con respecto al tiempo 2, esto parece indicar que la condición estresante está modificando el porcentaje de este AG en el mismo sentido que lo hace el tiempo y por eso el aumento se nota una tendencia marcada.

Tabla 10. Porcentaje de ácido graso esteárico (mol %) a 5 tiempos en microsomas de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

<b>Microsomas</b>		
<b>% Esteárico</b>	<b>Control</b>	<b>Inducidas</b>
<b>T 0</b>	14.1 ±2.6	14.1 ±2.6
<b>T 1</b>	21.0 ±2.1 *	13.6 ±4.3
<b>T 2</b>	15.0 ±4.7 °*	11.5 ±1.4
<b>T 3</b>	14.4 ±1.2 °*	16.5 ±2.4 °°*
<b>T 4</b>	18.7 ±0.8 *	19.2 ±3.6 °°*

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, °\*p<0.05 diferencia con el tiempo 1, °°\*p<0.05 diferencia con el tiempo 2, °°°\*p<0.05 diferencia con el tiempo 3, °°°°\*p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.2.3 Porcentaje de ácido esteárico en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 11 se muestra el porcentaje de AG esteárico en mitocondrias, podemos observar que en organismos control a los tiempos 3 y 4 incrementa casi al doble (87%) con respecto a los tiempos 0,1 y 2, esto indica que la tendencia de este AG en mitocondrias es a incrementar el porcentaje en condiciones normales.

En mitocondrias de organismos inducidos no se presentan diferencias estadísticas significativas, pero muestra un comportamiento distinto ya que se mantiene la concentración, lo que marca una clara diferencia entre tejido, microsomas y mitocondrias bajo una condición estresante.

Tabla 11. Porcentaje de ácido graso esteárico (mol %) a 5 tiempos en mitocondrias de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Esteárico	Mitocondrias	
	Control	Inducidas
T 0	13.7 ±3.5	13.7 ±3.5
T 1	12.3 ±4.1	15.9 ±3.9
T 2	10.4 ±3.0	13.2 ±5.7
T 3	19.5 ±3.3 <sup>o**</sup>	11.8 ±2.8
T 4	19.3 ±1.7 <sup>***</sup>	11.3 ±5.0

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>o</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>oo</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>ooo</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>oooo</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.3.1 Porcentaje de ácido linoleico en tejido de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 12 se muestra el porcentaje de AG linoleico en tejido hepático, en organismos control al tiempo 3 este AG aumenta 22% con respecto al tiempo 2, el comportamiento en condiciones normales de este AG en tejido indica que se tiene una tendencia a elevar y mantener esta concentración.

En tejido de organismos inducidos vemos algo similar ya que al tiempo 2 y 3 aumenta el porcentaje de este AG 31% y al tiempo 4 no disminuye lo que concuerda con que al paso del tiempo aumenta la concentración y se mantiene, por lo que parece que la condición estresante tiene poca influencia sobre este comportamiento en tejido.

Tabla 12. Porcentaje de ácido graso linoleico (mol %) a 5 tiempos en tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Linoleico	Tejido	
	Control	Inducidas
T 0	18.7 ±2.0	18.7 ±2.0
T 1	21.7 ±3.4	21.4 ±2.8
T 2	18.4 ±5.5	24.5 ±2.0 *
T 3	22.4 ±2.5 <sup>oo*</sup>	24.1 ±4.4 *
T 4	21.7 ±1.8	20.2 ±2.6

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>o\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>oo\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>ooo\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>oooo\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.3.2 Porcentaje de ácido linoleico en microsomas de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 13 se muestra el porcentaje de AG linoleico en microsomas obtenidos a 5 tiempos distintos, podemos observar que en organismos control no hay diferencias estadísticas significativas, lo cual indica que el tiempo no parece tener un efecto directo sobre el porcentaje de este AG.

Por el contrario, en microsomas de organismos inducidos al tiempo 2 la concentración de este AG linoleico incrementa 50% con respecto a los tiempos 0 y 1, al tiempo 3 disminuye un 18% con respecto al tiempo 2 y finalmente al tiempo 4 se muestra disminuido un 21% con respecto al tiempo 2, en este AG esencial podemos observar un comportamiento diferente que se puede atribuir a la condición estresante.

Tabla 13. Porcentaje de ácido graso linoleico (mol %) a 5 tiempos en microsomas de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Linoleico	Microsomas	
	Control	Inducidas
T 0	16.5 ±3.4	16.5 ±3.4
T 1	16.3 ±3.0	15.5 ±2.3
T 2	17.5 ±2.1	23.9 ±2.4 **
T 3	15.1 ±2.9	19.7 ±2.4 <sup>o**</sup>
T 4	16.0 ±1.7	18.9 ±3.1 <sup>oo*</sup>

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>o</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>oo</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>ooo</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>oooo</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.3.3 Porcentaje de ácido linoleico en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 14 podemos observar el porcentaje de AG linoleico en mitocondrias, en organismos control al tiempo 3 se muestra disminuido hasta un 50% respecto a los tiempos 0,1,2 y 4, finalmente al tiempo 4 la concentración de este AG incrementa un 28% con respecto al tiempo 3, esto muestra una tendencia de regular este AG con el tiempo.

Por el otra parte las mitocondrias de organismos inducidos nuevamente reaccionan de manera diferente ya que muestra un aparente control del porcentaje de AG linoleico, hasta el tiempo 3 en donde aumenta un 29%, contrario a los que pasa con microsomas, pareciera que la condición estresante es un disparador para que las mitocondrias sean casi contrarias a retículo.

Tabla 14. Porcentaje de ácido graso linoleico (mol %) a 5 tiempos en mitocondrias de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Linoleico	Mitocondrias	
	Control	Inducidas
T 0	18.2 ±3.2	18.2 ±3.2
T 1	23.3 ±1.4 *	19.3 ±3.3
T 2	20.8 ±2.2	19.6 ±2.5
T 3	13.6 ±6.4 ****	23.5 ±1.6 *
T 4	17.4 ±2.8 <sup>o*o*</sup>	18.9 ±3.1

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>o\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>oo\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>ooo\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>oooo\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

#### 5.6.4.1 Porcentaje de ácido araquidónico en tejido de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 15 se muestra el porcentaje de AG araquidónico en tejido hepático, se observa que en organismos control, no se muestran diferencias, lo que indica que este AG se mantiene estable al paso del tiempo. De manera contraria en tejido hepático de ratas inducidas al tiempo 1 aumenta el porcentaje de este AG un 23% lo que parece ser influencia directa de la primera inducción, finalmente al tiempo 4 se encuentra una concentración disminuida en 21% con respecto al tiempo 1, lo anterior muestra la influencia de la condición estresante en el porcentaje de este ácido graso, ya que se observa un desbalance con respecto al control.

Tabla 15. Porcentaje de ácido graso araquidónico (mol %) a 5 tiempos en tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Araquidónico	Tejido	
	Control	Inducidas
T 0	19.7 ±1.9	19.7 ±1.8
T 1	20.4 ±4.0	24.3 ±2.2 *
T 2	19.1 ±5.4	20.6 ±3.7 <sup>0*</sup>
T 3	20.5 ±3.5	22.3 ±4.0
T 4	19.0 ±2.3	19.2 ±2.3 <sup>0*</sup>

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>0\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>00\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>0000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

#### 5.6.4.2 Porcentaje de ácido araquidónico en microsomas de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 16 podemos observar el porcentaje de AG araquidónico que en organismos control tiende a incrementar ya que al tiempo 2 incrementa hasta un 27% y al tiempo 4 se muestra aumentado hasta un 38% por encima con respecto al tiempo 0 y 1, esto muestra una clara tendencia de los microsomas de aumentar esta concentración con el paso del tiempo.

En organismos inducidos a una hiperglucemia ligera, parece que existe el mismo comportamiento que en los controles ya que al tiempo 1 esta concentración aumenta un 36% con respecto al tiempo 0, pero al tiempo 4 bajo una condición estresante severa, la concentración de este AG araquidónico disminuye un 38%, lo que modifica de manera contraria este sentido de cambio en condiciones normales.

Tabla 16. Porcentaje de ácido graso araquidónico (mol %) a 5 tiempos en microsomas de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Araquidónico	Microsomas	
	Control	Inducidas
T 0	21.5 ±6.7	21.5 ±6.7
T 1	21.3 ±2.5	29.2 ±3.0 *
T 2	27.0 ±2.4 **	23.0 ±5.5
T 3	29.4 ±1.9 **	26.3 ±4.4
T 4	28.9 ±2.5 **	18.1 ±7.6 <sup>0*</sup>

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>o</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>oo</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>ooo</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>oooo</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.4.3 Porcentaje de ácido araquidónico en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 17 se muestra el porcentaje de AG araquidónico en mitocondrias, en organismos control al tiempo 3 se muestra una disminución de este porcentaje hasta en un 47%, posteriormente al tiempo 4 esta concentración muestra un aumento de 66% con respecto al tiempo 3, lo cual indica que al paso del tiempo se modifica a la baja este AG, esto puede ser un efecto de la edad reproductiva en la que se encuentran los organismos.

Las mitocondrias de organismos inducidos no muestran cambios esto puede ser debido a las necesidades reacciones metabólicas que ocurren en la mitocondria, como la  $\beta$  oxidación para producción de energía, de nuevo esto es ajeno a lo que ocurre en retículo.

Tabla 17. Porcentaje de ácido graso araquidónico (mol %) a 5 tiempos en mitocondrias de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% Araquidónico	Mitocondrias	
	Control	Inducidas
T 0	22.4 $\pm$ 4.5	22.4 $\pm$ 4.5
T 1	23.6 $\pm$ 4.5	25.5 $\pm$ 3.1
T 2	26.1 $\pm$ 2.0	22.3 $\pm$ 6.0
T 3	13.9 $\pm$ 7.2 <sup>o**</sup>	25.9 $\pm$ 3.9
T 4	23.1 $\pm$ 1.8 <sup>ooo*</sup>	24.7 $\pm$ 1.1

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>o</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>oo</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>ooo</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>oooo</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.5.1 Porcentaje de DHA en tejido de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 18 se muestra el porcentaje de DHA en tejido, se observa que en organismos control al tiempo 4 este porcentaje disminuye a la mitad con respecto a los tiempos 0,1 y 3, esto indica una tendencia a disminuir este AG con el paso del tiempo, en tejido bajo condiciones normales.

En tejido de organismos inducidos sucede lo contrario ya que en los tiempos 1 y 2 la concentración el DHA disminuye a la mitad y al tiempo 4 aumenta hasta un 59% con respecto a los tiempos 1,2, y 3, esto muestra que bajo una hiperglucemia ligera se aceleran los efectos que tiene el tiempo sobre el tejido ya que el tiempo 2 a la inducción se asemeja al tiempo 4 del tejido control, por otra parte muestra que una hiperglucemia severa modificará de manera contraria la tendencia provocada por el tiempo.

Tabla 18. Porcentaje de DHA (mol %) a 5 tiempos en tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% DHA	Tejido	
	Control	Inducidas
T 0	8.4 ±2.1	8.4 ±2.1
T 1	7.4 ±0.6	6.4 ±1.2 *
T 2	7.4 ±1.1	4.4 ±1.1 **
T 3	7.5 ±1.5	6.9 ±1.2 <sup>00*</sup>
T 4	5.3 ±0.2 <sup>**0*</sup>	10.2 ±1.1 <sup>0***</sup>

DHA, ácido docosahexaenoico. \*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>0\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>00\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>0000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

#### 5.6.5.2 Porcentaje de DHA en microsomas de ratas control y de ratas inducidas

El porcentaje de DHA en microsomas cambio en organismos control al tiempo 4, ya que se muestra un decremento en la concentración de este AG de hasta un 47% con respecto al tiempo 0, 1, 2, y 3, lo que señala que en microsomas en condiciones normales este AG tiende a reducir su concentración siendo comparable con el tejido (Tabla 19). De manera similar bajo una hiperglucemia ligera tiende a disminuir la concentración de DHA hasta un 41% en los tiempos 1,2 y 3, sin embargo bajo una hiperglucemia severa en el tiempo 4 se incrementa esta concentración a más del doble con respecto al tiempo 0,1 ,2 y

3, lo cual indica que la condición estresante severa es capaz de modificar a la inversa el control que tiene el retículo sobre este AG.

Tabla 19. Porcentaje de DHA (mol %) a 5 tiempos en microsomas de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

% DHA	Microsomas	
	Control	Inducidas
T 0	9.0 ±1.6	9.0 ±1.7
T 1	7.4 ±1.2	5.3 ±1.3 *
T 2	7.9 ±0.9	5.3 ±1.1 *
T 3	8.3 ±1.1	6.9 ±1.6 *
T 4	4.8 ±2.4 ****	12.3 ±2.1 ****

DHA, ácido docosahexaenoico. \*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>o</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>oo</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>ooo</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>oooo</sup>\*p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.6.5.3 Porcentaje de DHA en mitocondrias de ratas control y de ratas inducidas

En la tabla 20 se muestra el porcentaje de DHA en mitocondrias, podemos observar que en organismos control al tiempo 4 se muestra una disminución de la concentración de este AG de hasta un 42% con respecto a los tiempos 0, 1 y 2, esto indica que bajo condiciones normales la tendencia de este AG en mitocondrias es a reducir su porcentaje. De manera similar bajo una hiperglucemia ligera tiende a disminuir la concentración de este AG hasta un 51% en los tiempos 1, 2 y 3, sin embargo bajo una hiperglucemia severa en el tiempo 4 la respuesta es incrementar esta concentración a más del doble lo que conduce a pensar que bajo una condición estresante la influencia del retículo sobre la composición de membranas es mayor en ácidos grasos esenciales.

Tabla 20. Porcentaje de DHA (mol %) obtenido en 5 tiempos en mitocondrias de tejido hepático de ratas control y de ratas inducidas.

<b>Mitocondrias</b>		
<b>% DHA</b>	<b>Control</b>	<b>Inducidas</b>
<b>T 0</b>	9.6 ±1.5	9.6 ±1.5
<b>T 1</b>	8.0 ±1.7	6.9 ±1.9 *
<b>T 2</b>	9.0 ±1.1	4.7 ±1.7 *
<b>T 3</b>	3.7 ±2.0 ***	7.1 ±2.0 *0*
<b>T 4</b>	5.6 ±0.9 ***	12.2 ±1.0 0***

DHA, ácido docosahexaenoico. \*p<0.05 diferencia con el tiempo 0 , 0\*p<0.05 diferencia con el tiempo 1, 00\*p<0.05 diferencia con el tiempo 2, 000\*p<0.05 diferencia con el tiempo 3, 0000\*p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.7 Relación I/S

Este cociente se obtuvo para tener una aproximación de la fluidez de las membranas que se analizaron (tejido, microsomas y mitocondrias) esto al realizar el cálculo de la proporción de ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados, se comparó entre organismos control y organismos inducidos, entre organismos control al paso del tiempo, entre organismos inducidos al paso del tiempo y entre tejido, microsomas y mitocondrias, esto para tener un panorama más amplio sobre los posibles cambios que llegaran a presentar con respecto al paso de tiempo y a la condición estresante.

En la figura 9 se observa el comportamiento de este cociente en tejido el cual indica que la relación I/S de sus membranas mantiene un comportamiento similar entre organismos inducidos y controles.

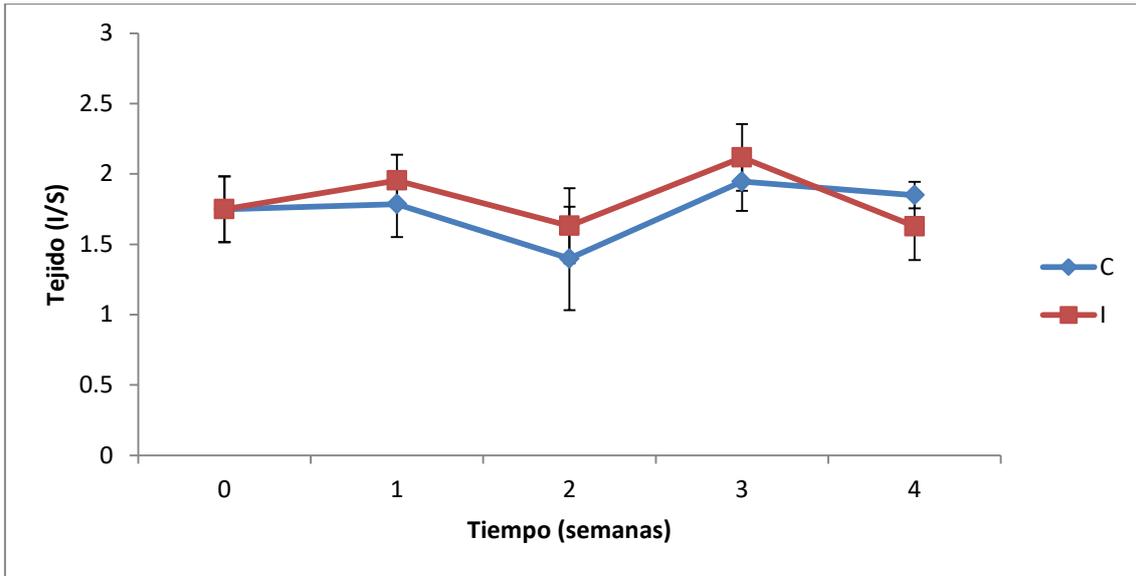


Figura 9. Comparación del índice de fluidez en tejido hepático de ratas control e inducidas, durante 5 semanas.  $p > 0.05$ .  $n=3$ .

En la figura 10 se observa el comportamiento de este índice en microsomas, el cual no muestra diferencias con respecto a la condición estresante hasta que esta se considera como severa y en ella disminuye significativamente.

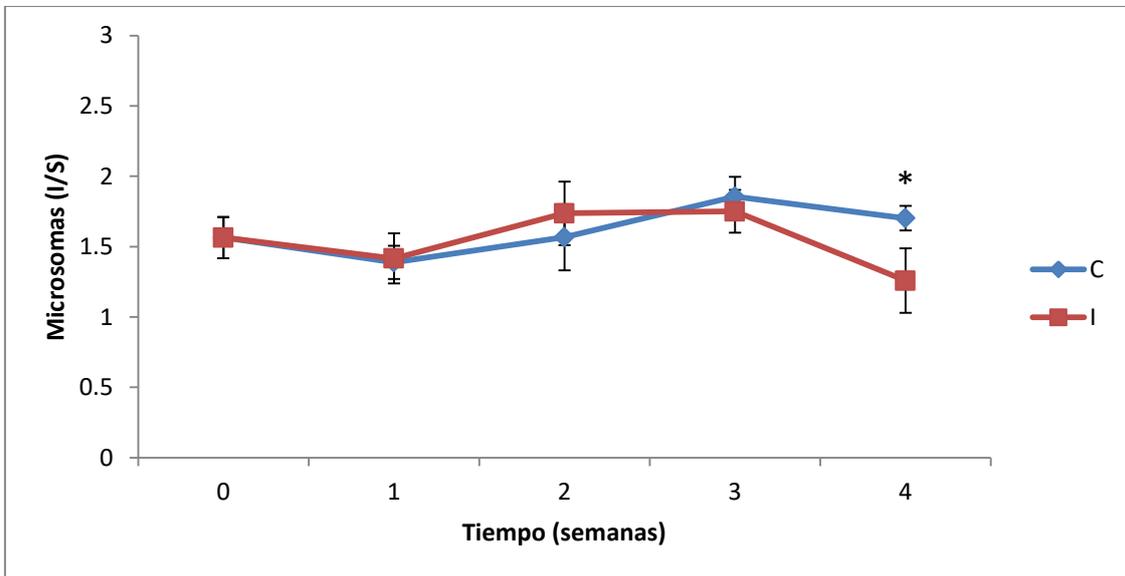


Figura 10. Comparación del índice de fluidez en microsomas de ratas control e inducidas, durante 5 semanas. Tiempo 4 \*  $p < 0.05$ , tiempo 0, 1, 2 y 3  $p > 0.05$   $n=3$ .

En la figura 11 se observa el comportamiento de este índice en mitocondrias, el cual cambia completamente de sentido con la condición estresante, esto indica

que la condición estresante actúa en la fluidez de estas y por lo tanto las mitocondrias son más sensibles a dicha condición estresante en comparación de tejido y microsomas, lo que nos llevaría a inferir que existe un mecanismo alterno con el que las mitocondrias regulan la composición de ácidos grasos de sus membranas bajo condiciones estresante.

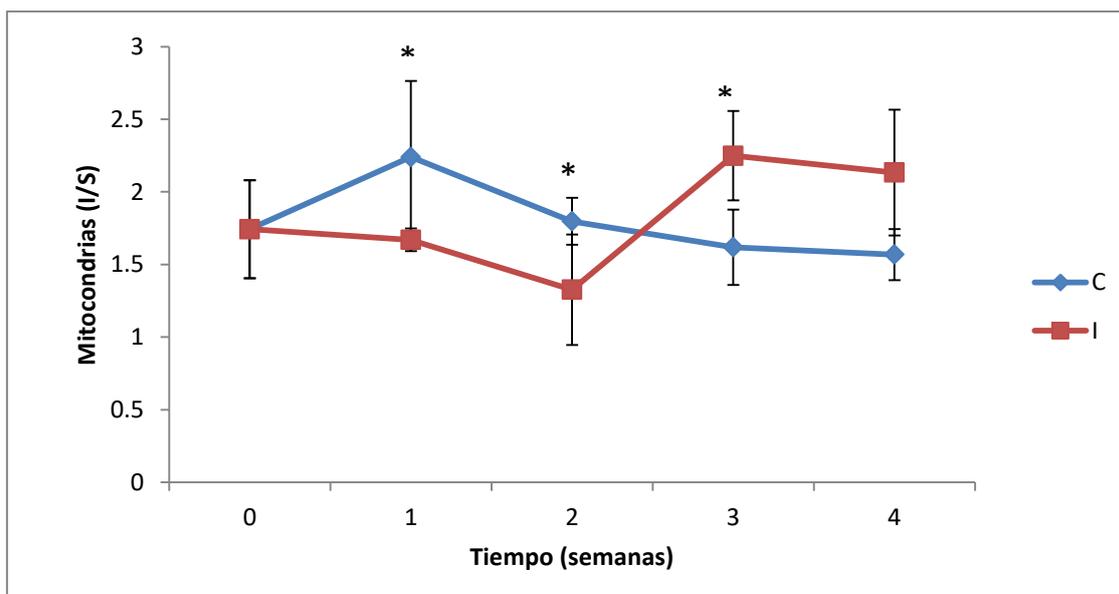


Figura 11. Comparación del índice de fluidez en mitocondrias de ratas control e inducidas, durante 5 semanas. Tiempo 1, 2 y 3 \*  $p < 0.05$ , tiempo 0 y 4  $p > 0.05$   $n = 3$ .

### 5.7.1 Relación I/S por tiempos en tejido, microsomas y mitocondrias

En la tabla 21 se muestra el cociente I/S de tejido de ratas control y tejido de ratas inducidas obtenidos en 5 tiempos distintos.

En organismos control, al tiempo 3 esta relación I/S muestra una disminución del 22% con respecto al tiempo 1, posteriormente al tiempo 3 y 4 aumenta hasta un 36% con respecto al tiempo 2, esto muestra que bajo condiciones normales este índice en tejido se mantiene en un rango con el paso del tiempo.

En organismos inducidos de nuevo se muestra una disminución al tiempo 2 de un 20% con respecto al tiempo 1 y al tiempo 3 aumenta un 31% con respecto al tiempo 2, sin embargo al tiempo 4 bajo una condición estresante severa este

índice disminuye 24% con respecto al tiempo 3. Lo anterior indica que es necesaria una condición estresante severa para modificar este índice en tejido.

Tabla 21. Cociente I/S de tejido hepático de ratas control y ratas inducidas, obtenido en 5 tiempos.

I/S	Tejido	
	Control	Inducidas
T 0	1.7 ±0.2	1.7 ±0.2
T 1	1.8 ±0.2	2.0 ±0.2
T 2	1.4 ±0.3 <sup>0*</sup>	1.6 ±0.2 <sup>0*</sup>
T 3	1.9 ±0.2 <sup>00*</sup>	2.1 ±0.2 <sup>0**</sup>
T 4	1.8 ±0.09 <sup>00*</sup>	1.6 ±0.2 <sup>000*</sup>

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>0\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>00\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>0000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

En la tabla 22 se muestra la relación I/S de microsomas de ratas control y microsomas de ratas inducidas obtenidos en 5 tiempos distintos.

En organismos control, este índice aumenta hasta un 36% con respecto a los tiempos 0, 1 y 2, al tiempo 4 este índice continúa aumentado en un 21% con respecto al tiempo 2. Esto muestra que este cociente tiende a incrementar con el paso del tiempo bajo condiciones normales en microsomas.

En organismos inducidos, este cociente aumenta al tiempo 3 en un 21%, similar a lo que ocurre en organismos control, sin embargo, al tiempo 4 disminuye un 24%, demostrando que una condición estresante severa modifica la tendencia de este índice de la misma manera que ocurre en tejido.

Tabla 22. Cociente I/S de microsomas de ratas control y ratas inducidas, obtenido en 5 tiempos.

I/S	Microsomas	
	Control	Inducidas
T 0	1.6 ±0.1	1.6 ±0.1
T 1	1.4 ±0.1	1.4 ±0.2
T 2	1.6 ±0.2	1.7 ±0.2
T 3	1.9 ±0.1 <sup>***</sup>	1.7 ±0.1 <sup>0*</sup>
T 4	1.7 ±0.1 <sup>0*</sup>	1.3 ±0.2 <sup>00**</sup>

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>0\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>00\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>0000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

En la tabla 23 se muestra el cociente I/S de mitocondrias de ratas control y mitocondrias de ratas inducidas obtenidos en 5 tiempos distintos.

En organismos control, al tiempo 1 este índice aumenta 29% con respecto al tiempo 0, a los tiempos 3 y 4 disminuye 27% con respecto al tiempo 1, esto indica que en mitocondrias bajo condiciones normales y al paso del tiempo este índice en mitocondrias tiende a disminuir, siendo diferente a tejido y microsomas que tienden a mantener estable el índice de fluidez.

En organismos inducidos, al tiempo 3 este índice aumenta un 69% con respecto al tiempo 2 y al tiempo 4 se mantiene prácticamente con el mismo aumento, lo anterior muestra una respuesta distinta a tejido y a microsomas, incluso bajo una condición estresante ligera.

Tabla 23. Cociente I/S de mitocondrias de ratas control y ratas inducidas, obtenido en 5 tiempos.

I/S	Mitocondrias	
	Control	Inducidas
T 0	1.7 ±0.3	1.7 ±0.3
T 1	2.2 ±0.5 *	1.7 ±0.1
T 2	1.8 ±0.2	1.3 ±0.4
T 3	1.6 ±0.3 <sup>0*</sup>	2.2 ±0.3 <sup>00*</sup>
T 4	1.6 ±0.2 <sup>0*</sup>	2.1 ±0.4 <sup>00*</sup>

\*p<0.05 diferencia con el tiempo 0, <sup>0\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 1, <sup>00\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 2, <sup>000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 3, <sup>0000\*</sup>p<0.05 diferencia con el tiempo 4. n=3.

### 5.7.2 Comparación de la relación I/S de tejido, microsomas y mitocondrias

En la figura 12 se muestra el cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias de organismos control al tiempo 0, podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas y que al parecer tejido, microsomas y mitocondrias tienen un comportamiento similar en cuanto a la relación I/S.

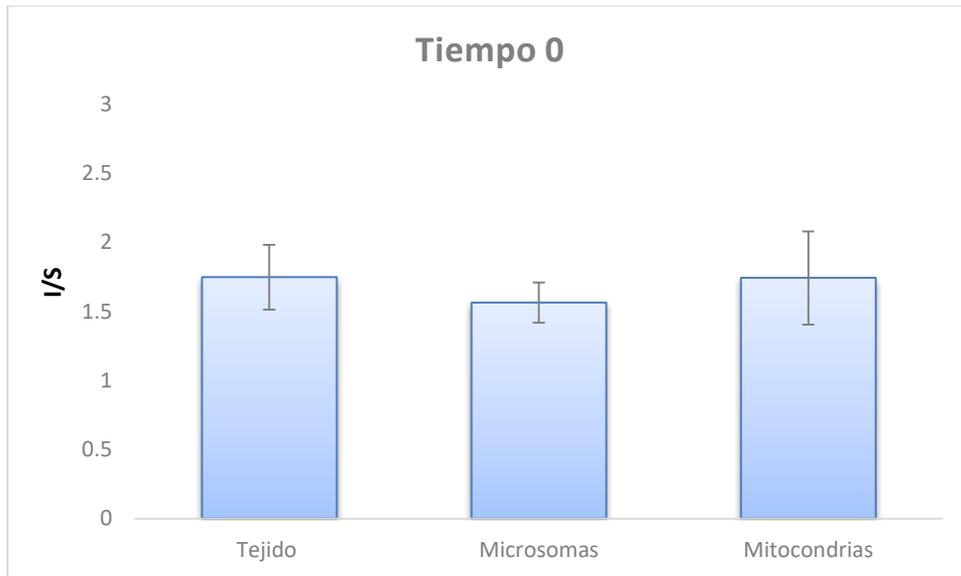


Figura 12. Comparación del cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias al tiempo 0.

En la figura 13 se muestra el cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias de organismos control al tiempo 1, podemos observar que en mitocondrias este índice aumenta un 26% con respecto al tejido y un 72% con respecto a los microsomas, lo que indica que al paso del tiempo las mitocondrias muestran un comportamiento diferente a tejido y microsomas en cuanto a la relación I/S, esto quizá por algún requerimiento energético de la célula.

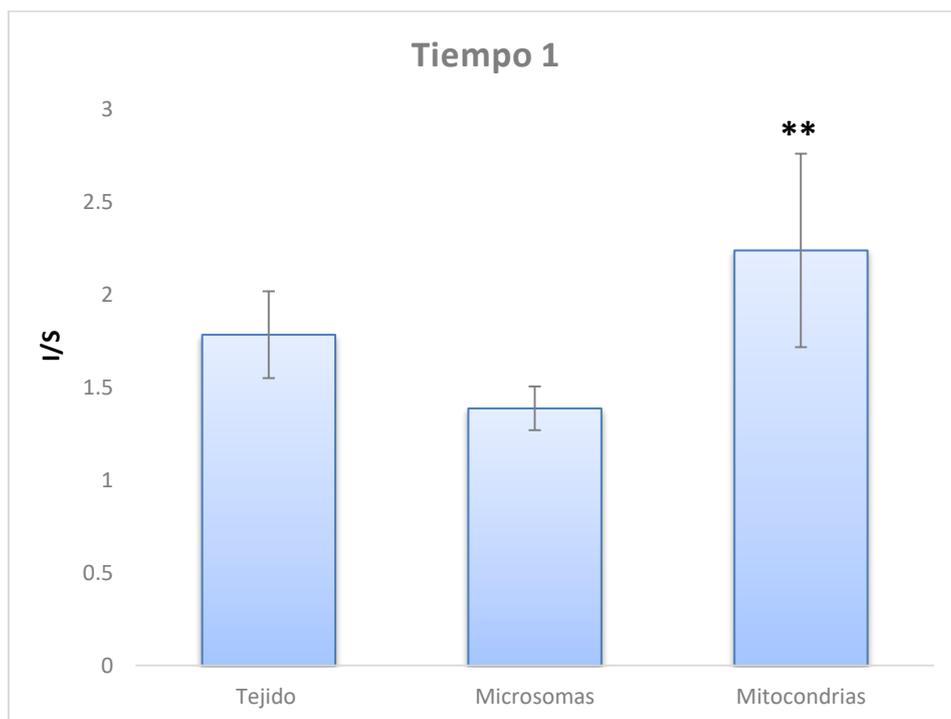


Figura 13. Comparación del cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias control, al tiempo 1. \* $p < 0.05$ , \*\* diferencia con ambas fracciones  $n = 3$ .

En la figura 14 se muestra el cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias de organismos control al tiempo 2, podemos observar que este índice en mitocondrias continua ligeramente elevado con respecto al tejido, esto parece indicar mayor influencia del retículo en las mitocondrias.

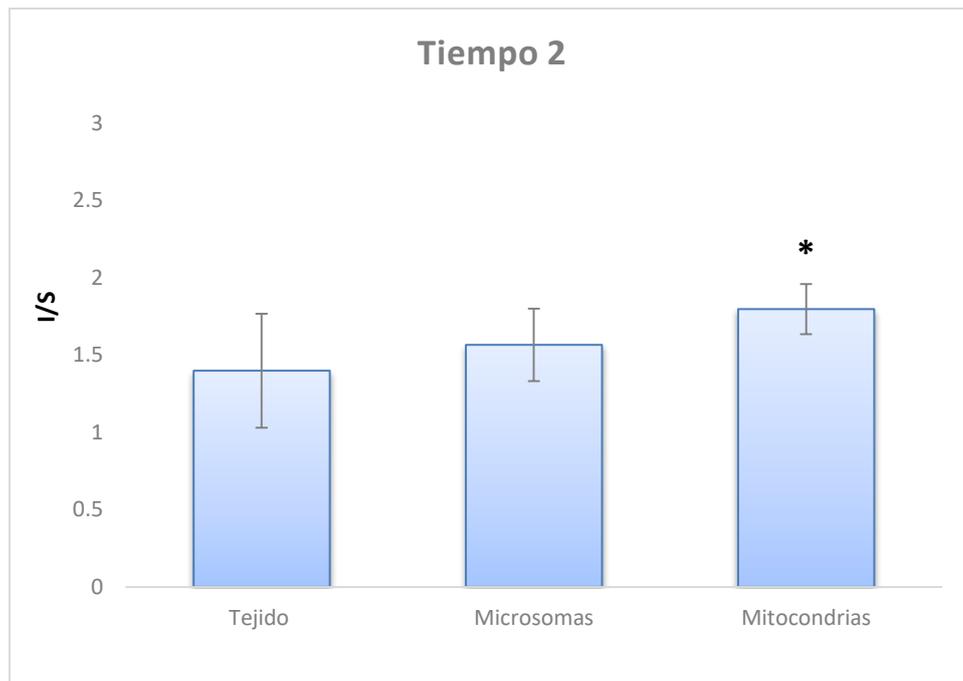


Figura 14. Comparación del cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias control, al tiempo 2. \* $p < 0.05$ , \*\* diferencia con ambas fracciones  $n = 3$ .

En la figura 15 se muestra el cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias de organismos control al tiempo 3, no se muestran diferencias estadísticamente significativas y como se mencionó anteriormente las mitocondrias se comportan de manera similar a tejido y microsomas, parece existir una tendencia por parte de las mitocondrias a reducir la fluidez.

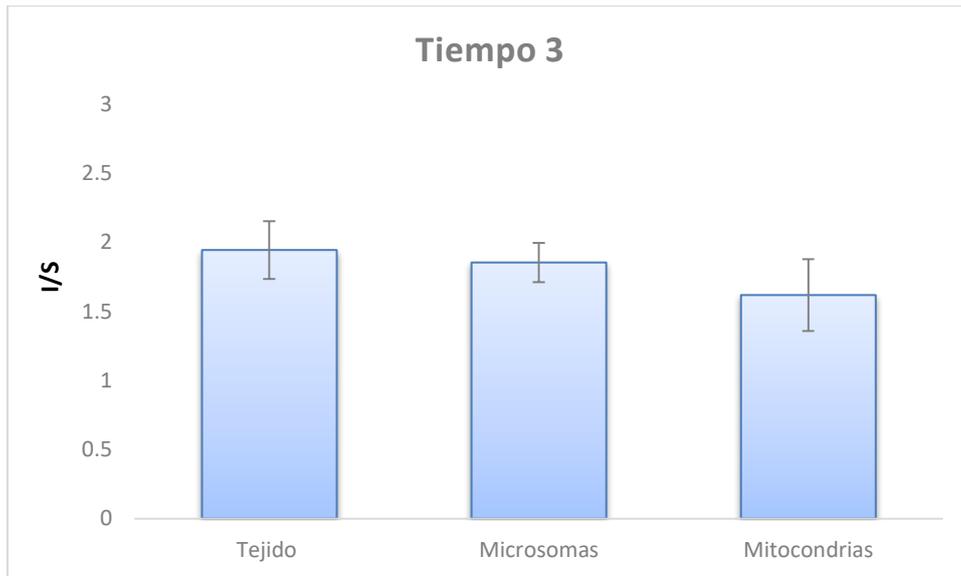


Figura 15. Comparación del cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias control, al tiempo 3. \* $p < 0.05$ , \*\* diferencia con ambas fracciones  $n = 3$ .

En la figura 16 se muestra el cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias de organismos control al tiempo 4, se observa que las mitocondrias son diferentes estadísticamente de tejido, ya que disminuye su fluidez en un 17%, como se mencionó anteriormente bajo condiciones normales las mitocondrias tienden a disminuir su fluidez al paso del tiempo, mientras que tejido y microsomas tienden a mantenerse muy similares, lo cual parece indicar que la fluidez de las mitocondrias en condiciones normales no está completamente bajo la dirección del retículo endoplásmico.

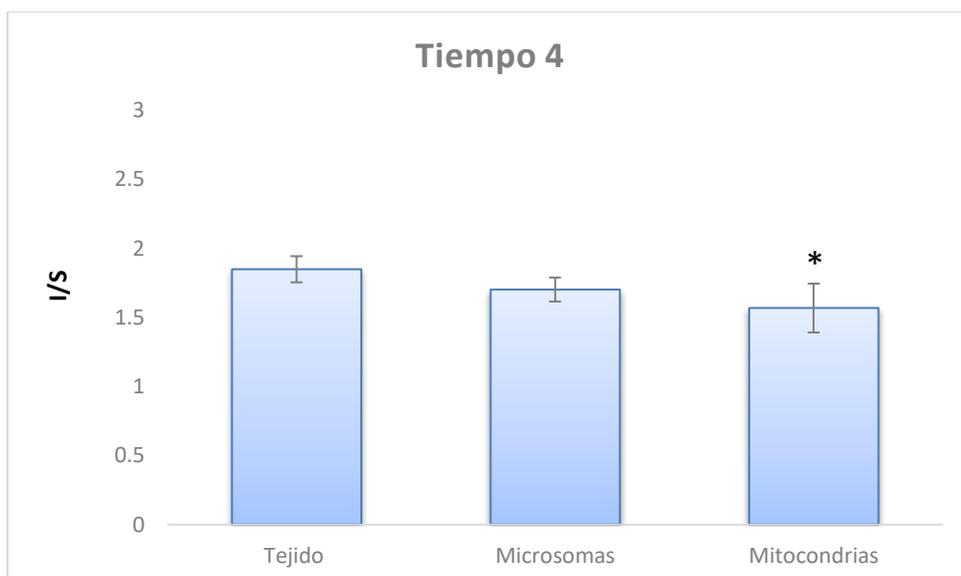


Figura 16. Comparación del cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias control, al tiempo 4. \* $p < 0.05$ , \*\* diferencia con ambas fracciones  $n = 3$ .

En la figura 17 se muestra el cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias de organismos inducidos a diabetes, al tiempo 1. Podemos observar que los microsomas muestran una disminución de este índice del 26% con respecto al tejido y del 18% con respecto a mitocondrias, por su parte las mitocondrias presentan una disminución en este índice de 16% con respecto al tejido, esto indica que la condición estresante tiene efecto sobre tejido, microsomas y mitocondrias, en estas últimas parece que sus modificaciones son contrarias a lo que sucede en condiciones normales.

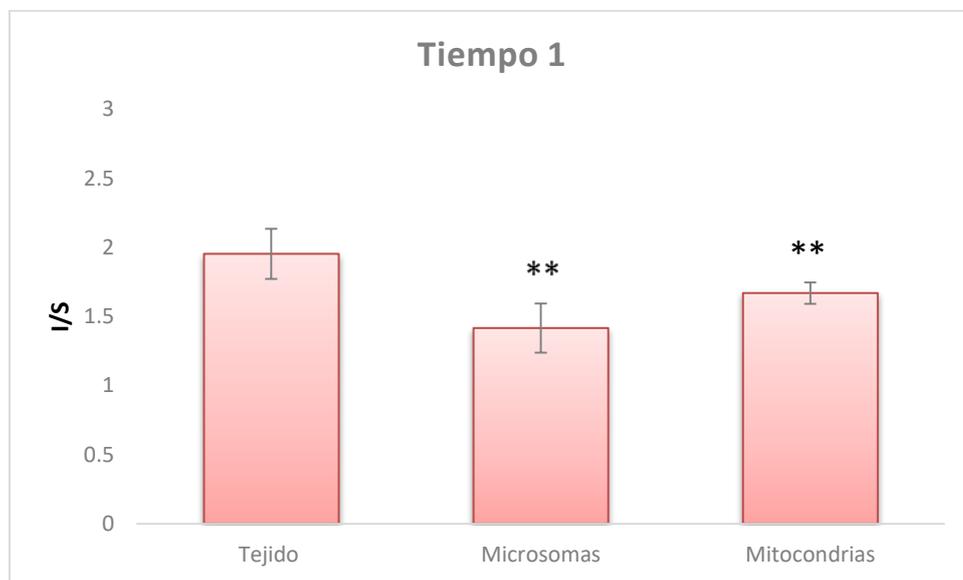


Figura 17. Comparación del cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias inducidas, al tiempo 1. \* $p < 0.05$ , \*\* diferencia con ambas fracciones  $n = 3$ .

En la figura 18 se muestra el cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias de organismos inducidos al tiempo 2, no se observan diferencias estadísticas significativas, parece que bajo una condición estresante ligera y a las dos semanas no se ha provocado el suficiente estrés para poder observar los cambios que se provocan.

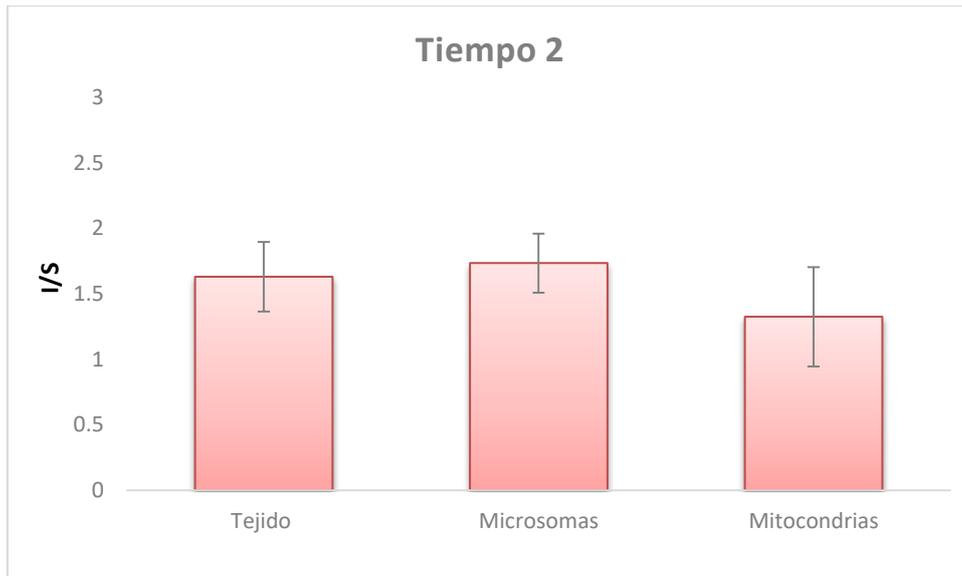


Figura 18. Comparación del cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias inducidas, al tiempo 2. \* $p < 0.05$ , \*\* diferencia con ambas fracciones  $n = 3$ .

En la figura 19 se muestra el cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias de organismos inducidos al tiempo 3, de nuevo no se observan diferencias estadísticas significativas, pero sí un cambio de comportamiento de las mitocondrias de organismos inducidos con respecto a su control, se aprecia que existe un control de las alteraciones que provoca una condición estresante, sin embargo esta condición a pesar de ser ligera, modifica la tendencia que toma este índice bajo condiciones normales.

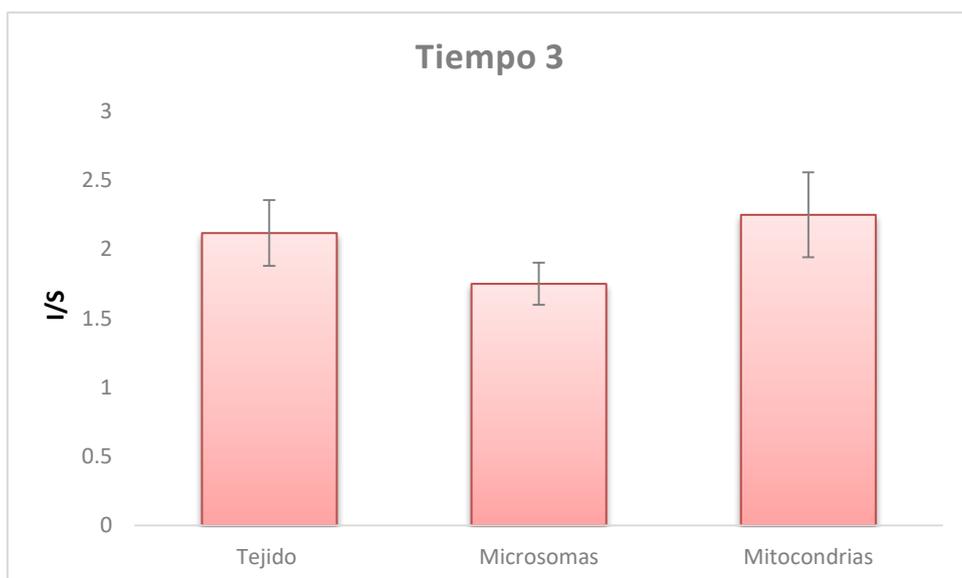


Figura 19. Comparación del cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias inducidas, al tiempo 3. \* $p < 0.05$ , \*\* diferencia con ambas fracciones  $n = 3$ .

En la figura 20 se muestra el cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias de organismos inducidos al tiempo 4, podemos observar que este índice en mitocondrias se encuentra aumentado un 75% con respecto a los microsomas, esto indica que una condición estresante severa provoca un aumento de la fluidez de las membranas mitocondriales y parece que esta modificación en dichas membranas no está bajo el control de retículo endoplásmico.

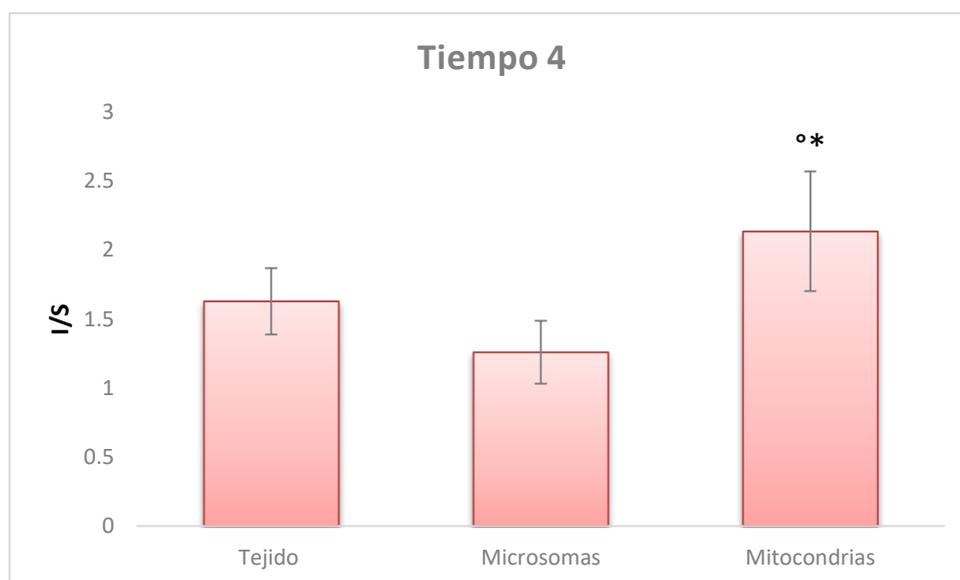


Figura 20. Comparación del cociente I/S de tejido, microsomas y mitocondrias inducidas, al tiempo 4. \* $p < 0.05$ , \*\* diferencia con ambas fracciones  $n = 3$ .

## 6. Discusión

### 6.1 Control respiratorio

Los datos obtenidos muestran que la concentración elevada de glucosa al tiempo 4 generada por una DE1 severa, induce una alteración en la función mitocondrial evidenciada por el incremento en el consumo de oxígeno tanto en el estado 3 como en el estado 4 (anexo 1), con un menor cociente respiratorio, lo que sugiere desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones y daño mitocondrial. Aunque cabe destacar que algunas de las diferencias encontradas podrían deberse al estrés provocado por la STZ, ya que genera

ROS que están relacionados con la disfunción mitocondrial (Bolzan y Bianchi 2002). La disfunción mitocondrial ha sido señalada en diversas patologías como el resultado de procesos de peroxidación de lípidos en las membranas, los cuales se producen al presentarse hiperglucemia (Vamecq *et al* 2012), lo anterior podría ser un indicador del porqué de los cambios encontrados al tiempo 4.

Los resultados encontrados en control respiratorio son coincidentes con lo reportado por varios investigadores (Dey y Swaminathan 2010; Rolo y Palmeira 2006; Santos *et al* 2003, estudios en que el CR es menor en mitocondrias de organismos inducidos a diabetes; en estos artículos se atribuye la pérdida de CR a la formación de radicales libres, lo que concuerda con que los cambios en CR no sean visibles sino hasta el tiempo 4 cuando las mitocondrias fueron sometidas a un estrés severo. Pérez-Hernández *et al.* (2017), proponen que el CR podría estar condicionado por la fluidez, lo que concuerda al tiempo 1 ya que se observa que a mayor fluidez mayor fue el CR, algo curioso es que el tiempo 2 y 3 no concordaron con las afirmaciones anteriores, también Perseghin *et al* (2003) mencionan que el control respiratorio está dado por la concentración de glucosa en sangre, entonces una hiperglucemia severa modifica la composición de ácidos grasos de membranas mitocondriales y por lo tanto estas se vuelven más fluidas, como indica Desoye y Hauguel- de Mauzon, (2007); si aumenta la fluidez de membranas mitocondriales se modifica el control respiratorio, esto debido al desacoplamiento provocado por los cambios anteriormente señalados. El cambio en la fluidez está relacionado con un incremento en la concentración de ácidos grasos libres, o que estimula el desacoplamiento mitocondrial a través de proteínas desacoplantes reduciendo la actividad de la cadena respiratoria (Hagen y Vidal, 2002), Además estos AGs libres pueden interactuar con las membranas y modificar su composición y por lo tanto sus propiedades fisicoquímicas (Penzo *et al* 2002), lo anterior podría explicar lo ocurrido al tiempo 2 y 3 ya que como veremos más adelante los ácidos grasos en efecto cambian y esto podría estar modificando la posible respuesta a la condición estresante.

## **6.2 Composición de ácidos grasos**

El papel de los ácidos grasos es muy importante ya que dicta la estructura y función de la membrana, estos tienen la cualidad de modular las propiedades importantes, como la fluidez y la permeabilidad, además de la acción de algunas enzimas (Rodríguez Leyva 2009). Como se muestra en este estudio y coincidiendo con lo reportado por Okamoto (1989) podemos observar que la composición de ácidos grasos es modificada durante la diabetes.

### **6.2.1 Composición de ácidos grasos al tiempo 0**

Debido a que la composición de ácidos grasos de tejido, microsomas y mitocondrias no muestra diferencias en ácidos grasos esenciales o en el cociente I/S, parece que a este tiempo el retículo endoplásmico se encuentra regulando la composición de ácidos grasos de tejido y mitocondrias como ha sido propuesto (Kornmann *et al* 2009). Los cambios en ácidos grasos saturados que se presentaron en microsomas y mitocondrias con respecto al tejido nos pueden indicar una mayor demanda energética, debido a que se considera que a los dos meses (edad que tenían estos organismos) comienzan procesos de maduración sexual en ratas (Cossio-Bolanos *et al* 2012). Aunque la prácticamente nula diferencia también se podría explicar porque la fracción mitocondrial está contaminada hasta en un 20 % de MAMs y la fracción microsomal muestran una pequeña contaminación de mitocondrias y hasta un 30 % de MAMs según lo reportado por Stone *et al.* (2008).

### **6.2.2 Composición de ácidos grasos al tiempo 1**

En este tiempo se puede observar que los ácidos grasos saturados disminuyeron su porcentaje en organismos inducidos, lo cual es contrario con lo que se creía anteriormente, se hacía referencia a que la diabetes aumentaba la concentración de ácidos grasos saturados (Garcia *et al* 1997) pero coincide con lo reportado por Pérez-Hernández *et al* (2017), en donde estos ácidos de igual manera disminuyen con el progreso de una diabetes ligera.

En este estudio también observamos que los ácidos grasos araquidónico y DHA aumentaron en tejido y microsomas; en mitocondrias disminuyeron, continuando con la comparación con lo reportado por Pérez-Hernández *et al* (2017), el aumento de los AGs araquidónico y DHA son contrarios ya que en su caso disminuyen en tejido hepático pero aumentan en mitocondrias, esto puede ser explicado por los tiempos en los que se realizaron los experimentos y es un buen antecedente para demostrar que con una semana de exposición a una condición estresante ligera existen cambios estadísticamente significativos. Por último los resultados reflejan que la composición de ácidos grasos de mitocondrias es diferente a retículo aun en organismos control, Hammer y Wills (1978) señalan que la composición de ácidos grasos de retículo endoplásmico depende directamente de la alimentación, una condición estresante provoca que exista menor incorporación de ácidos grasos poliinsaturados, algo que parece contradecirse en este estudio o quizá el retículo endoplásmico no sea tan sensible a la condición estresante, esto se podrá comprobar al tiempo cuatro en donde la condición estresante fue mayor.

### **6.2.3 Composición de ácidos grasos al tiempo 2**

A este tiempo los ácidos grasos saturados parecen no haberse modificado, sólo en tejido presentaron pequeños cambios y debido a que uno de los ácidos grasos que mostró diferencias es el pentadecanoico, este efecto se puede atribuir directamente a la dieta ya que este tendría que ser sintetizado de

manera endógena a partir propionato que se encuentra en la dieta como conservador (Weitkunat *et al* 2017), quizá en los organismos inducidos se modificó la afinidad de la sintasa de ácidos grasos (FAS). Para el caso de los insaturados, el ác. Araquidónico disminuye sólo en mitocondrias, esto concuerda con lo reportado por Delachambre *et al.* (1998), ellos reportaron que el metabolismo del AG araquidónico va a la baja con el paso del tiempo y que también influye una condición estresante, esto debido a que la actividad de la  $\Delta 5$  y  $\Delta 6$  desaturasa pudo haber sido modificada y en consecuencia el metabolismo del mismo se vio modificado, cabe aclarar que ellos manejaron un modelo de ratas hipertensas, parece curioso que los cambios sean parecidos aunque la condición estresante sea diferente. El DHA disminuyó en tejido, como en microsomas y mitocondrias, Stillwell y Wassall (2003) mencionan que la concentración de DHA está asociada con la modificación de varias características de la membrana como la fluidez, lo que concuerda con los resultados aquí presentados debido a que en este caso el índice de fluidez disminuye y la concentración de DHA atendiendo a esta premisa también disminuye. De nuevo la composición para microsomas y mitocondrias, tanto de organismos control como inducidas es diferente.

#### **6.2.4 Composición de ácidos grasos al tiempo 3**

A este tiempo la concentración de ácidos grasos saturados es muy variada en mitocondrias, un ejemplo muy marcado es el AG esteárico que aumenta su concentración en microsomas pero disminuye en mitocondrias, esto puede deberse a la actividad de las FAS que se encuentra menos regulada en mitocondrias, algo que sería contrario es que el ác. linoleico aumenta en ambas, lo cual podría deberse al metabolismo de este, ya que como se muestra en microsomas en la tabla 4, el ácido araquidónico que es un producto de la elongación y desaturación del AG linoleico, concuerda con que se encuentra en concentraciones mayores y el araquidónico en menores (Reyes-Hernández *et al* 2018), esto sólo concuerda con microsomas, con mitocondrias pasa algo curioso ya que en lugar de que uno disminuya y el otro aumente,

ambos aumentan y no sólo eso, la concentración de DHA también se ve incrementada, esto podría explicarse ya que Getz *et al* (1962) analizaron la composición de AGs de mitocondrias de tejido hepático de rata, encontrando que existe una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados. Araquidónico (16.2 %) DHA (4.9 %), lo que podría indicar un mecanismo de regulación de AGs poliinsaturados especial para mitocondrias.

#### **6.2.5 Composición de ácidos grasos al tiempo 4**

El porcentaje de ácidos grasos saturados es muy variado y parece ser que esto es para regular la fluidez membranal de maneras diferentes, en este estudio el AG palmítico aumenta en microsomas y mitocondrias, pero el AG esteárico sólo disminuye en mitocondrias, lo que repercute directamente con su fluidez, esto es prácticamente contrario a lo observado por Pérez-Hernández *et al* (2017) a pesar de que ambos resultados son en hígado y a un mes de exposición a la hiperglucemia, por lo cual estos cambios se podrían explicar por la edad reproductiva en la que se encuentran las ratas, además de que el modelo utilizado no es exactamente el mismo. Como mencionan Spector y Yorek (1985), las membranas plasmáticas son el principal indicador del estatus de alteraciones de los ácidos grasos y del metabolismo en los organismos, las cuales pueden ser influenciadas por el desarrollo de patologías como la diabetes, esto también explicaría la reducción del AG oleico ya que disminuye en ambas. El AG araquidónico disminuye en microsomas y se encontraba en mayor proporción en las mismas, por último el DHA aumenta en todas, lo que sería un posible indicativo de cómo se modifica el metabolismo de este ácido graso bajo una condición estresante severa no sólo en mitocondrias, lo que resulta curioso ya que este ácido graso al ser esencial se obtiene de la dieta y múltiples estudios reportan que bajo una condición estresante, la concentración de este tiende a disminuir (Lloyd *et al* 1999).

### 6.3. Porcentaje de ácidos grasos por separado

El organismo sintetiza numerosos ácidos grasos (no esenciales), mientras que otros deben incorporarse a través de la dieta (esenciales) (Rodríguez-Cruz 2005). Existen varias enzimas responsables en la regulación de la composición de ácidos grasos de las membranas, como son: elongasas, desaturasas, fosfolipasas, y las lisofosfolípido acil-transferasas. Se ha propuesto que el mantenimiento de la fluidez es un proceso regulado por la actividad de las desaturasas (Kates et al 1984). En el presente estudio se pudo observar que hay diversos cambios ocasionados por la edad y por la hiperglucemia y que cada fracción analizada (tejido, microsomas y mitocondrias) responden de manera diferente a lo anterior, por lo que podríamos pensar en que la actividad de FAS es diferente o se modifica de acuerdo a la región del citosol donde se estén sintetizando los AGs como lo menciona Hulbert *et al* (2005), la afinidad de algunas enzimas involucradas en la remodelación de la membrana como es la acil-transferasa microsomal y las elongasas están estrechamente influenciadas por el ambiente lipídico que las rodea. Lo anterior explicaría de alguna manera lo encontrado en este estudio, esto para el caso de los AGs saturados, el caso de los ácidos grasos insaturados o poliinsaturados en este trabajo es muy peculiar, ya que si bien el caso del ácido linoleico y araquidónico concuerdan con el carácter precursor-resultado como lo indican Reyes-Hernández *et al* (2018), algo más a discutir es que parece que los efectos que se muestran sobre el comportamiento de los AGs es producto de la edad y que en organismos inducidos parece que la inducción acelera los efectos que se presentan, lo que concuerda con lo reportado por García *et al* (1997), donde menciona que los cambios en la composición de membrana están implicados con los procesos de enfermedad y la fisiología del envejecimiento.

El caso del DHA es muy curioso ya que como se conocía anteriormente este AG bajo una hiperglucemia tiende a disminuir, esto por su carácter de AG esencial y el supuesto de que es obtenido a partir de la dieta, en algunas otras

investigaciones como en la de Pérez-Hernández *et al* (2017), indica que en tejido efectivamente la concentración de este AG disminuye, pero en mitocondrias se veía aumentada, en este estudio encontramos que esta concentración aumenta no sólo en mitocondrias, sino que también en micromas y tejido, esto pudo haber ocurrido por la hiperglucemia severa a la que fueron sometidas las ratas de una semana a la otra y en respuesta esta concentración se aumentó de golpe para establecer la fluidez necesaria, nuevamente como lo indican Stillwell y Wassall (2003), la concentración de DHA está asociado con la modificación de características de la membrana como la fluidez, cabe señalar que no fue detectado su precursor. Algo que se debe tener en cuenta es que además de ser importantes para mantener la estructura de las membranas celulares los ácidos grasos poliinsaturados son una fuente de energía (Caballero *et al* 2006), esto nos podría indicar que quizá estos ácidos grasos poliinsaturados cambian su rol dependiendo de las necesidades fisiológicas.

#### **6.4 Relación I/S**

La estructura de las membranas celulares se describe como una bicapa lipídica donde se insertan las proteínas y otros componentes. Esta estructura es altamente plástica y dinámica debido a las propiedades de los lípidos que la constituyen (Singer y Nicolson, 1972). La composición de la membrana determina las propiedades fisicoquímicas de la misma (Hulbert *et al* 2005). Una de estas propiedades es la fluidez y como menciona Pérez-Hernández *et al* (2017), la fluidez membranal es afectada por varios factores, uno de los más importantes es la composición de ácidos grasos. Diversos estudios señalan que existe un incremento de la fluidez membranal, y esto está relacionado con la hiperglucemia (Figueroa-García *et al* 2015). Estas modificaciones son importantes ya que las propiedades de la membrana están asociadas a muchas funciones celulares, como la actividad de enzimas asociadas, transporte de solutos y señalización (García *et al* 2003), al igual que la disminución de la fluidez al envejecer se asocia a la disminución de

señalización y a un mayor riesgo de rompimiento de las membranas por cambios osmóticos (Winocour *et al* 1990).

En este estudio la relación I/S no se ve modificado por la hiperglucemia entre tejido en ni uno de los 4 tiempos, esto quizá por lo ligera que fue la condición estresante y a que este no es tan sensible como las mitocondrias, aunque lo reportado por Figueroa-García *et al* (2015) indique que bajo una condición estresante cociente I/S del tejido disminuye, cabe aclarar que en el artículo anteriormente mencionado se trabajó con tejido placentario y es sabido que se encuentra bajo mayor estrés. Entre microsomas este índice de fluidez se afecta sólo con una condición estresante severa y este disminuye hasta un 26 % lo que indicaría que el tejido no es lo suficientemente sensible a una hiperglucemia o tarda más en percibirla. Finalmente entre mitocondrias se modifica a la baja en las dos primeras semanas y después aumenta por la hiperglucemia, al tiempo 4 con una hiperglucemia severa se mantiene, esto concuerda con lo reportado por Figueroa-García *et al* (2015) y por Pérez-Hernández *et al* (2017) en donde la fluidez de las mitocondrias aumenta con una condición estresante, y parece ser que este organelo es más sensible y es el primero en modificar la composición de ácidos grasos de manera significativa como para alterar su índice de fluidez.

Con la edad ocurre algo diferente ya que el tejido tiene un comportamiento variado aunque de cierta manera estable, lo cual es un buen señalador para la planificación de proyectos ya que el tiempo y una condición estresante pueden condicionar a cambios en periodos de tiempo cortos y parece que la condición estresante actúa como un acelerador de los cambios que ocurren con la edad, esto podría explicarse por lo reportado por Winocour *et al* (1990), que al envejecer ocurren cambios en la fluidez de las membranas que están asociados a la disminución de la señalización y como se menciona anteriormente es un proceso que se ve alterado con la hiperglucemia. El retículo endoplásmico de organismos control con el paso del tiempo parece que tiende a estabilizar este índice de fluidez, como se mencionó anteriormente, es un efecto directo de la dieta y al no cambiar la dieta se espera que esta fluidez se conserve; por otro lado la fluidez de retículo endoplásmico de organismos inducidos disminuye bajo una condición estresante severa, lo que concuerda

con lo reportado por Cester *et al* (1996), quienes encontraron que durante la diabetes las membranas de retículo endoplásmico sufren una remodelación al igual que las mitocondrias, hasta ahora sabemos que una condición estresante si logra modificar este índice de fluidez, una incógnita interesante es el sentido en el que se modifica este índice, ya que en el artículo mencionado se incrementa la fluidez y en nuestros resultados ocurre lo contrario. Las mitocondrias al paso del tiempo tienden a reducir la fluidez como lo reporta Winocour *et al* (1990), bajo una condición estresante ligera parece que aceleran este proceso de reducción de fluidez, coincidiendo con los reportes donde indican que la hiperglucemia reduce la fluidez, pero al existir una condición estresante severa esta se modifica por completo y aumenta, esto se puede comparar con lo obtenido por Pérez – Hernández *et al* (2017), ya que sus mitocondrias están expuestas a un estrés considerado como ligero por juntar dos condiciones estresante, y observa que las mitocondrias bajo estrés incrementan el índice de fluidez.

La comparación entre las tres fracciones muestra que en la mayoría de tiempos las mitocondrias son diferentes a tejido y microsomas, aunque en algunos no exista diferencia estadística, esto se explicaría por la contaminación que aún conserva cada fracción (Stone *et al* 2008). El origen evolutivo de RE explicado como una evaginación de la membrana plasmática podría darnos una idea de por qué no existen tantas diferencias entre retículo endoplásmico y tejido, diferenciados por la eliminación de ciertas funciones de la membrana plasmática durante la evolución que podría haber facilitado la adaptación del RE para otros procesos, por lo cual la composición es similar pero la función es diferente (Mironov *et al* 2007). Por otra parte el RE cuenta con una vía de señalización intracelular llamada respuesta de proteína desplegada (UPR por sus siglas en inglés) cuya función es mantener la homeostasis del retículo y se activa bajo condiciones de estrés (Oakes y Papa 2015), lo cual explicaría el hecho de que el RE parece conservar su composición de ácidos grasos. Las membranas asociadas a mitocondrias, también podrían ser las responsables de los cambios encontrados, las cuales como su nombre lo indica es un punto de contacto entre retículo y mitocondrias; se ha reportado recientemente que en estas MAMs es donde se da la mayor parte del transporte de lípidos

(Kornmann et al., 2009, Fagone y Jackoski, 2009); también se propone que las MAMs en condiciones homeostáticas, son cruciales para la adecuada bioenergética de las mitocondrias, además se cree que las MAMs son las reguladoras maestras de la forma mitocondrial y la motilidad (Van Vilet y Agostinis 2018), estos autores también mencionan que se ha demostrado que las MAM transfieren las señales de estrés de RE a las mitocondrias, por lo anterior mencionado se podría pensar que en efecto estas MAMs tienen gran influencia en la respuesta de las mitocondrias al estrés y lo escrito anteriormente podría ser la razón por la cual las mitocondrias responden al estrés modificando su composición de ácidos grasos antes que el RE. El contacto deteriorado entre MAM y las mitocondrias provoca disfuncionalidad de estas últimas (Vance, 2014), continuando con esta idea Díaz en 2017 menciona que la integridad de las MAMs se ve afectada por la acumulación de ácidos grasos saturados en estas mismas, por lo cual sería importante saber la composición de las MAMs para saber cómo participa dentro de este proceso de regulación específico para mitocondrias.

Por último cabe mencionar que también se ha postulado la teoría de que las mitocondrias al tener un posible origen bacteriano, explicado en la teoría de la endosimbiosis (Margulis 1967) y ser sometidas a una condición estresante, estas modifican la composición de sus membranas de manera parecida a como responderían las bacterias, demostrando así su origen bacteriano (Figueroa-García et al., 2015, Pérez-Hernández et al., 2017).

Actualmente se cuenta con información suficiente para respaldar estos postulados, esto apoyando la idea de que el vehículo que introdujo el sistema respiratorio en los linajes eucariotas fue una  $\alpha$ -proteobacteria, las evidencias bioquímicas indicaban que existe una relación cercana entre las mitocondrias y las  $\alpha$ -proteobacterias (Andersson et al 1998). Por otra parte, los datos moleculares apuntan hacia un origen monofilético de la mitocondria que surgió de un ancestro  $\alpha$ -proteobacteriano. Lo cual indica que la mitocondria se originó sólo una vez en la evolución. Las reconstrucciones filogenéticas parecen indicar que miembros de la subdivisión rickettsia de las  $\alpha$ -proteobacterias (Gray y Franz 1999), un grupo de parásitos intracelulares, son los parientes más cercanos que se conocen de las mitocondrias; las mitocondrias evolucionaron

por dos mecanismos importantes: pérdida de genes y transferencia de los genes al genoma nuclear de la célula huésped. La marca filogenética del ancestro mitocondrial, la protomitocondria, debería ser identificada en el ADN nuclear de los eucariotas, al menos 840 genes de eucariotas llevan la firma de las  $\alpha$ -proteobacterias (Kurland y Andersson 2000). Ahora enfocándonos en las características de sus membranas, se señala que los lípidos de las membranas biológicas de las bacterias se mantienen generalmente en estado líquido cristalino para que la temperatura de la fase de transición sea menor que la temperatura ambiente y estos se modificaran bajo condiciones de estrés para mantener la integridad y el funcionamiento de la bacteria manteniendo su fluidez (Suutari y Laakso, 1994), el principal mecanismo por el cual las bacterias mantienen esta fluidez ideal de la membrana es cambiando la composición de los ácidos grasos (Annous *et al.*, 1997). Así mismo se menciona que cada grupo bacteriano responde al estrés de diferentes formas pero siempre actuando sobre la composición de los ácidos grasos de membrana y se han propuesto mecanismos tales como desaturación, ramificación, isomerización cis-trans, elongación de la cadena de ácidos grasos y formación de ciclo propano (Russell y Sandercock, 1980). Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* se reportó la activación del gen de una desaturasa de ácidos grasos por el frío (Aguilar *et al.*, 1998), Pucci y Pucci en 2006 al trabajar con bacterias encontraron que bajo condiciones estresantes de temperatura las bacterias modifican la concentración de los ácidos grasos de cadena impar (15 y 17 C) conservando o reduciendo la concentración del ácido pentadecanoico y aumentando la del AG heptadecanoico, algo similar ocurrió en este proyecto con las mitocondrias por lo que sería coherente proponer que los cambios encontrados en mitocondrias están influenciados de cierta manera por su origen bacteriano, en este estudio se puede observar cómo las mitocondrias son más sensibles a una condición estresante y cómo responden de manera diferente y prácticamente independiente de retículo, por lo que se podría pensar que en efecto, existe algún mecanismo por el cual las mitocondrias regulen la composición de sus membranas.

## Conclusiones

La hiperglucemia severa generada por nuestro modelo de diabetes tipo 1 experimental modifica el control respiratorio, provocando la pérdida de este.

En términos generales las mitocondrias son más sensibles a una condición estresante, incluso cuando se generó una hiperglucemia leve

El tejido completo parece no ser tan sensible a la condición estresante ligera ni a la severa por lo cual no presento modificaciones en el índice de fluidez

La composición de ácidos grasos de RE al cabo de un mes y bajo una condición estresante, presenta modificaciones ya que aumentan los ácidos grasos saturados

La composición de ácidos grasos de mitocondrias al cabo de un mes y bajo una condición estresante presenta cambios contrarios a lo ocurrido en retículo, en estas aumenta la concentración de ácidos grasos insaturados

Los cambios en la composición de ácidos grasos se ven reflejados incluso en periodos de tiempo cortos (semanas)

La composición de ácidos grasos y por lo tanto el índice de fluidez de las mitocondrias no está del todo controlada por retículo endoplásmico

Los resultados encontrados indican que posiblemente existe una manera no descrita por la cual las mitocondrias regulan la composición de ácidos grasos de sus membranas

## Bibliografía

- Aguilar P S, Cronan J E Jr, De Mendoza D. A *Bacillus subtilis* Gene Induced by Cold Shock Encodes a Membrane Phospholipid Desaturase. *J Bacteriol.* 1998; 180:2194-2200.
- Alberts B, Dennis B, Julian L, Martin R, Keith R, James W. *Molecular biology of the cell.* España: Omega. 2002; 767-769.
- Andersson S G, Zomorodipour A, Andersson J O, Sicheritz-Pontén T, Alsmark U C, Podowski R M, Näslund A K, Eriksson A S, Winkler H H, Kurland C G. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature.* 1998; 396:133-140.
- Annous B A, Becker L A, Bayles D O, Labeda D P, Wilkinson B J. Role of Anteiso-C15:0 Fatty Acid in the Growth of *Listeria monocytogenes* at Low Temperatures. *Appl Environ Microbio.* 1997; 63:3887-3894.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248–254.
- Bolzán A D, Bianchi M S. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutation Research* 512. 2002; 121–134.
- Böttinger L, Ellenrieder L, Becker T. How lipids modulate mitochondrial protein import. *J Bioenerg Biomembr.* 2015; 48:125–135.
- Caballero R, Gomez R, Nuñez L, Vaquero M, Tamargo J, Delpon E. Farmacología de los ácidos grasos omega 3. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2006; 6: 3-19.
- Cester N, Rabini R A, Salvolini E, Staffolani R, Curatola A, Pugnali A, Brunelli M A, Biagini G, Mazzanti L. Activación de endotelial cells during insulin dependent diabetes Mellitus: a biochemical and morphological study. *European Journal of Clinical Investigation.* 1996; 26(7): 569-573.
- Cossio-Bolanos M A, Gómez-Campos R, Pilco-Quesada S, Lancho-Alonso J L, Arruda M. Proposal of a linear equation to determine somatic growth velocity by male Wistar rats' body mass. *An Fac med.* 2012; 73(2):93-100.
- Delachambre M, Narce M, Asdrúbal P, Poisson. Changes in Tissue Polyunsaturated Fatty Acids with Age, in Spontaneously Hypertensive rats. *Lipids.* 1998; 33: 795-801.

- Desoye G, Hauguel-De Mouzon S. The human placenta in gestational diabetes mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care*. 2007; 30(Suppl 2): 120–26.
- Dey A, Swaminathan K. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sci*. 2010; 87(7–8):197–214.
- Díaz Salinas B E. Papel de las membranas asociadas a la mitocondria en la sensibilidad a la insulina cerebral en un modelo de obesidad en roedores. Tesis Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2017.
- English A R, Zurek N, Voeltz G K. Peripheral ER structure and function. *Current opinion in cell biology*. 2009; 21:506-602.
- Fagone P, Jackowski S. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res* 2009; 50(Suppl):311– 316.
- Figuroa-García M C, Espinosa-García M T, Martínez-Montes F, Palomar-Morales M, Mejía-Zepeda R. Even a chronic mild hyperglycemia affects membrane fluidity and lipoperoxidation in placental mitochondria in Wistar rats. *PLoS One*. 2015; 10(12):1–15.
- García J J, Reiter R J, Guerrero J M, Escames G, Yu B P, Oh C S. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett*. 1997; 408: 297–300.
- García M A, Millan C, Balmaceda-Aguilera T, Castro P, Pastor H, Montecinos K, Reinicke F, Zuñiga J C, Vera S A, Oñate y Nualart F. Hypothalamic ependymalglial cells express the glucose transporter GLUT2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem*. 2003; 86:709-24.
- Gennis R B. *Biomembranes; Molecular Structure and Function*. Springer-Verlag, New York Inc. 1989.
- Getz G S, Bartley W, Stirpet F, Notton B M and Renshaw A. The Lipid Composition of Rat-Liver Mitochondria, Fluffy Layer and Microsomes. *Biochem. J*. 1962; 83:181-191.
- Geydan G, Giraldo G, Jaramillo M, McEwen M, Ossa P, Patiño R, Vásquez Y. *Biología de la célula*. 1ª Ed. Colombia: Fondo Editorial Biogénesis. 2006.
- Gray M W, Burger G, Franz Lang B. Mitochondrial Evolution. *Science*. 1999. 283: 1476-1481.
- Guzman J R, Lyra R, Cavalcanti N. DIABETES MELLITUS Visión Latinoamericana. AC FARMACEUTICA, Brasil. 2009; 530-539.
- Hagen T, Vidal-Puig A. Mitochondrial uncoupling proteins in human physiology and disease, *Minerva Med*. 2002; 93(1):41-57.

- Hammer T C y Wills E D. The Role of Lipid Components of the Diet in the Regulation of the Fatty Acid Composition of the Rat Liver Endoplasmic Reticulum and Lipid Peroxidation. *Biochem. J.* 1978; 174: 585-593.
- Kurland C G, Andersson S G. Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000. 64(4), 786-820.
- Lloyd A, Horrocks K, Young K. Health Benefits of Docosahexaenoic Acid DHA. *Pharmacological Research.* 1999; 40 (3).
- Hulbert A, Turner N, Storlien L, Else P. Dietary fats and membrane function: implications for metabolism and disease. *Biol Rev.* 2005; 80: 155-169.
- Kamat S G y Roy R. Evaluation of the effect of n-3 PUFA-rich dietary fish oils on lipid profile and membrane fluidity in alloxan-induced diabetic mice (*Mus musculus*). *Mol Cell Biochem.* 2016; 416:117–129.
- Kates M, Pugh E, Ferrante G. Regulation of membrane fluidity by lipid desaturases. *Biomembranes membrane fluidity.* 1984; 12: 379-395.
- Kornmann B, Currie E, Collins S R, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman J S, Walter P. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* . 2009; 325:477–481.
- Lehninger D, Cox, M N. *Principles of Biochemistry.* Fourth Edition. 2002; 659-670.
- Lodish H. *Biología celular y molecular.* Médica Panamericana. Madrid: 2006; 513-634.
- Margulis L. "On origen of mitosing cells", *Journal of theoretical biology.* 1967; 14 (3): 225.
- Mejía E M, Hatch G. Mitochondrial phospholipids: role in mitochondrial function. *J Bioenerg Biomembr.* 2016; 48(2):99–112.
- Mironov A, Banin V, Irina S, Dolgikh V, Luini A y Beznoussenko G. Evolution of the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Complex *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton: Origins and Evolution*, edited by Gaspar Jedkely. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. 2007; 5:75-86.
- Morrison W R y Smith L M. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lipid Res.* 1964; 5:600–608.
- Oakes A S y Papa R F. The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annu Rev Pathol.* 2015; 10: 173–194.

- Okamoto H, Kawaguchi H, Minami M, Saito H, Yasuda H. Lipid alterations in renal membrane of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1989; 13: 456-62.
- Penzo D, Tagliapietra C, Colonna R, Petronilli V, and Bernardi P. Effects of fattyacids on mitochondria: implications for cell death. *BBA-Bioenergetics*. 2002; 1555 (1-3):160- 165.
- Pérez-Hernández I H, Domínguez-Fuentes J M, Palomar-Morales M, Zazueta-Mendizabal A C, 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.
- Perseghin G, Petersen K, Shulman G I. Cellular mechanism of insulin resistamce : potencial links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003; 27(3):S6 -11.
- Pilon M. Revisiting the membrane-centric view of diabetes. *Lipids Health Dis*. 2016; 15(1):167.
- Pucci G N, Pucci C. Cambios en los ácidos grasos de membrana de *Microbacterium esteraromaticum* GNP-5 con diferentes temperaturas y osmolaridades. *Acta Biológica Colombiana*. 2006. 11:61–73.
- Raza H, Prabu S, John A, Avadhani N. Impaired Mitochondrial Respiratory Functions and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Int J Mol Sci*. 2011; 12:3133–3147.
- Reyes-Hernández C G, Cortijo D R, Rodríguez-Rodríguez P, Giambelluca S, Simonato M, González M, López A L, López-Giménez M R, Cogo P, Sáenz M, Carnielli V, and Arribas M. Effects of Arachidonic and Docosohexahenoic Acid Supplementation during Gestation in Rats. Implication of Placental Oxidative Stress. *Int. J. Mol. Sci*. 2018; 19: 3863.
- Rodriguez-Cruz M, Tovar A, Del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de Investigación Clínica*. 2005; 3: 457-472.
- Rodriguez-Leyva D, Basset C, McCullough R, Pierce G. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *J. Cardiol*. 2009.
- Rolo A P, Palmeira C M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006; 212:167–178.

- Russell N J, Sanderock S P. In Membrane Fluidity Biophysical Techniques and Cellular Regulation; 1980. 181-190.
- Santos D L, Palmeira C M, Seíça R, Dias J, Mesquita J, Moreno A J, Santos M S. Diabetes and mitochondrial oxidative stress: a study using heart mitochondria from the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Mol Cell Biochem.* 2003; 246(1–2):163–170.
- Sáyago-Ayerdi S G, Vaquero M P, Schultz-Moreira A, Bastida F, Sánchez-Muniz F J. Utilidad y controversias del consumo de ácidos grasos de cadena media sobre el metabolismo lipoproteico y obesidad. *Nutr Hosp.* 2008; 23(3):191-202.
- Short K, Bigelow M, Kahl J, Singh R, Coenen-Schimke J, Raghavakaimal S, Nair K. Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. 12;102(15): 5618-23.
- Singer S J y Nicolson G L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 1972; 175:720-31.
- Sorriento D, Pascale A, Finelli R, Carillo AL, Annunziata R, Trimarco B, Iaccarino G. Targeting mitochondria as therapeutic strategy for metabolic disorders. *ScientificWorldJournal.* 2014;13: 1-9.
- Spector A A y Yorek M A. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* 1985; 26:1015-35.
- Stillwell W y Wassall S R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. *Chem. Phys. Lipids.* 2003; 126:1-27.
- Stone M C, Scot J, Levin P Z, JiayiHan T, Walther C, Robert V F. The Endoplasmic Reticulum Enzyme DGAT2 Is Found in Mitochondria-associated-Membranes and Has a Mitochondrial Targeting Signal That Promotes Its Association with Mitochondria. *Biochem. J.* 2008; 284 (8):5352–5361.
- Stöckl M T, Hwang I K, Rosenthal M J, Harris D M, Yamaguchi D T, Yip I, Go V L. Antidiabetic actions of arachidonic acid and zinc in genetically diabetic GotoKakizaki rats. *Metabolism.* 2003; 52(1):7-12.
- Stryer L, Berg J M, Tymoczko J L. *BIOQUÍMICA CON APLICACIONES CLÍNICAS.* 7ma Ed. Reverté. España. 2013; 639-672.
- Suutari M, Laakso S. Microbial Fatty Acids and Thermal Adaptation. *Crit Rev Microbio.* 1994; 20:285-328.
- Vamecq J, Desein AF, Fontaine M, Briand G, Porchet N, Latruffe N, Andreolotti P, Cherkaoui-Malki M. Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis. *Curr Drug Metab.* 2002; 13(10):1388- 1400.

- Van Vliet A R, Agostinis P. Mitochondria-Associated Membranes and ER Stress. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018; 414:73-102.
- Vance E D y Vance E J. *Biochemistry of Lipids and Membranes*. The Benjamin/Cummings publishing Company, INC. United States of America. California. 1985; 593.
- Vance E J. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1841(4):595-609.
- Voet D y Voet J. *Bioquímica. Medica Panamericana.*, Buenos Aires. 2006; 830-833.
- Weitkunat K, Schumann S, Nickel D, Hornemann S, Petzke K J, Schulze M B, Pfeiffer F H A, Klaus S. Odd-chain fatty acids as a biomarker for dietary fiber intake: a novel pathway for endogenous production from propionate. *Am J Clin Nutr*. 2017; 105:1544–5.
- Winocour P D, Bryszewska C, Watala M L, Rand R M, Epanand R L, Kinlough-Rathbone M A, Packham and Mustad J F. Reduced membrane fluidity in platelets from diabetic patients. *Diabetes*. 1990; 39:241-4.

## Anexo

### 1.- Consumo de oxígeno al tiempo 4 de organismos inducidos

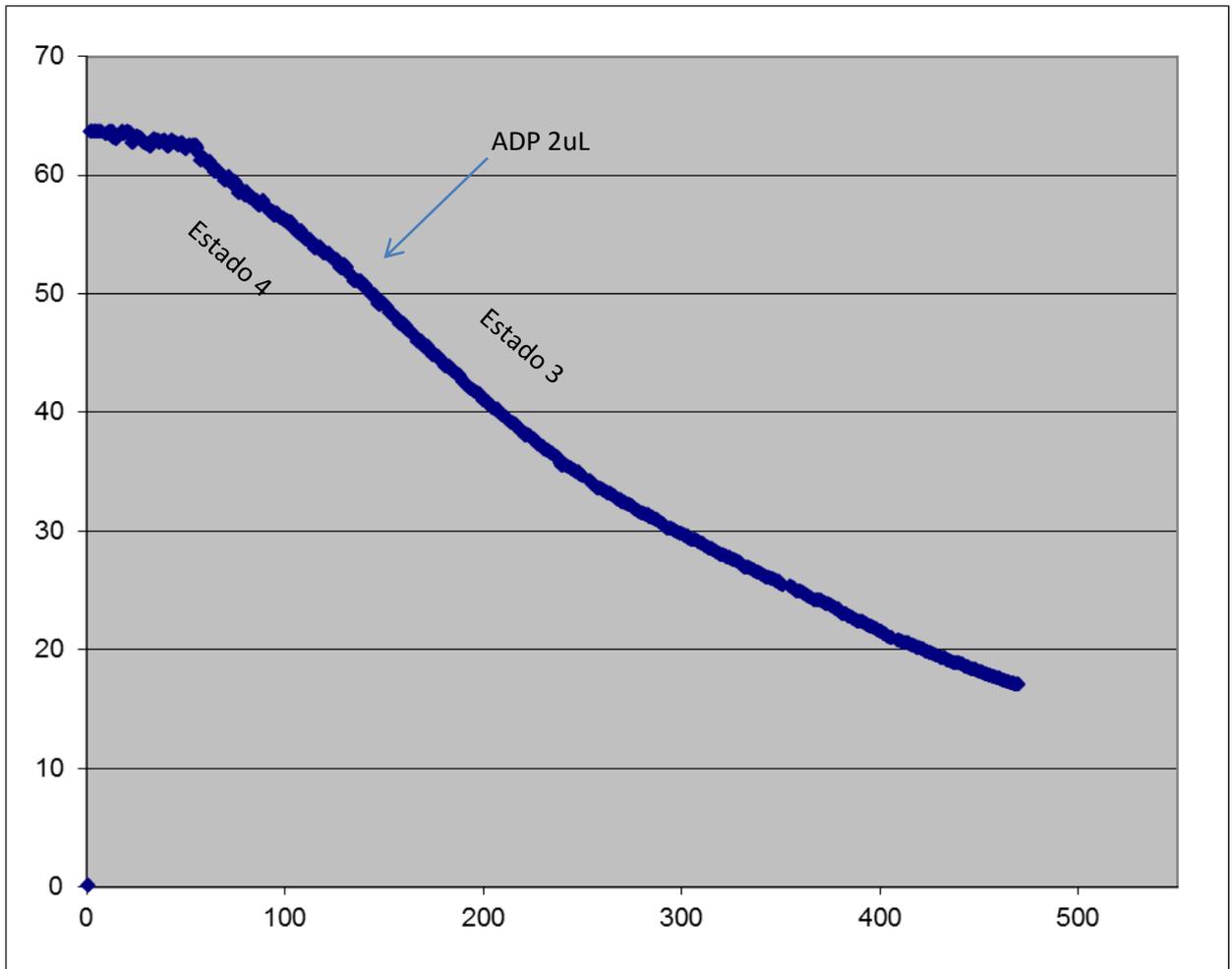


Figura 21. Respuesta reducida al ADP en ratas inducidas a hiperglicemia severa, lo que indica un desacoplamiento de la membrana.