



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 DE
CADENA CORTA Y LARGA EN MEMBRANAS
MITOCONDRIALES DE HÍGADO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A:

María Fernanda Campos Guzmán

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Ricardo Mejía Zepeda



Los Reyes Iztacala , Edo de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 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 a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT No. IN-215917-3 otorgado al Dr. Ricardo Mejía Zepeda, UBIMED. FESI-UNAM.

A mis sinodales

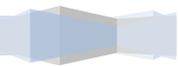
Dr. Hugo Virgilio Perales Vela

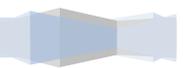
Dr. Ismael Herminio Pérez Hernández

Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro

Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

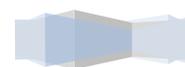




Índice

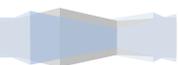
I.	Índice de Tablas.....	7
II.	Índice de Figuras.....	8
III.	Abreviaturas.....	10
	RESUMEN.....	11
1	INTRODUCCION.....	13
1.1	Diabetes Mellitus.....	13
1.2	Hígado.....	15
1.3	Membranas.....	16
1.4	Mitocondrias.....	16
1.5	Tratamiento para el control de la diabetes.....	18
1.5	Importancia de los ácidos grasos.....	19
2	JUSTIFICACIÓN.....	22
3	HIPÓTESIS.....	22
4	OBJETIVOS.....	23
4.1	General.....	23
4.2	Objetivos particulares:.....	23
5	MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
5.1	Reactivos.....	24
5.2	Animales de experimentación.....	24
5.3	Inducción de diabetes mellitus tipo 2.....	25
5.4	Diseño del experimento.....	25
5.5	Administración de ácidos grasos omega 3.....	26
5.6	Cuantificación de los parámetros fisiológicos: peso y glucosa sanguínea.....	26
5.7	Obtención de las muestras.....	27
5.8	Metodología para aislamiento de mitocondrias de tejido hepático.....	27
5.9	Control Respiratorio.....	28
5.10	Obtención de metil-esteres.....	28
5.11	Análisis por cromatografía de gases.....	29
5.12	Análisis estadístico.....	29

6 RESULTADOS	30
6.1 Peso corporal y glucosa sanguínea	30
.....	33
6.2 Cambios metabólicos de ratas CN y STZ a un mes de edad.....	34
6.2.1 Composición de ácidos grasos de tejido y mitocondrias de hígado	34
6.2.2. Respiración Mitocondrial	35
6.3 Cambios metabólicos de las ratas a 3 meses de edad	37
6.3.1 Composición de ácidos grasos de tejido y mitocondrias de hígado	37
6.3.2. Respiración Mitocondrial	42
6.4 Cambios metabólicos de las ratas a 6 meses de edad	43
6.4.1 Composición de ácidos grasos de tejido y mitocondrias de hígado	43
6.4.2. Respiración Mitocondrial	48
7 DISCUSIÓN.....	49
7.1 Desarrollo del modelo de diabetes y efecto de los ácidos grasos ω 3 en el control de la glicemia	49
7.2 Conversión de ALA a EPA y DHA.....	51
7.3 Mitocondrias de Hígado: Respiración y Fluidez membranal.....	52
Conclusiones.....	56
Literatura citada	57
Apéndice I.....	64



I. Índice de Tablas

Tabla 1 Hipoglucemiantes Orales (Tomado de Almeida <i>et al.</i> , 2009).....	19
Tabla 2. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) de ratas CN y STZ a un mes de edad.....	34
Tabla 3.Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias (arriba) y tejido hepático (abajo) de ratas CN y STZ con sus respectivos tratamientos a 3 meses de edad.....	37
Tabla 4 Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias (arriba) y tejido hepático (abajo) de ratas CN y STZ con sus respectivos tratamientos a 6 meses de edad.....	44



II. Índice de Figuras

Figura 1 Funciones de los ácidos grasos poliinsaturados.....	20
Figura 2 Esquema de tratamientos	26
Figura 3. Peso corporal de los grupos de ratas Wistar normoglicémicas (CN), inducidas a diabetes (STZ) y sus respectivos grupos tratados con ácidos grasos omega 3 de cadena larga (ω 3-L) (EPA y DHA) o con ácidos grasos omega 3 de cadena corta (ω 3-C) (α -Linolénico) durante los 6 meses de vida.....	31
Figura 4. Concentración de glucosa sanguínea de ratas Wistar normoglicémicas (CN), inducidas a diabetes (STZ) y sus respectivos grupos tratados con ácidos grasos omega 3 de cadena larga (ω 3-L) o de cadena corta (ω 3-C) a partir de un mes de edad.	33
Figura 5. Índice de fluidez membranal (ácidos grasos insaturados sobre saturados) de los grupos CN y STZ de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a un mes de edad	35
Figura 6. Velocidad de respiración mitocondrial a 1 mes de edad. Respiración en estado 3 (E3) y respiración en estado 4 (E4). CN n= 4; STZ =3.....	36
Figura 7. Control respiratorio mitocondrial (E3/E4) de ratas CN y STZ a un mes de edad. CN n= 4; STZ n=3. (* p < 0.05).....	36
Figura 8. Diferencias en la composición de ácidos grasos de mitocondrias del grupo STZ a tres meses de edad.	38
Figura 9. Contenido de ácido esteárico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a tres meses de edad. CN n= 3; CN ω 3-C n=3; CN ω 3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω 3-C n=4-6; STZ ω 3-L n=6 (* p <0.05; *** p <0.001).	39
Figura 10. Contenido de ácido Oleico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a tres meses de edad. CN n= 3; CN ω 3-C n=3; CN ω 3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω 3-C n=4-6; STZ ω 3-L n=6 (* p <0.05; *** p <0.001).	39
Figura 11 Contenido del ácido Linoleico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido (derecha) a tres meses de edad. CN n= 3; CN ω 3-C n=3; CN ω 3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω 3-C n=4-6; STZ ω 3-L n=6 (* p <0.05; ** p < 0.01; *** p <0.001).	40
Figura 12. Índice de Fluidez membranal (I/S) de mitocondrias de todos los grupos a 3 meses de edad. CN n= 3; CN ω 3-C n=3; CN ω 3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω 3-C n=4-6; STZ ω 3-L n=6 (* p <0.05). 41	

Figura 13 Índice de insaturación del tejido (hígado) de todos los grupos a 3 meses de edad. CN n= 3; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω3-C n=4-6; STZ ω3-L n=6 (*p <0.05).....	41
Figura 14. Actividad mitocondrial a 3 meses de edad, respiración en estado 3 (E3) y respiración en estado 4 (E4); CN n= 3; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω3-C n=4-6; STZ ω3-L n=6.	42
Figura 15. Control Respiratorio (CR) mitocondrial (E3/E4) todos los grupos a tres meses de edad. CN n= 3; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω3-C n=4-6; STZ ω3-L n=6 (*p < 0.05).....	43
Figura 16. Contenido de ácido esteárico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a seis meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (*p <0.05; **p < 0.01; ***p <0.001).....	45
Figura 17. Contenido de ácido Oleico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a seis meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (*p <0.05; **p < 0.01; ***p <0.001).	46
Figura 18. Contenido de ácido linoleico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a seis meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (*p <0.05; **p < 0.01; ***p <0.001).....	46
Figura 19. Índice de Fluidez membranal (I/S) de mitocondrias de todos los grupos a 6 meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6	47
Figura 20 Cociente instauración del tejido de todos los grupos a 3 meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (*p <0.05).	47
Figura 21. Respiración mitocondrial a 6 meses de edad. Velocidad de respiración en estado 3 (E3) y en estado 4 (E4) CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (*p <0.05; **p < 0.01; ***p <0.001).	48
Figura 22 Control Respiratorio mitocondrial (E3/E4) de ratas CN, CN-W3C, CN-W3L, STZ, STZ-W3C y STZ-W3L a seis meses de edad. CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6	48



III. Abreviaturas

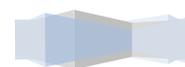
ALA	Ácido α -Linolenico
DHA	Ácido Docosahexanoico
EPA	Ácido Eicosapentanoico
ATP	Adenosín trifosfato
DM	Diabetes mellitus
DM2	Diabetes mellitus Tipo 2
CR	Control Respiratorio
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiletér)-N,N,N'N'-tetraacético
GLUT	Glucotransportador
PPARS	Receptores activadores por proliferación del peroxisoma
STZ	Estreptozotocina / Grupos inducidos



RESUMEN

El estilo de vida moderno, junto con la disponibilidad de alimentos industrializados, ha propiciado el incremento notable de las tasas de sobrepeso y obesidad registradas en todos los grupos de edad, así como el aumento de la morbilidad y la mortalidad por enfermedades crónico degenerativas. Dentro de estas patologías se encuentra la Diabetes mellitus tipo 2 (DM2), síndrome caracterizado por la pérdida progresiva de la acción de la insulina derivada de la resistencia a la misma lo que resulta en una condición de hiperglicemia crónica. Diferentes investigaciones señalan que hay una interacción significativa entre las alteraciones de las membranas y el desarrollo de esta patología. Los ácidos grasos ω 3 de cadena larga eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) han sido utilizados en las últimas décadas como una opción complementaria en el tratamiento de DM2. Sin embargo, cabe destacar que también existen ácidos grasos ω 3 de cadena corta como el ácido alfa linolénico (ALA, precursor de EPA y DHA) los cuales no han sido estudiados con tanta profundidad y que probablemente podrían tener efectos similares en el control de la glicemia. También hay que resaltar que se tiene poca evidencia de los efectos que tienen tanto en la función celular como en la salud de los individuos que no padecen algún desorden metabólico. Por lo anteriormente mencionado el objetivo general fue determinar el efecto de los ácidos grasos Omega-3 de cadena corta (ALA) y larga (EPA y DHA) sobre las propiedades fisicoquímicas de membranas de mitocondrias de hígado de ratas Wistar y su repercusión en la actividad mitocondrial durante el desarrollo incipiente de la diabetes. Para la realización del estudio se utilizaron 70 ratas wistar macho de 48 horas de nacidas, de los cuales 35 fueron inducidos a un modelo de diabetes tipo 2 mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina 130 mg/kg de peso corporal, en un volumen de 50 μ L de amortiguador de citratos a pH de 4.6 y a 35 (animales del grupo control) se les administró únicamente el amortiguador de citratos vía intraperitoneal. Cada grupo se dividió en tres tratamientos de la siguiente manera: animales no suplementados (CN o STZ), animales con suplemento de ácidos grasos omega-3

de cadena larga (W3L) y animales con suplemento de ácidos grasos de cadena corta (W3C). Se realizaron sacrificios a 1, 3 y 6 meses de edad. De todos los animales se obtuvieron mitocondrias y tejido hepático. La composición de ácidos grasos se obtuvo por cromatografía de gases, el análisis estadístico se realizó mediante el cálculo de las medidas de tendencia central. Así mismo, se realizó un análisis inferencial mediante el uso de ANOVA de dos vías con prueba de Tukey con el programa Graphpad Prism 8. La hiperglicemia generada fue muy ligera, simulando las etapas iniciales del desarrollo de la diabetes; se observó alteración en el control de la glicemia y se generó una tendencia a una menor ganancia de peso corporal. El suministro de los ácidos grasos omega 3, tanto de cadena larga como de cadena corta, ayudó parcialmente a contrarrestar esta condición. En mitocondrias hepáticas, el modelo de hiperglicemia ligera altera las velocidades de respiración, aunque el control respiratorio de las mitocondrias de hígado, aunque no es diferente del control, tiende a disminuir, tanto por la inducción a diabetes como por el suministro de ácidos grasos omega 3, excepto en ratas control con ácidos grasos omega 3 de cadena corta. El análisis de cromatografía de gases no mostró cambios drásticos en la composición de ácidos grasos, sin embargo, sí se observaron diferencias en algunos ácidos grasos particulares. El porcentaje de ácido esteárico es mayor en las mitocondrias que en el tejido. Por el contrario, el oleico, es mayor en el tejido que en las mitocondrias. En conclusión, se puede afirmar que aun cuando el desarrollo de la diabetes no es evidente, se están generando alteraciones tanto en la bioenergética mitocondrial como en el metabolismo de lípidos en el hígado; además, el tiempo de exposición a la hiperglicemia parece jugar un papel importante en el desarrollo de la patología.



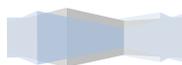
1 INTRODUCCION

Todos los seres vivos requieren de nutrientes con el fin de obtener energía, regular procesos metabólicos y agregar moléculas a su estructura para así continuar su ciclo de vida. Las fuentes nutrimentales son múltiples y variadas desde los carbohidratos, proteínas y lípidos seguidos por subproductos de estas mismas biomoléculas (Voet y Voet, 2006).

La mayor disponibilidad de alimentos industrializados, ricos en azúcares y grasas es un patrón conocido como “dieta occidental” (Popkin, 1993) que se ha asociado al incremento notable de las tasas de sobrepeso y obesidad registradas en todos los grupos de edad así como el aumento de morbilidad y mortalidad por enfermedades crónico degenerativas (Gracia, 2007). Dentro de estas patologías podemos encontrar a la Diabetes mellitus cuya prevalencia e incidencia en México es cada vez mayor (Andrade, 2002).

1.1 Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es un síndrome en el cual se involucran varios procesos patogénicos que van desde la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas con la consiguiente deficiencia de insulina, hasta anomalías que resultan en resistencia a la acción de la insulina (Pérez-Hernández, 2011). La DM se caracteriza por un aumento en la concentración de glucosa sanguínea de los organismos que la padecen (hiperglicemia) que puede acompañarse con la alteración del metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (American Diabetes Association, 2014).



La insulina es una hormona peptídica sintetizada por las células β pancreáticas (McKee, 2014) que se encarga de la homeostasis de la glucosa en sangre; además, participa en la regulación del metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, por ejemplo, estimulando la producción de ácidos grasos en el hígado como respuesta a una mayor producción de piruvato y NADPH, favoreciendo la captación de aminoácidos a nivel muscular y promoviendo la síntesis y almacenamiento del glucógeno (Alexsanderson, 2009). Así, podemos entender que las anomalías en la síntesis y acción de la insulina generadas durante el desarrollo de la DM desencadenan una serie de fallos metabólicos que se ven reflejados a nivel de órganos y a nivel celular.

Existen diferentes tipos de diabetes, Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) que se da como resultado de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas y conlleva a una deficiencia absoluta de insulina. Diabetes gestacional caracterizada por la presencia de cualquier grado de intolerancia a la glucosa durante el embarazo y finalmente, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) en donde existe pérdida progresiva de la acción de la insulina derivada de la resistencia a la misma (ADA, 2015).

La DM2 es la forma más frecuente de diabetes, se caracteriza por trastornos de la acción (resistencia a la insulina) y/o de la secreción de insulina y corresponde al 90% de los pacientes diabéticos. Se sabe que los factores genéticos y ambientales influyen en el establecimiento de dicha patología, sin embargo, los mecanismos por los que se desarrolla aún no se han descifrado en su totalidad (Malecki, 2005, Dey y Swaminathan 2010, Flachs *et al.*, 2014).

La resistencia a la insulina se desarrolla por el déficit en la unión de dicha hormona a sus receptores, así como por la insensibilización de dichos receptores. El sobrepeso y la obesidad son los factores de mayor riesgo para el desarrollo de la resistencia a la insulina (Bailey, 2007). La hiperglucemia es la característica bioquímica fundamental de la DM2, causando estrés oxidativo (Brownlee, 2005).

1.2 Hígado

El hígado es el órgano más grande en humanos, ocupa aproximadamente de 2 a 3% del peso total del cuerpo (Abdel-Misih y Bloomston, 2010). Es uno de los órganos más complejos del organismo y de acuerdo a Hall (2016) desempeña diferentes funciones dentro del mismo como son:

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

De igual forma el hígado regula la salida de glucosa (GLC) al torrente sanguíneo por medio de un ciclo dinámico entre el hígado y las células beta del páncreas (Matthews, 2010). La insulina (secretada por las células beta del páncreas) regula la secreción de GLC por parte del hígado al torrente sanguíneo y estimula la absorción de GLC por músculo, tejido adiposo y el mismo hígado, resultando en una baja en la glucemia. La hipoglucemia nuevamente estimula al hígado a producir GLC por medio de la glucogenólisis y gluconeogénesis y la libera al torrente sanguíneo, regulando así las concentraciones de GLC (Wasserman, 2008).



Durante el desarrollo de DM2 los efectos de la hiperglicemia crónica desencadenan un estado de glucotoxicidad que puede afectar al hígado (Rull *et al.*, 2009), diferentes autores indican que existen mecanismos y modificaciones de la célula relacionadas con el establecimiento de la DM2, incluyendo alteraciones en la composición de los ácidos grasos de las membranas celulares y mitocondriales (Waczulikova 2007, Pérez-Hernández *et al.*, 2010, Figueroa-García *et al.*, 2015).

1.3 Membranas

Como se mencionó anteriormente la glucotoxicidad desencadenada por DM2 puede dañar diversas estructuras celulares entre las que se encuentran las membranas.

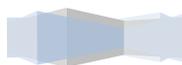
Pilon (2016) afirma que las membranas de distintas células tienden a ser más rígidas o menos fluidas con el desarrollo de DM2. La fluidez de estas membranas depende en gran medida del porcentaje de ácidos grasos insaturados y saturados presentes en los fosfolípidos que las conforman (Mckee y Mckee, 2014) y con la alteración de dicha fluidez se pueden ver afectados algunos procesos de transporte, así como la actividad de ciertas enzimas (Bloom *et al.*, 1991).

1.4 Mitocondrias

Las mitocondrias son orgánulos celulares que básicamente se encuentran formados por membranas, en ellas tienen lugar diferentes procesos metabólicos. El mejor conocido es la fosforilación oxidativa, proceso mediante el cual se produce ATP. Otras vías, como la beta-oxidación, el ciclo del ácido tricarbóxico, el metabolismo de algunos aminoácidos y la síntesis del grupo hemo también se llevan a cabo en las mitocondrias. Por lo tanto, se podría decir que las

mitocondrias funcionan como reguladores metabólicos (Picard *et al.*, 2016). La fosforilación oxidativa es dependiente del flujo de electrones que tiene lugar en cuatro complejos proteicos que se encuentran embebidos en la membrana mitocondrial interna, que en su conjunto se denomina cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones (Stryer *et al.*, 2013). Por su parte la cadena respiratoria es un complejo sistema de cuatro enzimas (I-IV) que produce un gradiente electroquímico utilizado para la síntesis de ATP por la ATP sintasa (complejo V). Todo el proceso integra la fosforilación oxidativa y se encuentra en las crestas mitocondriales. Cualquier falla de fosforilación oxidativa promueve una menor disponibilidad de ATP y desequilibrio energético. 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 esfingomielininas 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). 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 β -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).

Las mitocondrias representan un blanco importante para la intervención terapéutica aun cuando el daño al orgánulo no es el evento patológico inicial (Murphy, 2009).

1.5 Tratamiento para el control de la diabetes

El tratamiento de la DM2 es muy complejo, en general los fármacos utilizados en el tratamiento de la DM2 tienen un efecto hipoglucemiante (Acaso 2014). Existen, básicamente, dos grupos principales de fármacos para el tratamiento de la hiperglicemia (Tabla 1) aquellos que mejoran la sensibilización de la insulina sin elevar la secreción de la misma, llamados sensibilizadores y aquellos que aumentan la concentración de insulina circulante los secretágonos, que estimulan la secreción por el páncreas (Almeida *et al.*, 2009).

Sin embargo, en las últimas décadas ha surgido interés por la utilización de tratamientos alternativos, entre los que se encuentra el uso de ácidos grasos omega 3, 6 y 9 a los cuales se les han atribuido bondades tanto terapéuticas como nutricionales (Romero-Márquez, 2011). Se sabe que estas moléculas además de ser constituyentes esenciales de las membranas biológicas también desempeñan funciones importantes en diversos tejidos (Voet y Voet, 2006).



Tabla 1 Hipoglucemiantes Orales (Tomado de Almeida *et al.*, 2009).

		Principio Activo
Secretagogos	Sulfas	Clorpropamida Glibenclamida Glimepirida Glipizida Gliciazida
	Glinidas	Repaglinida Nateglinida
Sensibilizadores	Biguanida	Metformina
	Glitazonas	Roziglitazona Pioglitazona

1.5 Importancia de los ácidos grasos

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con grupos laterales hidrocarbonados de cadena larga que rara vez se encuentran libres en la naturaleza (Voet y Voet, 2006). Estos ácidos grasos pueden ser clasificados según la longitud de su cadena y/o su grado de insaturación, ya sea como ácidos grasos de cadena corta y larga o como ácidos grasos insaturados y saturados (Stryer *et al.*, 2013).

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) tienen funciones heterogéneas y de gran importancia en mamíferos (Figura 1). Son componentes estructurales de las membranas celulares, por lo tanto regulan diversas propiedades físicas y químicas de las mismas. En ese sentido se ha reportado que un incremento de AGPI en las membranas aumenta la fluidez mientras que los ácidos grasos saturados tienen el efecto contrario, es decir, generan una mayor rigidez a la membrana (Jump 2002; Leonard *et al.*, 2004).

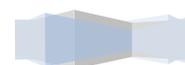




Figura 1 Funciones de los ácidos grasos poliinsaturados

El aumento en la fluidez membranar puede influir en la función y actividad de receptores y enzimas asociadas a las membranas celulares (Leonard *et al.*, 2004). Asimismo, se ha reportado que el incremento en la fluidez membranar está asociado con un aumento de la afinidad de la insulina a sus receptores y en el aumento en el número de éstos sobre la superficie celular (Risérus, 2008).

Existen estudios que muestran los efectos del desarrollo de DM2 sobre las membranas biológicas en diferentes órganos. Pilon (2016) sugiere que con el desarrollo de DM2 las membranas de distintas células tienden a ser más rígidas.



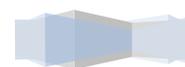
Al analizar la fluidez en membranas de eritrocitos de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con diabetes a diferentes edades (1, 3 y 6 meses de edad), desde el primer mes de edad, los animales diabéticos muestran una disminución de la fluidez membranal con respecto al grupo control. La composición de ácidos grasos muestra incremento de los ácidos grasos saturados, lo que se reflejó en un decremento en el cociente de insaturación (I/S). Estos resultados indican que cambios en la composición de ácidos grasos contribuyen significativamente en la disminución de la fluidez membranal (Pérez-Hernández *et al.*, 2010).

En otro estudio elaborado por Pérez y colaboradores (2017) se encontró un aumento de la fluidez membranal y un aumento del control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas con DM2 durante la etapa inicial de esta patología.

De forma similar Figueroa y colaboradores (2015) reportan que incluso una hiperglicemia ligera crónica genera un incremento de la lipoperoxidación, así como un aumento de la fluidez de la membrana mitocondrial placentaria aparentemente derivada de cambios en la composición de ácidos grasos y, en consecuencia, mal funcionamiento mitocondrial.

El estudio realizado en colaboración con el presente trabajo (Avendaño-Briseño, 2019) muestra que la hiperglicemia ligera tiene repercusiones en ciertos parámetros fisiológicos de las ratas, por otra parte la suplementación con ácidos grasos omega 3 de cadena larga (ω 3-L) ayudaron a la regulación parcial del control de la glicemia de los animales inducidos a DM2. Sin embargo la administración de ácidos grasos omega 3 de cadena corta (ω 3-C) y larga no mostró efecto sobre el índice de fluidez membranal de tejido y mitocondrias de cerebro, pero sí se generaron cambios particulares en ciertos ácidos grasos.

Los datos anteriores sugieren que la fluidez membranal y las funciones asociadas a esta no tienen un comportamiento único y en realidad dependen de muchos factores como el estado fisiológico, edad nutrición entre otros.

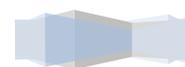


2 JUSTIFICACIÓN

Los ácidos grasos ω 3 de cadena larga EPA y DHA han sido utilizados en las últimas décadas no sólo como suplementos alimenticios sino también como una opción complementaria en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Sin embargo cabe destacar que EPA y DHA no son los únicos ácidos grasos ω 3 que existen, también se encuentran los ácidos grasos ω 3 de cadena corta como ALA (precursor de EPA y DHA) los cuales no han sido estudiados con tanta profundidad y que probablemente podrían tener efectos similares en el control de la glicemia atenuando así los cambios estructurales provocados por el desarrollo temprano de la DM2. También hay que resaltar que se tiene poca evidencia de los efectos que tienen tanto en la función celular como en la salud de los individuos que no padecen algún desorden metabólico. Por lo que el presente estudio pretende estudiar los cambios a nivel membranar de mitocondrias y tejido hepático en individuos normoglicémicos e hiperglicémicos que han sido tratados con ácidos grasos ω 3 tanto de cadena corta como de cadena larga.

3 HIPÓTESIS

Los ácidos grasos ω 3 de cadena corta y larga tendrán un efecto positivo en el control de la glicemia ayudando así a controlar parcialmente los cambios que desencadena el desarrollo de DM2, sin embargo este efecto será contrario en organismos normoglicémicos.



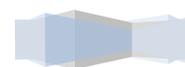
4 OBJETIVOS

4.1 General

El objetivo general del presente estudio fue determinar el efecto de los ácidos grasos Omega-3 de cadena corta (ALA) y larga (EPA y DHA) sobre las propiedades fisicoquímicas de membranas de mitocondrias de hígado de ratas Wistar y su repercusión en la actividad mitocondrial durante el desarrollo incipiente de la diabetes.

4.2 Objetivos particulares:

- Analizar el efecto de los ácidos grasos omega 3 de cadena corta y larga sobre la glicemia y el peso de los animales
- Analizar la composición de ácidos grasos del hígado
- Analizar la composición de ácidos grasos de mitocondrias
- Analizar la respiración mitocondrial
- Comparar las velocidades de consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 mitocondriales



5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo en su mayoría fueron grado reactivo de la marca Merck, sin embargo para la parte de cromatografía de gases, los solventes fueron grado HPLC. El trifluoruro de boro al 14% en metanol, la estreptozotocina y los estándares de metil ésteres de ácidos grasos, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich de México. El agua utilizada en todos los procedimientos experimentales fue bidestilada.

5.2 Animales de experimentación

Se utilizaron 10 ratas Wistar hembra de 4 meses de edad, con un peso promedio de 250 g, albergadas en forma individual en jaulas de polisulfonato, en condiciones de bioterio: temperatura de 22 °C, humedad de 54 %, un sistema de luz/obscuridad de 12 horas y con suministro de agua y alimento ((Labdiet 5008, Pet-Food ©) *ad libitum*). Se realizó frotis vaginal a los animales para diagnosticar el estro, aquellas que resultaron positivas se pusieron con machos sanos de la misma estirpe toda la noche para su apareo. Durante la mañana se realizó diagnóstico de apareo mediante frotis vaginal. La hembras positivas a apareo se albergaron de forma individual, a los 12 días pos-coito se confirmó la gestación mediante palpación abdominal (gravidéz de los cuernos uterinos). Las hembras positivas a gestación fueron mantenidas en forma individual y monitoreadas hasta el parto, momento en el cual se seleccionaron los machos formando pares por camada para obtener un animal control y un tratado de la misma madre. Las hembras fueron eliminadas de las camadas. Los animales de cada grupo fueron elegidos en un sistema completamente aleatorizado para formar dos grupos de 35 individuos cada uno.



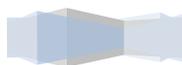
5.3 Inducción de diabetes mellitus tipo 2

Para la realización del estudio se utilizaron 70 machos, de los cuales 35 (animales del grupo diabético) fueron inducidos a un modelo de diabetes tipo 2 mediante la administración intraperitoneal de una dosis de 130 mg/kg de peso de estreptozotocina, en un volumen de 50 μ L de amortiguador de citratos a pH de 4.6, entre las 48 y 72 horas de vida y a 35 (animales del grupo control) se les administró únicamente el amortiguador de citratos vía intraperitoneal.

Los animales se mantuvieron con la madre hasta el destete (cuatro semanas de edad) y posteriormente se albergaron en grupos de 3 animales, en cajas de polisulfonato y fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas oscuridad a 22 °C; con alimento (Labdiet 5011 Pet-Food ©) y agua *ad libitum*.

5.4 Diseño del experimento

Se formaron dos grupos de 35 animales cada uno; grupo control o animales no inducidos (CN) y grupo diabético o animales inducidos (STZ). Cada grupo se dividió en tres tratamientos (con 5 animales cada uno) de la siguiente manera: animales no suplementados (CN o STZ), animales con suplemento de ácidos grasos omega-3 de cadena larga (W3L) y animales con suplemento de ácidos grasos de cadena corta (W3C). Se realizaron sacrificios a 1, 3 y 6 meses de edad (Figura 2).



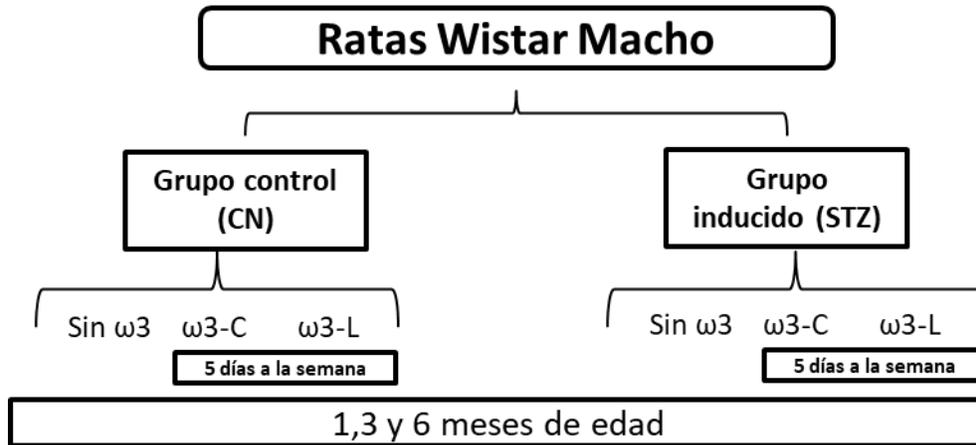


Figura 2 Esquema de tratamientos

5.5 Administración de ácidos grasos omega 3

Los ácidos grasos omega 3 fueron suplementados a dosis de 200 mg/kg de peso, vía oral, iniciando el tratamiento a los 30 días de edad. El esquema que se utilizó fue 5 días por semana, con una n de 5 animales por tratamiento. La duración de los tratamientos fue de 1, 3 ó 6 meses. Se utilizó como fuente de ácidos grasos: aceite de salmón para el tratamiento ω 3-L y aceite de linaza para el tratamiento ω 3-C.

5.6 Cuantificación de los parámetros fisiológicos: peso y glucosa sanguínea

La determinación de la concentración de glucosa en sangre (tiras reactivas para glucosa y equipo **Accu-Chek Active®** de Roche) y peso (báscula digital Original Kaiser) una vez por semana a partir de la cuarta semana y hasta las 24 semanas



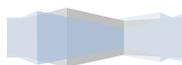
de edad. Para la realización de las pruebas se mantuvo a los animales en ayuno durante 4 horas y las mediciones se realizaron a las 12:00 AM.

5.7 Obtención de las muestras

Concluido el tiempo de tratamiento los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico a una dosis de 40 mg/Kg de peso corporal, vía intraperitoneal. Los animales se sacrificaron por exsanguinación. Se realizó una incisión profunda en línea media abdominal, se extrajo el hígado completo y se colocó en solución salina fisiológica para su lavado.

5.8 Metodología para aislamiento de mitocondrias de tejido hepático

Con un homogenizador de vidrio tipo Potter Elvehjem se homogenizó el tejido hepático en medio H (10 mL por gramo de tejido), el cual contiene 0.07 M de sacarosa, 0.21 M de manitol, 20 mM de HEPES, albúmina bovina libre de ácidos grasos al 0.05 %, con un pH final de 7.4. Todo el procedimiento se llevó a cabo en hielo. La obtención de las mitocondrias se hizo mediante la centrifugación diferencial del homogenado en una centrífuga Sorvall ST-16R con refrigeración y rotor Fiberlite F15-6x100y de Thermo Scientific. El esquema de centrifugaciones fue el siguiente: 10 min a 2,500 rpm y se colectó el sobrenadante; 10 min a 7,500 rpm y se colectó la pastilla, la cual se incubó por 30 min en medio H con BSA 0.5%. Se resuspendió la pastilla en medio H y finalmente se centrifugó a 9,000 rpm por 10 min y se colectó la pastilla en medio H. Se cuantificó la proteína por el método de Bradford (1976).



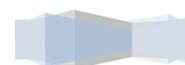
5.9 Control Respiratorio

La respiración mitocondrial fue evaluada con la medición de consumo de oxígeno. Para ello se utilizó un electrodo de Clark, acoplado a una cámara de incubación de 1.5 mL que contenía medio de respiración (Succinato 10mM, Sacarosa 250mM, MgCl₂ 10mM, H₃PO₄ 10mM, EGTA 1.1mM y Albúmina bovina al 0.1% a pH 7.4) y cerrada con tapón de vidrio esmerilado. La temperatura de la reacción se mantuvo constante a 37°C mediante un baño de recirculación termostatzado conectado a la cámara de reacción.

La respiración mitocondrial se evaluó en los estados 3 (alto contenido de ADP y sustrato) y 4 (bajo contenido de ADP y alto de sustrato) para calcular el control respiratorio (Velocidad en estado 3/estado 4).

5.10 Obtención de metil-esteres

La obtención de metil ésteres se realizó por el método de Morrison y Smith (1964) con ligeras modificaciones utilizando la fracción mitocondrial completa o el homogenado de tejido. Se utilizaron 50 µl de la fracción mitocondrial (o tejido), adicionando 1ml de trifloruro de boro, posteriormente se pusieron en atmósfera de nitrógeno y se colocaron a baño maría a punto de ebullición (92°C) por 30 minutos. Después de la transesterificación se adicionaron 2ml de hexano y 1 de agua a cada muestra, se homogenizaron y se centrifugaron a 1000rpm durante 5 minutos; se recuperó la fase hexánica con pipetas Pasteur con bulbo y se trasladó a otro recipiente, se evaporó el hexano con nitrógeno gaseoso y finalmente se almacenaron a -20°C protegidos de la luz con papel aluminio.



5.11 Análisis por cromatografía de gases

Los reactivos y solventes utilizados para este análisis fueron grado HPLC. Se resuspendieron los metil ésteres de ácidos grasos con 100 μ l de hexano HPLC y se inyectó 4 μ l en el cromatógrafo de gases Clarus 500 de Perkin Elmer controlado por computadora, equipado con detector de ionización de flama (FID) y una columna capilar omegawax marca Supelco de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro interno y grosor de 0.25mm. 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 temperatura a la que es mantenido durante 18 minutos más, para un tiempo total de 35 min. La identidad de los ácidos grasos se obtuvo por comparación de los tiempos de retención con metil ésteres estándares. Para la cuantificación de ácidos grasos se hizo una integración del área bajo la curva de cada uno de los picos detectados.

5.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el cálculo de las medidas de tendencia central: promedio y desviación estándar de los datos obtenidos. Así mismo se realizó un análisis inferencial mediante el uso de ANOVA de dos vías con prueba de Tukey con el programa Graphpad Prism 8.



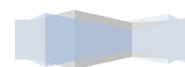
6 RESULTADOS

6.1 Peso corporal y glucosa sanguínea

Los resultados de este trabajo son parte de un proyecto de investigación que incluyó el análisis del efecto que los ácidos grasos omega 3 de cadena corta (ALA) y de cadena larga (EPA y DHA), tuvieron sobre el desarrollo de una hiperglicemia ligera. Asimismo, estaba en el interés de esta investigación analizar el efecto que estos ácidos grasos omega 3 tuvieron sobre la composición de ácidos grasos del hígado (esta Tesis) y de cerebro (Avendaño-Briseño 2019, Tesis de Licenciatura), así como sobre la composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales de dichos órganos y la respiración mitocondrial. Así, aunque las curvas de crecimiento y las glicemias ya han sido expuestas en otra tesis (Avendaño-Briseño 2019), al ser parte de este trabajo y para una mejor comprensión de los resultados aquí obtenidos, se presentarán gráficas de dichos datos para que el trabajo sea comprensible para el lector.

Del lado izquierdo de la figura 3 se presentan las curvas de ganancia de peso de los grupos control y del lado derecho las curvas de ganancia de peso de los grupos inducidos a diabetes mediante STZ. Como se puede observar en la figura 3 el peso corporal promedio del grupo control sin tratamiento fue de 511 ± 62 g a los seis meses de edad siendo este mayor a todos los grupos. El grupo STZ sin tratamiento presentó menor ganancia de peso (454 ± 66 g) hasta el momento del sacrificio, lo cual significa que es 11.1% menor que el grupo control. Esto indica que aunque la inducción a diabetes no muestre claros síntomas, es suficiente para generar una menor ganancia de peso. Cuando se dio el suplemento con ácidos grasos ω 3-L el peso final de los animales fue 6.3% menor que el grupo control y con los ácidos grasos ω 3-C fue de 9.6% menor que el grupo control.

Con respecto a los grupos control tratados con ácidos grasos podemos observar que tanto el grupo CN ω 3-L y CN ω 3-C tuvieron una menor ganancia de peso



promedio con respecto al control, sobre todo el grupo CN ω 3-L en el cual su peso promedio fue de 426 ± 44 g.

En el caso de los grupos STZ que recibieron el tratamiento con ácidos grasos se observa que ambos grupos muestran una ligera ganancia de peso con respecto al grupo STZ, especialmente el grupo STZ ω 3-L (479 ± 45.6 g).

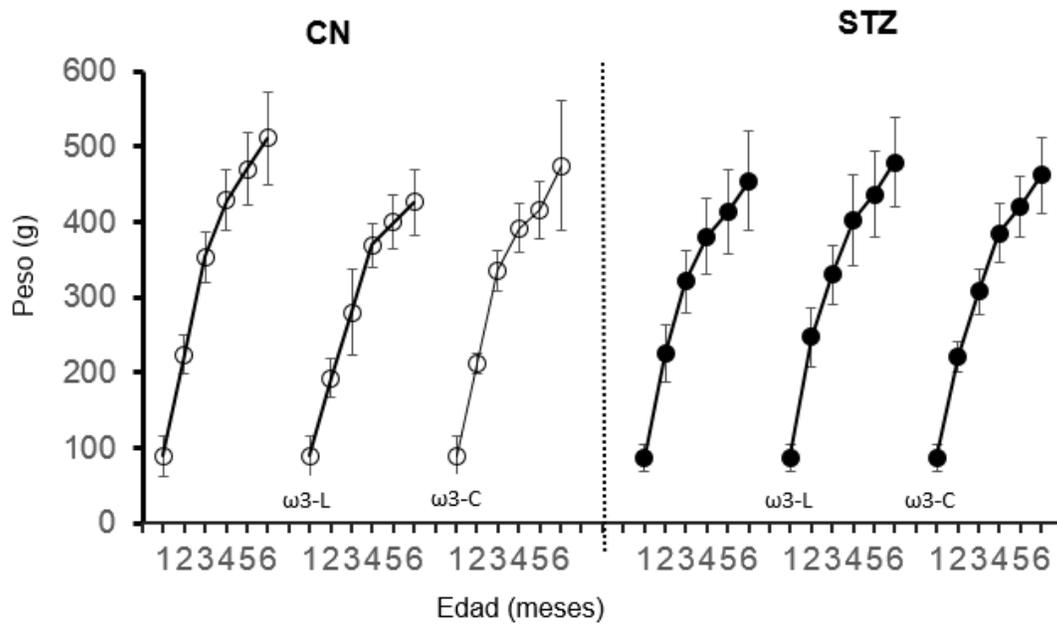


Figura 3. Peso corporal de los grupos de ratas Wistar normoglicémicas (CN), inducidas a diabetes (STZ) y sus respectivos grupos tratados con ácidos grasos omega 3 de cadena larga (ω 3-L) (EPA y DHA) o con ácidos grasos omega 3 de cadena corta (ω 3-C) (α -Linolénico) durante los 6 meses de vida.

En la figura 4 se muestran las glicemias promedio de todos los grupos experimentales. Este parámetro fisiológico se midió cada mes desde el momento del destete de los animales (1 mes de edad) y hasta el momento del sacrificio (6 meses de edad). En la gráfica se presentan los grupos CN (izquierda) y los grupos inducidos a DM2 (STZ) (derecha), ambas partes de la gráfica incluyen a los respectivos grupos con la administración de ácidos grasos omega 3.



En general se observa que las concentraciones promedio de glucosa sanguínea de los grupos CN con y sin tratamiento se mantienen en un intervalo de 80-110 mg/dL durante todo el tiempo experimental lo cual no refleja alteración aparente en este parámetro con la administración de los ácidos grasos.

En el caso de los grupos STZ se observa que la glicemia al primer mes de edad es mayor con relación a los grupos CN, lo que en principio refleja la inducción de los animales neonatos. La dispersión de los datos refleja el comportamiento “normal” de organismos que padecen DM2

En el grupo STZ sin tratamiento se puede apreciar que a medida que pasa el tiempo, la glicemia de este grupo disminuye aparentemente adoptando un comportamiento “normal” ya que si se compara con el grupo control parece no haber diferencia entre ambos grupos, principalmente en los dos últimos meses de vida.

La administración de ácidos grasos ω 3-L parece participar en el control de la glicemia ya que en la gráfica se observa que en el transcurso de los primeros tres meses la concentración de glucosa sanguínea comienza a disminuir y a partir del cuarto mes en adelante la glicemia se mantiene en concentraciones promedio aparentemente “normales” hasta el momento del sacrificio.

Por su parte la administración de los ácidos grasos ω 3-C también parece participar en el control de la glicemia, en la gráfica se puede apreciar una tendencia a disminuir las concentraciones de glucosa sanguínea en los primeros 4 meses de vida después del tratamiento, sin embargo, la última medición no permite aceptar por completo esta aseveración.



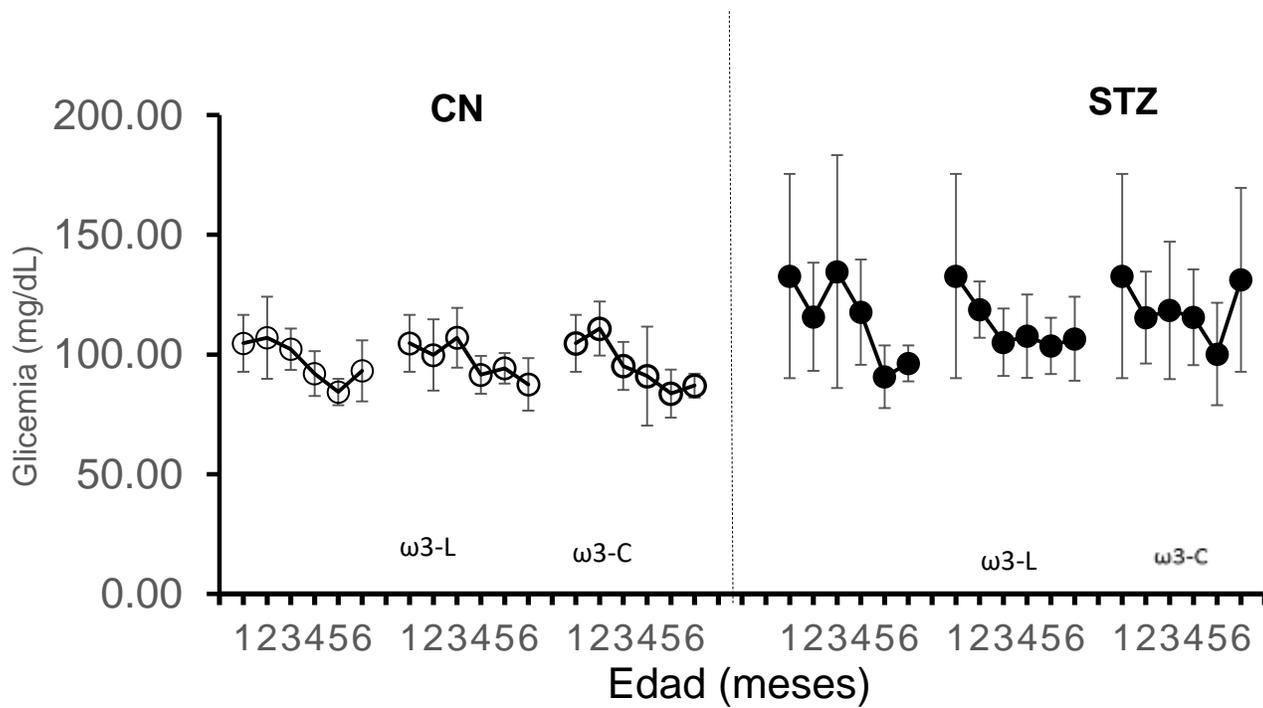
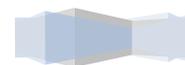


Figura 4. Concentración de glucosa sanguínea de ratas Wistar normoglicémicas (CN), inducidas a diabetes (STZ) y sus respectivos grupos tratados con ácidos grasos omega 3 de cadena larga (ω 3-L) o de cadena corta (ω 3-C) a partir de un mes de



6.2 Cambios metabólicos de ratas CN y STZ a un mes de edad

6.2.1 Composición de ácidos grasos de tejido y mitocondrias de hígado

Hasta el primer mes de edad, las ratas no recibieron ningún suplemento alimenticio por lo que las proporciones de AG que se muestran a continuación provienen de síntesis endógena y su alimentación (leche materna y alimento sólido).

En la tabla 2 se puede observar la composición de ácidos grasos de mitocondrias y tejido hepático del grupo CN y STZ a un mes de edad. En mitocondrias la composición de ácidos grasos no muestra diferencias significativas. Por otro parte, la composición del tejido sólo muestra diferencia en el ácido oleico el cual es aproximadamente 1.78 veces mayor con respecto a su control.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) de ratas CN y STZ a un mes de edad.

AG	Mitocondrias				Tejido			
	CN		STZ		CN		STZ	
Mirístico	0.40	± 0.21	0.30	± 0.03	0.50	± 0.11	0.50	± 0.18
Miristoleico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pentadecanoico	0.38	± 0.26	0.32	± 0.14	0.45	± 0.15	0.56	± 0.16
Palmitico	15.81	± 6.66	17.10	± 1.21	19.08	± 4.82	20.90	± 4.464
Palmitoleico	1.01	± 0.92	0.29	± 0.25	0.79	± 0.73	0.40	± 0.24
Heptadecanoico	0.85	± 0.39	0.56	± 0.06	0.74	± 0.23	0.52	± 0.16
Estearico	19.47	± 3.70	17.93	± 3.49	19.32	± 5.22	17.48	± 3.94
Oleico	9.88	± 3.04	14.69	± 4.78	11.67	± 5.24	** 20.86	± 14.87
Linoleico	16.85	± 2.64	15.11	± 2.40	14.49	± 4.87	16.79	± 3.79
Gamma-linolénico	0.16	± 0.08	0.59	± 0.46	0.32	± 0.29	0.20	± 0.04
Linolenico	0.13	± 0.03	ND	ND	0.42	± 0.10	0.26	± 0.10
Araquidico	0.00	ND	ND	ND	0.45	± 0.28	0.03	ND
Eicosanoico	2.86	± 3.66	ND	ND	0.19	ND	0.18	ND
Araquidónico	18.11	± 2.96	16.05	± 0.67	14.36	± 1.90	12.28	± 5.53
EPA	1.31	± 0.79	2.12	± 1.68	2.71	± 1.95	0.85	± 0.81
Behenico	0.20	± 0.002	ND	ND	0.21	± 0.18	ND	ND
Erucico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	ND
DHA	11.04	± 0.78	9.97	± 1.21	8.79	± 1.96	6.58	± 2.16
Lignocérico	0.79	± 0.50	0.24	± 0.16	0.52	± 0.56	0.76	± 0.52
NI	2.66	± 1.47	2.99	± 3.68	6.85	± 9.84	1.34	± 1.37
Cociente I/S	1.43	± 0.43	1.61	± 0.55	1.3	± 0.34	1.42	± 0.95

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; ND, No detectados; I/S, insaturados sobre saturados. (** $p < 0.01$)



Por otra parte, el cociente de ácidos grasos insaturados sobre saturados (I/S) se utilizó como un índice de fluidez. En la figura 5 se muestra el índice de fluidez de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha). No se encontraron diferencias entre grupos (CN y STZ) y/o fracciones.

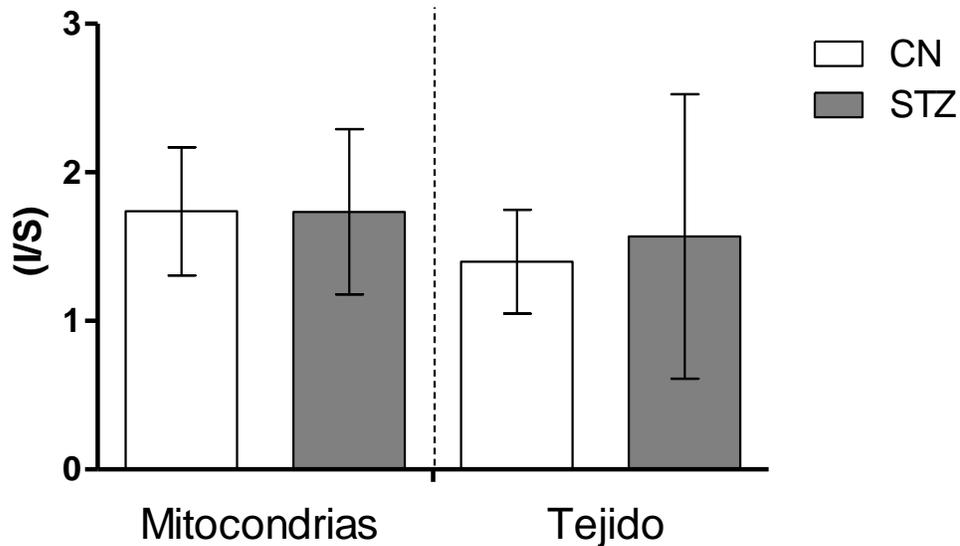


Figura 5. Índice de fluidez membranal (ácidos grasos insaturados sobre saturados) de los grupos CN y STZ de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a un mes de edad

6.2.2. Respiración Mitocondrial

Para conocer las modificaciones de la actividad mitocondrial durante el desarrollo de la diabetes se realizaron mediciones del consumo de oxígeno de las mitocondrias.

Al analizar los datos obtenidos de las mitocondrias de ratas de 1 mes de edad observamos que no existen diferencias en el consumo de oxígeno de los estados 3 y 4 entre el grupo control y diabético (Fig. 6).

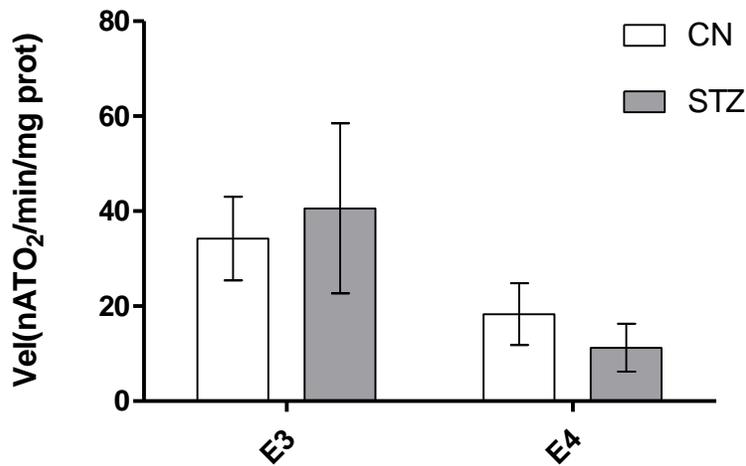


Figura 6. Velocidad de respiración mitocondrial a 1 mes de edad. Respiración en estado 3 (E3) y respiración en estado 4 (E4). CN n= 4; STZ =3.

A pesar de no presentar diferencias entre los estados 3 y 4 en la figura 6, en la figura 7 se muestra que en el Control Respiratorio (E3/E4) sí hay diferencias significativas del grupo STZ (3.7 ± 0.85) con respecto al grupo CN (2.0 ± 0.56) siendo 54% mayor que este último.

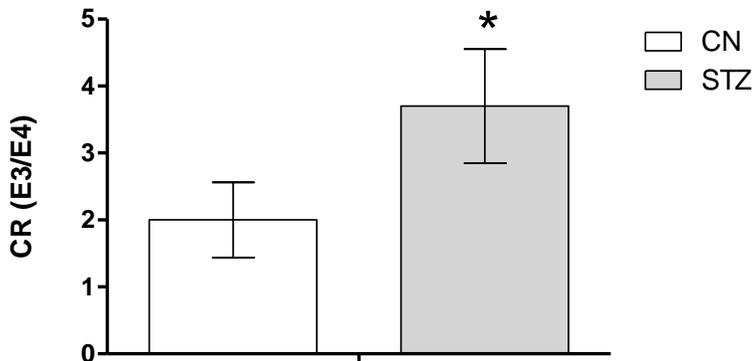
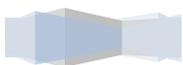


Figura 7. Control respiratorio mitocondrial (E3/E4) de ratas CN y STZ a un mes de edad. CN n= 4; STZ n=3. (* $p < 0.05$).



6.3 Cambios metabólicos de las ratas a 3 meses de edad

6.3.1 Composición de ácidos grasos de tejido y mitocondrias de hígado

Una vez cumplido el mes de edad se comenzó a suplementar a ambos grupos (CN y STZ) con ácidos grasos omega 3 de cadena corta o larga.

A continuación se muestra la composición de AG de mitocondrias y tejido hepático a 3 meses de edad (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias (arriba) y tejido hepático (abajo) de ratas CN y STZ con sus respectivos tratamientos a 3 meses de edad.

Ácido graso	MITOCONDRIAS											
	CN		STZ		CN ω3-C		CN ω3-L		STZ ω3-C		STZ ω3-L	
Mirístico	0.29		1.91	± 0.37	0.16	± 0.06	0.49	± 0.07	0.37	± 0.10	0.23	± 0.12
Miristoleico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pentadecanoico	0.29	± 0.02	0.30	± 0.05	0.15	± 0.08	0.38	± 0.13	0.23	± 0.06	0.27	± 0.11
Palmitico	17.36	± 2.56	*** 23.43	± 1.91	16.39	± 1.88	21.13	± 4.47	17.86	± 2.98	19.59	± 4.18
Palmitoleico	1.00	± 0.87	0.86	± 0.52	0.61	± 0.44	0.37	± 0.35	0.55	± 0.24	0.32	± 0.15
Heptadecanoico	0.55	± 0.04	0.80	± 0.05	0.65	± 0.23	0.65	± 0.18	0.51	± 0.09	0.54	± 0.08
Estearico	18.02	± 1.58	*** 22.73	± 3.29	*** 23.74	± 7.66	*** 27.56	± 6.89	20.26	± 3.27	17.78	± 5.65
Oleico	13.09	± 1.83	* 18.15	± 3.16	10.15	± 4.17	*** 5.27	± 3.55	*** 8.18	± 2.14	*** 5.28	± 2.622
Linoleico	19.47	± 2.58	* 11.14	± 1.21	20.16	± 4.70	19.41	± 6.42	* 22.84	± 2.30	* 23.26	± 3.38
Gamma-linolénico	0.31	± 0.40	0.06	± 0.02	0.58	ND	0.19	ND	0.24	± 0.17	0.14	± 0.18
Linolenico	0.34	± 0.24	0.10	± 0.03	ND	ND	ND	ND	0.32	± 0.05	ND	ND
Araquidico	0.10	ND	0.41	± 0.05	0.35	± 0.08	*** 9.36	ND	0.15	± 0.07	*** 7.0	± 2.18
Eicosanoico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Araquidonico	18.68	± 1.56	*** 13.55	± 2.35	21.42	± 4.76	16.89	± 4.98	21.35	± 2.50	*** 23.43	± 5.20
EPA	1.06	± 0.41	1.00	± 0.60	ND	ND	0.53	± 0.02	2.17	± 1.33	0.29	± 0.17
Behenico	0.87	ND	ND	ND	ND	ND	0.30	± 0.07	ND	ND	ND	ND
Erucico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DHA	7.13	± 2.52	5.17	± 2.23	5.67	± 1.69	3.86	± 1.89	4.45	± 1.79	4.93	± 1.84
Lignocericico	0.16	± 0.03	0.31	ND	0.25	± 0.07	0.73	± 0.40	0.11	± 0.08	0.18	± 0.18
NI	2.59	± 1.03	1.32	± 0.66	0.75	± 0.33	2.30	± 0.94	2.35	± 3.69	1.76	± 1.33
Cociente I/S	1.64	± 0.68	1.04	± 0.48	1.41	± 0.57	0.77	± 0.30	1.54	± 0.30	1.27	± 0.50
Ácido graso	TEJIDO											
	CN		STZ		CN ω3-C		CN ω3-L		STZ ω3-C		STZ ω3-L	
Mirístico	0.36	± 0.03	0.57	± 0.13	0.25	± 0.08	0.42	± 0.05	0.46	± 0.32	0.32	± 0.14
Miristoleico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pentadecanoico	0.30	± 0.04	0.44	± 0.30	0.20	± 0.04	0.28	± 0.03	2.91	± 8.41	0.22	± 0.07
Palmitico	18.81	± 1.35	21.21	± 3.12	20.41	± 2.85	20.35	± 1.84	19.36	± 8.16	21.30	± 4.16
Palmitoleico	1.26	± 0.80	2.85	± 3.87	0.77	± 0.39	0.82	± 0.24	0.50	± 0.30	0.92	± 0.82
Heptadecanoico	0.56	± 0.11	0.41	± 0.08	2.37	± 5.43	0.54	± 0.05	0.52	± 0.17	0.47	± 0.11
Estearico	14.17	± 1.46	*** 17.50	± 3.66	* 19.11	± 4.37	* 18.78	± 3.88	16.05	± 5.01	12.23	± 3.25
Oleico	15.25	± 2.03	7.97	± 3.22	*** 8.09	± 6.12	11.68	± 4.80	*** 7.07	± 2.82	* 11.01	± 3.11
Linoleico	19.83	± 1.12	21.84	± 3.60	*** 26.50	± 6.09	*** 25.43	± 1.71	22.49	± 5.65	*** 25.43	± 4.06
Gamma-linolénico	0.08	± 0.02	0.20	± 0.035	0.66	± 0.33	0.35	± 0.36	0.36	± 0.31	0.74	± 0.32
Linolenico	0.45	± 0.21	1.75	± 0.94	ND	ND	0.60	± 0.10	0.52	± 0.14	0.51	± 0.22
Araquidico	4.00	± 7.60	0.07	± 0.02	*** 12.5	± 10.79	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eicosanoico	ND	ND	0.13	± 0.04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.63	± 0.28
Araquidonico	16.49	± 1.33	18.09	± 2.37	19.71	± 8.11	14.81	± 5.82	*** 26.16	± 11.85	18.39	± 6.83
EPA	1.56	± 0.52	0.16	± 0.01	ND	ND	ND	± 0.15	0.20	ND	3.11	± 7.200
Behenico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.06	± 0.008
Erucico	ND	ND	1.60	± 0.06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DHA	8.04	± 0.724	3.91	± 1.02	* 3.65	± 1.98	4.32	± 1.51	4.09	± 1.09	4.72	± 1.95
Lignocericico	0.14	± 0.05	1.30	± 0.31	0.24	± 0.10	0.15	± 0.05	ND	ND	0.89	± 1.86
NI	3.28	± 0.58	2.53	± 1.67	0.93	± 0.60	2.00	± 1.19	1.06	± 0.57	2.34	± 2.29
Cociente I/S	1.64	± 0.12	1.36	± 0.54	1.08	± 0.27	1.44	± 0.35	1.56	± 0.36	1.80	± 0.43

En el caso de las mitocondrias, el grupo STZ presentó la mayor cantidad de cambios en cuanto a su composición; se muestran diferencias en 5 ácidos grasos (palmítico, esteárico, oleico, Linoleico y araquidónico) con respecto a sus controles (Figura 8).

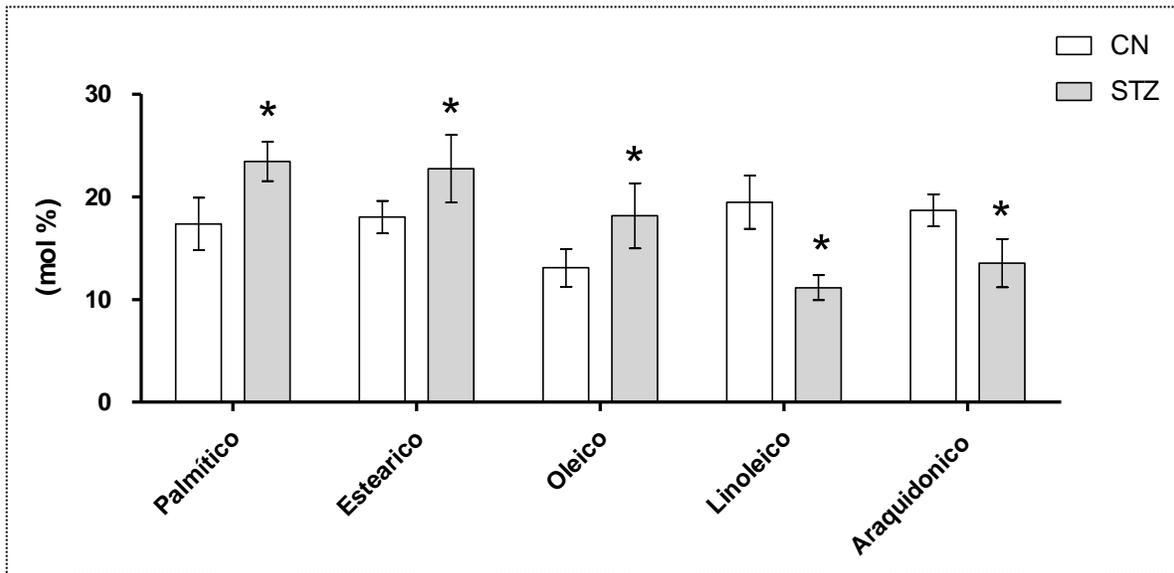


Figura 8. Diferencias en la composición de ácidos grasos de mitocondrias del grupo STZ a tres meses de edad.

CN n= 3 STZ n=3 (* $p < 0.001$)

A diferencia de las mitocondrias, el tejido del grupo STZ sólo muestra diferencias en el ácido esteárico que es 23.5% mayor que el grupo CN.

El análisis de los datos de la tabla 3 también nos permitió notar que los cambios son más frecuentes en algunos ácidos grasos en particular como es el caso de los ácidos esteárico, oleico y linolénico. El ácido Esteárico presenta diferencias en los grupos CN ω 3-C, CN ω 3-L y STZ tanto en tejido como en mitocondrias. En todos los casos en donde el ácido esteárico presenta diferencias la concentración (mol%) es mayor con respecto al grupo CN (Figura 9).

En el caso del ácido Oleico se observan diferencias principalmente en los grupos STZ y STZ con tratamientos tanto en mitocondrias como en tejido (Figura 10).



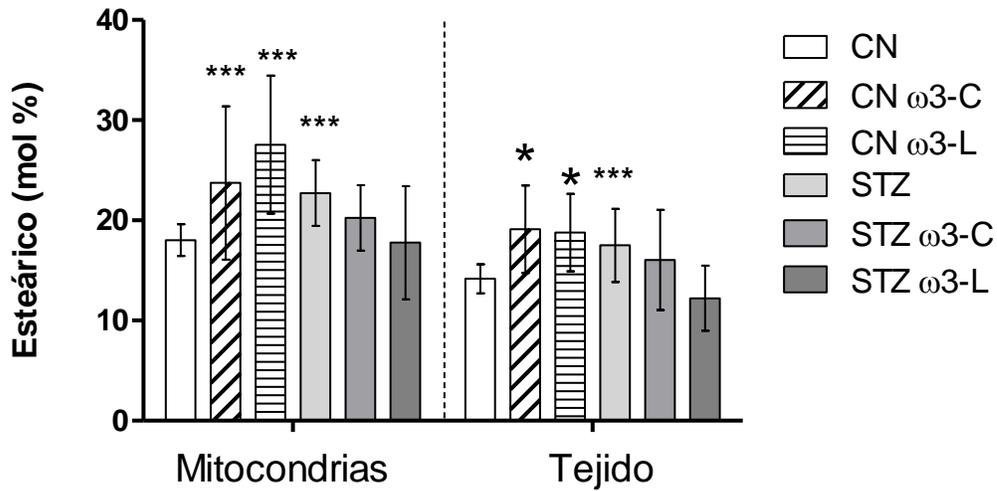


Figura 9. Contenido de ácido esteárico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a tres meses de edad. CN n= 3; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω3-C n=4-6; STZ ω3-L n=6 (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).

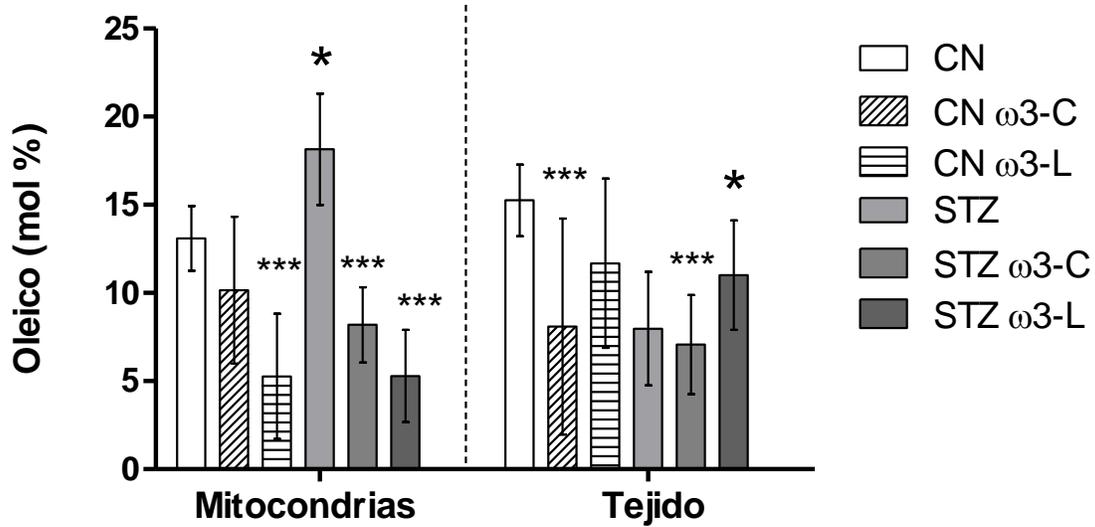


Figura 10. Contenido de ácido Oleico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a tres meses de edad. CN n= 3; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω3-C n=4-6; STZ ω3-L n=6 (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$).



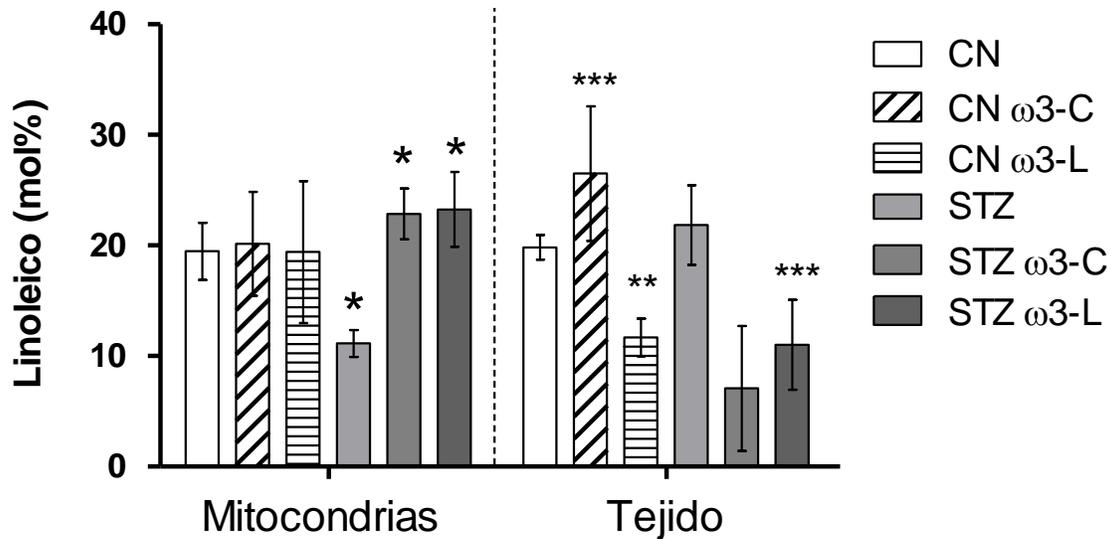


Figura 11 Contenido del ácido Linoleico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido (derecha) a tres meses de edad. CN n= 3; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω3-C n=4-6; STZ ω3-L n=6 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Por otra parte en la figura 12 se observan diferencias en el índice de fluidez de mitocondrias en el grupo STZ (1.10 ± 0.30) que es 55.27% menor que el grupo CN (1.99 ± 0.68).

Para el caso del tejido la relación entre ácidos grasos insaturados sobre saturados muestra diferencias en el grupo CN ω3-C (1.20 ± 0.27) que es 33.4% inferior al grupo CN (Fig.12).



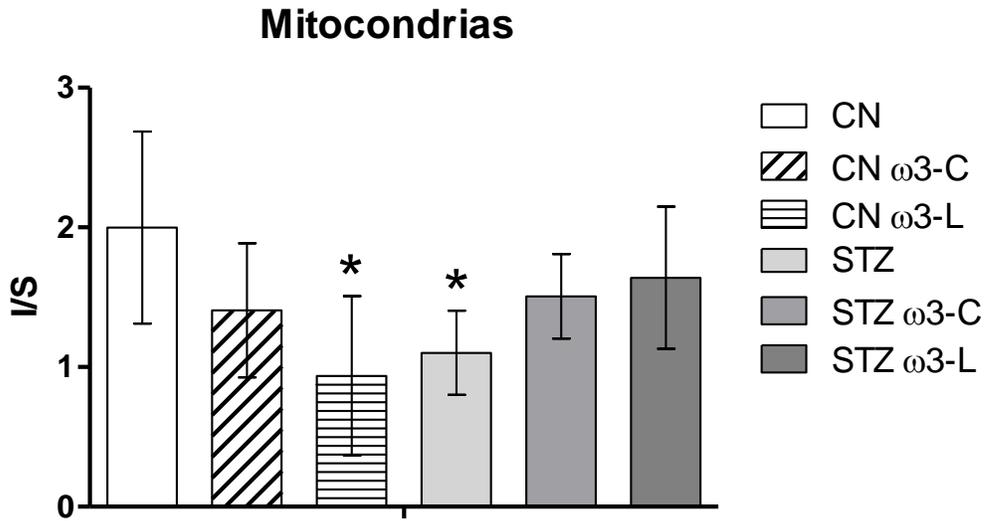


Figura 12. Índice de Fluidez membranal (I/S) de mitocondrias de todos los grupos a 3 meses de edad. CN n= 3; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω3-C n=4-6; STZ ω3-L n=6 (* $p < 0.05$).

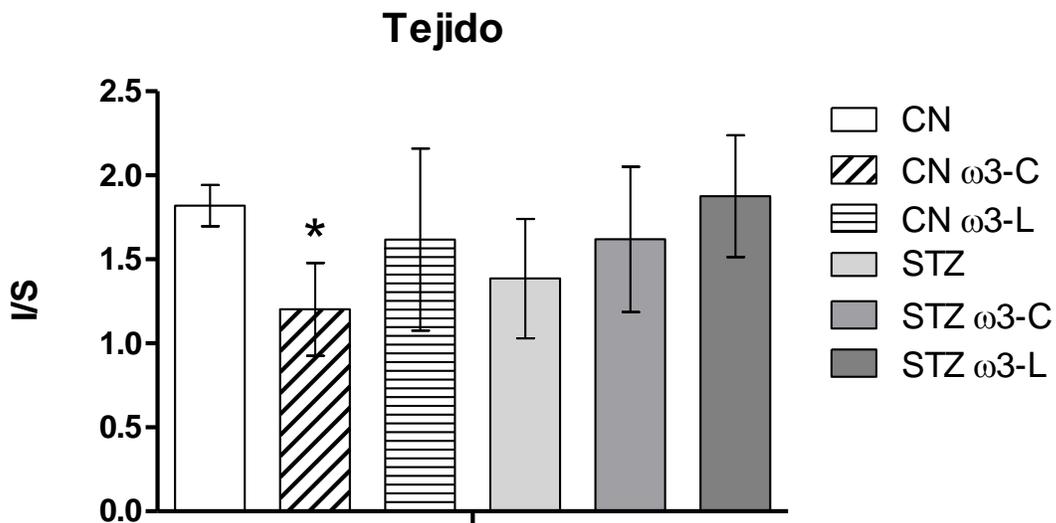


Figura 13 Cociente de insaturación del tejido (hígado) de todos los grupos a 3 meses de edad. CN n= 3; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω3-C n=4-6; STZ ω3-L n=6 (* $p < 0.05$).

6.3.2. Respiración Mitocondrial

En el análisis de los datos obtenidos de las mitocondrias a 3 meses de edad observamos que de forma semejante con lo ocurrido en el primer mes de edad, el consumo de oxígeno en los estados 3 y 4 (Fig.14) no presentaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos. Al hacer la relación entre los estados 3 y 4, podemos apreciar que únicamente se encuentran diferencias en el CR (E3/E4) del grupo CN ω 3-C con respecto al grupo CN (Fig.15).

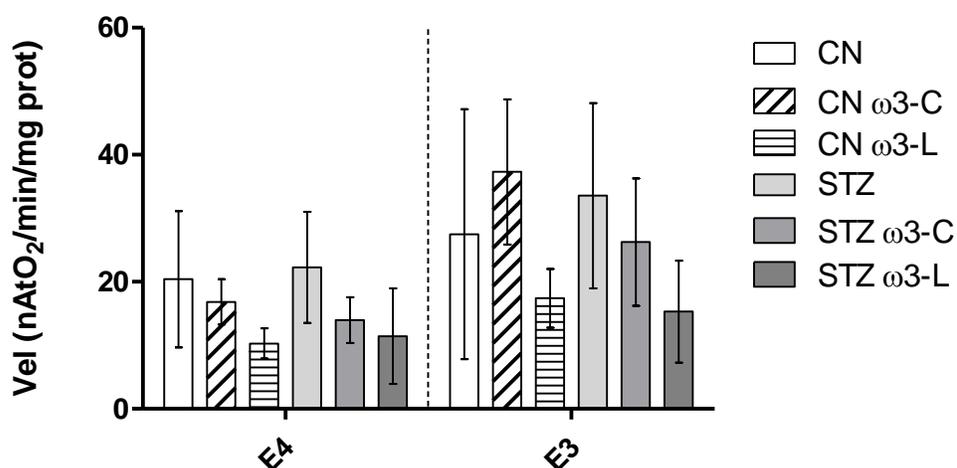


Figura 14. Actividad mitocondrial a 3 meses de edad, respiración en estado 3 (E3) y respiración en estado 4 (E4); CN n= 3; CN ω 3-C n=3; CN ω 3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω 3-C n=4-6; STZ ω 3-L n=6.



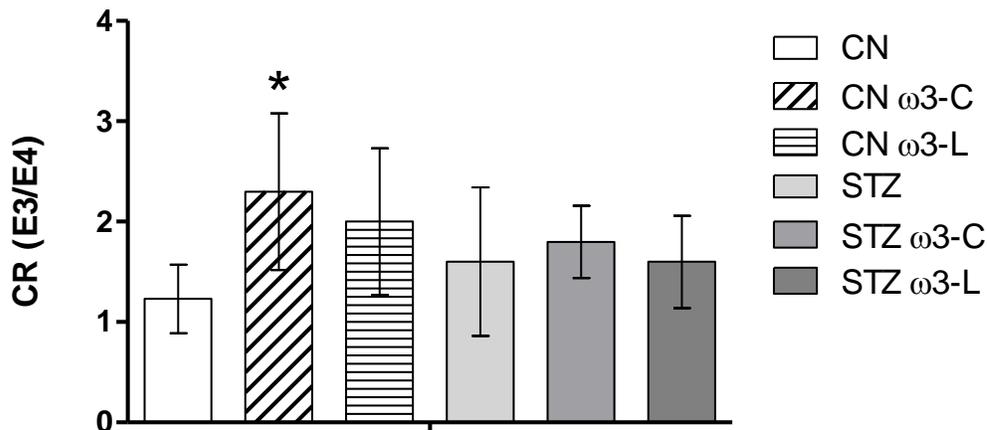


Figura 15. Control Respiratorio (CR) mitocondrial (E3/E4) todos los grupos a tres meses de edad. CN n= 3; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=3; STZ n=3-6; STZ ω3-C n=4-6; STZ ω3-L n=6 (* $p < 0.05$).

6.4 Cambios metabólicos de las ratas a 6 meses de edad

6.4.1 Composición de ácidos grasos de tejido y mitocondrias de hígado

En la tabla 4 se muestra la composición de ácidos grasos de mitocondrias y tejido de las ratas a 6 meses de edad.

En el apartado 6.3.1 se mencionó que hubo cambios en la composición de ciertos ácidos grasos entre los cuales destacaban el ácido esteárico, oleico y linoleico; con la finalidad de comparar si ocurría lo mismo a 6 meses de edad se realizaron gráficas de los mismos ácidos grasos.

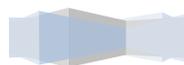
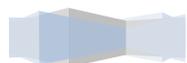


Tabla 4 Composición de ácidos grasos (mol%) de mitocondrias (arriba) y tejido hepático (abajo) de ratas CN y STZ con sus respectivos tratamientos a 6 meses de edad.

MITOCONDRIAS												
Ácido graso	CN		STZ		CN ω3-C		CN ω3-L		STZ ω3-C		STZ ω3-L	
Mirístico	0.38	± 0.04	0.44	± 0.34	0.18	± 0.05	0.21	± 0.06	0.13	± 0.04	0.16	± 0.04
Miristoleico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pentadecanoico	0.19	± 0.02	0.14	± 0.04	0.33	± 0.12	0.36	± 0.14	0.19	± 0.13	0.17	± 0.06
Palmitico	19.41	± 1.69	18.56	± 5.45	17.48	± 1.27	18.54	± 1.24	***14.29	± 2.26	***16.43	± 1.62
Palmitoleico	1.18	± 0.52	1.44	± 2.47	0.26	± 0.09	0.40	± 0.12	0.25	± 0.14	0.28	± 0.21
Heptadecanoico	0.46	± 0.06	0.43	± 0.08	0.56	± 0.09	0.51	± 0.06	0.35	± 0.20	0.52	± 0.13
Estearico	15.50	± 4.58	***20.1	± 2.36	***20.75	± 2.40	***20.47	± 2.15	***19.29	± 4.18	***20.82	± 2.10
Oleico	9.50	± 0.98	7.89	± 2.65	8.09	± 0.66	7.79	± 1.00	*7.49	± 1.77	***6.74	± 1.68
Linoleico	18.87	± 2.22	18.43	± 1.40	***21.97	± 1.03	*20.95	± 1.85	19.79	± 2.56	19.93	± 3.03
Gamma-linoleico	0.17	± 0.03	0.04	± 0.05	0.12	± 0.08	0.10	± 0.06	0.25	ND	0.05	± 0.02
Linolenico	0.30	± 0.03	0.28	± 0.08	0.36	± 0.07	0.37	± 0.08	0.88	± 1.23	0.30	± 0.06
Araquidico	0.11	± 0.03	0.07	± 0.009	0.12	± 0.07	0.09	± 0.04	0.05	± 0.007	0.10	± 0.06
Eicosanoico	ND	ND	0.12	± 0.02	0.13	± 0.06	0.14	± 0.04	0.18	± 0.01	0.21	± 0.16
Araquidónico	22.54	± 2.80	22.96	± 3.15	***20.25	± 2.05	*20.61	± 1.55	21.58	± 2.82	23.13	± 2.79
EPA	ND	ND	ND	ND	0.92	± 0.57	1.33	± 0.58	1.48	± 0.20	0.47	± 0.21
Behenico	0.62	± 0.18	ND	ND	ND	ND	1.75	ND	ND	ND	ND	ND
Erucico	ND	ND	0.15	± 0.002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DHA	7.35	± 1.37	6.19	± 1.43	5.62	± 1.08	***4.85	± 2.08	6.96	± 1.07	6.44	± 2.61
Lignocérico	1.73	± 0.34	1.22	± 0.49	1.49	± 0.84	1.55	± 0.44	***4.85	± 4.18	1.53	± 0.54
NI	1.68	± 0.60	2.21	± 4.47	1.52	± 0.66	1.64	± 0.37	1.14	± 0.88	1.32	± 0.32
Cociente I/S	1.58	± 0.53	1.41	± 0.32	1.41	± 0.13	1.30	± 0.10	1.50	± 0.40	1.45	± 0.16
TEJIDO												
Ácido graso	CN		STZ		CN ω3-C		CN ω3-L		STZ ω3-C		STZ ω3-L	
Mirístico	2.17	± 7.05	0.22	± 0.04	0.23	± 0.05	0.36	± 0.11	0.24	± 0.08	0.25	± 0.08
Miristoleico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.08	ND
Pentadecanoico	0.21	± 0.04	0.15	± 0.03	0.29	± 0.12	0.37	± 0.11	0.23	± 0.03	0.40	± 0.51
Palmitico	24.10	± 2.46	***20.57	± 1.95	*20.8	± 2.14	***20.88	± 1.51	***18.9	± 1.0	***18.40	± 1.58
Palmitoleico	1.40	± 0.88	0.42	± 0.15	3.67	± 4.73	0.62	± 0.42	0.36	± 0.12	0.38	± 0.19
Heptadecanoico	0.37	± 0.09	1.42	± 5.76	0.45	± 0.10	0.43	± 0.16	0.49	± 0.03	0.56	± 0.06
Estearico	12.04	± 1.66	12.07	± 1.56	***16.71	± 2.14	***15.14	± 1.62	***15.01	± 0.75	*17.20	± 2.95
Oleico	12.87	± 1.60	11.32	± 2.32	10.52	± 1.24	11.95	± 2.70	13.27	± 1.08	10.73	± 1.59
Linoleico	23.14	± 2.40	***27.41	± 2.96	24.39	± 1.67	25.39	± 3.64	24.36	± 1.50	22.33	± 3.19
Gamalinolero	0.22	± 0.17	0.22	± 0.09	0.13	± 0.03	0.11	± 0.01	0.24	± 0.06	0.21	± 0.08
Linolenico	0.69	± 0.13	0.99	± 0.19	0.81	± 0.19	0.84	± 0.19	0.93	± 0.17	0.68	± 0.20
Araquidico	0.09	± 0.03	0.11	± 0.12	0.06	± 0.01	0.07	± 0.03	0.10	± 0.03	0.10	± 0.10
Eicosanoico	6.62	± 11.24	***0.21	± 0.06	***0.22	± 0.10	***0.12	± 0.05	9.37	± 10.09	***0.10	± 0.05
Araquidónico	17.09	± 2.40	17.34	± 2.06	*13.89	± 5.54	14.92	± 1.44	***11.09	± 7.84	18.10	± 1.20
EPA	0.31	± 0.07	1.44	± 4.09	1.90	± 1.26	1.48	± 0.28	0.66	± 0.30	0.79	± 0.33
Behenico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Erucico	ND	ND	ND	ND	0.14	± 0.05	0.08	ND	ND	ND	0.11	± 0.07
DHA	5.25	± 1.07	4.47	± 0.62	3.96	± 0.52	4.68	± 0.48	4.96	± 0.54	5.90	± 1.16
Lignocérico	1.22	± 0.27	1.11	± 0.31	1.19	± 0.21	1.63	± 0.39	1.35	± 0.36	1.48	± 0.40
NI	1.44	± 0.67	0.91	± 0.33	1.27	± 0.88	1.07	± 0.30	1.79	± 0.47	2.45	± 1.99
Cociente I/S	1.30	± 0.17	1.77	± 0.32	1.48	± 0.21	1.54	± 0.24	1.22	± 0.37	1.22	± 0.12

Abreviaturas: EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No identificados; ND, No detectados; I/S, insaturados sobre saturados. CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (*p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001).



En el caso del ácido esteárico de mitocondrias se muestran diferencias en todos los grupos con respecto al control ($p < 0.001$), todos son mayores a este entre 24 y 35%. En el tejido ocurre algo similar, casi todos los grupos presentan diferencias con respecto al control excepto el grupo STZ.

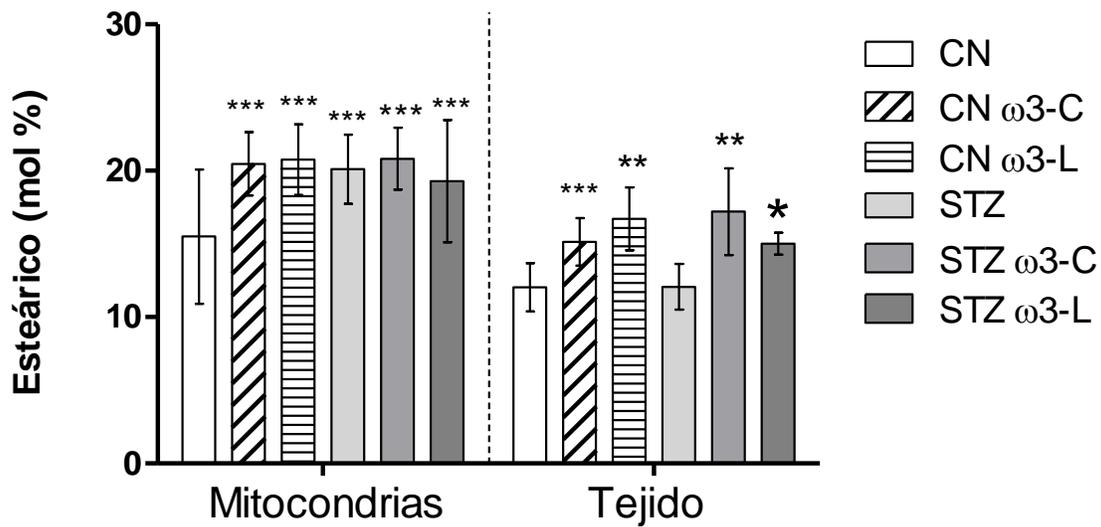


Figura 16. Contenido de ácido esteárico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a seis meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

El contenido de ácido oleico sólo muestra diferencias en los grupos STZ ω3-C (21.16% menor con respecto al control) y STZ ω3-L (31.9% menor con respecto al control) de mitocondrias.

Por otra parte el porcentaje de ácido linoleico presentó diferencias en los grupos CN ω3-C y CN ω3-L de mitocondrias, mientras que en tejido únicamente se observan diferencias en el grupo STZ siendo este último aproximadamente 18% mayor con respecto a CN.



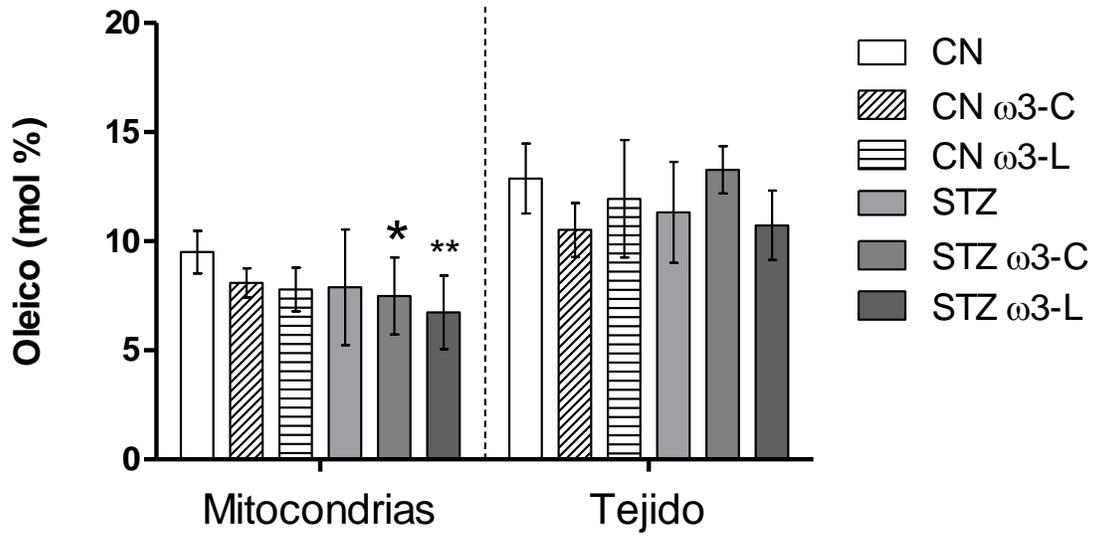


Figura 17. Contenido de ácido Oleico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a seis meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (*p <0.05; **p < 0.01; ***p <0.001).

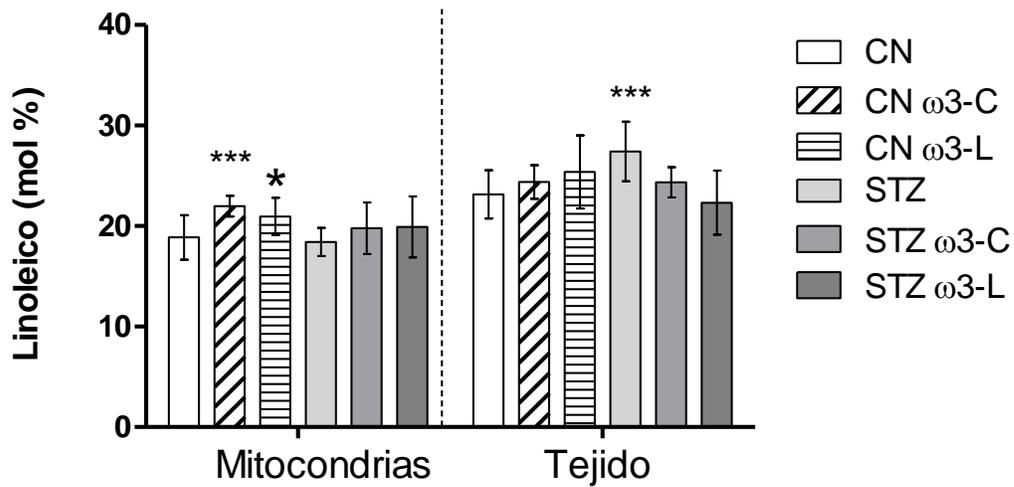
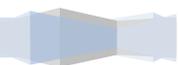


Figura 18. Contenido de ácido linoleico (mol %) en los diferentes grupos de mitocondrias (izquierda) y tejido hepático (derecha) a seis meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (*p <0.05; **p < 0.01; ***p <0.001).



El índice de Fluidez (I/S) no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos de mitocondrias a 6 meses de edad (Fig.19). Por el contrario en tejido (Fig.20) sí se encuentran diferencias en el cociente de insaturación (I/S) del grupo STZ (1.8 ± 0.24) que incrementó 16.77% con respecto al grupo CN (1.5 ± 0.17).

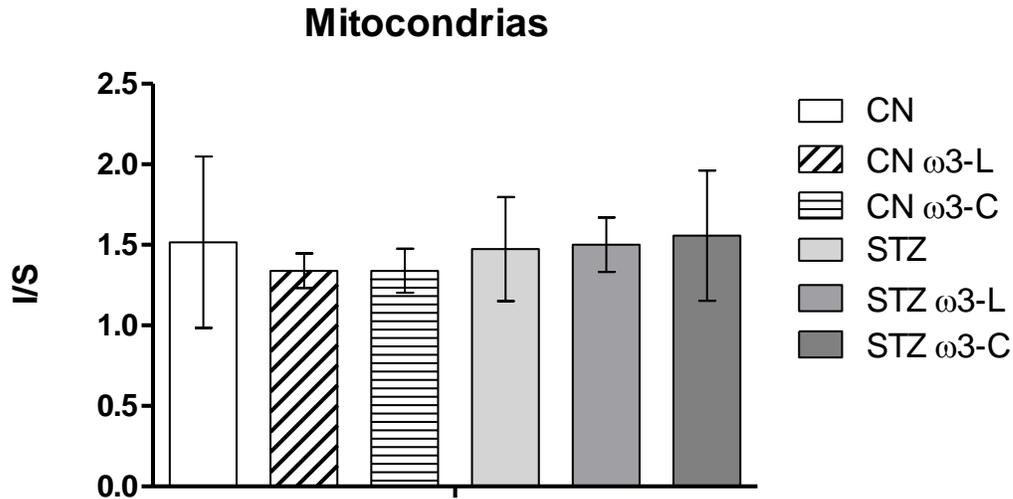


Figura 19. Índice de Fluidez membranal (I/S) de mitocondrias de todos los grupos a 6 meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6

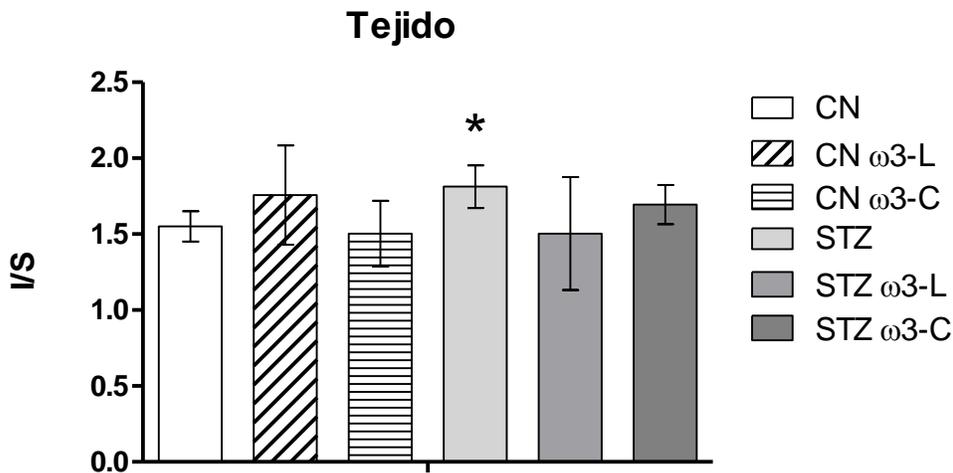
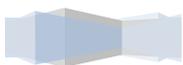


Figura 20 Cociente insaturación del tejido de todos los grupos a 3 meses de edad CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (* $p < 0.05$).



6.4.2. Respiración Mitocondrial

En la figura 21 se muestran las velocidades de respiración de las mitocondrias a 6 meses de edad (estados 3 y 4). El estado 4 presenta diferencias significativas en los grupos STZ con suplementos (STZ-W3C y STZ-W3L) que son aproximadamente 3 veces más grandes que el grupo CN.

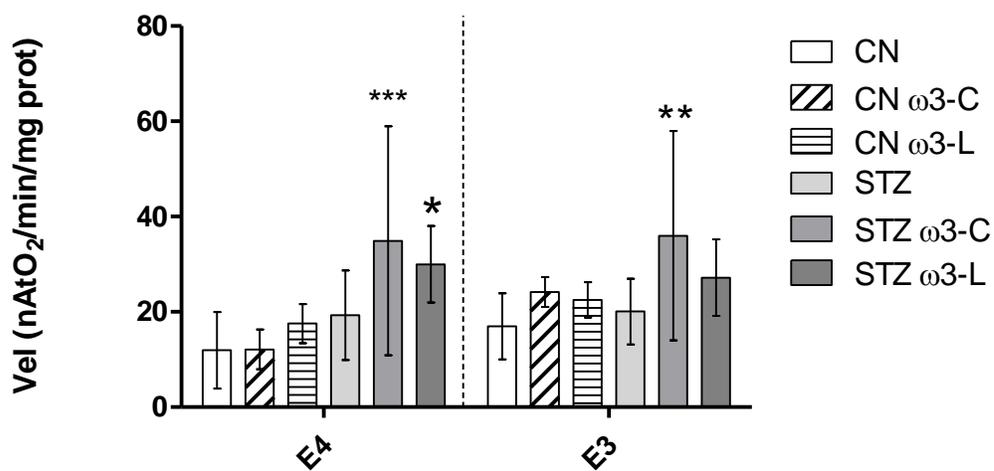


Figura 21. Respiración mitocondrial a 6 meses de edad. Velocidad de respiración en estado 3 (E3) y en estado 4 (E4) CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6 (*p <0.05; **p <0.01; ***p <0.001).

A diferencia de lo ocurrido con el Control Respiratorio de 3 meses en 6 meses no se muestran diferencias significativas en ninguno de los grupos con respecto al grupo CN (Fig.22).

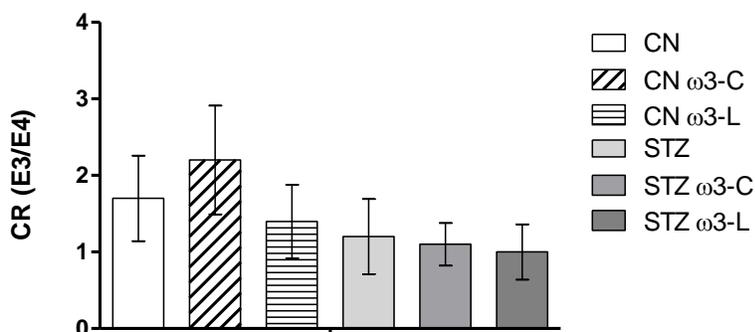
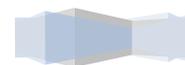


Figura 22 Control Respiratorio mitocondrial (E3/E4) de ratas CN, CN-W3C, CN-W3L, STZ, STZ-W3C y STZ-W3L a seis meses de edad. CN n=5-6; CN ω3-C n=3; CN ω3-L n=4; STZ n=6; STZ ω3-C n=3; STZ ω3-L n=4-6



7 DISCUSIÓN

7.1 Desarrollo del modelo de diabetes y efecto de los ácidos grasos ω 3 en el control de la glicemia

En el presente estudio se utilizó una dosis de estreptozotocina (STZ) de 130 mg/kg de peso a las 48 horas posteriores al nacimiento, ya que en estudios realizados por nuestro grupo de investigación, y documentados en la bibliografía, se demuestra que, con dosis similares y edad de inducción, se tienen hiperglicemias de entre 130 y 160 mg/dL, consideradas como ligeras, además de una marcada intolerancia a la glucosa y dislipidemias casi imperceptibles, similares con el periodo inicial de diabetes tipo 2 en humanos (Figuroa, 2015; Pérez-Hernández, 2011)

En este trabajo la glicemia de los grupos control se mantuvo en un intervalo de 80-110 mg/dL durante todo el tiempo experimental (Fig.4). El incremento en la concentración de glucosa sanguínea del grupo STZ con respecto al grupo CN durante los primeros meses de vida se explica por la administración de la estreptozotocina la cual actúa específicamente sobre las células beta del páncreas utilizando al transportador de glucosa 2 (GLUT 2) para entrar a la célula, causando daño y muerte de esta por la polirribosilación del DNA y la generación de radicales a través de la vía xantina-oxidasa (Szkudelsky, 2001). Sin embargo, pasada esta etapa las concentraciones de glucosa en sangre tienden a regresar a estados basales sobre todo en los dos últimos meses de vida, este fenómeno se debe a que en animales neonatos el páncreas tiene la capacidad de regenerar y/o diferenciar parcialmente la población de células β , lo que resulta en un animal adulto con hipoinsulinemia e hiperglicemias moderadas (Bonner-Weir *et al.*, 1981).

El suplemento con ácidos grasos omega-3 parece ayudar a la regulación de la glicemia, especialmente cuando se trata de los ácidos grasos ω -3 de cadena larga EPA y DHA. En la figura 4 se muestra que las concentraciones de glucosa sanguínea comienzan a disminuir en los dos primeros meses a partir de la

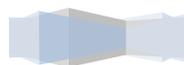
administración con estos ácidos grasos y en los últimos meses la glicemia se mantiene en concentraciones “normales”.

El efecto de estos ácidos grasos podría explicarse a través de la acción de los factores de transcripción PPARs (Por sus siglas en inglés: proliferator peroxisome activator receptor) que son receptores nucleares pertenecientes a la familia de los factores de transcripción involucrados en la homeostasis de los lípidos. Los PPARs presentan 3 isoformas (α, δ, γ) y se activan por concentraciones micromolares de ácidos grasos poliinsaturados, por eicosanoides derivados del ácido araquidónico y también por medicamentos hipolipemiantes. Los AGPI tienen mayor afinidad a PPAR α . El PPAR γ activado se une a elementos de respuesta llamados PPRE que se encuentran en genes involucrados en el transporte y oxidación de lípidos, además de la termogénesis (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2005).

Se sabe que tanto PPAR α como PPAR γ se expresan en el páncreas, aunque se ha encontrado que PPAR γ se localiza en células de tejido endocrino, por lo que se ha relacionado con secreción; particularmente se localiza en células β pancreáticas donde es funcionalmente importante (Lupi *et al.*, 2004).

La cantidad de PPAR α suele ser mayor que la de PPAR γ , sin embargo éste último se sobreexpresa en ratas con diabetes inducida químicamente (Lupi *et al.*, 2004).

Existen ligandos de PPAR γ como son las prostaglandinas y los AGPI, particularmente los ω -3, que en la DM2 podrían estar estimulando la síntesis de insulina (Laybutt *et al.*, 2002). Aunque el papel de PPAR γ no es muy conocido, se ha encontrado que retarda y detiene el desarrollo de la DM en modelos de ratón (Bergeron *et al.*, 2006). Asimismo, la activación de PPAR α y PPAR γ , se ha asociado con disminución del contenido de lípidos en hígado y músculo, además de disminuir la resistencia a insulina en la DM2 (Bergeron *et al.*, 2006).



7.2 Conversión de ALA a EPA y DHA

La mayoría de las investigaciones que reportan la conversión de ALA a EPA y DHA son ensayos clínicos realizados en plasma y/o intestino. En éstos se reporta que esta conversión es deficiente. Krauss y colaboradores (2007) afirman que tan sólo 2% de ALA es convertido a EPA y DHA; así mismo Goyens y colaboradores (2005) encontraron que del contenido total de ALA el 7% es convertido a EPA y tan sólo el 0.013% a DHA. Cabe resaltar que no se sabe si la conversión de ALA tiene lugar en el intestino o después de llegar al hígado.

Para comprender y analizar el potencial de conversión de ALA hasta EPA y/o DHA en nuestros resultados, implementamos la generación de los índices de ácidos grasos omega 3 de cadena larga entre cadena corta (ω 3-L/ ω 3-C) (ver apéndice I). Así, vemos que en algunas mitocondrias es mayor la proporción de EPA y/o DHA con respecto a las mitocondrias de ratas control, lo cual sugiere que sí hay conversión desde ALA hasta EPA y DHA lo cual es contrastante con los autores reportados (Krauss *et al.*, 2007; Goyens *et al.*, 2005; Hussein *et al.*, 2006) pero consistente con lo reportado por Sugasini y colaboradores (2014) quienes observaron que la conversión de ALA a EPA y DHA es eficiente en hígado de ratas que recibieron un suplemento de aceite de linaza (LSO, por sus siglas en inglés).

Al igual que Sugasini y colaboradores (2014) y Sugasini y Lokesh (2012) en nuestro trabajo se les administró LSO a las ratas de los grupos CN ω 3-C y STZ ω 3-C sin embargo nuestros resultados no son consistentes con los suyos ya que ellos reportan que la conversión de ALA fue significativamente mayor en dichos grupos.

En nuestro trabajo también se puede observar que tanto a 3 como a 6 meses la proporción de ALA es mayor en el tejido total que en las mitocondrias. En un estudio anterior de nuestro equipo de trabajo, Escutia (2019) en un modelo de diabetes experimental tipo 1, reportó que la composición de ácidos grasos era diferente entre mitocondrias y tejido en la mayoría de sus tiempos experimentales

del avance de la diabetes; creemos que este comportamiento se le puede atribuir a las membranas asociadas a mitocondrias (MAMs), que como su nombre lo indica son un punto de contacto entre retículo y mitocondrias; se ha reportado recientemente que en estas MAMs se da la mayor parte del transporte de lípidos (Kornmann *et al.*, 2009, Fagone y Jackoski, 2009); Van Vilet y Agostinis (2018), mencionan que las MAM transfieren las señales de estrés de RE a las mitocondrias, de este modo se podría pensar que en efecto estas MAMs tienen gran influencia en la respuesta de las mitocondrias al estrés modificando su composición de ácidos grasos antes que el RE.

7.3 Mitocondrias de Hígado: Respiración y Fluidez membranaral

La importancia fisiológica de las modificaciones en las propiedades físicas de las membranas reside en su relación con numerosas funciones celulares, incluyendo la actividad de enzimas asociadas a ésta, transporte de solutos y procesos de transducción de señales inducidos por hormonas. La peroxidación lipídica y la fluidez de membrana han sido implicadas en procesos de enfermedad y la fisiología del envejecimiento (García *et al.*, 1997).

El estudio de la fluidez de la membrana en diversos tipos celulares apunta a que existe un diferente comportamiento entre la membrana plasmática y la mitocondrial (Mataix y Mataix, 2005). Diversos autores refieren una disminución de la fluidez de la membrana plasmática asociada a lipoperoxidación y en mitocondrias se han identificado perturbaciones cualitativas, cuantitativas y funcionales ya sea como causalidad o resultado de patologías como diabetes e hipertensión, en tejido extraído de distintos órganos (Sivitz y Yorek, 2010).

Uno de los principales objetivos de este estudio fue determinar si un modelo de hiperglicemia ligera que simule los primeros estadios del desarrollo de DM2 es suficiente para generar alteraciones en la respiración y fluidez de mitocondrias

hepáticas y a su vez analizar el efecto que tienen los ácidos grasos omega 3 de cadena corta y/o larga sobre el mismo parámetro.

La hiperglicemia genera un estado de estrés oxidante en donde los radicales libres se encuentran implicados en el daño a la membranas por lipoperoxidación, en la mayoría de los estudios realizados en membrana plasmática en tejidos de pacientes con DM2 se reporta una disminución de la fluidez relacionada con este fenómeno. Sin embargo en nuestros resultados se puede observar que en el índice de fluidez membranal (I/S) de ratas de un mes no existen diferencias significativas lo que nos podría indicar que a esta edad el modelo de hiperglicemia ligera aun no es suficiente para generar cambios dentro de este parámetro sin embargo a seis meses de edad si se observa un incremento del índice (I/S) (ver figura 12).

El incremento en la fluidez de la membrana mitocondrial puede modificar la actividad de diversas enzimas y translocadores como: la carnitina-palmitoil transferasa y el translocador de citrato, esta alteración está relacionada con un incremento en el metabolismo mitocondrial y la producción de radicales libres y/o un desacoplamiento ligero de la cadena de transporte de electrones o bien con una cadena de transporte reversa (Brady *et al.*, 1985; Desoye y Hauguel-de Mauzón, 2007). Sergent y colaboradores (2005), sugieren que el incremento en la concentración de radicales libres en mitocondrias está relacionado a un aumento de la fluidez de la membrana mitocondrial.

El desacoplamiento en la cadena transportadora de electrones permite la fuga de protones translocados al espacio intermembranal que regresan a la matriz mitocondrial de forma independiente a la ATP sintasa (Cadenas, 2018).

Es importante destacar que existe una estrecha relación entre la fuga de protones y la generación de ROS por la cadena respiratoria mitocondrial: la producción de superóxido mitocondrial muestra una fuerte dependencia de Δp en las mitocondrias aisladas. Los desacoplantes y el ADP, que estimulan la síntesis de

ATP, aumentan la tasa de respiración y se sabe que disminuyen la producción de ROS en las mitocondrias aisladas (Boveris *et al.*,1973).

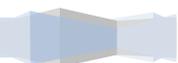
Estas observaciones apoyan un papel para la conductancia de protones mitocondriales endógenos en la protección contra la producción de ROS, y se ha planteado la hipótesis de que la disipación parcial de Δp por desacoplamiento leve de la fosforilación oxidativa atenúa la producción de ROS (Papa *et al.*,1997; Brookes *et al.*,2005).

En general en nuestros resultados se encontró que el CR de todos los grupos experimentales tiende a disminuir con el paso del tiempo, sin embargo no lo hacen en la misma magnitud.

En primera instancia se encontró que a 1 mes de edad no hay diferencias en las velocidades de consumo de oxígeno (E3 y E4) entre ratas normoglicémicas (grupo CN) e inducidas a DM2 (grupo STZ), sin embargo al analizar el Control Respiratorio (CR), que es a su vez un indicador del acoplamiento de las mitocondrias, observamos que este parámetro es significativamente mayor en ratas STZ, estos resultados concuerdan con lo reportado por Pérez (2018).

Soto-Urquieta *et al.*, (2014) reportan que en ratones con diabetes el consumo de oxígeno es mayor y a su vez Pérez (2018) encontró resultados similares en mitocondrias hepáticas de ratas de 1 mes edad, sin embargo Lowell y Shulman (2005) indican que en mitocondrias de músculo esquelético disminuye el consumo de oxígeno así como la síntesis de ATP durante el desarrollo de diabetes. Estas discrepancias muestran la necesidad de continuar investigando los efectos de la diabetes en la funcionalidad de la mitocondria.

Por otra parte es importante resaltar que Avendaño-Briseño (2019), quien trabajó con mitocondrias de cerebro de las mismas ratas que usamos, no reportó diferencias en el CR de ratas STZ de 1 mes de edad en mitocondrias de cerebro lo cual es de esperarse ya que al ser un órgano tan importante existen estructuras especializadas que lo protegen de posibles lesiones o que impiden el paso de

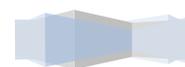


sustancias que intervengan con su buen funcionamiento (Escobar y Gómez, 2008).

En relación a los grupos STZ tratados con ácidos grasos ω 3-C se aprecia que la disminución del CR no es significativamente menor con respecto al grupo STZ sin tratamiento, por lo que estos ácidos grasos no parecen tener ningún efecto en este parámetro con relación al tiempo. Por otra parte en los grupos CN tratados con ácidos grasos ω 3-C se observa una tendencia de aumento del CR con respecto al grupo CN sin tratamientos.

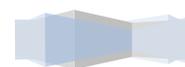
En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que se tuvo éxito al generar un modelo de diabetes tipo 2 incipiente con el cual fue posible observar si se están generando cambios en mitocondrias y en tejido hepático.

Retomando los resultados de Avendaño-Briseño (2019) podemos decir que el modelo de diabetes tipo 2 incipiente no es suficiente para generar cambios drásticos en tejido y mitocondrias de cerebro sin embargo este mismo modelo sí logra generar cambios más perceptibles cuando se trata de los parámetros respiratorios de mitocondrias y composición de ácidos grasos de tejido hepático.



Conclusiones

- ◆ Los resultados aquí presentados demuestran que se tuvo éxito en generar un modelo de Diabetes Tipo 2 incipiente. Las glicemias de los grupos inducidos a diabetes, aunque mayores, fueron estadísticamente iguales a los grupos control.
- ◆ La hiperglicemia ligera que presentaron los organismos inducidos a diabetes generó una tendencia a una menor ganancia de peso corporal y al parecer el suministro de los ácidos grasos omega 3, tanto de cadena larga como de cadena corta, ayudó parcialmente a contrarrestar esta condición.
- ◆ El hígado y sus mitocondrias, comparados con el cerebro y sus mitocondrias (Avendaño 2019), tienen mayores cambios en la composición de ácidos grasos.
- ◆ El porcentaje de ácido esteárico es mayor en las mitocondrias que en el tejido. Por el contrario, el oleico, es mayor en el tejido que en las mitocondrias.
- ◆ El índice de insaturación es más constante en las mitocondrias que en el tejido.
- ◆ El control respiratorio de las mitocondrias de hígado, aunque no es diferente del control, tiende a disminuir, tanto por la inducción a diabetes como por el suministro de ácidos grasos omega 3, excepto en ratas control con ácidos grasos omega 3 de cadena corta.
- ◆ El índice de conversión ALA-DHA disminuyó con los tratamientos y/o la diabetes en tejido a tres meses de edad
- ◆ En general hay una disminución ligera del cociente DHA/ALA en tejido a 6 meses de edad con excepción del grupo STZ ω 3-L

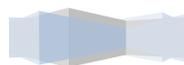


Literatura citada

- Abdel-Misih S.R., Bloomston M. 2010. Liver anatomy. *Surg Clin N Am.* 90(4):643-653
- Acaso J. 2014. Diabetes mellitus tipo 2: nuevos tratamientos. *Med Clínica.* 143:117– 123.
- Andrade I. S. 2002. DIABETES MELLITUS. McGraw-Hill interamericana editores, México D.F. 2da Ed.
- Almeida C.S. 2009. Terapia combinada en la Diabetes Mellitus tipo 2. En *Diabetes Mellitus visión latinoamericana.* México D.F. Intersistemas, 367-378.
- Alexsanderson R., Camargo M. J. 2009. Insulina: biosíntesis, secreción y aspectos moleculares. En *Diabetes Mellitus visión latinoamericana.* México D.F. Intersistemas, 22-27.
- American Diabetes Association. 2015. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes care.* 38(Suppl. 1):8–16.
- American Diabetes Association. 2014. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab care.* 37:81-90.
- Avenidaño, B. K. A. 2019. Comparación del efecto de los ácidos grasos omega -3 de cadena larga y de cadena corta durante el desarrollo inicial de la diabetes. (Tesis de licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Bailey C. 2007. Treating insulin resistance: future prospects. *DiabVasc Dis Res.* 4:20– 31.
- Bergeron R., Yao J., Woods J., Zycband E., Liu C., Li Z., Adams A., Berger J., Zhang B., Moller D., Doebber T. 2006. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- α Agonism Prevents the Onset of Type 2 Diabetes in Zucker Diabetic Fatty Rats: A Comparison with PPAR γ Agonism. *Endocrinology.* 147(9): 4252:4262.



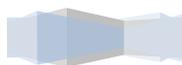
- Bonner-Weir S. D. F., Trent R. N., Honey G. C., Weir. 1981. Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes*. 30:64–9.
- Boveris B.A., Chance. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134: 707–716.
- Bloom M., Evans E., Mouritsen O. G. 1991. Physical properties of the fluid bilayer component of cell membrane:A perspective. *Q Rev. Biophys.* 2:293-39.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1): 248–254.
- Brady J., Silverstein L.J., Hoppel C. L., Brady P. S. 1985. Hepatic mitochondrial inner membrane properties and carnitine palmitoyltransferase A and B. Effect of diabetes and starvation. *Biochem J.* 232(2):445-450.
- Brookes P.S. 2005. Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple, *Free Radic. Biol. Med.* 38:12–23.
- Brownlee M. 2005. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes*. 54:1615– 1625.
- Cadenas S. 2018. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *BBA- Bioenergetics.* 1859 :940-950.
- Dey A., Swaminathan K. 2010. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sciences.* 87: 197-214.
- Desoye G., Hauguel-de Mouzon S. 2007. The human placenta in gestational diabetes Mellitus. The insulin and cytokine network. *Diabetes Care.* 30 (2):120-126.



- Escobar I. A., Gomez G. B. 2008. Barrera hematoencefálica. Neurobiología, implicaciones clínicas y efectos del estrés sobre su desarrollo. *Rev Mex Neuroci* 9(5): 395-405.
- Escutia M. J. 2019. Composición de ácidos grasos de mitocondria y retículo endoplásmico extraídos de tejido hepático de ratas diabéticas.(Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autonoma de México. México.
- Fagone P., Jackowski S. 2009. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J Lipid Res.* 50(Suppl):311– 316.
- Figuroa-García M. C., Espinosa-García M. T., Martínez-Montes F., Palomar-Morales M., Mejía-Zepeda R. 2015. Even a chronic mild hyperglycemia affects membrane fluidity and lipoperoxidation in placental mitochondria in Wistar rats. *PLoS One* 10(12):1–15.
- Flach P., Rossmeisl M., Kopechy J. 2014. The effect of ω -3 Fatty Acids on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity. *Physiol. Res.* 63 (Suppl.1):93-118.
- García J. J., Reiter R. J., Guerrero J. M., Escames G., Byung B. P., Chang Oh C. S., Muñoz A. H. 1997. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Letters.* 408:297-300.
- Geydan G., Giraldo G., Jaramillo M., Ossa P., Patiño R., Vásquez Y. 2006. Biología de la célula. 1° Ed. Colombia: Fondo Editorial Biogénesis.
- Goyens P. L., Spilker M. E., Zock P. L., Katan M. B., Mensink R. P. 2005. Compartmental modeling to quantify alpha-linolenic acid conversion after longer term intake of multiple tracer boluses. *J Lipid Res.*46:1474–83.
- Hall E. J. 2016. Guyton y Hall tratado de Fisiología Médica.ELSERVIER. 13ª Ed.1170.
- Gracia-Arnaiz M. 2007. Comer bien, comer mal: medicalización del comportamiento alimentario. *Salud Pública de México.*49: 236 - 242.



- Hussein N., Ah-Sing E., Wilkinson P., Leach C., Griffin B. A., Millward D. J. 2005. Long-chain conversion of [¹³C]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. *J Lipid Res.*46:269–80.
- Jump D. 2002. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem.* 277: 8755–8758.
- Kornmann B., Currie E., Collins S. R., Schuldiner M., Nunnari J., Weissman J S., Walter P. 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science.* 325:477–481.
- Krauss-Etschmann S., Shadid R., Campoy C., Hoster E., Demmelmair H., Jimenez M., Gil A., Rivero M., Veszpremi B., Decsi T. 2007. Effects of fishoil and folate supplementation of pregnant women on maternal and fetal plasma concentrations of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid: a European randomized multicenter trial. *Am J Clin Nutr.*85:1392–400.
- Laybutt R., Sharma A., Sgroi D., Gaudet J., Bonner-Weir S., Weir, G. 2002. Genetic Regulation of Metabolic Pathways in β -Cells Disrupted by Hyperglycemia. *The journal of Biological Chemistry.* 277(13):10912-10921.
- Lehninger D., Cox M. N. 2002. Principles of Biochemistry. Forth Edition. 659-670.
- Leonard A., Pereira S., Sprecher H., Huang Y. 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res.* 43: 36–54.
- Lodish H. 2006. Biología celular y molecular. *Medica Panamericana.* Madrid. 513-634.
- Lowell B., Shulman G. 2005. Mitochondrial Dysfunction and Type 2 Diabetes. *Science.*307:384–387.
- Lupi R., Del Guerra S., Marselli L., Bugliani M., Boggi U., Mosca F., Marchetti P., Del Prato S. 2004. Rosglitazone prevents the impairment of human islet function induced by fatty acids: evidence for a role of PPAR γ 2 in the modulation of insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 286:560-567.



- Malecki M. 2005. Genetics of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 68:10–2.
- Mataix J., Mataix A. B. 2005. Valoración del estado nutricional: IV Evaluación clínica y otros sistemas de evaluación. En: Mataix J. Nutrición y alimentación humana. *Barcelona: Océano/Ergon*. 92-780.
- Matthews R. D. 2010. Regulation of homeostasis: glucose and other substrates. En Serrano R. M., Gutiérrez F. J. A. Type 2: Diabetes Mellitus. España: *Elsevier*.89-104.
- McKee T. y McKee J. R. 2014. Bioquímica. Las bases moleculares de la vida. 5 Ed Mexico: The McGraw-Hill. 340-368.
- Morrison R. W., Smith M. L. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J Lip Res*. 5:600-608.
- Murphy M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 417 (1):1-13.
- Risérus U. 2008. Fatty acids and insulin sensitivity. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 5: 11-100
- Romero-Márquez R. S., Díaz-Veja G., Romero-Zepeda H. 2011. Estilo y calidad de vida de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Rev Med Instituto Mexicano del Seguro Social*. 49(2):125-136.
- Rull A. J., Valdés A. P., Cuevas R. D., Gómez P. F. J. 2009. Historia Natural de la diabetes mellitus tipo 2. En Diabetes Mellitus visión latinoamericana. México D.F. Intersistemas 75-81
- Sergent O., Pereira M., Belhomme C., Chevanne M., Huc L., And Lagadic-Gossmann D. 2005. Role for Membrane Fluidity in Ethanol-Induced Oxidative Stress of Primary Rat Hepatocytes. *J. Phar. Exp. Therap*.313(1):104-111.



-Sivitz I. W., Yorek A. M. 2010. Mitochondrial Dysfunction in Diabetes: From Molecular Mechanisms to Functional Significance and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & redox signaling*. 12(4):538-577.

-Soto-Urquieta M., López-Briones S., Pérez-Vázquez V., Saavedra-Molina A., González-Hernández G., Ramírez-Emiliano J. 2014. Curcumin restores mitochondrial functions and decreases lipid peroxidation in liver and kidneys of diabetic db/db mice. *Biol Res*. 47:74.

-Stryer L., Berg M. J., Tymoczko L. J. 2013. Bioquímica con aplicaciones clínicas. Editorial reverté. (1) 346-348

-Sugasini D., Devaraj V. C., Ramesh M. 2014. Lymphatic Transport of α -Linolenic Acid and Its Conversion to Long Chain n-3 Fatty Acids in Rats Fed Microemulsions of Linseed Oil. *Lipids*. 49, 225–233

-Sugasini D., Lokesh B. R. 2012. Uptake of α -Linolenic Acid and Its Conversion to Long Chain Omega-3 Fatty Acids in Rats Fed Microemulsions of Linseed Oil. *Lipids*. 47:1155-1167.

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

- Papa S. V. P., Skulachev. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging, *Mol. Cell. Biochem*. 174:305–319

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

-Pérez-Hernández I. H. 2011. Efecto del aceite de linaza (ácido alfa linolénico) sobre la fluidez membranal en células de ratas espontáneamente hipertensas con diabetes. Universidad Nacional Autónoma de México. 131 pp.

-Pérez-Hernández I. H., Domínguez-Fuentes J. M., Palomar-Morales M., Zazueta Mendizabal A. C., Baiza-Gutman A., Mejía-Zepeda R. 2017. Liver mitochondrial

membrane fluidity at early development of diabetes and its correlation with the respiration. *J Bioenerg Biomembr.* 49(3):231-239

-Picard M., Wallace D., Burelle Y. 2016. The raice of mitochondria in medicine. *Mitocondrion* .30:105-116.

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

-Popkin, B. M. 1993. Nutritional patterns and transitions. *Population Development Reviews* 19: 138-57.

-Rodriguez-Cruz M., Tovar A., Del Prado M., Torres N. 2005. Mecanismos moleculares de adición de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Revista de investigación Clínica* .57(3):457-472.

-Van Vliet A. R., Agostinis P. 2018. Mitochondria-Associated Membranes and ER Stress. *Curr Top Microbiol Immunol.*414:73-102.

-Voet D., Voet G.J. 2006. Bioquímica 3° E. Buenos Aires: Médica Panamericana, 1776p

-Waczulikova I., Habodaszova D., Cagalinec M., Ferko M., Ulicna O., Mateasik A., Sikurova L., Ziegelhöffer A. 2007. Mitochondrial membrane fluidity, potential, and calcium transients in the myocardium from acute diabetic rats. *Can J PhysiolPharmacol.* 85:372–381.

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



Apéndice I

Tablas del índice de conversión de ALA a EPA y DHA

A continuación se muestran las tablas del índice de conversión de ALA obtenidas a partir de los cocientes EPA/ALA y DHA/ALA para 1, 3 y 6 meses de edad.

1 MES	MITOCONDRIAS				TEJIDO			
	CN		STZ		CN		STZ	
ALA (mol%)	0.13	± 0.03	ND	ND	0.42	± 0.10	0.26	± 0.10
EPA (mol%)	1.31	± 0.79	2.12	± 1.68	2.71	± 1.95	0.85	± 0.81
EPA/ALA	10.49		--		6.48		3.23	
DHA (mol%)	11.04	± 0.78	9.97	± 1.21	8.79	± 1.96	6.58	± 2.16
DHA/ALA	88.21		--		21.05		25.0	

MITOCONDRIAS												
3 MESES	CN		STZ		CN ω3-C		CN ω3-L		STZ ω3-C		STZ ω3-L	
ALA (mol%)	0.34	± 0.24	0.10	± 0.03	ND	ND	ND	ND	0.32	± 0.05	ND	ND
EPA (mol%)	1.06	± 0.41	1.00	± 0.60	ND	ND	0.53	± 0.02	2.17	± 1.33	0.29	± 0.17
EPA/ALA	3.11		10.03		--		--		6.70		--	
DHA (mol%)	7.13	± 2.52	5.17	± 2.23	5.67	± 1.69	3.86	± 1.89	4.45	± 1.79	4.93	± 1.84
DHA/ALA	20.82		51.68		--		--		13.75		--	
TEJIDO												
3 MESES	CN		STZ		CN ω3-C		CN ω3-L		STZ ω3-C		STZ ω3-L	
ALA (mol%)	0.45	± 0.21	1.75	± 0.94	ND	ND	0.60	± 0.10	0.52	± 0.14	0.51	± 0.22
EPA (mol%)	1.56	± 0.52	0.16	± 0.01	ND	ND	ND	± 0.15	0.20	ND	3.11	± 7.200
EPA/ALA	3.47		0.09		--		--		0.39		6.07	
DHA (mol%)	8.04	± 0.724	3.91	± 1.02	3.65	± 1.98	4.32	± 1.51	4.09	± 1.09	4.72	± 1.95
DHA/ALA	17.93		2.23		--		7.18		7.92		9.21	

MITOCONDRIAS												
6 MESES	CN		STZ		CN ω3-C		CN ω3-L		STZ ω3-C		STZ ω3-L	
ALA (mol%)	0.30	± 0.03	0.28	± 0.08	0.36	± 0.07	0.37	± 0.08	0.88	± 1.23	0.30	± 0.06
EPA (mol%)	ND	ND	ND	ND	0.92	± 0.57	1.33	± 0.58	1.48	± 0.20	0.47	± 0.21
EPA/ALA	--		--		2.56		3.58		1.68		1.59	
DHA (mol%)	7.35	± 1.37	6.19	± 1.43	5.62	± 1.08	4.85	± 2.08	6.96	± 1.07	6.44	± 2.61
DHA/ALA	24.41		21.93		15.63		13.11		7.89		21.75	
TEJIDO												
6 MESES	CN		STZ		CN ω3-C		CN ω3-L		STZ ω3-C		STZ ω3-L	
ALA (mol%)	0.69	± 0.13	0.99	± 0.19	0.81	± 0.19	0.84	± 0.19	0.93	± 0.17	0.68	± 0.20
EPA (mol%)	0.31	± 0.07	1.44	± 4.09	1.90	± 1.26	1.48	± 0.28	0.66	± 0.30	0.79	± 0.33
EPA/ALA	0.45		1.45		2.36		1.75		0.71		1.15	
DHA (mol%)	5.25	± 1.07	4.47	± 0.62	3.96	± 0.52	4.68	± 0.48	4.96	± 0.54	5.90	± 1.16
DHA/ALA	7.57		4.49		4.91		5.54		5.34		8.61	



