UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFECTO DE LA INGESTA DE ACEITES VEGETALES REUTILIZADOS PARA LA COCCIÓN SOBRE LOS FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

YUKARI KOMERA ARENAS

MÉXICO, D.F. **2012**

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero
Vocal	Prof. Oscar Armando Pérez Méndez
Secretario	Profa. Martha Patricia Neri Páez
1er. Suplente	Profa. Luz María del Rocío Valdés Gómez
2º. Suplente	Profa. Teresa Neri Gómez

Sitio en donde se desarrolló el tema: Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Departamento de Biología Molecular.

Dr. Óscar Armando Pérez Méndez
Asesor del tema

Yukari Komera Arenas
Sustentante

AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA (CONACYT) POR EL APOYO OTORGADO DURANTE EL DESARROLLO DEL ESTE TRABAJO CON No. DE EXPEDIENTE 6549 y No. DE CONVENIO 8309.

A mi madre, por darme la vida, acompañarme y apoyarme incondicionalmente en cada etapa de mi desarrollo.

A mi hermana, por brindarme su cariño y por ser mi ejemplo a seguir.

A mi padre, por su interés y apoyo.

Al Dr. Óscar Pérez, por abrirme las puertas de su laboratorio, compartir sus conocimientos, su paciencia, tiempo y constante orientación.

A la Dra. Marta Franco, por su apoyo, interés, ayuda y conocimientos en todo momento.

A la Dra. Rocío, por enseñarme, transmitirme sus conocimientos y orientación.

A Mariana, por compartir su experiencia, conocimiento en cada experimento, ayudarme cuando me enfermaba y brindarme su amistad.

A Ezequiel, por ayudarme con mis grupos de ratas, por su cooperación nutricional de las mañanas y por su amistad.

INDICE

Página

RESUMEN…….……..7

ANTECEDENTES…….....8

1. Lípidos……..…....8

1.1 Digestión, absorción y transporte…….....9

1.2 Metabolismo intracelular……..11

1.3 Lipoproteínas……....13

1.4 Clasificación de las lipoproteínas…….....15

2. Metabolismo de la HDL…….....17

3. Relación de las lipoproteínas en el desarrollo de ateroesclerosis……...19

4. Aceites vegetales comestibles…….....20

5. Modificación estructural en los aceites vegetales y productos por efecto de la temperatura…….....22

5.1 Toxicidad de los productos formados por el efecto de la temperatura en los aceites……...24

HIPÓTESIS……....27

OBJETIVO GENERAL……..28

OBJETIVOS PARTICULARES……28

MATERIALES Y MÉTODOS…….…..29

Animales……29

Preparación del aceite reutilizado……..29

Medición de la presión arterial…….....29

Monitoreo del peso corporal……..30

Consumo calórico……..30

Recolección de muestras…….....31

Extracción de la grasa visceral…….....32

Análisis de laboratorio…….....32

Cálculo del índice HOMA-IR…….....32

Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL……..33

Cálculo del colesterol de LDL……33
Determinación de la función endotelial…….....34
Inmunohistoquímica……..35
Estudio histológico……36
Análisis estadístico……37
RESULTADOS…….....38
1. Monitoreo del peso corporal……...38
2. Peso de la grasa visceral presente en los grupos tratados……...39
3. Monitoreo del consumo calórico…….....39
4. Monitoreo de la presión arterial……..41
5. Función endotelial…….....42
6. Inmunohistoquímica…….....43
7. Perfil de lípidos…….....44
8. Composición química de las HDL……45
9. Distribución de tamaños de las subclases de HDL…….....46
10. Ácidos grasoso libres…….....47
11. Determinación de la concentración plasmática de glucosa e insulina……....49
12. Evaluación de la resistencia a la insulina……...50
13. Estudio histológico…….....51
DISCUSIÓN……...53
BIBLIOGRAFÍA……....59
ANEXO 1……...64
ANEXO 2……...66
ANEXO 3……...68

RESUMEN

Los aceites vegetales, en particular los que contienen una proporción de ácidos grasos poliinsaturados, al ser calentados para la cocción de alimentos generan niveles elevados de acidos grasos *trans*, productos aldéhicos tóxicos, entre otros.

Se ha sugerido que cada uno de estos compuestos pueden promover inflamación, hiperglucemia, resistencia a la insulina o incrementar el riesgo cardiovascular. Sin embargo, no se conocen con precisión los efectos nocivos que pueden tener de los aceites reutilizados sobre el metabolismo lipídico y de carbohidratos. Por esta razón se determinó si existe algún efecto al consumir aceites vegetales reutilizados sobre la predisposición al desarrollo de factores de riesgo cardiovascular y/o alteraciones metabólicas.

Para generar el aceite reutilizado, se frió la masa nixtamalizada a una temperatura de 190 - 200 °C durante 10 minutos. Este proceso se realizó una vez (aceite de un ciclo) o diez veces (aceite de 10 ciclos). Estos aceites se adicionaron al alimento habitual de las ratas y se les administraron a 2 grupos independiente de ratas Wistar macho durante 10 semanas. Se incluyó un grupo de comparación que recibió aceite crudo y un grupo control sin suplementar. Nuestros resultados muestran que el peso corporal promedio, la cantidad de grasa visceral, el consumo calórico, son significativamente mayores en los grupos de ratas que recibieron aceite vegetal utilizado una vez y 10 veces. En los mismos grupos observamos hipertensión arterial asociada a una disfunción endotelial y a una mayor presencia de nitrotirosina en el endotelio aórtico, además de hiperglucemia que alcanzan niveles para ser considerada diabetes, así como la presencia de esteatosis hepática. En el grupo tratado con aceite vegetal crudo también presentódaños endoteliales y de resistencia a la insulina, pero de menor impacto que los grupos que recibieron aceites reutilizados. En este estudio sugiere que la utilización y reutilización de aceites vegetales para la preparación de alimentos puede exacerbar los efectos de una dieta hipercalórica. Estudios con otro tipo de aceite vegetales y que puedan ser más fácilmente extrapolables al humano permitirán establecer políticas de salud pública apropiadas para el uso culinario de los aceites

ANTECEDENTES

1.Lípidos.

Los lípidos son moléculas de diferente naturaleza química, insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos.Presentan gran diversidad estructural y funcional, forman parte de las membranas y de las lipoproteínas plasmáticas[2], además de participar como cofactores enzimáticos, agentes emulsionantes, fuente de energía, hormonas y mensajeros intracelulares, entre otros. Los lípidos más comunes en el plasma son colesterol, fosfolípidos, triacilgliceroles y ácidos grasos[1].

Los triacilgliceroles son formas de almacenamiento universales de ácidos grasos como fuente de energía en los organismos vivos. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos de cadenas de número par entre 4 y 36 carbonos [3]. En algunos ácidos grasos, estas cadenas se encuentran completamente saturadas (enlaces sencillos); en otras contienen uno o más dobles enlaces, generalmente en isomería *cis* y en ocasiones presentan radicales como grupos hidroxilo o metil.

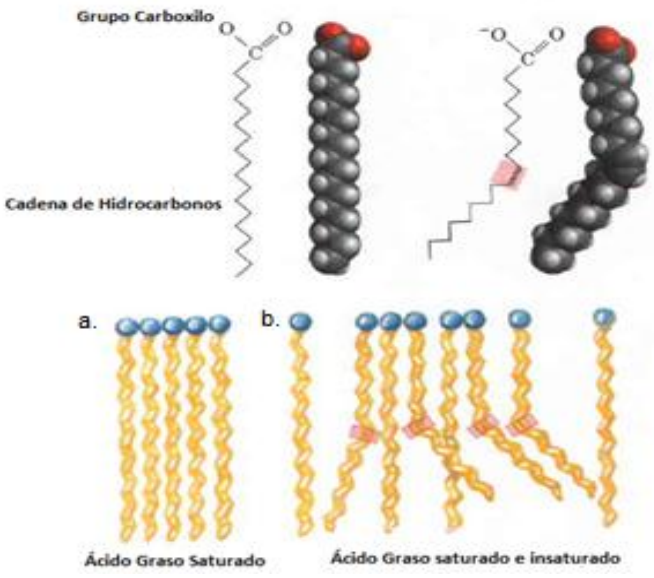


Figura 1. Ejemplos de la estructura de los ácidos grasos saturados (a) e insaturados (b).

Los ácidos grasos son componentes de lípidos más complejos como los triacilgliceroles (triacilgliceroles). Estos triacilgliceroles están estructurados por tres ésteres de ácidos grasos unidos a un glicerol.

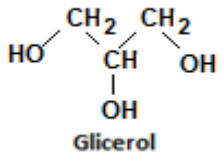


Figura 2. Estructura desarrollada del glicerol.

En los vertebrados, los triacilgliceroles se almacenan en mayor cantidad en unidades celulares especializadas denominadas adipocitos. Estos adipocitos contienen lipasas, que son las enzimas que catalizan la hidrólisis de los triacilgliceroles almacenados, obteniendo como resultado ácidos grasos que pueden ser utilizados como fuente de energía en los sitios requeridos.

1.1 Digestión, absorción y transporte.

Las células pueden obtener energía a partirde los ácidos grasos provenientes de tres fuentes:

a) Consumidas en la dieta diaria.

b) Almacenadas en las células

c) Sintetizadas en un órgano para otro.

Los triacilgliceroles proveen más de la mitad de la energía requerida para algunos órganos, particularmente, el hígado, el corazón y el músculo esquelético.

Antes de absorber los triacilgliceroles por medio de la pared intestinal, estos deben ser convertidos de partículas grasas insolubles a micelas dispersables. Dicha solubilidad es realizada por las sales biliares,que se sintetizan partir del colesterol en el hígado,

almacenadas en la vesícula biliar y liberadas en el intestino delgado posterior a la ingesta de grasas. Las sales biliares son compuestos anfipáticos, las cuales actúan como “detergentes”, para convertir las grasas de la dieta en una mezcla micelar de sales biliares y triacilgliceroles (coadyuva a la solubilidad de los lípidos formando micelas) permitiendo la acción de la lipasa pancreática que es liberada en el intestino. La lipasa pancreática hidroliza a los triacilgliceroles en monoacilgliceroles y diacilgliceroles, ácidos grasos libres y glicerol. Estos productos difunden a través de las membranas de las células epiteliales de la superficie del intestino, en donde se reconvierten en triacilgliceroles, que se integran con los fosfolípidos, para formar un grupo de partículas llamadas quilomicrones[1]. Éstos contienen apolipoproteínas (apo) tipo B-48, C-II y C-III, son transportados por el intestino hacia el sistema linfático y posteriormente a la sangre hasta llegar a los tejidos musculary adiposo. En los capilares de estos tejidos, existe una enzima extracelular denominada lipoproteína lipasa (LPL), que es activada por la apoC-II, para hidrolizar los triacilgliceroles a ácidos grasos y glicerol, los cuales son transportados por las células hacia los órganos blanco. En el músculo, los ácidos grasos son oxidados para obtener energía; mientras que en el tejido adiposo, estos ácidos grasos son reesterificados para su almacenamiento en forma de triacilgliceroles.

Los remanentes de los quilomicrones, son separados en su mayor parte en triacilgliceroles, pero aun contienen colesterol y apolipoproteínas, que se encuentran en el torrente sanguíneo hasta llegar al hígado, en donde son absorbidos por endocitosis, mediado por receptores para sus apolipoproteínas. Los triacilgliceroles que llegan al hígado por esta vía, pueden ser oxidados para obtener energía o bien ser empleados como precursores para la síntesis de VLDL o de cuerpos cetónicos [1]. Cabe señalar que no es la única ruta en que se forman las VLDL; la síntesis *de novo* a partir de los ácidos grasos libres provenientes de las lipólisis es otra fuente para la síntesis de VLDL.Estaslipoproteínas son transportadas por el torrente sanguíneo hacia el tejido adiposo, en donde los triacilgliceroles son movidos y almacenados como “gotas” de lípidos (Figura 3) o al músculo para generar energía por β - oxidación.

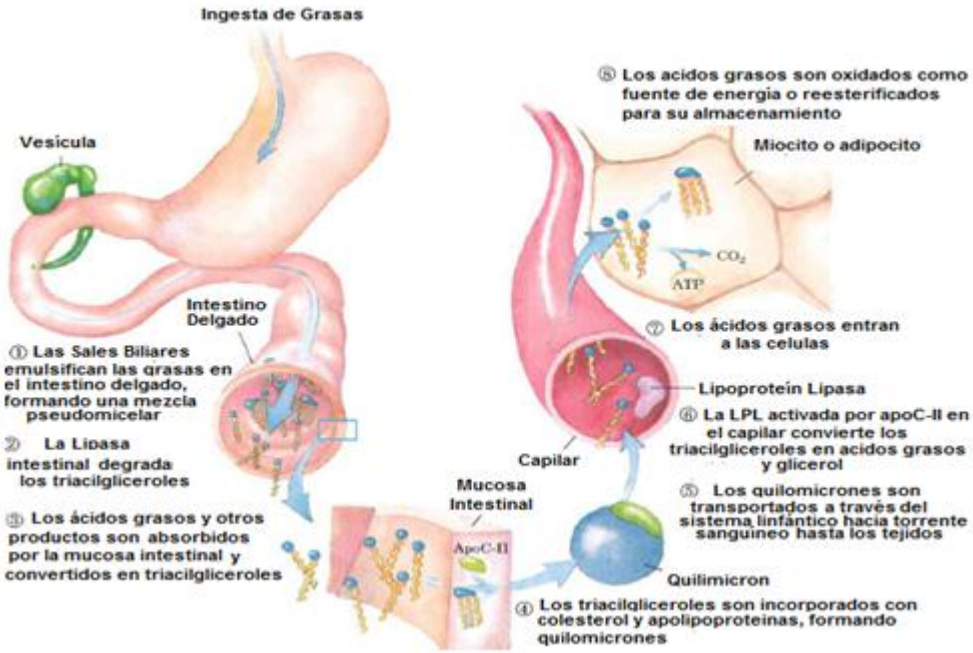


Figura 3. Mecanismo de absorción y transporte de las grasas a través del tracto digestivo.

*1.2 Metabolismo intracelular***.**

La capacidad para sintetizar o metabolizar los lípidos en los organismos es fundamental, ya que estos tienen varios papeles importantes a nivel celular, anteriormente mencionados.

Las enzimas participantes en la oxidación de los ácidos grasos se encuentran localizadas en la matriz mitocondrial. Los ácidos grasos con un cadena de 12 o menor número de carbonos pueden entrar a la mitocondria sin necesidad del uso de los transportadores de membrana propias de la célula. Cuando son de 14 o mayor número de carbonos, como es el caso de la mayoría de los ácidos grasos que se obtienen de la dieta diaria no es posible que entren a la matriz mitocondrial a través de la membrana, sin modificaciones enzimáticasprevias [2]. La primera reacción es catalizada por isoenzimas (cada isoenzima es específica para los ácidos grasos de cadena corta, mediana y larga de carbonos) presentes en la parte exterior de la membrana mitocondrial, conocidas como acil-CoAsintetasas[3], responsables de la siguiente reacción:

$$\text{ácido graso} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{acil-CoA} + \text{AMP} + \text{PPi}$$

El Acil-CoA, es un producto de alto nivel energético. Los ésteres de este producto se forman en el citosol externo de la membrana mitocondrial, los cuales a su vez pueden ser transportados a través de la membrana y ser oxidados para producir ATP, o bien pueden ser utilizados para sintetizar lípidos propios de la membrana[3]. Los ácidos grasos destinados para la oxidación en la mitocondria se unen al grupo hidroxilo de la carnitina para formar el complejo acil-carnitina. Dicha esterificación es catalizada por la acilcarnitinatransferasa I, la cual se encuentra en la membrana externa, por lo que el paso de los ácidos grasos se ve facilitado por el transportadoracil-carnitina/carnitina por difusión hacia el interior de la mitocondria. El grupo acil formado es transferido de complejo acil-carnitina a coenzima A intramitocondrial por la acilcarnitinatransferasa II. Esta isoenzima, regenera el complejo acil-CoA y deja libre la carnitina dentro de la matriz mitocondrial, la cual regresa al espacio intermembranal por medio de el transportadoracil-carnitina/carnitina (Figura 4.)

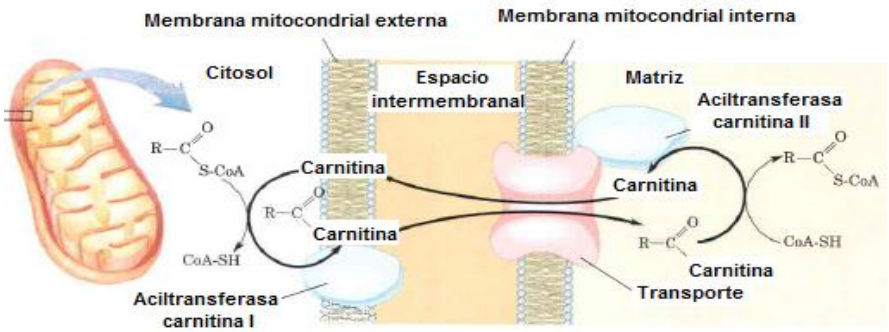


Figura 4. Mecanismo de transporte del sistema acil-carnitina/cartina en la mitocondria.

A continuación se lleva a cabo la oxidación de los ácidos grasos que consta de 2 etapas:

1. La β-oxidación (formación de unidades de acetil-CoA, producción de agentes donadores de electrones NADH y $FADH_2$)

2. Oxidación de las unidades de acetil-CoA a CO_2

La oxidación de los ácidos grasos saturados se constituye de 4 pasos:

1. Formación de unidades de trans-2-enoil-CoA, por acción de la enzimaacil-CoA deshidrogenasa, la reacción se acopla con la reducción de FAD a $FADH_2$.

2. Formación del esteroisómero de la β–hidroxiacil-CoA, catalizada por la enoil-CoAhidratasa.

3. Formación de donadores de electrones, NADH, por acción de la β-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa.

4. Formación de unidades de acetil-CoA, catalizada por una tiolasa.

Las unidades de acetil-CoA producto de la oxidación de los ácidos grasos, pueden ser oxidadas a CO_2 como producto del ciclo del ácido cítrico e intermediario en otros procesos celulares de suma importancia.

1.3 Lipoproteínas.

Las moléculas responsables del transporte de los triacilgliceroles, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol en el organismo, se denominan lipoproteínas (Fig. 5). Las lipoproteínas son complejos macromoleculares, formadas por una monocapa de lípidos anfipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), los cuales presentan sus grupos polares hacia el medio acuoso. La monocapa contiene proteínas asociadas denominadas apolipoproteínas (tabla 1), las cualesdan estabilidad a dicha estructura. En la parte interior de la macromolécula, se encuentran los lípidos no polares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol), evitando así la interacción con el medio acuoso. Estas características permiten a las lipoproteínas circular por el torrente sanguíneo[2].

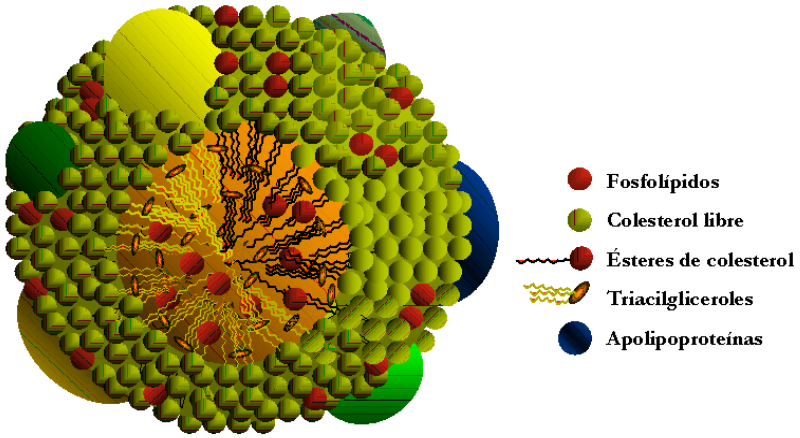


Figura 5. Esquema general de la composición de las lipoproteínas. Se muestran los lípidos hidrofóbicos del núcleo, en su superficie los lípidos antipáticos y las apolipoproteínas que estabilizan a la lipoproteína.

Diferentes apolipoproteínas y sus principales características (Tabla 1).

Tabla 1. Características de las apolipoproteínas[1].

Apo	PM	P.I.	Localización	Sitio de síntesis	Conc. plasmática (mg/dL)	Función
A-I	29,016	5.9-5.4	HDL, Qm	Intestino Hígado	100-150	Principal componente de las HDL, activador de LCAT, estimula el eflujo del colesterol.
A-II	14,414	5.0	HDL	Intestino Hígado	30-50	Principal proteína componente de HDL, inhibidor de LH y de la LCAT.
A-IV	44,465	5.5	HDL, Qm	Intestino	15	Activador de LCAT, modulador de LPL y estimula el eflujo de colesterol.
B-100	512,72	-	VLDL, LDL	Hígado	80-100	Ligando para receptor

	3					de LDL
B-48	240,800	6.8	Qm	Intestino	--	Proteína estructural de los Qm.
C-I	6,630	7.5	HDL, VLDL, Qm	Hígado	4-6	Activador de LCAT, inhibe la captación hepática de Tg.
C-II	8,900	4.9	HDL, VLDL, Qm	Hígado	3-5	Activador LPL, inhibición de la captación hepática de Lp-apo B-100.
$C\text{-}III_{0,1,2}$	8,800	4.5-5.0	HDL, VLDL, Qm	Hígado	12-14	Inhibidor de la LPL
$E_{2,3,4}$	34,145	6.0-5.7	VLDL, HDL	Hígado	3-5	Ligando de receptor de LDL y de residuos de Qm, estimula el eflujo de colesterol.

Lp: Lipoproteína, Tg: Triacilgliceroles, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Qm: Quilomicrones, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, LCAT: Lecitina: colesterol aciltransferasa, LPL: Lipoproteína lipasa, LH: Lipasa hepática.

1.4 Clasificación de las lipoproteínas.

Las lipoproteínas se pueden clasificar en base a diferentes propiedades, tales como su densidad de flotación, movilidad electroforética y contenido de apolipoproteínas.

a) De acuerdo a su densidad se conocen cinco clases:

- Quilomicrones (Qm): Son de mayor tamaño y menor densidad, d < 0,94 g/mL. Tienen un alto contenido en triacilgliceroles y sus apolipoproteìnas son B-48, A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E.

- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, VeryLowDensityLipoproteins): 0,94 < d < 1,006 g/mL. Contienen principalmente triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

- Lipoproteínas de densidad intermedia (IDL, Intermedie DensityLipoproteins): 1,006 < d < 1,019 g/mL. Estas partículas contienen colesterol y triacilgliceroles, apo B-100, C-I, C-II, C-III y E.

- Lipoproteínas de baja densidad (LDL, LowDensityLipoproteins): 1,019 < d < 1,063 g/mL. Tienen un alto contenido en colesterol y apo B-100.

- Lipoproteínas de alta densidad (HDL, High DensityLipoproteins): 1,063 < d < 1,210 g/mL. Estas partículas tienen un alto contenido en proteínas y fosfolípidos, además de colesterol. Su principal apolipoproteína es A-I, así como A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III y E. Las HDL, a su vez, pueden ser separadas en 2 subpoblaciones:

  - HDL_2: 1.063 < d < 1.120 g/mL.

  - HDL_3: 1.120 < d < 1.210 g/mL.

b) Por su migración electroforética se tienen tres tipos de lipoproteínas: α, β y pre-β.

c) De acuerdo al contenido en apolipoproteínas se conocen dos poblaciones:

♦ Las lipoproteínas que contienen apo A-I: Lp A-I y Lp A-II: En esta clasificación podemos encontrar a las HDL.

- Las lipoproteínas que contienen apo B: Lp B; Lp B: E; Lp B: C-III y Lp B: C-III: E. En esta clasificación podemos encontrar a las VLDL, IDL, LDL y los Qm.

Tabla 2. Propiedades de las lipoproteínas plasmáticas [2].

Lp	Mov. Electro-forética	Tamaño (nm)	Cont. deProt. (%)	Cont. de Plp (%)	Cont. de Tg (%)	Cont. de CL (%)	Cont. de CE (%)
Qm	Origen	>70	1-2	3-6	90-95	1-3	2-4
VLDL	Pre-beta	30-70	6-10	15-20	45-65	4-8	5
IDL	Pre-beta beta	20-30	20	30	35	35	
LDL	Beta	18-30	18-22	18-24	4-8	6-8	45-50
HDL	Alfa	5-12	45-55	26-32	2-7	3-5	15-20

Qm: Quilomicrones, VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad, IDL: Lipoproteínas de densidad intermedia, LDL: Lipoproteínas de baja densidad, HDL: Lipoproteínas de alta densidad, Plp: fosfolípidos, Triacilgliceroles, Prot: proteína, Col: colesterol.

2. Metabolismo de las HDL

El transporte reverso del colesterol (TRC) se define como el regreso del exceso de colesterol proveniente de las células periféricas hacia el hígado para su excreción o reciclaje, mecanismo en el cual participan las HDL, confiriéndoles propiedades antiaterogénicas, ya que por medio de este pueden evitar la formación de la placa ateromatosa[4].

La primera etapa del TRC (Fig.6) es el eflujo de colesterol a través de diversos mecanismos de las células hacia las HDL pequeñas, tipo pre-β o HDL_3. Una vez que el colesterol se encuentra en las HDL es esterificado por la enzima plasmática

lecitincoleterolaciltransferasa(LCAT) y posteriormente se internaliza, dando origen a HDL de mayor tamaño y menos densas, tipo HDL_2. A partir de ahí, el colesterol esterificado puede tomar dos caminos: 1) Puede ser eliminado directamente de la lipoproteína por un mecanismo en el cual interviene el receptor hepático SR-BI, que remueve de manera selectiva los ésteres de colesterol, generando partículas pequeñas, HDL_3, capaces de reiniciar el ciclo de captación de colesterol y, 2) por medio de diversas reacciones de transferencia, en las que intervienen la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), el colesterol de las HDL_2 es intercambiado por triacilgliceroles con lipoproteínas ricas en apo B como VLDL e IDL, por una parte y por la otra, las aposC's y E pasan a los quilomicrones y VLDL. Los triacilgliceroles captados por las HDL_2 son hidrolizados por la lipasa hepática (LH), y en asociación con la actividad de la proteína de transferencia de fosfolípidos (PLTP) los remanentes de HDL son remodelados en partículas pre-β y HDL_3, ambas con la capacidad de reiniciar el ciclo. Es así como el colesterol de los tejidos periféricos llega al hígado para ser reciclado o excretado a través de las vías biliares.[5] (Fig.6).

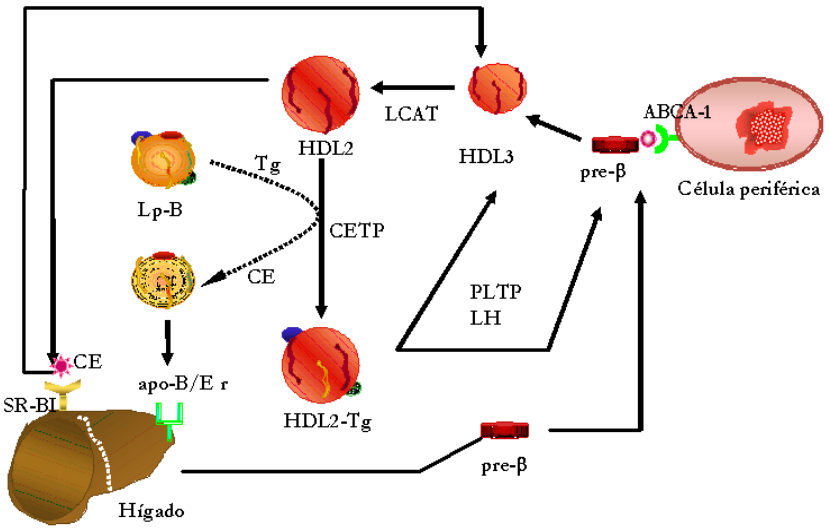


Fig. 6. Transporte Reverso del Colesterol. Lp-B: Lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad, LDL. lipoproteínas de baja densidad y Qm, Quilomicrones). Tg: triacilgliceroles; LCAT: Lecitina colesterol acilo transferasa; LH: Lipasa hepática; CETP: Proteína de transferencia de ésteres de colesterol; PLTP: Proteína de transferencia de fosfolípidos; SR-BI: Receptor scavenger BI; ABCA-1: Transportador de membrana dependiente de ATP.

3. Relación de las lipoproteínas con el desarrollo de la ateroesclerosis.

La función de las lipoproteínas es fundamental en la homeostasis metabólica de los ácidos grasos, sin embargo, al presentar un desequilibrio de la misma puede ser el punto inicial para el desarrollo de enfermedades cardiacas. Una de las principales, es la enfermedad ateroesclerosa coronaria (EAC) [6], la cual puede comenzar con la infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial en dónde, al existir un ambiente de estrés oxidativo, ocurre una peroxidación de los lípidos contenidos en las LDL. Las LDL oxidadas son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio vascular y se transforman en macrófagos, que son capaces de fagocitar las LDL oxidadas a través de receptores denominados "scavanger". La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos, tiene como consecuencia un acúmulo de éstos en el citoplasma del macrófago, al cual se le denomina célula espumosa. Antes de morir, las células espumosas liberan una gran cantidad de citocinas que estimulan al endotelio vascular para que sintetice más adhesinas, exacerbando así el proceso inflamatorio. Las células espumosas constituyen las etapas tempranas de formación del ateroma (Fig. 7).

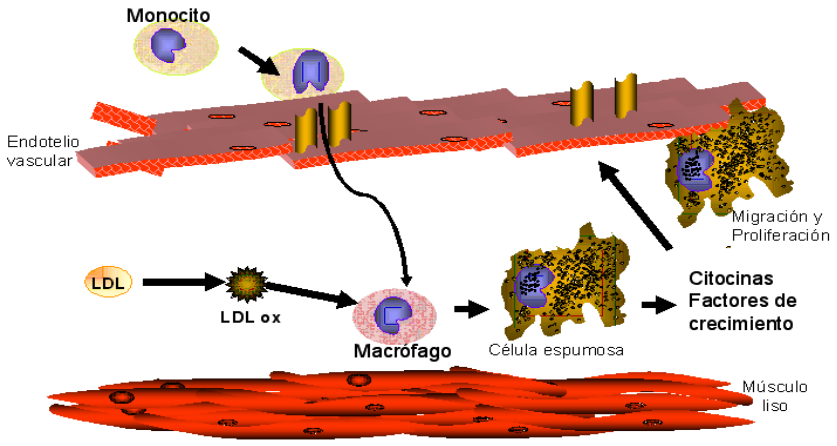


Fig. 7. Esquema de las primeras etapas en la formación de la placa ateromatosa. En zonas donde existe disfunción endotelial se facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, donde sufren procesos de modificación, generando LDL oxidadas (LDLox). Los monocitos se adhieren al endotelio activado que sobreexpresa moléculas de adhesión. Los monocitos circulantes, atraídos, penetran en la pared y son diferenciados a macrófagos. Los macrófagos captan LDLox y se transforman en células espumosas. Las células musculares lisas de la media, activadas por citocinas y factores de crecimiento liberados en las lesiones, migran a la íntima y proliferan contribuyendo a la evolución de las lesiones.

Diversos estudios han demostrado la correlación inversa que existe entre la concentración plasmática del colesterol de las HDL (C-HDL) y el riesgo de desarrollar EAC, lo que sugiere una asociación causal entre ambos [7]. A partir de esta correlación negativa, se ha postulado que las HDL desempeñan una función antiateroesclerosa. Uno de los mecanismos por medio del cual las HDL evitan la formación del ateroma, es el transporte reverso de colesterol (TRC), previamente descrito, además de otros mecanismos antiaterogénicos de las HDL, tales como sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.

4. Aceites vegetales comestibles.

Los aceites vegetales comestibles tiene una función vital en nuestro organismo, constituyen una de las más importantes fuentes de energía dispensable,contribuyen a mantener el equilibrio de lípidos, colesterol y lipoproteínas que circulan en sangre, proporcionan vitaminas A, D, E, y K y ácidos grasos esenciales. Tienen la capacidad de resaltar muchas de las características sensoriales de los alimentos, como el sabor, el aroma y la textura. Precisamente por ser un nutrimento fundamental, el ser humano ha utilizado todo su ingenio para buscar más y mejores oleaginosas [8].

El siglo XX es un período de intensificación y diversificación del comercio mundial de oleaginosas, con la cual la alimentación también se transforma de una forma significativa, de manera que se puede decir que hay una revolución de los hábitos alimenticios. Con los aceites vegetales se prepara una enorme gama de alimentos aromáticos y nutritivos que van desde aceites líquidos para condimentar alimentos hasta llegar al uso generalizado de las pastas proteínicas que se utilizan en la ganadería [8].

Tabla 3.Principales aceites vegetales comestibles y sus características [8].

Nombre	Fuente	Usos principales
Aceite de algodón	Semilla de algodón	Condimento para ensaladas, cocinas,

	(*Gossypiumspp.*)	en mayonesa, sustituto de la manteca de cacao, pastelería, productos horneados, en frituras y mezcla de aceites.
Aceite de aguacate	Pulsa del fruto del árbol de aguacate (*Persea americana*)	Condimento para ensaladas, cocinar, cosméticos
Aceite de cacahuate	Semilla del cacahuate (*Arachishypogaea*).	Condimento para ensaladas, cocinar y freír.
Aceite de cártamo	Semilla de cártamo (*Carthamustinctorius*).	Condimento para ensaladas, cocinar y freír, mayonesas
Aceite de coco	Pulpa o copra del fruto del cocotero (*Cocos nucifera*)	Repostería y pastelería, mantecas duras y sustituto de manteca de cacao.
Aceite de girasol	Semilla de girasol (*Helianthusannus*)	Condimento para ensaladas y otros platillos, para cocinar y freír, bases para margarinas y mantecas vegetales, panadería y repostería
Aceite de maíz	Germen del maíz (*Zea mays*)	Condimento para ensaladas y otros platillos, cocinar, margarinas, en mayonesas, panadería y repostería.
Aceite de oliva	Fruto del olivo (*Olea europea*).	Condimento para ensaladas, cocinar y freír, en embutidos y enlatados de pescado.
Aceite de palma	Fruto de la palma (*Elaeeisguineensis*).	En mantecas vegetales, margarinas, pastelería, helados, en frituras, mezclas para sopa, repostería, en mantequillas, pastas.

Aceite de soya	Frijol de soya (*Glycinemax*)	En frituras, comida rápida, condimento para ensaladas, cocinar, en mezclas de aceites, panadería, repostería, cremas vegetales, salsas, pastas y mayonesas.

Uno de los aceites vegetales más usados en México, y que se utilizó en el presente estudio, es el aceite de canola.

Tabla 4. Características del aceite de canola[8].

Apariencia	Datos	Composición Química
Cristalina	-Se obtiene del cártamo, maíz, ajonjolí, girasol, algodón, soya, oliva y canola principalmente. -Por extracción mecánica y/o solventes orgánicos. -El aceite refinado y deodorizado, tiene un color amarillo claro. -Alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados.	Contiene el 7 % de ácidos grasos saturados, como: - Ácido palmítico (saturado) -Ácido esteárico (saturado) Así como: - Ácido oleico (monoinsaturado), el 61 % - Ácido linoléico (poliinsaturado), el 21 % -Ácido linolénico (poliinsaturado), el 11 % Ácidos grasos libres < 0.05%

5. Modificación estructural en los aceites vegetales y productos por efecto de la temperatura.

La mayoría de las grasas, tales como aceites vegetales, productos de uso común y grasa animal, son mezclas de triacilgliceroles. Estos lípidos están compuestos de ácidos grasos de cadenas de número variable de carbonos y grado de saturación. Los aceites vegetales están

compuestos por varios triacilgliceroles con ácidos grasos insaturados y en consecuencia, son líquidos a temperatura ambiente. Sin embargo los triacilgliceroles compuestos por ácidos grasoso saturados, como el triestearin-glicerol (componente mayor de la grasa en la carne), la cual es sólida a temperatura ambiente.

Cuando la comida rica en grasa es expuesta a intervalos largos en un ambiente con oxígeno, este adquiere un sabor agrio y por lo tanto se le da el término de "rancio". Dicho sabor y olor está relacionado con la producción de aldehídos y ácidos carboxílicos de cadena más corta y de mayor volatilidad. Para alargar la vida media e incrementar la estabilidad de los aceites vegetales utilizados para cocinar alimentos, son sometidos a un proceso parcial de hidrogenación. Este proceso convierte a varios dobles enlaces que se encuentran en posición *cis* de los ácidos grasos en enlaces sencillos, dándoles una temperatura de fusión mayor y una estructura más sólida. O bien, estos mismos dobles enlaces modifican su configuración *cis* a una *trans.*En la actualidad se tiene evidencia de que el consumo de ácidos grasos *trans* incrementa la incidencia de enfermedades cardiovasculares y viceversa. [9].

Muchos alimentos llamados "comida rápida" son fritos en aceites vegetales parcialmente hidrogenados, los cuales contienen niveles elevados de ácidos grasos*trans*. Estas grasas o aceites, son calentados a altas temperaturas durante varios procedimientos para preparar alimentos, principalmente alfreírlos. Ya que este método da una textura crujiente, con mayor sabor y un color café-dorado a los alimentos. El efecto de freír sobre el contenido proteínico o mineral en los alimentos por general no sufre ningún cambio o bien, este es mínimo. Sin embargo, el someter a este proceso los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, por sus siglas en inglés) genera niveles elevados de aminas heterocíclicas como, *trans*-2-alquenales, *trans*, *trans* -alca-2-,4-dienales, *cis, trans*-alca-2,4 dienales y *n*-alcanales. Se ha demostrado que compuestos con una estructura básica *trans*-2-alquenal, producto del calentamiento de los ácidos grasos, induce una autooxidación de los PUFAs[10] o productos aldéhicos tóxicos respectivamente, así como incrementar la fragmentación de precursores de hidroperoxidinas conjugados, los cuales se absorben favorablemente en el intestino[11].Algunos aldehídos como el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) que se forma a partir de los AG ω-6, se han relacionado con ateroesclerosis, en enfermedad de Alzheimer, cirrosis, diabetes y ciertos tipos de cáncer [12], pero la información es escasa y poco contundente. Durante el proceso de calentamiento a

altas temperaturas por periodos cortos puede causar una perdida menor de vitaminas termolábiles que otras. Por otro lado, algunos ácidos grasos insaturados y vitaminas antioxidantes se pierden durante la oxidación de los mismos o bien al freír los alimentos [11]. En otros estudios se ha observado que el color café y el sabor característicos de los alimentos cocidos a altas temperaturas con aceite, son producto de los compuestos originados por una reacción, llamada reacción de Maillard (entre un carbohidrato y un amino ácido) o bien que dicho proceso genera compuestoscomo la acrilamida y aminas heterocíclicas, los cuales son potentes carcinógenos[13]. También se han observado la presencia de otros productos derivados del calentamiento de los aceites en donde sus ácidos grasos insaturados cuentan con cadenas de 18 carbonos. Éstos son monómeros cíclicos de ácidos grasos (CFAM, por sus siglas en inglés). Los ácidos grasos cíclicos que se generan a partir del ácido oleico (18:1) son al menos 8 diferentes moléculas con anillos de 5 a 6 átomos de carbono [14]. Trece moléculas similares se forman a partir del ácido linoléico (18:2) [15], mientras que el ácido **α**-linolénico (18:3) da lugar 16 AG cíclicos identificados [16-18]. Al parecer, los CFAM ejercen de forma específica efectos en el metabolismo de carbohidratos y en el de los ácidos grasos insaturados. [14].

Un consumo crónico de estos alimentos tratados ha demostrado una aceleración en el padecimiento o complicación de enfermedades cardiovasculares tanto en animales como en humanos con diabetes y un posible favorecimiento en el desarrollo de las mismas. [13].

5.1 Toxicidad de los productos formados por el efecto de la temperatura en los aceites.

La historia del estudio de la relación entre la dieta y los padecimientos cardiacos es transcendente. Una de las principales afecciones es la EAC[1], su presencia va en aumento en casi todo el orbe y cada año es responsable de incontables muertes y de una cuota enorme de invalidez en los sobrevivientes de infartos cardiacos. Se sabe que en la ateroesclerosis intervienen características personales como la edad y el sexo, entre otras, al lado de conductas como la alimentaria y la del ejercicio físico. Sin embargo, no es más que una forma de expresar lo que es una ley natural: *en todo fenómeno biológico se combinan en una u otra proporción las características genéticas con los factores ambientales*[19].

En la actualidad, el estilo de vida occidental se caracteriza por el consumo de alimentos fritos a altas temperaturas, debido a las características del sabor y la textura. Sin embargo, se ha demostrado que dicho tratamiento a los alimentos puede generar componentes dañinos que promuevan inflamación, hiperglucemia, resistencia a la insulina, daño cardiovascular, entre otras [13].

Aparentemente, una reacción severa de estrés se enfoca a una sobrecarga metabólica, ocasionando ciclos dañinos que podrían incrementar una disfunción orgánica. Una hipertrofia en los adipocito, facilita la apoptosis, la cual se enfoca a una reacción inflamatoria. La incapacidad del tejido adiposo para almacenar las grasas consumidas, origina depósitos de estas mismas en otros órganos, mayormente en el hígado, teniendo consecuencias como la resistencia a la insulina.[20]. También se ha observado una relación entre el desarrollo y/o padecimiento de diabetes mellitus con enfermedades hepáticas como esteatosis o esteatohepatitis en humanos [25]. Por otro lado, la relación entre una dieta alta en grasas con necrosis hepática en ratas y daño renal [26]. Una alimentación acompañada con estrés oxidativo, particularmente cuando ésta se basa en una ingesta excesiva de grasas y/o diversos macronutrientes sin un balance con el consumo de alimentos ricos en antioxidantes, puede contribuir con marcadores de inflamación atribuidos a la obesidad [20]. Aunque cabe señalar que dicha activación depende la respuesta del organismo a nivel físico, químico, biológico, así como a factores ambientales como, las costumbres, hábitos, vida cotidiana, medio ambiente, etc. Sin embargo se ha observado en modelos animales con un consumo elevado de grasas, desarrollo de algunos factores de estrés [21], dando una posible relación entre la dieta y factores de riesgo en la salud del organismo.

Otro de los factores de gran riesgo relacionados con las enfermedades cardiovasculares es la hipertensión.Se maneja la hipótesis de la relación entre una alta presión arterial con un desequilibrio entre la cantidad de especies antioxidantes y especies reactivas de oxígeno (ROS)[24]. Uno de los mecanismos propios del organismo que se ven afectados en consideración por dicho factor es, la función endotelial. Posiblemente esto se relacione con la reducción en la concentración de óxido nítrico (NO) o en el incremento de la desactivación basal de la pared endotelial [23]. Dichas células endoteliales son la principal fuente de producción del NO a nivel vascular, en respuesta a un estimulo vasodilatador

como la acetilcolina o estrés. Sin embargo, debemos tomar en cuenta que el NO, no es una señal única del endotelio. Aunque si contribuye en gran parte con la homeostasis en el sistema vascular o bien modulando la apoptosis y el efecto inflamatorio celular. De igual forma se ha relacionado la incidencia del síndrome metabólico con este factor, además de la intolerancia a la glucosa y/o resistencia a la insulina, obesidad, dislipidemias, hipertrigliceridemia, incremento de ácidos grasos libres y una disminución del colesterol HDL[22]. Se ha demostrado que el efecto de la insulina en el flujo sanguíneo del músculo esquelético y en la vascularización de los adipocitos, es mediado a través de la liberación del NO derivado del endotelio (el más potente vasodilatador endógeno).[23]

Por otra parte existen estudios en donde se ha relacionado la presencia y acción de la insulina sobre el metabolismo de la glucosa, proteínas y ácidos grasos, así como diferentes efectos en el sistema vascular. Principalmente, se ha observado que una elevada concentración de insulina en circulación podría ser un factor de riesgo en el padecimiento o desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Dicha elevación de la concentración de insulina surge como una compensación ocasionada por la resistencia a la misma la cual se observa en enfermedades como obesidad central, hipertensión y diabetes tipo 2 [20].

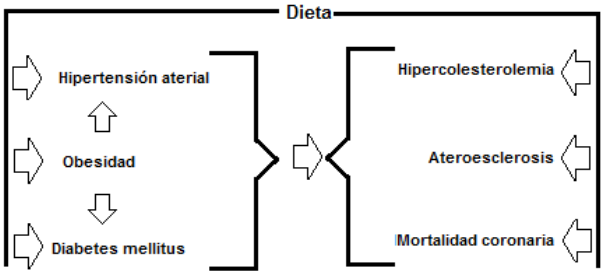


Figura 8. Posible relación de la dieta como factor común en el desarrollo de enfermedades propias del sistema cardiovascular y/o de riesgo en la formación de las mismas.

HIPÓTESIS

El consumo de aceites vegetales reutilizados favorecerádislipidemia caracterizada por hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia asociada a esteatosis hepática y resistencia a la insulina.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto del consumo de aceites vegetales reutilizados sobre el desarrollo de factores de riesgo cardiovascular y/o alteraciones metabólicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Observar el comportamiento e el consumo, peso corporal, así como de la presión arterial de cada grupo durante el tratamiento con aceite vegetal reutilizado.

- Caracterizar el perfil de lípidos en ratas incluyendo ácidos grasos libres después del tratamiento con aceite crudo, utilizado una sola vez y reutilizado 10 veces.

- Determinar si existe alguna alteración metabólica de la glucosa y la insulina en cada grupo posterior al tratamiento.

- Evaluar algún efecto en el endotelio de la aorta de rata sufrido en cada grupo después del tratamiento.

- Determinar el estado histológico de los órganos blandos y tejidos (hígado y riñón) después del tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales.

Se utilizaron ratas macho, raza Wistar de 195-200 g de peso. Se formaron 4 grupos de estudio, cada uno con 12 individuos, todos recibieron alimentación durante 10 semanas (*Laboratory Roden tDiet, LabDiet, México*). El grupo 1 recibió alimento normal, el grupo 2 fue alimentado con alimento normal más aceite vegetal crudo (sin calentar), el grupo 3 consumió alimento normal adicionado con vegetal utilizando en una ocasión (Aceite de 1 Ciclo) y el grupo 4 recibió alimento normal adicionado con vegetal utilizado 10 veces (Aceite de 10 Ciclos). El porcentaje de aceite agregado al alimento normal de los tres grupos fue del 7% [25, 26]. El peso corporal y el consumo calórico fueron controlados de manera semanal durante el tratamiento.

Preparación del Aceite Reutilizado.

Se calentó un volumen de 500mL de aceite vegetal a una temperatura entre 190°C y 200°C (a una T > 200°C, comienza a humear el aceite). Al llegar a los 190°C se agregó una porción de 50 g de masa de maíz nixtamalizada. Se dejófreír la masa durante 10 minutos aproximadamente. Se retiró la masa del aceite y se dejó enfriar a temperatura ambiente.Se separaron 250 mL del aceite (Aceite de 1 ciclo) y se calentaron nuevamente los 250 mL restantes hasta una temperatura de 190°C y menor a los 200°C. Al llegar a los 190°C se agregó una porción de masa equivalente al nuevo volumen (25 g) y se dejófreír durante 10 minutos. Se retiró la masa y se dejó enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente y se repitió este paso hasta que se cumplieron los 10 ciclos.

Medición de la Presión Arterial.

De manera semanal se realizaron mediciones de presión arterial en todos los grupos de animales, utilizando un polígrafo, calibrado a 100 mmHg antes y durante la toma de

mediciones correspondientes [26]. Las ratas fueron calentadas a 45 °C aproximadamente durante 10 a 12 minutos antes de realizar las mediciones. Se colocó un manguito en la parte superior de la cola de la rata y al final un transductor acoplado al polígrafo para registrar las mediciones. Se dejaron reposar una hora antes y una hora después de las mediciones.Esta determinación se realizó semanalmente.

Monitoreo del peso corporal.

Se colocaba una caja de acrílico sobre una báscula analítica la cual era ajustada en cero. A cada una de las ratas de los 4 grupos se colocaban de forma individual dentro de la misma caja de acrílico y se registraba el peso en gramos. En cada determinación, se ajustaba la balanza en cero.[24]. El monitoreo del peso corporal era registrada semanalmente.

Consumo calórico.

Se realizó el cálculo del aporte calórico total por gramo de alimento preparado para cada uno de los 4 grupos. Para esto se utilizó las siguientes fórmulas:

Para conocer las calorías aportadas diariamente por el alimento consumido se calculó con la siguiente fórmula:

Fórmula 1.

calorías en el alimento = alimento crudo (g) * 3.36 (cal/g) crudo (cal)

donde el “alimento crudo” corresponde a masa de alimento consumido por rata en un día. Posteriormente se calculó el aporte calórico del aceite agregado (7 % p/p) al alimento. Se utilizó la siguiente fórmula:

Fórmula 2.

$$\text{calorías aportadas por el aceite agregado (cal)} = \text{aceite agregado (g)} * 9.0 \text{ (cal/g)}$$

donde el “aceite agregado” es el total de aceite consumido por animal por día.

Con estos datos, se calculan las calorías totales consumidas por día por animal durante el tratamiento. Se utilizó la siguiente fórmula:

Fórmula 3.

$$\text{calorías totales (cal)} = \text{calorías en el alimento crudo (cal)} + \text{calorías aportadas por el aceite agregado (cal)}$$

Finalmente se calculan las calorías consumidas diariamente en cada grupo utilizado.

Fórmula 4.

$$\text{calorías consumida diariamente de cada rata en cada grupo (cal)} = \frac{\dfrac{\text{calorías totales (cal)}}{\text{alimento crudo (g)}} * \text{gramos consumidos de alimento (g)}}{\text{número de ratas de cada grupo}}$$

Este dato fue calculado diariamente durante las 10 semanas, por lo que se realizó el promedio por cada 7 días.

El valor 3.36 cal/g, se obtuvo de la información nutricional registrada en el alimento de la rata fabricado por *Laboratory Rodent Diet, LabDiet, México.*

Recolección de muestras.

Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico intraperitoneal (*Holland de México, México*) con un volumen de administración de 0.1 mL / 100 g de peso). Las muestras sanguíneas se obtuvieron por punción de la aorta abdominal, después de un ayuno de 12horas, utilizando heparina como anticoagulante (10µL/mL). El plasma se separó con

centrifugación a 3,000 rpm durante 15 minutos, inmediatamente después de ser obtenidas y fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis. Se separaron muestras en fresco para la determinación del perfil de lípidos conforme se iban obteniendo las muestras de plasma.

Posteriormente de obtener las muestras sanguíneas, se extrajo la grasa presente en la cavidad abdominal, se colocó en solución salina al 0.9%, eliminando cualquier otro tejido o residuo no correspondiente al tejido adiposo. Se lavó perfectamente, se eliminó el exceso de líquido presente y se pesó en una balanza analítica [39].

Análisis de Laboratorio.

Las concentraciones de colesterol total, triacilgliceroles, glucosa y fosfolípidos en plasma y de HDL, se determinaron mediante ensayos enzimáticos colorimétricos (*Randox Laboratories, LTD, Reino Unido*). La determinación de proteínas totales en HDL se realizó por el método de Lowry.[25] (Apéndice 1)

Las concentraciones de insulina y ácidos grasos en plasma, se determinaron mediante ensayos ELISA yenzimáticos colorimétricos comerciales (*Millipore, EUA*), respectivamente.

Cálculo del Índice HOMA-IR.

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{Concentración de insulina(mU/mL)} * \text{Concentración de glucosa (mmol/L)}}{22.52}$$

Aislamiento y análisis de subpoblaciones de HDL.

Las HDL se separaron por ultracentrifugación secuencial (*Beckman Optima TLX*) en tubos de policarbonato. Se aislaron en primer lugar las lipoproteínas que contienen apo B a una densidad menor a 1.063 g/mL, ajustado con KBr sólido, a 100,000 rpm durante 2 h 30 min. Posteriormente se aislaron las LDL ajustando con KBr sólido a una densidad de 1.19 g/mL, a 100,00 rpm durante 2 h 30 min. Posteriormente se separó el sobrenadante y lo restante del tubo se ajusta a una densidad de 1.21 mg/mL con KBr sólido, a 100,000 rpm durante 3 h. Se obtiene el sobrenadante y se coloca en otro tubo, se ajustó la densidad a 1.25 mg/mL para realizar un lavado de las HDL, a 100,000 rpm durante 3h, se separa el sobrenadante y se dializaron en una solución amortiguadora de TBE (Tris 0.09 M, ácido bórico0.08M, EDTA 3mM, pH 8.4).

Para determinar la homogeneidad y diámetro de las HDL, se realizó una electroforesis en condiciones nativas en gradiente de poliacrilamida 3-30%, utilizando como referencia marcadores de proteínas de alto peso molecular (tiroglobulina, 17 nm; ferritina, 12.2 nm; catalasa, 10.4 nm; lactato deshidrogenasa, 8.2 nm; y albúmina, 7.1 nm[27] (*Amersham GE, Reino Unido*). De esta manera, se determinó la proporción de cada subpoblación de HDL por su diámetro conocido (HDL_{2b}= 10.58-12.36 nm, HDL_{2a}= 9.94-10.58 nm, HDL_{3a}= 8.98-9.94 nm, HDL_{3b}= 8.45-8.98 nm, HDL_{3c}= 7.90-8.45 nm)[28]. Los geles fueron teñidos inicialmente para la detección de lípidos, fueron decolorados y a continuación se tiñeron todas las apolipoproteínas asociadas a las HDL con azul de Coomassie (Apéndice 2). De cada tinción se obtuvo un densintograma correspondiente a cada uno de los componentes (*Molecular Analyst Software*). Para calcular el porcentaje con el que contribuye cada subclase a la población total de HDL plasmáticas se consideró que el área bajo la curva corresponde a la población total de HDL y que las subclases pueden dividirse empleando los diámetros previamente reportados. Para calcular la concentración plasmática de los lípidos de las subclases de HDL, el porcentaje relativo de cada uno de los lípidos determinados en plasma después de separar por centrifugación las lipoproteínas que contienen apo B.

Cálculo del colesterol de LDL. (Ecuación de Friedewald).

Tomando como base la ecuación de Friedewald para el cálculo del colesterol de LDL, tenemos la siguiente ecuación:

Fórmula 5.

$$\text{Colesterol Total (mg/dL)} = \text{Colesterol de LDL (mg/dL)} + \text{Colesterol de HDL (mg/dL)} + \text{Colesterol de VLDL (mg/dL)}$$

Posteriormente considerando la fórmula para el cálculo del colesterol de VLDL, tenemos la siguiente ecuación:

Fórmula 6.

$$\text{Colesterol de VLDL (mg/dL)} = \frac{\text{Concentración de Triglicérido en plasma (mg/dL)}}{5}$$

Tomando en cuenta las ecuaciones anteriores y sustituyendo en la ecuación 1, podemos conocer la concentración del colesterol de las LDL, utilizando la siguiente ecuación:

Fórmula 7.

$$\text{Colesterol de LDL (mg/dL)} = \text{Colesterol Total (mg/dL)} - \text{Colesterol de HDL (mg/dL)} - \frac{\text{Concentración de Triglicéridos (mg/dL)}}{5}$$

Determinación de Función Endotelial.

El día del experimento, se indujo anestesia general en la rata, mediante la administración de pentobarbital sódico por vía i.p. (0.1 mL/kg) (*Holland de México, México*). Posteriormente se disecó la aorta torácica y se removió el tejido conectivo circundante, se cortaron 2anillos de 3 mm de longitud [24]. Se colocaron en una cámara para órgano aislado con 10 ml de solución de Krebs (NaCl 118.1mM, $NaHCO_3$ 25mM, KCl 4.7mM, KH_2PO_4 1.2mM, MgSO4 1.2mM, $CaCl_2$ 2.5mM D-glucosa 11.1mM a pH 7.4), con burbujeo continuo de una mezcla de O_2/CO_2 (95%,5%) a 37°C. Cada anillo aórtico se montó entre 2 ganchos de acero inoxidable, uno de los ganchos se colocó en el fondo de la cámara y el otro se colocó a un transductor de tensión, para producir una tensión de 1 g. Después de un periodo de equilibrio de 1h, la capacidad contráctil del endotelio vascular se evaluó con una curva dosis-respuesta a fenilefrina (50µM, 1mM y 100 mM). La curva dosis-respuesta a acetilcolina (50µM, 1mM

y 100 mM) fue determinada en anillos aórticos precontraidos con 3 x 10^{-6} M de fenilefrina. La vasorelajación se expresó como el porcentaje de precontracción con fenilefrina. Las contracciones fueron medidas isométricamente con un transductor de tensión FT-03 acoplado a un polígrafo modelo 7D (*Grass Medical Instruments, Quincy, MA, EUA*).

Inmunohistoquímica.

La técnica de inmunohistoquímica se basa en la especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo, que permite la identificación de una proteína (el antígeno), cuya presencia queremos demostrar, mediante su unión a un anticuerpo específico (anticuerpo primario) contra ella.

Los métodos directos de inmunohistoquímica tienen baja sensibilidad, lo que dificulta su detección, en la actualidad se usan generalmente métodos indirectos. En este caso la interacción antígeno-anticuerpo se amplifica mediante la introducción de un segundo anticuerpo marcado con biotina y ésta reacciona con un conjugado de avidina-peroxidasa, la peroxidasa es detectada finalmente mediante el método de diaminobenzidina (DAB) y H_2O_2.

En el presente trabajo se utilizó un método de inmunodetección LSAB (labelledstreptavidin-biotin) + Peroxidasa.

Después de 10 semanas los animales de los diferentes grupos tratados fueron anestesiados con pentobarbital sódico (*Holland de México, México*) con una dosis ponderal de 0.1 mL/ 100 g de peso), y después de tomar las muestras de sangre, cada una de las ratas fue canulada por aorta inferior para perfundir solución salina, lo cual nos permite eliminar resto de sangre de las arterias y posteriormente se disecó la aorta para colocarla en paraformaldehido. Posteriormente se incluyeron en parafina, se realizaron cortes de 3 mm de espesor y se colocaron en portaobjetos, los cortes se incubaron con xilol para eliminar la parafina y se procedió a hidratar el tejido con concentraciones decrecientes de etanol terminando con agua.

Para inactivar a la peroxidasa endógena, los cortes se incubaron con H_2O_2al 3 % por 5 minutos, después de lavar con agua se incubó con el anticuerpo primario anticonejo contra Nitrotirosina (*Santa Cruz. int*) toda la noche a 4 °C, posteriormente se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario marcado con biotina, después se incubó con el complejo de estreptoavidina-peroxidasa por 15 minutos. Finalmente el producto de reacción de ésta enzima se reveló utilizando como sustrato 3,3'-diaminobencidina (DAB) que al oxidarse forma un producto marrón insoluble. Los puntos o células donde se localiza el antígeno, aparece de color marrón. Se analizaron 20 campos por corte en un microscopio Olympus BX51.

***Estudio Histológico*.**

Las muestras de hígado, corazón, riñones y grasa visceral de cada uno de los animales fueron almacenados algunos a -70°C y otros en formol al 10%[13].

Inclusión en Parafina.

Los tejidos se fijaron en formol al 10% por 24 horas. Se lavaron con agua corriente de 15 a 30 minutos y se deshidrataron con alcoholes de concentración ascendente, de 30, 50, 70, 80, 96 grados, y absoluto durante 30 minutos en cada alcohol, con el fin de suprimir el agua tisular, ya que la parafina no es soluble en agua. Se aclaró con xilol, de 30 minutos a una hora y para transparentar, se utilizó aceite de cedro, de 12 a 24 horas, o hasta que las piezas adquieran un color ámbar. Se colocaron en xilol durante 15 minutos ante de incluir. (Los pasos 4, 5 y 6 son con el objeto de facilitar la penetración de parafina en la trama del tejido, aprovechando al mismo tiempo que estos reactivos tiene poder como aclarantes). Posteriormente se incluyó en parafina. Se sumergió la pieza en parafina fundida, cuyo punto de fusión se selecciona de acuerdo al órgano; se realizaron dos cambios, después de 30 minutos cada uno. En la primera inmersión se realizó en una parafina de menor punto de fusión y el segundo en una parafina con un punto de fusión ligeramente mayor. En cajas pequeñas de plástico se colocó la parafina fundida y limpia, de punto de fusión igual al del segundo cambio; se dejó formar una capa superficial sólida de parafina, la cual se licuó

pasando la aguja de disección caliente, en ese momento se introdujo el fragmento y se orientó de acuerdo a la forma en que se iba a cortar. Cuando quedó solidificada una nueva capa superficial, se rodó con una aguja de disección caliente, con el objeto de sacar todas las burbujas. Finalmente se dejó solidificar sin mover, en un recipiente con agua fría.

Una vez solidificada la parafina, se delimitó el bloque con una navaja y se le dió una forma de pirámide truncada, sin lesiona el órgano y se retiró el exceso de parafina. La base de la pirámide se adhirió por calor a la platina del micrótomo; el filo de la navaja se colocó de forma paralela a dicha superficie. Los cortes se realizaron con un grosor entre 3 y 10 μm y se colocaron en un baño de flotación a 37 °C con gelatina previamente disuelta, para adherirlos al portaobjetos. Se dejaron secar durante 24 horas a la temperatura ambiente o en una estufa a 37 °C, durante 12 horas.

Para teñir las muestras se realizó el método de hematoxilina de Harris (Apéndice 3). Se observaron al microscopio con un aumento de 40x 24 horas después.

Análisis Estadístico.

Para cada grupo de tratamiento, si no se indica algo diferente, los datos se reportaroncomo la media±la desviación estándar. Las comparaciones entre los grupos de variables continuas con distribución normal se realizaron por ANOVA, considerando una $p < 0.05$ como significativas. Se realizó un análisis post-hoc tipo LSD para identificar específicamente los grupos que diferían en ANOVA. Las variables con distribución no normal se transformaron logarítmicamente antes del análisis.

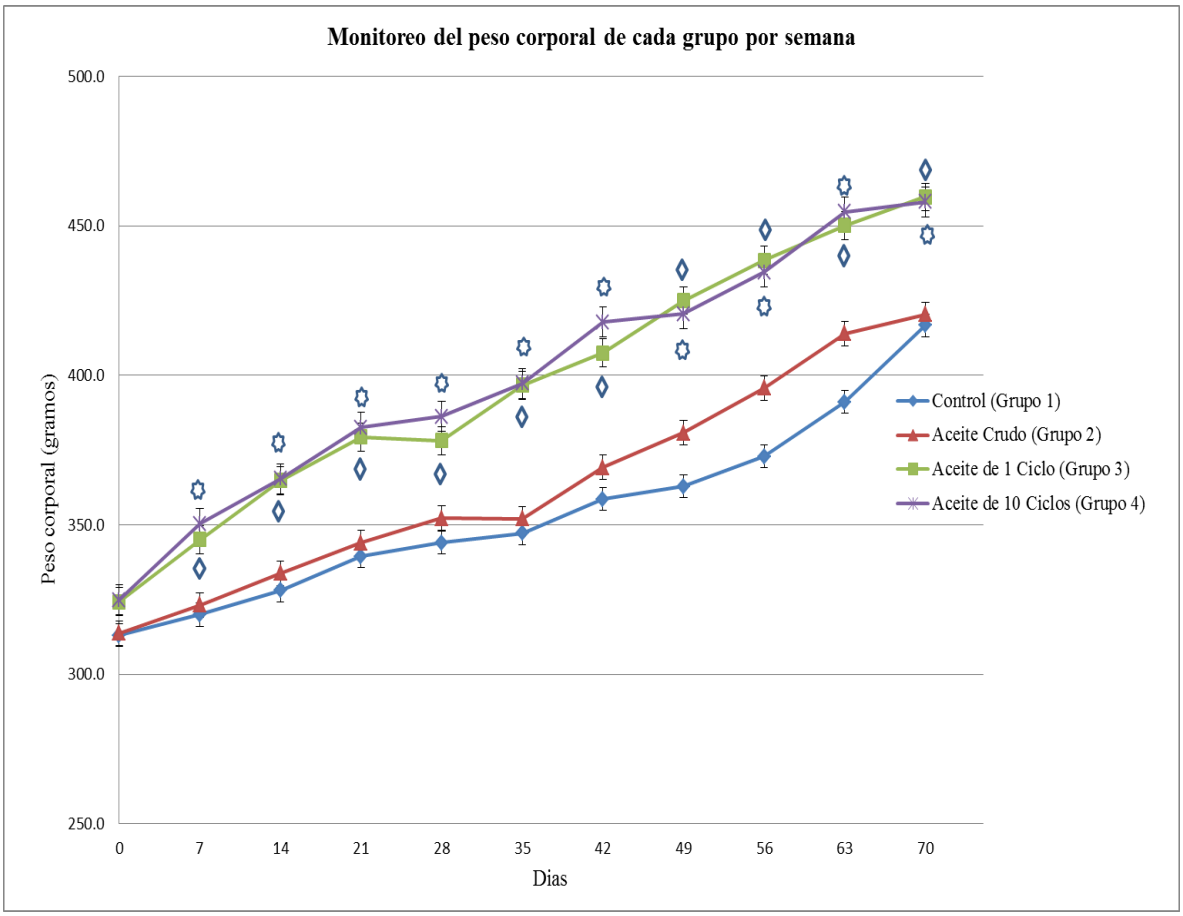
RESULTADOS

1. Monitoreo del Peso Corporal.

En la Gráfica 1 se presentan los promedios de los pesos corporales de cada semana durante 10 semanas de los 4 grupos. Un grupo control (grupo 1), con aceite crudo (grupo 2), aceite utilizado una sola vez (grupo 3) y aceite reutilizado 10 veces (grupo 4), respectivamente.

Se observó que a lo largo del tratamiento, se presentó un incremento mayor del peso corporal del grupo tratado con aceite de 1 ciclo y el grupo tratado con aceite de 10 ciclos, con respecto al grupo control y al grupo tratado con aceite crudo.

Gráfico 1. Comportamiento del peso corporal en los 4 grupos durante 10 semanas.



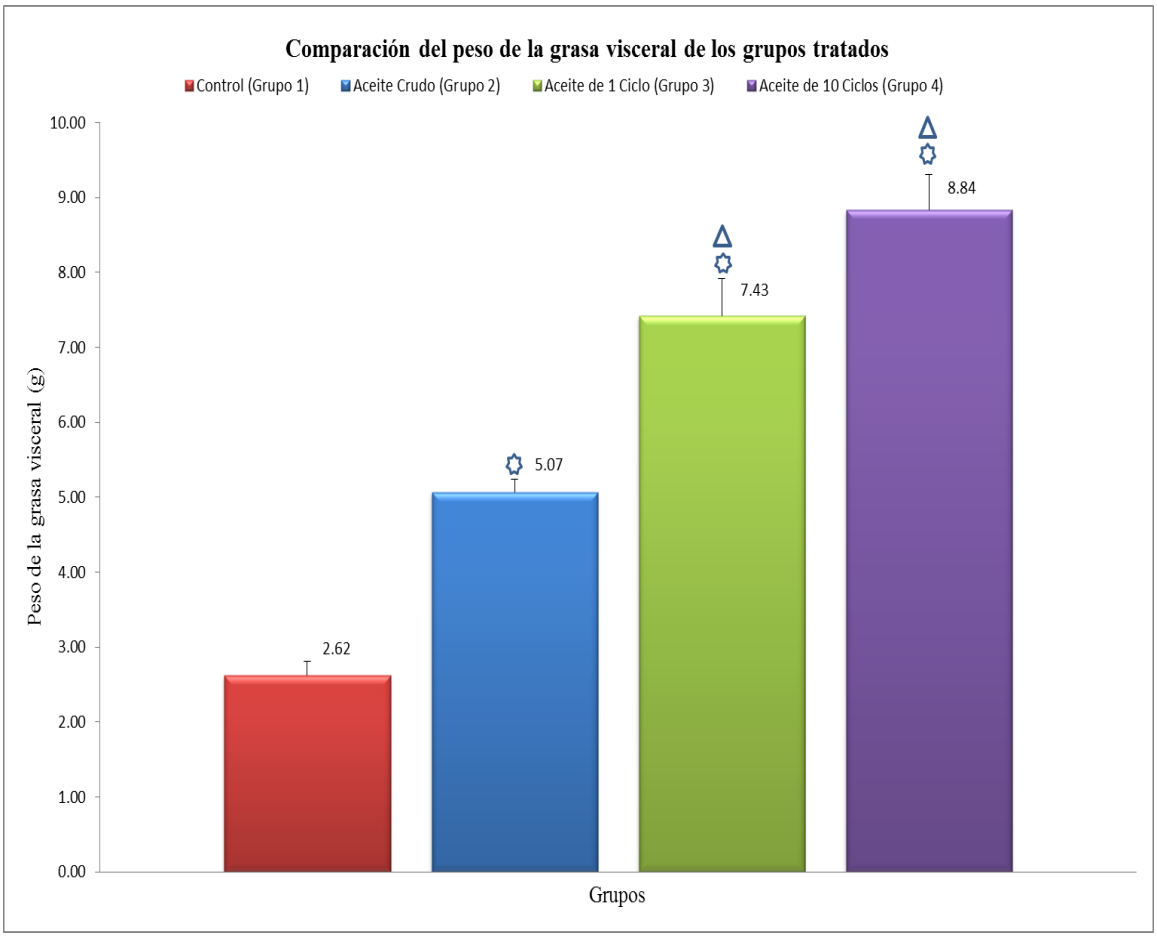
Los datos se muestran como la media ± DE
◇ *= ANOVA, p<0.05 aceite de 1 ciclo vs control*

✿ = *ANOVA, p<0.05 aceite de 10 ciclos vs control*

2. Peso de la grasa visceral presente en los grupos tratados.

Se realizó la separación del tejido graso visceral presente en los grupos tratados. En el Gráfico 2 observamos que el grupo 3 y 4 presentaron una mayor cantidad de tejido adiposo en comparación con los grupos 1 y 2. Sin embargo el grupo 2 también tuvo un comportamiento similar, pero menor en comparación con el grupo 3 y 4, de tal forma que los 3 grupos tratados presentó una diferencia significativa.

Gráfico 2. Comparación de la cantidad de grasa visceral de los 4 grupos.



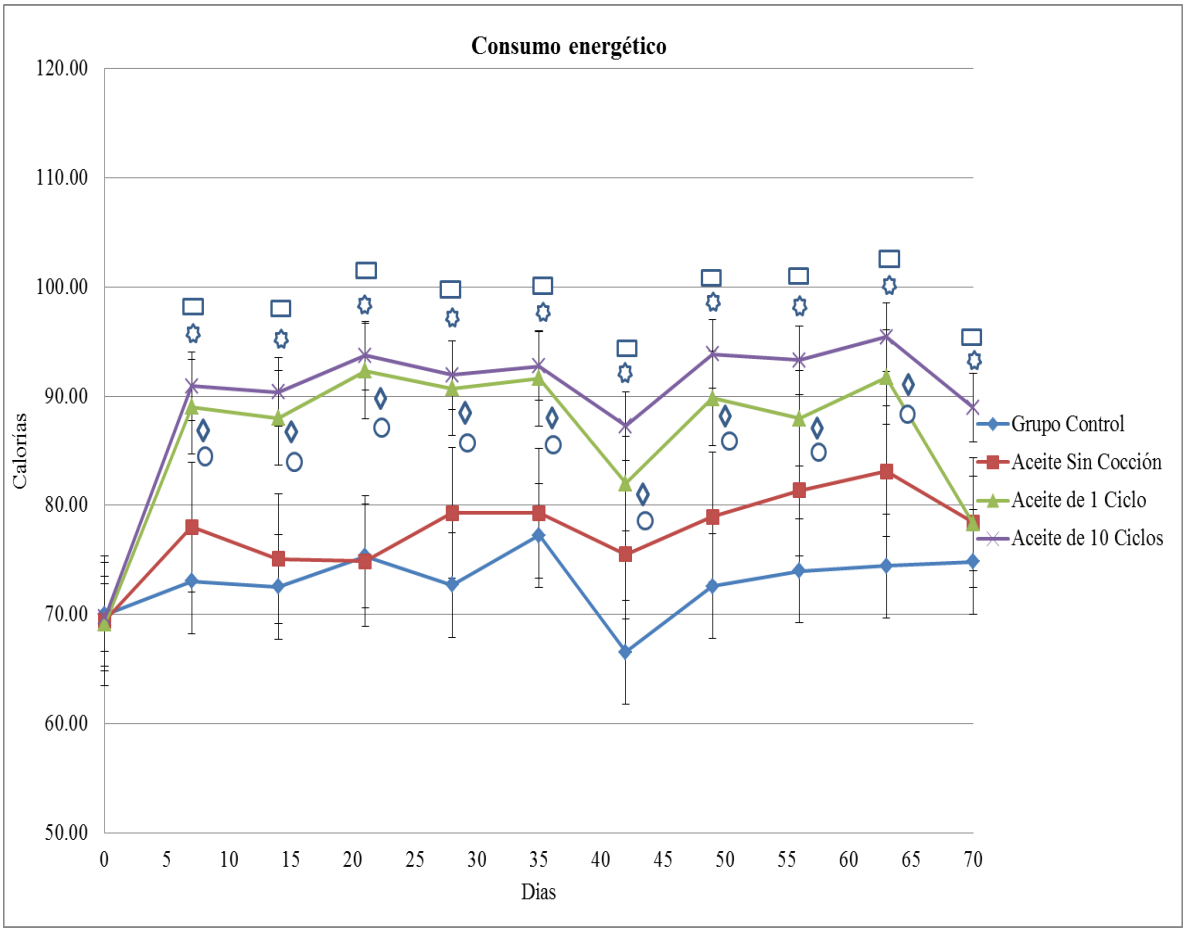
Los datos se muestran como la media ± ESM.
✿ = *ANOVA, p<0.05 vs control*
△ = *ANOVA, p<0.05 vs aceite crudo*

3. Monitoreo del consumo calórico.

Determinamos que por cada 100 gramos de peso corporal de los animales, consumen diariamente 10 gramos de alimento en promedio. En el Gráfico 3 se presenta el monitoreo del consumo calórico diariopor cada gramo de alimento de los 4 grupos en tratamiento.

Se observó un incremento en el consumo calórico tanto del grupo 3 como del4 en la primera semana, de tal forma que el consumo calórico de estos dos grupos fue mayor con respecto al grupo 1 y 2. Dicha tendencia se presenta hasta el día 35. Posteriormente hay una disminución de los 4 grupos en el día 42, sin embargo se vuelve a presentar un aumento del mismo hasta llegar a un consumo constante que después declina en los grupos 2, 3 y 4

Gráfico 3. Monitoreo del consumo energético diario promedio de los 4 grupos.



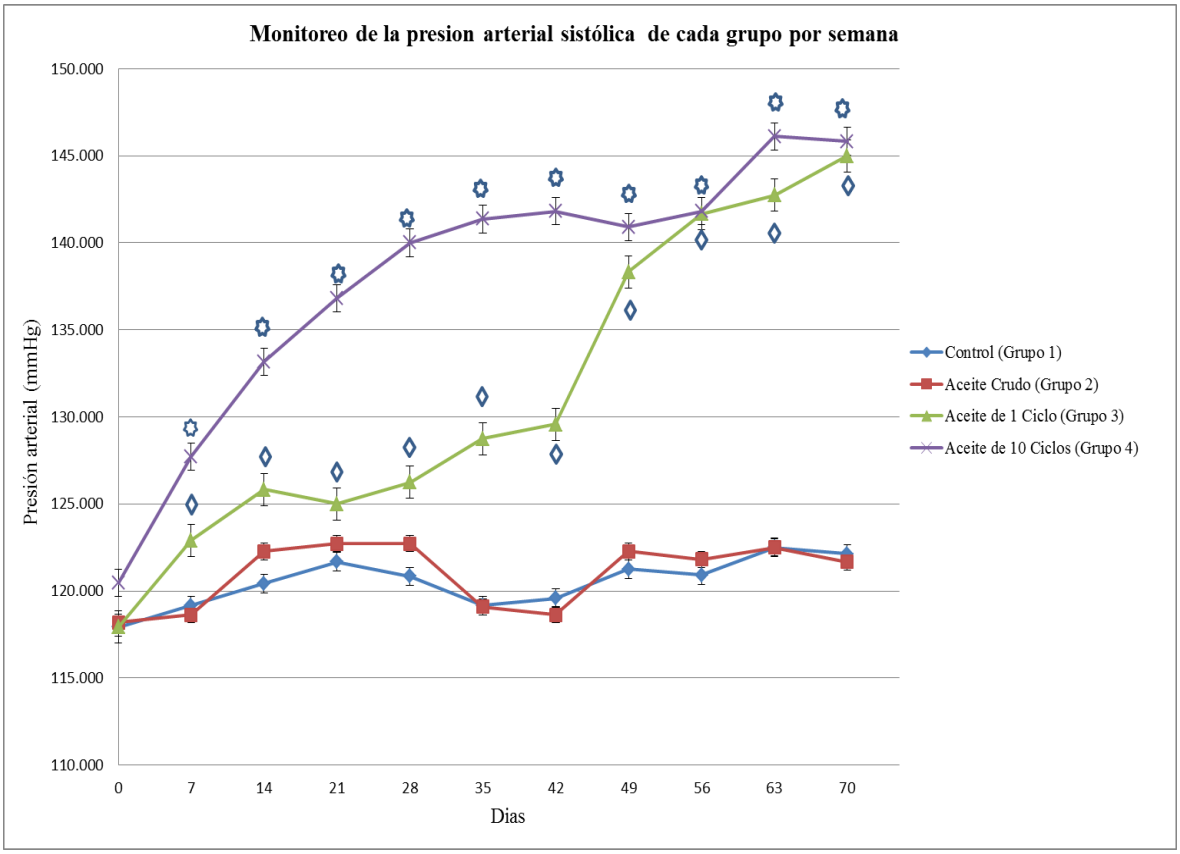
Los datos se muestran como la media ± DE
◇ *= ANOVA, p<0.05 aceite de 1 ciclo vs control*
✡ *= ANOVA, p<0.05 aceite de 10 ciclos vs control*
○ *= ANOVA, p<0.05 aceite de 1 ciclo vs aceite crudo*
▭ *= ANOVA, p<0.05 aceite de 10 ciclos vs aceite crudo*

4. Monitoreo de la Presión Arterial.

Para poder determinar de forma tentativa el posible efecto del tratamiento en los respectivos grupos, se realizó el monitoreo de la presión arterial en cada uno de los mismos y fue utilizado como indicador para finalizar el tratamiento.

Se observó un incremento de la presión arterial de los grupos 3 y 4, mientras que en el grupo 1 y 2 se mantuvo con oscilaciones pequeñas y no significativas. El incremento de la presión arterial se presentó en el grupo 4 antes que en el grupo 3, que mantuvo un incremento mayor en la semana 7 del tratamiento hasta que ambos grupos tienen valores semejantes de presión arterial al final del estudio.

Gráfico 4. Comportamiento de la presión arterial sistólica de cada uno de los grupos con tratamientodurante 10 semanas.

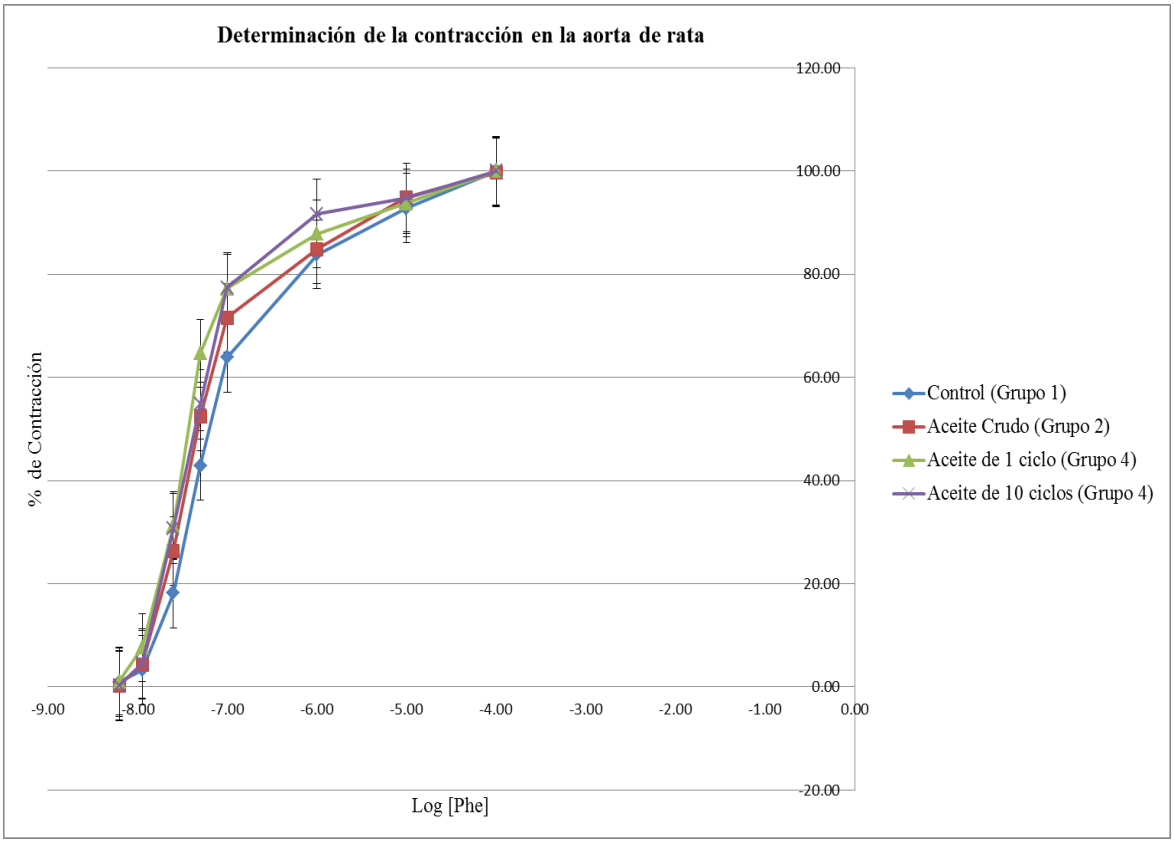


Los datos se muestran como la media ± DE
◇ *= ANOVA, p<0.05 aceite de 1 ciclo vs control*
✿ *= ANOVA, p<0.05 aceite de 10 ciclos vs control*

5. Función endotelial.

Existen varios factores de riesgo que coadyuvan al desarrollo o al padecimiento de enfermedades cardiovasculares, posiblemente relacionado con hipertensión y daño vascular. Al realizar el monitoreo de la presión arterial como indicador de algún efecto causado por el tratamiento, se realizó la evaluación de la función endotelial en la aorta de la rata. (Estos datos se muestran en la Gráfica 5 y 6). El comportamiento de cada uno de los grupos tratados es diferente al grupo 1. Para evaluar la acción de contracción de la aorta, se utilizó fenilefrina (Phe). Se puede observar que no existe una diferencia de los tres grupos tratados con respecto al grupo 1. Sin embargo al evaluar la relajación de la aorta por efecto de la acetil colina (ACh), es menor en los grupos 2, 3 y 4 en comparación con el grupo 1. El porcentaje de relación debido al efecto de la ACh en lo grupos tratados es menor al 50 %, en cambio el grupo 1 tiene un porcentaje de relación del 80 % aproximadamente.

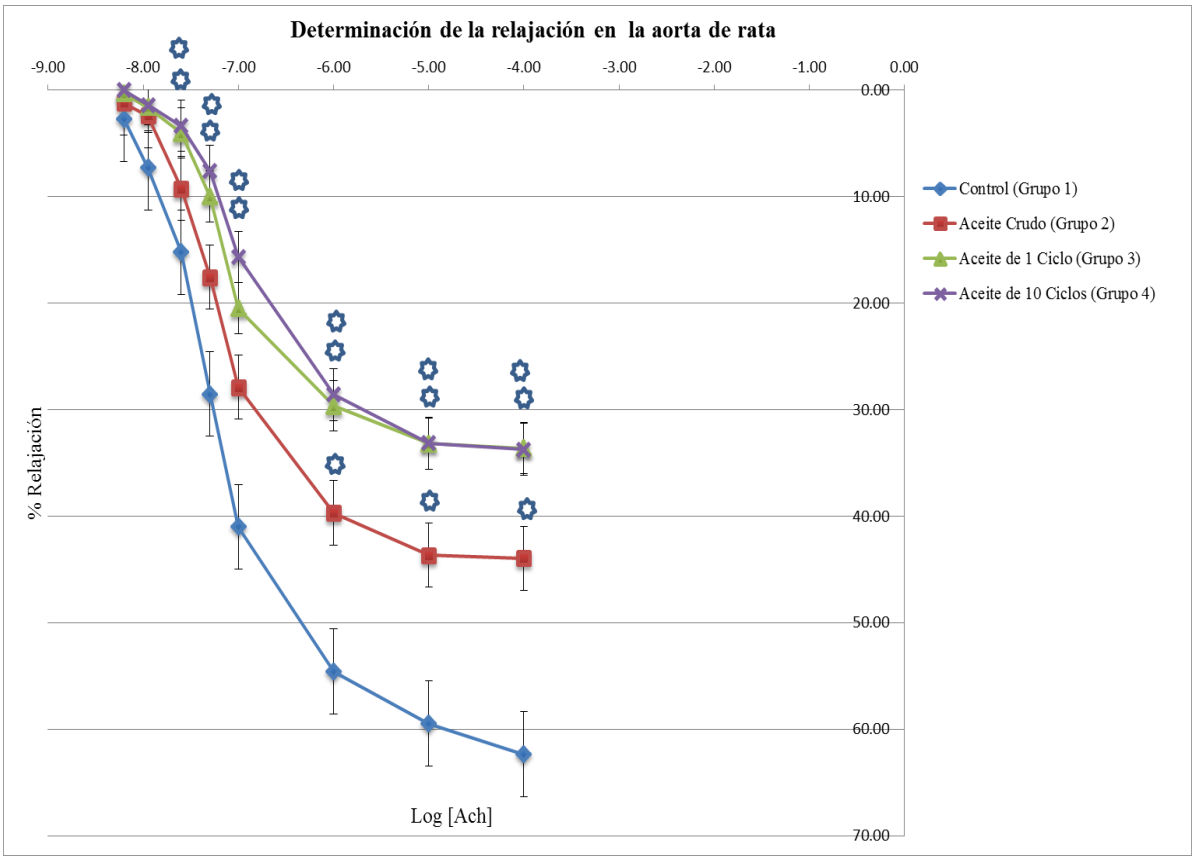
Gráfica 5. Evaluación de la función endotelial en los 4 grupos.



Los datos se muestran como la media ± ESM.

*ANOVA * p<0.05 vs control*

Gráfica 6. Evaluación de la relajación de la aorta en los 4 grupos.

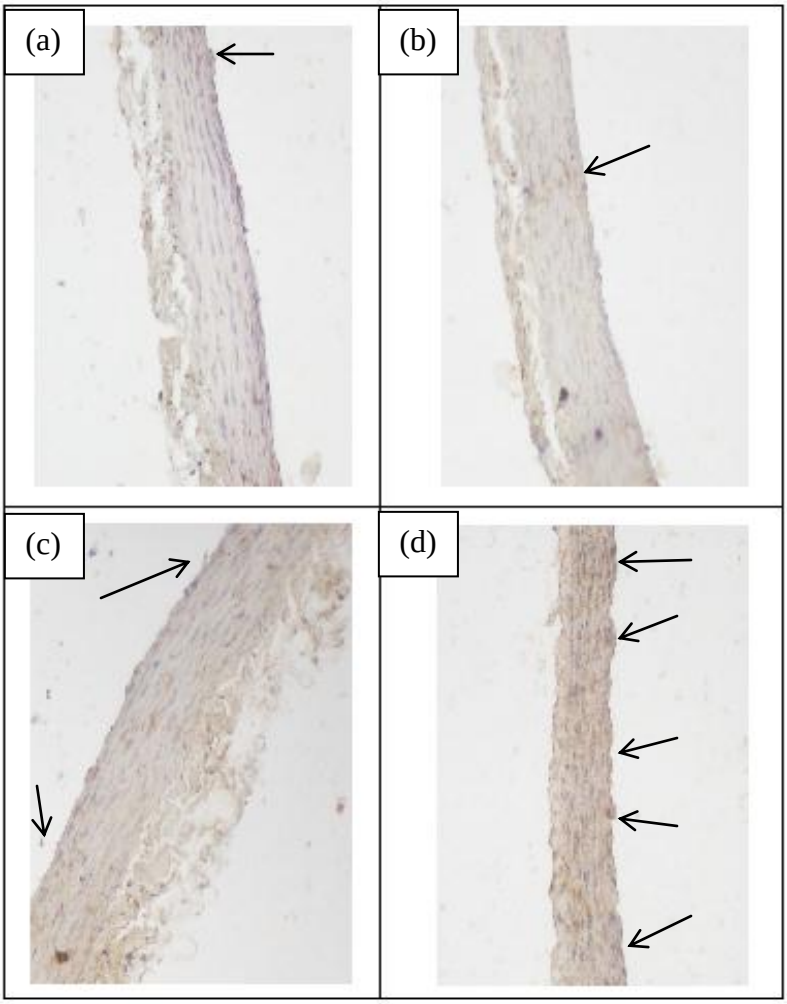


Los datos se muestran como la media ± ESM.
✿ *= ANOVA, p<0.05 vs control*

6. Inmunohistoquímica.

En muchas ocasiones al realizar la evaluación de la función endotelial, se complementa con la determinación de metabolitos producto de reacciones que involucra como especie reactiva al NO producido por el endotelio. En nuestro estudio se llevó a cabo la determinación de Nitrotirosina mediante una inmunohistoquímica indirecta, para poder evaluar si existía algún cambio en el endotelio de la aorta de rata de los grupos tratados.

Podemos observar que en el endotelio de aorta de la rata del grupo 4 tiene una mayor presencia de nitrotirosina en comparación con los grupos 1 y 2. Tanto que el grupo 3 presenta una menor señal en comparación con el grupo 4, pero diferente en comparación con el grupo 1 y 2.



(a)Inmunohistoquímica del endotelio de aorta de la rata del grupo 1. (b)Grupo 2. (c)Grupo 3 (d)Grupo 4. Las flechas indican la presencia de un precipitado color marrón, interpretado como positivo para nitrotirosina.

7. Perfil de lípidos.

Con base en el enfoque original del proyecto, se realizó el perfil de lípidos de los 4 grupos, para poder evaluar el posible efecto del tratamiento sobre las concentraciones plasmáticas decolesterol total (CT),triacilgliceroles (Tg) y fosfolípidos (Plp).En la Tabla 5 se muestran las concentraciones de CT, Tg y Plp de los 4 grupos. Únicamente se observó que la concentración de Tg del grupo 3 y 4 alcanzaron diferencia significativa con respecto al grupo 1.

Tabla 5. Perfil de lípidos en plasma de rata de los 4 grupos tratados.

	Control (n = 7)	Aceite Crudo (n = 7)	Aceite de 1 Ciclo (n = 7)	Aceite de 10 Ciclos (n = 7)
Colesterol Total (mg/dL)	44.1 ± 18.7	38.0 ± 16.1	47.1 ± 14.0	47.4 ± 18.0
Triacilgliceroles (mg/dL)	42.0 ± 18.3	45.1 ± 16.0	33.2 ± 10.0*	53.3 ± 18.4*
Fosfolípidos (mg/dL)	59.3 ± 19.0	57.0 ± 15.6	65.3 ± 31.1	55.0 ± 10.0

Los datos se muestran como la media ± DE.
*ANOVA * p<0.05 vs control*

8. Composición química de las HDL.

La estructura de las HDL es un factor relevante en su función, por lo que se determinó la composición porcentual de lípidos, que se muestran en la Tabla 6. Se observóque la concentración del colesterol de las HDL (C-HDL) y en el colesterol de las LDL (C-LDL) en los grupos 2, 3 y 4 es semejante en comparación con el grupo 1. Por otra parte, la concentración de fosfolípidos de HDL (Plp-HDL) son menores con respecto al grupo 1, sin embargo los datos de los 4 grupos no presentaron diferencia estadística significativa. Únicamente en la concentración de triacilgliceroles de HDL (Tg-HDL) del grupo 3 alcanzó diferencia significativa con respecto al grupo 1.

Tabla 6. Determinación de la concentración de lípidosde las HDL de rata y colesterol de las LDL.

	Control (n = 5)	Aceite Crudo (n = 5)	Aceite de 1 Ciclo (n = 5)	Aceite de 10 Ciclos (n = 5)
C-HDL (mg/ dL)	28.0± 1.2	29.5± 1.1	28.5± 1.4	31.2± 1.5
Tg-HDL (mg/ dL)	29.4± 1.4	18.0± 1.0	12.5± 0.3*	27.1± 2.0

Plp-HDL (mg/ dL)	47.1 ± 2.3	37.0± 0.5	41.0± 1.0	42.0± 1.5
C-LDL (mg/dL)	13.0 ± 1.3	14.28 ± 1.4	15.1 ± 1.1	11.0 ± 2.0

Los datos se muestran como la media ± EE.
ANOVA * *p<0.05* vs control

9. Distribución de tamaños de las subclases de HDL.

Debido a la importancia que tienen las HDL, se decidió evaluar el posible efecto del tratamiento con aceite reutilizado en la distribución de los tamaños de las diferentes subclases de HDL. Se ha observado una presencia significativa de las subclases 3b y 3c en el síndrome metabólico y ateroesclerosis en humanos, pero no se tiene información clara con la distribución de las subclases de HDL en rata.

En las Tablas 7, 8 y 9se presentan los porcentajesen la distribuciónde las diferentes subclases de las HDL en plasma de rata, las cuales no presentaron diferencias significativas entre ellas.

Tabla 7. Determinación del porcentaje de colesterol (CT) en las diferentes subclases de HDL en rata.

Subclase de HDL	Control (n = 5)	Aceite Crudo (n = 5)	Aceite de 1 Ciclo (n = 5)	Aceite de 10 Ciclos (n = 5)
2b (% de CT)	44.4 ± 1.3	52.0 ± 2.0	59.0 ± 3.0	52.0± 4.0
2a (% de CT)	15.0 ± 0.4	15.3 ± 0.2	16.3 ± 0.3	14.0± 1.0
3a (% de CT)	20.0 ± 1.0	18.0 ± 1.0	13.0 ± 1.5	17.1± 1.3
3b (% de CT)	8.3 ± 0.4	6.4 ± 0.4	4.5 ± 1.0	6.6± 1.0
3c (% de CT)	13.0± 1.0	9.5 ± 1.0	8.0 ± 1.0	11.3± 1.2

Los datos se muestran como la media ± EE.
ANOVA p<0.05 vs control

Tabla 8. Determinación del porcentaje de triacilgliceroles (Tg) en las diferentes subclases de HDL en rata.

Subclase de HDL	Control (n = 5)	Aceite Crudo (n = 5)	Aceite de 1 Ciclo (n = 5)	Aceite de 10 Ciclos (n = 5)
2b (% de Tg)	45.4± 1.2	43.1 ± 1.1	50.0 ± 1.4	46.0 ± 3.1
2a (% de Tg)	14.5± 0.5	13.3 ± 1.0	14.4 ± 0.4	15.0 ± 1.0
3a (% de Tg)	18.4± 1.0	19.0 ± 0.4	15.0 ± 1.0	18.0 ± 1.3
3b (% de Tg)	8.1± 0.4	9.0 ± 0.4	8.0 ± 0.5	8.0 ± 0.6
3c (% de Tg)	14.5± 1.0	16.0 ± 1.5	13.0 ± 1.0	15.0 ± 2.0

Los datos se muestran como la media ± EE.
*ANOVA * p<0.05 vs control*

Tabla 9. Determinación del porcentaje de fosfolípidos (Plp) en las diferentes subclases de HDL en rata.

Subclase de HDL	Control (n = 5)	Aceite Crudo (n = 5)	Aceite de 1 Ciclo (n = 5)	Aceite de 10 Ciclos (n = 5)
2b (% de Plp)	40.3 ± 1.3	45.4 ± 1.5	45.0 ± 2.0	47.0 ± 4.0
2a (% de Plp)	13.3 ± 0.3	14.1 ± 0.3	14.5 ± 0.1	14.3 ± 1.0
3a (% de Plp)	23.0 ± 1.0	20.3 ± 1.0	18.0 ± 1.0	19.3 ± 1.5
3b (% de Plp)	10.1 ± 0.4	9.0 ± 1.0	7.6 ± 0.4	8.0 ± 1.0
3c (% de Plp)	13.3± 1.1	11.5 ± 0.5	10.3 ± 0.5	11.4 ± 1.0

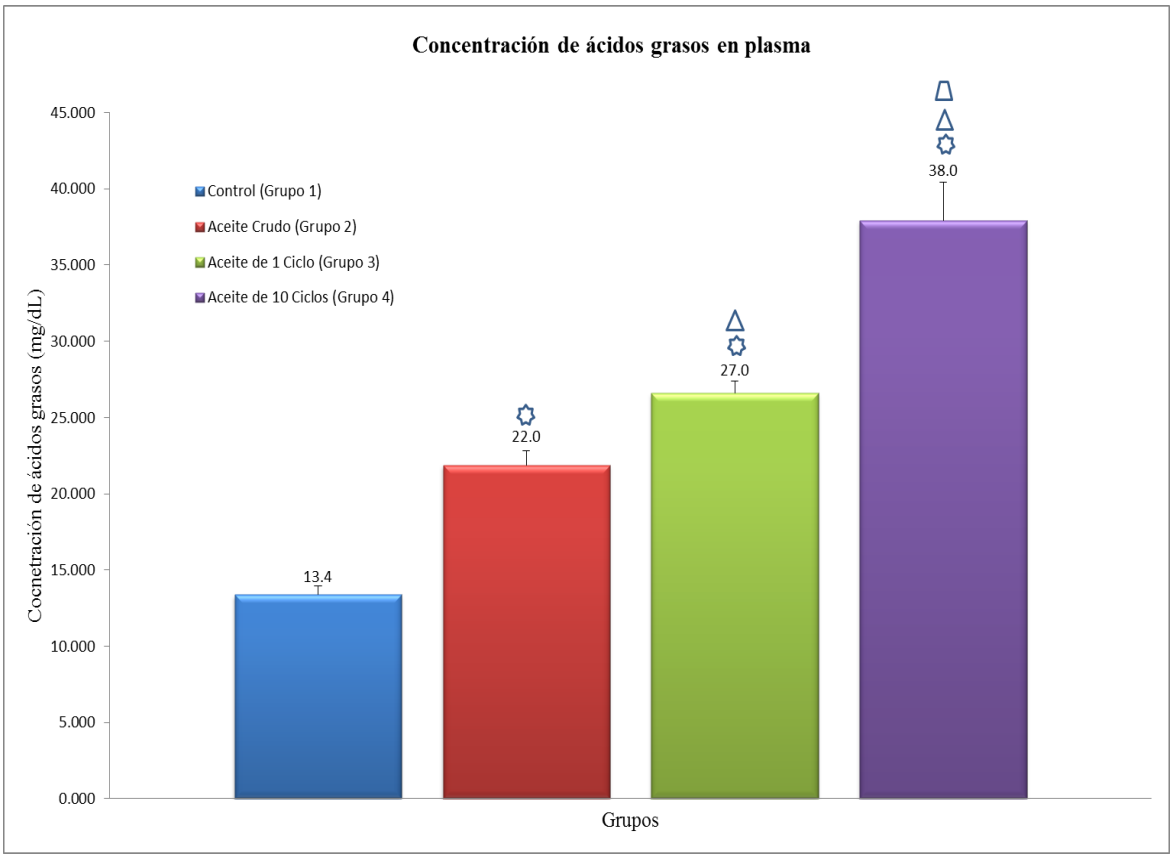
Los datos se muestran como la media ± EE
*ANOVA * p<0.05 vs control*

10. Ácidos grasos libres (AGL).

La presencia de ácidos grasos libres en plasma es normal como parte del metabolismo de los lípidos, ya que provienen de la hidrólisis de los triacilgliceroles presentes en el tejido adiposo. Sin embargo, una elevada concentración de estos ácidos se asocia con procesos fisiopatológicos como la resistencia a la insulina. Por tal motivo se determinó la concentración de los AGL en el plasma de las ratas de los 4 grupos.

En la Gráfica 7 se presentan las concentraciones de los ácidos grasos libres de cada uno de los grupos incluidos en el estudio. Se observó que la concentración de AGL en los grupo 2, 3 y 4 son mayores con respecto al grupo 1, por lo que dichos grupos alcanzaron diferencias significativas.

Gráfica 7. Determinación de la concentración de ácidos grasos libres en plasma.

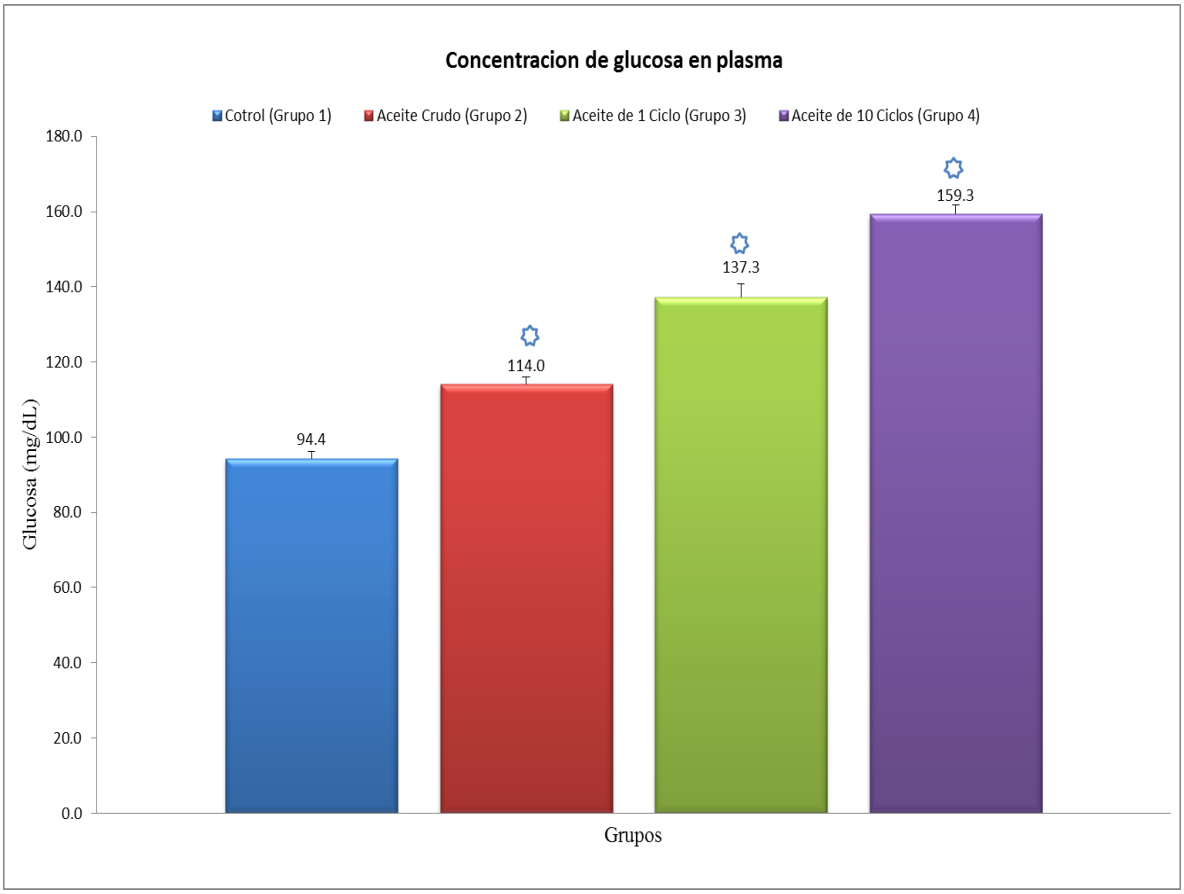


Los datos se muestran como la media ± EE
✿ *= ANOVA, p<0.05 vs control*
△ *= ANOVA, p<0.05 vs aceite crudo*
⏢ *= ANOVA, p<0.05 vs aceite de 1 ciclo*

11. Determinación de la concentración plasmática de glucosa e insulina.

En vista de los niveles elevados de AGL y considerando su relación con la resistencia a la insulina, a continuación se realizó la determinación de la concentración de glucosa en plasma de cada uno de los grupos. En la Gráfica 8 se observa la concentración de la glucosa del grupo 2, 3 y 4 fue significativamente mayor en comparación con el grupo 1. Es notable la mayor concentración de glucosa en plasma que se presenta en el grupo 4 y posteriormente se encuentra la del grupo 3;estos valores son diagnósticos de diabetes si se aplican los criterios que se aplican a los humanos.

Gráfica 8. Determinación de la concentración plasmática de glucosa.

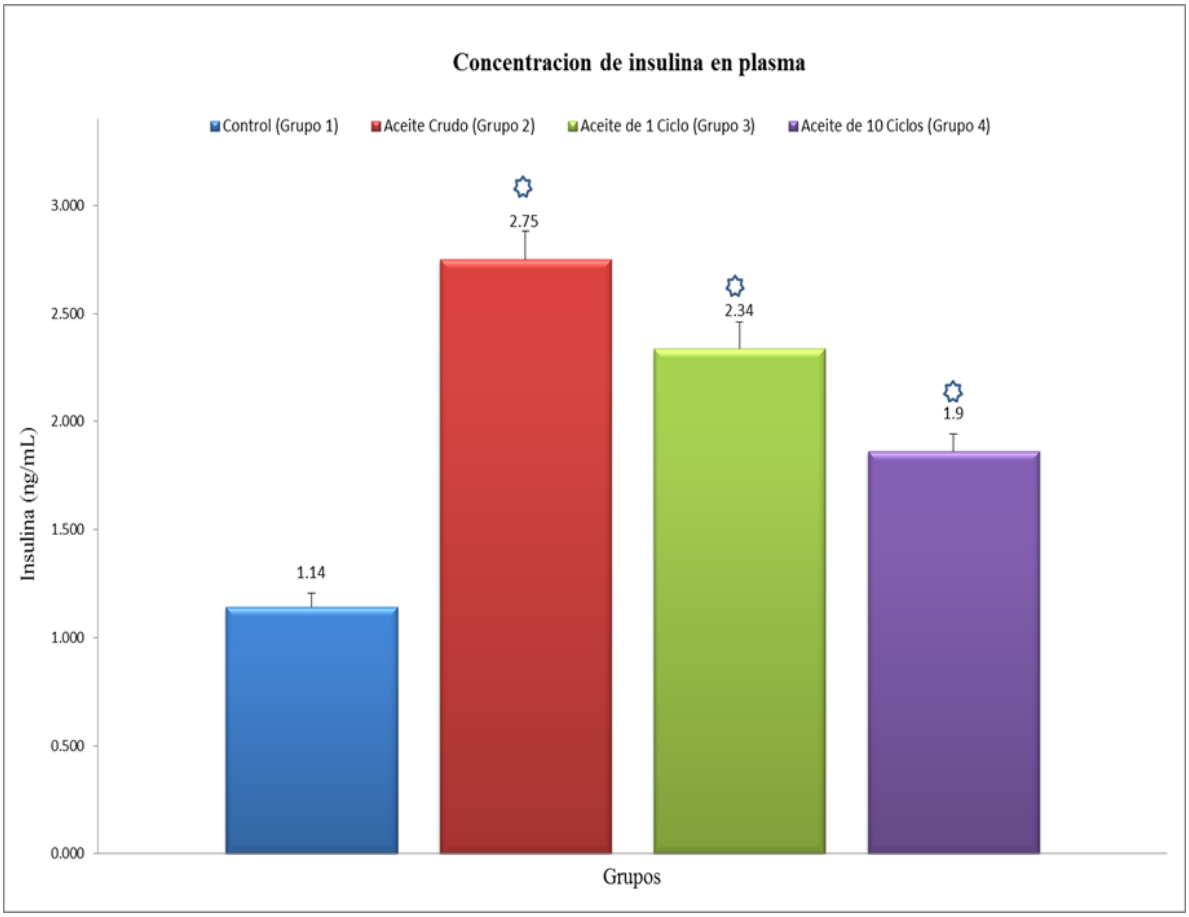


Los datos se muestran como la media ± EE
✿ *= ANOVA, p<0.05 vs control*

Para establecer la etiología de la hiperglucemia en los grupos tratados, se determinó la concentración de insulina en el plasma de cada uno de los grupos. En la Gráfica

9observamos que el grupo 2 presentó la mayor concentración en comparación con los otros 3 grupos. Sin embargo, el grupo 3 presentó una mayor concentración en comparación con el grupo 1 y 4, de igual forma el grupo 4 tuvo una concentración de insulina mayor a la grupo 1. Es visible como la concentración de insulina en los grupos 2, 3 y 4 es mayor al grupo 1 y entre estos mismos existe una diferencia en la concentración de insulina. Entre los datos obtenidos existe una diferencia significativa.

Gráfica 9. Determinación de la concentración plasmática de insulina.



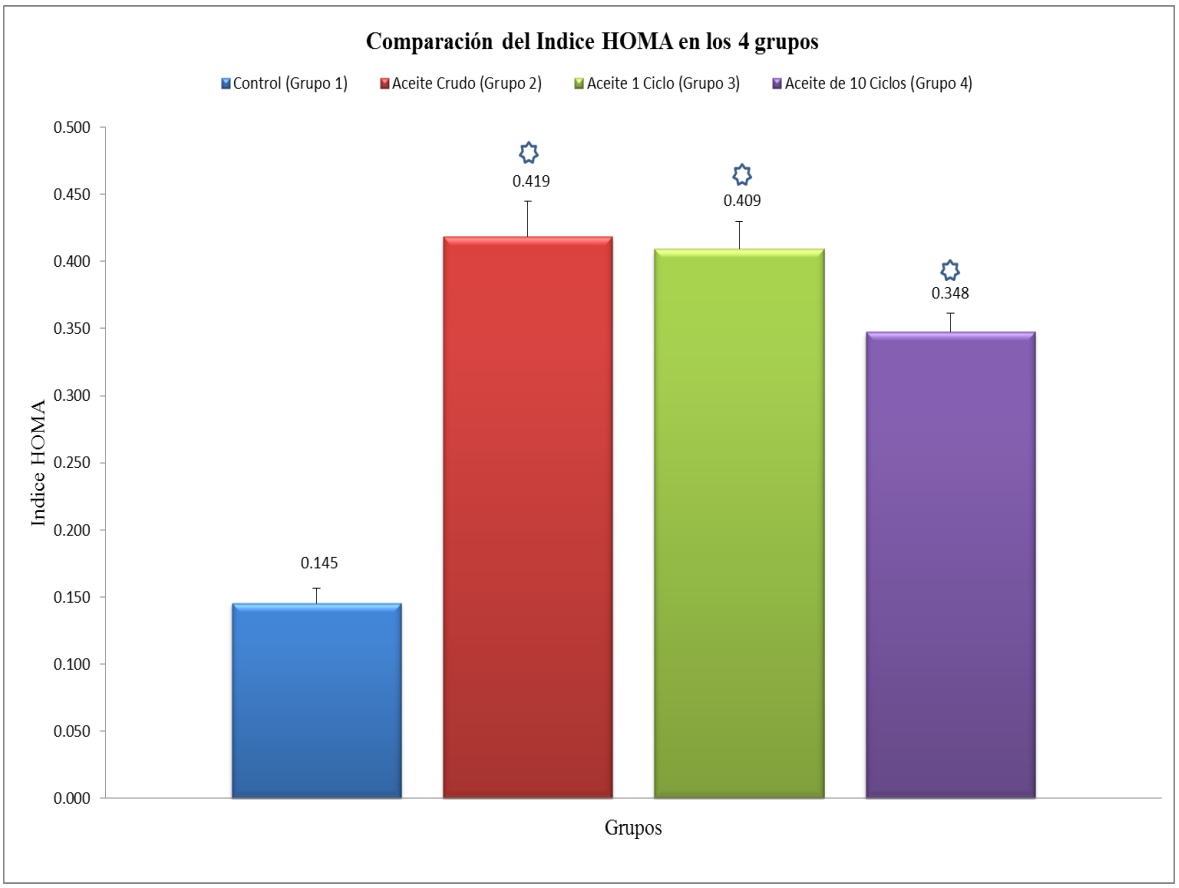
Los datos se muestran como la media ± EE
✿ *=ANOVA, p<0.05 vs control. Los datos se transformaron logarítmicamente para el análisis estadístico.*

12. Evaluación de la resistencia a la insulina.

Como una herramienta para tener una mejor referencia respecto al grado de resistencia a la insulina de nuestros grupos tratado, se realizóel cálculo del índice HOMA-IR. En el Gráfico

10 observamos que el índice HOMA es mayor en el grupo 2, 3 y 4 respectivamente en comparación con el grupo 1, alcanzando una diferencia significativa con una p <0.05.

Gráfico 10. Cálculo del Índice HOMA-IR



Los datos se muestran como la media ± EE

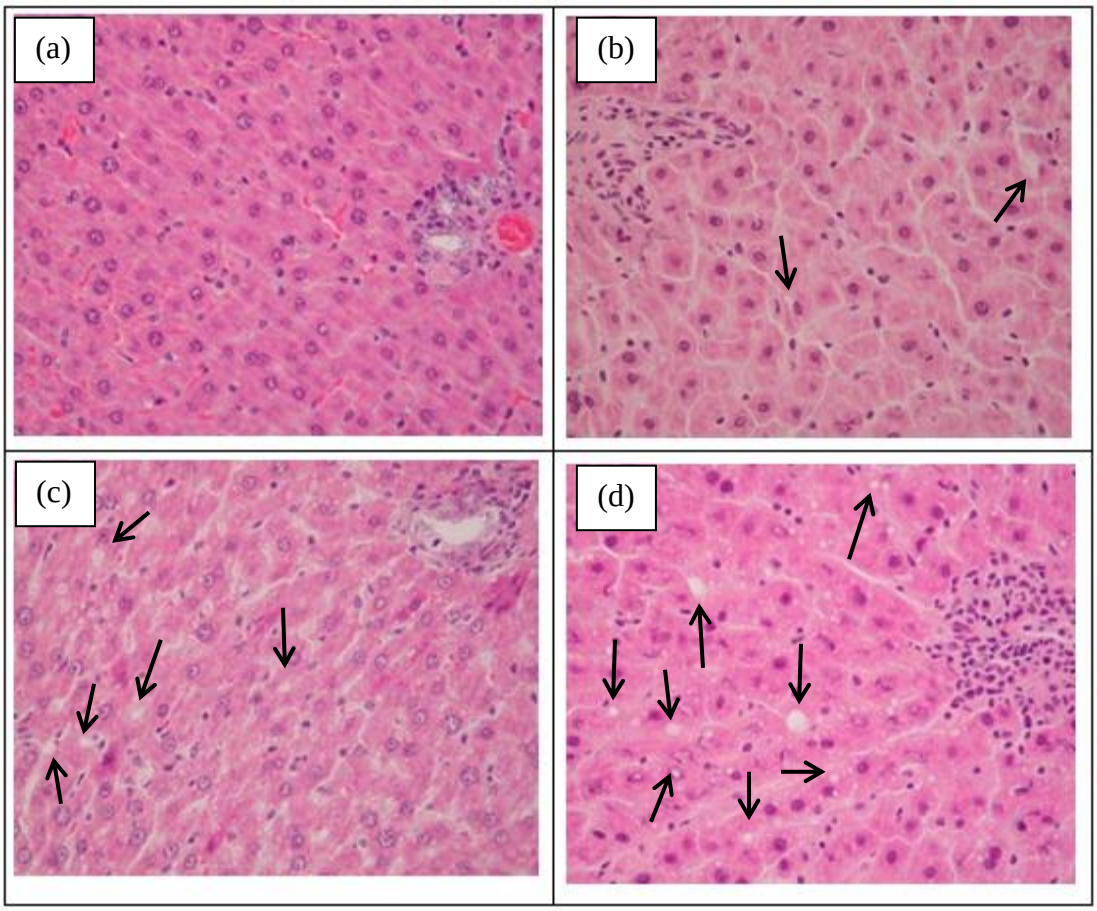
✿ *=ANOVA, p<0.05 vs control. Los datos se transformaron logarítmicamente para el análisis estadístico.*

13. Estudio Histológico.

Se ha observado una posible relación entre la obesidad y el desarrollo de diabetes mellitus con complicaciones a nivel hepático y renal. Por lo que se llevó a cabo el estudio histológico del hígado, riñones y adicionalmente al tejido adiposode los 4 grupos.

La fotomicrografía (a) correspondiente al hígado de la rata representativa del grupo 1. Se observar la presencia de hepatocitos y espacios extracelulares sin alteración en el tejido. En la fotomicrografía (b), correspondiente al hígado de la rata representativa del grupo 2, observamos vacuolación intracitoplásmica. En la fotomicrografía (c) correspondiente al

hígado de la rata representativa del grupo 3., observamos una leve esteatosis microvacuolar. En la fotomicrografía (d), correspondiente al hígado de la rata representativa del grupo 4, observamos la presencia de una posible esteatosis microvacuolar intermedia.



(a)Fotomicrografía de hígado de la rata del grupo 1. (b) Grupo 2. (c) Grupo 3. (d) Grupo 4. Las flechas indican estructuras denominadas “gotas”, que comúnmente se asocian con espacios previamente ocupados por lípidos.

DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación se ha puesto en evidencia utilizando como modelo ratas, el efecto en el consumo de aceite vegetal crudo yaceites reutilizados en el desarrollo de factores de riesgo cardiovasculares. Observamos efectos significativos sobre la concentración de glucosa, insulina y ácidos grasos libres en el plasma de las ratas tratadas con aceite. Estos hallazgos se asociaron a resistencia a la insulina y diabetes *mellitus* tipo 2 en el grupo que consumió el aceite reutilizado 10 veces.

El uso de aceite para cocinar alimentos forma parte de nuestra tradición culinaria y generalmente se utiliza para procesa productos de maíz entre otros ingredientes. El uso del maíz es parte de nuestras raíces prehispánicas como base de la alimentación. Por esta razón se decidió freír la masa de maíz para la preparación del aceite utilizado y reutilizado. Además, simulamos las condiciones en las que se preparan los alimentos que son cocinados con aceite, sometiéndolos a temperaturas que permiten una cocción más rápida del alimento, a fin de dar una textura más aceptable, modificar su sabor, color y olor. La temperatura a la que se sometió al aceite junto con el maíz fue controlada entre 190 ° C y 200 °C. Este intervalo nos permitió que no llegara al punto de humeo, que el maíz alcanzará una consistencia de "frito" sin quemarse, y simular la condición habitual en la que se cocinan los alimentos de nuestra dieta. Otro factor durante el tratamiento del aceite al freír la masa, fue el tiempo, en el cual se dejaba la masa en el aceite, que era de 10 minutos.

Otro factor importante en el diseño del estudio fue el tipo de aceite a utilizar, a pesar de la gran gama de aceites para cocinar existentes, no todos tiene la misma composición y la misma cantidad de ácidos grasos saturados, insaturados o poliinsaturados. Por estas características, nos inclinamos por utilizar un aceite que fuera hecho con aceite de canola, el cual tiene un menor porcentaje de ácidos grasos saturados, un mayor porcentaje de ácidos grasos mono y poliinsaturados. Cabe destacar que a estos últimos se les atribuyen propiedades antioxidantes. Buscamosque tuviera de forma adicional algún tocoferol, como la vitamina E (α-tocoferol), agregando una capacidad antioxidante mayor [13]. Existen estudios referentes al posible daño a nivel cardiovascular generado por el consumo de ácidos grasos insaturados, poliinsaturados y los compuestos producidos al calentarlos, por este

motivo se optó por utiliza el aceite de marcar Capullo®, que es fabricado con aceite de canola.

Existen estudios previos con animales de laboratorio en los cualesse analizaron los efectos de los aceites reutilizados obtenido de establecimientos comerciales. En esos estudios, se monitoreó el peso corporal y se observó un incremento en el peso en comparación con su grupo alimentado con aceite crudo [28]. Este comportamiento también lo observamos en nuestros grupos tratados con aceite utilizado y reutilizado comparados con el grupo control y el grupo alimentado con aceite crudo. Este último, a pesar de recibir una dieta con una proporción excesiva de calorías aportada por lípidos no incrementó su peso corporal promedio, y la evolución de su masa corporal promedio es semejante a la del grupo control durante todo el tratamiento. Estos resultados sugieren que a pesar de la dieta alta en grasas, la rata reguló su consumo calórico en el grupo de aceite crudo. Esto difiere con los resultados obtenidos por Totani *et al* [28], quienes observaron un incremento en el peso corporal de los animales que tuvieron una dieta basada en una mezcla con aceite crudo de soya y canola. En contraste, también existen estudios donde observaron que el grupo alimentado con aceite crudo de soya tuvieron un incremento de peso corporal promedio menor al grupo control, y sus grupos tratados con aceite reutilizado varias veces fue menor con respecto al grupo control [25]. Dichas diferencias entre los estudios citados con respecto a nuestros resultados posiblemente se deba a la naturaleza de los aceites, pues la composición del aceite de soya, canola o una mezcla de aceites varía en la relación con respecto a los ácidos grasos saturados, insaturados y poliinsaturados. El porcentaje de aceite agregado, un exceso de aceite podría no ser palatable para las ratas, debido a una mayor oxidación del aceite y modificar el sabor del alimento. La duración del experimento, ya que manejaron periodos superiores a las 10 semanas, que fue el tiempo de duración de nuestro protocolo. Si observamos en nuestras gráficas de peso corporal, probablemente hubieran tenido un comportamiento similar entre los grupos tratados con el grupo control. Edad del modelo, en los estudios realizados utilizan animales de diferentes semanas, al igual que en nuestro experimento. La rata tiene 2 ciclos de crecimiento durante su desarrollo, de cría a adulto-joven y de adulto-joven a adulto, dichos ciclos podrías estar afectando a los resultados obtenidos. Llegando a la última etapa, las ratas tienen un comportamiento estable, lo que concuerda con la conducta observada en el peso corporal al presentar una meseta en un

tiempo superior a las 22 semanas [28]. Tipo de tratamiento al que se someten los aceites, pues un aceite reutilizado y recuperado tienen diferencias considerables, tales como: son de usocomercial y generalmente estos aceites son hidrogenados para alargar su tiempo de uso y son sometidos a muy altas temperaturas. Encontraste, en nuestro estudio las condiciones que se manejaron fueron similares al uso que se le da al aceite en el hogar, la temperatura en nuestro protocolo fue controlada y menor, el aceite utilizado es de origen vegetal bien definido, es poliinsaturado y muy posiblemente debido a su característica, dé origen a una mayor cantidad de productos tóxicos, como aminas heterocíclicas, aldehídos insaturados, entre otros. Existen otros estudios que utilizaron una dieta basada en grasas y presentaron diferencias en el peso corporal en su modelo en comparación con su grupo control que recibió una dieta normal con alimento para ratón [34]. Estas comparaciones junto con nuestros resultados, nos permite suponer que existe una relación entre una dieta alta basada en grasas reutilizadas con una diferencia en el peso corporal promedio, aunque dicha relación puede ser afectada por otros factores relacionados con el diseño del experimento.Consistentemente con el aumento de la masa corporal en nuestros grupos tratados con aceite utilizado y reutilizado,tuvieron una mayor cantidad de grasa visceral en comparación con el grupo control y el grupo con aceite crudo. Por lo anterior, una dieta alta en grasas utilizadas y reutilizadas de origen vegetal estimula el incremento del tejido adiposo visceral.

Por otro lado, el efecto que tiene un consumo de aceites vegetales sometidos al calentamiento sobre la presión arterial en ratas Sprague-Dawley ha sido descrito con anterioridad [25]. En ese estudio, se demostró que la presión arterial de los grupos alimentados con aceite de soya reutilizado 5 y 10 veces, es mayor en comparación con su grupo control. Con base en esas observaciones, se realizó el monitoreo de la presión arterial como un marcador para establecer el final del tratamiento en nuestro estudio. Además, se observaron que el grupo alimentado con aceite crudo presentó una presión arterial menor en comparación con el grupo control. De igual forma, evaluaron la función endotelial después de su tratamiento, así como la concentración de NO presente en plasma antes, durante y después del tratamiento; observaron una disminución en la concentración de NO y un aumento de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) [25], a lo que los autores atribuyen la hipertensión. Nuestros resultados son congruentes con este estudio previo, ya que nuestros grupos alimentados con aceite utilizado 1 y 10 veces presentaron un incremento en la

presión arterial en comparación con el grupo control y el grupo de aceite crudo. Además confirmamos que existe una disminución en la capacidad de relajación mediada por endotelio en los 3 grupos tratados en comparación con el grupo control. Tomando en cuenta las evidencias previas y nuestros datos, se puede afirmar que el consumo de aceites vegetales reutilizados produce una disfunción endotelial asociada a hipertensión. Realizamos además una inmunohistoquímica que demostró una mayor presencia de nitrotirosina en el endotelio del grupo con aceite reutilizado en comparación con el grupo control. La nitrotirosina es producto de la nitración de la tirosina por acción de las especies reactivas de nitrógeno (RNS), como los peroxinitritos que se generan a su vez a partir del NO endotelial y las especies reactivas de oxígeno (ROS) [38]. Un exceso en la producción de NO, considerado como inducido, reacciona con las ROS, generando una mayor concentración de RNS que a su vez podría estar relacionada con una elevada presencia de nitrotirosina [38]. En este contexto, nuestros resultados sugieren que el NO participa en la nitración de la tirosina, disminuyendo la biodisponibilidad y contribuyendo asi a la disfunción endotelial y a la hipertensión. No obstante, no podemos descartar que otros mecanismos como elevación de producción de angiotensinógenos, endotelina u otros sistemas se alteren y contribuyan a la hipertensión asociada al consumo de aceites reutilizados. Más estudios en esta área son necesarios para explorar la etiología de la hipertensión en nuestro modelo.

En distintos estudios se ha observado que el perfil de lípidos de los modelos utilizados con una dieta basada en grasas, no presentan ninguna diferencia en las concentraciones plasmáticas de CT, Tg, Plp, AGL, glucosa e insulina [12, 25, 34]. De acuerdo con esas observaciones, el perfil de lípidos y el análisis de las HDL en los 4 grupos utilizados, no presentaron ninguna diferencia significativa en las concentraciones de los lípidos plasmáticos. Es importante enfatizar la ausencia de la proteína CETP en la rata como participante en el TRC. El colesterol en la rata se depura del plasma vía las HDL, que son eliminadas a través del hígado por su receptor apo B/E.; la presencia o ausencia de la apolipoproteina tipo E (Apo E) influye en el desarrollo de dislipidemias y ateroesclerosis en ratones [36]. A pesar de que el modelo de ateroesclerosis en rata no es el más adecuado, existen estudios previos con rata en los que utilizaron dietas con ácidos grasos *trans*, poliinsaturados (PUFA) y saturados (SFA) y observaron dislipidemias importantes [22]. Por esta razón, a pesar de que los murinos son mal modelo de ateroesclerosis, hipotetizamos al

inicio de nuestro estudio que las ratas presentarían algún cambio en el perfil de lípidos bajo el tratamiento con aceite tratado. Finalmente, a pesar de la ausencia de alteraciones en el perfil de lípidos de las ratas por la ingesta de aceites reutilizados, las diferencias en el metabolismo intravascular de las lipoproteínas entre la rata y el ser humano, no nos permite excluir el riesgo de dislipidemias en el segundo. Otros estudios en diferentes especies animales son necesarios para confirmar o descartar esta posibilidad.

Por lo general en la clínica no se contempla la determinación de la concentración de AGL en plasma como una determinación de rutina, nosotros la incluimos porque postulamos un posible aumento en su concentración debido a la ingesta de una dieta abundante en triacilgliceroles, además de que en estudios realizados, se ha encontrado que una mayor concentración de AGL en plasma es común en la resistencia a la insulina, así como la relación entre AGL elevados y una posible capacidad citotóxica [37]. En nuestro estudio observamos una mayor concentración de AGL en los grupos tratados con aceite usado y reutilizado en comparación con el grupo control.La presencia de AGL sugería la presencia de esteatosis hepática [35], por esta razón realizamos el estudio histológico correspondiente, el cual confirmó la presencia de lípidos en forma de “gotas”. De esta manera, la ingesta de aceites vegetales favorece también el desarrollo de esteatosis hepática, hallazgo frecuente asociado a la resistencia a la insulina.

Por lo anterior y con base en estudios previos que demostraron que una dieta muy alta en grasas saturadas induce una diferencia significativa en la presencia de insulina y glucosa plasmática [34], en nuestro presente trabajo de investigación decidimos determinar la concentración de glucosa e insulina en plasma; basándonos en los criterios establecidos para el humano, nuestros datos indican claramente que nuestras ratas del grupo tratado con aceite reutilizado habían desarrollado *diabetes.* Asimismo, el grupo alimentado con aceite utilizado y crudo desarrollaron resistencia a la insulina. A nuestro conocimiento, es la primera vez que se reporta la resistencia a la insulina y diabetes tipo 2 por el consumo de aceites vegetales reutilizados. Si bien nuestros resultados no son extrapolable al ser humano, estos hallazgos deben ser considerados como fundamento para establecer políticas de investigación en salud pública dirigidas a establecer el posible efecto tóxico de los aceites vegetales reutilizados.

El presente estudio se realizó con la idea de dar una visión más clara de las posibles consecuencias que tiene el consumo de aceites para cocinar alimentos y reutilizarlos a nivel cardiovascular. Sin embargo, a pesar de que existen estudios basados en dietas con proporciones variables de diferentes tipos de ácidos grasos contenidos en los aceites comestibles, no se había realizado un estudio específico que contemplara los hábitos alimenticios tradicionales de México. Los resultados obtenidos abrieron otras posibles consecuencias a parte de las cardiovasculares, como la presencia de AGL y su probable relación con desarrollar resistencia a la insulina, tener una mayor concentración de glucosa en plasma y por lo tanto desarrollar *diabetes mellitus.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Huff MW. Dietary cholesterol, cholesterol absorption, postprandial lipemia and atherosclerosis. Can. J. Clin. Pharmacol, 2003; 10:26A-32A.

2. Nilsson A., Duan RD. Absorption and lipoprotein transport of sphingomyelin. J Lipid Res. 2006; 47:154-71.

3. Turchetto-Zolet A.C, Maraschin F.S, de Morais GL, Cagliari A, Andrade CM Margis-Pinheire M, Margis R. Evolutionary view of acyl-CoA diacylglicerolacyltransferase (DGAT), a key enzyme in neutral lipid biosynthesis. BMC Evol. Biol, 2011. 11.

4. Von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high-density lipoprotein subclasses. Curr Opin Lipidol. 1994; 5: 404-16.

5. Aguilar-Salinas C, Gómez-Pérez F. Lipoproteínas y aterogénesis. 1. Metabolismo normal de las lipoproteínas. Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. 1989; 2: 22-28.

6. Von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. HDL and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001; 21: 13-27.

7. Sviridov D, Nestel P. Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis. Atherosclerosis. 2002; 161: 245-54.

8. Secretaría de Salud Información epidemiológica de morbilidad 2000. Dirección General de Epidemiología.

9. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience

and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. Atherosclerosis 1996; 124:S11-20.

10. www.canolacouncil.org/health_nutritional.aspx., consultada el 01/09/11, 11:40 pm.

11. Mozaffarian D, Aro A, Willet WC. Health effect of trans-fatty acids: experimental and observation evidence. Eur J Clin Nutr. 2009; 63: S5-21.

12. Grootveld M, Atherton MD, Sheerin AN, Hawkes J, Blake DR, Richens TE, Silwood CJ, Lynch E, Claxs AW. In Vivo Absorption, Metabolism and Urinary Excretion of α,β-Unsaturated Aldehydes in Experimental Animals. J. Clin. Invest. 1998; 101: 1210-8.

13. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Ramírez-Tortosa MC, Cassinello M, Mataix J, Lopez-Frias M, Mañas M. The intake of fried virgin olive or sunflower oils differentially induces oxidative stress in rat liver microsomes. Br J Nutri. 2002; 88: 57-65 2002.

14. Guillen MD, Goicoechea E. Toxic oxygenated a, b-unsaturated aldehydes and their study in foods: a review. Crit Rev Food SciNutr. 2008; 48:119–136.

15. Birlouez-Aragón I, Saavedra G, Tessier FJ, Galinier A, Ait-Ameur L, Lacoste F, Niamba CN, Alt N, Somoza V, Lecerf JM. A diet based on high-heat-treated foods promotes risk factors for diabetes mellitus and cardiovascular diseases. Am J Clin Nutr. 2010; 91: 1220-6.

16. Martin J.C., Joffre F. Cyclic Fatty Acid Monomers from Heated Oil Modify the Activities of Lipid Synthesizing and Oxidizing Enzymes in Rat Liver. J Nutr. 2000; 130: 1524-30.

17. Dobson, G., Christie, WW. and Sebedio, JL. Monocyclic saturated fatty acids formed from oleic acid in heated sunflower oils. Chem. Phys. Lipids. 1996; 82: 101–110

18. Christie, WW, Brechany, EY, Sebedio, JL, LeQuere, JL. Silver ion chromatography and gas chromatography-mass spectrometry in the structural analysis of cyclic monoenoic acids formed in frying oils. Chem. Phys. Lipids. 1993; 66: 143–153.

19. Dobson G, Christie WW. Structural analysis of fatty acids by mass spectrometry of picolinyl esters and dimethyloxazoline derivatives. Trends Anal. Chem. 1996; 15: 130–137.

20. Sebedio JL, LeQuere JL, Morin O, Grandgirard A. Heat treatment of vegetable oils. III. GC-MS characterization of cyclic fatty acid monomers in heated sunflower and linseed oils after total hydrogenation. J. Am. Oil Chem. Soc. 1989; 66: 704–709.

21. Héctor Bourges R. La ateroesclerosis y sus causas 1. Revista del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. 1990; 13, ISSN 0186-3274: 17-31.

22. Monteiro R. Azevedo I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. Mediators Inflamm. 2010; 2010. pii: 289645.

23. Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W. The effect of high-fat and high fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. Diabetes Obes Metab. 2004; 6: 120-126.

24. Winzell MS, Magnusson C, Ahrén B. Temporal and dietary fat content-dependent islet adaptation to high fat feeding-induced glucose intolerance in mice. Metabolism. 2007; 56: 122-8.

25. Leong XF, Mustafa MR, Das S, Jaarin K. Association of elevated blood pressure and impaired vasorelaxation in experimental Sprague-Dawley rats fed with heated vegetable oil. Lipids in Health and Disease. 2010; 9:66

26. Leong XF, Najib MN, Das S, Mustafa MR, Jaarin K. Intake of Repeatedly Heated Palm Oil Causes Elevation in Blood Pressure with Impared Vasorelaxation in Rats.2009; 219: 71-8

27. Ferreira VS, Pernambuco RB, Lopes P, Morais CN, Rodriguez MC, Arruda MJ, Silva LM, Vilar L. Frequency and risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. Arq Bras Endocrinol Metab, 2010; 54: 362-8.

28. Totani N. Ojiri Y. Mild Ingestion of Used frying oil Damages Hepatic and renal Cells in Wistar Rats. J Oleo Sci. 2007; 56: 261-267.

29. Totani N, Ojiri Y. Thermal Deterioration of Oil and Frying Foodstuffs. J. Oleo Sci. 2007; 56: 543-551.

30. Burenjargal M, Totani N. Effects of Thermally Processed Oil on Weight Loss in Rats. J. of Oleo Sci. 2008; 57: 463-470.

31. Lowry OH, Rosebrough HJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-275.

32. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. J Lipid Res 1990; 31: 1131-1139.

33. Williams PT, Krauss RM, Nichols AV. Identifying the predominant peak diameter of high-density and low-density lipoproteins by electrophoresis. J Lipid Res. 1990; 31: 1131-1139.

34. Sörhede W. M, Magnusson C, Ahrén B. Temporal and dietary fat content-dependent islet adaptation to high-fat feeding-induced glucose intolerance in mice. Metabolism. 2007; 56:122-8.

35. Machado RM, Stefano JT, Oliveira CP, Mello ES, Ferreira FD, Nunes VS, de Lima VM, Catanozi S, Nakandakare ER, Lottenberg AM. Intake of Trans Fatty Acids Causes Nonalcoholic Steatohepatitis and Reduces Adipose Tissue Fat Content. J Nutr. 2010; 140: 1127-32.

36. Folkman JK, Loft S, Moller P. Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic Apo E^{-l-} and wild type mice. Mutagenesis. 2007; 22: 105-110.

37. Danielsson A. Fagerholm S. Short-Term Overeating Induces Insulin Resistance in Fat Cells in Lean Human Subjects. Mol. Med. 2009; 15: 228-234.

38. Szabo C. Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction. Br J Pharmacol. 2009; 156, 713-727.

39. Del Mar M, Fernández JA. Different modulation by dietary restriction of adipokine expression in white adipose tissue sites in the rat. Cardiovasc Diabetol. 2009; 8:42.

ANEXO 1

Determinación de proteínas por el método de Lowry

SOLUCIONES

- -Solución de Na_2CO_3: 20 % en H_2O
- -Solución de tartrato de Na y K: 1 g + $CuSO_4$:0.5g
- -Solución de NaOH 0.8N: 16g en 500 mL H_2O
- -Solución de SDS al 10%
- -Solución patrón de albúmina: 1 mg/mL
- -Solución A. Preparar al momento
  - 1 volumen de tartrato de Na y K
  - 1 volumen de Na_2CO_3
  - 2 volúmenes de NaOH
  - 2 volúmenes de SDS
  - 2 volúmenes de H_2O

TÉCNICA

CURVA PATRÓN

Tubo	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**muestra**
MUESTRA (mL)	0	0	0	0	0	0	20
ST (mL)	0	10	20	40	80	100	0
H_2O (mL)	100	90	80	60	20	0	80
			MEZCLAR				
Sol. A (mL)	1	1	1	1	1	1	1

INCUBAR 10 MINUTOS
EN OSCURIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE

Reac. Folin (1/6) (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

INCUBAR 30 MINUTOS
EN OSCURIDAD A TEMPERATURA AMBIENTE

Leer a una longitud de onda de 750 nm

DETERMINACIÓN DE LOS RESULTADOS

Trazar una gráfica de concentración contra absorbancia con los datos de la curva patrón. Interpolar la absorbencia de las muestras en la gráfica para determinar la concentración correspondiente.

ANEXO 2

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas

SOLUCIONES

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MUESTRA

Sacarosa 50% + Azul de bromofenol al 0.05% c.b.p. 20 mL

A= Tris 0.09 M + Ac. Bórico 0.08M + EDTA 3mM pH 8.35

B= 48 g acrilamida + 1.28g bisaclilamidac.b.p. 100mL

C= persulfato de amonio 10%

Vol. total	**3%** **5mL**	**30%** **5 mL**
Sol A	0.5mL	0.5mL
Sol. B	300µL	3 mL
H_2O d	4.2mL	750µL
GLICEROL	---	750µL
TEMED	4µL	4µL
SOL. C	20µL	20µL

1) Depositar 25 μg de proteína/ 2 μL de buffer de muestra.
2) Utilizar marcador de alto peso molecular
3) Migrar 15 min a 40 V(para concentrar las muestras)
4) Migrar 15 min a 70 V (para que entren las muestras al gel)
5) Migrar 22 h a 160 V
6) Teñir el gel con azul de Coomasie

ANEXO 3

Método de Hematoxilina de Harris

PREPARACIÓN DEL COLORANTE.

HEMATOXILINA DE HARRIS.

Hematoxilina…… 1.0 g

Óxido rojo de mercurio……. 0.5 g

Sulfato de aluminio y

Amonio o potasio (alumbre)…….. 20 g

Alcohol etílico absoluto…… 10 cc

Agua destilada……... 200 cc

TÉCNICA.

1. Fijar en formol al 10%.
2. Hacer cortes delgados por parafina.
3. Lavar los cortes en agua destilada.
4. Teñir con hematoxilina de Harris, 1 a 3 minutos (la coloración debe verse homogénea).
5. Virar en agua de la llave o en agua destilada con granos de carbonato de litio.
6. Enjuagar en agua destilada.
7. Deshidratar en dos cambios de alcohol de 96°.
8. Aclarar con xilol.
9. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.