



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RELACIÓN ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS Y LA RESPIRACIÓN
MITOCONDRIAL EN TUMORES RENALES EN RATAS WISTAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

KARLA ALEJANDRA AVENDAÑO BRISEÑO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR: DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**RELACIÓN ENTRE LOS ÁCIDOS GRASOS Y LA RESPIRACIÓN
MITOCONDRIAL EN TUMORES RENALES EN RATAS WISTAR**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

KARLA ALEJANDRA AVENDAÑO BRISEÑO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

COMITÉ TUTOR: DRA. SARA RODRÍGUEZ ENRÍQUEZ

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

OFICIO CPCB/565/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 25 de abril de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de (Biología Experimental) de la estudiante AVENDAÑO BRISEÑO KARLA ALEJANDRA con número de cuenta 312199810 con la tesis titulada "Relación entre los ácidos grasos y la respiración mitocondrial en tumores renales en ratas Wistar", realizada bajo la dirección del DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. AIDA SUSANA ROMERO GARCÍA
Vocal: DRA. JAZMÍN MARLEN PÉREZ ROJAS
Vocal: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Vocal: DRA. DIANA BARRERA OVIEDO
Secretario: DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 15 de junio de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría (N° CVU 1035130).

A la DGAPA-UNAM por el apoyo recibido a través del proyecto PAPIIT IN213421-3.

A la FES Iztacala-UNAM por el apoyo al proyecto Número 33 del programa FESI-PAPCA 2021-2022.

Al Dr. Ricardo Mejía Zepeda, por todo el apoyo brindado para realizar este trabajo de investigación.

A los miembros del comité tutor: Dra. Sara Rodríguez Enríquez y al Dr. José Guillermo Ávila Acevedo por todo el apoyo brindado y por los valiosos comentarios para mejorar este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A la Dra. Figueroa. Gracias por los nuevos conocimientos adquiridos, por la buena disposición y porque, sin todo su trabajo y esfuerzo, esta investigación no se habría realizado. Es una mujer admirable.

A Georgina (Gina). Muchas gracias por toda su paciencia, por su apoyo y por toda la orientación brindada durante estos años del posgrado.

A las Dras. Aida Susana Romero García, Jazmín Marlen Pérez Rojas y Diana Barrera Oviedo, así como al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez. Por la revisión de la presente tesis y por sus valiosos comentarios para mejorar este trabajo de investigación.

DEDICATORIAS

A mis padres, por el inmenso amor que me tienen. He llegado hasta aquí gracias a su apoyo y comprensión. No me alcanzaría la vida para agradecerles todo lo que han hecho por mí. Ustedes son mi ejemplo de amor y fortaleza; soy tan afortunada de ser su hija. Los amo mucho.

A mi hermana, por su valentía. Gracias por tantas risas, aprendizajes y por estar ahí cuando más lo he necesitado. I love you.

A mis amigos, por su valiosa amistad y apoyo. Misaelo, gracias por seguir aquí, eres de las mejores personas que conozco; Te quiero mucho. A Héctor y Brendita, porque a pesar de la distancia dejaron una huella imborrable con su amistad. Ramirito y Jorge, chicos, fue un gusto compartir con ustedes otra etapa de nuestra vida académica, espero que podamos seguir creciendo juntos. Los quiero. (Jorge, ojalá pronto se nos haga exponer juntos XD).

Al Dr. Ricardo, por ser el mejor investigador del mundo. Gracias por permitirme trabajar nuevamente con usted, por todo el apoyo, la comprensión y por los nuevos conocimientos adquiridos... pero, sobre todo, muchas gracias por creer en nosotros. Lo quiero mucho.

A Zenit, por todo el amor incondicional. Gracias por el apoyo que me has brindado, por siempre escucharme y por ayudarme a superar todo con tus consejos que son reflejo de tu sensatez. Infinitas gracias por motivarme a ser la mejor versión de mí, Te amo muchísimo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Diabetes y cáncer	3
Relación entre la DM y el cáncer	4
Metabolismo energético en ambas patologías.....	5
Ácidos grasos omega 3 en DM y cáncer	7
Metabolismo de ácidos grasos en DM y cáncer	8
Mitocondrias en DM y cáncer	10
JUSTIFICACIÓN	11
HIPÓTESIS	11
OBJETIVOS	11
General:	11
Objetivos particulares:	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
Modelo Experimental	12
Diseño experimental: Administración de ácidos grasos omega-3.....	12
Medición de peso y glucemia.....	13
Lineamientos de bioética	13
Obtención de muestras.....	14
Aislamiento mitocondrial	15
Respiración de mitocondrias renales	15
Procesamiento de las muestras.....	16
Análisis de los ácidos grasos de mitocondrias y tejido renal.	16
Análisis estadístico	16
RESULTADOS.....	18
Composición de aceite de salmón	18
Peso y glucemia al sacrificio.....	19
Generación de tumores	20
Clasificación de los tumores	23
Peso y medidas de los riñones	25

Respiración mitocondrial.....	26
Composición de ácidos grasos	28
DISCUSIÓN	35
Modelo	35
Peso.....	37
Glucemia.....	38
Curva de Tolerancia a la glucosa.....	39
Respiración mitocondrial.....	40
Composición de ácidos grasos: Índice de fluidez membranar I/S	43
Composición de ácidos grasos: Ácido palmítico	45
Composición de ácidos grasos: Ácido Araquidónico	47
OBSERVACIONES FINALES	53
CONCLUSIÓN	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
ANEXOS	64

ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
ADA	Por sus siglas en inglés: American Diabetes Association
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
ccRCC	Por sus siglas en inglés: Clear cell renal cell carcinoma
CCR	Por sus siglas en inglés: Renal cell carcinoma
ChCCR	Por sus siglas en inglés: Chromophobe renal cell carcinoma
CR	Control Respiratorio
CTG	Curva de Tolerancia a la Glucosa
COX	Ciclooxygenasas
DHA	Ácido Docosahexaenoico
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPH	Difenilhexatrieno
DPIP	Dipirenilpropano
EGTA	(Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético)
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
ETC	Por sus siglas en inglés: Electron Transport Chain
FAS	Por sus siglas en inglés: Fatty Acids Synthase
GLUT 1	Transportador de Glucosa 1
GLUT 2	Transportador de Glucosa 2
GLUT 3	Transportador de Glucosa 3
GLUT 4	Transportador de Glucosa 4

HDL	Por sus siglas en inglés: High density lipoprotein
HEPES	(Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-etanosulfónico)
HIF1-α	Por sus siglas en inglés: Hypoxia-inducible factor 1- alpha
I/S	Cociente de insaturación
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina
IRS-1	Por sus siglas en inglés: Insulin receptor substrate 1
LOX	Lipoxigenasa
MDA	Malondialdehído
nAO	Nano Átomos de Oxígeno
PRCC	Por sus siglas en inglés: Papillary renal cell carcinoma
PPAR γ	Receptores activados por proliferación de peroxisomas isoforma γ
PPARS	Por sus siglas en inglés: Peroxisome proliferator- activated receptors
PUFA omega 3	Por sus siglas en inglés: Polyunsaturated fatty acids omega 3
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RXR	Receptores retinoides X
sPLA2	Por sus siglas en inglés: secretory Phospholipase A2
STZ	Estreptozotocina
VLDL	Por sus siglas en inglés: Very low density lipoprotein

RESUMEN

Los ácidos grasos omega 3 han sido estudiados por sus “supuestos” efectos benéficos en contra la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), sin embargo, recientemente se ha propuesto que la ingesta excesiva y prolongada de estas moléculas incrementa el riesgo de desarrollar cáncer. El diagnóstico de algún tipo de cáncer en las personas que padecen Diabetes Mellitus ha sido cada vez más frecuente.

Se ha observado que el consumo de ácidos grasos omega 3 promueve el desarrollo de tumores renales en ratas Wistar que fueron inducidas experimentalmente a DM2. Se ha informado que la DM y el cáncer alteran la composición de las membranas celulares y sus respectivas mitocondrias. La composición determina las propiedades fisicoquímicas de las membranas y se ha reportado que la composición membranal puede afectar la función mitocondrial. En este estudio nos interesó investigar la composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales y su asociación con la respiración mitocondrial en tumores renales en ratas wistar macho inducidas a DM2.

La DM2 fue inducida en ratas Wistar macho recién nacidas de 48 horas de edad mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) a 125mg/kg de peso corporal. El tratamiento con los ácidos grasos omega 3 de cadena larga (125mg/kg) fue administrado directamente en el hocico de las ratas. Cuando los tumores fueron evidentes se realizó la eutanasia de los organismos y los riñones fueron extraídos, el tejido se homogeneizó y las mitocondrias fueron aisladas por centrifugaciones diferenciales. La respiración mitocondrial fue evaluada midiendo el consumo de oxígeno y la composición de los ácidos grasos del tejido (y de sus respectivas mitocondrias) fue analizada por cromatografía de gases.

El modelo del tumor renal fue obtenido con éxito en el 50 % de los organismos experimentales que recibieron tratamiento de ácido grasos omega 3 de cadena larga. Los tumores generados fueron heterogéneos en cuanto a peso y tamaño, por lo que se clasificaron de acuerdo con diferentes rangos de peso. No se desarrollaron tumores en los organismos que no recibieron el suplemento de omega 3. Se encontró que los organismos inducidos a DM2 tuvieron menor ganancia de peso y mostraron alteración en el metabolismo de la glucosa en comparación con el grupo control. En los tumores renales hubo una disminución en la respiración mitocondrial en el estado 3 y en el estado 4. Además, en los riñones con mayor desarrollo tumoral se encontró una disminución significativa de la proporción del ácido araquidónico y un incremento del ácido palmítico tanto en el tejido como en las mitocondrias. Los cambios encontrados en la proporción de estas moléculas reflejan una disminución en el índice de fluidez membranal (suma de los ácidos grasos insaturados / suma de los ácidos grasos saturados) en estos grupos.

En conclusión, en este estudio se encontró que los ácidos grasos omega 3 de cadena larga están involucrados en el desarrollo de tumores renales. El desarrollo de los tumores alteró la proporción de ácidos grasos de la membrana (tanto del tejido renal como de sus respectivas mitocondrias) y se observó que dichas alteraciones están relacionadas con el peso y tamaño de los tumores. Finalmente, los cambios en la composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales del tejido tumoral están relacionados con la función bioenergética de estas mitocondrias.

ABSTRACT

The Omega 3 fatty acids have been studied because of their supposed beneficial effects against Type 2 Diabetes Mellitus (DM2), however recently it has been proposed that high and prolonged intake of these molecules increases the risk of developing cancer. Diagnosis of some type of cancer in people with DM2 has become more frequent.

It has been observed that consumption of long chain omega 3 fatty acids promotes the development of kidney tumors in Wistar rats that were experimentally induced to DM2. Diabetes and cancer have been reported to alter the lipid composition of cells membranes and their respective mitochondria. The composition determines the physicochemical properties of membranes and it has been reported that the membrane composition could affect the mitochondrial function. In this study we were interested in investigating the fatty acids composition of mitochondrial membranes and its association with mitochondrial respiration in renal tumors in male Wistar rats induced to DM2.

DM2 was induced in 48 hours-old newborn male Wistar Rats by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), at 125 mg/kg of body weight. The treatment with long chain Omega 3 fatty acids (125mg/kg) was administered directly into the mouth of the rats. When tumors were observed, the organisms were euthanized and kidneys were removed, tissue was homogenized and mitochondria were isolated by differential centrifugation. The mitochondrial respiration was evaluated by measuring oxygen consumption and the fatty acids composition of tissue (and its mitochondria) was analyzed by gas chromatography.

The renal tumor model was successfully obtained in 50% of the experimental organisms with long chain omega 3 fatty acids supplement. The tumors generated were heterogeneous in terms of weight and size, so they were classified according to different weight ranges. No tumors were developed in organisms without the omega 3 fatty acids supplement. Organisms induced to DM2 were found to have lower body weight gain and impaired glucose metabolism compared to the control group. In renal tumors, there was a decrease in the mitochondrial respiration in state 3 and in the state 4. In addition, in kidneys with increased tumor developed a significant decrease in the proportion of arachidonic acid and an increase in palmitic acid in both tissue and mitochondria were found. The changes found in the proportion of these molecules shows a decrease in the membrane fluidity index (sum of unsaturated / sum of saturated fatty acids) in these groups.

In conclusion, in this study it was found that long chain omega 3 fatty acids are involved in development of kidney tumors. The development of the tumors altered the proportion of membrane fatty acids (both of the kidney tissue and their respective mitochondria) and these alterations were observed to be related to the weight and size of tumors. Finally, changes in the mitochondrial fatty acids membrane composition of tumor tissue are related to the bioenergetic function of these mitochondria.

INTRODUCCIÓN

Diabetes y cáncer

La diabetes mellitus (DM) y el cáncer son dos patologías multifactoriales y crónicas que tienen una alta prevalencia en el mundo (Wang *et al*, 2020).

La DM se define como un grupo de trastornos metabólicos que se caracteriza por que las personas que lo padecen presentan hiperglucemia (concentración elevada de glucosa en sangre) que puede acompañarse con una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas. Se ha mencionado que el origen y las causas de este síndrome son distintos, sin embargo, se ha establecido que todas conllevan a defectos en la secreción o defectos en la acción de la insulina (American Diabetes Association, 2009).

La insulina es una hormona peptídica cuya función principal es promover la captación de glucosa tanto en las células del músculo esquelético como en las células del tejido adiposo, lo que contribuye a la homeostasis de la concentración de glucosa en sangre. Adicionalmente, la insulina participa en otros procesos metabólicos como la lipogénesis, síntesis de glucógeno en el hígado y promueve la síntesis de proteínas e inhibe los procesos contrarios (Saltiel y Kahn, 2001). En el caso de la DM, la insulina secretada por las células beta no es suficiente o también puede ocurrir que las células diana no responden de manera adecuada a su estímulo lo que da como resultado una desregulación de los procesos metabólicos antes mencionados y como consecuencia se produce un aumento en la concentración de glucosa en sangre.

Las estadísticas indican que alrededor del 90% de los pacientes que padecen DM en el mundo tienen Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) (IDF, 2017) la cual está asociada a malos hábitos alimenticios y falta de actividad física. En el caso particular de algunos países como México el sedentarismo ha ocasionado que la población tenga sobrepeso y obesidad un factor de riesgo para desarrollar diversas patologías, entre estas se encuentra no sólo la DM2 sino también cáncer (Kánter, 2021).

Cáncer se refiere a una colección de enfermedades que están relacionadas entre sí y que comparten características comunes. Dentro de estas características se encuentra que estas enfermedades tienen un origen genético (mutaciones en el material genético de las células) lo que ocasiona que haya alteraciones en los mecanismos de división y muerte celular. Estas alteraciones resultan en un crecimiento celular descontrolado que desencadena en la formación de tumores (National Institutes of Health, 2007) y, eventualmente, estas células tumorales pueden sufrir transformaciones adicionales que les permiten invadir otros tejidos distintos a los de origen (Hanahan y Weinberg, 2000).

Hanahan y Weinberg (2011) realizaron un análisis de la literatura publicada con relación a los trabajos experimentales que se realizaron con tumores y se dieron cuenta que había características que son compartidas por las células neoplásicas, entre estas características se encuentran: Independencia de señales de crecimiento, potencial replicativo ilimitado, insensibilidad a estímulos que inhiben el crecimiento, evasión de la

apoptosis, angiogénesis sostenida, invasividad y metástasis, reprogramación del metabolismo energético y evasión a la respuesta inmune.

De acuerdo con las estimaciones de incidencia y mortalidad por cáncer en la base de datos GLOBOCAN realizadas por la Agencia internacional para la investigación del cáncer, se estima que en el año 2020 en todo el mundo se presentaron 19.3 millones de casos nuevos de cáncer y alrededor de 10 millones de personas fallecieron debido a estas patologías; y se prevé, que para el 2040 el número de casos nuevos de cáncer aumente a 28.9 millones.

Existen diferentes tipos de cáncer, uno de ellos es el que se desarrolla en el riñón. A nivel mundial se estima que más de 430,000 personas fueron diagnosticadas con cáncer de riñón en 2020, lo que representa alrededor de 2.2 % de todos los nuevos casos diagnosticados de neoplasias malignas humanas (Ferlay *et al*, 2020). Dentro de las estadísticas se incluye el carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés), el carcinoma de células de transición de la pelvis renal y el sarcoma renal. El tabaquismo, la obesidad y algunos pacientes con condiciones hereditarias como el síndrome de Von Hippel Lindau son algunos de los factores de riesgo asociados al cáncer renal (Hsieh *et al*, 2017).

El RCC se compone de varios tumores malignos con características biológicas y morfológicas distintas. En conjunto, constituyen alrededor del 85% de todos los tumores malignos renales. De forma general se cree que los RCC surgen de las células epiteliales de la nefrona. Los 3 subtipos principales del carcinoma de células renales incluyen: RCC de células claras (ccRCC), RCC papilar y RCC cromóforo (Nabi *et al*, 2018).

Relación entre la DM y el cáncer

El diagnóstico de algún tipo de cáncer en las personas que tienen DM2 es cada vez más frecuente. Se ha mencionado que el riesgo de varios tumores malignos sólidos (incluidos el cáncer de hígado, páncreas, colorrectal, renal y de mama) es elevado en pacientes diabéticos (Vigneri *et al*, 2009).

Ambos padecimientos se han asociado a diferentes factores de riesgo, sin embargo, hasta la fecha los vínculos entre las dos patologías no se tienen completamente claros. Algunos investigadores han sugerido que la relación entre ambos padecimientos es directa y puede estar establecida por las altas concentraciones de glucosa en sangre, el sello distintivo de la DM. Warburg y colaboradores en la década de 1920 encontraron que los tejidos tumorales sostenían tasas más altas de consumo de glucosa que los tejidos normales y a partir de este hallazgo los investigadores realizaron una gran cantidad de estudios y encontraron que la hiperglucemia puede promover el desarrollo de tumores ya que señalan que las altas concentraciones de glucosa en sangre pueden proporcionar los requerimientos necesarios para la rápida proliferación de las células neoplásicas (Joshi *et al*, 2015).

Otra de las propuestas es que la hiperglucemia podría promover el desarrollo de tumores ya que se ha visto que las altas concentraciones de glucosa en sangre aumentan la producción de radicales libres y otras moléculas reactivas, que, en conjunto pueden promover mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores. Dichas mutaciones ocasionan alteración al DNA y se piensa que este fenómeno puede desempeñar un papel clave en el inicio y la progresión de las células neoplásicas (Ramteke *et al*, 2019; Ames *et al*, 1993).

Adicionalmente, se conoce que en pacientes con DM2 la hiperglucemia detectada a menudo se acompaña de hiperinsulinemia (debido a la condición de resistencia a la insulina) y se sabe que la hiperinsulinemia conduce a una mayor expresión del factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) (Gallagher y LeRoith, 2010). Tanto la insulina como el IGF-1 son hormonas mitogénicas y específicamente, se ha identificado que el IGF1 está implicado en la señalización de PI3K/AKT, vía que lleva a la supervivencia y proliferación celular (Ma *et al*, 2010); y de hecho se ha reportado que esta vía se encuentra altamente desregulada en varios tipos de cáncer (Fresno *et al*, 2004).

Metabolismo energético en ambas patologías

Es bien sabido que en una condición patológica como lo es la DM2 o el cáncer se presentan modificaciones del metabolismo energético. Entre estas modificaciones se encuentran las que están involucradas con el metabolismo de carbohidratos (Lin *et al*, 2020; Bonadonna, 2004).

En la DM2 se conoce que los cambios en el metabolismo de la glucosa llevan a alteraciones en el metabolismo de otras biomoléculas, lo cual tiene efectos perjudiciales sobre diferentes tejidos y órganos. Como se mencionaba anteriormente, la DM2 se caracteriza por la pérdida progresiva de la secreción de insulina y/o derivada de la resistencia a la insulina, lo cual implica una alteración en los procesos metabólicos en los que esta hormona participa.

En un principio, la estimulación de la captación de glucosa (por translocación de GLUT 4 a la membrana plasmática) no se lleva a cabo de manera adecuada en las células del tejido adiposo y las células del tejido muscular (Vargas *et al*, 2021), lo que ocasiona que estas células no puedan utilizar principalmente la glucosa para la obtención de energía; esta restricción obliga a los miocitos y adipocitos a utilizar otras biomoléculas (como los ácidos grasos y los aminoácidos) para producción de ATP, lo que da como resultado una disminución de las reservas de estas moléculas en los tejidos correspondientes. Específicamente, la resistencia a la insulina ocasiona una disminución de la entrada de aminoácidos en el tejido muscular con lo que se ve favorecido el catabolismo proteico en este tejido (Wang *et al*, 2006; Price *et al* 1996) y hay un aumento en el uso de estas biomoléculas para ser utilizadas como sustrato para la gluconeogénesis.

En el caso del tejido adiposo, la resistencia a la insulina impide la captación de los ácidos grasos puesto que la enzima lipoproteína lipasa 1, encargada de catalizar la hidrólisis de los triacilglicéridos contenidos en las lipoproteínas (quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL) no es estimulada de manera adecuada. (Panarotto *et al*, 2002; Taskinen *et al*, 1982). Además, con resistencia a la insulina, los adipocitos no pueden almacenar los triacilglicéridos y se ve favorecida la lipólisis (Morigny *et al*, 2016).

Todo lo descrito anteriormente ocasiona hiperglucemia en el organismo, que no sólo puede generar un estado denominado glucotoxicidad (que es altamente perjudicial para el organismo) sino que como se mencionó anteriormente, se ha propuesto que las altas concentraciones de glucosa en sangre podrían cubrir las demandas energéticas de células altamente proliferativas como en el caso de las células tumorales.

Se sabe que las células neoplásicas presentan diversas diferencias bioquímicas con respecto a las células no transformadas. De acuerdo con varios investigadores la gran mayoría de las células tumorales tienen un metabolismo energético modificado (Hammoudi *et al*, 2011; Hanahan y Weinberg, 2011).

Como se mencionó anteriormente, Warburg y colaboradores fueron pioneros en encontrar estas diferencias ya que en 1920 encontraron que los tejidos tumorales sostenían tasas más altas de consumo de glucosa que sus contrapartes normales. A partir de este hallazgo plantearon una serie de propuestas para intentar dar explicación a este fenómeno. Dentro de estas propuestas estaba que la capacidad glucolítica aumentada en las células tumorales era ocasionada por una deficiencia energética causada por un daño irreversible de la función mitocondrial. Por mucho tiempo se pensó que esta idea era correcta y que la glucólisis era la principal vía proveedora de ATP en estas células; sin embargo, en los últimos años con los trabajos realizados por varios investigadores se ha visto que esto no es del todo cierto puesto que estas observaciones no fueron reportadas en todos los tipos de células tumorales. Por lo anterior, en revisiones más recientes se propone que debido a la heterogeneidad de las células neoplásicas se debe evaluar la capacidad de fosforilación oxidativa para cada línea tumoral con la que se esté trabajando (Moreno-Sánchez *et al*, 2007).

No obstante, lo que sí se ha demostrado experimentalmente, es que en muchas líneas tumorales la capacidad glucolítica se ve aumentada. Estudios posteriores mostraron que el aumento de la glucólisis en estas células se debe a que algunos de los transportadores de glucosa (principalmente GLUT 1 y GLUT3) (Yamamoto *et al*, 1990) así como algunas enzimas glucolíticas (Hexocinasa y Fosfofructocinasa) se sobreexpresan (Coelho, *et al*, 2015; Moreno-Sánchez *et al*, 2007).

Las observaciones antes mencionadas han sido involucradas con el factor inducible por hipoxia 1 (HIF1 α), regulador de la expresión genética que juega un papel importante en las respuestas adaptativas de las células a condiciones de hipoxia (Tirpe *et al*, 2019). A partir de todo lo descrito anteriormente, una de las propuestas que ha tenido mayor aceptación es que el aumento observado de la glucólisis es una estrategia metabólica que les permite a las células sobrevivir y crecer en estos entornos tumorales donde ya se ha demostrado que la concentración de oxígeno es baja (Gatenby y Gillies, 2004).

Ácidos grasos omega 3 en DM y cáncer

Los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (PUFA omega 3,) han sido considerados como alimentos nutraceuticos, ya que se ha mencionado que además de su valor nutricional estas moléculas actúan en la prevención y/o tratamiento de algunas patologías. Son varios los trabajos experimentales que ponen en evidencia los efectos benéficos de los ácidos grasos omega 3, entre estos trabajos se encuentra el uso de estas moléculas en el tratamiento de la DM2 y el cáncer. En el caso particular de la DM2 se ha demostrado que la suplementación de PUFA omega 3 produce efectos hipolipidémicos favorables (Chauhan *et al*, 2017; Connor, 1988) y se ha visto una mejora del control glucémico (Vicenteño 2018; Cabezas y Díaz, 2015). Con relación a los efectos benéficos para el tratamiento contra el cáncer, los estudios sugieren que la suplementación con omega -3 ayuda principalmente a atenuar la pérdida de masa muscular asociada con la caquexia (Abe *et al*, 2018; Schiessel *et al*, 2015).

Los investigadores han manifestado una serie de propuestas para explicar los efectos benéficos de los PUFA omega 3. Entre estas propuestas se encuentra la incorporación competitiva de estos ácidos grasos en las membranas biológicas. Se ha visto que dicha incorporación de estos PUFAS repercute en cambios en la organización molecular de las membranas con lo cual no sólo se ven afectadas las propiedades de la misma, sino que, dichos cambios pueden influir en la señalización celular (al alterar las balsas lipídicas) (Williams *et al*, 2012).

Además, se ha propuesto que los PUFA omega 3 participan en la transducción de señales actuando como ligandos de ciertos receptores nucleares. Entre estos receptores se encuentran los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs), los cuales regulan una amplia variedad de genes. Entre estos se encuentran los genes involucrados en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos y la sensibilidad a la insulina (González-Pérez, *et al*, 2009; Edwards y O'Flaherty, 2008).

Adicionalmente, se conoce que tanto el ácido eicosapentaenoico (EPA) como el ácido docosahexaenoico (DHA) son precursores de un grupo de lípidos conocidos como resolvinas y protectinas, moléculas que poseen propiedades antiinflamatorias (González-Pérez, *et al*, 2009). Lo anterior tiene gran relevancia puesto que la inflamación se ha relacionado con el inicio y progresión de la DM y el cáncer. Sin embargo, se ha reportado que la administración de los PUFA omega 3 produce algunos efectos no deseados (Albert *et al*, 2013) y es por esta razón que el consumo de estas moléculas sigue siendo controversial. Por ejemplo, existen estudios prospectivos en donde se ha mencionado un riesgo elevado de cáncer de próstata en los hombres con altas concentraciones de PUFA omega 3 en sangre (Brasky *et al*, 2013).

Hasta la fecha no se conocen por completo los efectos reales de los PUFA omega 3 y, recientemente, ha surgido preocupación por su consumo ya que se ha propuesto que la ingesta alta y prolongada de estas moléculas pueda ejercer efectos pro cancerígenos en humanos (Lange *et al*, 2019; Serini y Calviello, 2018). Las concentraciones

sanguíneas/tisulares de EPA y DHA aumentan de acuerdo con su ingesta mediante el consumo directo tanto de los alimentos como de los suplementos y es bien conocido que estos ácidos grasos son muy propensos a ser oxidados debido a la presencia de los dobles enlaces en su estructura. Por lo anterior, cuando estas moléculas están en altas concentraciones, especialmente en condiciones donde se presentan estados de inflamación crónica, pueden formarse diversos compuestos tóxicos (Serini y Calviello, 2018). Dichos compuestos podrían conducir a un estado de inestabilidad genómica y por lo tanto podrían asumir un papel importante en la formación de tumores (Marnett, 1999).

García- Gasca en 2021 encontró que la administración de los ácidos grasos omega 3 (específicamente los de cadena larga, EPA y DHA) propicia el desarrollo de tumores renales en ratas Wistar a las que se les indujo experimentalmente la DM2 por una inyección intraperitoneal de Estreptozotocina (STZ). En los grupos que sólo fueron inducidos a DM2 y que no recibieron tratamiento la formación de tumores no fue evidente. La STZ es un fármaco que ha sido reportado como agente carcinogénico (Szkudelski, 2012) y su efectividad para inducir DM experimental reside en la especificidad para las células beta pancreáticas debido a que la STZ puede ingresar a dichas células a través del Glucotransportador 2 (Hosokawa *et al*, 2001; Schnedl *et al*, 1994), transportador que también se encuentra en las células renales (Thorens *et al*, 1990).

Metabolismo de ácidos grasos en DM y cáncer

Está bien documentado que la fisiopatología de la DM2 y el cáncer está relacionada con la modificación de las enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos y en particular, varios trabajos de investigación han resaltado el papel clave de los ácidos grasos y su metabolismo en el desarrollo y progresión de ambas patologías.

Por ejemplo, la dislipidemia que se observa en la DM2 a menudo se asocia con concentración altas de triacilgliceroles, concentraciones bajas de colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (HDL) y concentraciones elevadas de ácidos grasos libres. Se ha postulado que los ácidos grasos libres pueden alterar la acción de la insulina y el metabolismo de la glucosa de varias formas. Una de las propuestas es que los ácidos grasos libres inhiben la señalización de la insulina en los adipocitos mediante una vía de transducción de señales que lleva a la inhibición de la función de IRS-1 (Gao *et al*, 2004), además se ha mencionado que la exposición crónica de las células beta pancreáticas a altas concentraciones extracelulares de ácidos grasos libres altera la respuesta secretora de insulina a la glucosa (Arner, 2002).

En el caso del cáncer, se conoce que los ácidos grasos son esenciales para las células neoplásicas pues proporcionan una fuente importante de energía durante condiciones de estrés metabólico (Koundouros y Poulogiannis, 2020). Además, cada vez existe más evidencia que respalda que ciertos tipos de células tumorales son capaces de sintetizar *de novo* sus ácidos grasos, por lo tanto, se ha propuesto que la lipogénesis tiene un papel clave en el crecimiento tumoral (Röhrig y Schulze, 2016) y, experimentalmente se ha

demostrado que existen vías oncogénicas que convergen en la síntesis de ácidos grasos (Yang *et al*, 2002; Swinnen *et al*, 2000).

Se ha planteado que dentro de los motivos de la síntesis de novo en las células tumorales está la construcción de membranas biológicas, un proceso esencial para la rápida proliferación de estas células. Una de las enzimas claves en el proceso antes mencionado es la sintasa de ácidos grasos (FAS, por sus siglas en inglés); experimentalmente, se ha demostrado que esta enzima está regulada positivamente en varios tipos de cáncer (Wang *et al*, 2005; Swinnen *et al*, 2002; Kusakabe *et al*, 2002).

Como se describió anteriormente, es claro que el metabolismo de los ácidos grasos se ve modificado en ambas patologías y específicamente, se han realizado estudios en donde se pretenden observar las alteraciones que ocasionan estas patologías en las membranas de distintas células. Un parámetro que comúnmente se reporta para observar estos cambios es la fluidez membranal.

La fluidez de membrana indica el grado de desorden molecular y es un parámetro que hace referencia a la facilidad de movimiento que tienen las moléculas/componentes dentro de la bicapa lipídica (Los y Murata, 2004). La alteración de este parámetro puede desempeñar un papel clave en la regulación de las propiedades de la membrana y con ello influir en otros procesos celulares; por ejemplo, se ha mencionado que la permeabilidad de la membrana está correlacionada con la fluidez de la membrana (Lande *et al*, 1995) y experimentalmente se ha observado que algunos procesos de transporte (Block y Edwards, 1978), así como la actividad de ciertas enzimas pueden alterarse cuando la fluidez de la membrana se ve afectada (Brasitus *et al*, 1988).

Los factores ambientales y algunos nutrientes afectan la fluidez de la membrana al alterar la temperatura, la composición de proteínas y lípidos (contenido de colesterol, porcentaje de ácidos grasos saturados e insaturados en sus moléculas de fosfolípidos), y al inducir la modificación de dichas proteínas y lípidos (por ejemplo, lipoperoxidación) (Maulucci *et al*, 2016).

En general, se acepta que con el desarrollo de la DM2 las membranas de distintos tipos celulares tienden a ser rígidas o menos fluidas (Pilon, 2016) y se ha propuesto que el cambio en este parámetro durante el desarrollo de esta patología es derivado de una disminución de la actividad de las desaturasas. (Ntambi, 1999), lo que implica que la proporción de los ácidos grasos saturados en la membrana aumenta. Esta propuesta es parcialmente compatible con los resultados obtenidos por nuestro equipo de trabajo, ya que se ha encontrado que dependiendo de la etapa en desarrollo de la DM2 la fluidez de membrana efectivamente cambia, sin embargo, este cambio no implica necesariamente una disminución (Pérez-Hernández *et al*, 2017).

Por su parte, en el caso del cáncer, la generalidad es una mayor fluidez. Se ha encontrado que en distintos tipos de cáncer la fluidez membranal aumenta en comparación con sus contrapartes normales. Comúnmente se ha reportado que este incremento en la fluidez de membrana se relaciona con el potencial invasivo y la capacidad metastásica de estas células (Zhao *et al*, 2016). Por ejemplo, se ha informado que las células de carcinoma de pulmón que tienen una mayor fluidez membranal está relacionada con el potencial maligno de estas células (peor pronóstico para los pacientes) (Sok *et al*, 2002). Por su parte, en células de cáncer de mama se reportó que el aumento

en la fluidez membranal se correlaciona con un aumento de la metástasis pulmonar (Zeisig *et al*, 2007); y, particularmente, ya se ha demostrado que en líneas celulares malignas existen diferencias en el contenido y la proporción de ácidos grasos de sus membranas en comparación con las células del tejido normal (Meng *et al*, 2004).

Mitocondrias en DM y cáncer

Se ha reportado que la DM, no sólo altera la composición membranal de las células sino también altera la composición de las membranas mitocondriales. Lo anterior es importante ya que varios procesos celulares tienen lugar en las membranas biológicas y, por lo tanto, el cambio en el patrón lipídico podría tener consecuencias directas específicamente sobre un proceso que es indispensable para la función celular: la respiración mitocondrial.

En mitocondrias de corazón de ratas inducidas a Diabetes mellitus tipo 1 (DM1), se ha informado una asociación negativa entre la fluidez de membrana y el potencial de membrana (parámetro esencial en la síntesis de ATP en estas células) (Waczulikova *et al*, 2007).

Figueroa – García y colaboradores (2015) encontraron que una hiperglucemia leve cambia el patrón lipídico de las membranas mitocondriales placentarias en ratas hembras con DM2, se reportó un aumento en la proporción de los ácidos grasos insaturados y una disminución en la respiración.

Posteriormente, Pérez- Hernández y colaboradores (2017) reportaron que en mitocondrias de hígado la fluidez membranal aumenta durante el desarrollo temprano de la DM2, también se encontró un aumento en la proporción de ácidos grasos insaturados en la membrana y por su parte, se encontró un aumento en la respiración mitocondrial.

Recientemente, Mejía -Zepeda y Pérez Hernández (2020), demostraron que en ratas wistar que cursaron por 5 meses de hiperglucemia, la DM2 disminuyó la fluidez de la membrana en mitocondrias hepáticas (por cambios en la composición de sus ácidos grasos) y a su vez, encontraron disminución en el control respiratorio de estas mitocondrias.

Lo anterior, parece reflejar que las alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de las membranas de las mitocondrias (cambios en los ácidos grasos o en la fluidez membranal) traen como consecuencia alteraciones en la respiración mitocondrial.

Con relación al cáncer, García- Gasca (2021) reportó que en el modelo de tumor renal inducido por STZ y suplementación de ácidos grasos omega 3 hay alteraciones en las propiedades físicas (fluidez) y químicas (composición de ácidos grasos) del tejido tumoral. En el caso de las mitocondrias, dichas alteraciones aún no han sido descritas; por lo tanto, existe la necesidad de conocer los efectos que los cambios en el metabolismo de los lípidos pueden generar en las membranas mitocondriales y como consecuencia, en su función bioenergética.

JUSTIFICACIÓN

Uno de los tratamientos más difundidos en la actualidad contra la diabetes, es el uso de ácidos grasos omega 3 de cadena larga, los cuales parecen estar implicados en el desarrollo de tumores renales en ratas inducidas a DM2 por STZ. En este modelo, ya se demostró que hay alteraciones en las propiedades fisicoquímicas de los lípidos del tejido tumoral, sin embargo, aún se desconoce qué ocurre en membranas mitocondriales. Lo anterior es relevante si se considera que hay procesos celulares que tienen lugar en las membranas de estos organelos, como la respiración mitocondrial, que podría verse afectado.

HIPÓTESIS

La respiración mitocondrial, proceso bioenergético asociado a las membranas mitocondriales, se verá afectada por cambios en la composición de ácidos grasos de dichas membranas durante el desarrollo de tumores renales.

OBJETIVOS

General:

Analizar la participación de la composición de ácidos grasos en las propiedades fisicoquímicas de las membranas mitocondriales y su relación con la respiración mitocondrial en tumores renales en ratas Wistar- macho inducidas a diabetes mellitus tipo 2.

Objetivos particulares:

- Evaluar la función mitocondrial a través del control respiratorio en tumor renal de ratas Wistar inducidas a diabetes mellitus tipo 2 suplementadas con ácidos grasos omega 3 de cadena larga (EPA y DHA).
- Analizar la composición de ácidos grasos de tejido y mitocondrias en tumor renal de ratas Wistar inducidas a diabetes mellitus tipo 2 suplementadas con ácidos grasos omega 3 de cadena larga (EPA y DHA).
- Analizar el efecto del desarrollo de tumores sobre la composición de ácidos grasos de mitocondrias renales y su repercusión en la respiración mitocondrial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo Experimental

La Diabetes mellitus tipo 2 fue inducida en ratas Wistar macho neonatos de 48 horas de edad por inyección intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) con una dosis de 125 mg/kg de peso corporal disuelto 50 μ l de amortiguador de citratos, a un pH de 4.6. Para el caso de los grupos control solamente se les inyectó el amortiguador de citratos. Los animales se mantuvieron con la madre hasta que fueron destetados, aproximadamente a las 4 semanas de edad. Para más información referente al modelo, ver anexos.

Diseño experimental: Administración de ácidos grasos omega-3

Se formaron 4 grupos experimentales de acuerdo con el siguiente esquema (Figura 1): Grupo control sin tratamiento (Control), Grupo control con administración de ácidos grasos omega 3 de cadena larga (Control + ω -3), Grupo inducido a DM2 sin tratamiento (STZ) y Grupo inducido a DM2 con tratamiento de ácido grasos omega 3 de cadena larga (STZ+ ω -3). Los ácidos grasos fueron administrados de forma oral con ayuda de una micropipeta con una dosis de 125 mg/kg de peso corporal. El tratamiento se comenzó a administrar cuando los animales cumplieron las 4 semanas de edad y el esquema de dosificación empleado fue de 7 días a la semana. El tiempo de administración del tratamiento fue variable (de los 6 a los 9 meses de edad de los organismos), ya que dependió del periodo de desarrollo de los tumores renales (detectados por palpación).

Para asegurar que el tratamiento administrado era buena fuente de EPA y DHA se procedió a realizar el análisis correspondiente del aceite por medio de cromatografía de gases.

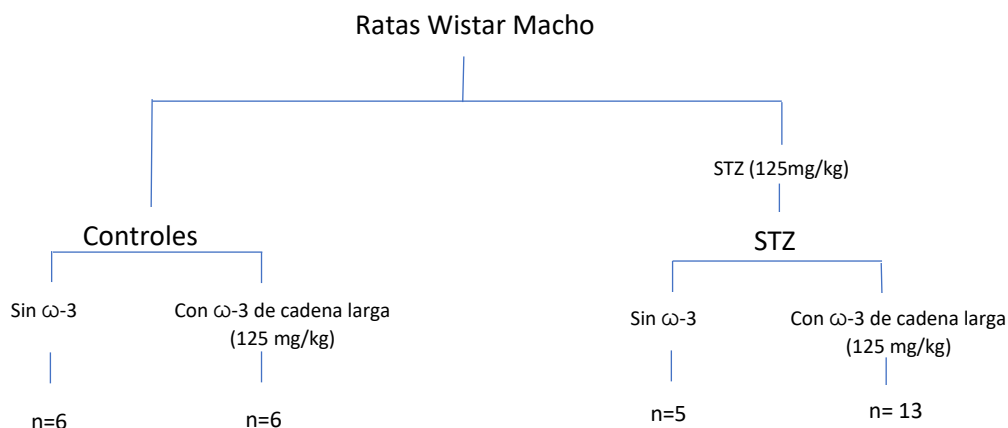


Figura 1. Esquema del diseño experimental; n= número de animales.

Medición de peso y glucemia

La concentración de glucosa en sangre fue cuantificada con un glucómetro marca Accucheck. La muestra de sangre fue obtenida por medio de punción en la cola con ayuda de una lanceta. El peso de los animales se obtuvo con ayuda de una balanza digital. Ambos parámetros se obtuvieron antes de proceder a la eutanasia de los organismos con previo ayuno de 4 horas.

Lineamientos de bioética

Para la realización de este estudio se siguieron las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) y AVMA Guidelines on Euthanasia (2007).

Obtención de muestras

Una vez cumplido el tiempo establecido en protocolo, se realizó la eutanasia de los organismos. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40mg/kg de peso) por vía intraperitoneal y se prosiguió a exsanguinarlos por punción cardíaca para después extraer los riñones.

Posteriormente, los órganos se procesaron completos cuando:

- 1) Los riñones estaban totalmente sanos (figura 2a).
- 2) El desarrollo del tumor fue muy avanzado y no fue posible distinguir tejido sano (figura 2b).

Por el contrario, en el caso de los riñones con tumor, se realizó la separación de la sección del tejido con tumor y el tejido normal. Lo anterior se hizo únicamente en los riñones que tuvieron desarrollo incipiente del tumor (o en los riñones en los cuáles fue posible distinguir macroscópicamente estas dos secciones) (Figura 2c).

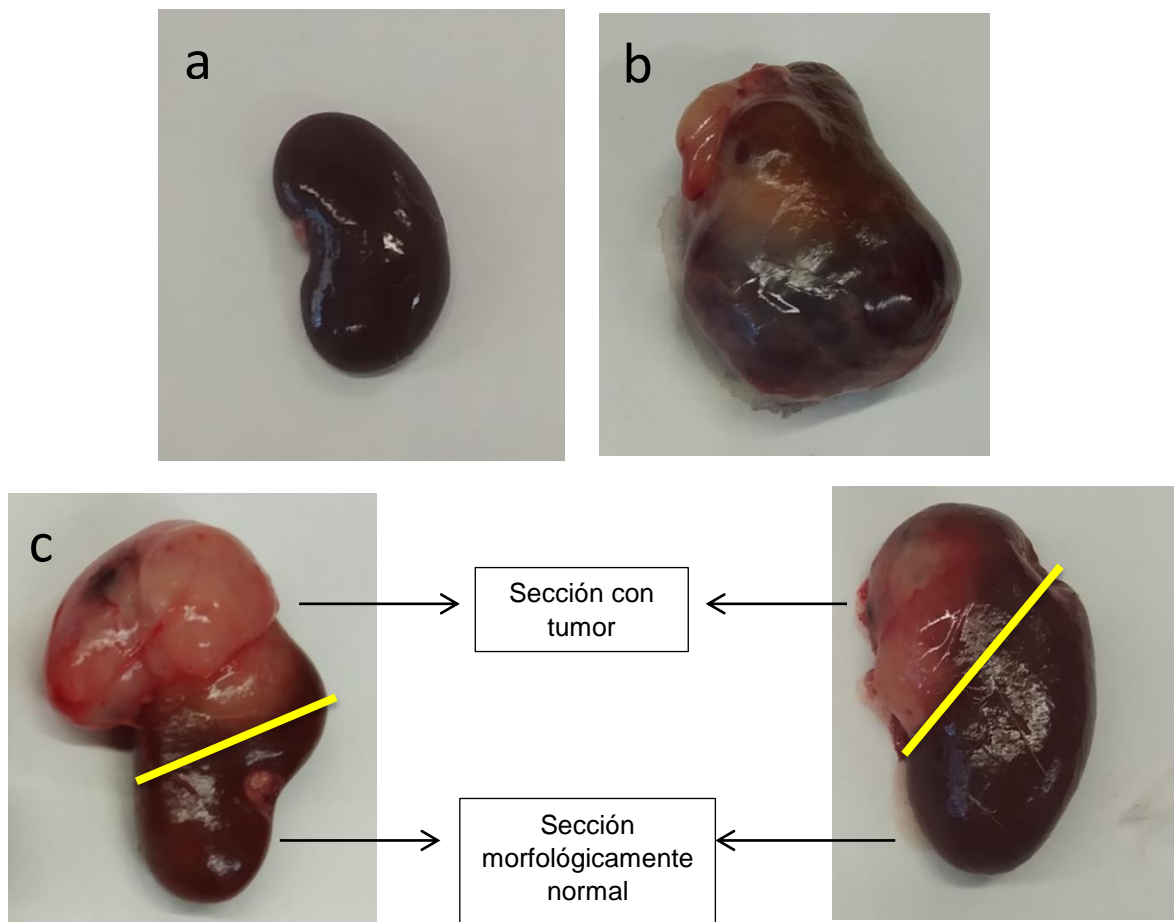


Figura 2. Representación de cómo se procesaron los riñones de acuerdo con su característica macroscópica sano/tumoral. En **a**, riñón completamente sano; en **b**, riñón con desarrollo de tumor avanzado; en **c** riñones con tumor en donde fue posible distinguir tejido sano y tejido tumoral.

Los riñones completos (o las secciones de riñón, según fue el caso) se transfirieron a un medio acuoso (medio de aislamiento), el cual está compuesto por sacarosa 0.07 M, ácido 4- (2-hidroxietil) piperazina- 1 etanosulfónico (HEPES) 20 mM, manitol 0.21 M y albumina bovina 2 Mm a pH. 7.4; los riñones fueron homogeneizados con ayuda de un homogeneizador de vidrio Potter- Elvehjem en hielo evitando el sobrecalentamiento de la muestra y las mitocondrias de riñón fueron aisladas por centrifugaciones diferenciales. Con la finalidad de conocer la composición de ácidos grasos del tejido renal se colectó una muestra del homogenado para su posterior análisis en cromatografía de gases.

Aislamiento mitocondrial

Las mitocondrias de riñón fueron aisladas por centrifugaciones diferenciales empleando una centrífuga Sorvall ST 16 R (Thermo Scientific) con rotor F15-6x100. Se hicieron 3 centrifugaciones de 10 minutos cada una. En la primera centrifugación de 2500 rpm se colectó el sobrenadante. La segunda centrifugación fue de 7500 rpm y se obtuvo el precipitado. Posteriormente, se hizo una incubación de 30 min con el precipitado obtenido y medio de aislamiento con albumina al 1% con la finalidad de eliminar los ácidos grasos libres de la fracción mitocondrial. La última centrifugación fue de 9000 rpm en donde se obtuvo el precipitado (mitocondrias de riñón) y fue resuspendido en el menor volumen posible (menos de 1 ml) para posteriormente proceder a cuantificar proteína (Método de Bradford, 1976).

Respiración de mitocondrias renales

La función mitocondrial fue evaluada con la medición de consumo de oxígeno. Para ello se utilizó un electrodo de oxígeno tipo Clark conectado a un oxímetro YSI 500A. Los experimentos fueron realizados en una cámara de reacción que contenía 1.5 ml de medio de control respiratorio (medio de reacción) cuyos componentes son Succinato 10 mM, Sacarosa 250 mM, MgCl₂ 10 mM, H₃PO₄ 10 mM, EGTA 1.1 mM y albúmina bovina al 1%. El medio de reacción se mantuvo a una temperatura de 37°C mediante un baño de recirculación JULABO 77960. El consumo de oxígeno fue monitoreado por una computadora con ayuda del programa Bite Wedge Standard.

La respiración mitocondrial se evaluó con los cambios en la velocidad del consumo de oxígeno (consumo de oxígeno por unidad de tiempo) en los estados 4 (alto contenido de sustrato y oxígeno) y estado 3 (alto contenido de sustrato y adición de ADP) para posteriormente calcular el control respiratorio (cociente de la velocidad en estado 3/ velocidad del estado 4).

Procesamiento de las muestras.

Los metil ésteres de los ácidos grasos fueron obtenidos siguiendo el método de Morrison y Smith (1964). Se utilizaron viales de vidrio de 4 ml en donde se adicionaron 50 µl de muestra, posteriormente se agregó 1 ml de reactivo de trifluoruro de boro 14% en metanol. Los viales se colocaron en baño maría por 30 minutos a temperatura de ebullición del agua (aproximadamente 92°C a la altura de la CDMX). Una vez transcurrido el tiempo los viales se retiraron del baño maría y se le adicionaron 2 ml de hexano y 1 ml de agua, se centrifugó y dio como resultado la formación de dos fases. A continuación, se colectó la parte orgánica y esta se trasladó a otro vial. El hexano fue evaporado con una corriente constante de nitrógeno y los metil ésteres de los ácidos grasos fueron almacenados en congelación y protegidos de la luz para su posterior análisis.

Análisis de los ácidos grasos de mitocondrias y tejido renal.

Los metil ésteres de los ácidos grasos fueron resuspendidos en 50 µl de hexano, se analizaron en un cromatógrafo de Gases Perkin Elmer Clarus 500 cuyas características son las siguientes: inyector capilar Split/splitless y detector de ionización de flama (FID). La columna responsable de la separación de los ácidos grasos fue la columna capilar Omegawax con un diámetro interno de 0.25 mm y 30 m de longitud. El gas acarreador fue nitrógeno. Se inyectaron 4 µl de la muestra y la composición de ácidos grasos tanto del tejido, así como de las mitocondrias renales se determinó por comparación de los tiempos de retención con metil esterés estándares y por análisis de las áreas bajo los picos de los ácidos grasos correspondientes registrados en el cromatograma.

Análisis estadístico

En este estudio, la "n" fue variable dependiendo de la naturaleza de los datos presentados.

- Para los datos del peso y la glucemia, la n hace referencia al número de organismos de cada grupo experimental (n= número de animales).
- En el caso de los pesos y las medidas de los órganos, la n corresponde a los riñones que fueron extraídos (n= número de riñones).
- Por su parte, en los datos de la respiración mitocondrial y la composición de ácidos grasos, la n hace referencia al número de ensayos que se realizaron (n= número de ensayos).

Se utilizó la prueba de Kolmogorov- Smirnov para probar la normalidad de los datos del peso de los organismos. Posteriormente estos datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con prueba de Bonferroni.

Los demás datos (parámetros respiratorios y composición de ácidos grasos) fueron analizados mediante prueba de Kruskal- Wallis con prueba de Dunn's para la comparación múltiple de los datos entre los grupos. Todos los análisis se realizaron en el programa SigmaPlot 12.3 (2013).

RESULTADOS

Composición de aceite de salmón

El aceite de salmón comercial seleccionado para el tratamiento fue analizado por cromatografía de gases. En la tabla 1 se presenta la composición (en mol %) del aceite de la marca salmon oil 1000; se encontró que este aceite es buena fuente de ácidos grasos omega 3 de cadena larga ya que su contenido de EPA y DHA es de 24.27 y 14.63 % respectivamente, lo que en conjunto representa un contenido de alrededor del 39%.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos del aceite de salmón comercial analizado por cromatografía de gases

Ácido graso	mol %
<i>Mirístico</i>	3.65 ± 0.20
<i>Palmítico</i>	9.41 ± 0.20
<i>Palmitoleico</i>	4.57 ± 0.31
<i>Esteárico</i>	2.83 ± 0.31
<i>Oleico</i>	20.09 ± 0.39
<i>Linoleico</i>	4.66 ± 0.41
<i>Linolénico</i>	2.04 ± 0.15
<i>Araquídico</i>	1.57 ± 0.37
<i>Araquidónico</i>	1.16 ± 0.46
<i>EPA</i>	24.27 ± 0.26
<i>DHA</i>	14.63 ± 1.41
<i>NI</i>	7.50 ± 1.06

EPA, Ácido eicosapentaenoico; DHA Ácido docosahexaenoico; NI, No identificado

Peso y glucemia al sacrificio.

Los parámetros fisiológicos (peso y glucemia) se tomaron justo antes de proceder a la eutanasia de los organismos. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 2.

En general, se observa que, de las ratas sacrificadas, el grupo STZ fue el grupo que tuvo una menor ganancia de peso corporal en relación con las ratas de los otros grupos experimentales y este parámetro es significativamente menor si se compara con la ganancia de peso del grupo control.

Como era de esperarse, tanto el grupo normoglicémico (grupo control) así como el grupo normoglicémico con administración de ácidos grasos omega 3 (grupo control+ ω -3) tuvieron glucemias normales. En contraste, los grupos STZ y STZ + ω -3 mostraron glucemias muy elevadas al momento del sacrificio en comparación con sus respectivos grupo control.

Además, con la finalidad de mostrar cómo es el control de la glucemia en organismos representativos de los diferentes grupos experimentales, se realizaron Curvas de Tolerancia a la Glucosa (CTG) (Figura 10, anexos).

Tabla 2. Peso y glucemia de ratas diabéticas tipo 2 tratadas con ácidos grasos omega 3 de cadena larga al sacrificio.

Grupo experimental	Peso (g)	Glucemia (mg/dL)
Control (n=6)	514 ± 53	95 ± 8
Control + ω -3 (n=6)	469 ± 33	90 ± 5
STZ (n=5)	413 ± 38 *	214 ± 158
STZ + ω -3 (n=13)	461 ± 43	189 ± 108

STZ; diabético tipo 2, ω -3: ácidos grasos omega 3 de cadena larga, n= número de organismos
* $p < 0.05$ diferencia con relación al grupo control.

Generación de tumores

Las siguientes figuras muestran los tumores renales generados en las ratas que fueron inducidas a DM2 y que recibieron administración de ácidos grasos omega 3 (STZ + ω -3).

En la figura 3a se muestra la primera rata sacrificada de este grupo experimental con una edad de 8 meses; se observa la formación del tumor renal a simple vista y en la figura 3b se muestran sus respectivos riñones, en el caso de este organismo el tumor se generó en el riñón izquierdo.

En la figura 3c se muestra la segunda rata sacrificada, la edad de sacrificio fue a los 7 meses y en este caso se observa el tumor renal al momento de extirpar estos órganos, mientras que, en la figura 3d se puede apreciar con mayor claridad el crecimiento celular anormal del riñón tumoral (riñón derecho) en comparación con el riñón que no presentó tumor (riñón izquierdo).

En la figura 3e se muestra la tercera rata sacrificada de este grupo experimental y se observa que, en el caso de este organismo, la generación de tumores renales es evidente en ambos riñones (los tumores se encuentran señalados por círculos rojos); finalmente, en la figura 3f se muestran los riñones una vez que estos fueron extraídos y se aprecia que, el riñón derecho tuvo un crecimiento tumoral mayor.

En la figura 4a se muestra el riñón izquierdo con tumor (círculo rojo) de la cuarta rata sacrificada a los 7 meses de edad; en 4b se observan sus riñones una vez que fueron extraídos. En este caso es evidente que ambos riñones presentaron tumor (incluso el peso de sus riñones con tumor fue muy similar, alrededor de los 20 g).

En la figura 4c se observa la quinta rata de este grupo experimental, la edad de sacrificio fue a los 8 meses y en este caso se observa el tumor renal al momento de extirpar estos órganos; por su parte, en la figura 4d se aprecia el crecimiento anormal del riñón tumoral (riñón derecho) en comparación con el riñón que no presentó tumor (riñón izquierdo).

Finalmente, en la figura 4e se muestra el riñón derecho con tumor de la sexta rata sacrificada de este grupo experimental, mientras que en la figura 4f se observan sus riñones una vez que fueron extraídos. En el caso de este organismo se observa que ambos riñones presentaron tumor, sin embargo, el riñón derecho tuvo un crecimiento tumoral mayor.

Se presentan estas imágenes por dos razones: la primera es para demostrar que se obtuvo con éxito el modelo de generación de tumores renales y la segunda, es para hacer notar que los tumores se generaron en algunos casos en el riñón derecho, en otros casos en el riñón izquierdo y también se tuvieron ratas en las que el desarrollo de tumores fue evidente en ambos riñones.

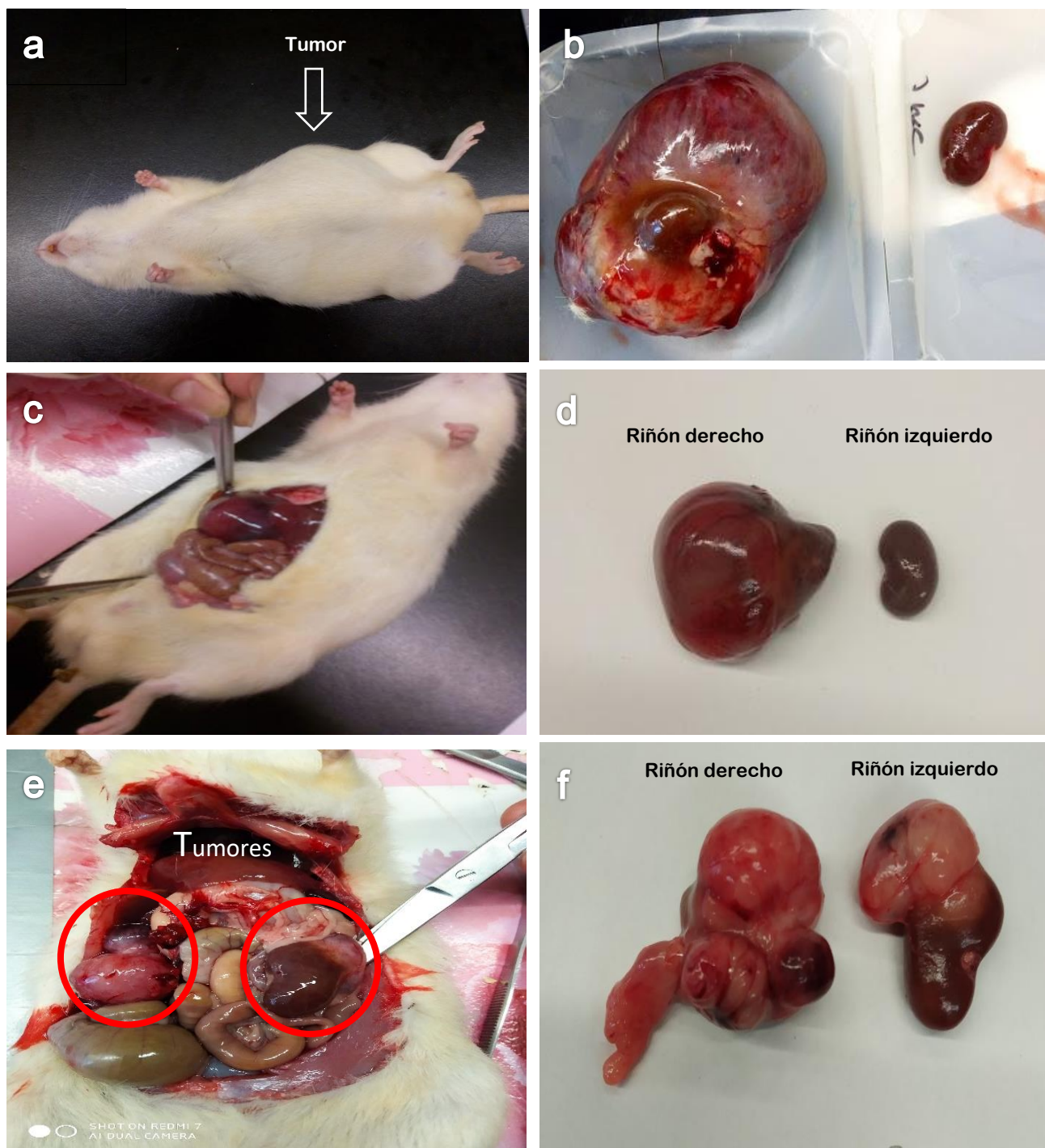


Figura 3. Tumores renales de ratas inducidas a DM2 con tratamiento de ácidos grasos omega 3 de cadena larga. En a, c y e se muestran los riñones con tumor antes de ser extraídos del organismo. En b, d y f se observan los riñones una vez que fueron obtenidos.

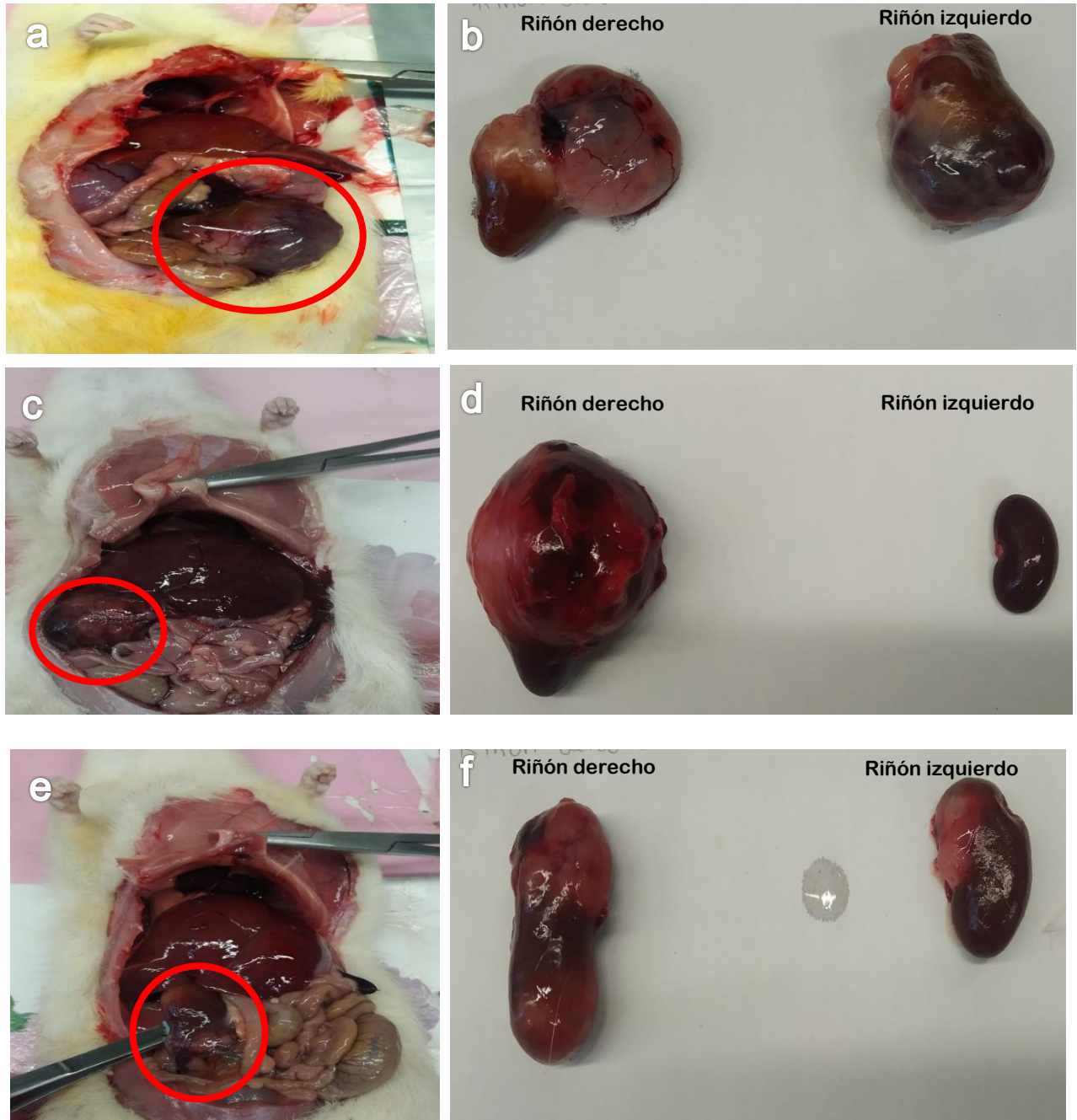


Figura 4. Tumores renales de ratas inducidas a DM2 con tratamiento de ácidos grasos omega 3 de cadena larga. En a, c y e se muestran los riñones con tumor antes de ser extraídos del organismo. En b, d y f se observan los riñones una vez que fueron obtenidos.

Clasificación de los tumores

El grupo STZ + ω -3 estuvo conformado por 13 organismos, y 7 de ellos presentaron tumores renales (alrededor del 50 % de la población). Los tumores generados fueron muy heterogéneos en cuanto al peso, tamaño y tiempo de desarrollo (por ejemplo, hubo casos en donde los tumores fueron apenas incipientes, mientras que en otro caso en particular el riñón con tumor pesó 88g). Por lo anterior se decidió separar/clasificar a los tumores renales generados de acuerdo con cuatro diferentes rangos de peso. Lo anterior se hizo con la finalidad de observar mejor los posibles cambios en estas muestras e incluso para detectar posibles tendencias. Los rangos de peso asignados se presentan en la tabla 3 (así mismo se muestran algunas imágenes representativas de los tumores clasificados).

Para el caso de los riñones con tumores que pesaron entre 1.8 g y 3.8 se les asignó el nombre de “pequeños”. Los riñones con tumor que pesaron entre 7.6 y 12.9 g se les asignó el nombre de “medianos”. Por su parte, los riñones con tumor cuyo peso fue entre 19.5 g y 24.3 g se nombraron como “grandes”. Por último, se obtuvo un riñón con tumor renal cuyo peso fue muy superior a los anteriores (88g) y por ello se decidió clasificarlo aparte y se le asignó el nombre de “Extra Grande”.

En este punto es de suma importancia mencionar que los 6 organismos restantes del grupo STZ + ω -3 (en donde no fue evidente la presencia de los tumores renales) se trabajaron en un grupo por separado.

Entonces, tomando en cuenta lo anterior se tendrían en total 4 grupos experimentales en los cuales la generación de tumores no fue evidente: el grupo control, el grupo control + ω -3, el grupo STZ y el grupo STZ + ω -3 (en donde se incluyen a los 6 organismos antes mencionados). Y, por su parte, los riñones de las 7 ratas del grupo STZ + ω -3 (en donde sí fue evidente la generación de tumores) se trabajaron de acuerdo con la clasificación antes mencionada.

Tabla 3. Clasificación por peso de los riñones con tumores generados en las ratas del grupo experimental STZ + ω -3.

Nombre asignado	Pequeños	Medianos	Grandes	Extra Grande
Rango de peso	1.8- 3.8 g	7.6 – 12.9 g	19.5- 24.3g	88g



Peso y medidas de los riñones

Con la finalidad de conocer la magnitud de los tumores renales generados, se tomaron mediciones del peso y se obtuvieron las medidas (largo, ancho y grosor) de los riñones que fueron extraídos de cada una de las ratas (al momento de realizar la eutanasia) de los diferentes grupos experimentales. En general, se observa que los riñones del grupo STZ + ω -3 que presentaron tumores (mostrados en las últimas 4 filas de la tabla) fueron los que tuvieron un mayor peso.

Si el peso de estos riñones tumorales los comparamos con el peso de los riñones del grupo control se observa que: los tumores “pequeños” pesaron 1.6 veces más, los “medianos” tuvieron un peso 5.4 veces mayor; los pesos promedios de los tumores nombrados como “Grandes” fueron 13.7 veces mayor y el tumor “Extra Grande” pesó 51.9 veces más. Además, las medidas obtenidas de los riñones con tumores parecen ser consistentes con su peso.

Tabla 4. Peso (g) y medidas de los riñones (mm) de los diferentes grupos experimentales analizados.

		Medidas de riñones (mm)			
	Grupo	Peso (g)	Largo	Ancho	Grosor
Sin tumores	Control (n=12)	1.70 ± 0.17	20.85 ± 0.78	12.21 ± 0.73	9.16 ± 0.25
	Control + ω -3 (n=12)	1.48 ± 0.26	20.34 ± 1.18	11.65 ± 1.01	8.82 ± 0.49
	STZ (n=10)	1.44 ± 0.21	19.97 ± 0.93	12.72 ± 0.77	10.07 ± 0.61
	STZ + ω -3 (n=12)	1.52 ± 0.19	20.36 ± 1.27	12.43 ± 0.75	9.52 ± 0.55
STZ + ω-3 Tumores n=10	Pequeños (n=2)	2.87	24.41	15.96	12.13
	Medianos (n=3)	9.25 ± 3.11	34.73 ± 3.61	27.73 ± 9.31	19.10 ± 3.48
	Grandes (n=4)	23.31 ± 2.8	45.6 ± 4.7	37.6 ± 3.9	28.5 ± 4.9
	Extra Grande (n=1)	88.29			

STZ; diabético tipo 2, ω -3: ácidos grasos omega 3 de cadena larga. n= número de riñones

Respiración mitocondrial

Con la finalidad de conocer si el desarrollo de los tumores renales afectó la respiración mitocondrial, se midieron las velocidades de respiración para posteriormente calcular el control respiratorio (CR; cociente entre las velocidades de respiración del estado 3/ velocidad de respiración del estado 4).

En la tabla 5 se muestran los parámetros respiratorios de las mitocondrias que fueron aisladas de los diferentes grupos experimentales. En general, se muestra que el grupo control, es el grupo en donde se observa que los parámetros respiratorios promedio (velocidad de respiración en el estado 4 y estado 3 mitocondrial, así como el CR) son más altos en comparación con los parámetros de los demás grupos experimentales.

Por su parte, se observa que en las mitocondrias que fueron aisladas del tejido tumoral (últimas 4 filas de la tabla) las velocidades de respiración disminuyen de manera evidente en comparación con las velocidades del grupo control.

Para el caso de los riñones con tumores “pequeños” se observa que hay una disminución de las velocidades del estado 4 y 3 mitocondrial, y esta disminución es de 1.9 y 2.5 veces menor respectivamente si se compara con las velocidades del grupo control.

En los riñones con tumores “Grandes” se observa una disminución de 4.4 y 5.5 veces de las velocidades de respiración del estado 4 y 3 mitocondrial respectivamente en relación a las que se presentan en el grupo control

Y por último, en el riñón con tumor “Extra Grande” se encontró que las velocidades de respiración disminuyeron 12.3 y 16.6 veces con relación a las velocidades de respiración del estado 4 y 3 mitocondrial del grupo control.

En todos los casos es evidente que no se observó gran cambio en el CR de las muestras tumorales con relación a los CR de los otros grupos experimentales, sin embargo, es claro que la presencia de los tumores está alterando principalmente las velocidades de respiración mitocondrial

Tabla 5. Parámetros respiratorios de mitocondrias renales de los diferentes grupos experimentales analizados.

Respiración mitocondrial				
	Grupo experimental	Edo 4 (nAO/min/mg de proteína)	Edo 3 (nAO/min/mg de proteína)	CR
Sin tumores	Control (n=29)	161 ± 63	267 ± 83	1.71 ± 0.30
	Control + ω-3 (n=26)	135 ± 35	213 ± 60	1.59 ± 0.34
	STZ (n=19)	154 ± 85	182 ± 88	1.21 ± 0.19 ^a
	STZ + ω-3 (n=22)	162 ± 54	214 ± 86	1.31 ± 0.24
Tumores	Pequeños (n=4)	81 ± 57	104 ± 67 ^a	1.35 ± 0.13
	Medianos (n=2)	13	19	1.44
	Grandes (n=6)	36 ± 10 ^{acd}	48 ± 17 ^{abd}	1.31 ± 0.21
	Extra Grande (n=4)	13 ± 0.7 ^{acd}	16 ± 1.8 ^{abd}	1.24 ± 0.15

STZ; diabético tipo 2, ω-3: ácidos grasos omega 3 de cadena larga. n= se refiere al número de ensayos; a $p < 0.05$ diferencia con grupo control, b $p < 0.05$ diferencia con grupo control + ω-3, c $p < 0.05$ diferencia con grupo STZ, d $p < 0.05$ diferencia con STZ + ω-3

Composición de ácidos grasos

Mediante cromatografía de gases se analizó la composición de ácidos grasos tanto del tejido renal, así como de sus respectivas mitocondrias correspondientes a todos los grupos experimentales.

Con el fin de observar cambios en las membranas (del tejido renal y sus mitocondrias) se trabajó con un índice de fluidez (mostrado en la última fila de todas las tablas que se presentan). Este índice se define de la siguiente manera: cociente I/S (donde I= es la suma de los ácidos grasos insaturados, S= suma de los ácidos grasos saturados). En este sentido, es de suma importancia mencionar que este cociente al tomar en cuenta únicamente a los ácidos grasos sólo hace alusión a un índice de fluidez y no al parámetro físico como tal (pues para poder determinar la fluidez se deben considerar otras moléculas como las proteínas o el colesterol, las cuales también forman parte de las membranas).

En las siguientes tablas se muestran los resultados de la composición de ácidos grasos (en mol%) del tejido renal (tablas 6 y 7) y sus respectivas mitocondrias (tablas 8 y 9) de los diferentes grupos experimentales. Los datos se analizaron de acuerdo con lo descrito en material y métodos y las diferencias encontradas se muestran en cada una de las tablas.

En primer lugar, se presenta la tabla 6 que corresponde a la composición de ácidos grasos del tejido renal de los grupos experimentales en donde la generación de tumores renales no fue evidente. En general, se observa que entre estos cuatro grupos no hay grandes diferencias en la composición de ácidos grasos de sus membranas. De hecho, el índice de fluidez membranal promedio entre estos 4 grupos es bastante similar.

Por su parte, en la tabla 7 se muestran los tejidos de los tumores. Es importante tener claro que dentro del grupo STZ + ω -3 se obtuvo una generación de tumores de alrededor del 50 % y esos tumores fueron clasificados en diferentes rangos de peso, por lo que en esta tabla se presentan organizados de esa forma con la intención de visualizar posibles tendencias. En principio se observa que los índices de fluidez de los tumores son menores si se comparan con el índice del grupo control. Y en particular, se observa que, el cociente de I/S del tumor clasificado como “extra grande” disminuye significativamente con relación a los cocientes I/S de los tumores de menor peso. Lo anterior es consistente con el aumento significativo de la suma de ácidos grasos saturados encontrado en las membranas del tejido renal del riñón con tumor “extra grande”.

Además, se observa que hay cambios en la proporción de algunos ácidos grasos entre los tumores clasificados. Por ejemplo, la proporción del ácido palmítico y el ácido graso de 22 carbonos (aún no se ha identificado con precisión el número de insaturaciones, C22) incrementan de forma significativa en los tumores “grandes” y en el tumor “extra grande” con relación a la proporción de los tumores “pequeños”.

Adicionalmente, es evidente que hay una disminución significativa en la proporción de ácido araquidónico entre los tumores clasificados

Tabla 6. Composición de ácidos grasos (en mol%) de tejido renal de los grupos experimentales donde la generación de tumores no fue evidente.

Ácido graso	TEJIDO RENAL DE RATA			
	Control n = 36	Control + ω -3 n = 36	STZ n = 30	STZ + ω -3 n = 42
Mirístico	0.34 ± 0.07 _{bd}	0.48 ± 0.22 _{ad}	0.40 ± 0.16 _d	0.49 ± 0.10 _{abc}
Pentadecanoico	0.15 ± 0.03 _b	0.19 ± 0.02 _{acd}	0.12 ± 0.03 _b	0.13 ± 0.02 _{bc}
Palmítico	17.86 ± 2.11 _b	18.86 ± 1.15 _a	17.34 ± 0.93 _d	17.2 ± 0.61 _c
Palmitoleico	0.25 ± 0.05 _d	0.30 ± 0.08 _c	0.22 ± 0.05 _{bd}	0.27 ± 0.07 _{ac}
Heptadecanoico	0.32 ± 0.07 _b	0.41 ± 0.05 _{acd}	0.32 ± 0.04 _b	0.33 ± 0.04 _b
Estearico	17.69 ± 2.15 _c	17.57 ± 1.79 _c	18.87 ± 1.10 _{abd}	18.4 ± 1.24 _c
Oleico	16.16 ± 2.09	14.66 ± 3.73 _d	14.76 ± 2.85 _d	16.3 ± 1.87 _{bc}
Linoleico	16.65 ± 2.55 _d	16.31 ± 1.30	15.66 ± 1.91	15.8 ± 1.36 _a
Gamma Linolénico	0.08 ± 0.01 _d	0.07 ± 0.02 _d	0.08 ± 0.01 _d	0.1 ± 0.05 _{abc}
Linolénico	0.17 ± 0.06	0.18 ± 0.08	0.14 ± 0.04	0.18 ± 0.05
Araquídico	0.17 ± 0.04	0.14 ± 0.09	0.20 ± 0.05	0.14 ± 0.03
Araquidónico	21.27 ± 1.89	22.69 ± 3.30	22.80 ± 2.82	22.4 ± 2.39
EPA	0.36 ± 0.07 _d	0.43 ± 0.12 _d	0.40 ± 0.09 _d	0.33 ± 0.05 _{abc}
Behénico	0.27 ± 0.11	0.35 ± 0.06	0.28 ± 0.08	0.26 ± 0.04
C22	0.27 ± 0.07 _{cd}	0.30 ± 0.08 _{bd}	0.40 ± 0.13 _{ab}	0.38 ± 0.05 _{abc}
Lignocérico	2.66 ± 0.44 _{bd}	2.13 ± 0.71 _{ad}	2.41 ± 0.34 _{bd}	2.04 ± 0.26 _{ac}
DHA	3.16 ± 0.79 _{bd}	2.14 ± 0.89 _{ac}	2.66 ± 0.48 _b	2.58 ± 0.63 _a
NI	2.30 ± 0.51	3.01 ± 0.78	2.97 ± 1.01	2.81 ± 0.33
Saturados	39.36 ± 4.02 _{bc}	39.99 ± 1.89 _{ac}	39.93 ± 1.25 _{abd}	38.9 ± 1.26 _c
Insaturados	58.34 ± 4.09 _{bc}	57.00 ± 2.17 _a	57.09 ± 1.90 _a	58.3 ± 1.28
I/S	1.50 ± 0.22 _{bc}	1.43 ± 0.12 _a	1.43 ± 0.09 _{ad}	1.5 ± 0.08 _c

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, índice de fluidez (ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados). n= número de ensayos; a $p < 0.05$ diferencia con "Control", b $p < 0.05$ diferencia con "Control + ω -3", c $p < 0.05$ diferencia con "STZ", d $p < 0.05$ diferencia con "STZ + ω -3".

Tabla 7. Composición de ácidos grasos (en mol%) de tejido renal del grupo experimental STZ + ω -3 con generación de tumores renales.

Ácido graso	TEJIDO DE TUMOR RENAL DE RATA			
	Pequeños n = 6	Medianos n = 6	Grandes n = 12	Extra Grande n = 10
Mirístico	0.59 ± 0.03	0.52 ± 0.11	0.67 ± 0.16	0.69 ± 0.12
Pentadecanoico	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.05	0.20 ± 0.03	0.19 ± 0.02
Palmitico	17.78 ± 0.66 _{bcd}	19.95 ± 1.05 _{acd}	21.48 ± 1.14 _{ab}	23.04 ± 1.50 _{ab}
Palmitoleico	0.25 ± 0.05	0.48 ± 0.03	0.44 ± 0.07	0.31 ± 0.03
Heptadecanoico	0.32 ± 0.04 _{bcd}	0.24 ± 0.04 _{acd}	0.31 ± 0.04 _{abd}	0.34 ± 0.05 _{abc}
Esteárico	18.79 ± 0.46 _{bcd}	16.24 ± 0.50 _{acd}	15.61 ± 1.02 _{abd}	17.19 ± 0.95 _{abc}
Oleico	15.79 ± 2.34	19.27 ± 1.52	21.36 ± 2.24	18.68 ± 1.41
Linoleico	12.96 ± 3.07 _{bcd}	10.75 ± 1.18 _a	13.10 ± 2.12 _a	9.97 ± 0.87 _a
Gamma Linolénico	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.07 ± 0.01
Linolénico	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.22 ± 0.14	0.09 ± 0.02
Araquídico	0.16 ± 0.07	0.32 ± 0.21	0.21 ± 0.14	0.32 ± 0.08
Araquidónico	21.53 ± 1.66 _c	18.87 ± 3.77 _d	13.38 ± 1.79 _a	14.51 ± 0.63 _b
EPA	0.29 ± 0.07	0.27 ± 0.05 _d	0.32 ± 0.08	0.41 ± 0.05 _b
Behénico	0.33 ± 0.10	0.43 ± 0.34	0.19 ± 0.08	0.18 ± 0.10
C22	0.89 ± 0.49 _{cd}	2.05 ± 0.81 _d	2.87 ± 0.88 _a	3.43 ± 0.21 _{ab}
Lignocérico	1.96 ± 0.12	2.02 ± 0.38	1.96 ± 0.51	2.06 ± 0.25
DHA	2.53 ± 0.39 _d	2.71 ± 0.23 _d	2.54 ± 0.45 _d	4.20 ± 0.30 _{abc}
NI	5.52 ± 3.08	5.49 ± 0.49	5.02 ± 1.46	4.47 ± 2.50
Saturados	40.09 ± 0.27 _d	39.87 ± 0.26 _d	40.61 ± 2.15 _d	43.93 ± 1.02 _{abc}
Insaturados	54.39 ± 2.95	54.64 ± 0.41 _d	54.37 ± 2.35	51.61 ± 1.60 _b
I/S	1.36 ± 0.07 _d	1.37 ± 0.01 _d	1.34 ± 0.13 _d	1.17 ± 0.02 _{abc}

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, índice de fluidez (ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados). n= número de ensayos; a $p < 0.05$ diferencia con "Pequeños", b $p < 0.05$ diferencia con "Medianos", c $p < 0.05$ diferencia con "Grandes", d $p < 0.05$ diferencia con "Extra grande".

Por su parte, en las siguientes tablas se muestra la composición de ácidos grasos de las membranas mitocondriales. En la tabla 8 se muestran los resultados de la composición de ácidos grasos (en mol%) de las mitocondrias de los grupos experimentales en donde la generación de tumores renales no fue evidente. En principio se puede observar que los índices de fluidez son mayores en comparación con lo reportado para el tejido. En este caso se observa que las mitocondrias del grupo control tuvieron un índice de fluidez promedio que es mayor en comparación con los índices de los otros grupos experimentales, sin embargo, de forma general no se observan grandes diferencias en la composición de ácidos grasos entre estos grupos.

Nuevamente, los datos de las mitocondrias tumorales se presentan en el mismo sentido que el tejido (donde los tumores fueron clasificados en diferentes rangos de peso). En este caso se puede apreciar (tabla 9) que en las membranas de las mitocondrias también hay cambios importantes en la proporción de algunos ácidos grasos entre los tumores clasificados. En principio, se observa que desde los tumores “medianos” y hasta el riñón con tumor “extra grande” hay un incremento significativo en la proporción del ácido palmítico y en la proporción del ácido oleico en comparación con los tumores “pequeños”.

En relación a la proporción del ácido Linoleico, se observa que en los tumores que pesaron más de 7 g (tumores “medianos, tumores “grandes” y riñón con tumor “extra grande”) hay una disminución significativa de este ácido graso con relación a los tumores “pequeños”. Algo similar ocurre con la proporción de ácido araquidónico; sin embargo, en este caso, se observa una tendencia de disminución que parece estar asociada con el peso y tamaño de los tumores.

Derivado de todos los cambios descritos anteriormente, se observan diferencias en la suma de ácidos grasos insaturados, y como consecuencia, en el cociente de I/S. Es evidente que mientras más desarrollado es el tumor (en cuanto a peso y tamaño) menor es el índice de fluidez membranal.

Tabla 8. Composición de ácidos grasos (en mol%) de mitocondrias aisladas del tejido renal de los grupos experimentales sin tumores evidentes.

MITOCONDRIAS DE RIÑÓN DE RATA

Ácido graso	Control	Control + ω -3	STZ	STZ + ω -3
	n = 36	n = 36	n = 30	n = 42
Mirístico	0.18 ± 0.03 _b	0.24 ± 0.08 _a	0.21 ± 0.06 _d	0.30 ± 0.05 _c
Pentadecanoico	0.12 ± 0.02 _b	0.13 ± 0.02 _a	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.01
Palmítico	14.80 ± 0.63	15.48 ± 0.96	14.85 ± 1.03	15.29 ± 0.58
Palmitoleico	0.19 ± 0.03 _{bd}	0.22 ± 0.04 _{ac}	0.16 ± 0.02 _b	0.21 ± 0.03 _a
Heptadecanoico	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.31 ± 0.04
Esteárico	18.30 ± 1.39 _c	18.53 ± 1.05 _d	19.86 ± 1.68 _a	19.21 ± 0.75 _b
Oleico	10.64 ± 1.27 _c	10.80 ± 1.38 _c	10.19 ± 0.60 _{abd}	11.35 ± 0.62 _c
Linoleico	17.64 ± 1.49	17.75 ± 0.99	17.37 ± 0.87	16.47 ± 0.94
Gamma Linolénico	0.07 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02
Linolénico	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02
Araquídico	0.14 ± 0.08	0.04 ± 0.01	0.17 ± 0.06	0.12 ± 0.03
Araquidónico	29.12 ± 1.24 _b	29.26 ± 1.04 _{ad}	28.33 ± 1.51 _d	28.58 ± 0.95 _{bc}
EPA	0.48 ± 0.10 _d	0.46 ± 0.10 _d	0.47 ± 0.08 _d	0.38 ± 0.05 _{abc}
Behénico	0.20 ± 0.04	0.22 ± 0.05	0.25 ± 0.10	0.24 ± 0.03
C22	0.18 ± 0.04 _d	0.17 ± 0.04 _d	0.20 ± 0.05 _d	0.24 ± 0.03 _{abc}
Lignocérico	2.13 ± 0.42 _d	1.36 ± 0.55 _d	2.16 ± 0.27	1.97 ± 0.23 _{ab}
DHA	2.85 ± 0.33 _{bcd}	2.03 ± 0.65 _a	2.43 ± 0.31 _a	2.35 ± 0.44 _a
NI	2.66 ± 0.64	2.87 ± 0.58	2.80 ± 0.32	2.74 ± 0.32
Saturados	36.11 ± 1.72 _c	36.33 ± 0.93 _c	37.91 ± 2.46 _{ab}	37.55 ± 0.82
Insaturados	61.23 ± 1.99 _d	60.79 ± 1.06 _c	59.29 ± 2.38 _b	59.71 ± 0.79 _a
I/S	1.70 ± 0.14 _c	1.68 ± 0.07 _c	1.57 ± 0.15 _{ab}	1.59 ± 0.06

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, índice de fluidez (ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados). n= número de ensayos; a $p < 0.05$ diferencia con "Control", b $p < 0.05$ diferencia con "Control + ω -3", c $p < 0.05$ diferencia con "STZ", d $p < 0.05$ diferencia con "STZ + ω -3".

Tabla 9. Composición de ácidos grasos (en mol%) de mitocondrias aisladas del tejido renal del grupo experimental STZ + ω -3 con generación de tumores renales.

Ácido graso	MITOCONDRIAS DE TUMOR DE RIÑÓN DE RATA			
	Pequeños	Medianos	Grandes	Extra Grande
	n = 6	n = 6	n = 13	n = 10
Mirístico	0.37 ± 0.11 _b	0.46 ± 0.16 _a	0.52 ± 0.06	0.70 ± 0.05
Pentadecanoico	0.11 ± 0.02 _{bcd}	0.16 ± 0.08 _a	0.19 ± 0.03 _a	0.19 ± 0.02 _a
Palmitico	15.6 ± 0.41 _{bcd}	18.85 ± 2.09 _a	20.46 ± 0.69 _a	24.73 ± 1.79 _a
Palmitoleico	0.18 ± 0.03	0.54 ± 0.08	0.43 ± 0.08	0.33 ± 0.03
Heptadecanoico	0.32 ± 0.06 _{bcd}	0.26 ± 0.07 _{acd}	0.33 ± 0.04 _{abd}	0.37 ± 0.06 _{abc}
Esteárico	19 ± 0.41	17.44 ± 0.57	16.68 ± 0.69	18.21 ± 1.07
Oleico	12.4 ± 0.40 _{bcd}	17.77 ± 2.45 _a	18.57 ± 2.01 _a	17.54 ± 0.88 _a
Linoleico	14.6 ± 1.25 _{bcd}	10.35 ± 0.48 _a	12.32 ± 1.10 _a	10.04 ± 1.18 _a
Gamma Linolénico	0.08 ± 0.00	0.08 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.07 ± 0.02
Linolénico	0.06 ± 0.01 _b	0.09 ± 0.02 _a	0.13 ± 0.08	0.06 ± 0.02
Araquídico	0.17 ± 0.07	0.31 ± 0.20	0.14 ± 0.05	0.30 ± 0.06
Araquidónico	28 ± 0.11 _{bcd}	20.56 ± 5.14 _a	16.19 ± 2.25 _a	14.17 ± 0.84 _a
EPA	0.33 ± 0.06	0.28 ± 0.02	0.32 ± 0.06	0.29 ± 0.09
Behénico	0.28 ± 0.04	0.40 ± 0.29	0.15 ± 0.06	0.24 ± 0.07
C22	0.67 ± 0.34	1.92 ± 1.17	3.00 ± 0.63	3.16 ± 0.33
Lignocérico	2.26 ± 0.10 _c	2.00 ± 0.18	2.07 ± 0.38 _a	2.17 ± 0.25
DHA	2.74 ± 0.32	3.15 ± 0.37	2.70 ± 0.38	3.91 ± 0.22
NI	2.93 ± 1.37	5.37 ± 0.37	5.68 ± 0.88	3.75 ± 1.42
Saturados	38.1 ± 0.45 _d	39.89 ± 1.28 _d	40.55 ± 0.80 _d	46.79 ± 1.69 _{abc}
Insaturados	59 ± 1.05 _{cd}	54.74 ± 0.98 _d	53.77 ± 1.50 _{ad}	49.46 ± 1.33 _{abc}
I/S	1.55 ± 0.02 _{bcd}	1.37 ± 0.07 _{ad}	1.33 ± 0.06 _{ad}	1.06 ± 0.06 _{abc}

EPA, Ácido Eicosapentaenoico; DHA, Ácido Docosahexaenoico; NI, No Identificado; I/S, índice de fluidez (ácidos grasos insaturados/ ácidos grasos saturados). n= número de ensayos; a $p < 0.05$ diferencia con "Pequeños", b $p < 0.05$ diferencia con "Medianos", c $p < 0.05$ diferencia con "Grandes", d $p < 0.05$ diferencia con "Extra grande".

DISCUSIÓN

Modelo

Existen diversas técnicas experimentales para generar modelos de DM en animales, algunos de estos métodos incluyen dietas altas en grasas y azúcar (Heydemann, 2016; Surwit *et al*, 1988) y animales modificados genéticamente (Withers *et al* 1998); sin embargo, la inducción de DM utilizando productos químicos citotóxicos como la estreptozotocina (STZ) ha sido de los métodos más utilizados debido a la alta selectividad para las células β pancreáticas.

La STZ es un compuesto cuya estructura es muy similar a la de la glucosa y gracias a esta característica es que la STZ puede ingresar a ciertas células a través del glucotransportador 2 (GLUT2) (Schedl *et al*, 1994), transportador que se expresa ampliamente en la membrana plasmática de las células β pancreáticas y en otras líneas celulares como las hepáticas, las células intestinales y las renales (Thorens *et al*, 1990).

El mecanismo de acción de la STZ se basa principalmente en su efecto genotóxico, ya que varios investigadores han reportado que esta toxina es un agente alquilante que lleva a cabo la metilación directa del DNA de las células beta pancreáticas (Lenzen, 2008) lo que ocasiona daños y lleva al rompimiento de las cadenas de DNA para posteriormente promover la muerte celular (Yamamoto *et al*, 1981). Adicionalmente, se ha propuesto que durante el proceso del metabolismo de la STZ se forman especies reactivas, moléculas que desempeñan un papel clave en la toxicidad del compuesto (Kröncke *et al*, 1995).

A pesar de la eficacia de este fármaco para la generación de modelos de DM en animales, los investigadores han observado efectos adversos en otros órganos blancos. Dentro de estos efectos adversos se ha visto que los animales de experimentación inducidos a DM desarrollan neoplasias en el riñón (Arison, y Feudale, 1967).

En el caso de este estudio se trabajó con un modelo de DM2 generado por medio de la administración de STZ (125 mg/kg) vía intraperitoneal en ratas wistar recién nacidas (48 horas de vida). Es importante destacar que durante el desarrollo de este estudio no se observó generación de tumores renales en los organismos que sólo fueron inducidos a DM2 (es decir organismos que no recibieron tratamiento de PUFA omega 3); por el contrario, los tumores renales se generaron en alrededor el 50% de la población que fue inducida a DM2 y que recibió suplemento de PUFA omega 3. Lo anterior también fue reportado por García-Gasca (2021), sin embargo, se encontró que el desarrollo de los tumores en los animales suplementados con PUFA omega 3 (con previa inducción a DM2) se observó desde los 3 meses de edad.

El fenómeno anteriormente descrito posiblemente esté asociado con la participación de estos PUFA omega 3 en la señalización y/o en el metabolismo celular. Existen estudios en donde se ha visto que los PUFA omega 3 están involucrados en la sensibilización y secreción de insulina; de acuerdo con estos resultados se ha propuesto a los receptores activados por proliferador del peroxisoma (PPARS) como uno de los objetivos a través de los cuales la omega 3 ejercen dicho efecto (Wang y Chan, 2015). Se conoce que los

PUFA omega 3 y sus metabolitos son ligandos para los PPARs, receptores nucleares que heterodimerizan con los receptores retinoides X (RXR) formando complejos PPAR-RXR, complejos se unen a secuencias de DNA y regulan una gran variedad de genes. Entre estos se encuentran los genes involucrados con la regulación del metabolismo de los ácidos grasos y la sensibilidad a la insulina (González- Périz *et al*, 2009). Lo anterior tendría implicaciones importantes, pues se conoce que la insulina es un factor de crecimiento importante, que actúa a través de la cascada del factor de crecimiento de tirosina cinasa (Boyd, 2003) por lo que la acción de esta hormona por esta vía podría favorecer la proliferación de las células tumorales en este modelo.

En el caso particular de lo que se conoce de estos receptores nucleares y su relación con los tumores renales es que PPAR y se expresa de forma funcional en el carcinoma de células renales de células claras (ccRCC, por sus siglas en inglés, el subtipo más común de cáncer renal) (Collet *et al*, 2011). Después, se encontró que el aumento en la abundancia de PPAR y se correlaciona con una supervivencia reducida del paciente (Zhu *et al*, 2015). Posteriormente, se demostró que PPAR y es innecesario para la viabilidad y proliferación de las células ccRCC, aunque los autores refieren que no se puede descartar un papel potencial para este receptor en la iniciación de tumor (Sanchez *et al*, 2018).

Por otro lado, es bien conocido que los PUFA omega 3 son químicamente inestables y se ha mencionado que los aceites comerciales se oxidan durante su almacenamiento (Nogueira *et al*, 2019). Lo anterior es importante porque se conoce que los aceites oxidados no tienen la misma actividad biológica, e incluso el consumo de estas moléculas pueden tener efectos nocivos para el organismo. Por ejemplo, ya se ha demostrado que el consumo del aceite marino incrementa las concentraciones plasmáticas (Haglund *et al*, 1991) y urinarias de Malondialdehído (MDA, uno de los productos de oxidación) en humanos debido tanto a la absorción del aceite peroxidado como a la peroxidación de estos ácidos grasos *in vivo*. (Piché *et al*, 1988) Lo anterior es importante pues se conoce que el MDA es una molécula que produce, entre otras cosas, mutaciones al DNA (Marnett L. J. ,1999).

Por lo anterior, una de las preocupaciones que ha surgido recientemente es que cuando estos PUFA omega 3 se encuentran en altas concentraciones y se administran por largos periodos de tiempo podrían favorecer la formación de diversos compuestos tóxicos productos de la oxidación de estas moléculas (Lange *et al*, 2019; Serini y Calviello, 2018). Dichos compuestos podrían conducir a un estado de inestabilidad genómica y por lo tanto, podrían asumir un papel importante en la formación de tumores (Lange *et al*, 2019).

En la literatura, se plantea que el desarrollo de los tumores renales por la STZ está relacionado con diversos factores (como la dosis que se utiliza de STZ o el periodo que transcurre después de la inducción) (Kazumi *et al*, 1978; Mauer *et al*, 1974) sin embargo, no hay que olvidar que pueden existir otros estímulos adicionales que podrían llevar a favorecer/acelerar el desarrollo de estos tumores como es el caso de estos PUFA omega 3 en este estudio.

Peso

El peso es uno de los parámetros que se ha utilizado para evaluar el estado nutricional individual de los organismos (Marugán de Miguelansanz *et al*, 2015). Se ha propuesto que los cambios en este parámetro (principalmente la pérdida de peso repentina) puede ser un indicativo de alguna enfermedad subyacente (Goldenberg, 1990).

En este estudio, el grupo STZ fue el grupo experimental en el cual se observa una menor ganancia de peso y este parámetro es significativamente menor a la ganancia de peso del grupo control (tabla 2). Lo anterior es consistente con lo que sucede en la DM2, pues la pérdida progresiva de la secreción de insulina y/o derivada de la resistencia a la insulina ocasiona alteraciones en los procesos en los que esta hormona participa. Se conoce que la insulina es una hormona anabólica que favorece entre otras cosas, el almacenamiento de ácidos grasos en el tejido adiposo y muscular, aumenta la tasa de síntesis de proteínas en el músculo e inhibe la proteólisis (Dimitriadis *et al*, 2011). Por lo anterior, en condiciones de resistencia a la insulina se ven favorecidos los procesos catabólicos que podrían verse reflejados en la pérdida de peso o afectaciones en el crecimiento de los organismos.

En el caso de este estudio, se encontró que el tratamiento con los PUFA omega 3 “aparentemente” ayudó a atenuar la pérdida de peso en los organismos inducidos a DM2. El fenómeno anterior puede estar relacionado con un incremento en la síntesis de insulina (y por lo tanto con la acción anabólica de esta hormona) en este grupo experimental; pues ya se ha demostrado que el tratamiento con PUFA omega 3 en organismos inducidos a DM2 incrementa la síntesis de insulina en islotes pancreáticos (Orozco, 2008). No obstante, en el caso de este estudio, hay organismos con desarrollo de tumores renales dentro de este grupo experimental; y, en el caso particular de algunos individuos, el peso de los riñones con tumor fue alrededor de 20g -26g (e incluso el riñón con tumor clasificado como extra grande pesó 88g) por lo que, el tamaño de estos tumores podría encubrir el peso real en estos organismos.

Todo lo descrito anteriormente es consistente con lo reportado para este mismo modelo, pues ya se ha demostrado que tanto la DM2 (y sus complicaciones) así como la presencia de los tumores renales afectan el desarrollo/ crecimiento de los organismos (García-Gasca, 2021).

Glucemia

Como se observó en la tabla 2 los organismos de los grupos control sin y con tratamiento (grupo control y grupo control + ω -3) tuvieron glucemias alrededor de los 90 mg/dL. Lo anterior es consistente con lo que se ha reportado en la literatura para organismos normoglicémicos (Vicenteño, 2018); por su parte, las glucemias de las ratas STZ en este estudio fueron 2.25 veces mayores en comparación con el grupo control. Esto es consistente con lo reportado para la DM2, pues esta patología se caracteriza por defectos en la secreción o defectos en la acción de la insulina, lo que ocasiona que el metabolismo de la glucosa se vea alterado y por lo tanto que los individuos tengan hiperglucemia (glucemia en ayunas superior o igual a los 126 mg/dL; ADA, 2011).

En el caso de las glucemias de los organismos STZ suplementados con PUFA omega 3 (STZ + ω -3) se observa que estas fueron en promedio más bajas que la de los organismos únicamente inducidos a DM2 (Grupo STZ), sin embargo, las concentraciones de glucosa en sangre siguen siendo elevadas si se comparan con las del grupo control. Lo anterior parece indicar que el tratamiento de PUFA omega 3 no tuvo efecto claro sobre la regulación de la glucemia a diferencia de lo observado en otros trabajos experimentales (Vicenteño, 2018; Orozco, 2008).

Algunos investigadores han propuesto que las altas concentraciones de glucosa en sangre pueden promover el desarrollo de neoplasias. Dentro de estas propuestas se encuentra que la hiperglucemia puede proporcionar los requerimientos energéticos necesarios para la rápida proliferación de las células neoplásicas (Joshi *et al*, 2015), así como un aumento de la producción de radicales libres y otras moléculas reactivas que, podrían llevar a promover mutaciones en genes críticos para el desarrollo de los tumores (Ramteke *et al*, 2019). Incluso se ha mencionado que la hiperglucemia promueve la expresión de metaloproteinasas de matriz, enzimas clave para la reorganización de la matriz celular y cuya expresión podría llevar a favorecer la invasión tumoral en algunos tipos de cáncer (Franko *et al*, 2020; Sun *et al*, 2017).

Anteriormente se reportó que en el modelo de DM2 con tratamiento de PUFA omega 3 hay más presencia de neoplasias renales en los individuos que tuvieron glucemias por encima de los 200 mg/dL (García- Gasca, 2021). En el caso particular de este estudio, de los 7 organismos que desarrollaron neoplasias renales, 4 de ellos (el 57%) tuvieron glucemias mayores a los 200 mg/dL al momento del sacrificio. Por el contrario, en los individuos que no desarrollaron neoplasias renales las concentraciones de glucosa en sangre al momento del sacrificio se mantuvieron entre los 100 y 146 mg/dL.

Curva de Tolerancia a la glucosa

Con la finalidad de mostrar cómo es el control de la glucemia en los organismos de los diferentes grupos experimentales, se realizaron Curvas de Tolerancia a la Glucosa (CTG) (Figura 10, anexos). Esta prueba evalúa la capacidad que tiene un organismo para metabolizar una cantidad estándar de glucosa. Las mediciones de glucemia se toman cada 30 minutos partiendo desde el tiempo 0 y hasta las dos horas después de la ingestión. (Eyth et al, 2022).

En consideración con los criterios para evaluar “anormalidad” en una CTG (basados en el pico que alcanza la glucemia en los primeros 60 minutos y la falta de retorno de las concentraciones normales de glucosa sanguínea a las 2 horas, es evidente que los organismos STZ mostrados (con y sin tratamiento) no tienen un buen control de la glucemia ya que el pico máximo que alcanza la glucemia en los primeros 60 minutos sobrepasa los 160 mg/dl en ambos casos; además, es evidente que se trata de organismos con DM2 ya que se observa un regreso paulatino de las concentraciones de glucosa en sangre a los 120 minutos, sin embargo, la glucemia no retorna a las concentraciones normales.

En este caso es importante mencionar que sólo se muestra un organismo de cada grupo experimental para esta prueba puesto que caracterizar el modelo no era el objetivo del proyecto; además de que este modelo de DM2 (con y sin tratamiento de PUFA omega 3) ya se conoce y ha sido estudiado a detalle anteriormente por nuestro equipo de trabajo (García 2021; Vicenteño, 2018; Figueroa et al, 2013).

Respiración mitocondrial

Como se mostró en la tabla de respiración mitocondrial no se observó gran cambio en el CR de las muestras tumorales, sin embargo, es evidente que la presencia de los tumores está alterando principalmente las velocidades de respiración mitocondrial. Además, se observa una cierta tendencia que muestra que mientras más desarrollado (en cuanto al peso y tamaño) sea el tumor, menor es la velocidad de respiración mitocondrial en el estado 4 (figura 5a) y estado 3 (figura 5b).

Se conoce que las células tumorales se someten a una reprogramación metabólica que les permite proliferar, y crecer (Phan *et al*, 2014). Se sabe que la hipoxia es una condición esencial en los tumores sólidos pues se conoce que en estos tumores hay zonas avasculares que pueden tener limitación de oxígeno y sustrato; se ha propuesto que cuando esta condición se presenta, hay un cambio metabólico importante en las células tumorales que ocasiona que la fosforilación oxidativa deje de ser la proveedora mayoritaria de ATP y por lo tanto, ahora sea la glucólisis la encargada de suministrar la mayor parte de la energía. (Rodríguez- Enriquez *et al*, 2008). Adicionalmente se ha visto que el factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) regula al alza los genes que codifican enzimas de la vía glucolítica (Al Tameemi *et al*, 2019; Semenza, 2010; Kim *et al*, 2006).

Lo anterior podría explicar parcialmente los resultados, puesto que las velocidades de respiración de estas mitocondrias tumorales son muy bajas con respecto a sus grupos control, lo que hace pensar que es muy poco probable que se cubran las demandas de energía de estas células tumorales por esta vía. Es muy importante aclarar que esta es sólo una propuesta, que puede ayudar a explicar parcialmente los resultados obtenidos; y para poder aseverar lo anterior se tendrían que hacer más experimentos como medir el flujo glucolítico y ver la contribución de ATP que se produce por cada vía metabólica.

Por otro lado, se conoce que tanto la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) así como los productos de daño oxidativo se encuentran elevados en algunos tumores (Young *et al*, 2010; Kumar *et al*, 2008; Szatrowski y Nathan, 1991). Adicionalmente, se ha propuesto que la hiperglucemia también incrementa la producción de ROS (Kaneto *et al*, 2010). Por lo anterior, es probable que las concentraciones de ROS aumenten en los tumores generados en este estudio (principalmente en los tumores de los organismos que tuvieron glucemias elevadas al momento del sacrificio). Lo anterior es importante pues ya se ha demostrado que una gran cantidad de ROS puede provocar, entre otras cosas, daños oxidativos en proteínas, lípidos de membrana y ADN de las mitocondrias lo que podría desencadenar en alteraciones de las funciones de estos organelos, entre las que se encuentran la fosforilación oxidativa y la capacidad de sintetizar ATP (Orrenius *et al*, 2007).

Todo lo descrito anteriormente podría dar una posible explicación al por qué de la disminución de las velocidades de respiración observadas principalmente en los tumores; sin embargo, para los propósitos de este trabajo nos interesa enfocarnos en encontrar la asociación entre las propiedades fisicoquímicas de la membrana y la respiración mitocondrial. Para ello se muestran la figura 5 en donde se observa la asociación que existe entre la velocidad de respiración en el estado 4 y en el estado 3 mitocondrial con respecto al índice de fluidez membranal entre los diferentes grupos experimentales analizados. Además, se aplicó la correlación de Pearson a los datos (0.86 para Edo 4 y 0.88 para Edo 3) y en ambos casos se observa que existe una correlación positiva y con un buen grado de asociación entre estos dos parámetros. Por lo tanto, en el caso de este estudio se encontró que entre mayor es la fluidez membranal mayor es la velocidad de respiración mitocondrial.

Lo anterior es consistente con un estudio en donde se encontró una estrecha relación entre la disminución de la fluidez membranal (por cambios en la composición de ácidos grasos) y la disminución del CR detectado en mitocondrias hepáticas de ratas Wistar inducidas a DM2 (que cursaron por 5 meses de hiperglucemia) (Mejía – Zepeda y Pérez - Hernández, 2020).

De hecho, ya existen trabajos en donde se demuestra que la fluidez de membrana influye directamente en la cadena de transporte de electrones (ETC, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, con enfoques de biología sintética (control experimental de la fluidez de membrana interna en *Escherichia coli* por biosíntesis de lípidos) y con el empleo de un modelo basado en la difusión de ubiquinonas (que transportan electrones a través de ETC), se demostró que la capacidad de difusión de estas proteínas aumenta en las membranas que son más fluidas y se observó que este fenómeno ocasiona un aumento en las tasas de respiración (Budin *et al*, 2018).

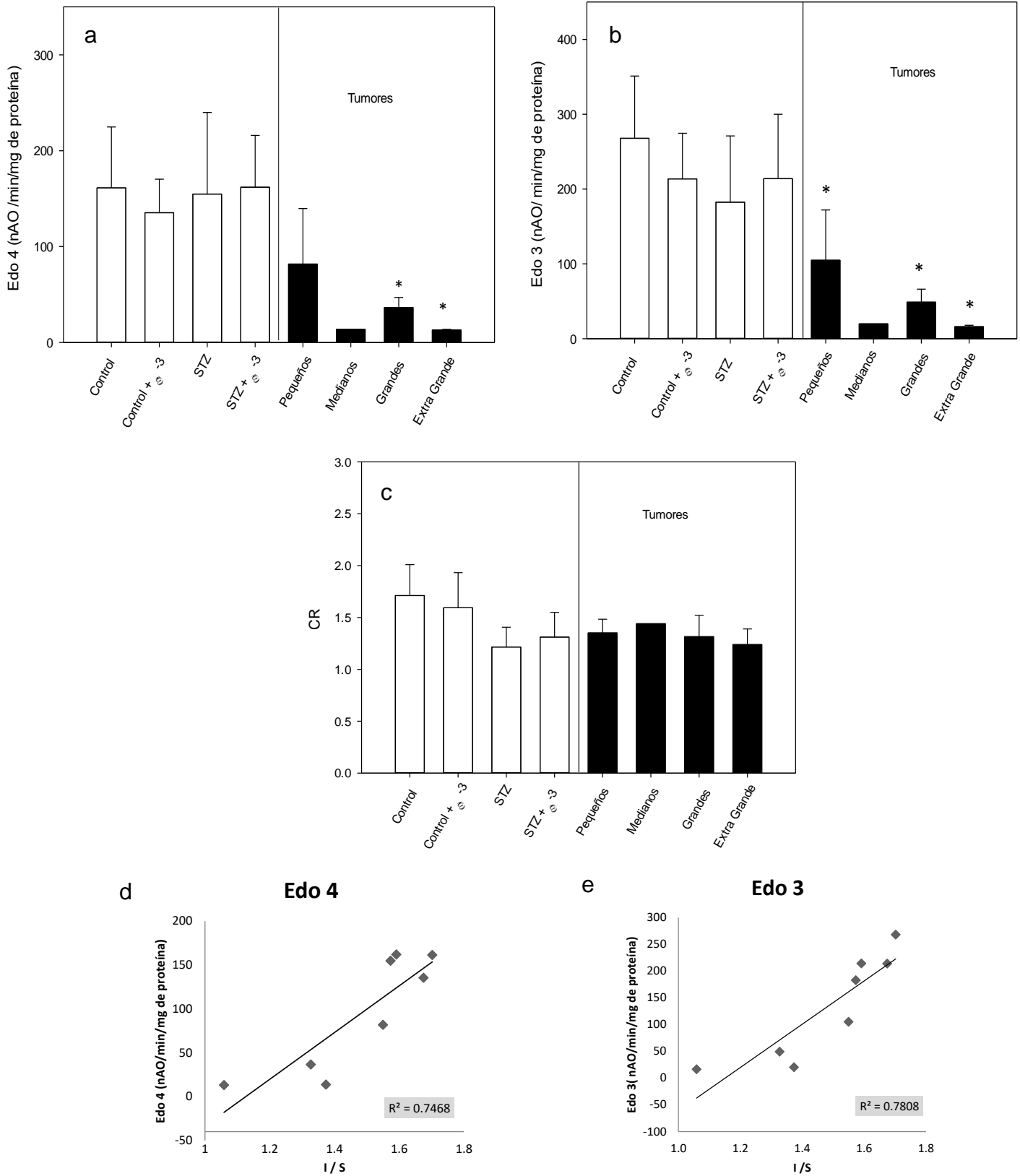


Figura 5 a-c Perfiles comparativos de los parámetros respiratorios mitocondriales de los diferentes grupos experimentales. En **a** se muestran las velocidades de respiración en el Edo 4 mitocondrial. En **b** se presentan las velocidades de respiración en el Edo 3 mitocondrial y en **c** se muestran los CR. En la figura 5 **d** y **e** se presentan gráficos que muestran la asociación entre las velocidades de respiración mitocondrial en el estado 4 (**d**) y estado 3(**e**) con respecto al índice de fluidez membranal entre los diferentes grupos experimentales. Los datos para la construcción de estos gráficos fueron obtenidos de la tabla de los parámetros de respiración mitocondrial (tabla 5) y para el caso de los gráficos **d** y **e** también se utilizaron las tablas de composición de ácidos grasos de mitocondrias (tablas 8 y 9). * $p < 0.05$ diferencia con relación al grupo control.

Composición de ácidos grasos: Índice de fluidez membranal I/S

En este estudio se trabajó con un índice de fluidez con el fin de observar cambios en la composición de ácidos grasos en la membrana.

En la siguiente figura (figura 6) se observan los perfiles comparativos de los índices de fluidez membranal de los diferentes grupos experimentales analizados. Se observa que los grupos experimentales en donde no fue evidente la presencia de los tumores este parámetro no cambia, sin embargo, en las muestras tumorales hay una disminución de este parámetro con relación al grupo control y se aprecia que, mientras más desarrollado (en cuanto peso y tamaño) sea el tumor, menor es el índice de fluidez de sus membranas. Un aspecto interesante es que en la mitocondria se observan más acentuados estos cambios.

Dichas disminuciones en este parámetro en las muestras tumorales reflejan los cambios en la proporción de ciertos ácidos grasos que componen sus membranas y estos resultados son consistentes con lo reportado anteriormente; pues ya se ha demostrado que en líneas celulares tumorales existen diferencias en el contenido y la proporción de ácidos grasos en comparación con las células del tejido normal (Meng *et al*, 2005; García-Gasca, 2021).

La literatura señala que en el cáncer la generalidad es una mayor fluidez, ya que se ha reportado que en distintos tipos de cáncer la fluidez membranal aumenta en comparación con sus contrapartes normales (Sok *et al*, 2002), por lo que los resultados de este estudio en principio no parecen ser consistentes con lo reportado en la literatura, sin embargo, en este punto es importante volver a mencionar que este cociente de fluidez sólo toma en cuenta a los ácidos grasos y por lo tanto sólo hace alusión a un índice de fluidez y no al parámetro físico como tal (para ello se deben tomar en cuenta a los otros componentes que forman a las membranas biológicas). Por lo anterior, en el caso de este estudio se deben considerar otros métodos para la medición de la fluidez membranal como el empleo de diferentes monitores fluorescentes entre los que se encuentran el Difenil Hexatrieno (DPH) o el dipirenil propano (DPiP), los cuales se ubican en diferentes zonas de la bicapa lípidica y por lo tanto su empleo permitirá obtener información más completa de la fluidez en estas células tumorales.

Por lo anterior, los resultados reportados de la fluidez membranal en las células tumorales parecen depender mucho del tejido de origen y de los métodos empleados por los investigadores para medir este parámetro; sin embargo, lo más relevante son las repercusiones que este cambio en la fluidez membranal tiene en las células tumorales, por ejemplo, se ha mencionado que una mayor fluidez membranal en algunas líneas tumorales está asociado con la capacidad de estas células para infiltrarse y hacer metástasis (Zeisig *et al*, 2007; Taraboletti *et al*, 1989). De hecho, se ha propuesto que los fármacos antimetastasis suprimen la capacidad metastásica de las células de cáncer de mama al reducir la fluidez de membrana (Zhao *et al*, 2016).

Además, se tienen reportes de que las alteraciones en los lípidos de membrana pueden modificar el grado de resistencia a la quimioterapia (Huang *et al*, 2003; Liang y Huang, 2001; Callaghan, 1993). Rivel y colaboradores (2019) realizaron un estudio de dinámica molecular en donde mostraron que la pérdida de la asimetría de los lípidos que se ha reportado en algunas células malignas (dada por la exposición de fosfatidilserina en la monocapa externa de sus membranas) (Riedl *et al*, 2011; Utsugi *et al*, 1991) conduce a una disminución de la permeabilidad en estas células.

En el caso particular de este estudio los cambios en las proporciones de los ácidos grasos membranales de las muestras tumorales y por consiguiente, la disminución en el índice de fluidez, especialmente para las mitocondrias, parece estar íntimamente asociado con su función bioenergética (figura 5).

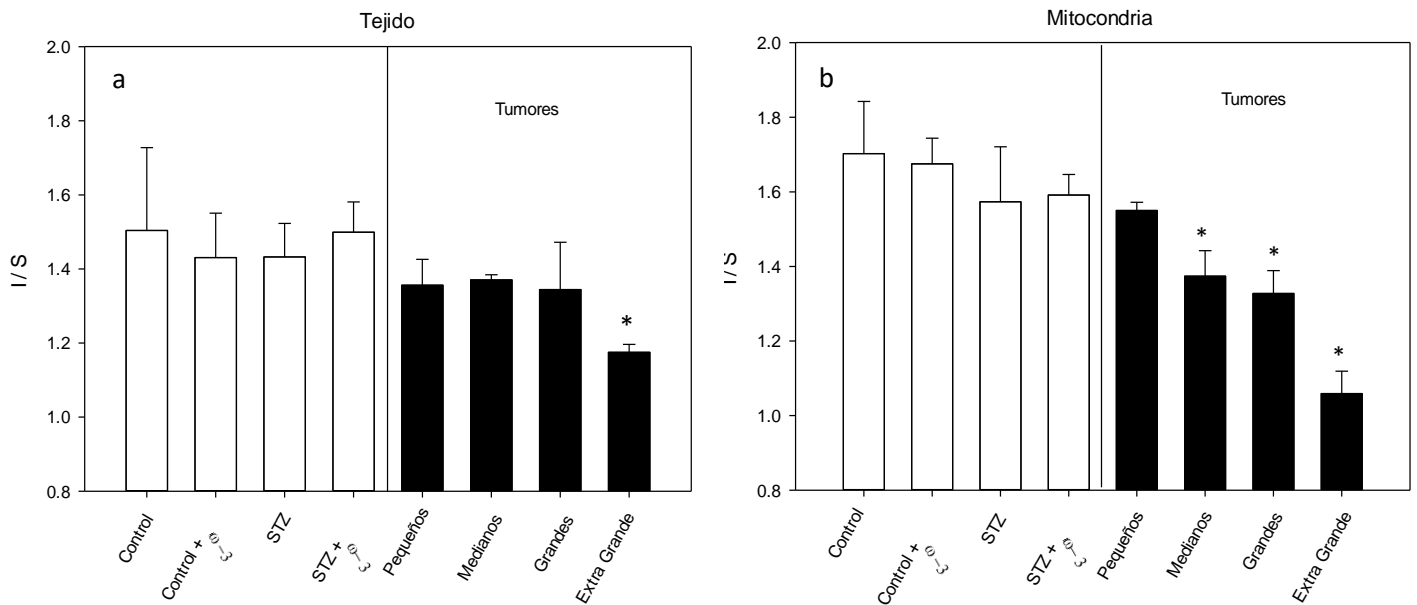


Figura 6. Perfiles comparativos de los Índices de fluidez membranal de todos los grupos experimentales analizados. Los perfiles se muestran tanto para el tejido (a) como para sus respectivas mitocondrias (b). Los datos para la construcción de estos gráficos se obtuvieron de las tablas 6, 7, 8 y 9. * $p < 0.05$ diferencia con relación al grupo control

Composición de ácidos grasos: Ácido palmítico

Como se pudo observar en las tablas de composición de ácidos grasos mostradas anteriormente, se encontró que hubo cambios evidentes en la proporción de algunos ácidos grasos entre los diferentes grupos experimentales analizados. Uno de estos ácidos grasos fue el ácido palmítico.

En la siguiente figura (figura 7) se muestran las proporciones de este ácido graso (en mol%) del tejido renal (y sus respectivas mitocondrias) de los diferentes grupos experimentales. De forma general, se aprecia que los grupos experimentales en los que no fue evidente la generación de los tumores renales, la proporción de palmítico es igual entre estos grupos, sin embargo, en las muestras de tejido tumorales (así como de sus respectivas mitocondrias) se observa un aumento significativo en la proporción de este ácido graso en los tumores clasificados como “grandes” y en el tumor “extra grande” con relación al grupo control; y se observa que, mientras más desarrollado (en cuanto a peso y tamaño) sea el tumor, mayor es la proporción de palmítico en sus membranas.

El ácido palmítico, es un ácido graso saturado de 16 carbonos; por lo que el aumento de esta molécula impacta de forma directa en la suma total de ácidos grasos saturados y por lo tanto, en el índice de fluidez membranal. En este sentido los resultados obtenidos para los diferentes grupos experimentales parecen ser consistentes, ya que el aumento de las proporciones del ácido palmítico encontrado en las muestras de tejido tumoral (así como en sus respectivas mitocondrias) reflejan la disminución del índice de fluidez membranal encontrados en estos grupos experimentales (Figura 6).

Existen estudios en los que se ha demostrado que las células tumorales se someten a una reprogramación metabólica (en la que se incluye el metabolismo de los lípidos) para apoyar la proliferación y el crecimiento. Dentro de esta reprogramación metabólica se incluye la captación y la síntesis de *novo* de los ácidos grasos en las células cancerosas (Yu *et al*, 2018). Se conoce que el ácido palmítico es un ácido graso no esencial y es el principal producto de la sintasa de ácidos grasos, la enzima encargada de la síntesis de *novo* de los ácidos grasos (King, 2014).

Si bien es cierto que no podemos discriminar, en el caso de este estudio, cuánto de esta concentración total de ácido palmítico proviene de la síntesis endógena y cuánto de la dieta, lo cierto es que se encontró un aumento de este ácido graso en las muestras tumorales. Por lo anterior, el aumento del ácido palmítico en estas muestras puede estar involucrado con procesos biosintéticos que podrían estar relacionados / implicados con el ensamblaje de nuevas membranas con el fin de promover la rápida proliferación celular; pues como se observó en las tablas de composición de ácidos grasos, esta molécula es un componente principal de estas estructuras.

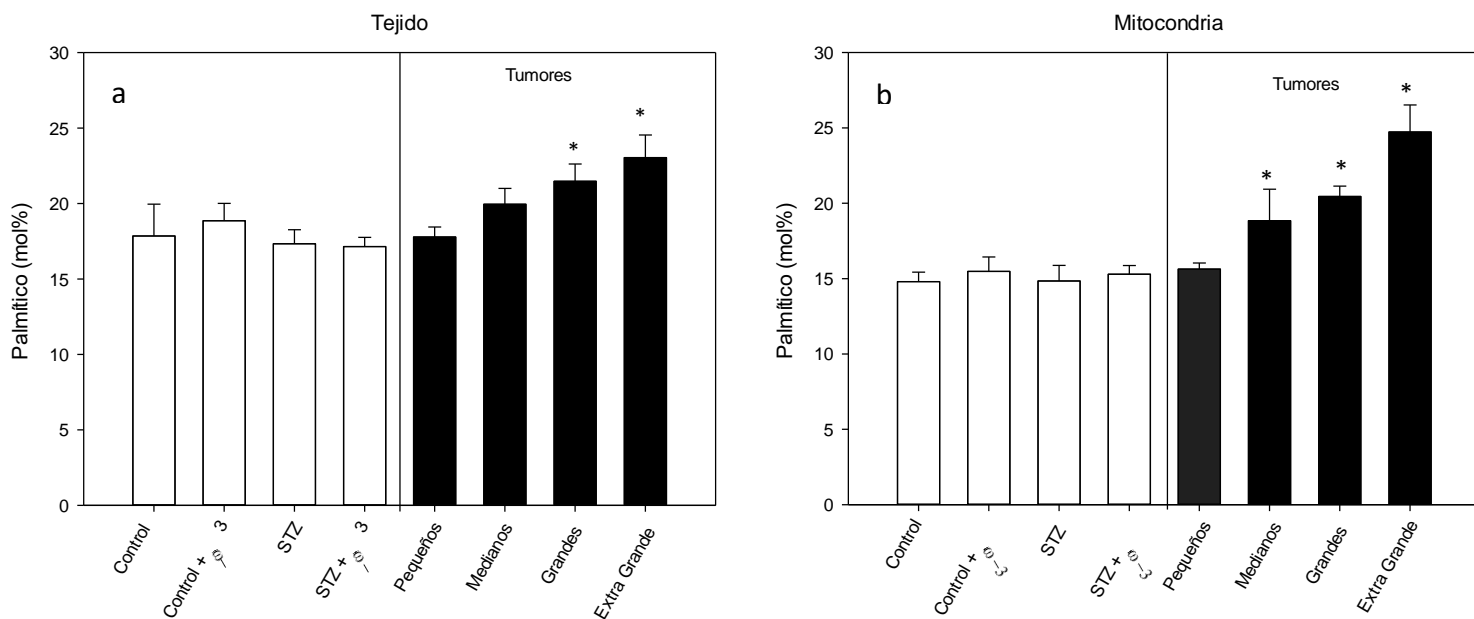


Figura 7. Perfiles comparativos de la proporción del ácido palmítico de todos los grupos experimentales representados como mol%. Los perfiles se muestran tanto para tejido renal (a) así como para sus respectivas mitocondrias (b). Los datos para la construcción de estos gráficos fueron obtenidos de las tablas de composición de ácidos grasos (tablas 6, 7, 8 y 9). * $p < 0.05$ diferencia con relación al grupo control.

Composición de ácidos grasos: Ácido Araquidónico

El ácido Araquidónico (AA) fue otro de los ácidos grasos en los que se observaron cambios en las proporciones entre los diferentes grupos experimentales.

En la figura 8 se muestran las proporciones de este ácido graso (en mol%) del tejido renal (y sus respectivas mitocondrias) de los diferentes grupos experimentales analizados. De forma general, se puede observar que en los grupos experimentales en los que no fue evidente la generación de los tumores renales, la proporción de AA es igual entre estos grupos, sin embargo, en las muestras de tejido tumoral (así como de sus respectivas mitocondrias) la proporción de este ácido graso muestra una disminución significativa en los tumores “grandes” y en el tumor “extra grande” con relación al grupo control; y se observa que entre más pesado es el tumor, menor es la proporción de AA que componen sus membranas.

Por lo anterior y tomando en cuenta que el AA es un ácido graso de 20 carbonos que posee 4 insaturaciones se asume que su disminución impacta directamente en la suma de ácidos grasos insaturados totales y, por lo tanto, en el índice de fluidez membranal. En este sentido los resultados obtenidos para las muestras del tejido tumoral, así como sus respectivas mitocondrias, reflejan la disminución en el índice de fluidez membranal en estos grupos experimentales (Figura 6).

Es importante revisar la posible razón por la cual sucede este fenómeno. De forma general, se conoce que el AA es sustrato de las enzimas ciclooxigenasas (COX), de la enzima lipoxigenasa (LOX), y algunas enzimas del CYP450, enzimas que son claves para la síntesis de eicosanoides (Calder, 2020). Los eicosanoides son compuestos bioactivos de 20 carbonos que, entre sus funciones se encuentra que, pueden actuar para regular eventos de la respuesta inflamatoria. En varios trabajos de investigación se ha mencionado que las prostaglandinas y los leucotrienos se han relacionado con la regulación del microambiente tumoral y la inflamación promotora de tumores (Koundouros y Poulgiannis, 2020; Jala *et al*, 2017).

Wang y DuBois (2010) realizaron una revisión del papel que juegan los eicosanoides en cáncer; estos investigadores mencionan que los mediadores lipídicos (algunas prostaglandinas y leucotrienos) pueden estimular a las células epiteliales y a sus células estromales circulantes con la finalidad de que produzcan factores de crecimiento, mediadores inflamatorios y factores angiogénicos. Todo lo descrito anteriormente contribuye a que el microambiente se modifique y con ello se favorezca el crecimiento tumoral acelerado.

Por lo anterior, es importante mencionar que el AA es un ácido graso ω -6 esencial, es decir, es un ácido graso que tiene que ser adquirido principalmente a través de la dieta. Se encuentra presente principalmente en forma esterificada en los fosfolípidos de la membrana celular, en donde puede ser liberado por la fosfolipasa A2 (Balsinde *et al*, 2002). De hecho, la fosfolipasa A2 (principalmente la isoforma de secreción, sPLA2 por

sus siglas en inglés) ha sido involucrada en la tumorigénesis y progresión tumoral. Existen estudios que demuestran que sPLA2 desempeña un papel protumorigénico en varios tipos de cáncer entre los que se encuentran el cáncer de mama (Yamashita *et al*, 1993), cáncer de pulmón (Bennett *et al*, 2014) y cáncer de próstata (Jiang *et al*, 2002).

Por lo anterior y, de acuerdo con la marcada disminución de AA encontrada en las muestras del tejido tumoral (y de sus respectivas mitocondrias) podría estar ocurriendo que este ácido graso está siendo liberado de las membranas para llevar a cabo todos los procesos antes mencionados y con ello favorecer el desarrollo de tumores.

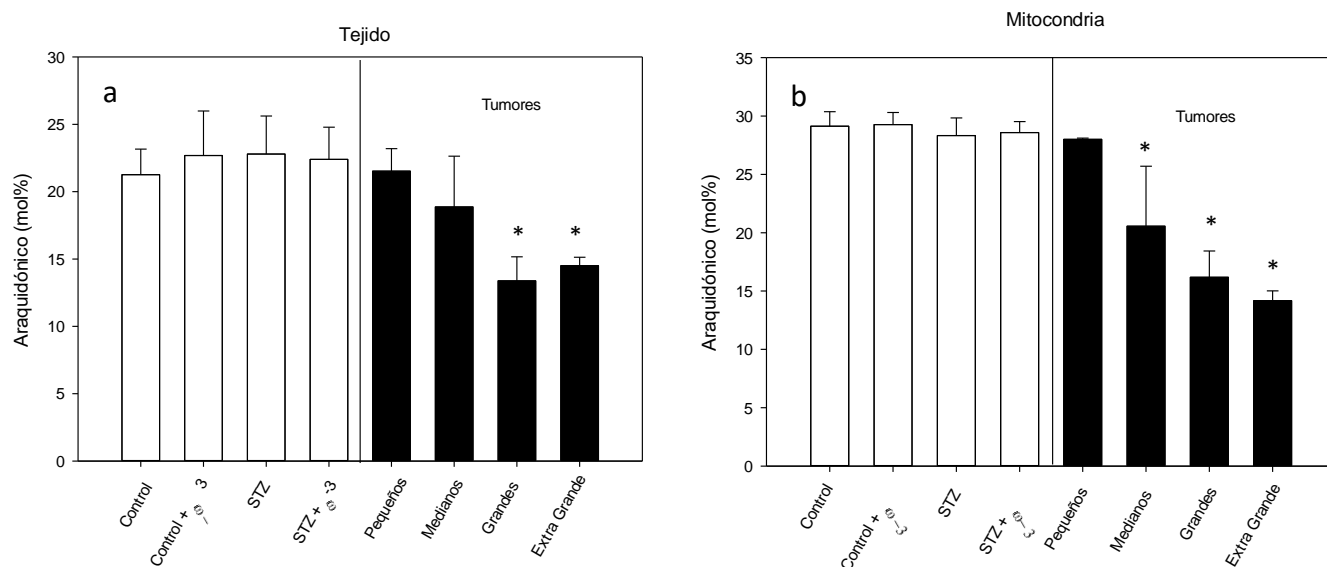


Figura 8. Perfiles comparativos de la proporción del ácido AA de todos los grupos experimentales representados como mol%. Los perfiles se muestran tanto para tejido renal (a) así como para sus respectivas mitocondrias (b). Los datos para la construcción de estos gráficos fueron obtenidos de las tablas de composición de ácidos grasos (tablas 6, 7, 8 y 9). * $p < 0.05$ diferencia con relación al grupo control.

Anteriormente se mencionó que se tuvieron algunas ratas en las cuales los tumores renales se generaron solamente en un riñón. Partiendo de esta idea se compararon las membranas mitocondriales que fueron aisladas de los dos riñones de estas ratas (riñón morfológicamente sano vs riñón tumoral) para observar si la presencia de estos tumores altera el metabolismo de los lípidos (se tomó como referencia la proporción de ácido palmítico, AA y el índice de fluidez membranal) en estos órganos dentro un mismo organismo. Para ello se tomaron como ejemplo 3 ratas las cuales presentaron los tumores renales exclusivamente en el riñón derecho (Figura 9). Los datos se muestran de acuerdo al peso y tamaño del tumor (Figura 9 y tabla 10).

De forma general, se observa que todos los datos muestran coherencia con relación a lo que se encontró anteriormente, pues se observa que cuando el tumor es incipiente (rata 12) no hay cambios en la proporción de estos dos ácidos grasos ni tampoco se ve alterado el índice de fluidez membranal; sin embargo, cuando los tumores son más grandes (aproximadamente de 20 g, Rata 2 y 5) hay cambios importantes en la proporción de estas dos moléculas (la proporción de palmítico aumenta y la proporción de AA disminuye en ambos casos, tablas 11 y 12). Como se había mencionado anteriormente estos cambios repercuten en el índice de fluidez membranal, y en este caso se observa que este parámetro también disminuye (tabla 13).

Además, no hay que olvidar que se analizaron las secciones morfológicamente sanas de los riñones con tumor. Estos resultados se muestran en la tabla 14 (anexos). Y, en particular, de los 3 riñones con tumor que se presentaron anteriormente, en 2 de ellos (los riñones de las ratas 5 y 12) fue posible distinguir la sección morfológicamente sana. Por lo anterior se decidió comparar las proporciones de ácido Palmítico y AA y su repercusión en el índice de fluidez de las membranas mitocondriales en estas dos secciones (sección morfológicamente sana vs sección tumoral). Los resultados se muestran en la tabla 15 (anexos); y en este caso, es interesante que aun tratándose del mismo órgano se observan los mismos fenómenos que se describieron anteriormente.

En este sentido, es evidente que el desarrollo de tumores está alterando el metabolismo de los lípidos en las membranas de las mitocondrias (al menos la proporción de estos dos ácidos grasos y por ende, el índice de fluidez membranal) y, nuevamente, estos datos apoyan la idea de que estos cambios están asociados con el peso y tamaño del tumor.



Figura 9. Imágenes representativas de los riñones de los organismos que tuvieron generación de tumores renales exclusivamente en el riñón derecho. Las imágenes están organizadas de acuerdo con el peso y el tamaño de los tumores generados.

Tabla 10. Peso (g) de ambos riñones (riñón morfológicamente normal y riñón tumoral) de los organismos que tuvieron generación de tumores renales exclusivamente en el riñón derecho.

Peso de Riñones (g)				
	Desarrollo incipiente del tumor		Desarrollo avanzado del tumor	
	Rata 12		Rata 5	Rata 2
Riñón morfológicamente normal	1.54		1.56	1.97
Riñón tumoral	1.86		19.51	24.28

Tabla 11. Proporción (en mol%) de ácido palmítico de las mitocondrias aisladas del tejido (tanto del riñón morfológicamente sano como del riñón tumoral) de ratas que tuvieron generación de tumores renales exclusivamente en el riñón derecho.

Palmítico (mol%)				
	Desarrollo incipiente del tumor		Desarrollo avanzado del tumor	
	Rata 12		Rata 5	Rata 2
Riñón morfológicamente normal	16.12 ± 0.22		15.02 ± 0.04	15.52 ± 0.44
Riñón tumoral	15.88 ± 0.49		21.34 ± 0.25	19.82 ± 0.18

Tabla 12. Proporción (en mol%) de AA de las mitocondrias aisladas del tejido (tanto del riñón morfológicamente sano como del riñón tumoral) de ratas que tuvieron generación de tumores renales exclusivamente en el riñón derecho.

AA (mol%)				
	Desarrollo incipiente del tumor		Desarrollo avanzado del tumor	
	Rata 12		Rata 5	Rata 2
Riñón morfológicamente normal	28.42 ± 0.99		28.17 ± 0.59	25.54 ± 0.38
Riñón tumoral	28.05 ± 0.08		14.12 ± 0.30	17.54 ± 0.54

Tabla 13. Índice de fluidez de las mitocondrias aisladas del tejido (tanto del riñón morfológicamente sano como del riñón tumoral) de ratas que tuvieron generación de tumores renales exclusivamente en el riñón derecho.

I/S				
	Desarrollo incipiente del tumor		Desarrollo avanzado del tumor	
	Rata 12		Rata 5	Rata 2
Riñón morfológicamente normal	1.54 ± 0.04		1.63 ± 0.03	1.53 ± 0.01
Riñón tumoral	1.56 ± 0.02		1.24 ± 0.02	1.36 ± 0.04

OBSERVACIONES FINALES

- En el modelo de DM2 generado por inyección intraperitoneal de STZ, los ácidos grasos omega 3 de cadena larga están implicados en el desarrollo de tumores renales.
- Se observó que los organismos inducidos a DM2 tuvieron menor ganancia de peso.
- Hay cambios en las velocidades de respiración mitocondrial en el tumor renal más que en el CR; a mayor grado de desarrollo tumoral (en cuanto al peso y tamaño del tumor), menor es la velocidad de respiración en el estado 4 y en el estado 3 mitocondrial.
- El desarrollo de tumores alteró la proporción de ácidos grasos de la membrana (del tejido renal y sus respectivas mitocondrias) y estas alteraciones están asociadas con el peso y el tamaño de los tumores; se observó que entre mayor es el tamaño del tumor, menor es el índice de fluidez membranal.
- A mayor grado de desarrollo tumoral, se observó un incremento de la proporción de ácido palmítico de hasta 1.2 veces (en el tejido) y, de hasta 1.6 veces (para las mitocondrias) con relación a sus respectivos grupos control.
- A mayor grado de desarrollo tumoral, se observó una disminución de la proporción de AA de hasta 1.4 veces (en el tejido) y, de hasta 2 veces (para las mitocondrias) con relación a sus respectivos grupos control.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se concluye que la respiración mitocondrial es un proceso bioenergético estrechamente relacionado con las propiedades fisicoquímicas de las membranas, particularmente la composición de ácidos grasos, y esa relación es evidente en el desarrollo de los tumores renales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K., Uwagawa, T., Haruki, K., Takano, Y., Onda, S., Sakamoto, T., Gocho, T., & Yanaga, K. (2018). Effects of ω -3 Fatty Acid Supplementation in Patients with Bile Duct or Pancreatic Cancer Undergoing Chemotherapy. *Anticancer research*, 38(4), 2369–2375
- Al Tameemi, W., Dale, T. P., Al-Jumaily, R., & Forsyth, N. R. (2019). Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Frontiers in cell and developmental biology*, 7, 4.
- Albert, B. B., Cameron-Smith, D., Hofman, P. L., & Cutfield, W. S. (2013). Oxidation of marine omega-3 supplements and human health. *BioMed research international*, 2013, 464921.
- American Diabetes Association (2009). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 32 Suppl 1(Suppl 1), S62–S67.
- American Diabetes Association (2011). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 34 Suppl 1(Suppl 1), S62–S69.
- Ames B.N, Shigenaga M.K, Gold L.S. (1993) DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect*; 101:35–44.
- Arison, R. N., & Feudale, E. L. (1967). Induction of renal tumour by streptozotocin in rats. *Nature*, 214(5094), 1254–1255.
- Arner P. (2002). Insulin resistance in type 2 diabetes: role of fatty acids. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 18 Suppl 2, S5–S9.
- Balsinde, J., Winstead, M. V., & Dennis, E. A. (2002). Phospholipase A(2) regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS letters*, 531(1), 2–6.
- Bradford, M.M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle protein- dye binding. *Anal Biochem*, 72(1) 248-254.
- Bennett, D. T., Deng, X. S., Yu, J. A., Bell, M. T., Mauchley, D. C., Meng, X., Reece, T. B., Fullerton, D. A., & Weyant, M. J. (2014). Cancer stem cell phenotype is supported by secretory phospholipase A2 in human lung cancer cells. *The Annals of thoracic surgery*, 98(2), 439–446.
- Block, E. R., & Edwards, D. (1987). Effect of plasma membrane fluidity on serotonin transport by endothelial cells. *The American journal of physiology*, 253(5 Pt 1), C672–C678.
- Bonadonna R. C. (2004). Alterations of glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus. An overview. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 5(2), 89–97.
- Bonner-Weir, S., Trent, D. F., Honey, R. N., & Weir, G. C. (1981). Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes*, 30(1), 64–69.
- Boyd D. B. (2003). Insulin and cancer. *Integrative cancer therapies*, 2(4), 315–329.

- Brasitus, T. A., Dahiya, R., Dudeja, P. K., & Bissonnette, B. M. (1988). Cholesterol modulates alkaline phosphatase activity of rat intestinal microvillus membranes. *The Journal of biological chemistry*, 263(18), 8592–8597.
- Brasky, T. M., Darke, A. K., Song, X., Tangen, C. M., Goodman, P. J., Thompson, I. M., Meyskens, F. L., Jr, Goodman, G. E., Minasian, L. M., Parnes, H. L., Klein, E. A., & Kristal, A. R. (2013). Plasma phospholipid fatty acids and prostate cancer risk in the SELECT trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(15), 1132–1141.
- Budin, I., de Rond, T., Chen, Y., Chan, L., Petzold, C. J., & Keasling, J. D. (2018). Viscous control of cellular respiration by membrane lipid composition. *Science (New York, N.Y.)*, 362(6419), 1186–1189.
- Cabezas, J.R.M y Díaz, O.J. (2015). Efecto de los ácidos grasos omega 3 sobre la diabetes inducida en *rattus rattus var albinus*. *Cientifi-k*, 4(1), 25-32.
- Calder P. C. (2020). Eicosanoids. *Essays in biochemistry*, 64(3), 423–441.
- Chauhan, S., Kodali, H., Noor, J., Ramteke, K., & Gawai, V. (2017). Role of Omega-3 Fatty Acids on Lipid Profile in Diabetic Dyslipidaemia: Single Blind, Randomised Clinical Trial. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 11(3), OC13–OC16.
- Coelho, R. G., Calaça, I. C., Celestrini, D. M., Correia-Carneiro, A. H., Costa, M. M., Zancan, P., & Sola-Penna, M. (2015). Hexokinase and phosphofructokinase activity and intracellular distribution correlate with aggressiveness and invasiveness of human breast carcinoma. *Oncotarget*, 6(30), 29375–29387.
- Collet, N., Théoleyre, S., Rageul, J., Mottier, S., Jouan, F., Rioux-Leclercq, N., Fergelot, P., Patard, J. J., Masson, D., & Denis, M. G. (2011). PPAR γ is functionally expressed in clear cell renal cell carcinoma. *International journal of oncology*, 38(3), 851–857.
- Connor W. E. (1988). Effects of omega-3 fatty acids in hypertriglyceridemic states. *Seminars in thrombosis and hemostasis*, 14(3), 271–284.
- Dimitriadis G, Mitrou P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011 Aug;93 Suppl 1:S52-9
- Edwards, I. J., & O'Flaherty, J. T. (2008). Omega-3 Fatty Acids and PPAR γ in Cancer. *PPAR research*, 2008, 358052.
- Eyth E, Basit H, Smith CJ. 2022 Jan- Glucose Tolerance Test. [Updated 2022 Jan 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; -. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532915/>
- Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed [27 diciembre 2021].
- Figueroa G, M. C., Pérez H, I. H., & Mejía Z, R. (2013). Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Revista MVZ Córdoba*, 18(supl), 3699-3707.
- Figueroa-García M, Espinosa-García M, 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.

- Franko, A., Berti, L., Hennenlotter, J., Rausch, S., Scharpf, M. O., Angelis, M. H., Stenzl, A., Peter, A., Birkenfeld, A. L., Lutz, S. Z., Häring, H. U., & Heni, M. (2020). Increased Expressions of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Prostate Cancer Tissues of Men with Type 2 Diabetes. *Biomedicines*, 8(11), 507.
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews*, 30(2), 193–204.
- Gallagher, E. J., & LeRoith, D. (2010). The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21(10), 610–618.
- Gao, Z., Zhang, X., Zuberi, A., Hwang, D., Quon, M. J., Lefevre, M., & Ye, J. (2004). Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 18(8), 2024–2034
- García – Gasca. H.A. (2021). Características fisicoquímicas de Membrana en un Modelo de Tumor Renal de Ratas Wistar Diabéticas. Tesis Profesional para obtener el título de Biólogo. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gatenby, R. A., & Gillies, R. J. (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nature reviews. Cancer*, 4(11), 891–899.
- Goldenberg K. Weight Change. In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 210. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK323/>
- González-Pérez, A., Horrillo, R., Ferré, N., Gronert, K., Dong, B., Morán-Salvador, E., Titos, E., Martínez-Clemente, M., López-Parra, M., Arroyo, V., & Clària, J. (2009). Obesity-induced insulin resistance and hepatic steatosis are alleviated by omega-3 fatty acids: a role for resolvins and protectins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(6), 1946–1957.
- Haglund, O., Luostarinen, R., Wallin, R., Wibell, L., & Saldeen, T. (1991). The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E. *The Journal of nutrition*, 121(2), 165–169.
- Hammoudi, N., Ahmed, K. B., Garcia-Prieto, C., & Huang, P. (2011). Metabolic alterations in cancer cells and therapeutic implications. *Chinese journal of cancer*, 30(8), 508–525.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57–70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Heydemann, A. (2016). "An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus", *Journal of Diabetes Research*, vol. 2016, Article ID 2902351, 14 pages.

- Hosokawa, M., Dolci, W., & Thorens, B. (2001). Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing beta cells to streptozotocin. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(5), 1114–1117.
- Hsieh, J. J., Purdue, M. P., Signoretti, S., Swanton, C., Albiges, L., Schmidinger, M., Heng, D. Y., Larkin, J., & Ficarra, V. (2017). Renal cell carcinoma. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17009.
- Huang, Z., Tong, Y., Wang, J., & Huang, Y. (2003). NMR studies of the relationship between the changes of membrane lipids and the cisplatin-resistance of A549/DDP cells. *Cancer cell international*, 3(1), 5.
- IDF Diabetes Atlas (2017) International diabetes federation, 8th edn
- Jala, V. R., Bodduluri, S. R., Satpathy, S. R., Chheda, Z., Sharma, R. K., & Haribabu, B. (2017). The yin and yang of leukotriene B₄ mediated inflammation in cancer. *Seminars in immunology*, 33, 58–64.
- Jiang, J., Neubauer, B. L., Graff, J. R., Chedid, M., Thomas, J. E., Roehm, N. W., Zhang, S., Eckert, G. J., Koch, M. O., Eble, J. N., & Cheng, L. (2002). Expression of group IIA secretory phospholipase A2 is elevated in prostatic intraepithelial neoplasia and adenocarcinoma. *The American journal of pathology*, 160(2), 667–671
- Joshi, S., Liu, M., & Turner, N. (2015). Diabetes and its link with cancer: providing the fuel and spark to launch an aggressive growth regime. *BioMed research international*, 2015, 390863.
- Kaneto, H., Katakami, N., Matsuhisa, M., & Matsuoka, T. A. (2010). Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*, 2010, 453892.
- Kántor Coronel, Irma (2021) “Magnitud del sobrepeso y obesidad en México: Un cambio de estrategia para su erradicación”. Mirada Legislativa No. 197, Instituto Belisario Domínguez, Senado de la República, Ciudad de México, 18p
- Kazumi, T., Yoshino, G., Fujii, S., & Baba, S. (1978). Tumorigenic action of streptozotocin on the pancreas and kidney in male Wistar rats. *Cancer research*, 38(7), 2144–2147.
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* ;3(3):177-185.
- King, M.W (2014). Lipids: Fatty Acid Synthesis. In: King, M. W. (Ed.). *Integrative Medical Biochemistry Examination and Board Review*. McGraw Hill.
- Koundouros, N., & Poulogiannis, G. (2020). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British journal of cancer*, 122(1), 4–22.
- Kröncke, K. D., Fehsel, K., Sommer, A., Rodriguez, M. L., & Kolb-Bachofen, V. (1995). Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 376(3), 179–185.
- Kumar, B., Koul, S., Khandrika, L., Meacham, R. B., & Koul, H. K. (2008). Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer research*, 68(6), 1777–1785.

- Kusakabe, T., Nashimoto, A., Honma, K., & Suzuki, T. (2002). Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology*, 40(1), 71–79.
- Lande, M. B., Donovan, J. M., & Zeidel, M. L. (1995). The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons. *The Journal of general physiology*, 106(1), 67–84.
- Lange, K. W., Nakamura, Y., Gosslau, A. M., & Li, S. (2019). Are there serious adverse effects of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements?. *Journal of Food Bioactives*, 7.
- Lenzen S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216–226.
- Liang, X., & Huang, Y. (2001). Alteration of membrane lipid biophysical properties and resistance of human lung adenocarcinoma A(549) cells to cisplatin. *Science in China. Series C, Life sciences*, 44(1), 25–32.
- Lin, X., Xiao, Z., Chen, T., Liang, S. H., & Guo, H. (2020). Glucose Metabolism on Tumor Plasticity, Diagnosis, and Treatment. *Frontiers in oncology*, 10, 317.
- Los, D. A., & Murata, N. (2004). Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et biophysica acta*, 1666(1-2), 142–157.
- Ma, J., Sawai, H., Matsuo, Y., Ochi, N., Yasuda, A., Takahashi, H., Wakasugi, T., Funahashi, H., Sato, M., & Takeyama, H. (2010). IGF-1 mediates PTEN suppression and enhances cell invasion and proliferation via activation of the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway in pancreatic cancer cells. *The Journal of surgical research*, 160(1), 90–101.
- Marnett L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation research*, 424(1-2), 83–95.
- Marugán de Miguelsanz, J.M; Torres M.; Vicente, C; Redondo del Río, M.P. 2015. Valoración de estado nutricional. *Pedratr Integral*;XIX (4):289.e1-289.e6
- Mauer, S. M., Lee, C. S., Najarian, J. S., Brown, D. M. (1974). Induction of malignant kidney tumors in rats with streptozotocin. *Cancer Research*, 34(1), 158-160.
- Maulucci, G., Cohen, O., Daniel, B., Sansone, A., Petropoulou, P. I., Filou, S., Spyridonidis, A., Pani, G., De Spirito, M., Chatgialloglu, C., Ferreri, C., Kypreos, K. E., & Sasson, S. (2016). Fatty acid-related modulations of membrane fluidity in cells: detection and implications. *Free radical research*, 50(sup1), S40–S50.
- Mejía-Zepeda, R., & Pérez-Hernández, I. H. (2020). Effect of alpha linolenic acid on membrane fluidity and respiration of liver mitochondria in normoglycemic and diabetic Wistar rats. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 52(6), 421–430
- Meng, X., Riordan, N. H., Riordan, H. D., Mikirova, N., Jackson, J., González, M. J. Trinidad, W. C. (2004). Cell membrane fatty acid composition differs between normal and malignant cell lines. *Puerto Rico health sciences journal*, 23(2), 103-106.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., & Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal*, 274(6), 1393–1418.

- Morigny, P., Houssier, M., Mouisel, E., & Langin, D. (2016). Adipocyte lipolysis and insulin resistance. *Biochimie*, 125, 259–266
- Morrison W.R y Smith L. M. (1964). Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipides with boron fluoride-methanol. *J Lipids Res.*; 5:600–608.
- Nabi, S., Kessler, E. R., Bernard, B., Flaig, T. W., & Lam, E. T. (2018). Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Research*, 7, 307.
- National Institutes of Health (US); Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); 2007. Understanding Cancer.
- Nogueira, M.S; Scolaro, B., Milne, G., Castro, I. (2019). Oxidation products from omega-3 and omega-6 fatty acids during a simulated shelf life of edible oils. *LWT*.101, 113-122.
- NOM-062-ZOO-1999, N. O. M., LA PRODUCCION, E. T. P. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
- Ntambi J. M. (1999). Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *Journal of lipid research*, 40(9), 1549–1558.
- Orozco T. R. 2008. Efecto de los ácidos grasos omega 3 (FA -3) y linoleico conjugado (CLA) en la Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) en ratas Wistar. [Tesis Licenciatura]. [México]: Universidad Nacional Autónoma de México
- Orrenius, S., Gogvadze, V., & Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, 143–183.
- Panarotto, D., Rémillard, P., Bouffard, L., & Maheux, P. (2002). Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in an adipose tissue-specific manner. *European journal of clinical investigation*, 32(2), 84–92.
- Pérez-Hernández IH, Domínguez-Fuentes JM, Palomar-Morales M, Zazueta-Mendizabal AC, 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* 49:231–239
- Phan, L. M., Yeung, S. C., & Lee, M. H. (2014). Cancer metabolic reprogramming: importance, main features, and potentials for precise targeted anti-cancer therapies. *Cancer biology & medicine*, 11(1), 1–19. <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.01.001>
- Piché, L. A., Draper, H. H., & Cole, P. D. (1988). Malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil vs a concentrate of n-3 fatty acids. *Lipids*, 23(4), 370–371.
- Pilon M. (2016). Revisiting the membrane-centric view of diabetes. *Lipids Health Dis* 15(1):167.
- Price, S. R., Bailey, J. L., Wang, X., Jurkovitz, C., England, B. K., Ding, X., Phillips, L. S., & Mitch, W. E. (1996). Muscle wasting in insulinopenic rats results from activation of the ATP-dependent, ubiquitin-proteasome proteolytic pathway by a mechanism including gene transcription. *The Journal of clinical investigation*, 98(8), 1703–1708.

- Ramteke, P., Deb, A., Shepal, V., & Bhat, M. K. (2019). Hyperglycemia Associated Metabolic and Molecular Alterations in Cancer Risk, Progression, Treatment, and Mortality. *Cancers*, 11(9), 1402.
- Riedl, S., Rinner, B., Asslaber, M., Schaidler, H., Walzer, S., Novak, A., Lohner, K., & Zweytick, D. (2011). In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochimica et biophysica acta*, 1808(11), 2638–2645.
- Rivel, T., Ramseyer, C. & Yesylevskyy, S. (2019). The asymmetry of plasma membranes and their cholesterol content influence the uptake of cisplatin. *Sci Rep* 9, 5627.
- Rodríguez-Enríquez, S., Gallardo-Pérez, J. C., Avilés-Salas, A., Marín-Hernández, A., Carreño-Fuentes, L., Maldonado-Lagunas, V., & Moreno-Sánchez, R. (2008). Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *Journal of cellular physiology*, 216(1), 189–197.
- Röhrig, F., & Schulze, A. (2016). The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 16(11), 732–749.
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865), 799–806.
- Sanchez, D. J., Steger, D. J., Skuli, N., Bansal, A., & Simon, M. C. (2018). PPAR γ is dispensable for clear cell renal cell carcinoma progression. *Molecular metabolism*, 14, 139–149.
- Schiessel, D. L., Yamazaki, R. K., Kryczyk, M., Coelho, I., Yamaguchi, A. A., Pequito, D. C., Brito, G. A., Borghetti, G., & Fernandes, L. C. (2015). α -Linolenic Fatty Acid Supplementation Decreases Tumor Growth and Cachexia Parameters in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. *Nutrition and cancer*, 67(5), 839–846.
- Schnedl, W., Ferber, S., Johnson, J., Newgard, C. (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2- expressing cells. *Diabetes* 43(11):1326-1333.
- Semenza G. L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development*, 20(1), 51–56
- Serini, S., & Calviello, G. (2018). Long-chain omega-3 fatty acids and cancer: any cause for concern?. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 21(2), 83–89.
- Sok, M., Sentjurc, M., Schara, M., Stare, J., & Rott, T. (2002). Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer. *The Annals of thoracic surgery*, 73(5), 1567–1571.
- Sun, X. F., Shao, Y. B., Liu, M. G., Chen, Q., Liu, Z. J., Xu, B., Luo, S. X., & Liu, H. (2017). High-concentration glucose enhances invasion in invasive ductal breast carcinoma by promoting Glut1/MMP2/MMP9 axis expression. *Oncology letters*, 13(5), 2989–2995.
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37(9), 1163–1167.
- Swinnen, J. V., Heemers, H., Deboel, L., Fougelle, F., Heyns, W., & Verhoeven, G. (2000). Stimulation of tumor-associated fatty acid synthase expression by growth

factor activation of the sterol regulatory element-binding protein pathway. *Oncogene*, 19(45), 5173–5181.

- Swinnen, J. V., Roskams, T., Joniau, S., Van Poppel, H., Oyen, R., Baert, L., Heyns, W., & Verhoeven, G. (2002). Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. *International journal of cancer*, 98(1), 19–22.
- Szatrowski, T. P., & Nathan, C. F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer research*, 51(3), 794–798.
- Szkudelski, T. (2012). Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med*. 237 (5): 481-490
- Taraboletti, G., Perin, L., Bottazzi, B., Mantovani, A., Giavazzi, R., & Salmona, M. (1989). Membrane fluidity affects tumor-cell motility, invasion and lung-colonizing potential. *International journal of cancer*, 44(4), 707–713.
- Taskinen MR, Nikkila EA, Kuusi T, Harmo K (1982) Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin-independent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia* 22:46–50
- Thorens, B., Cheng, Z. Q., Brown, D., & Lodish, H. F. (1990). Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *The American journal of physiology*, 259(6 Pt 1), C279–C285.
- Thyssen, S., Arany, E., & Hill, D. J. (2006). Ontogeny of regeneration of beta-cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin. *Endocrinology*, 147(5), 2346–2356.
- Tirpe, A. A., Gulei, D., Ciortea, S. M., Crivii, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). Hypoxia: Overview on Hypoxia-Mediated Mechanisms with a Focus on the Role of HIF Genes. *International journal of molecular sciences*, 20(24), 6140.
- Utsugi, T., Schroit, A. J., Connor, J., Bucana, C. D., & Fidler, I. J. (1991). Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer research*, 51(11), 3062–3066.
- Vargas E, Podder V, Carrillo Sepulveda MA. Physiology, Glucose Transporter Type 4. [Updated 2021 May 9]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537322/>
- Vicenteño, M. U. A. (2018). Análisis de diferentes dosis de ácidos grasos omega 3 (alfa-linolénico) en fantasmas de eritrocitos de ratas inducidas a diabetes tipo 2. Tesis Profesional para obtener el título de Biólogo. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México
- Vigneri, P., Frasca, F., Sciacca, L., Pandini, G., & Vigneri, R. (2009). Diabetes and cancer. *Endocrine-related cancer*, 16(4), 1103–1123.
- Waczulikova I, Habodaszova D, Cagalinec M, Ferko M, Ulicna O, Mateasik A, et al. (2007). Mitochondrial membrane fluidity, potential, and calcium transients in the myocardium from acute diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 85: 372–381.
- Wang HQ, Altomare DA, Skele KL, Poulikakos PI, Kuhajda FP, Di Cristofano A & Testa JR (2005) Positive feedback regulation between AKT activation and fatty acid synthase expression in ovarian carcinoma cells. *Oncogene* 24, 3574–3582

- Wang, D. & Dubois, R. N. (2010). Eicosanoids and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 10(3), 181–193.
- Wang, M., Yang, Y., & Liao, Z. (2020). Diabetes and cancer: Epidemiological and biological links. *World journal of diabetes*, 11(6), 227–238.
- Wang, R. N., Bouwens, L., & Klöppel, G. (1994). Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: site, dynamics and capacity. *Diabetologia*, 37(11), 1088–1096.
- Wang, X., & Chan, C. B. (2015). n-3 polyunsaturated fatty acids and insulin secretion. *The Journal of endocrinology*, 224(3), R97–R106
- Wang, X., Hu, Z., Hu, J., Du, J., & Mitch, W. E. (2006). Insulin resistance accelerates muscle protein degradation: Activation of the ubiquitin-proteasome pathway by defects in muscle cell signaling. *Endocrinology*, 147(9), 4160–4168
- Warburg O., Wind F., Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *The Journal of General Physiology*, 8:519–530.
- Williams, J. A., Batten, S. E., Harris, M., Rockett, B. D., Shaikh, S. R., Stillwell, W., & Wassall, S. R. (2012). Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids segregate differently between raft and nonraft domains. *Biophysical journal*, 103(2), 228–237.
- Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S., & White, M. F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), 900–904
- Yamamoto, H., Uchigata, Y., & Okamoto, H. (1981). Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature*, 294(5838), 284–286.
- Yamamoto, T., Seino, Y., Fukumoto, H., Koh, G., Yano, H., Inagaki, N., Yamada, Y., Inoue, K., Manabe, T., & Imura, H. (1990). Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 170(1), 223–230
- Yamashita, S., Yamashita, J., Sakamoto, K., Inada, K., Nakashima, Y., Murata, K., Saishoji, T., Nomura, K., & Ogawa, M. (1993). Increased expression of membrane-associated phospholipase A2 shows malignant potential of human breast cancer cells. *Cancer*, 71(10), 3058–3064.
- Yang, Y. A., Han, W. F., Morin, P. J., Chrest, F. J., & Pizer, E. S. (2002). Activation of fatty acid synthesis during neoplastic transformation: role of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Experimental cell research*, 279(1), 80–90
- Young, O., Crotty, T., O'Connell, R., O'Sullivan, J., & Curran, A. J. (2010). Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head & neck*, 32(6), 750–756
- Yu, X. H., Ren, X. H., Liang, X. H., & Tang, Y. L. (2018). Roles of fatty acid metabolism in tumorigenesis: Beyond providing nutrition (Review). *Molecular medicine reports*, 18(6), 5307–5316.
- Zeisig, R., Koklic, T., Wiesner, B., Fichtner, I., & Sentjurg, M. (2007). Increase in fluidity in the membrane of MT3 breast cancer cells correlates with enhanced cell

adhesion in vitro and increased lung metastasis in NOD/SCID mice. *Archives of biochemistry and biophysics*, 459(1), 98–106.

- Zhao, W., Prijic, S., Urban, B. C., Tisza, M. J., Zuo, Y., Li, L., Tan, Z., Chen, X., Mani, S. A., & Chang, J. T. (2016). Candidate Antimetastasis Drugs Suppress the Metastatic Capacity of Breast Cancer Cells by Reducing Membrane Fluidity. *Cancer research*, 76(7), 2037–2049.
- Zhu, C., Wei, J., Tian, X., Li, Y., & Li, X. (2015). Prognostic role of PPAR- γ and PTEN in the renal cell carcinoma. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(10), 12668–12677.

ANEXOS

Modelo experimental de DM2

Se ha demostrado que la administración intraperitoneal de STZ a ratas Wistar neonatos con una dosis de 70 mg/kg de peso corporal es suficiente para disminuir aproximadamente en un 60% la población de células β pancreáticas (Thyssen *et al*, 2006). En el presente estudio se utilizó una dosis de STZ de 125 mg/kg de peso para inducir experimentalmente la DM2; se ha visto que esta dosis es suficiente para disminuir casi por completo a las células β pancreáticas, sin embargo, se conoce que en animales neonatos el páncreas tiene la capacidad de regenerar y/o diferenciar parcialmente la población celular (Thyssen *et al*, 2006; Wang *et al*, 1994), lo que resulta en un animal adulto con hipoinsulinemia e hiperglucemia moderada (Bonner-Weir *et al*, 1981).

En nuestro equipo de trabajo Orozco- Tapia (2008) observó la atrofia de los islotes pancreáticos generada por la administración intraperitoneal de STZ mediante el análisis de cortes histológicos del páncreas. Además, mediante técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra insulina, observó que las ratas inducidas a DM2 con STZ tienen una menor cantidad de insulina en los islotes pancreáticos que las ratas no inducidas.

Este modelo de inducción a DM2 mediante inyección intraperitoneal de STZ ya ha sido estudiado a detalle anteriormente por nuestro equipo de trabajo (García- Gasca, 2021; Vicenteño, 2018; Figueroa *et al*, 2013; Orozco, 2008). En todos los trabajos reportados se han observado los episodios de hiperglucemia característicos de la DM2 (ADA, 2011). De igual manera se han evaluado algunos otros indicadores de alteraciones en el metabolismo que concuerdan con el desarrollo de la DM2 como la concentración sanguínea de triacilglicéridos, colesterol y la hemoglobina glicada. Los parámetros se obtienen mensualmente a partir de que los animales cumplen las 4 semanas de edad. Lo anterior debido a que se ha informado que en ratas hay un patrón de cambios en la concentración de glucosa que se presentan de forma temprana después de la administración de STZ

Curvas de Tolerancia a la Glucosa

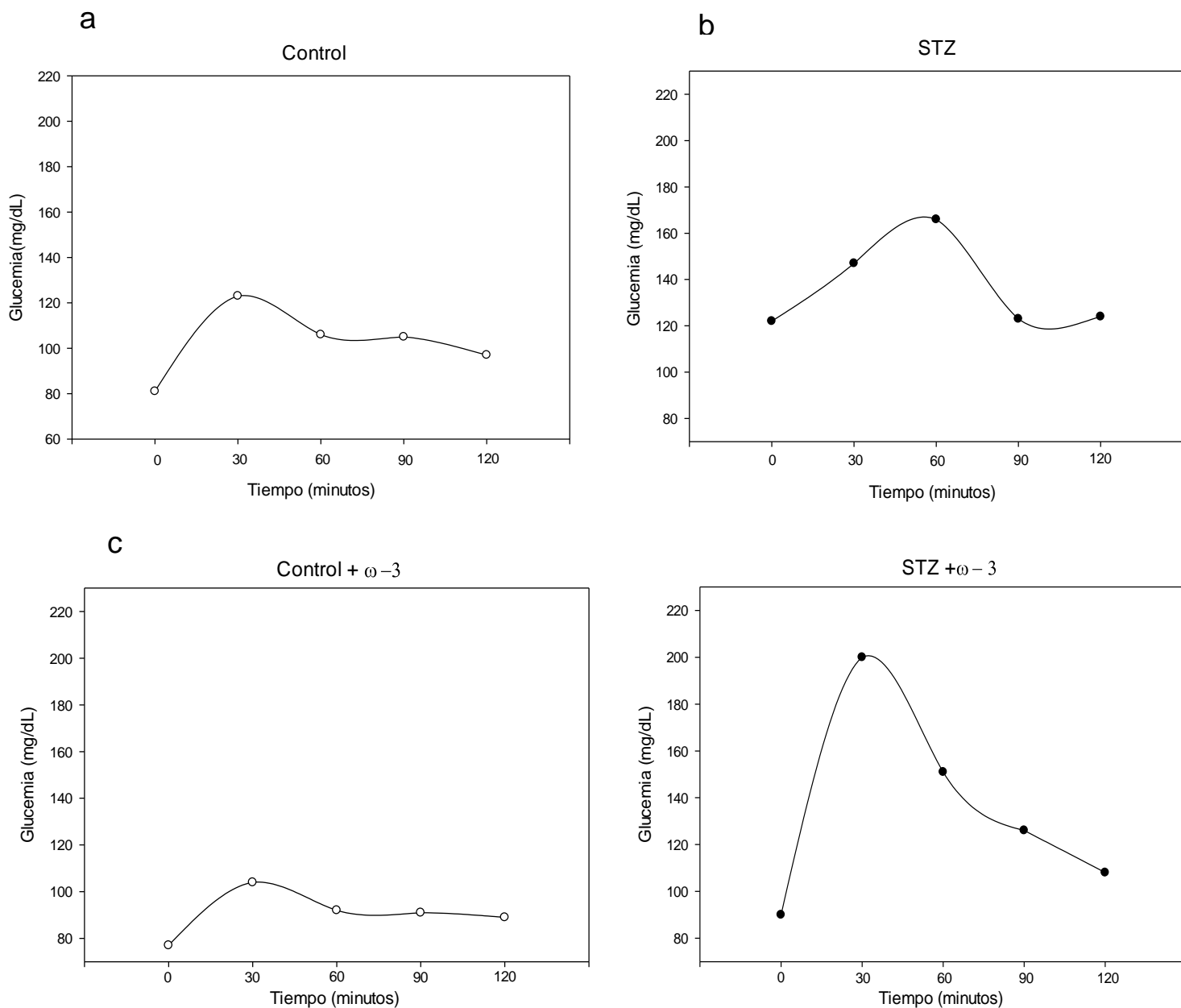


Figura 10. Curvas de Tolerancia a la Glucosa de organismos de los diferentes grupos experimentales, puntos blancos, ratas control; puntos negros ratas inducidas a DM2. En **a** se muestra un organismo del grupo control, en **b** se observa un organismo del grupo control con administración de ácidos grasos omega 3 (control + ω -3); en **c** se observa un organismo inducido a DM2 (STZ) y en **d** se observa un organismo inducido a DM2 con administración de ácidos grasos omega 3 (STZ + ω -3)

Tabla 14. Composición de ácidos grasos de membranas de mitocondrias aisladas de la sección morfológicamente sana en los riñones con tumor.

Ácido graso	Sección morfológicamente sana n=8
Mirístico	0.27 ± 0.10
Pentadecanoico	0.13 ± 0.05
Palmítico	16.65 ± 1.92
Palmitoleico	0.24 ± 0.13
Heptadecanoico	0.31 ± 0.04
Esteárico	18.06 ± 0.91
Oleico	12.43 ± 2.26
Linoleico	15.41 ± 2.48
Gamma	0.08 ± 0.02
Linolénico	0.08 ± 0.03
Araquídico	0.18 ± 0.06
Araquidónico	25.19 ± 4.02
EPA	0.39 ± 0.12
Behénico	0.25 ± 0.06
C22	0.90 ± 0.89
Lignocérico	2.21 ± 0.16
DHA	2.67 ± 0.50
NI	4.62 ± 1.96
Saturados	38.03 ± 1.59
Insaturados	57.35 ± 3.16
I/S	1.51 ± 0.14

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

Tabla 12. Proporción (en mol%) de ácido Palmítico y AA e índice de fluidez membranal de las mitocondrias aisladas de la sección morfológicamente sana y sección tumoral de los riñones de las ratas 12 (donde el desarrollo del tumor es incipiente) y rata 5 (con desarrollo de tumor avanzado)

	Palmítico (mol%)		Araquidónico (mol%)		I/S	
	Desarrollo de tumor incipiente	Desarrollo de tumor avanzado	Desarrollo de tumor incipiente	Desarrollo de tumor avanzado	Desarrollo de tumor incipiente	Desarrollo de tumor avanzado
	Rata 12	Rata 5	Rata 12	Rata 5	Rata 12	Rata 5
Sección morfológicamente normal	15.20 ± 0.33	15.08 ± 0.30	29.95 ± 0.28	26.46 ± 0.38	1.55 ± 0.03	1.62 ± 0.03
Sección tumoral	15.88 ± 0.49	21.34 ± 0.25	28.05 ± 0.08	14.12 ± 0.30	1.56 ± 0.02	1.24 ± 0.02

Análisis estadísticos

Análisis de Varianza de una vía para peso

One Way Analysis of Variance

miércoles, febrero 23, 2022, 03:04:50 p. m.

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.580)

Equal Variance Test: Passed (P = 0.864)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
Control	6	0	514.167	53.731	21.935
Control w-L	6	0	469.167	33.247	13.573
STZ	5	0	413.000	38.425	17.184
STZ + w-L	13	0	461.154	43.195	11.980

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	28317.308	9439.103	5.086	0.007
Residual	26	48257.359	1856.052		
Total	29	76574.667			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0.007).

Power of performed test with alpha = 0.050: 0.790

Multiple Comparisons versus Control Group (Bonferroni t-test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	P	P<0.050
Control vs. STZ	101.167	3.878	0.002	Yes
Control vs. STZ + w-L	53.013	2.493	0.058	No
Control vs. Control w-L	45.000	1.809	0.246	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

Análisis de Varianza de una vía para el Estado 3 mitocondrial

One Way Analysis of Variance

viernes, febrero 11, 2022, 11:44:51 a. m.

Data source: Data 1 in Notebook1

Normality Test (Kolmogorov-Smirnov) Passed (P = 0.357)

Equal Variance Test: Failed (P < 0.050)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

viernes, febrero 11, 2022, 11:44:51 a. m.

Data source: Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
CN	29	0	271.656	195.378	335.724
CN-O	26	0	223.296	148.242	265.974
STZ	19	0	163.008	123.504	219.600
STZ-O	22	0	201.006	144.495	286.545
PEQUEÑOS	4	0	101.886	44.739	167.907
GRANDES	6	0	53.346	35.982	62.568
EXTRA GRANDE 4	4	0	16.440	14.181	17.628

H = 42.598 with 6 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0.05
CN vs EXTRA GRANDE	73.810	4.338	Yes
CN vs GRANDES	67.644	4.728	Yes
CN vs PEQUEÑOS	52.310	3.075	Yes
CN vs STZ	30.100	3.197	Yes
CN vs STZ-O	17.356	1.924	No
CN vs CN-O	16.349	1.898	Do Not Test
CN-O vs EXTRA GRANDE	57.462	3.354	Yes
CN-O vs GRANDES	51.295	3.551	Yes
CN-O vs PEQUEÑOS	35.962	2.099	No
CN-O vs STZ	13.751	1.428	Do Not Test
CN-O vs STZ-O	1.007	0.109	Do Not Test
STZ-O vs EXTRA GRANDE	56.455	3.256	Yes
STZ-O vs GRANDES	50.288	3.423	Yes
STZ-O vs PEQUEÑOS	34.955	2.016	Do Not Test
STZ-O vs STZ	12.744	1.276	Do Not Test
STZ vs EXTRA GRANDE	43.711	2.491	No
STZ vs GRANDES	37.544	2.513	Do Not Test
STZ vs PEQUEÑOS	22.211	1.266	Do Not Test

PEQUEÑOS vs EXTRA GRANDE	21.500	0.953	Do Not Test
PEQUEÑOS vs GRANDES	15.333	0.745	Do Not Test
GRANDES vs EXTRA GRANDE	6.167	0.299	Do Not Test

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

Ánalsi de Varianza para estado 4 mitocondrial

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

viernes, febrero 11, 2022, 11:25:16 a. m.

Data source: Data 1 in Notebook1

Group	N	Missing	Median	25%	75%
CN	29	0	151.680	119.268	180.996
CN-O	26	0	119.040	110.058	152.580
STZ	19	0	124.704	101.964	186.120
STZ-O	22	0	158.142	122.772	205.356
PEQUEÑOS	4	0	78.168	30.510	136.644
GRANDES	6	0	36.534	31.005	45.882
EXTRA GRANDE	4	0	13.038	12.303	13.683

H = 33.605 with 6 degrees of freedom. (P = <0.001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0.05
STZ-O vs EXTRA GRANDE	67.273	3.880	Yes
STZ-O vs GRANDES	60.939	4.148	Yes
STZ-O vs PEQUEÑOS	39.023	2.251	No
STZ-O vs CN-O	16.003	1.732	Do Not Test
STZ-O vs STZ	12.352	1.236	Do Not Test
STZ-O vs CN	4.428	0.491	Do Not Test
CN vs EXTRA GRANDE	62.845	3.694	Yes
CN vs GRANDES	56.511	3.950	Yes
CN vs PEQUEÑOS	34.595	2.033	Do Not Test
CN vs CN-O	11.576	1.344	Do Not Test
CN vs STZ	7.924	0.842	Do Not Test
STZ vs EXTRA GRANDE	54.921	3.130	Yes
STZ vs GRANDES	48.588	3.253	Yes

STZ vs PEQUEÑOS	26.671	1.520	Do Not Test
STZ vs CN-O	3.652	0.379	Do Not Test
CN-O vs EXTRA GRANDE	51.269	2.993	No
CN-O vs GRANDES	44.936	3.110	Do Not Test
CN-O vs PEQUEÑOS	23.019	1.344	Do Not Test
PEQUEÑOS vs EXTRA GRANDE	28.250	1.252	Do Not Test
PEQUEÑOS vs GRANDES	21.917	1.064	Do Not Test
GRANDES vs EXTRA GRANDE	6.333	0.308	Do Not Test

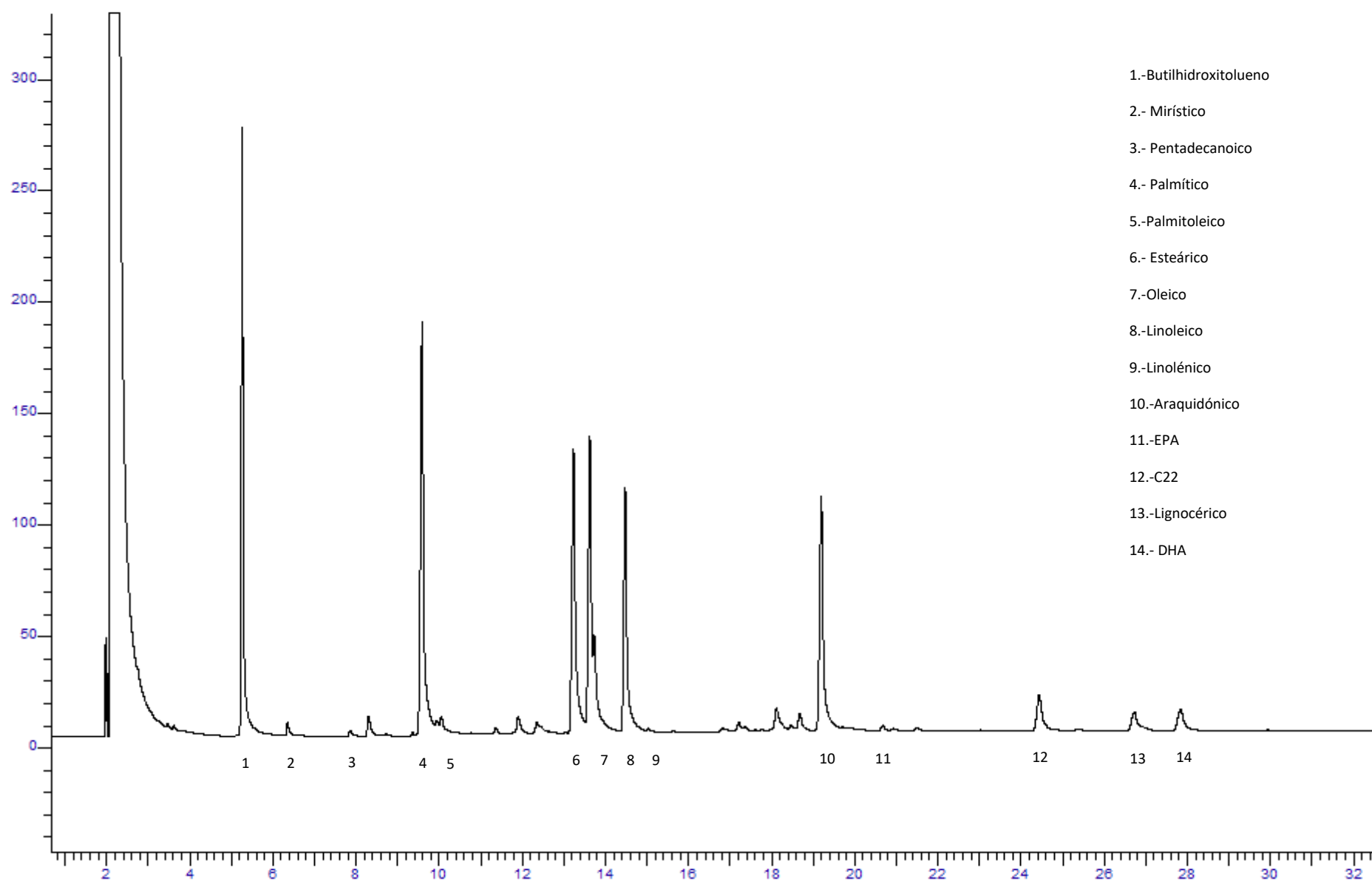
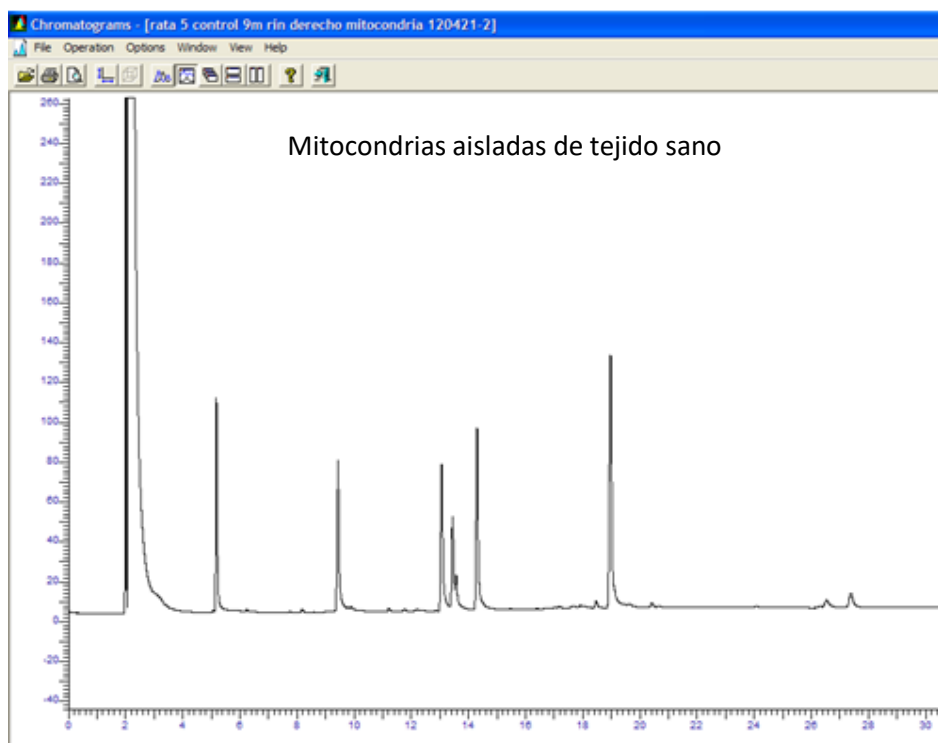


Figura 12. Cromatograma (cromatografía de gases) de mitocondrias aisladas de tejido tumoral

a)



b)

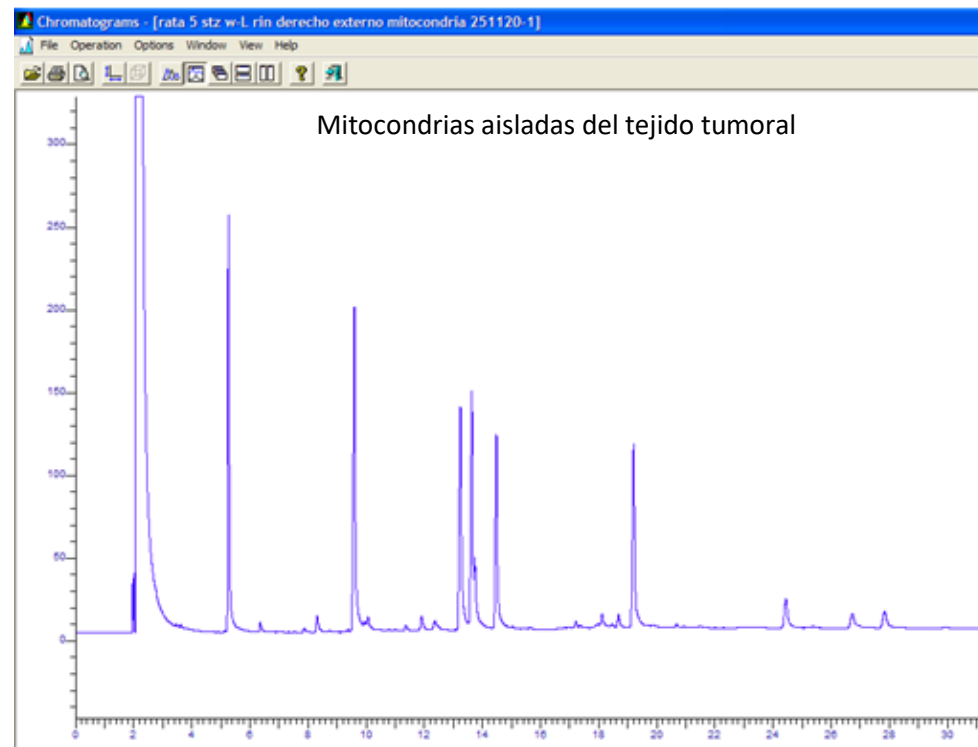


Figura 13. Cromatogramas (cromatografía de gases) de mitocondrias aisladas de tejido renal sano (a) y mitocondrias aisladas de tejido renal tumoral (b).