



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre la actividad
mitocondrial hepática de ratas con Diabetes Mellitus Tipo 2.**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

DIANA ALEJANDRA MARTIÑÓN RAMÍREZ

Director de Tesis:

Dr. Ricardo Mejía Zepeda.



Los reyes Iztacala, Tlalnepanitla, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

Al Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnología **PAPIIT No. IN215917-3** otorgado al Dr. Ricardo Mejía Zepeda. UBIMED. FESI-UNAM.

A los miembros del sínodo por ayudarme a mejorar:

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman.

Dr. Martín Palomar Morales.

Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro.

M en C. Luis Barbo Hernández Portilla.

A los integrantes del Laboratorio 4 por su apoyo tanto académico como personal. En especial a Ramiro y Raymundo que me han ayudado mucho, en este trabajo y con los que he compartido tanto durante este tiempo.

Al profesor José Ángel Lara Vázquez, mi tutor académico durante toda la carrera, por su ayuda con el modelo tridimensional del monitor fluorescente, por sus enseñanzas y consejos.

DEDICATORIAS

A mi abuelo, por ser mi ejemplo a seguir en la vida, fuiste una maravillosa persona, la mejor que he conocido y a la que más admiro, espero con gran ilusión poder volver a verte algún día, aunque sea solo en sueños. Muchas gracias por nunca haberte rendido, por querer siempre ver a tu familia unida y por los miles de historias tan bonitas que sigo escuchando de ti. El gran amor que le tenías a tu familia me sigue enseñando cosas nuevas. A mi abuelita, muchas gracias por el gran cariño que le tienes a tu familia, por alegrar siempre mis días con tus ocurrencias y por enseñarme tanto con tu experiencia (gracias por enseñarme a ser López). Gracias a los dos por la gran mujer que me dieron. Los quiero abuelitos y me sorprende todo lo que sigo aprendiendo y seguramente seguiré aprendiendo de ustedes.

A mis abuelitos paternos, porque con ustedes crecí y aprendí las cosas más importantes de mi vida, gracias por su apoyo para mí y mis hermanos, abuelita Lupita gracias por enseñarme que las mujeres pueden lograr lo que se propongan, abuelito gracias por tu cariño y por ser tan consentidor, creo que parte de mi temperamento es herencia tuya. A mi tía Olga, muchas gracias por todo tu apoyo tía, por ser parte de mi aprendizaje y por querer y cuidar tanto de mis abuelitos, es lo que más admiro de ti. Ustedes me han enseñado lo que más aprecio en la vida que es el cariño y respeto para las personas mayores, porque son la voz de la experiencia de las que siempre se aprenden.

A mis padres, gracias por todo su apoyo incondicional, por su esfuerzo y su dedicación que siempre han tenido para mí y mis hermanos. Ma muchas gracias por todo, por ser la mujer fuerte que necesitaba y un gran ejemplo para mí y mis hermanos. Espero tengas mucho éxito en esta nueva vida que decidiste empezar y de la cual estoy muy orgullosa. Gracias por todo tu amor y esfuerzo, eres justamente el reflejo de tus papás. Papa gracias por tu esfuerzo y cariño, por enseñarme que debemos trabajar siempre al 100% y esperar el mejor resultado. En realidad, espero que algún día encuentres la felicidad. Siempre los voy a querer.

A mis hermanos, Luis y Cristian gracias por todas las peleas, juegos y experiencias con las que hemos crecido y aprendido, agradezco que llegaran a mi vida, porque han sido lo mejor, gracias por su apoyo. Es por ustedes que siempre intentare ser una mejor persona. Siempre podrán contar conmigo. Los quiero.

A mis tíos, tías, primos y primas maternos, muchas gracias familia por toda la ayuda que nos han dado, siempre han estado para lo que hemos necesitado y les agradezco mucho. Me gustaría agradecerle a cada uno de ustedes, porque me han ayudado de maneras distintas, pero escribirlo aquí, me llevaría algunas hojas más y prefiero decírselas. Aunque en general puedo decirles que convivir con ustedes me ha hecho ver diferente la vida, he aprendido y me he divertido. Lo que me hace feliz, es escuchar de su vida con mi abuelito, que lo quieran tanto y que intenten complacer su deseo por una familia unida, que se apoya, a pesar de los problemas y disgustos. Los quiero familia y siempre intentare estar para ustedes, como lo esperaba mi abuelito.

Dra. Figueroa. Ha sido en verdad una gran guía para mí, he aprendido mucho tanto académicamente como personalmente, con todas sus enseñanzas, gracias por lo que me ha dicho y por el tiempo que hemos convivido. Ha formado parte del cambio que menciona que vio en mí. Muchas gracias por todo su apoyo. Espero seguir teniéndola en mi vida por mucho tiempo más.

Dr. Ricardo. Gracias por el apoyo durante todo este tiempo. Por ser de las personas más importantes, que me ha guiado en el mundo de la ciencia. Muchas gracias por su paciencia, comprensión y dedicación para que yo pudiera hacer este trabajo. Porque con sus enseñanzas he conocido un enfoque diferente de la vida, que me ha servido a mi toma de decisiones, lo que ha mejorado varias cosas que andaban mal. Espero algún día poder ser su colega y seguir aprendiendo. En verdad aprecio todo su ayuda brinda tanto académica como personalmente.

A mis amigas ("machos") de la carrera, de las que he aprendido mucho, con las que trabajé prácticamente toda la carrera y las que me han apoyado, durante todo este tiempo, Kat (la alfa), Bren (chinos+Aura bebé) y Fer (fernandinini) las quiero mucho chicas, muchas gracias por todo lo que hemos vivido, porque siguen en mi vida, apoyándome y espero sea así por mucho mucho tiempo más, ya saben que cuentan conmigo.

A mis nuevos amigos de la carrera que han sido muy importantes, en esta última etapa, Alexia (sas...) gracias por todos tus consejos, ya tú sabes. A Frida has sido una excelente persona, gracias por escucharme siempre. Kari, Toni y Jiel buenas personas que agradezco tener en mi vida. Gracias por esas últimas prácticas de campo a todos, fueron de lo mejor y gracias por sus consejos. Finalmente, a mis amigos que siempre han estado y que siempre me han escuchado y apoyado. Saben que son especiales. Itzy, Angie e Ivan gracias por todo este tiempo de amistad.

**“El hombre más sabio que he conocido en toda mi vida no sabía leer ni escribir.
Somos la memoria que tenemos y la responsabilidad que asumimos, sin
memoria no existimos y sin responsabilidad quizá no merezcamos existir”.**

José Saramago



ÍNDICE

I. ÍNDICE DE TABLAS	III
II. ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
III. ABREVIATURAS	VI
1. RESUMEN.....	IX
1. ABSTRACT.....	XI
2. INTRODUCCIÓN.....	1
2.1. Diabetes mellitus	1
2.1.1 Diabetes gestacional	1
2.1.2 Diabetes mellitus tipo 1	2
2.1.3 Diabetes mellitus tipo 2	2
2.2. Insulina.....	3
2.3. Diabetes mellitus tipo 2: un problema socioeconómico	4
2.4. Hígado y su importancia metabólica	6
2.5. Membranas biológicas.....	6
2.6. Ácidos grasos y las membranas biológicas	7
2.7. Ácidos grasos poliinsaturados: Ácidos grasos Omega 3.....	9
2.8. Mitocondria	10
2.9. Membranas mitocondriales y actividad mitocondrial	12
2.10. Fluidez membranal.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1. General.....	20
5.2. Particulares.....	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
6.1. Diseño experimental y animales	21

6.2. Sacrificio.....	21
6.3. Obtención de mitocondrias	22
6.4. Medición de la actividad mitocondrial.....	23
6.5. Fluidez membranal.....	23
6.6. Análisis electroforético.....	25
6.7. Análisis matemático y estadístico	27
7. RESULTADOS.....	29
7.1. Actividad mitocondrial.....	29
7.2. Fluidez membranal.....	42
7.3. Análisis electroforético.....	50
8. DISCUSIÓN.....	65
8.1. Actividad mitocondrial.....	66
8.2. Fluidez membranal.....	69
8.3. Análisis electroforético.....	72
9. CONCLUSIONES	77
10. PERSPECTIVAS	78
11. LITERATURA CITADA	79
12. ANEXOS	87
12.1. Cálculo de la fluidez membranal por el gráfico de Arrhenius	87

I. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gel de poliacrilamida-SDS.....	26
Tabla 2. Control respiratorio, estado 3, estado 4 y OPR de mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 1 mes de edad.	30
Tabla 3. Control respiratorio, estado 3, estado 4 y OPR de las mitocondrias de hígado de ratas Wistar, de diferentes edades.	33
Tabla 4. Control respiratorio, estado 3, estado 4 y OPR de las mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 3 meses de edad.	36
Tabla 5. Control respiratorio, estado 3, estado 4 y OPR de las mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 6 meses de edad.	40
Tabla 6. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y cristal líquido de mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 1 mes de edad.....	44
Tabla 7. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y líquido cristal de mitocondrias de hígado de ratas Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad.....	45
Tabla 8. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y cristal líquido de mitocondrias de hígado de ratas de 3 meses de edad.	47
Tabla 9. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y cristal líquido de mitocondrias de hígado de 6 meses de edad.	48

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los ácidos grasos omega 3 (AG ω 3).....	10
Figura 2. Mitocondria. Funciones canónicas bioenergéticas centrales de la mitocondria.	11
Figura 3. Componentes estructurales de la mitocondria..	13
Figura 4. Componentes de la fosforilación oxidativa y complejos respiratorios.....	16
Figura 5. Diseño experimental de los tratamientos.	22
Figura 6. Molécula de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), en 2 D y en 3 D.....	24
Figura 7. Localización del DPH dentro la membrana lipídica..	25
Figura 8. Control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas de 1 mes..	30
Figura 9. Control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas) a diferentes edades.	34
Figura 10. Control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas a 3 meses.....	37
Figura 11. Control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas a 6 meses.....	41
Figura 12. Fluidez membranal de liposomas de DPPC (0.1mM) con el monitor DPH (2 μ M) y análisis de Arrhenius.	43
Figura 13. Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de los grupos normoglicémicos y diabéticos sin AG ω 3 de 1, 3 y 6 meses de edad.....	51
Figura 14. Densitometría del perfil proteico de los grupos normoglicémicos y diabéticos sin AG ω 3 de 1mes.....	53
Figura 15. Densitometría del perfil proteico de los grupos normoglicémicos sin AG ω 3 de 1, 3 y 6 meses.	54
Figura 16. Densitometría del perfil proteico de los grupos diabéticos sin AG ω 3 de 1 3 y 6 meses.....	55
Figura 17. Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de los grupos normoglicémicos y diabéticos sin y con AG ω 3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 3 meses.....	56
Figura 18. Densitometría del perfil proteico de los grupos normoglicémicos sin y con AG ω 3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 3 meses.....	59

Figura 19. Densitometría del perfil proteico de los grupos diabéticos sin y con AG ω 3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 3 meses	60
Figura 20. Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de los grupos normoglicemicos y diabéticos sin y con AG ω 3 a 1, 3 y 7 días a la semana, de 6 meses.....	61
Figura 21. Densitometría del perfil proteico de los grupos normoglicémicos sin y con AG ω 3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 6 meses.....	63
Figura 22. Densitometría del perfil proteico de los grupos diabéticos sin y con AG ω 3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 6 meses.	64
Figura 23. Clasificación de las proteínas mitocondriales identificadas según su función (Fox, 2012).	73
Figura 24. Caracterización termotrópica de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar, a) 1 mes b) Gráfico de Arrhenius de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 1 mes.	87
Figura 25. Caracterización termotrópica de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar a diferentes edades.....	88
Figura 26. Gráfico de Arrhenius de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar a diferentes edades.....	89
Figura 27. Caracterización termotrópica de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 3 meses.....	90
Figura 28. Gráfico de Arrhenius de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 3 meses.	91
Figura 29. Caracterización termotrópica de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 6 meses.....	92
Figura 30. Gráfico de Arrhenius de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 6 meses.	93

III. ABREVIATURAS

μ	Movilidad electroforética
ADA	American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes)
ADP	Adenosín difosfato
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AGω3	Ácidos grasos omega 3
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosín trifosfato
CN	Grupo control (sin tratamiento de AGω3 y normoglucémicas)
CN 1d-3m	Grupo de 3 meses de edad normoglucémico con tratamiento de AGω3 1 día a la semana
CN 1d-6m	Grupo de 6 meses de edad normoglucémico con tratamiento de AGω3 1 día a la semana
CN 3d-3m	Grupo de 3 meses de edad normoglucémico con tratamiento de AGω3 3 días a la semana
CN 3d-6m	Grupo de 6 meses de edad normoglucémico con tratamiento de AGω3 3 días a la semana
CN 7d-3m	Grupo de 3 meses de edad normoglucémico con tratamiento de AGω3 7 días a la semana
CN 7d-6m	Grupo de 6 meses de edad normoglucémico con tratamiento de AGω3 7 días a la semana
COX	Subunidades del complejo IV
CR	Control respiratorio
cyt c	Citocromo c
DHA	Ácido docosahexaenoico
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DG	Diabetes mellitus Gestacional
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPH	Monitor fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
DPiP	1,3-Dipirenil-propano

Ea	Energía de activación
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ER	Retículo endoplasmático
FAD	Flavín Adenín Dinucleótido
FADH₂	Dinucleótido de Flavina y Adenina
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos
GLP-1	Péptido similar al glucagón 1 (suprime la liberación de glucagón)
H+	Catión de hidrógeno (electrones)
H₂O	Agua
HMG-CoA reductasa	3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa
HMG-CoA sintasa	3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintasa
IDF	International Diabetes Federation (Federación Internacional de Diabetes)
IMS	Espacio Intermembranal
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
KDa	Kilodaltones
MDA	Malondialdehido
MDM	Mitochondrial Dynamics and Morphology (Dinámica y Morfología Mitocondrial)
Mdm 10	Proteína de β-barril de la membrana mitocondrial
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida y Adenina
NDDG	National Diabetes Data Group (Grupo Nacional de Datos de Diabetes)
O₂	Oxígeno diatómico
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPR	Tasa de Fosforilación Oxidativa (O:P Ratio por sus siglas en inglés)
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
Pi	Fosfato inorgánico
PPAR	Receptores Asociados a Proliferación Peroxisomal
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SAM	Maquinaria de asociación y ensamblaje de la membrana mitocondrial

	externa
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio bajo condiciones desnaturalizantes
SREBP1	Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides.
STZ	Grupo inducido a diabetes con estreptozotocina sin tratamiento de AGω3
STZ 1d-3m	Grupo de 3 meses de edad inducido a diabetes con tratamiento de AGω3 1 día a la semana
STZ 1d-6m	Grupo de 6 meses de edad inducido a diabetes con tratamiento de AGω3 1 día a la semana
STZ 3d-3m	Grupo de 3 meses de edad inducido a diabetes con tratamiento de AGω3 3 días a la semana
STZ 3d-6m	Grupo de 6 meses de edad inducido a diabetes con tratamiento de AGω3 3 días a la semana
STZ 7d-3m	Grupo de 3 meses de edad inducido a diabetes con tratamiento de AGω3 7 días a la semana
STZ 7d-6	Grupo de 6 meses de edad inducido a diabetes con tratamiento de AGω3 7 días a la semana
TMA-DPH	Trimetil Amonio Difenil 1,3,5-Hexatrieno
U/S	Índice de Ácidos grasos insaturados/Ácidos grasos saturados
UQ	Ubiquinona
UQH₂	Coenzima Q reducida
VC	Veces de Cambio, respecto al grupo control

1. RESUMEN

La diabetes mellitus es el trastorno metabólico de mayor crecimiento en el mundo, se ha convertido en una de las principales causas de enfermedad y muerte. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un padecimiento progresivo en el que el control glucémico tiende a empeorar con el paso del tiempo, debido a la falta de acción de la insulina, ya sea por defectos en su síntesis, modificaciones del receptor, o alteraciones en los mecanismos intracelulares de acción de esta hormona. La DM2 es responsable del 90 a 95% de los casos clínicos en el mundo, cuyas complicaciones crónicas, microvasculares y macrovasculares provocan elevados costes socio-sanitarios y la pérdida de la calidad de vida de los pacientes y de sus familiares. Por los supuestos efectos benéficos de los ácidos grasos omega 3 (AG ω 3), se han visto como una opción complementaria y eficaz para el tratamiento en contra de la diabetes y las dislipidemias junto con estatinas, sin embargo, no se tienen aún resultados concluyentes de dichos efectos y menos aún de los mecanismos de acción. Las mitocondrias tienen un papel central en el metabolismo de las células y se conoce que con el desarrollo de la diabetes se generan diferentes alteraciones morfológicas y funcionales en ellas. Los cambios fisicoquímicos de las membranas, de cualquier tejido, están directamente correlacionados con la composición de los ácidos grasos y la fluidez de la membrana, por lo que se decidió analizar el efecto de los (AG ω 3) sobre la fluidez y la respiración de mitocondrias del hígado de ratas con Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2). Se indujo diabetes a ratas Wistar macho de 48 horas de edad con estreptozotocina. Se suministraron AG ω 3 (125 mg/kg) por 1, 3 o 7 días a la semana, a ratas diabéticas y normoglucémicas. Se sacrificaron a 1, 3 y 6 meses de edad, se obtuvieron mitocondrias del hígado para el registro de la actividad mitocondrial mediante oximetría y se obtuvo el Control Respiratorio (CR). La fluidez membranal, se midió con el monitor fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), para obtener las características termotrópicas, se calcularon las Energías de Activación (Ea) y por último se analizó el perfil proteico de mitocondrias por electroforesis con gel de poliacrilamida y los geles, por densitometría. Se observó una disposición a disminuir el CR con el aumento de la edad, comportamiento que se ve más marcado para los grupos diabéticos. Para los grupos de 3 meses de edad los datos son heterogéneos en el CR tanto para las ratas normoglucémicas como en las ratas diabéticas. En los grupos de 6 meses de edad para las ratas control, entre mayor fue la frecuencia de administración de ácidos grasos omega 3, menor es el control respiratorio. En ratas inducidas a diabetes, cualquier administración de ácidos grasos omega 3 las ayuda a normalizar el control respiratorio. Para los animales de 1 mes de edad la Energía de activación (Ea) sugiere cambios importantes en las membranas durante el desarrollo de la diabetes, siendo esta más fluida.

Para los grupos de 3 meses de edad las diferentes dosificaciones de AG ω 3 provocan condiciones similares a las del grupo control en ratas diabéticas; sin embargo, en las ratas normoglucémicas los AG ω 3 provocan una menor fluidez parecida al grupo diabético. El análisis electroforético de los grupos diabéticos de 3 y 6 meses con AG ω 3, muestra que son similares al grupo control. Las ratas diabéticas de 1, 3 y 6 meses presentaron cambios, particularmente, en la expresión de la proteína de 165 kDa.

En conclusión, los resultados indican que la administración de los AG ω 3 puede llevar a la normalización de las propiedades fisicoquímicas de las membranas, alterando con ello la actividad mitocondrial, lo que aparentemente puede favorecer el control de daños causado por la patología, sin embargo, para los grupos normoglucémicos el comportamiento es contrario, ya que parece favorecer el desarrollo de diabetes.

1. ABSTRACT

The diabetes mellitus is the metabolic disorder of major growth in the world, turning into one of the principal reasons of disease and death. The Type 2 Diabetes Mellitus (DM2) is a progressive disease where the glycemic control tends to deteriorate with the passage of time, due to the lack of action of the insulin, defects in his synthesis, because of modifications of the receptor, or alterations in the intracellular mechanisms of action of this hormone. The DM2 is responsible for 90 to 95 % of the clinical cases in the world, where the chronic complications, microvascular and macrovascular, leads to high sanitary costs and the loss of the quality of life of the patients and their relatives. Because of the supposed beneficial effects of the omega 3 fatty acids (FA ω 3), they are considered as a complementary option for the treatment of diabetes, as well as for dyslipidemias together with statins; however, there are not concluding results about their effects and even less about their mechanisms of action. The mitochondria have a central role in cell metabolism and it is known that during diabetes development, several morphological and functional alterations are produced on them. It has been seen that the physicochemical changes in any kind of membrane, is directly related with the fatty acids composition and also related with the membrane fluidity, which is why the reason because the effect of the FA ω 3 on the fluidity and mitochondrial respiration of liver mitochondria in DM2 was analyzed. Diabetes was induced in 48 hours-old male Wistar rats with streptozotocin. The FA ω 3 were administered (at doses of 125 mg/kg) for 1, 3 or 7 days per week for 2 and 5 months, to diabetic and normoglycaemic rats. The rats were killed at 1, 3 or 6 months-old, liver mitochondria were obtained for measurements of mitochondrial activity by oxymetry for obtaining the respiratory control (RC). The membrane fluidity was measured with the fluorescent monitor 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) for obtaining thermotropic characteristics calculating the Activation energies (Ea) and finally the SDS- PAGE electrophoretic protein profile was analyzed; the gels were analyzed by densitometry . It was observed that the RC decreases as the age increases, tendency that was more prominent in the diabetic groups. In the 3 months-old group of rats the results of the RC are heterogeneous in normoglycemic and diabetic rats. In the 6 months-old control group of rats, the higher the frequency of omega 3 fatty acids supply, the lower the respiratory control. In rats induced to diabetes, any supply of omega 3 fatty acids helps to normalize the respiratory control. In 1 month-old animals the Ea suggest important changes in the membranes during the diabetes development, making them more fluids. It was not observed a unique tendency in the activation energies in the gel and liquid-crystal phases related with the age of the rats. In the 3 months-old groups, the different FA ω 3 doses drives to normal condition to diabetic rats, but the FA ω 3 induce in the normal rats a lower fluidity similar to the diabetic

group. The proteic expression in diabetic groups, both in 3 and 6 months-old animals, there is a tendency to shown normal densitometric scores, close to normal group.

In conclusion the results indicate that the FAw3 supply can drive to normalization of the physicochemical properties of the membranes, altering the mitochondrial activity, which apparently may participate in the control of damages produced by the pathology; however, in the normoglycemic groups the results are different because it seems to stimulate the development of diabetes.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Diabetes mellitus

Actualmente a escala mundial se estima que los casos de diabetes mellitus (DM) son cercanos a 425 millones, cifra que se prevé para el 2045 aumentará a 693 millones, mientras que otros 352 millones de personas con alteración de tolerancia a la glucosa corren un alto riesgo de generar diabetes (IDF, 2017).

La DM es un síndrome crónico de causas múltiples que representa un grupo de enfermedades metabólicas que se caracterizan por hiperglucemia resultante de defectos en la secreción y/o la acción de la insulina. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia con daño a largo plazo, disfunción y falla de diferentes órganos, especialmente los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos; además, ocurren alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Se sabe que la DM comprende un grupo heterogéneo de enfermedades y que los diversos tipos de diabetes tienen causas distintas, aunque sus efectos patológicos son similares. Distinguir sus distintas variedades, ayuda a una mejor comprensión de la DM (Harris, 2003; Lyra *et al.*, 2009).

Uno de los elementos principales para la investigación y para guiar la conducta terapéutica y diagnóstica ante esta enfermedad, es una clasificación apropiada, de acuerdo con la American Diabetes Association (ADA, 2011) quienes propusieron cambios en la clasificación de la National Diabetes Data Group y la OMS (NDDG, 1979; OMS, 1980), se identifican 2 tipos principales de diabetes, que son los que más se presentan: la diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), dentro de esta clasificación, pero con menor frecuencia, también se encuentra la diabetes mellitus gestacional (DG) y otros tipos específicos de diabetes como la diabetes monogénica que es resultado de una mutación genética en un solo gen autosómico dominante a la vez, y la diabetes secundaria que surge como complicaciones de otras enfermedades o por el uso de algunos medicamentos (Harris, 2003; ADA, 2017).

2.1.1 Diabetes gestacional

Este tipo de diabetes se ha definido como toda alteración del metabolismo de los carbohidratos, de severidad variable, que se reconoce durante el embarazo. La DG no sólo es un trastorno de la homeostasis de la glucosa, sino también un desorden de otras moléculas que también dependen de la insulina; se asocia con un desarrollo fetal anormal, conocido como

macrosomía (excesivo crecimiento fetal) y mortalidad perinatal; también se incrementa el riesgo de traumas en el parto y en la madre provoca un mayor riesgo de desarrollar DM2 después del embarazo (Harris, 2003; Lang y Márquez, 2009; ADA, 2011).

2.1.2 Diabetes mellitus tipo 1

La DM1, también conocida como diabetes mellitus insulino dependiente, es una condición crónica de deficiencia de insulina resultado de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, con desaparición casi completa de la secreción de insulina. En este tipo de diabetes los factores genéticos y ambientales, como infecciones virales, toxinas o algunos factores dietéticos juegan un papel muy importante como desencadenantes. La enfermedad se caracteriza por el comienzo repentino de síntomas intensos, la necesidad de administrar insulina exógena y la tendencia a la cetosis incluso en estado basal, todo ello producido por la deficiencia absoluta de insulina. Una de las complicaciones microvasculares es la nefropatía. Los pacientes con DM1 y nefropatía diabética, tienen incrementado el riesgo de morbilidad y padecimiento cardiovascular. Se distinguen dos subclases, una variedad autoinmunitaria y otra idiopática. Su incidencia se encuentra en aumento en todo el mundo, sin embargo, la DM2 es la que se representa en la mayoría de los casos de diabetes (Pugliese, 2003; Lang y Márquez, 2009; IDF, 2015).

2.1.3 Diabetes mellitus tipo 2

La DM2 es un complejo trastorno endocrino y metabólico en el que la interacción entre factores genéticos y ambientales genera una patología heterogénea y progresiva con grados variables de resistencia a la insulina, disfunción de células β pancreáticas y células α , así como otras alteraciones endocrinas. Las deficiencias de las células β del páncreas son el resultado de una combinación de insuficiencia parcial, una respuesta secretoria inadecuada de insulina, y resistencia a la acción de la insulina. La DM2 se caracteriza por un inicio insidioso, lento y en donde no siempre se requiere el uso de insulina para su tratamiento (Lyra *et al.*, 2009; ADA, 2011; Tahrani *et al.*, 2016).

En las fases tempranas de la DM2 inducida por resistencia, es característica una excesiva producción de insulina; inicialmente la resistencia insulínica es compensada por el páncreas que secreta más insulina, manteniendo las concentraciones de glucosa adecuadas. Conforme el síndrome avanza las concentraciones de insulina puede disminuir ya que la capacidad de secreción pancreática va disminuyendo, conduciendo a estados progresivos de

hiperglucemia. A partir de allí, la propia hiperglucemia, a través del fenómeno de glucotoxicidad, ejerce efectos dañinos, perjudicando tanto la función secretora de la célula beta como la captación periférica de glucosa (Amos *et al.*, 1997; Rull *et al.*, 2009). La hiperglucemia es la característica bioquímica fundamental de la DM2, causa estrés oxidativo y nitrosativo, activación de las vías inflamatorias y la disfunción endotelial, además de precipitar las complicaciones microvasculares y contribuir a la enfermedad macrovascular, que son las principales causas de morbilidad y mortalidad (Tahrani *et al.*, 2016).

2.2. Insulina

La insulina es la principal hormona polipeptídica anabólica que regula la homeostasis de la glucosa; es sintetizada y secretada a la circulación por las células β del páncreas en respuesta a las concentraciones crecientes de glucosa en la sangre. Las células β de los islotes pancreáticos de Langerhans constituyen del 65 al 80% de todas las células del islote. La biosíntesis y el procesamiento de la molécula de insulina en la vía secretoria de la célula es un proceso altamente regulado y dinámico. Es secretada a una variedad de estímulos, incluidos la glucosa, amino ácidos, Péptido similar al glucagón 1 (GLP-1) y drogas como lo son las sulfuronilureas (Matthews, 2010; Bełtowski *et al.*, 2018).

La insulina en el hígado, estimula la glucocinasa, fosfofructocinasa I y la piruvatocinasa, por lo que aumenta la glucólisis y estimula la conversión de glucosa a glucógeno. En los músculos esqueléticos, la insulina estimula la captación de glucosa y el almacenamiento de glucógeno. En el tejido adiposo la glucosa se metaboliza parcialmente en la formación de los ácidos grasos para almacenarse en los triglicéridos. En ayuno la glucosa se libera de las reservas hepáticas de glucógeno mediante la glucogenólisis, que es estimulada por el glucagón producido por las células α de los islotes pancreáticos. Posteriormente, si el ayuno es prolongado, las reservas de glucógeno se agotan y la administración adicional de glucosa se satisface con la gluconeogénesis a partir de sustratos como lactato, glicerol y aminoácidos. En los períodos entre comidas y en ayunas, la secreción de insulina inhibe la glucogenólisis y gluconeogénesis en el hígado, así como también suprime la descomposición de triglicéridos en el hígado y tejido adiposo. La falta de secreción de insulina o el deterioro en la acción de ésta agrupa un número de factores de riesgo como, trastornos metabólicos característicos de la diabetes mellitus y problemas cardiovasculares, entre ellos, obesidad (particularmente obesidad central) dislipidemia, e hipertensión (German, 2003; Bełtowski *et al.*, 2018).

Simoneau y Kelley (1997) sugirieron que una alteración de la capacidad oxidativa mitocondrial y la capacidad glucolítica pudiera ser un componente importante en el desarrollo de resistencia a la insulina; ya que encontraron que en la relación entre las actividades de hexocinasa y citrato sintasa se presenta una fuerte correlación con la sensibilidad a la insulina, a partir de estas observaciones, surgió el interés por ver si existe algún tipo de relación entre la morfología y el metabolismo mitocondrial ya que se cree que una disfunción mitocondrial (tanto primaria o secundaria a otras iniciales) pudiera ser un elemento central en la fisiopatología de la obesidad y/o de la diabetes (Zorzano *et al.*, 2004).

Por lo que se ha visto, la insulina juega un papel esencial en el mantenimiento de la concentración de glucosa en sangre dentro del rango normal, al unirse a receptores específicos presentes en las superficies celulares, lo que sirve de señal para la captación de nutrimentos, el almacenamiento de energía y el crecimiento. La glucosa es considerada como el sustrato más importante, por lo que tiene una influencia significativa y un efecto totalmente dependiente de la concentración. En la patología de la diabetes la hiperglucemia representa un problema clínico ya que la glucosa tiene un gran efecto osmótico y puede deshidratar a la célula en un periodo relativamente corto, y en un periodo más largo, su interacción con las proteínas y la glicación irreversible de estas, aumenta la susceptibilidad de problemas macro y micro vasculares (German, 2003; Matthews, 2010; Beltowski *et al.*, 2018).

2.3. Diabetes mellitus tipo 2: un problema socioeconómico

La diabetes tipo 2 corresponde a la mayoría de los casos de diabetes en el mundo siendo la responsable del 90% a 95% de los casos clínicos (Lyra *et al.*, 2009). Antes esta patología era considerada propia de personas de mediana edad a partir de los 40 años, y ancianos, pero ahora se está detectando en grupos más jóvenes, de adolescentes y niños; especialmente en las poblaciones con obesidad y sobrepeso (OMS/FAO, 2003). De acuerdo con la Federación Internacional de Diabetes (IDF), China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México, son los países con mayor número de diabéticos (IDF, 2015). La importancia de la diabetes como problema de salud está determinada por el desarrollo y progresión de sus complicaciones crónicas, microvasculares y macrovasculares, que afectan la calidad de vida del diabético y provocan altas tasas de morbilidad, mortalidad y elevados costes socio-sanitarios. Estas complicaciones afectan principalmente el aparato vascular y origina cifras excesivas de arteriopatía coronaria, nefropatía e insuficiencia renal, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, retinopatía y ceguera, enfermedad vascular periférica, neuropatías y amputaciones (Bennett, 2003; OMS, 2016; Beltowski *et al.*, 2018).

El tratamiento de la DM2 tiene como objetivo principal alcanzar concentraciones normales (o casi normales) de glucosa en sangre, para lo cual existen varias estrategias como los cambios en el estilo de vida, incluida la dieta, la pérdida de peso y la actividad física. Debido a la naturaleza progresiva de la DM2 y la dificultad en el mantenimiento de los cambios en el estilo de vida a largo plazo, la mayoría de los pacientes también requieren terapias orales, siendo la metformina el tratamiento inicial más utilizado en todo el mundo, eventualmente con el progreso de la DM2 se recurre a tratamientos inyectables, como las inyecciones de insulina. Para el tratamiento de la DM2 actualmente existen distintas terapias combinadas disponibles, como metformina, las sulfonilureas, la acarbosa, los inhibidores de dipeptidil peptidasa IV, agonistas del receptor del péptido 1 (GLP-1) similares al glucagón, los inhibidores del cotransportador 2 de la glucosa, derivados de sulfonilurea y tiazolidinedionas (Tahrani *et al.*, 2016; Beltowski *et al.*, 2018).

En el 2017 los costos sanitarios dedicados al tratamiento de la diabetes y sus complicaciones alcanzaron los 727 mil millones de dólares del gasto mundial en atención sanitaria, por lo que a pesar de la carga económica que esta presupone, el financiamiento para su prevención sigue siendo inexplicablemente insuficiente; y la diabetes crece con mayor rapidez en las ciudades de países de ingresos bajos y medios (IDF, 2017).

Para México la diabetes es uno de los problemas más graves de salud pública ya que cerca del 10% de la población la padece y es de las primeras siete causas de muerte con un 15% de los decesos totales, convirtiendo la falla en su control en una carga económica de grandes dimensiones para el sistema nacional de salud y por lo tanto para el país. En el continente americano, México tiene la mayor contribución a la mortalidad por diabetes y una de las tasas de mortalidad más altas del mundo (Fundación Mídete, 2016; OMS, 2016; INEGI, 2017).

Existen suplementos para diabéticos a base de aceite de pescado que están ampliamente disponibles y son comúnmente utilizados por los consumidores, al igual que medicamentos, los cuales están suplementados con ácidos grasos omega-3 de cadena larga aprobados por la FDA (Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos) y que pueden obtenerse sólo con receta médica, ya que han suscitado un gran interés como una de las estrategias propuestas para reducir la morbilidad y la mortalidad que traen consigo las complicaciones de la diabetes. El interés por estos ácidos grasos surgió después de que Dyerberg (1986) observara que el consumo de pescados de carne azul disminuye la incidencia

de cardiopatía isquémica (Nasiff-Hadad y Meriño-Ibarra, 2003; Tajuddin *et al.*, 2016). En la sección de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI): Ácidos grasos Omega 3 (AG ω 3), se hablará de los cambios producidos por estos en el metabolismo lipídico y glucídico y en las funciones de las membranas celulares.

2.4. Hígado y su importancia metabólica

El hígado es un órgano importante, encargado de numerosas funciones orgánicas. Algunas de ellas son: almacenamiento de varios nutrientes, como las vitaminas A, D, B-9 y B12, así como, el almacenamiento del hierro y su participación en la incorporación del hierro al grupo hemo; sintetiza varias proteínas esenciales tales como los factores de coagulación y los factores inmunitarios; también es crucial para la eliminación de sustancia nocivas para el organismo, por lo que es necesario para el funcionamiento adecuado de la sangre. Sin embargo, un papel importante del hígado es el que juega en el metabolismo de la glucosa donde en estado basal, la euglucemia se mantiene por un ciclo de retroalimentación dinámica entre el hígado y las células beta. También participa de manera significativa en el metabolismo de lípidos, del colesterol, de los ácidos grasos, e incluso en el sistema inmunitario (Matthews, 2010; Franciscus y Highleyman, 2012).

El hígado es el centro de la síntesis de ácidos grasos y la circulación de lípidos a través de la síntesis de lipoproteínas. Es un tejido importante para la construcción de membranas biológicas, ya que los ácidos grasos sintetizados en el hígado se exportan a través de la producción de lipoproteínas, y así proporcionan una fuente de energía y componentes estructurales para la construcción de membranas (Nguyen *et al.*, 2008).

Las lesiones hepáticas afectan a casi todos los sistemas orgánicos, entre ellos al digestivo, endocrino, cardiovascular e inmunitario. En la DM2 la hiperglucemia se caracteriza por una mayor producción de glucosa en el hígado y el riñón. En presencia de resistencia a la insulina, la mayor producción de glucosa por el hígado contribuye a la hiperglucemia junto con la deposición de glucosa reducida en el músculo esquelético, el corazón y el tejido adiposo (Xia *et al.*, 2011).

2.5. Membranas biológicas

Las membranas biológicas son ensamblajes de lípidos y proteínas en donde los componentes se mantienen juntos formando estructuras laminares, finas, flexibles y relativamente estables que rodean a todas las células. La mayoría de las membranas biológicas

posee la misma estructura básica: una bicapa lipídica formada por fosfolípidos y proteínas que están insertadas, o unidas de forma indirecta; diversas proteínas y carbohidratos, se unen con los lípidos y las proteínas. La bicapa lipídica tiene tres tipos principales de lípidos, fosfoglicéridos, esfingolípidos y colesterol. Esta bicapa sirve sobre todo como una columna estructural para la membrana y establece la barrera que impide los desplazamientos aleatorios de materiales hidrosolubles hacia dentro o fuera de la célula. Por otro lado, las proteínas de la membrana realizan la mayoría de las funciones específicas que son necesarias para la célula. Existen dos clases de proteínas de membrana, integrales (embebidas en las membranas por los aminoácidos hidrofóbicos de la proteína situados dentro de la membrana) y periféricas (adheridas a través de un enlace covalente con una molécula lipídica). La proporción entre lípidos y proteínas en la membrana varía, según el tipo de membrana celular, el tipo de organismo y el tipo de célula, estas diferencias pueden relacionarse con las funciones básicas de estas membranas (Mckee y Mckee, 2009; Karp, 2013).

Las membranas son estructuras vitales para la vida de las células, estas protegen a la célula del entorno exterior, forman los límites entre diferentes compartimientos donde tienen lugar procesos particulares como el metabolismo y la señalización celular. Además de proporcionar un andamio pasivo para receptores y otras proteínas, los lípidos de membrana también pueden jugar un papel activo contribuyendo a la transducción de señales (como la señal de apoptosis por la pérdida de la asimetría de la membrana caracterizada por la aparición de fosfatidilserina en la superficie extracelular de la membrana plasmática de mamíferos). No sólo las especies de lípidos individuales están involucradas en la señalización, además las propiedades físicas de la membrana como el grosor de la bicapa o la presión lateral también pueden afectar y, por lo tanto, regular la función de las proteínas de membrana (Stöckl y Herman, 2010).

2.6. Ácidos grasos y las membranas biológicas

Los lípidos de una membrana son más que simples elementos estructurales, ya que pueden tener efectos importantes en las propiedades biológicas de una membrana. La composición lipídica determina el estado físico de la membrana e influye en la actividad de las proteínas particulares de la misma. Estos lípidos también aportan los precursores para los mensajeros químicos altamente activos que regulan la función celular. La mayoría de los lípidos de la membrana contiene un grupo fosfato (fosfolípidos), casi todos los fosfolípidos de la membrana están formados sobre una columna de glicerol (fosfoglicéridos). Los glicéridos de la

membrana son diglicéridos, sólo dos de los grupos hidroxilo del glicerol están esterificados con ácidos grasos, el tercero está esterificado con un grupo fosfato hidrófilo que tiene un grupo adicional, casi siempre colina, etanolamina, serina o inositol. Un ácido graso de la membrana puede estar completamente saturado (sin enlaces dobles), monoinsaturado (tiene un enlace doble) o poliinsaturado (cuenta con más de un enlace doble). Los fosfoglicéridos a menudo contienen una cadena acilo insaturada y una saturada. Esta composición le confiere a la membrana diferentes características en las propiedades fisicoquímicas y por lo tanto los ácidos grasos pueden afectar las funciones de las membranas celulares, por lo que el interés, en fechas recientes, se han enfocado en los probables beneficios a la salud de dos ácidos grasos poliinsaturados, el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) (Karp, 2013).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos que contiene en general cadenas hidrocarbonadas de longitudes variables (entre 12 y 20 carbonos), los ácidos grasos naturales poseen un número par de átomos de carbono que forman una cadena sin ramificaciones. Los ácidos grasos son moléculas muy flexibles que pueden adoptar una amplia gama de conformaciones porque hay una rotación relativamente libre alrededor de cada uno de los enlaces C-C (Voet, 2006). El grupo carboxílico tiene afinidad por el agua, pero las largas cadenas hidrocarbonadas no polares hacen a la mayoría de los ácidos grasos insolubles al agua (Mckee y Mckee, 2009).

Diversos estudios muestran que una mayor ingesta de ácidos grasos insaturados (AGI) de origen vegetal y AGPI se ha asociado a un menor riesgo de DM2 que conlleva una mejora de la tolerancia a la glucosa y sensibilidad a la insulina (Vessby *et al.*, 2001).

Pilon (2016) menciona que el exceso de ácidos grasos saturados (AGS) (obtenidos a través de una dieta rica en grasas saturadas o a través de la conversión de azúcares en grasas saturadas a través de la lipogénesis) conduce a membranas celulares rígidas que perjudica la señalización de insulina, la absorción de glucosa y la circulación sanguínea, contribuyendo así al desarrollo de DM2. También Nguyen *et al.*, (2008) dicen que los ácidos grasos regulan la expresión génica mediante el control de la actividad o la abundancia de factores clave de transcripción, que a nivel molecular juegan un papel crucial; existiendo un vínculo entre las alteraciones en sus funciones y la aparición de enfermedades metabólicas importantes.

2.7. Ácidos grasos poliinsaturados: ácidos grasos omega 3

El ácido α -linolénico (18:3 ω 3) y sus derivados, como el EPA (20:5 ω 3) y el DHA (22:6 ω 3), son AG ω 3, se describen así porque su último enlace doble se sitúa a tres carbonos del extremo metilo (CH₃) de la cadena acilo (**figura 1**). Estos ácidos grasos pertenecen a la familia de los ácidos grasos esenciales, lo cual significa que no son sintetizados por el organismo humano y por lo tanto, tienen que ser ingeridos en la dieta. Entre las fuentes de ácido α -linolénico se incluye el aceite de linaza, de pescado, de soya y de nueces de Castilla (Nasiff-Hadad y Meriño-Ibarra, 2003; Mckee y Mckee, 2009).

Las membranas celulares requieren AGPI para mantener su estructura, fluidez, y la función; los ácidos grasos omega-3 de cadena larga son incorporados en las membranas celulares, por lo general en la posición sn-2 de los fosfolípidos de la membrana, donde sirven como sustrato de varias enzimas (Norris *et al.*, 2007). El EPA y el DHA se encuentran en alta concentración en el aceite de pescado. Estos tienen cinco y seis enlaces dobles, respectivamente, y se incorporan sobre todo en moléculas de fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) de ciertas membranas, sobre todo en el cerebro y la retina (Karp, 2013). Con frecuencia se prescriben los AG ω 3 en la diabetes y las dislipidemias como opción complementaria eficaz para el tratamiento con estatinas para la reducción del riesgo cardiovascular residual (Tajuddin *et al.*, 2016). Sin embargo, este grupo de AGPI provoca múltiples cambios tanto en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, como en las funciones de las membranas celulares, en los mecanismos trombogénicos y en la respuesta inmune e inflamatoria, mediante sustituciones de los ácidos grasos en la membrana.

Los cambios en la membrana han hecho necesario revisar el balance beneficio-perjuicio que los AG ω 3 pudieran provocar en el tratamiento contra la diabetes. Por ejemplo, se conoce que en los pacientes diabéticos esta enfermedad se asocia frecuentemente a dislipidemias y a un mayor riesgo de aterosclerosis (Nasiff-Hadad y Meriño-Ibarra, 2003), pero la pregunta a resolver es si su uso en estos pacientes tendrá efectos benéficos o no.

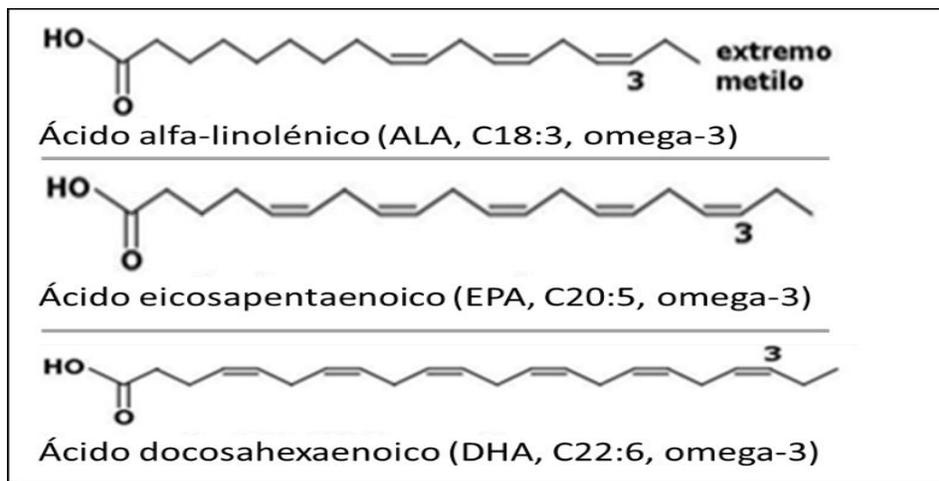


Figura 1. Estructura de los ácidos grasos omega 3 (AG ω 3). Modificado de: <http://www.nutracentr.org/Secretos-del-colesterol--La-importancia-de-los-acidos-grasos-omega-3-y-omega-6-7-nutart>

Después de investigaciones en donde se ha evaluado el efecto que los AG ω 3 producen sobre la glucemia, en personas diabéticas y no diabéticas, se habla de probables efectos benéficos en contra de la diabetes (Nasiff-Hadad y Meriño-Ibarra, 2003) sin embargo, no se tienen aún resultados concluyentes de dichos efectos y menos aún de los mecanismos por los cuales podrían tener efecto. En este trabajo nos interesa investigar si los AG ω 3 tienen efectos benéficos en un modelo de diabetes tipo 2 en ratas, así como estudiar si su posible efecto está relacionado con modificaciones sobre las propiedades fisicoquímicas de las membranas biológicas, para lo cual se utilizarán mitocondrias de hígado.

2.8. Mitocondria

Las mitocondrias son organelos complejos que están presentes en todas las células eucariontes, excepto en los eritrocitos de la mayoría de las especies, se encuentran en el citosol, a menudo adyacente al retículo endoplásmico (ER). Generan la energía necesaria para las actividades celulares, tales como la biosíntesis, el transporte de iones y moléculas y el trabajo mecánico; esta energía, proviene del ATP (*adenosín trifosfato*). En los mamíferos aproximadamente el 95% del ATP se genera en las mitocondrias, dependiendo del tipo celular y del estado metabólico. Son el sitio de síntesis de muchas sustancias (como ciertos aminoácidos y grupos hemo). Además, la mitocondria juega un papel central en algunas funciones celulares (**figura 2**) incluidas la regulación de especies reactivas de oxígeno, en la homeostasis del calcio, y en la traducción de señales, como en el proceso de apoptosis, adicional al papel más importante que es la producción de energía (Liu *et al.*, 2014; Forbes y Thorburn, 2018).

La morfología general de las mitocondrias es muy dinámica, ya que son capaces de sufrir grandes cambios morfológicos, que se mantiene a través del equilibrio entre la fusión y fisión. El papel de la dinámica mitocondrial permite la mezcla de contenido de la matriz mitocondrial y los componentes membranosos en la población mitocondrial, que protege a las mitocondrias de la lesión funcional. La alteración de la dinámica mitocondrial puede conducir a una serie de enfermedades metabólicas o contribuir a la fisiopatología de la obesidad y de la diabetes, también se incluyen enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares e incluso cáncer (Zorzano *et al.*, 2004; Karp, 2013; Liu *et al.*, 2014).

Cada célula hepática de mamífero contiene entre 1000 y 2000 mitocondrias, que ocupan del 15 a 20% de volumen celular y contienen más de mil proteínas diferentes (Serrano y Gutiérrez, 2010; Karp, 2013). Se estima que un 67% de la totalidad de las proteínas mitocondriales en el hígado, se encuentran en la matriz, un 21% se encuentran en la membrana mitocondrial interna, un 6% en la membrana externa y otro 6% en el espacio intermembranoso (Alberts, 2002).

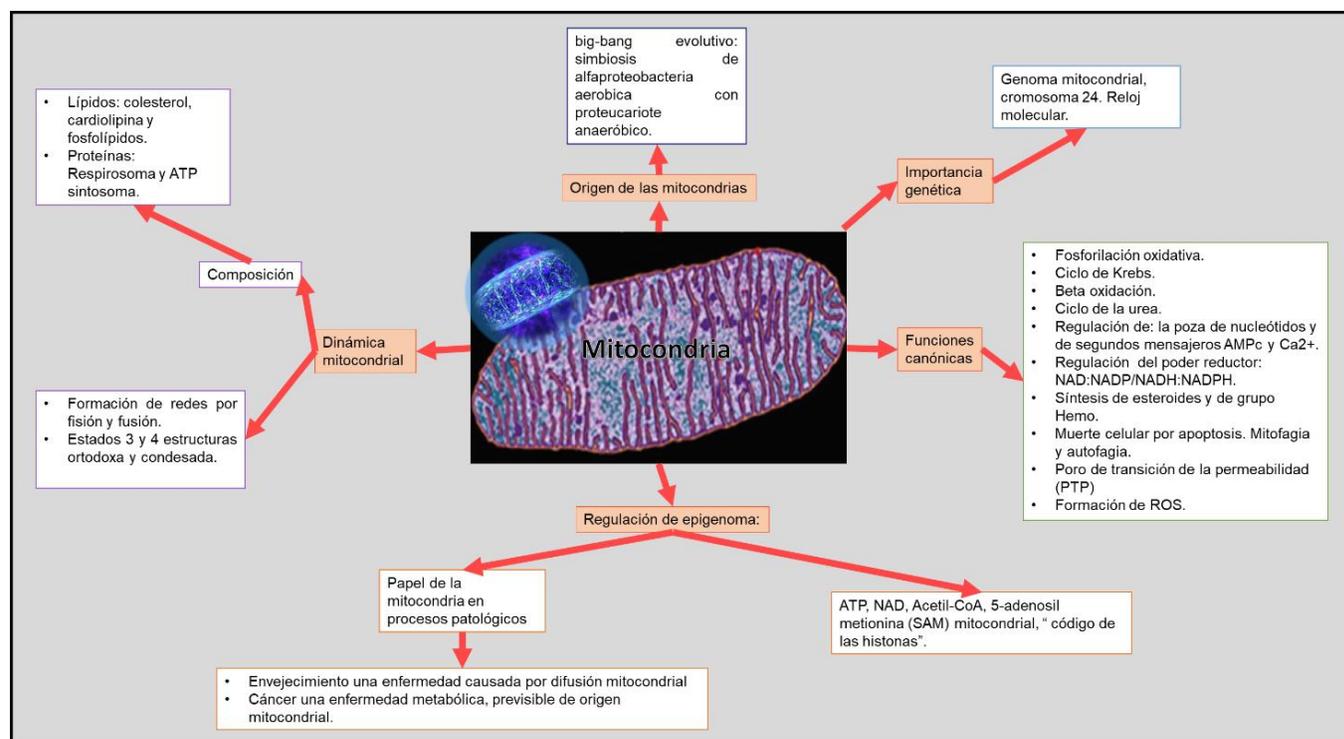


Figura 2. Mitocondria. Funciones canónicas bioenergéticas centrales de la mitocondria. Modificado de Tuena de Gómez y García. 2015.

2.9. Membranas mitocondriales y actividad mitocondrial

Las membranas mitocondriales son semejantes a las membranas de ciertas bacterias ya que se caracterizan por bajos niveles de ciertos lípidos, como el ácido fosfatídico, las esfingomielinas y los glicolípidos característicos de las células eucariotas, además presentan un bajo porcentaje de colesterol entre el 7-11% en comparación con la membrana celular, también presentan un alto contenido de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, cardiolipinas y una escasa cantidad de fosfatidilserina (Sánchez y Arboleda, 2008)

Cada mitocondria está limitada por un sistema de doble membrana altamente especializadas una interna y otra externa, que separan tres espacios bien definidos y desempeñan un papel crucial en las actividades de la mitocondria: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial (**figura 3**). Las mitocondrias son orgánulos altamente dinámicos, que se encuentran en constante movimiento (Sánchez y Arboleda, 2008; Alberts, 2002).

La membrana externa de la mitocondria es una bicapa lipídica, continua, uniforme que rodea por completo a la mitocondria y sirve como límite externo, está constituida por 40% de lípidos y 60% de proteínas. Contiene numerosas copias de una proteína de transporte, llamada porina, que forma grandes canales acuosos, llamados poros o canales aniónicos dependientes del voltaje. También contiene una mezcla de enzimas que participan en diversas actividades como la oxidación de la adrenalina, la degradación del triptófano y la elongación de los ácidos grasos. Es permeable a iones, metabolitos y muchos polipéptidos, y presenta un transporte pasivo (Sánchez y Arboleda, 2008; Karp, 2013).

El espacio intermembranal (IMS), está compuesto de un líquido similar al hialoplasma, contiene varias enzimas que utilizan la salida de ATP de la matriz para fosforilar otros nucleótidos, es rico en protones procedentes de la cadena respiratoria y contienen componentes clave para la apoptosis (Sánchez y Arboleda, 2008; Mckee y Mckee, 2009)

La membrana interna está altamente especializada. Posee 80% de proteínas y 20% de lípidos. Entre los lípidos que contiene hay una elevada proporción de cardiolipina, que contiene cuatro ácidos grasos que al parecer colaboran en conseguir que la membrana sea especialmente impermeable a los iones excepto a los iones de ADP, ATP, ácido pirúvico, oxígeno y agua, lo que permite que los lípidos citosólicos entren a la matriz para llevar a cabo la β -oxidación. Las proteínas presentes son de tres tipos: las que llevan a cabo las reacciones de

oxidación de la cadena respiratoria, diversas proteínas de transporte que hacen a la membrana permeable selectivamente y un complejo enzimático llamado ATPasa, que sintetiza ATP en la matriz. Se caracteriza por formar cierto número de repliegues que se denominan crestas y que incrementan el área total de la superficie interna, cuyo número está relacionado a las demandas energéticas de la célula (Alberts, 2002; Sánchez y Arboleda, 2008).

La matriz mitocondrial tiene una elevada concentración de proteínas hidrosolubles, que le dan una consistencia gelatinosa con una concentración elevada de hasta 500 mg/mL de proteínas, además contiene varias enzimas, ribosomas y moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA). Por lo tanto, las mitocondrias cuentan con su propio material genético y los mecanismos para producir su propio ácido ribonucleico (RNA) y proteínas, que es importante para codificar 13 polipéptidos mitocondriales, que se integran a la membrana mitocondrial interna, también se codifican dos RNA ribosómicos y 22 RNA de transferencia, que se utilizan para la síntesis de proteínas dentro del organelo (Karp, 2013).

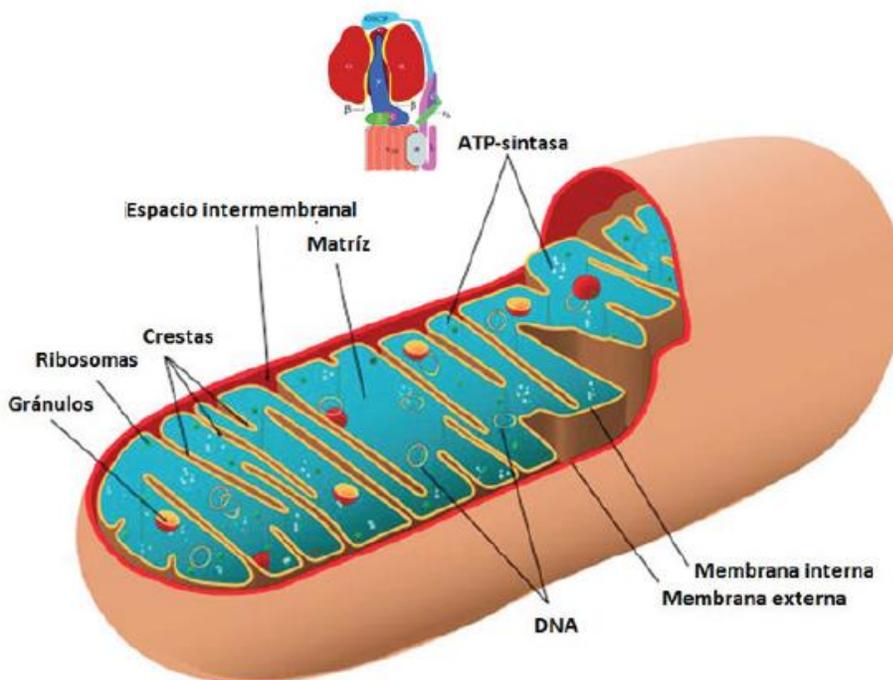


Figura 3. Componentes estructurales de la mitocondria. En azul se muestra la matriz mitocondrial conteniendo las enzimas del ciclo de Krebs, el ADN mitocondrial, los ribosomas mitocondriales y demás metabolitos en un medio acuoso. La membrana interna se muestra formando sinuosidades llamadas crestas mitocondriales, y es en esta membrana donde se encuentran los complejos respiratorios y la ATP sintasa (aumentada en el esquema superior). Las crestas aumentan la superficie membranar disponible para sintetizar ATP. (Tuena de Gómez y García. 2015).

El consumo de oxígeno está acoplado a la cadena de transporte de electrones y provee de energía necesaria para la producción de ATP. Las mitocondrias dan cuenta de aproximadamente un 95% del oxígeno consumido; entre el 90 y el 99% dependiendo el tipo celular y del estado metabólico. La energía del proceso por el cual los electrones se transfieren desde los sustratos componentes del ciclo de Krebs hasta el oxígeno, está acoplada al transporte vectorial de H^+ desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal (Boveris, *et al.*, 2000; Alberts, 2002).

Casi toda la energía disponible a partir de la combustión de los carbohidratos, grasas y otros nutrientes, obtenidos de los sustratos por el NAD^+ y el FAD, se almacenan inicialmente en forma de electrones de alta energía. Estos electrones, transportados por el NADH y el $FADH_2$, reaccionan con el oxígeno molecular a través de la cadena respiratoria. Estas reacciones se describen como fosforilación oxidativa, ya que, la energía que se libera de ellas es utilizada por las enzimas de membrana interna de la mitocondria para impulsar la transformación de $ADP + P_i$ hasta ATP (Alberts, 2002).

La cadena respiratoria es una vía única donde los átomos de hidrógeno son escindidos en protones y electrones. Los electrones pasan a través de una serie de transportadores de electrones de la membrana mitocondrial interna, la mayoría de los componentes de la cadena respiratoria están organizados en cuatro complejos (**figura 4**) (Alberts, 2002).

El complejo 1, o complejo deshidrogenasa de NADH, cataliza la transferencia de electrones del NADH a la ubiquinona (UQ), que es un transportador de electrones liposolubles móvil capaz de aceptar y donar electrones, uno a la vez. El complejo deshidrogenasa de succinato (complejo II) es un mediador en la transferencia de electrones del succinato a la UQ. Este complejo consta de una enzima del ácido cítrico deshidrogenasa de succinato y de dos ferredoxinas, donde el sitio de oxidación del succinato se encuentra en la ferredoxina más grande, en este complejo se transfiere electrones de NADH citoplasmático a la cadena. La deshidrogenasa de acil-coA, transfiere los electrones a la UQ desde el lado de la matriz de la membrana interna. El complejo III o complejo citocromo b_1 , transfiere electrones de la coenzima Q reducida (UQH_2) a una proteína llamada citocromo c (cyt c), que es un transportador móvil de electrones que está unido de manera laxa a la cara externa de la membrana mitocondrial interna. El paso de electrones a través del complejo III, se denomina ciclo Q, es intrincado. Durante este ciclo Q, las moléculas de coenzima Q se difunden dentro de la membrana interna entre los donadores de electrones de los complejos I o II y el receptor del complejo III (la ferredoxina). La UQH_2 dona dos electrones, uno a la vez. La oxidasa de citocromo (complejo IV)

es un complejo proteínico que cataliza la reducción de cuatro electrones de O_2 para formar H_2O . Cuatro protones y cuatro electrones son impulsados a través del complejo IV desde la cara externa de la membrana mitocondrial interna hasta la matriz, se forman dos moléculas de agua, que salen del sitio. En el complejo IV hay un sitio regulador de la unión a ATP (Mckee y Mckee, 2009).

La oxidación del NADH hace que se libere una cantidad sustancial de energía, cuando los electrones fluyen por los complejos I; III Y IV. Se sintetizan aproximadamente 2.5 moléculas de ATP por cada par de electrones que se transfieren entre el NADH y el O_2 en la cadena de transporte de electrones. De la transferencia de cada par donado por el $FADH_2$ que se produce en la oxidación del succinato resultan alrededor de 1.5 moléculas de ATP (Mckee y Mckee, 2009).

La fosforilación oxidativa, es el proceso por el cual la energía generada a través de la cadena transportadora de electrones se conserva mediante la fosforilación de ADP para originar ATP. Según la teoría quimioosmótica, la creación de un gradiente de protones que acompaña al transporte electrónico está acoplada a la síntesis de ATP (Mckee y Mckee, 2009).

Una disfunción mitocondrial pudiera ser un elemento central en la fisiopatología de la diabetes. Una actividad defectuosa de la cadena respiratoria implica un menor consumo de oxígeno y una menor oxidación de sustratos. Un defecto en la oxidación de los lípidos conduciría a un incremento en la deposición de lípidos, aspecto que se ha descrito como factor causal de la resistencia a la insulina y en la diabetes (Zorzano *et al.*, 2004).

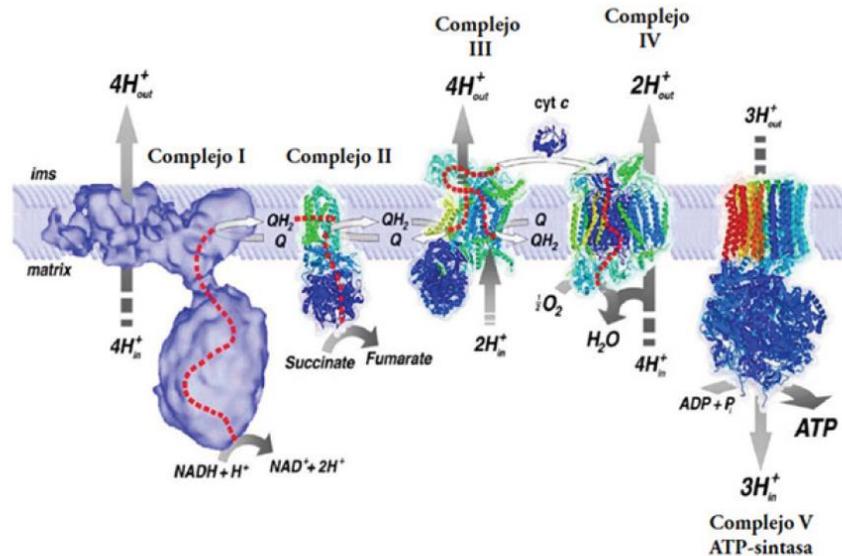


Figura 4. Componentes de la fosforilación oxidativa y complejos respiratorios. La generación de la corriente de electrones a lo largo de la membrana, que culmina en el consumo de oxígeno y la formación del agua. (Tuena de Gómez y García. 2015).

2.10. Fluidez membranal

La fluidez y las propiedades funcionales de las membranas biológicas se logran mediante la colaboración completa entre lípidos y proteínas. No fue sino hasta finales de los años sesentas cuando surge el concepto de fluidez de membrana que incorpora los aspectos dinámicos (por ejemplo: difusión, recambio, intercambio e interacciones moleculares) que se presentan en, o se dan entre, los elementos constitutivos de las biomembranas (Meza, 2010)

El término fluidez describe la resistencia de los componentes de la membrana al movimiento. El movimiento lateral rápido de las moléculas lipídicas es al parecer causal del funcionamiento adecuado de muchas de las proteínas de la membrana. El movimiento de los lípidos de un lado a otro de una bicapa lipídica sólo ocurre durante la síntesis de la membrana o en condiciones de desequilibrio de lípidos y requiere de la presencia de una proteína mediadora, un translocador de fosfolípidos o flipasa, en el proceso llamado difusión facilitada (Mckee y Mckee, 2009). Dependiendo de la capacidad de las moléculas de lípido para aglomerarse, en una bicapa particular de la membrana, donde se pasa de una fase cristalina líquida a un gel cristalino congelando el movimiento de las cadenas de ácido graso de los fosfolípidos está muy limitado, la temperatura a la cual ocurre este cambio se le llama

temperatura de transición, que a su vez depende de si los fosfolípidos tienen cadenas saturadas o insaturadas, por la longitud de la cadena de ácido graso y por la presencia del colesterol (Karp, 2013).

La composición y la organización de la membrana mitocondrial interna son fundamentales para las actividades bioenergéticas de este organelo. La configuración de la membrana interna y la aparente fluidez de su bicapa facilitan las interacciones necesarias para la síntesis de ATP (Karp, 2013). Es importante también para la orientación, organización, estructura y soporte mecánico de las membranas. Pérez-Hernández *et al.*, (2010) concluyeron que la DM2 combinada con hipertensión disminuye la fluidez membranal en fantasmas de eritrocitos que es derivada principalmente de los cambios de los ácidos grasos.

Posteriormente, Pérez-Hernández *et al.*, (2017) encuentran que los cambios fisicoquímicos que se dan en la membrana mitocondrial de ratas diabéticas, como es el aumento del cociente U/S (ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados), que está relacionado con una mayor fluidez, conducen al aumento del control respiratorio.

Figueroa-García *et al.*, (2015) demuestran que los cambios fisicoquímicos de las características de las membranas mitocondriales de placenta se encuentran directamente correlacionados con la composición de los ácidos grasos, observando que el aumento de la fluidez membranal en ratas diabéticas, tiene un efecto sobre la actividad mitocondrial disminuyéndola y en la lipoperoxidación aumentándola.

Ganapati y Roy (2016) concluyen que los aceites de pescado ricos en omega-3 son capaces de mejorar significativamente el metabolismo lipídico y fluidez membranal en ratones diabéticos, con lo que apoyan los beneficios terapéuticos de los omega-3 en la DM1.

3. JUSTIFICACIÓN

Como ya vimos, los ácidos grasos juegan un papel importante dentro de la bioenergética de la célula de cualquier tejido, alguna alteración que estos tengan en la estructura de las membranas biológicas y en su disponibilidad, tiene efectos importantes en la función de la célula, y por consecuencia, posteriormente en todo el organismo, es por esta razón que vemos el papel crucial que juegan estas biomoléculas en el metabolismo celular y en el desarrollo de diferentes patologías. Al ser la mitocondria el organelo más importante para el procesamiento energético celular, se vio que juega un papel central dentro del organismo y que depende de su estado metabólico, para entender el proceso de diferentes enfermedades, como por ejemplo la diabetes mellitus tipo 2.

El hígado es el órgano de mayor importancia metabólica, entre otras funciones en las que también participa, en este trabajo nos interesa la síntesis de ácidos grasos, la circulación de lípidos, y que es el tejido más importante para la construcción de membranas biológicas, las cuales hasta la actualidad no han sido ampliamente comprendidas, y como vimos en los antecedentes las modificaciones que estas tienen, conducen a cambios en la actividad mitocondrial; sin embargo, aún se desconocen los cambios que estas tienen durante una condición donde el metabolismo se ve alterado, como es el caso de la diabetes mellitus. Por múltiples razones, incluyendo por el alto costo, tanto económico como en la calidad de vida de los que padecen este síndrome, se ha hecho uso de los ácidos grasos omega 3 como una opción complementaria para el tratamiento de la diabetes, por sus supuestos efectos benéficos, sin embargo, dichos efectos no han sido confirmados.

Teniendo en cuenta lo anterior, vemos que es importante estudiar el efecto que tiene la suplementación en diferentes concentraciones de ácidos grasos omega 3 en la fluidez, en la actividad mitocondrial y en la proteómica membranal de mitocondrias hepática.

4. HIPÓTESIS

Después de ver que los ácidos grasos ω -3 tienen efectos benéficos en contra de la DM2, sobre la glucemia nos interesa saber si estos en diferentes dosificaciones tienen el mismo efecto benéfico tanto en individuos normoglucémicos como en individuos con DM2 y si este efecto, está relacionado con modificaciones sobre las propiedades fisicoquímicas de las membranas biológicas, para lo cual utilizaremos mitocondrias de hígado de ratas con DM2 y normoglucémicas, por lo que planteamos la siguiente hipótesis.

El desarrollo de la diabetes disminuirá la respiración mitocondrial y la ingesta de ácidos grasos omega-3 generará cambios tanto en el metabolismo de lípidos como en la función de las membranas celulares, que serán benéficos para la respiración mitocondrial al compensar los efectos que la diabetes tiene al disminuir la fluidez membranal.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Analizar el efecto de los AG ω 3, con diferentes esquemas de dosificación, sobre la fluidez membranal y respiración mitocondrial de células hepáticas de ratas inducidas a diabetes y ratas normoglucémicas.

5.2. Particulares

Determinar el efecto de diferentes esquemas de dosificación de AG ω 3 en las propiedades fisicoquímicas de membranas de mitocondrias de hígado de ratas con DM2 y normoglucémicas y su repercusión en la actividad mitocondrial.

Evaluar si el consumo de oxígeno y el control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas con DM2 y normoglucémicas, es afectado con la suplementación de diferentes esquemas de dosificación de AG ω 3 y la DM2.

Evaluar la fluidez membranal de mitocondrias de hígado de ratas con DM2 y normoglucémicas, y con diferentes esquemas de dosificación de AG ω 3, mediante el monitor fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno.

Estudiar el patrón electroforético de las proteínas mitocondriales hepáticas de ratas tratadas con diferentes esquemas de dosificación de AG ω 3 con DM2 y normoglucémicas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación del laboratorio 4 de la UBIMED, de la FES Iztacala en donde se determinaron varios otros parámetros relacionados con el modelo de diabetes tipo 2 que se está utilizando. En esta Tesis se presentan aspectos relacionados con el efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre la función mitocondrial medida a través de la respiración y el efecto que la fluidez tiene sobre esta función.

6.1. Diseño experimental y animales

La diabetes tipo 2 se indujo a las ratas Wistar macho de 48 horas de edad con estreptozotocina (STZ) mediante una inyección intraperitoneal a una dosis de 125 mg/kg de peso corporal, que fue disuelta en 50 μ L de amortiguador de citratos pH 4.5. Las ratas control fueron inyectadas sólo con amortiguador de citratos.

Los ácidos grasos omega-3, fueron administrados al destete (4 semanas), de aceite de linaza a una dosis de 125 mg/kg de peso corporal, oralmente mediante una pipeta repetidora.

Se utilizaron ratas Wistar macho que se mantuvieron en condiciones controladas (12 h luz, 12 h oscuridad, 22 °C y 25% humedad). Las cuales fueron asignadas al azar divididas a dos grupos: un grupo control (CN) y un grupo al que se le indujo diabetes mellitus tipo 2 (STZ), los dos grupos tuvieron 4 esquemas de administración de ácidos grasos omega-3 (AG ω 3) con una n promedio de 4: 0 días/semana, 1 día/semana, 3 días/semana ó 7 días/semana, como se indica en la **figura 5**.

Para el seguimiento del desarrollo de la diabetes, se midió glucosa en la sangre semanalmente mediante un glucómetro de Accu-chek active®, mensualmente se midieron colesterol y triglicéridos con un multiparamétrico de Accutrend® y se realizaron curvas de tolerancia a la glucosa mensualmente. Estos resultados no se incluyen al ser datos de otra tesis (ver resultados en Vicenteño 2018).

6.2. Sacrificio

El sacrificio se realizó a diferentes edades: 1, 3 y 6 meses, para las ratas del grupo CN y las del grupo STZ.

Para el sacrificio los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corporal), y se exsanguinaron.

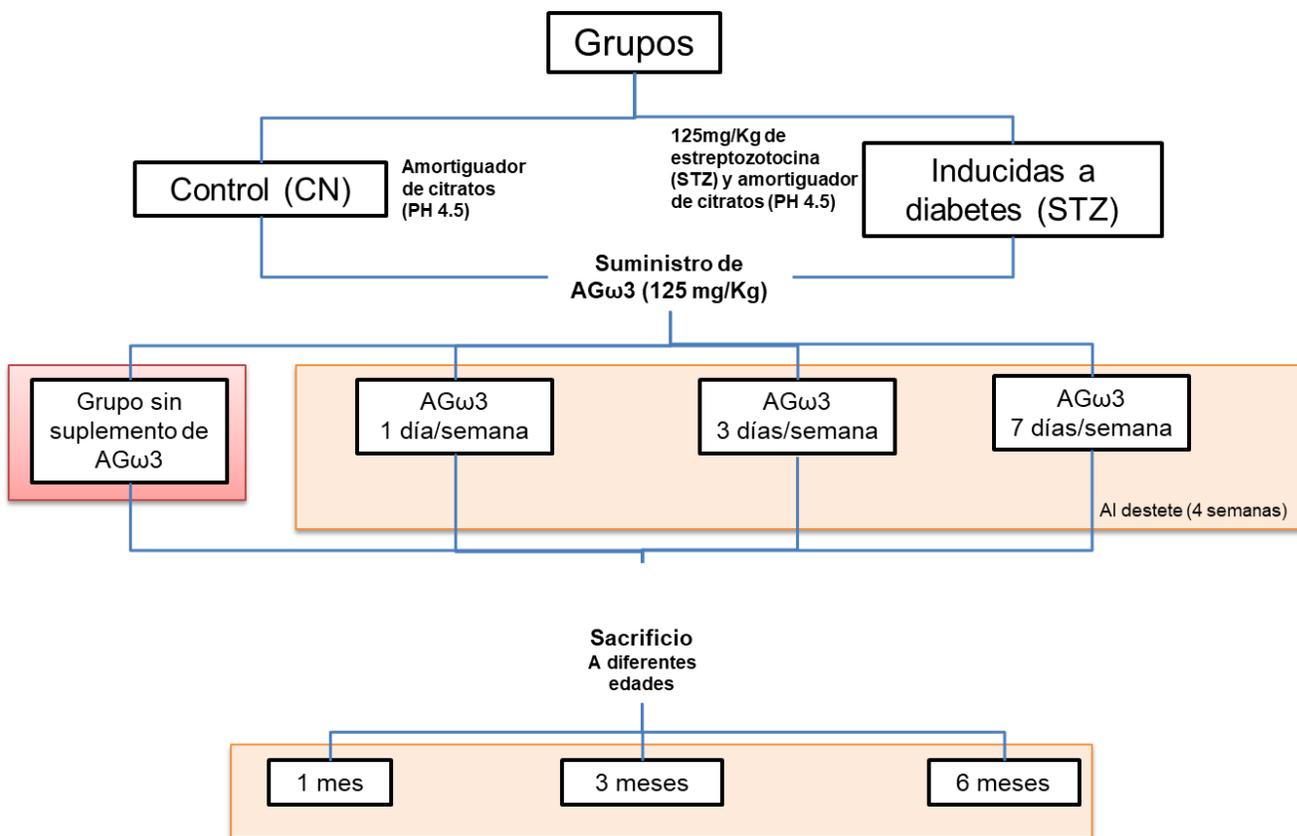


Figura 5. Diseño experimental de los tratamientos.

6.3. Obtención de mitocondrias

Posterior al sacrificio se realizó la extracción del hígado de las ratas. A los órganos obtenidos se le realizaron sucesivos cortes y lavados, el triturado fue suspendido en medio H que consiste de sacarosa al 0.07 M, manitol al 0.21 M, HEPES al 20 mM y Albúmina de suero bovino 0.5 g/L. Posteriormente, los tejidos fueron homogenizados individualmente con un homogeneizador Potter-Elvehjem hasta obtener una consistencia lechosa, a este homogenizado se le realizaron centrifugaciones diferenciales en un rotor F15-6x100y Thermo Scientific, la primera y segunda centrifugación se realizaron durante 10 min a 2500 rpm, se colectó el sobrenadante y se prosiguió con una tercera centrifugación con una duración de 10 min a 7500 rpm, se recuperó la pastilla y se incubó en medio H con albúmina a 0.5% por 30 min y se finalizó con una cuarta centrifugación durante 10 min a 9000 rpm, en esta última se recuperó la pastilla que contenía la fracción mitocondrial y fue resuspendida en 500 μ L de medio H dentro de tubos eppendorf de 1.5 mL que se mantuvieron en frío.

6.4. Medición de la actividad mitocondrial

Para la medición de la actividad mitocondrial fue necesario conocer la concentración de proteínas, que fue determinada por el método de Bradford (1976).

La actividad mitocondrial se midió con un oxímetro con electrodo tipo Clark, conectado a una cámara de incubación de 1.5 mL con un baño termostático a 37 °C de circulación y agitación constante. Se registró el consumo de oxígeno. La respiración mitocondrial se midió en los estados 3 (alto contenido de ADP) y 4 (bajo contenido de ADP). Para medir el estado 3 se adicionaron al medio de reacción 2 µL de ADP (100 mM). Se calculó el control respiratorio (velocidad del estado 3/ velocidad del estado 4). Dicho control respiratorio es función del grado de acoplamiento mitocondrial y es un indicador de la integridad mitocondrial.

6.5. Fluidez membranar

Para el análisis de la fluidez membranar, era necesario saber el contenido de fosfolípidos membranar. Así, primero se realizó la extracción de lípidos de acuerdo a Bligh y Dyer (1959) de la siguiente manera: se tomaron alícuotas de 5, 10 ó 15 µL de la muestra de mitocondrias, que se colocaron en un homogenizador Potter-Elvehjem. A estas mitocondrias se les adicionó una mezcla de metanol-cloroformo-agua con una relación volumen de 2:1:0.8 y se homogenizó. Posteriormente se retiró la fase acuosa y se dejó la fase cloroformica, a la que se le adicionó un volumen de cloroformo y uno de agua para volver a homogenizar brevemente. Después el homogenado se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min en una centrífuga Z206 A marca Hermle y se obtuvo un sistema de dos fases mejor definido que la primera vez que se retiró la fase acuosa. Se colectó la fase cloroformica, que finalmente, se evaporó el solvente bajo una corriente de nitrógeno, para posteriormente cuantificar fósforo por el método de Bartlett (1959).

Se utilizó el monitor fluorescente 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) (**figura 6**) que se ubica en el núcleo hidrofóbico de la membrana (Kaiser y London, 1998) para el análisis de la fluidez membranar ya que con este monitor se puede seguir la dinámica de los lípidos y el comportamiento cooperativo de las cadenas lipídicas de acilo en la membrana (Shinitzky y Barenholz, 1978) como se representa en la **figura 7**. El DPH fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 100 µM.

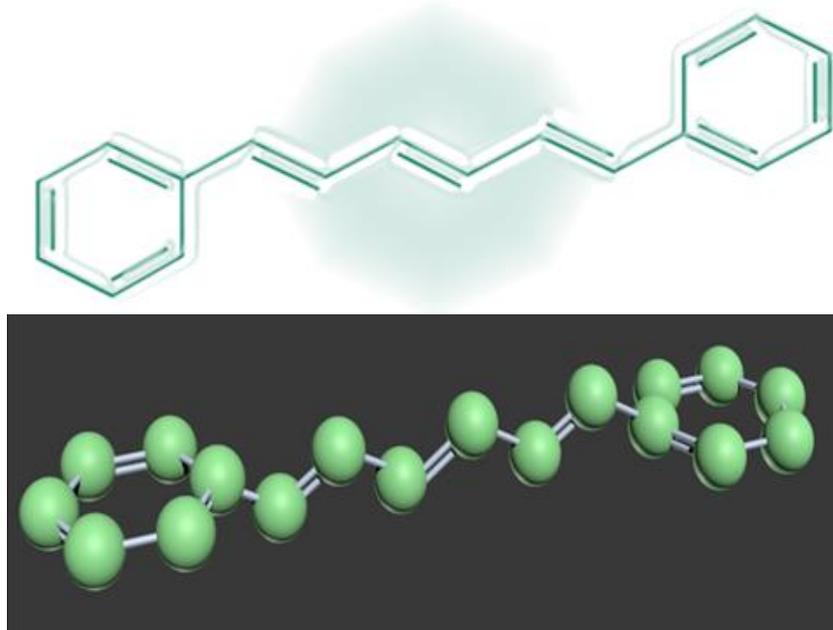


Figura 6. Molécula de 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH), en 2 D y en 3 D.

A las mitocondrias se les adicionó el DPH a una relación molar 1:150 (donde la concentración final del DPH y de fosfolípidos fueron de $0.33\mu\text{M}$ y $50\mu\text{M}$ respectivamente) 30 minutos antes de hacer las mediciones, posteriormente se sónico por 3 min en baño usando un sonicador de baño AS2060B, Autosciencice®. La polarización y la anisotropía se midieron con un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS55 equipado con portaceldas termostatzables y con agitación independiente. El fluoróforo se excitó a una λ de 340nm y la emisión fue leída a una λ de 440nm con una ranura que varió de acuerdo a la muestra de 5 y 15nm. Para poder obtener las características termotrópicas de las membranas mitocondriales las mediciones de polarización y anisotropía se realizaron a diferentes temperaturas desde 10 hasta 55 °C (en las temperaturas de 10, 15, 20, 25, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 44, 45, 50 y 55 °C), este rango fue elegido de acuerdo a la temperatura fisiológica que de acuerdo a Guyton, (1987) es de 35 °C para las células vivas. A partir de esta temperatura, se escogieron diferentes temperaturas por debajo y por arriba que no sobrepasaran los 0 °C donde hay formación de cristales de hielo y unos 60 °C donde se desnaturalizan las proteínas mitocondriales, para poder tener diferentes mediciones que permitan realizar un análisis termotrópico de las membranas mitocondriales. Las mediciones fueron realizadas utilizando el software FL WinLab el cual tiene una aplicación de lectura única de recopilación de datos para medidas de polarización y anisotropía.

Con las mediciones de polarización y anisotropía se pudieron obtener las energías de activación (E_a) del DPH para las fases gel y líquido cristalino de la membrana mitocondrial, también se obtuvo la temperatura de transición de fases.

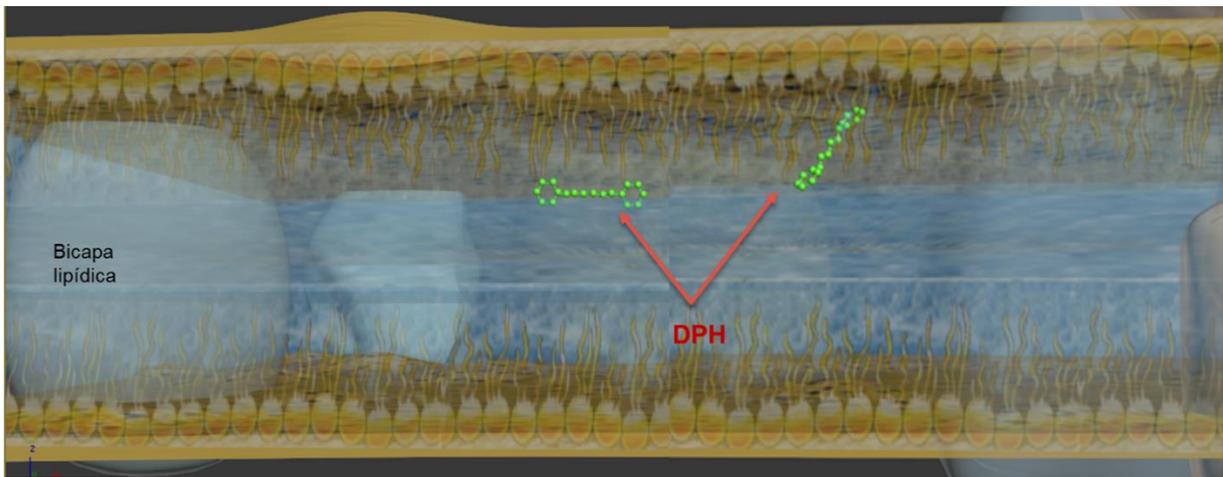


Figura 7. Localización del DPH dentro la membrana lipídica. El DPH explora el núcleo hidrofóbico de la membrana.

6.6. Análisis electroforético

La tecnología más usada para la separación de proteínas es la electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta técnica es la más eficaz para resolver mezclas complejas de proteínas. Este método permite que las biomoléculas se separen en dependencia entre otros factores de su carga y bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis es de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad (Garcia, 2000).

Para el análisis electroforético de las proteínas mitocondriales se realizaron electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), que permite el cálculo de pesos moleculares (al contrario que el resto de los tipos de electroforesis), pues los complejos SDS-proteína se separan estrictamente según su peso molecular (Garfin, 1990).

Para la SDS-PAGE se preparó un gel concentrador al 4% y un gel de resolución al 10% (**tabla 1**). Se utilizaron 10 μ L del marcador de pesos moleculares Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, que tiene una mezcla de 10 proteínas recombinantes (10-250 kDa). Se cuantifico la concentración de proteína, por el método de Bradford (1976) y en cada carril se cargó con 10 μ g de proteína de cada muestra, que previamente se desnaturizó por ebullición en baño maría durante 5 min, con 2-mercaptoetanol y amortiguador de preparación de la muestra. La electroforesis se llevó a cabo en una cámara vertical mini PROTEAN® System (BIO-RAD) a 100volts.

Para la visualización de las proteínas, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R-250 al 0.1%, metanol al 40% y ácido acético al 10%. Posteriormente se quitó el exceso de colorante y los geles fueron almacenados en bolsas ziploc de 12.5 x 8 cm.

Para el análisis de los geles se utilizó el documentador de geles Gel Doc™ EZ Imager de Bio-Rad y el software de image lab 5.2.1 para editar las fotografías. El análisis densitométrico se realizó con el uso del programa ImageJ.

Tabla 1. Gel de poliacrilamida-SDS.

Gel de resolución 10%	ml
Agua bidestilada	8.6
Tris-HCl, 1.5M, pH 6.8	2.5
SDS 10%	0.1
Acrilamida/bis (30% T/ 2.7% C)	3.75
Persulfato de Amonio 10%	0.05
TEMED	0.005
Gel concentrador 4%	ml
Agua bidestilada	6.1
Tris-HCl, 1.5M, pH 6.8	2.5
SDS 10%	0.1
Acrilamida/bis (30% T/ 2.7% C)	1.3
Persulfato de Amonio 10%	0.05
TEMED	0.005

Elementos y cantidades necesarias para la preparación de un gel al 10% de poliacrilamida-SDS.

6.7. Análisis matemático y estadístico

Para el cálculo del OPR se utilizó la siguiente ecuación:

$$OPR = \frac{\text{min} * ADP:O}{P}$$

Dónde:

OPR= Tasa de Fosforilación Oxidativa

min= tiempo transcurrido (3 min)

ADP:O= relación ADP oxígeno Estado 3 $ADP:O = \frac{(\text{Oxígeno} * ADP)}{\text{Estado 3}}$

P= concentración de proteína

Para el cálculo de la energía de activación se utilizó el gráfico de Arrhenius, el cual es una linealización entre las variables K y T^{-1} de la ecuación de Arrhenius.

Ecuación de Arrhenius:

$$K(T) = A \cdot e^{-\frac{Ea}{RT}}$$

Dónde:

K (T)=constante cinética (dependiente de la temperatura)

A =factor preexponencial o factor de frecuencia. Indica la frecuencia de las colisiones.

Ea = energía de activación, expresada en J/mol

R =constante universal de los gases. Su valor es 8,3143 J·K⁻¹·mol⁻¹

T =temperatura absoluta [K]

e=exponencial matemático

Regresión lineal del gráfico de Arrhenius:

$$\ln(K) = \ln(A) - \frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T} \right)$$

Dónde:

El valor de la intersección en el eje Y corresponderá a ln(A), y la pendiente de la línea será igual

a $\frac{-Ea}{R}$.

Para el cálculo de pesos moleculares de las proteínas en los geles de poliacrilamida se elaboró una curva de pesos moleculares con los marcadores y la distancia que migraban en la electroforesis, a lo que se le conoce como movilidad electroforética (μ). La migración de las proteínas describía un comportamiento en potencia ($y = cx^b$) en función del tamaño de la proteína (KDa), se sustituyeron los valores de migración de las proteínas de interés, para obtener su peso aproximado, con la siguiente ecuación:

$$10^{-\frac{\log \frac{y}{c}}{b}}$$

Se utilizaron medidas de tendencia central como el promedio (\bar{X}) y la desviación estándar (σ) para el análisis de los resultados, los cuales fueron representados en tablas y gráficos.

Para el análisis estadístico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores seguido de una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk con una $p < 0.050$ y de una prueba de Tukey con una $p < 0.050$, usando el programa SigmaPlot 2013 que es un paquete de gráficos y visualización, con funcionalidades de análisis estadístico.

7. RESULTADOS

7.1. Actividad mitocondrial

Como el objetivo principal del estudio es analizar el efecto de los AG ω 3 sobre la respiración mitocondrial de células hepáticas en ratas inducidas a diabetes, fue necesario ver los cambios de la actividad mitocondrial medida por oximetría, durante el desarrollo de la diabetes y el efecto de diferentes esquemas de dosificación con AG ω 3 en animales inducidos a diabetes y sus respectivos controles normoglucémicos.

Es necesario conocer lo que la DM2 causa por sí misma a las mitocondrias hepáticas, por lo cual, primero se presentan los cambios en el consumo de oxígeno del estado 3 y 4, el control respiratorio (CR) y la tasa de fosforilación oxidativa (OPR), de los grupos de ratas control (CN) y el grupo de ratas inducidas a diabetes (STZ) de 1 mes de edad.

En la **tabla 2** se observa que el CR de las ratas diabéticas es significativamente distinto al de las ratas control, lo que nos indica que la DM2 genera cambios importantes que afectan directamente la respiración mitocondrial, así como a las membranas mitocondriales. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) que se presentan entre las ratas STZ y CN de 1 mes de edad son, un mayor consumo de oxígeno para las ratas diabéticas que el grupo control, de 198.49% para el estado 3 y de 433.28% para el estado 4, donde el estado 3 para las ratas STZ es de 62.07 ± 42.90 nAO₂/min/mgP mientras, que para las ratas CN es de 31.27 ± 6.17 nAO₂/min/mgP y para el estado 4 las ratas STZ tienen un consumo de oxígeno de 30.33 ± 12.42 nAO₂/min/mgP en comparación con las ratas CN de 7.00 ± 2.35 nAO₂/min/mgP.

En cuanto al control respiratorio (CR) de las ratas CN de 1 mes (4.70 ± 0.95 CR) es 238% mayor que el CR de las ratas STZ de 1 mes (1.97 ± 0.87 CR) y como se puede observar en la **figura 8** y en la **tabla 2**, existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). También vemos que el OPR, es 3 veces mayor en ratas CN (2.54 ± 0.60 OPR) en comparación a las ratas STZ (0.86 ± 0.51 OPR) (**tabla 2**).

Tabla 2. Control respiratorio, estado 3, estado 4 y OPR de mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 1 mes de edad.

	CR	Edo 3 nAO ₂ /min/mgP	Edo 4 nAO ₂ /min/mgP	OPR ADP nmol/mg [P]/ min
CN 1mes	4.70 ± 0.95	31.27 ± 6.17	7.00 ± 2.35	2.54 ± 0.60
STZ 1mes	1.97 ± 0.87 *	62.07 ± 42.90 *	30.33 ± 12.42 *	0.86 ± 0.51 *

* $p < 0.05$; con relación al grupo CN 1mes. n=4.

Control Respiratorio a 1mes de edad

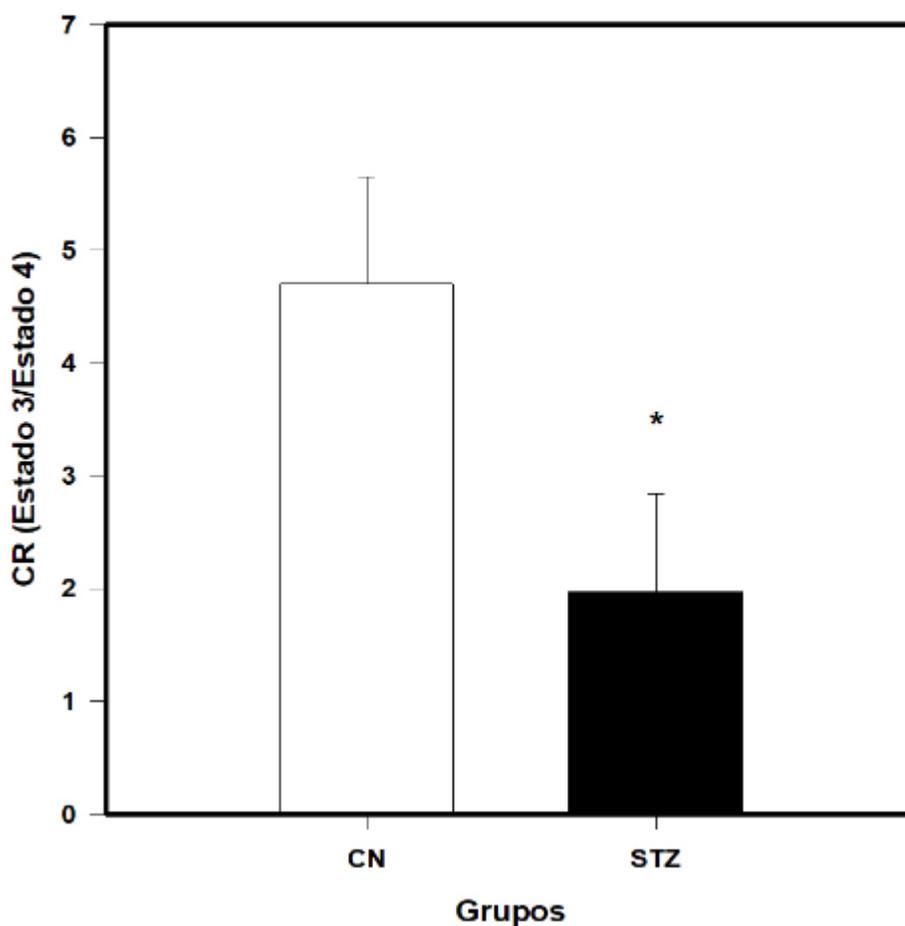


Figura 8. Control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas control (CN) e inducidas a diabetes (STZ), de 1 mes de edad. * $p < 0.05$; con relación al grupo CN 1mes. n=4.

En la **tabla 3** se presentan los parámetros cinéticos que se obtuvieron de las mitocondrias de ratas control (CN) e inducidas a diabetes (STZ) a las edades que se realizaron los sacrificios (1, 3 y 6 meses). En esta tabla se comparan las velocidades de consumo de oxígeno en los estados 3 y 4, así como el control respiratorio (CR) y la producción de ATP (OPR). En términos generales, en los grupos control (de 1, 3 y 6 meses de edad) la respiración mitocondrial es similar en los estados 3 y 4; de hecho, el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre estos grupos, lo que nos indica que la edad no influyó de manera significativa en el consumo de oxígeno, para los animales normoglucémicos. Por el contrario, en los grupos STZ, el consumo de oxígeno sufre más alteraciones. Por ejemplo, a 1 mes de edad en las ratas STZ, en el estado 3 el consumo de oxígeno es 2 veces mayor que las ratas CN de 1 mes, y en el estado 4 el consumo de oxígeno en STZ 1 mes es 4.3 veces mayor que en el control (CN). Comportamiento contrario para los grupos STZ de 3 y 6 meses donde el consumo de oxígeno es menor para el estado 3 con respecto a los grupos control (33.7% para 3 meses y 52.2% para 6 meses). También se puede ver que los grupos CN de 3 y 6 meses de edad presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) tanto para el estado 3 como para el estado 4 entre grupos de las mismas edades.

En cuanto al control respiratorio (CR), para los grupos controles el valor promedio de CR es de 3.45, que es mayor que el de los grupos STZ (que en promedio es de 1.21). Además, como se puede ver en la **tabla 3** y se representa en la **figura 9**, existe una predisposición a disminuir el CR con el aumento de la edad, comportamiento que se ve más marcado para los grupos diabéticos. Mientras que en los grupos CN, de 1 a 3 meses de edad hay una disminución del 37.24% del valor del CR y de 8.48% de 3 a 6 meses de edad, en los grupos STZ las disminuciones correspondientes a los mismos periodos de tiempo fueron de 48.74 y 33.67%. Finalmente, el valor de OPR es heterogéneo en ambos grupos; sí hay diferencias significativas entre grupos de las mismas edades y en promedio, el valor de OPR del grupo control es 1.43, el cual es similar al del grupo STZ de 1.85.

Finalmente veremos cómo los diferentes esquemas de suplementación de AG ω 3 (1, 3 y 7 días a la semana) afectan a la actividad mitocondrial en animales inducidos a diabetes y normoglucémicos.

En la **tabla 4** se presentan los parámetros cinéticos que se obtuvieron de las mitocondrias de ratas control (CN) e inducidas a diabetes (STZ) a los 3 meses de edad con los diferentes esquemas de dosificación de ácidos grasos omega 3. Se observa una constante a disminuir el consumo de oxígeno, en los estados 3 y 4 conforme se aumentan los días de

suplementación de AG ω 3, para los grupos de animales CN, en el estado 3 los grupos de 1 día a 3 días de tratamiento de AG ω 3 disminuye el consumo de oxígeno por un 34.78% y del grupo con 3 días a 7 días de tratamiento disminuye por un 25%, mientras que, para el estado 4, los porcentajes de disminución correspondientes son de un 35.66 y 23.66%. Comportamiento contrario a los grupos CN es el que se presenta para los grupos STZ, ya que la constante es a aumentar el consumo de oxígeno, conforme se aumentan los días de suplementación de los AG ω 3, para el estado 3 los grupos STZ de 1 día a 3 días de tratamiento de AG ω 3 aumenta el consumo de oxígeno 228.59%, y del grupo con 3 días a 7 días de tratamiento aumenta 118.75%, mientras que, para el estado 4, los porcentajes de aumento correspondientes son de un 364.81 y 116.14%.

Tabla 3. Control respiratorio, estado 3, estado 4 y OPR de las mitocondrias de hígado de ratas Wistar, controles (CN) e inducidas a diabetes (STZ), de diferentes edades: 1 mes, 3 meses y 6 meses de edad.

		CR	Edo 3	Edo 4	OPR
			nAO ₂ /min/mgP	nAO ₂ /min/mgP	ADP nmol/mg [P]/ min
CN	CN 1mes	4.70 ± 0.95	31.27 ± 6.17	7.00 ± 2.35	2.54 ± 0.60
	CN 3meses	2.95 ± 0.55 *	35.09 ± 4.65	12.32 ± 3.39 §	0.83 ± 0.12 *
	CN 6meses	2.70 ± 0.65 *	25.75 ± 5.51	12.32 ± 3.87 §	0.94 ± 0.17 *
STZ	STZ 1mes	1.97 ± 0.87 *	62.07 ± 42.90 *	30.33 ± 12.42 *	0.86 ± 0.51 *
	STZ 3meses	1.01 ± 0.87 *a	11.82 ± 2.85 *§a	16.80 ± 9.33 §	2.53 ± 0.58 §a
	STZ 6meses	0.67 ± 0.10 *§b	13.44 ± 1.56 *§b	20.16 ± 0.83 *b	2.17 ± 0.26 §b

* $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1mes;

§ $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 1mes;

a $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3meses;

b $p < 0.05$, con relación al grupo CN 6meses.

n=3 a 5.

Control Respiratorio

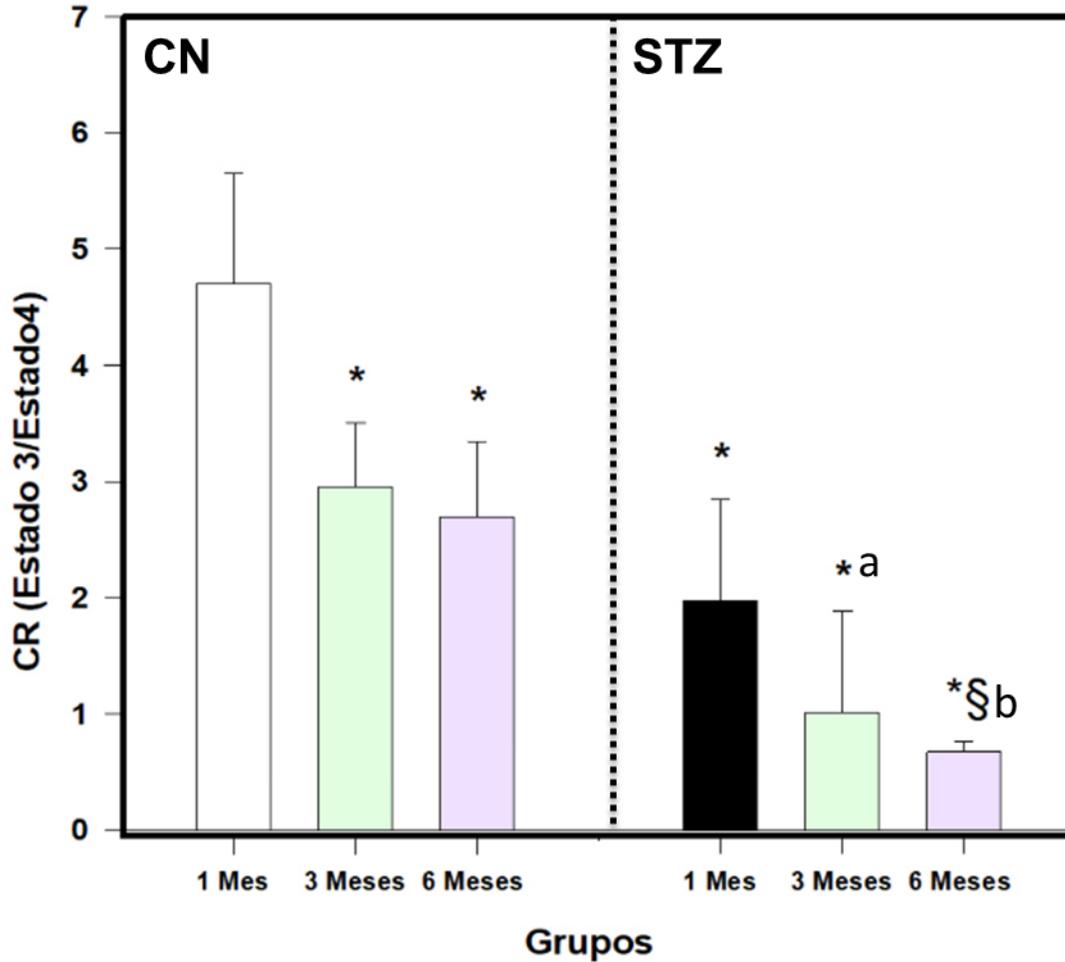


Figura 9. Control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas normoglucémicas (CN) e inducidas a diabetes (STZ) a diferentes edades. * $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1mes; § $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 1mes; a $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3meses; b $p < 0.05$, con relación al grupo CN 6meses.; n=3 a 5.

En cuanto al CR que se presenta en la **figura 10** y en la **tabla 4** (animales de 3 meses de edad), no se observa ninguna constante para las ratas normoglucémicas, ni para las ratas diabéticas, sin embargo, para los grupos CN de 1, 3 y 7 días con suplementación de AG ω 3 el CR (que en promedio es de 1.64) disminuye un 44.40% en comparación al grupo control, que tiene un CR de 2.95, si se comparan estos resultados con los grupos diabéticos, se puede ver, que el grupo diabético sin suplementación de AG ω 3 que tiene un CR de 1.01 es 64.76% menor que el grupo control. Sin embargo, para los grupos STZ de 1, 3 y 7 días con suplementación de AG ω 3 el CR (que en promedio es de 1.57) aumenta, siendo sólo 46.77% menor que el grupo control. Para el OPR tampoco se ve una predisposición entre los grupos STZ, sin embargo,

para los grupos CN sí encontramos un comportamiento a aumentar el OPR conforme tienen más días de suplementación de AG ω 3, también se ve que el promedio tanto para los grupos CN de 1, 3 y 7 días y para los grupos STZ de 1, 3 y 7 días es de 1.36.

En la **tabla 4** se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre varios grupos. Para el estado 3, el grupo control (35.09 ± 4.65 nAO₂/min/mgP) tiene un consumo de oxígeno significativamente mayor que el grupo STZ 3 meses (11.82 ± 2.85 nAO₂/min/mgP) y las ratas CN 7d-3m (16.80 ± 2.29 nAO₂/min/mgP). En cuanto al grupo diabético sin suplementación de AG ω 3 (11.82 ± 2.85 nAO₂/min/mgP) es 2.9 veces menor a las ratas del grupo CN 1d-3m (34.35 ± 9.57 nAO₂/min/mgP), 3.1 veces menor que las ratas STZ 3d-3m (37.33 ± 12.38 nAO₂/min/mgP) y 3.75 veces menor a las ratas STZ 7d-3m (44.33 ± 18.44 nAO₂/min/mgP). Otras diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) que se observan son las del grupo CN 1d-3m (34.35 ± 9.57 nAO₂/min/mgP) que es significativamente mayor con respecto a las ratas del grupo CN 7d-3m (16.80 ± 2.29 nAO₂/min/mgP) y que las ratas del grupo STZ 1d-3m (16.33 ± 6.71 nAO₂/min/mgP). En cuanto al estado 4 el grupo CN 3 meses (12.32 ± 3.39 nAO₂/min/mgP) es significativamente menor que el grupo STZ 3d-3m (28.93 ± 10.17 nAO₂/min/mgP) y el grupo STZ 7d-3m (33.60 ± 12.57 nAO₂/min/mgP).

En cuanto al CR como podemos observar en la **figura 10** el grupo CN 3 meses (2.95 ± 0.55 CR) es significativamente mayor (80%) con respecto a las ratas CN 1d-3m (1.64 ± 0.44 CR), con un 83% con respecto a las ratas CN 3d-3m (1.61 ± 0.19 CR), con un 77% con respecto a las ratas CN 7d-3m (1.67 ± 0.41 CR), con un 192% con respecto a las ratas STZ 3 meses (1.01 ± 0.87 CR).

En cuanto al OPR las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) que se presentan son las del grupo CN 3 meses (0.83 ± 0.12 OPR) que es significativamente menor con respecto al grupo STZ 3 meses (2.53 ± 0.58 OPR). Las ratas STZ 3 meses (2.53 ± 0.58 OPR) son significativamente mayores por un 260% con respecto al grupo STZ 3d-3m (0.69 ± 0.30 OPR) y las ratas STZ 3d-3m (0.69 ± 0.30 OPR) es significativamente menor por un 165% que las ratas STZ 7d-3m (1.83 ± 1.14 OPR) (**tabla 4**).

Tabla 4. Control respiratorio, estado 3, estado 4 y OPR de las mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 3 meses de edad.

		CR	Edo3 nAO ₂ /min/mgP	Edo4 nAO ₂ /min/mgP	OPR ADP nmol/mg [P]/ min
CN	CN 3 meses	2.95 ± 0.55	35.09 ± 4.65	12.32 ± 3.39	0.83 ± 0.12
	CN 1d-3m	1.64 ± 0.44 *	34.35 ± 9.57 §	21.28 ± 4.69	0.90 ± 0.27
	CN 3d-3m	1.61 ± 0.19 *	22.40 ± 9.88	13.69 ± 4.70	1.44 ± 0.54
	CN 7d-3m	1.67 ± 0.41 *	16.80 ± 2.29 *a	10.45 ± 2.13	1.74 ± 0.22 *
STZ	STZ 3 meses	1.01 ± 0.87 *	11.82 ± 2.85 *	16.80 ± 9.33	2.53 ± 0.58 *
	STZ 1d-3m	2.10 ± 0.54 *§	16.33 ± 6.71 a	7.93 ± 2.80 a	1.56 ± 0.50
	STZ 3d-3m	1.31 ± 0.14 *	37.33 ± 12.38 §d	28.93 ± 10.17 *bd	0.69 ± 0.30 §
	STZ 7d-3m	1.31 ± 0.13 *	44.33 ± 18.44 §cd	33.60 ± 12.57 *§cd	1.83 ± 1.14 *e

* $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3meses;

§ $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 3 meses;

a $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1d-3m;

b $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3d-3m;

c $p < 0.05$, con relación al grupo CN 7d-3m;

d $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 1d-3m;

e $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 3d-3m.

n=3 a 5.

Control Respiratorio 3 meses de edad

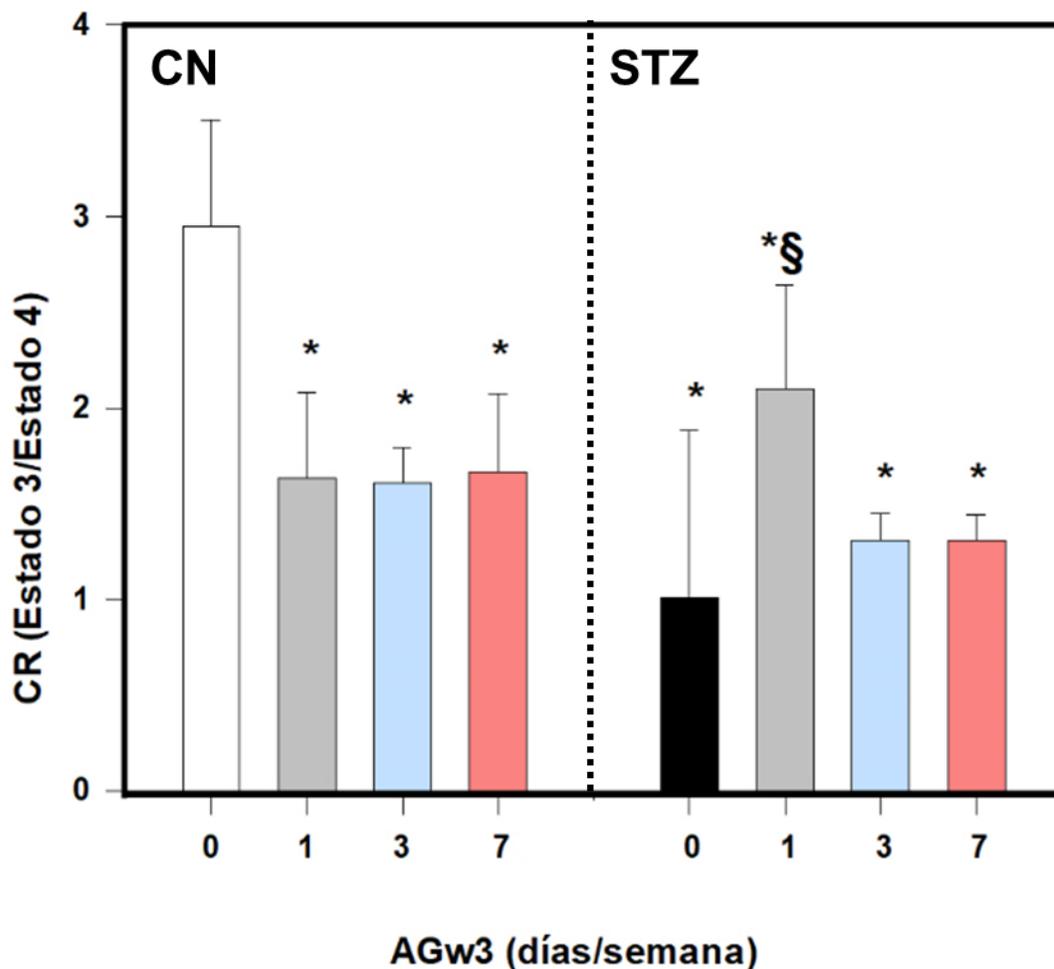


Figura 10. Control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas normoglucémicas (CN) e inducidas a diabetes (STZ) a 3 meses de edad. * $p < 0.05$, con relación al grupo § $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 3 meses. n=3 a 5.

Para finalizar de analizar el efecto de los AGw3 sobre la respiración mitocondrial de células hepáticas, tenemos a los animales de 6 meses de edad.

En la **tabla 5** se presentan los parámetros cinéticos que se obtuvieron de las mitocondrias de ratas control (CN) e inducidas a diabetes (STZ) a los 6 meses de edad, donde, se observa un comportamiento contrario al que se presenta con los animales de 3 meses de edad, ya que, en los animales de 6 meses de edad no existe una disposición en el consumo de oxígeno, para los estados 3 y 4 conforme se aumentan los días de suplementación de los AGw3, sólo se ve para el estado 3 que los grupos STZ con 1,3 y 7 días con suplementación de AGw3 tienen un mayor consumo de oxígeno que el grupo diabético sin suplementación, el

promedio para todos los grupos STZ es de 30.55 mientras que, para los grupos CN es de 32.44, sin embargo, para el estado 4 el promedio de consumo de oxígeno de los grupos CN (de 24.14) es 2 veces mayor al de los grupo STZ (de 12.99) y para este estado los grupos STZ con 1,3 y 7 días con suplementación de AG ω 3 tienen un menor consumo de oxígeno que el grupo diabético sin suplemento.

En el caso del CR sí hay una constante a disminuir conforme se aumentan los días de suplementación para todos los grupos CN, caso contrario para los grupos STZ donde CR es mayor conforme se aumentan los días de suplementación. Podemos observar en la **figura 12** y en la **tabla 5**, que para los grupos CN, el porcentaje de disminución del control al grupo CN con 1 día de suplementación es de 11.1%, el del grupo de 3 días es de 47% y el de 3 días a 7 días es de 72.6%. En los grupos inducidos a diabetes al parecer se recupera el control respiratorio con la administración de ácidos grasos omega 3. El porcentaje con el que aumenta el CR, con respecto al grupo STZ control (ácidos grasos omega 3 0 días/semana), para el grupo STZ AG ω 3 a 1 día de suplementación es de 424%, el grupo de 3 días es de 447% y el de 7 días es de 524%. En el caso del OPR no se observa ninguna disposición.

En la **tabla 5** se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), para el estado 3, donde el grupo de ratas CN 6 meses (25.75 ± 5.51 nAO₂/min/mgP) es significativamente mayor que el grupo STZ 6 meses (13.44 ± 1.56 nAO₂/min/mgP). Este grupo de ratas con DM2, también es significativamente menor que el grupo STZ 7d-6m (30.99 ± 8.81 nAO₂/min/mgP), y al grupo STZ 3d-6m (33.60 ± 5.44 nAO₂/min/mgP). Lo anterior parece indicar que el tratamiento con ácidos grasos omega 3 a las ratas inducidas a diabetes, les ayudó a mantener una mayor respiración en el estado 3. Para el estado 4 se presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para el grupo de ratas CN 6 meses (12.32 ± 3.87 nAO₂/min/mgP) que es menor con respecto a las ratas del grupo CN 3d-6m (36.21 ± 11.55 nAO₂/min/mgP), también con respecto a las ratas del grupo CN 7d-6m (36.09 ± 9.58 nAO₂/min/mgP) y que las ratas del grupo STZ 6meses (20.16 ± 0.83 nAO₂/min/mgP). El grupo CN1d-6m (11.95 ± 3.39 nAO₂/min/mgP) es significativamente menor con respecto a CN 3d-6m (36.21 ± 11.55 nAO₂/min/mgP), también con respecto a CN 7d-6m (36.09 ± 9.58 nAO₂/min/mgP).

Para el OPR que se observa también en la **tabla 5** tenemos que las ratas del grupo CN 6 meses (0.94 ± 0.17 OPR) sólo tiene diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con respecto a las ratas del grupo STZ 6 meses (2.17 ± 0.26 OPR). Sin embargo, este grupo STZ con DM2 también es significativamente mayor con respecto a todos los demás grupos.

Finalmente se observa en la **figura 11** diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de las ratas del grupo CN 6 meses (2.70 ± 0.65 CR) que es 3.6 veces mayor las ratas del grupo CN 7d-6m (0.74 ± 0.29 CR) y 4 veces mayor que las ratas del grupo STZ 6 meses (0.67 ± 0.10 CR). En cuanto a este grupo con DM2 se observa que es estadísticamente menor a los grupos: STZ 1d-6m (2.84 ± 0.41 CR), STZ 3d-6m (3.00 ± 0.26 CR) y STZ 7d-6m (3.51 ± 1.59 CR). En términos generales, a los 6 meses de edad de las ratas, se observa lo siguiente: en ratas control (grupos CN), entre mayor sea la frecuencia de administración de ácidos grasos omega 3, menor es el control respiratorio. En ratas inducidas a diabetes (grupos STZ), cualquier administración de ácidos grasos omega 3 las ayuda a normalizar su control respiratorio.

Tabla 5. Control respiratorio, estado 3, estado 4 y OPR de las mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 6 meses de edad.

		CR	Edo 3 nAO ₂ /min/mgP	Edo 4 nAO ₂ /min/mgP	OPR ADP nmol/mg [P]/ min
CN	CN 6meses	2.70 ± 0.65	25.75 ± 5.51	12.32 ± 3.87	0.94 ± 0.17
	CN 1d-6m	2.40 ± 0.87	26.51 ± 5.18	11.95 ± 3.39	1.12 ± 0.21 §
	CN 3d-6 m	1.43 ± 0.26	52.64 ± 22.99 *§ac	36.21 ± 11.55 *§a	0.64 ± 0.29 §
	CN 7d-6 m	0.74 ± 0.29 *a	24.89 ± 6.56	36.09 ± 9.58 *a	1.21 ± 0.32 §a
STZ	STZ 6meses	0.67 ± 0.10 *	13.44 ± 1.56 *	20.16 ± 0.83 *	2.17 ± 0.26 *
	STZ 1d-6m	2.84 ± 0.41 §	27.07 ± 4.44	9.80 ± 2.80	1.19 ± 0.27 §
	STZ 3d-6 m	3.00 ± 0.26 §b	33.60 ± 5.44 §b	11.20 ± 1.32 b	0.94 ± 0.38 §
	STZ 7d-6 m	3.51 ± 1.59 §c	30.99 ± 8.81 §	10.83 ± 7.16 c	0.96 ± 0.30 §

* $p < 0.05$, con relación al grupo CN 6 meses;
 § $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 6 meses;
 a $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1d-6m;
 b $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3d-6m;
 c $p < 0.05$, con relación al grupo CN 7d-6m.
 n=3 a 5.

Control Respiratorio 6 meses de edad

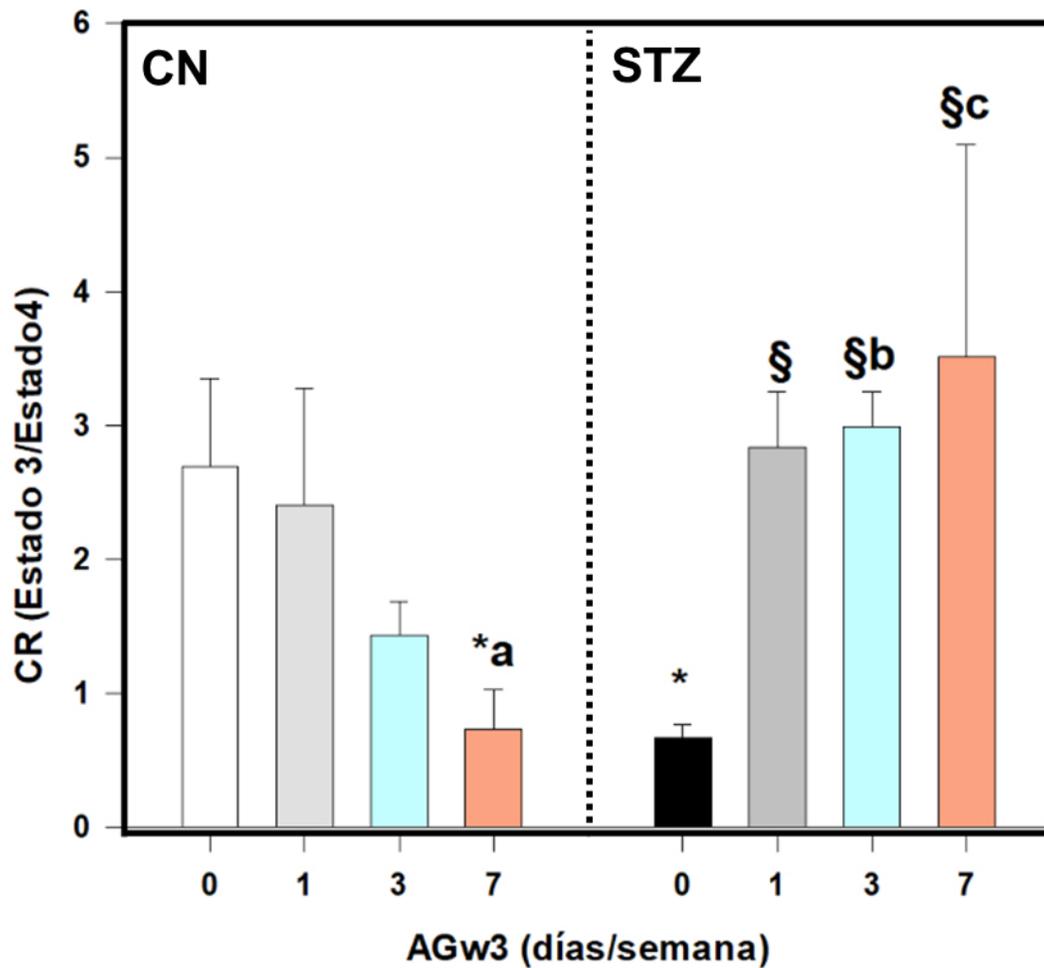


Figura 11. Control respiratorio de mitocondrias de hígado de ratas normoglucémicas (CN) e inducidas a diabetes (STZ) a 6 meses de edad, * $p < 0.05$, con relación al grupo CN 6 meses; § $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 6 meses; a $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1d-6m; b $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3d-6m; c $p < 0.05$, con relación al grupo CN 7d-6m. n=3 a 5.

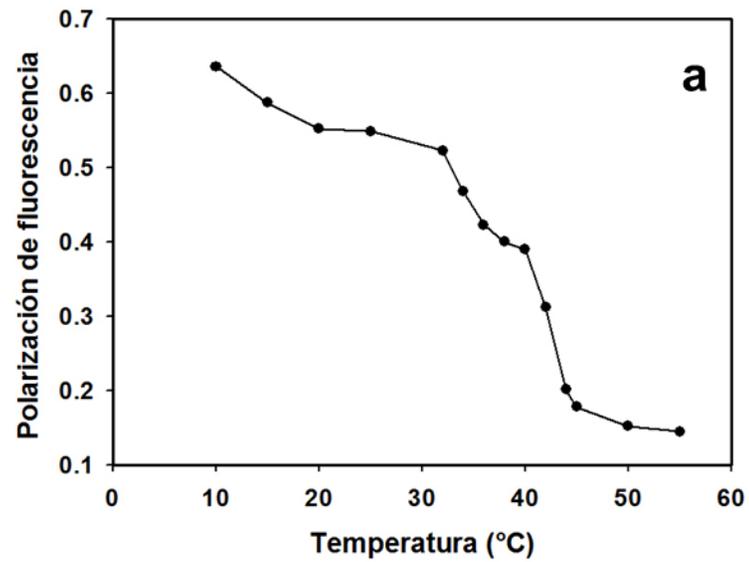
7.2. Fluidéz membranal

Para estudiar la fluidez de las membranas biológicas, se usó el monitor fluorescente DPH, que como se mencionó en material y métodos, se ubica preferencialmente en el núcleo hidrofóbico de la membrana. Posterior a la incorporación del monitor fluorescente se realizó un barrido de temperatura desde los 10 °C hasta los 55 °C, con lo que se obtuvieron las mediciones de polarización, con el objetivo de identificar la transición de fases (gel y líquido cristalino) y la temperatura de transición de fases y con ello conocer las características termotrópicas de las membranas mitocondriales ya que se sabe que dichas características son dependientes de su estructura química. La energía de activación (E_a) se obtuvo mediante el gráfico de Arrhenius como se muestra en la parte de anexos.

Se puede intuir que mientras mayor sea la energía de activación, menor es la fluidez de la membrana, puesto que el movimiento del DPH depende del medio donde se mueve y el gráfico de Arrhenius se realiza con la regresión lineal de la constante cinética. Con el movimiento del monitor se puede seguir la dinámica de los lípidos y el comportamiento cooperativo de las cadenas lipídicas de acilo en la membrana, que también está influenciada por la composición de la membrana.

Para evaluar la confiabilidad del monitor fluorescente DPH se utilizaron liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), que tiene una temperatura de transición de fases de 41 °C para pasar de fase gel a líquido cristalino. En la **figura 12** se presenta la polarización de fluorescencia y el análisis de Arrhenius aplicado a los liposomas de DPPC en el cual se observa que el monitor detecta la transición de fase a los 41 °C al aumentar la temperatura. Lo que demuestra que este monitor parece ser confiable para medir la fluidez de membranas biológicas.

Polarización de liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina



Análisis de Arrhenius

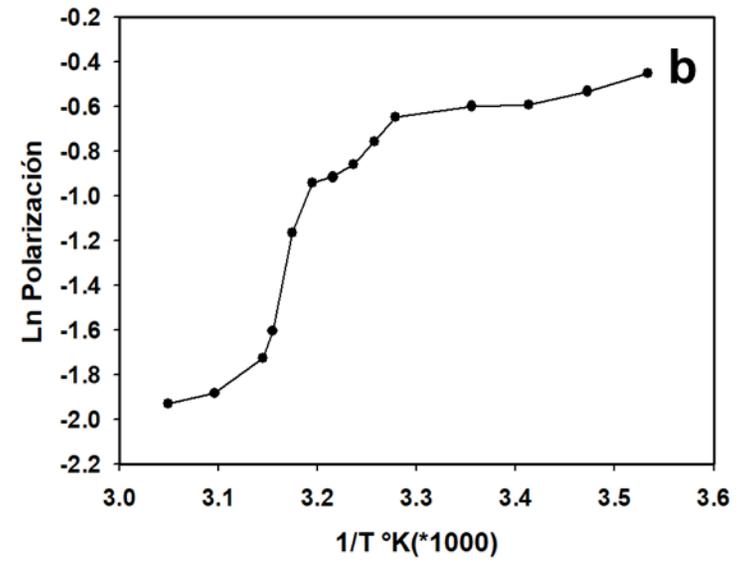


Figura 12. Fluidez membranal de liposomas de DPPC (0.1mM) con el monitor DPH (2 μ M) y análisis de Arrhenius.

En la **tabla 6** se muestran las E_a de las fases gel y líquido cristalino, al igual que la temperatura de transición de fases para las ratas de los grupos normoglucémico (CN) y diabéticas (STZ) de un mes de edad. Se observa que las ratas STZ presentan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) siendo 2.4 veces menor la E_a comparada con la del grupo CN, tanto para el estado gel (2.3 ± 0.5 y 5.7 ± 1.4 $\text{Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente) y el estado líquido cristalino (2.2 ± 0.3 y 5.5 ± 0.8 $\text{Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente). En cuanto a la temperatura de transición de fases (30.5 ± 1.5 y 36.3 ± 0.6 $\text{Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$ respectivamente) también es significativamente menor para las ratas STZ, lo que sugiere cambios importantes en las membranas durante el desarrollo de la diabetes, siendo esta más fluida.

Tabla 6. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y cristal líquido de mitocondrias de hígado de ratas Wistar de 1 mes de edad.

Grupo	Ea ($\text{Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$)						Temperatura de transición de fases ($^{\circ}\text{C}$)				
	Gel			Líquido Cristal							
CN 1 mes	5.7	±	1.4	5.5	±	0.8	36.3	±	1.5		
STZ 1 mes	2.3	±	0.5 *	2.2	±	0.3 *	30.5	±	0.6	*	

* $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1 mes. $p < 0.05$; $n=4$.

Con el objetivo de conocer si la edad afecta a la fluidez mitocondrial, tanto para el grupo de ratas CN como para el grupo STZ, en la **tabla 7** se presentan las E_a para las fases gel y líquido cristal, al igual que la temperatura de transición de fases para las ratas de 1, 3 y 6 meses de edad. No se observan cambios significativos en la E_a de las fases gel y líquido cristalino con respecto a la edad de las ratas, sin embargo, el promedio de $4.63 \pm 2.0 \text{Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$ de los grupos diabéticos es 0.78 veces menor que el promedio de $5.9 \pm 0.3 \text{Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$ de los grupos normoglucémicos para la fase gel, mientras que, para la fase líquido cristal el promedio es 0.74 veces menor para los grupos diabéticos ($3.46 \pm 1.6 \text{Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) que el promedio de los grupos normoglucémicos ($4.63 \pm 0.7 \text{Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$). En cuanto a la temperatura de transición de fases se presenta una disminución de la temperatura de transición de fases en las ratas normoglucémicas cuando estas tienen más edad, comportamiento que cambia para las ratas diabéticas, donde, no hay una distribución clara, sin embargo, el promedio de los grupos diabéticos (31.2 ± 0.6 $^{\circ}\text{C}$) indica que la transición de fases ocurre antes a la de los grupos normoglucémicos (35.03 ± 1.3 $^{\circ}\text{C}$). Estos resultados nos confirman, que existen cambios importantes en las membranas durante el desarrollo de la diabetes, sin embargo, la edad no parece ser un factor significativo para la fluidez de las membranas mitocondriales.

Tabla 7. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y líquido cristal de mitocondrias de hígado de ratas Wistar a 1, 3 y 6 meses de edad.

Grupo		Ea (Kj* mol^{-1})						Temperatura de transición de fases ($^{\circ}\text{C}$)							
		Gel			Líquido Cristal										
CN	CN 1mes	5.7	\pm	1.4			5.5	\pm	0.8			36.3	\pm	1.5	
	CN 3meses	6.4	\pm	2.0	§		4.1	\pm	1.4			35.2	\pm	1.8	§
	CN 6meses	5.8	\pm	1.9	§		4.3	\pm	1.8			33.6	\pm	1.3	*§
STZ	STZ 1mes	2.3	\pm	0.5	*		2.2	\pm	0.3	*		30.5	\pm	0.6	*
	STZ 3meses	5.4	\pm	0.6			2.9	\pm	1.4			31.7	\pm	0.6	*a
	STZ 6meses	6.2	\pm	2.4	§		5.3	\pm	1.9	§		31.4	\pm	1.3	*b

* $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1mes,
 § $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 1mes,
 a $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3meses,
 b $p < 0.05$, con relación al grupo CN 6meses.
 n=3 a 5.

Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) que se ven en la **tabla 7** para el estado gel son las del grupo normoglucémico de 1 mes de edad ($5.7 \pm 1.4 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) que es 2.5 veces mayor al grupo diabético de un mes de edad ($2.3 \pm 0.5 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$). Este grupo diabético (STZ 1mes) es significativamente menor con respecto al grupo CN 3 meses ($6.4 \pm 2.0 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) por 2.8 veces, respecto al CN 6 meses ($5.8 \pm 1.9 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) por 2.5 veces y STZ 6 meses ($6.2 \pm 2.4 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) por 2.7 veces. En cuanto al estado líquido cristal este mismo grupo STZ 1 mes ($2.2 \pm 0.3 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) es significativamente menor con respecto a los grupos CN 1 mes ($5.5 \pm 0.8 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) y STZ 6 meses ($5.3 \pm 1.9 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$). Para la temperatura de transición de fases las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) que se presentan son las del grupo CN 1mes ($36.3 \pm 1.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$) que es significativamente mayor a los grupos CN 6 meses ($33.6 \pm 1.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$), STZ 1 mes ($30.5 \pm 0.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$), STZ 3 meses ($31.7 \pm 0.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y STZ 6 meses ($31.4 \pm 1.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$). En cuanto al grupo STZ 1 mes ($30.5 \pm 0.6 \text{ }^{\circ}\text{C}$) es significativamente menor que CN 3 meses ($35.2 \pm 1.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$) y CN 6 meses ($33.6 \pm 1.3 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

En la **tabla 8** se presenta las Ea's de las fases gel y líquido cristalino, al igual que la temperatura de transición de fases para las ratas de los grupos CN y STZ de 3 meses de edad, con suplementación de AG ω 3 por 1,3 ó 7 días a la semana. Se observa que los grupos CN con AG ω 3 tienen una Ea (en promedio de $4.4 \pm 0.5 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) 0.68 veces menor a la del grupo control ($6.4 \pm 2.0 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) para el estado gel, donde no vemos diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, para los grupos STZ se observa un comportamiento contrario, donde los grupos STZ con suplementación de AG ω 3 tienen una Ea (en promedio de 7.2 ± 1.4

$\text{Kj}\cdot\text{mol}^{-1}$) 1.3 veces mayor a la del grupo STZ sin suplementación de AG ω 3 ($5.4\pm 0.6 \text{ Kj}\cdot\text{mol}^{-1}$) además, de ser 1.12 veces mayor a la del grupo control. Para el estado líquido cristalino, se observa un comportamiento similar al estado gel, los grupos CN con AG ω 3 tienen una E_a (en promedio de $3.8\pm 1.0 \text{ Kj}\cdot\text{mol}^{-1}$) que es 0.92 veces menor en comparación al grupo control ($4.1\pm 1.3 \text{ Kj}\cdot\text{mol}^{-1}$). En los grupos STZ, donde, los grupos con suplementación de AG ω 3 tienen una E_a (en promedio de $5.6\pm 1.7 \text{ Kj}\cdot\text{mol}^{-1}$) es 1.93 veces mayor al grupo STZ que no tiene suplementación de AG ω 3 ($2.9\pm 1.3 \text{ Kj}\cdot\text{mol}^{-1}$) y 1.36 veces mayor que el grupo control. Estos resultados permiten ver que los AG ω 3 llevan a condiciones similares del grupo control a las ratas diabéticas, sin embargo, en las ratas normoglucémicas los AG ω 3 provocan una menor fluidez parecida al grupo diabético. En cuanto a la temperatura de transición de fases tampoco se observa ninguna disposición, para ningún grupo, sin embargo, para los grupos CN con AG ω 3 (que en promedio la temperatura de transición es de $33.53\pm 0.8 \text{ }^\circ\text{C}$ su temperatura de transición es 0.96 veces menor a la del grupo control ($35.2\pm 1.7 \text{ }^\circ\text{C}$), pero en el caso de los grupos STZ este parámetro no se ve alterado por los AG ω 3.

Tabla 8. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y cristal líquido de mitocondrias de hígado de ratas de 3 meses de edad.

Grupo		Ea (Kj*mol-1)				Temperatura de transición de fases (°C)			
		Gel		Líquido Cristal					
CN	CN 3meses	6.4	± 2.0	4.1	± 1.4	35.2	± 1.8		
	CN 1d-3m	3.8	± 0.6	2.7	± 0.6	34.0	± 1.0		
	CN 3d-3m	4.9	± 0.8	4.9	± 1.1	34.0	± 1.0		
	CN 7d-3m	4.6	± 1.3	3.9	± 1.0	32.6	± 2.1	*	
STZ	STZ 3meses	5.4	± 0.6	2.9	± 1.4	31.7	± 0.6	*	
	STZ 1d-3m	8.8	± 2.1	7.4	± 2.6	31.8	± 0.5	*a	
	STZ 3d-3 m	6.7	± 1.4	5.4	± 1.2	32.5	± 1.0	*	
	STZ 7d-3 m	6.1	± 1.8	4.0	± 2.5	30.5	± 1.0	*c	

* $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3meses;
 § $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 3meses;
 a $p < 0.05$, con relación al grupo CN1d-3m;
 c $p < 0.05$, con relación al grupo CN 7d-3m;
 d $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 1d-3m.
 n=3 y 5.

Existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para la fase cristal donde el grupo control es menor al grupo STZ 1d-3m, este grupo diabético con un día a la semana de AGw3 es mayor al grupo STZ y al grupo CN 1d-3m. Para el estado líquido cristal el grupo control es menor al grupo STZ 1d-3m, que tiene una mayor Ea con respecto a los grupos, STZ 3 meses y STZ 7d-3m y finalmente la temperatura de transición de fases donde el grupo control es mayor a las ratas del grupo CN 7d-3m, las ratas del grupo STZ 3 meses, a las ratas del grupo STZ 1d-3m, a las ratas del grupo STZ 3d-3m y a las ratas del grupo STZ 7d-3m (**tabla 8**).

Tabla 9. Energías de activación y temperaturas de transición de fase gel y cristal líquido de mitocondrias de hígado de 6 meses de edad.

Grupo		Ea (Kj* mol^{-1})				Temperatura de transición de fases ($^{\circ}\text{C}$)			
		Gel		Líquido Cristal					
CN	CN 6 meses	5.8	\pm 1.9	4.3	\pm 1.8	33.6	\pm 1.3		
	CN 1d-6m	6.7	\pm 3.0	6.7	\pm 4.0	34.6	\pm 1.1	§	
	CN 3d-6 m	5.2	\pm 2.1	4.2	\pm 1.1	34.0	\pm 1.4	§	
	CN 7d-6 m	6.9	\pm 2.4	5.1	\pm 1.9	32.3	\pm 1.5		
STZ	STZ 6 meses	6.2	\pm 2.4	5.3	\pm 1.9	31.4	\pm 1.3	*	
	STZ 1d-6m	7.1	\pm 0.9	6.5	\pm 2.3	32.5	\pm 1.9	*a	
	STZ 3d-6 m	5.2	\pm 3.2	4.3	\pm 2.8	31.4	\pm 1.3	*b	
	STZ 7d-6 m	10.4	\pm 2.7	4.4	\pm 1.5	31.0	\pm 1.0		

* $p < 0.05$, con relación al grupo CN 6 meses;

§ $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 6 meses;

a $p < 0.05$, con relación al grupo CN1d-6m;

c $p < 0.05$, con relación al grupo CN 7d-6m;

d $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 1d-6m.

n=3 y 5.

Finalmente, en la **tabla 9** se presentan la Ea de las fases gel y líquido cristalino, al igual que la temperatura de transición de fases para las ratas del grupo CN y STZ de 6 meses de edad, con suplementación de AG ω 3 por 1,3 ó 7 días a la semana. Se observa que en la fase gel de las membranas mitocondriales los AG ω 3 en los grupos CN disminuyen la fluidez membranal ya que en promedio su Ea de $6.26 \pm 0.9 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$ es 1.07 veces mayor que la Ea del grupo control de $5.8 \pm 1.9 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$, comportamiento similar a los grupos STZ con suplementación de AG ω 3 que en promedio su Ea de $7.56 \pm 2.6 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$ es 1.21 veces mayor al grupo STZ sin suplemento de AG ω 3 con un Ea de $6.2 \pm 2.4 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$, y es 1.3 veces mayor al grupo control. Mientras que para la fase líquido cristalino se ve también una disminución en la fluidez membranal con un aumento de la Ea (en promedio de $5.33 \pm 1.2 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$) para los grupos normoglucémico con AG ω 3 que es 1.22 veces mayor que la Ea del grupo control ($4.3 \pm 1.7 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$), en cuanto a los grupos STZ con AG ω 3 el promedio de su Ea de $5.06 \pm 1.2 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$ no es muy diferente al del grupo diabético sin AG ω 3 con un Ea de $5.3 \pm 1.9 \text{ Kj} \cdot \text{mol}^{-1}$ siendo este 0.95 veces menor al de los grupos STZ con AG ω 3. En cuanto a la temperatura de transición de fases la administración de los AG ω 3 de los grupos CN provoca que suceda a una mayor temperatura, sin embargo, el promedio de los grupos CN con AG ω 3 de $33.6 \pm 1.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ es igual a la temperatura de transición del grupo control y para los grupos STZ tampoco vemos cambios

significativos entre el promedio de 31.6 ± 0.7 °C de los grupos STZ con AG ω 3 y el grupo STZ sin AG ω 3 de 31.4 ± 1.3 °C, sólo vemos que la temperatura de transición ocurre a una menor temperatura para los grupos STZ con relación a los grupos CN.

Se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para la fase gel en el grupo control que es menor al grupo STZ 7d-6m que a su vez este grupo diabético es mayor respecto a los grupos STZ 6 meses y STZ 3d-6m. Para la fase líquido cristal no se observan en la **tabla 9** diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, para la temperatura de transición de fases sí existen diferencias del grupo control que tiene una mayor temperatura de transición de fases respecto a los grupos STZ 6 meses, STZ 1d-6m y STZ 3d-6m. Lo que nos indica que el grupo diabético con suplementación de 7 días a la semana es el que mayor diferencia tiene con respecto al grupo control.

7.3. Análisis electroforético

Para esta parte del trabajo, las electroforesis son representativas de cada uno de los grupos estudiados y se realizaron sus respectivos análisis densitométricos. La intención de esta sección era saber si la expresión proteica cambia con los diferentes tratamientos y poder considerarlo para próximos trabajos similares. Las densitometrías se realizaron para describir mejor lo que se observa en el gel, por lo que el análisis y discusión de esta parte del proyecto es cualitativo y no cuantitativo.

Como observamos en los resultados anteriores se presentan cambios en el CR y la fluidez membranal que son producidos tanto por la diabetes como por los tratamientos con AG ω 3. Sin embargo, el comportamiento de estos ácidos grasos es diferente para los grupos normoglucémicos y los grupos diabéticos, por lo que surge la duda de si entre los efectos, tanto de la diabetes como de los mecanismos de acción de los ácidos grasos omega 3, puedan generarse cambios en las proteínas mitocondriales (y de la membrana mitocondrial) que puedan estar influyendo en estos parámetros. Por esta razón, se llevó a cabo un análisis electroforético que permitió obtener el perfil proteico de las mitocondrias de los grupos diabéticos y normoglucémicos sin tratamiento y con tratamiento a 1, 3 ó 7 días a la semana de AG ω 3. El análisis densitométrico de los geles nos permitió conocer si existen cambios importantes en los componentes proteicos de las mitocondrias que se podrían tomar en cuenta para próximas investigaciones e incluir otros métodos y técnicas que nos permitan obtener información precisa de los cambios en la totalidad de las membranas mitocondriales, considerando las proteínas que son componentes importantes de las membranas y que tienen relación con la fluidez y la actividad mitocondrial.

Para obtener el perfil proteico se realizó una electroforesis desnaturalizante con la que posteriormente se hizo un análisis densitométrico y se obtuvieron los pesos moleculares, elaborando una curva de pesos moleculares con los marcadores y la distancia que migraban en la electroforesis, que describía un comportamiento en potencia ($y = cx^b$).

En la **figura 13** se presentan los perfiles proteicos de los grupos normoglucémicos (CN) y diabéticos (STZ), para los grupos de 1, 3 y 6 meses de edad. Se pueden apreciar en promedio 23 bandas de proteínas en todos los grupos, para el grupo diabético de 6 meses de edad se ve una banda bien definida que se encuentra entre los 165 KDa, esta banda no se ve en los demás grupos normoglucémicos, inclusive en los grupos diabéticos de 1 y 3 meses de edad no se ve de forma definida.

En la **figura 14** se presenta el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida, del grupo diabético y normoglucémico de un mes de edad, se ve el mismo número de bandas para ambos grupos, y el análisis densitométrico muestra una mayor expresión de proteínas para el grupo diabético respecto al control teniendo un promedio de 1.2 en VC. Se ve una banda muy tenue en 165KDa, casi imperceptible en la figura 14 para las ratas diabéticas, sin embargo, en el análisis densitométrico se identifica tanto para el grupo control, como para el grupo diabético teniendo este último una mayor expresión de proteína por casi 2 veces.

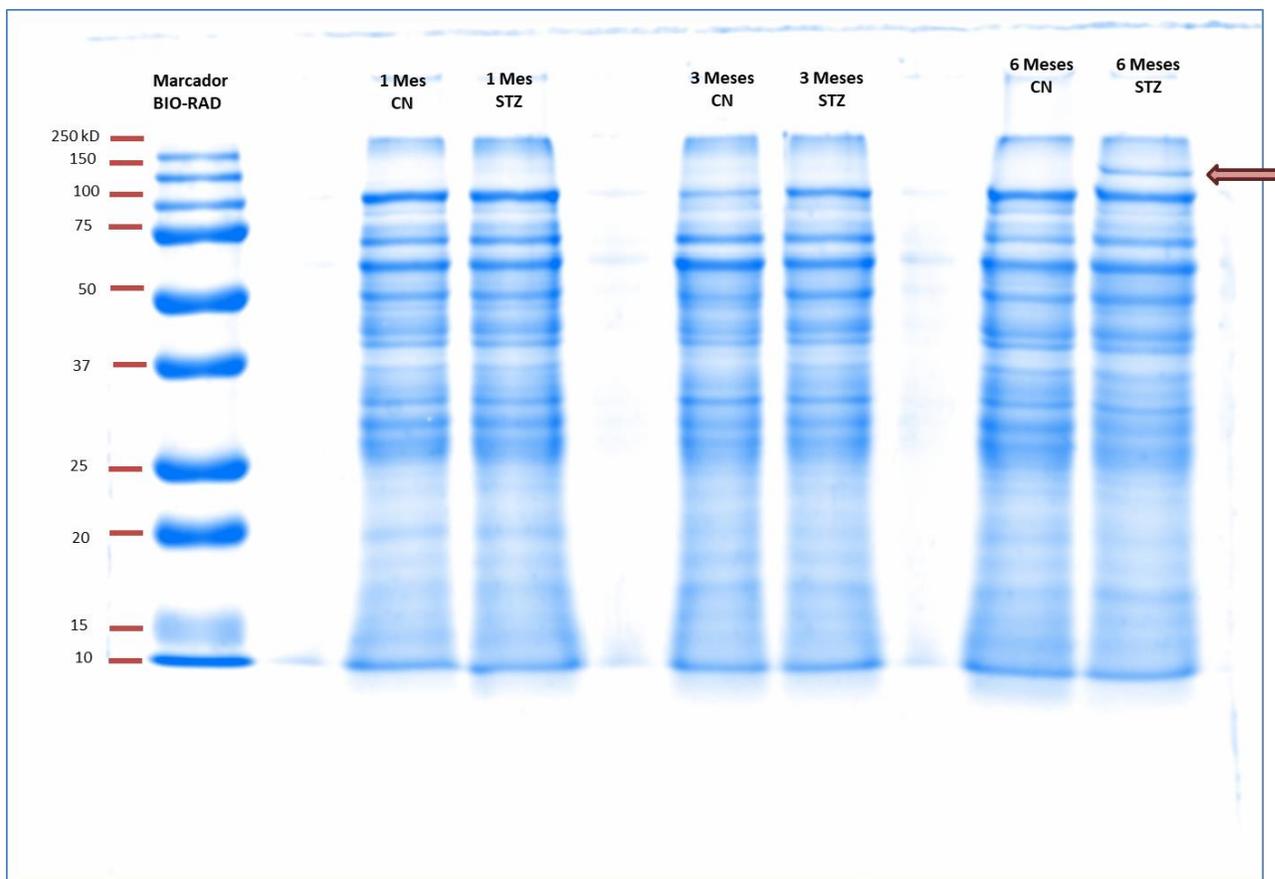


Figura 13. Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de los grupos normoglucémicos y diabéticos sin AG ω 3 de 1, 3 y 6 meses de edad. Se muestra el marcador con los pesos moleculares del lado izquierdo (carril 1) y marcado con una flecha las bandas que corresponden a las proteínas que cambiaron con respecto al grupo control de 1 mes de edad.

En la **figura 15** se muestra el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida de los grupos normoglucémicos de 1,3 y 6 meses de edad, en donde se aprecia que el promedio de las VC tanto para los grupos de 3 y 6 meses de edad es de 1.2 comparadas con el grupo de 1 mes de edad, sin embargo, vemos que para el grupo de 3 meses de edad 2dos bandas muestran picos en las VC que se encuentran en 50 y 165 KDa, lo que indica que el grupo de 3

meses de edad tiene 1.8 veces más expresión de la proteína de 165KDa y en cuanto a la proteína de 50 KDa en el análisis densitométrico no se detectó.

En cuanto a la **figura 16** donde se muestra el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida de los grupos diabéticos de 1,3 y 6 meses de edad y las VC que estos grupos tienen con respecto al grupo normoglucémico de 1 mes de edad, se aprecia que al igual que los grupos normoglucémicos el promedio de bandas que conforman el perfil proteico es de 23 y el promedio de las VC tanto para los grupos de 3 y 6 meses de edad es de 1.1. Para el grupo de 3 meses de edad se ve que las VC permanecen homogéneas, sin embargo, no se percibe la banda de 50KDa y sólo se observa un pico en la proteína de 165 KDa que tiene 1.7 veces mayor expresión, comportamiento similar para el grupo de 6 meses, que las VC permanecen homogéneas sin embargo, este grupo presenta una mayor expresión de la proteína de 165 KDa de 3.8 veces, aparte de tener 2.1 veces más expresión de una proteína de 35 KDa.

Estos resultados indican que el modelo de diabetes que se indujo afecta el perfil proteico, sin embargo, sólo para algunas proteínas, como por ejemplo, la proteína de 165 KDa en donde, se ven cambios relacionados con la patología y la edad, a diferencia de los grupos suplementados, donde se presentan cambios en varias proteínas del perfil proteico, por lo que podemos asegurar que los cambios en la expresión de proteínas que se pueden presentar en los grupos con los diferentes tratamientos de AG ω 3, son resultado de la suplementación de estos ácidos grasos y no por un efecto del modelo de diabetes o de la edad.

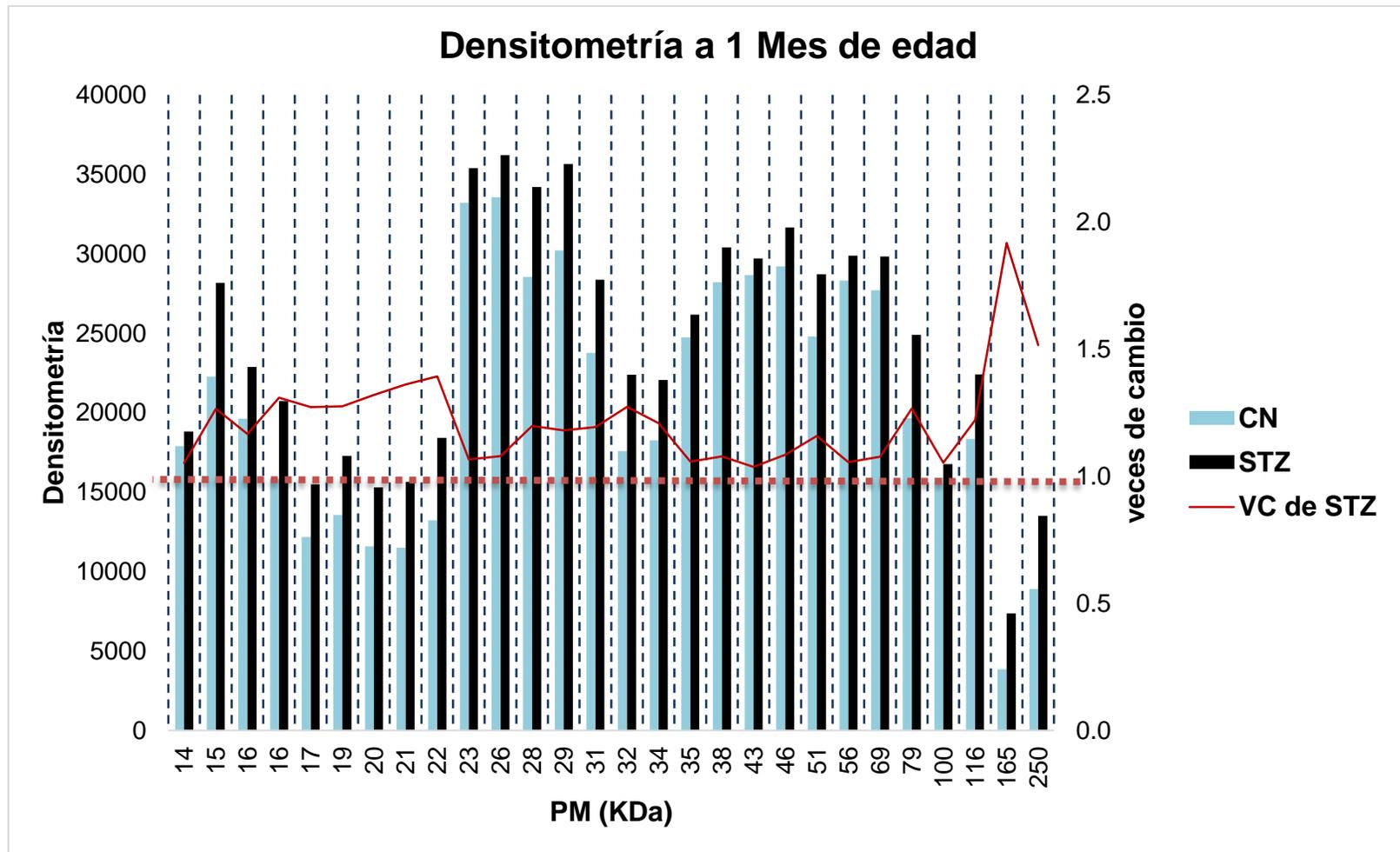


Figura 14. Densitometría del perfil proteico de los grupos normoglucémicos y diabéticos sin AGw3 de 1mes de edad y Veces de Cambio respecto al grupo control (VC).

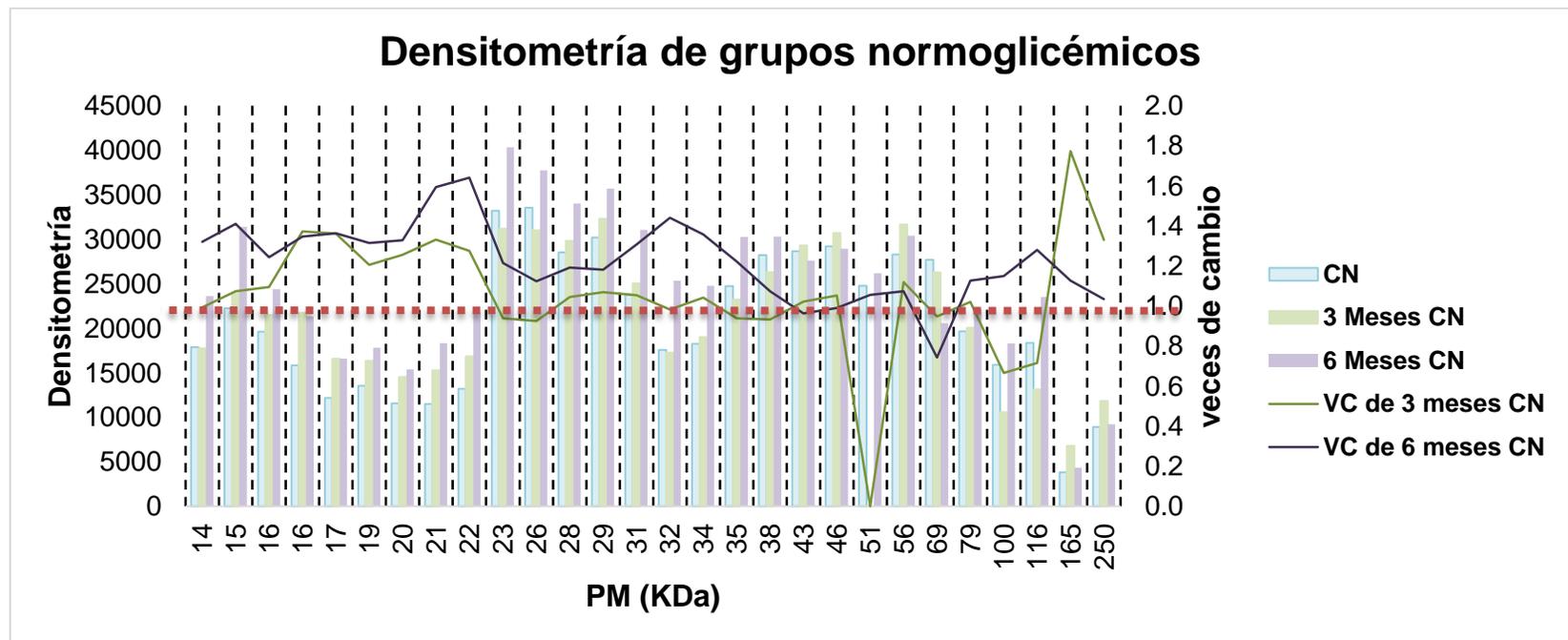


Figura 15. Densitometría del perfil proteico de los grupos normoglicémicos sin AG ω 3 de 1, 3 y 6 meses de edad y Veces de Cambio respecto al grupo control (VC).

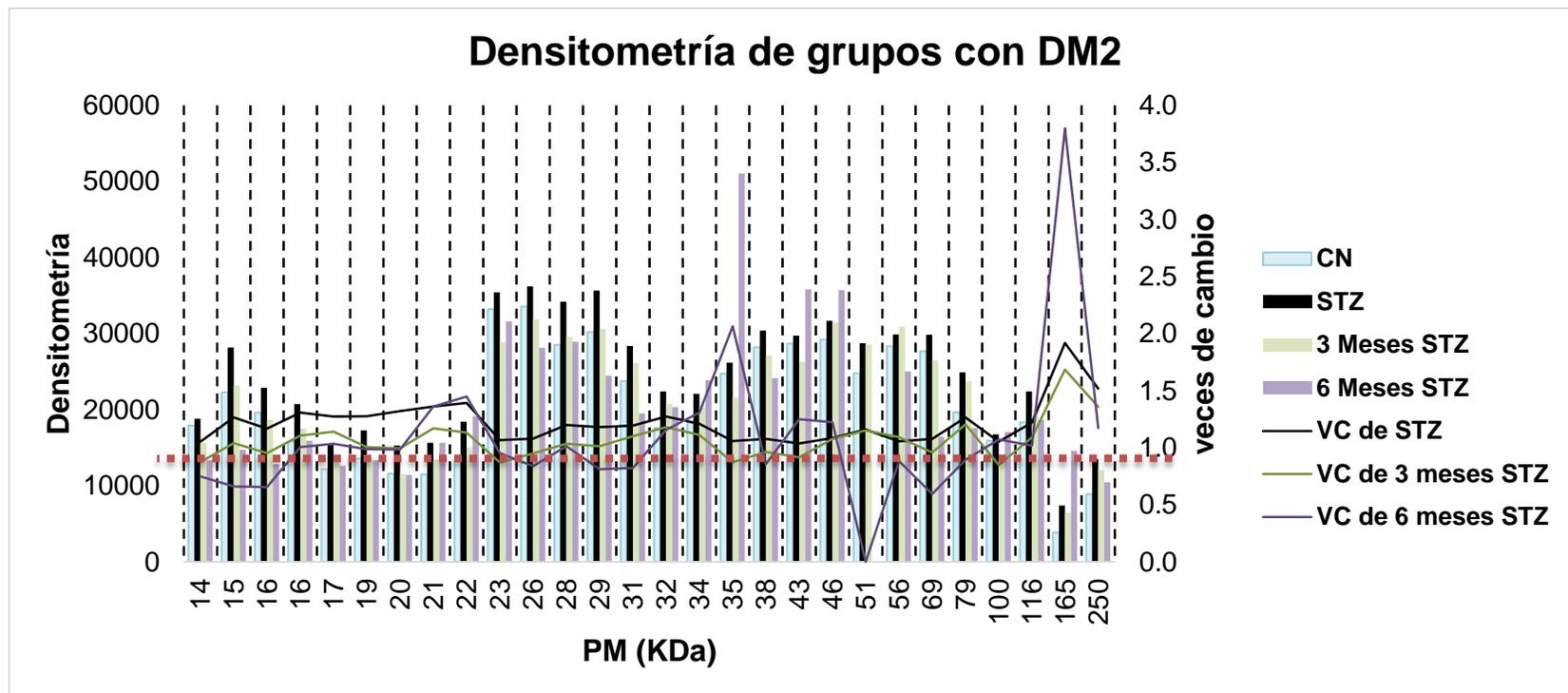


Figura 16. Densitometría del perfil proteico de los grupos diabéticos sin AGw3 de 1 3 y 6 meses de edad y Veces de Cambio respecto al grupo control (VC).

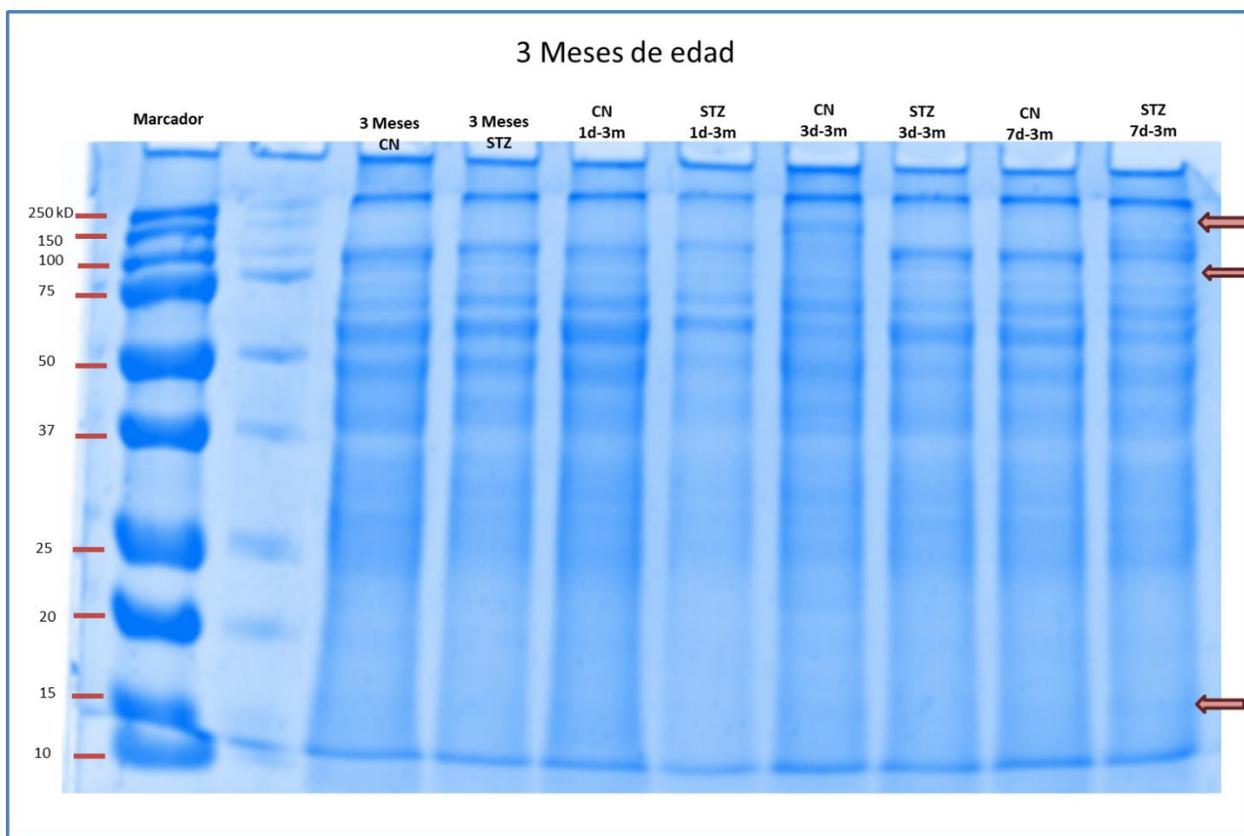


Figura 17. Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de los grupos normoglucémicos y diabéticos sin y con AGw3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 3 meses de edad. Se muestra el marcador con los pesos moleculares del lado izquierdo (carril 1) y marcado con una flecha las bandas que corresponde a las proteínas que cambiaron con respecto al grupo control.

En la **figura 17** se presentan los perfiles proteicos de los grupos normoglucémicos (CN) y diabéticos (STZ), de 3 meses de edad, sin tratamiento y con tratamiento por 1, 3 y 7 días a la semana con AGw3. En esta figura se puede apreciar un promedio de 23 bandas de proteína para todos los grupos, se observa también que las bandas correspondientes a las proteínas con mayor peso molecular como las de 165, 150, 122 y 99 KDa de los grupos con suplemento de AGw3 se ven diferentes a las del grupo control, apreciándose con más claridad en el grupo normoglucémico con suplemento de AGw3 3 días a la semana (CN 3d-3m) y el grupo diabético con suplemento de AGw3 7 días a la semana (STZ 7d-3m).

En la **figura 18** se muestra el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida de los grupos normoglucémicos de 3 meses de edad, sin tratamiento y con tratamiento a 1, 3 y 7 días a la semana con AGw3. En esta figura se observa que los grupos con tratamientos de AGw3 alteran la presencia de algunas proteínas dentro del perfil proteico, sin cambiarlo por completo, manteniendo promedios en las VC cercanos a 1 para los grupos de 1, 3 y 7 días a la semana con suplementación de AGw3, teniendo promedios de 0.92, 1.11 y 0.84

respectivamente, lo que nos indica homogeneidad en la mayoría de las proteínas que se encuentran en la mitocondria, sin embargo, hay proteínas que cambian significativamente ya que muestran una menor o mayor expresión con relación al grupo control, en su mayoría son las de mayor peso molecular, como se ve para la proteína de 165 KDa que tiene 3.63 veces mayor expresión para el grupo con AG ω 3 3 días a la semana (CN 3d-3m), la proteína de 150 KDa presenta una mayor expresión por 1.65, 3.54 y 1.66 para todos los grupos suplementados desde 1, 3 y 7 días a la semana. Otras proteínas que muestran cambios importantes para todos los grupos son la de 122 y 99 KDa, ya que estas tienen una menor expresión, por 0.35 y 0.48 para el grupo con suplemento 1 día a la semana (CN 1d-3m), de 0.41 y 0.52 para el grupo con suplemento 3 días a la semana (CN 3d-3m), finalmente de 0.38 y 0.42 para el grupo con suplemento 7 días a la semana (CN 7d-3m). En cuanto al grupo con suplemento 1 día a la semana (CN 1d-3m) presenta 0.20 veces menos proteína de 33 KDa.

En la **Figura 19** se muestra el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida de los grupos diabéticos de 3 meses de edad, sin tratamiento y con tratamiento de 1, 3 y 7 días a la semana con AG ω 3. Se observa que la diabetes altera la expresión disminuyendo 0.68 veces el promedio de las VC en el grupo diabético sin AG ω 3 (STZ 3meses) en relación al grupo control. En general se observa una menor expresión de proteínas para todos los grupos diabéticos con tratamientos de 1,3 y 7 días a la semana con AG ω 3 en comparación al grupo control, en el caso del grupo con AG ω 3 un día a la semana (STZ 1d-3m) el promedio de las VC es de 0.42, por lo que vemos una disminución considerable de la expresión de proteínas, indicando que la suplementación de los ácidos grasos no tiene efecto considerable para este grupo, sin embargo, para el grupo de 3 días a la semana (STZ 3-3m) y el de 7 días a la semana con AG ω 3 (STZ 7-3m) cuyo promedio de VC es de 0.75 y 0.97 respectivamente, se acercan a 1, lo que indica que los AG ω 3 tienen un efecto considerable sobre la expresión de proteínas, llevando a estos grupos diabéticos a condiciones similares a las del grupo control. Dentro de los perfiles proteicos las proteínas con mayores cambios en su expresión, son las que tienen mayor peso molecular, comportamiento parecido al de los grupos normoglucémicos, sin embargo, para estos grupos diabéticos también hay cambios importantes para proteínas con menor peso molecular, como se ve, para las proteínas de 20, 33 y 83 KDa que tienen una menor expresión proteica para los grupos con 1 y 3 días de tratamiento y el grupo diabético sin AG ω 3, que va desde 0.13 a 0.66 veces menor expresión proteica en relación al grupo control, sin embargo, el grupo con 7 días de tratamiento tienen una expresión proteica cercana al grupo control para las proteínas de 33 y 87 KDa con un valor de VC de 0.90 y para la de 20 KDa de 0.55. En cuanto a las proteínas con mayor peso como la de 165 KDa en el caso del grupo con 7 días de

tratamiento que tiene una mayor expresión de 2.73 veces que el grupo control, contrario a lo que pasa con los grupos con 1 y 3 días de tratamiento, que tienen una menor expresión de 0.70 y 0.74 VC. Para la proteína de 150 KDa todos los grupos presentan una mayor expresión en comparación al grupo control, siendo el grupo con 7 días de tratamiento con 3.82 VC el mayor, seguido por el grupo con 3 días a la semana con 1.36, después el grupo con 1 día a la semana con 1.28 y por último el grupo diabético sin tratamiento con 1.15, finalmente se observa una menor expresión para las proteínas de 99 y 122 KDa que va de 0.17 a 0.44 para todos los grupos diabéticos en comparación al grupo control.

Como se vio en los resultados anteriores de los grupos normoglucémicos y diabéticos de 3 meses de edad, la expresión de proteínas cambia con la suplementación de los AG ω 3, en especial las proteínas con mayor peso molecular como son las de 165, 150, 122 y 99 KDa. En cuanto a las proteínas que presentaron más cambios en su expresión de menor peso molecular fueron las de 20, 33 y 83 KDa. Para los grupos normoglucémicos vemos que los promedios de las VC eran cercanos a 1, sin embargo, para los grupos diabéticos presentaban una menor expresión proteica para todo el perfil, con excepción de la proteína con 150 KDa, en comparación al grupo control. También podemos observar que en los grupos diabéticos existe una disposición a valores cercanos a 1 conforme se aumentan los días de tratamiento con un promedio en las VC de 0.97 para el grupo diabético con tratamiento de 7 días a la semana, comportamiento interesante ya que los grupos con tratamientos de AG ω 3 de 1 y 3 días a la semana tienen valores cercanos a 0 con 0.42 y 0.75 respectivamente que son valores cercanos al del grupo diabético sin AG ω 3 con un promedio de 0.68.

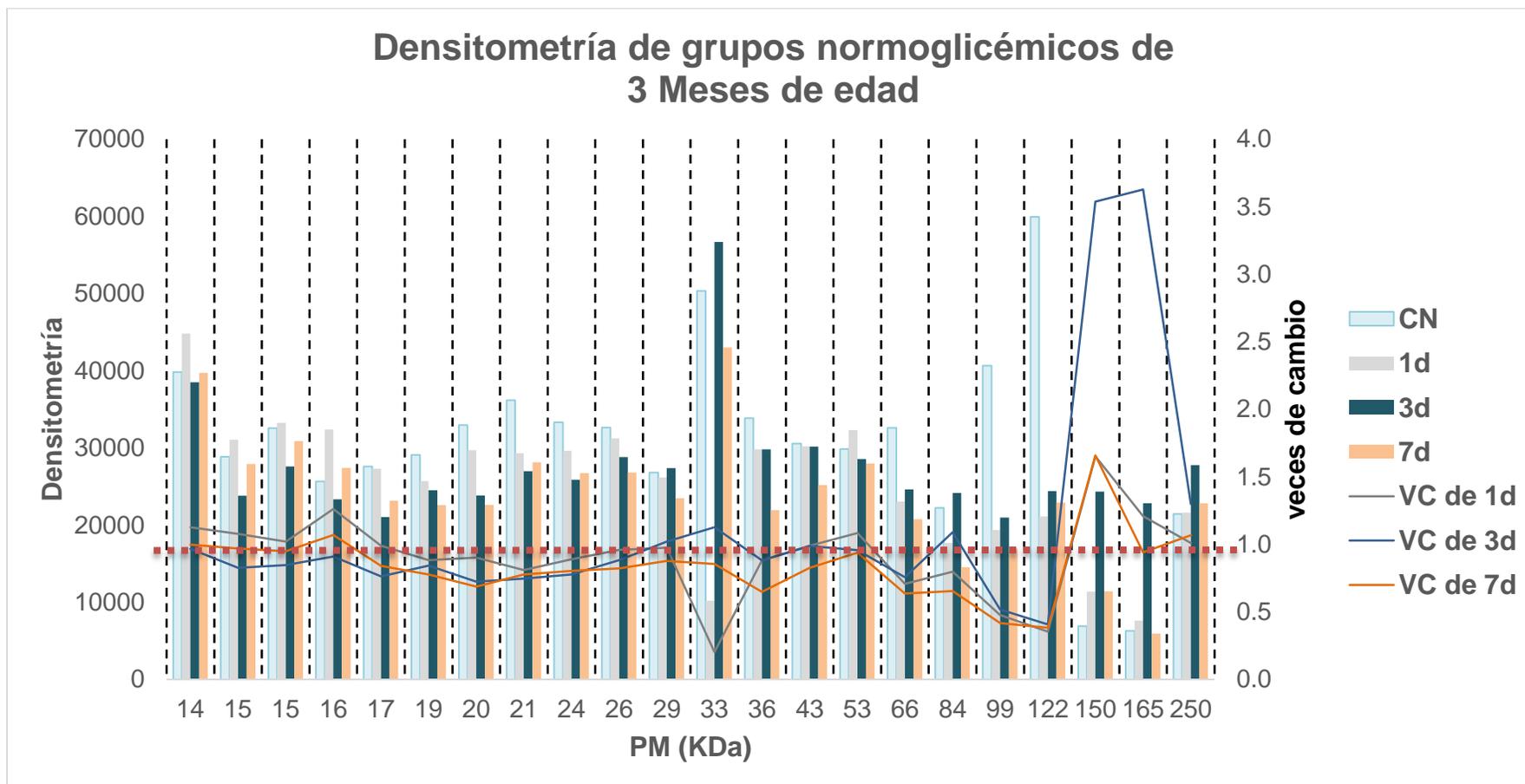


Figura 18. Densitometría del perfil proteico de los grupos normoglicémicos sin y con AGw3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 3 meses de edad y Veces de Cambio respecto al grupo control (VC).

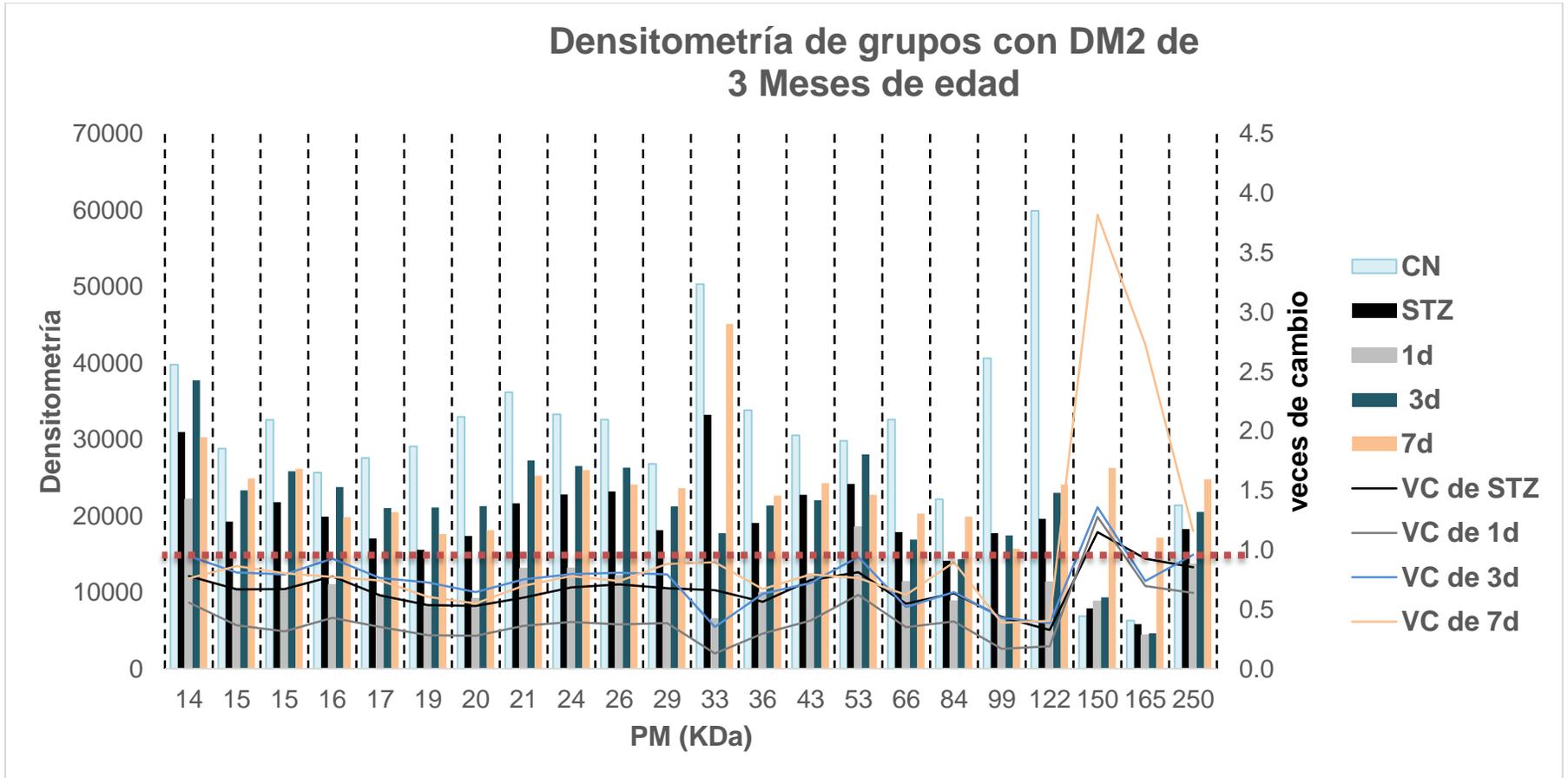


Figura 19. Densitometría del perfil proteico de los grupos diabéticos sin y con AGw3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 3 meses de edad y Veces de Cambio respecto al grupo control (VC).

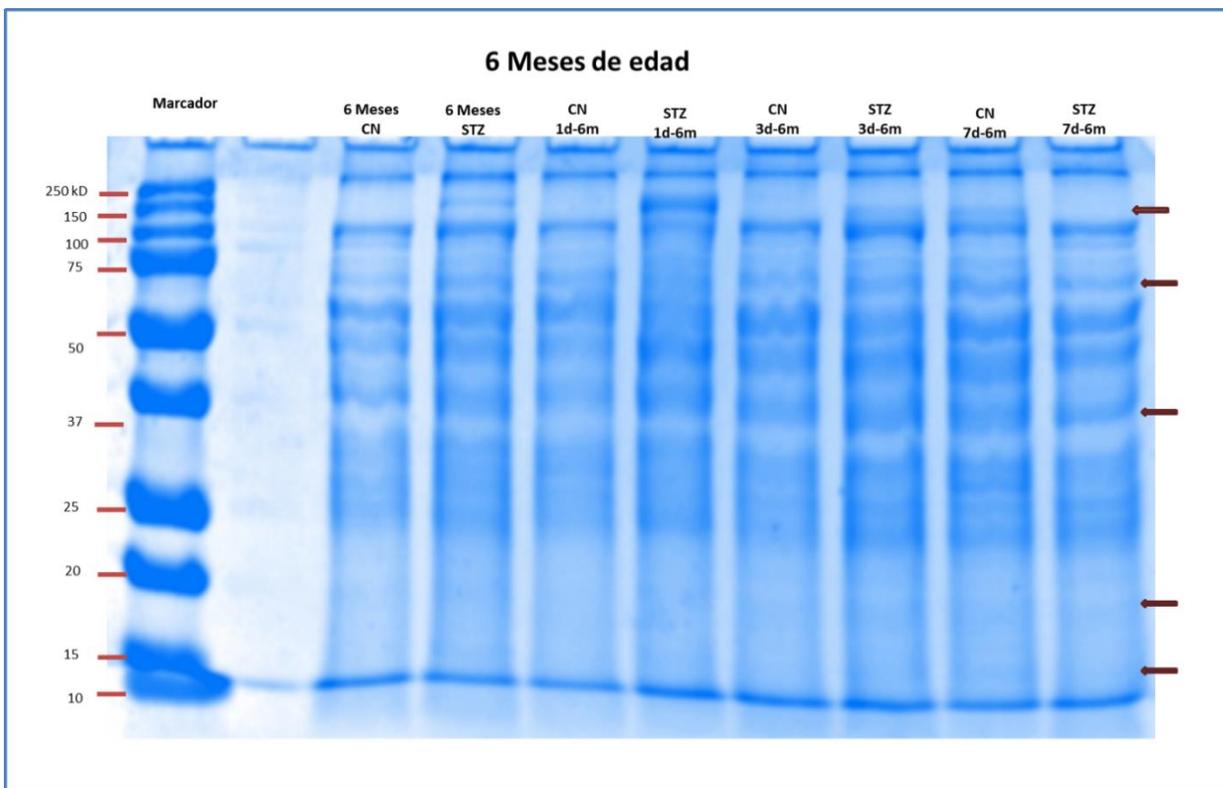


Figura 20. Perfil electroforético (SDS-PAGE 10%) de las proteínas de los grupos normoglucémicos y diabéticos sin y con AG ω 3 a 1, 3 y 7 días a la semana, de 6 meses de edad. Se muestra el marcador con los pesos moleculares del lado izquierdo (carril 1) y marcado con los pesos moleculares del lado izquierdo (carril 1) y marcado con una flecha las bandas que corresponde a las proteínas que cambiaron con respecto al grupo control.

En la **figura 20** se presentan los perfiles proteicos de los grupos normoglucémicos (CN) y diabéticos (STZ), de 6 meses de edad, sin tratamiento y con tratamiento por 1, 3 ó 7 días a la semana con AG ω 3. Se observa un promedio de 23 bandas de proteína para todos los grupos, también se percibe una banda en 165 KDa que cambia en todos los grupos, para el grupo diabético con suplemento de 1 día a la semana de AG ω 3 (STZ 1d-6m) es más perceptible que en los demás grupos, otras bandas en las que se ven cambios con la suplementación de los AG ω 3 tanto en los grupos normoglucémicos como diabéticos con respecto al grupo control son las de mayor peso molecular como en las de 71, 58 y 43 KDa.

En la **figura 21** se muestra el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida de los grupos normoglucémicos de 6 meses de edad, sin tratamiento y con tratamiento por 1, 3 ó 7 días a la semana con AG ω 3. En esta gráfica se ve una mayor expresión de las proteínas de las mitocondrias de ratas diabéticas a las del grupo control, con un promedio de VC de 1.96, también se observa que los AG ω 3 cambian la expresión de las proteínas de todos los pesos moleculares en el perfil y se observa un disposición en la mayoría de las proteínas de aumentar

la expresión conforme se aumentan los días de suplementación, con excepción de las proteínas de 14, 20, 22, 24, 59 y 87 KDa, en donde no está claro este comportamiento, sin embargo, en los promedios de las VC con respecto al control esta predisposición se ve claramente, teniendo para el grupo con suplementación 1 día a la semana un promedio en las VC de 1.35, para el grupo con suplementación 3 días a la semana de 1.55 y para el de 7 días a la semana de 2.04. Como vimos en las gráficas anteriores para los grupos de 3 meses de edad, las proteínas con más modificaciones son las de mayor peso molecular; como la proteína de 165 KDa que es la que presenta una mayor expresión para todos los tratamientos de AG ω 3 de 1, 3 y 7 días a la semana, con VC de 2.11, 2.78 y 4.37 respectivamente. Otras proteínas que presentan los picos más altos en las VC en la gráfica y que por tanto se expresan más que el grupo control para todos los tratamientos de 1, 3 y 7 días a la semana de AG ω 3 son, la de 71 KDa con VC de 1.95, 2.25 y 2.71, la de 36 KDa con VC de 1.35, 2.05 y 2.55 y por último la de 16 KDa con VC de 1.23, 1.41 y 1.84 respectivamente.

En la **figura 22** se muestra el análisis densitométrico de los geles de poliacrilamida de los grupos diabéticos de 6 meses de edad, sin tratamiento y con tratamiento de 1, 3 y 7 días a la semana con AG ω 3. Se ve que el grupo diabético tiene un promedio de VC de 1.96 en comparación al grupo control. En general se puede ver que a diferencia de las gráficas de 3 meses de edad donde la expresión de la mayoría de las proteínas era menor a la del grupo control, las proteínas de los grupos diabéticos de 6 meses de edad presentan una mayor expresión proteica a comparación del grupo control, como se ve en el análisis densitométrico para todas las proteínas, este es menor a los grupos suplementados con AG ω 3, pero no en todos los casos en el grupo diabético sin suplementación. También se ve una constante en los promedios de las VC con respecto al control de disminuir conforme se aumentan los días de suplementación, teniendo de esta forma que para los grupos con suplementación de AG ω 3 1, 3 y 7 días a la semana, cuentan con promedios en las VC de 2.66, 2.06 y 1.24 respectivamente. Igual que en gráficas anteriores vemos una mayor expresión para la proteína de 165 KDa que presenta VC de 5.65, 16.77, 4.04 y 1.28 respectivos a los grupos diabéticos sin AG ω 3 y diabéticos con suplementación de AG ω 3 1, 3 y 7 días a la semana. Otras proteínas que presentan una mayor expresión que el grupo control para todos los tratamientos de 1, 3 y 7 días a la semana de AG ω 3 y el grupo diabético sin AG ω 3 son, la de 71 KDa con VC de 3.60, 2.76, 1.27 y 2.49, la de 36 KDa con VC de 2.21, 2.46, 1.55 y 1.81 y por último la de 18 KDa con VC de 1.89, 2.38, 1.17 y 2.24 respectivamente.

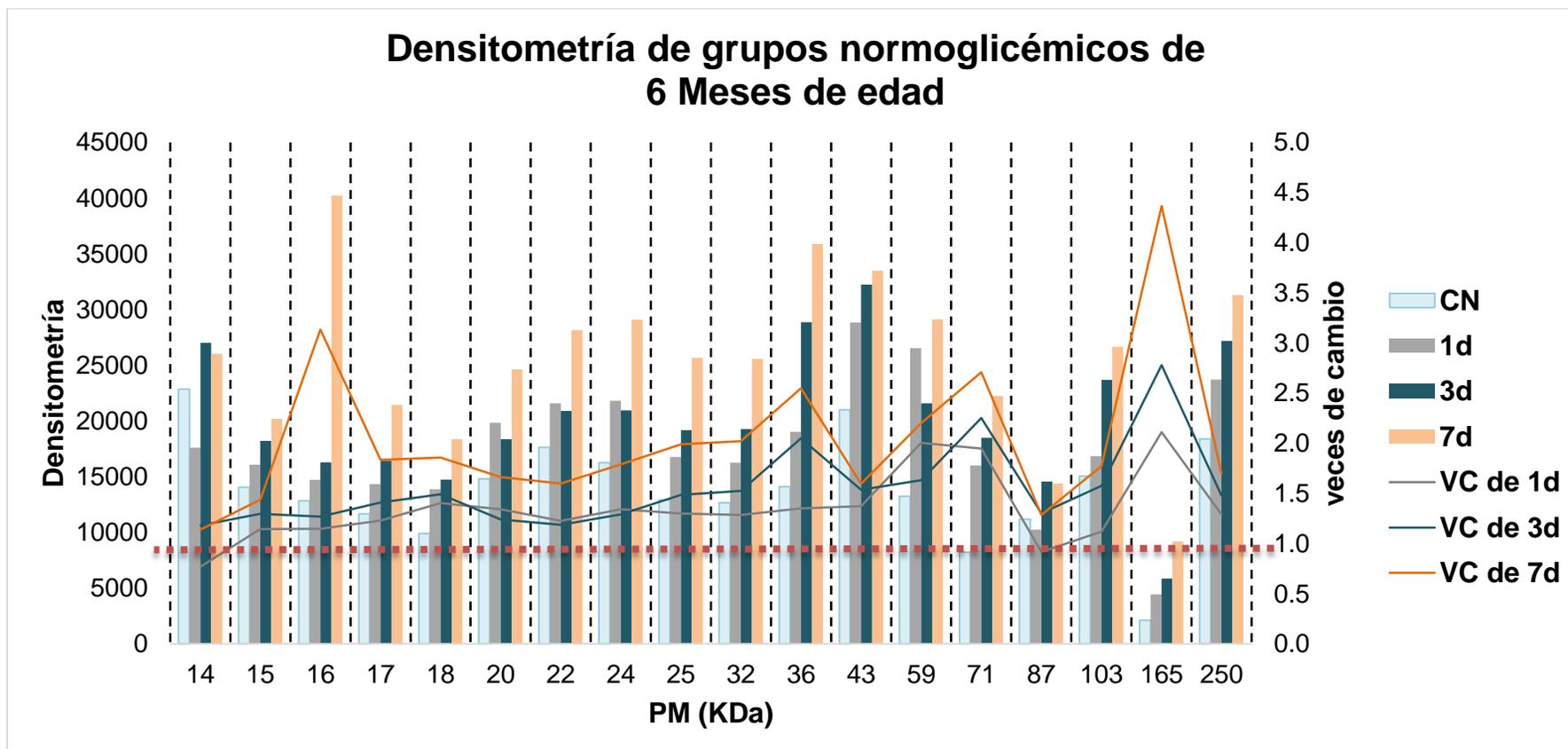


Figura 21. Densitometría del perfil proteico de los grupos normoglicémicos sin y con AGw3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 6 meses de edad y Veces de Cambio respecto al grupo control (VC).

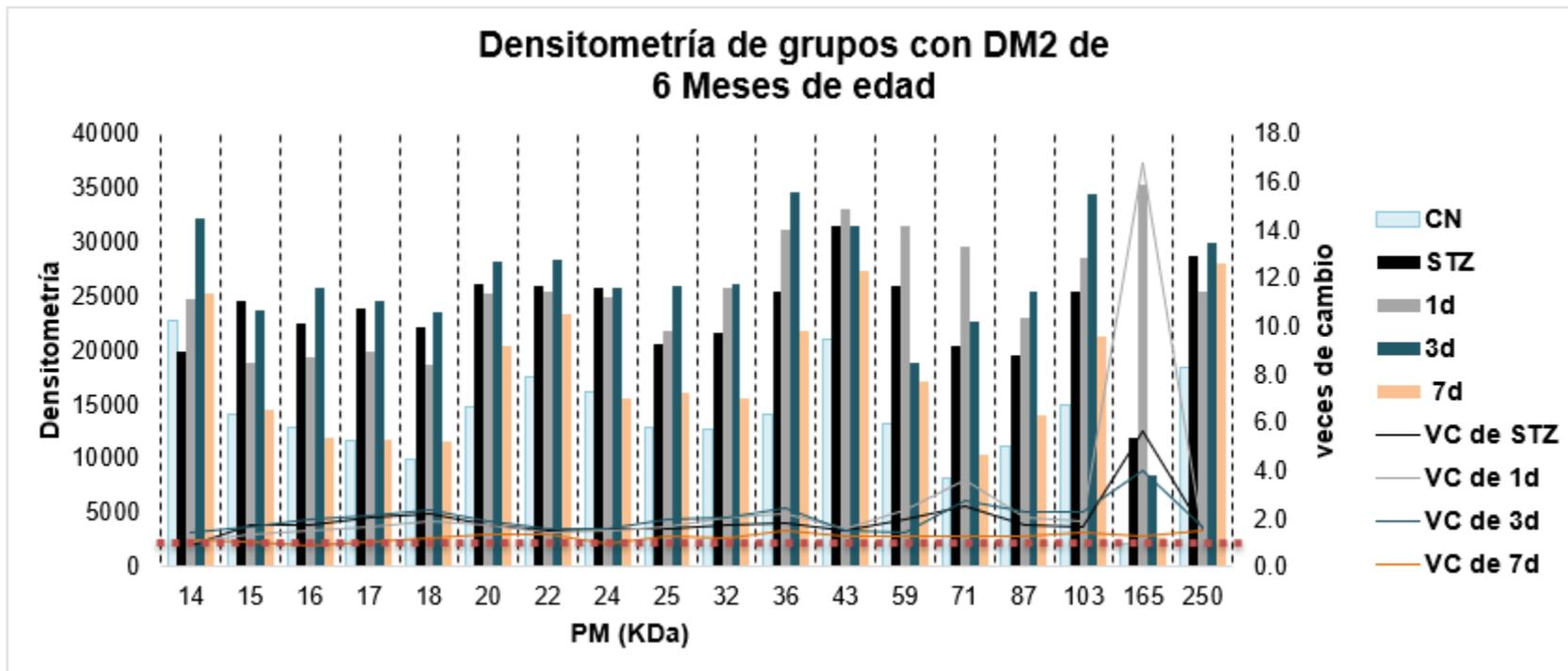


Figura 22. Densitometría del perfil proteico de los grupos diabéticos sin y con AGw3 por 1, 3 y 7 días a la semana, de 6 meses de edad y Veces de Cambio respecto al grupo control (VC).

8. DISCUSIÓN

La DM2 es un síndrome en el que, quien lo padece sufre de un deterioro progresivo, ya que el control glucémico tiende a empeorar con el paso del tiempo, debido a que el trastorno central es la resistencia de todos los tejidos periféricos a la acción de la insulina, ya sea por defectos en su síntesis, a causa de modificaciones del receptor, a alteraciones en los mecanismos intracelulares de acción de esta hormona o porque se produce en bajas concentraciones; la DM2 es un síndrome que puede pasar desapercibido por muchos años, por lo cual los modelos experimentales son importantes para conocer aspectos fundamentales de la enfermedad ya que permiten simular algunos fenómenos que contribuyen al conocimiento de los factores fisiológicos, bioquímicos y ambientales que predisponen a ella (Amaya-Chávez *et al.*, 2007; Lyra *et al.*, 2009). Uno de los modelos químicos que se usan para inducir diabetes tipo 2 es la destrucción química de los islotes con estreptozotocina, que es un buen modelo para los estudios de hiperglicemia aguda.

El modelo de DM2 inducida por estreptozotocina implementado en éste proyecto fue analizado en la tesis de Vicenteño (2018), en la que se midieron los principales parámetros bioquímicos como glucosa sanguínea, colesterol y triglicéridos sanguíneos, así como también se analizó la composición de ácidos grasos de fantasmas de eritrocitos. El modelo diabético muestra concentraciones de glucosa más alta que el grupo control al mes de edad, presentando alteraciones metabólicas a una temprana edad, se puede ver que el control de la glucosa para los grupos inducidos a diabetes presenta alteraciones, ya que se presentó un incremento progresivo de la glucosa sanguínea y heterogeneidad en las concentraciones de la glucosa de estos grupos, lo que indica el desarrollo progresivo de la diabetes, característico de la DM2, resultados que se pueden ver en las curvas de tolerancia a la glucosa que se presentan en la mencionada tesis.

El financiamiento para la prevención y tratamiento de la diabetes es insuficiente; este síndrome crece con mayor rapidez en las ciudades de países con ingresos bajos y medios, por lo que actualmente se buscan tratamientos alternativos o suplementarios a los ya existentes y con ello reducir gastos para el tratamiento de la diabetes y/o sobrellevar los efectos secundarios de los tratamientos ya existentes. El uso de productos con AG ω 3, como el ácido α -linolénico precursor de EPA y el DHA, es cada vez más, frecuente incluso por personas que no padecen de algún síndrome, porque se cree que

es una estrategia efectiva para prevenir varias enfermedades cardiovasculares, mentales, inflamatorias, la obesidad, y el cáncer (Tajuddin *et al.*, 2016); sin embargo, el uso de estos ácidos grasos es controversial ya que se desconocen los mecanismos por los cuales actúan en el metabolismo de la glucosa y los cambios fisicoquímicos en la membrana. Como se pudo observar en la tesis de Vicenteño, (2018) la suplementación con ácido α -linolénico a cualquier dosificación, ayudó a regular la concentración de triglicéridos en sangre, reguló la glicemia y previno la pérdida de peso. Sin embargo, para los grupos normoglucémicos la concentración de triglicéridos aumentó, retrasó el control de la glicemia y generó una tendencia hacia el sobrepeso, aunado, a que no hubo efectos significativos para el control de colesterol. Todo lo anterior nos indica que los cambios generados en el metabolismo de lípidos dependen de la condición del individuo que los está ingiriendo ya que no se generarán los mismos efectos en las ratas inducidas a diabetes que en las normoglucémicas. Así, consideramos que es importante conocer los cambios fisicoquímicos que suceden en la membrana mitocondrial y los cambios en la expresión genética, ya que como se vio en la introducción las mitocondrias juega un papel central en algunas funciones celulares.

8.1. Actividad mitocondrial

En este trabajo se pudo ver que cuando la diabetes se está estableciendo, es decir a un mes de edad, el daño que sufren las mitocondrias en su respiración es importante ya que en las ratas jóvenes inducidas a diabetes se observa que, aunque tienen un mayor consumo de oxígeno, tanto en estado 3 como en el estado 4, el control respiratorio (CR) disminuye. Un comportamiento parecido ha sido descrito en otros trabajos, por ejemplo Figueroa-García *et al.*, (2015) encontraron una disminución del 32.2% en el CR de mitocondrias de placenta de ratas hiperglicémicas, pero también tuvieron un mayor consumo de oxígeno en los estados 3 y 4. En ambos casos, esto significa una pérdida de la función mitocondrial, pero en el caso de Figueroa-García *et al.*, (2015) lo explican como un fenómeno derivado principalmente del aumento en la lipoperoxidación a consecuencia del aumento de la glicemia. En este trabajo, la medición de la lipoperoxidación corrió a cargo de Perusquía (2018) quien también encontró un aumento en la lipoperoxidación de las ratas inducidas a diabetes, por lo que esta explicación también parece válida en este trabajo. Adicionalmente, Pérez-Hernández *et al.* (2017) reportan que en ratas de un mes de edad inducidas a diabetes, cuando la lipoperoxidación aún no es significativamente

mayor a la de los grupos controles, sí hay un aumento en el CR. Los autores de ese trabajo (Pérez-Hernández *et al.*, 2017) sugieren que dicho aumento en el CR posiblemente fue derivado del aumento en la fluidez de las membranas mitocondriales.

Es posible que la DM proporcione a la membrana mitocondrial un aumento del potencial de membrana como consecuencia de glicación de lípidos y proteínas de membrana, por la alta concentración crónica de la glucosa, por lo que se alteraría la forma en que el citocromo c puede interactuar con las subunidades del complejo IV (COX). Una interacción alterada del citocromo/c-COX podría afectar el suministro de electrones por parte del primero y, como consecuencia, la utilización de oxígeno por el segundo (Friday *et al.*, 2017).

Friday *et al.* (2017) observaron que la disminución de la actividad del complejo IV de las mitocondrias del hígado de ratas con DM2, a diferentes edades, podría estar vinculada a la estructura alterada de la membrana, que sufre transformaciones sutiles causadas por la patología, a medida que los animales envejecen, lo que concuerda con lo visto para los animales STZ donde se vio la disminución de la respiración en estado 3 para los grupos de 3 y 6 meses de edad con respecto al grupo control, y una constante a disminuir el CR con el aumento de la edad, para estos mismos grupos diabéticos, lo que se podría explicar con dichas transformaciones de la membrana, que afectan al complejo 4 y posiblemente a todas las proteínas de la cadena transportadora de electrones, y de esa forma cambian su actividad. Un mal funcionamiento por la utilización del oxígeno, podría producir ROS en lugar de agua y la generación de estos ROS son los que podrían dañar el transporte de electrones, proteínas membranales e incluso y la propia membrana, lo que afecta aún más la utilización de oxígeno (Friday *et al.*, 2017). Explicación que concuerda con los resultados obtenidos de lipoperoxidación ya que vemos que los grupos STZ tienen significativamente una mayor concentración de MDA en comparación a sus respectivos grupos controles, también podemos apreciar el daño progresivo con respecto al desarrollo de los animales, ya que para los grupos diabéticos la concentración de MDA al mes de edad va de 8.02 terminando con 15.75 n mol/mgProt para los grupos de 6 meses (Perusquia, 2018).

Se ha visto que el consumo crónico de una dieta rica en grasas provoca cambios en la bioenergética de las mitocondrias como lo reportado con las mitocondrias hepáticas de ratones alimentados durante 16 semanas con este tipo de dieta, disminuyeron la

respiración y las actividades respiratorias complejas (Mantena *et al.*, 2009). Resultados que concuerdan con lo visto en este trabajo, ya que tanto para las ratas de 3 y 6 meses de edad, normoglucémicas con la administración de AG ω 3 el CR disminuyó significativamente con respecto a sus controles. Lo que resulta interesante es que esta disminución del CR se observó con cualquier dosis suministrada de AG ω 3, incluso con la de 1 día a la semana.

Eccleston *et al.*, (2011) tras observar el aumento del estado 4 mitocondrial, en el hígado de ratones con una dieta rica en grasa, por 16 semanas. Proponen que el consumo crónico de una dieta rica en grasa conduce a un desacoplamiento de las mitocondrias, como una condición adaptativa que puede ser utilizada para disipar la generación de oxidantes mitocondriales. Se concluyó que las tasas de respiración están asociadas con niveles más bajos de ROS en las mitocondrias del hígado, por lo que, se cree que la formación de ROS es dependiente del potencial de membrana y está unida al superóxido producido por la fuga de electrones de la cadena respiratoria, las mitocondrias serán menos capaces de conservar el gradiente de H⁺ generado a través de la membrana interna; por lo tanto, las mitocondrias están desacopladas, atenuando la producción de lipoperóxidos pero disminuyendo la eficacia de la síntesis de ATP. Esta propuesta coincide con lo visto en los grupos de 6 meses de edad normoglucémicos en este trabajo, ya que, para las dosificaciones de 3 y 7 días a la semana, se vio un aumento del doble para el estado 4 mitocondrial junto con la disminución del CR y de la concentración de la lipoperoxidación, en comparación a su grupo control, sin embargo, para las ratas de 3 meses de edad el comportamiento del estado 4 y lipoperoxidación es diferente, sin embargo entre mayor sea la frecuencia de administración de ácidos grasos omega 3, menor es el control respiratorio. Para el comportamiento del grupo de 3 meses, se le atribuye a la etapa de desarrollo del animal, en la cual existen varios cambios hormonales, porque los animales alcanzan la madurez sexual, lo que podría estar atribuyendo características diferentes a la mitocondria, teniendo resultados heterogéneos y que no marcan alguna tendencia clara para la actividad mitocondrial, incluso vemos esta variación en los resultados, para los demás parámetros estudiados en este trabajo. Sin embargo, con los resultados presentados podemos decir, que la suplementación de AG ω 3 de manera moderada y crónica a animales normoglucémicos afecta negativamente a la bioenergética de las mitocondrias del hígado.

Contrario a lo ocurrido con los animales normoglucémicos, para los grupos de animales STZ, los resultados con respecto a actividad mitocondrial y lipoperoxidación apuntan a tener un efecto positivo, normalizando la bioenergética de las mitocondrias del hígado, afectando benéficamente, ya que se aprecia en los animales de 6 y 3 meses de edad CR similares o cercanos al grupo control. En cuanto a los animales de 6 meses de edad los valores tanto para el estado 3 y 4, CR, OPR y lipoperoxidación similares o cercanos al grupo control, incluso no existen diferencias significativas entre los grupos con las diferentes dosificaciones y el control, sin embargo lo que sí se puede apreciar son diferencias significativas entre estos grupos suplementados y el grupo diabético. Resultados que podrían estar apoyando a Ganapati y Roy (2016) quienes concluyen que los AG ω 3 son capaces de mejorar significativamente el metabolismo lipídico y fluidez membranal en ratones diabéticos, ya que, se cree que reduce el estrés oxidativo al aumentar las concentraciones de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y disminuyendo la actividad de la 3-Hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) y la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintasa (HMG-CoA sintasa), sustentando los beneficios terapéuticos de los ácidos grasos omega-3 en pacientes con DM2.

8.2. Fluidez membranal

Waczulíkova *et al*, (2000) observaron disminución de la fluidez membranal en eritrocitos de pacientes diabéticos adultos, en comparación a su grupo control. Estos datos son consistentes con las mediciones de la polarización a temperaturas fijas, para los grupos de 1 y 6 meses de edad. Para tres meses de edad esas diferencias no son claras. Sin embargo, en este trabajo, se realizó el análisis termotrópico de las membranas de mitocondria de hígado y los resultados indican que las E_a son menores para las ratas diabéticas, que el grupo control, indicando un aumento de la fluidez membranal para el grupo diabético.

En este trabajo se considera que la ecuación de Arrhenius representa mejor las características termotrópicas de las membranas mitocondriales, puesto que esta describe el comportamiento general de todas las mediciones de polarización a diferentes temperaturas y los gráficos presentados nos ayudan a entender mejor los cambios de comportamiento en las dos fases de la membrana (fase gel y fase líquido-cristal) conforme cambia la temperatura.

Las propiedades físicas de las moléculas que componen a las membranas, dependen de la estructura química de sus componentes, por lo cual la fluidez membranal depende de la temperatura, así como se explicó en la introducción, de acuerdo con algunos autores, el cambio en la fluidez de las membranas depende del tejido celular y del organelo que se esté estudiando, por ejemplo en el trabajo de Pérez-Hernández *et al*, (2010) concluyó que la DM2 combinada con hipertensión, disminuye la fluidez membranal de fantasmas de eritrocitos, que es derivada principalmente de los cambios de los ácidos grasos. Resultado que confirman lo dicho por Waczulíkova *et al*, (2000) y lo visto por Ganapati y Roy (2016) quienes observan una disminución de la fluidez en los tejidos de ratones diabéticos cuando se compara con el control, pero contrastan con lo encontrado por Figueroa-García *et al*, (2015) en donde observa un aumento de la fluidez membranal de mitocondrias de placenta. Sin embargo, en estos trabajos se demuestra que los cambios fisicoquímicos de las membranas, de cualquier tejido celular, se encuentran directamente correlacionados con la composición de los ácidos grasos. Posiblemente se deba al empaquetamiento de los lípidos en la membrana, ya que, se ha visto que los cambios en el perfil de lípidos, también se reflejan en la fluidez. Posiblemente se explique debido a que el aumento de la concentración de glucosa en la sangre, conduce a un metabolismo lipídico celular alterado y al empaquetamiento de lípidos de la membrana modificada, que puede influir en la fluidez de la membrana (Ganapati y Roy, 2016)

Podemos ver en los gráficos de polarización en la parte de anexos, que la fluidez cambia de acuerdo a las diferentes etapas del desarrollo del animal. Para los grupos controles no es significativo este cambio, sin embargo, para los grupos diabéticos los cambios en la polarización y el gráfico de Arrhenius son significativamente diferentes entre sí, posiblemente por efecto de la progresión de la enfermedad. Se puede observar que para los animales de un mes de edad la polarización es mayor al grupo control, indicando que efectivamente la diabetes altera la fluidez membranal, sin embargo, a los tres meses de edad los grupos diabéticos se acercan un poco al comportamiento de su grupo control. Lo que hace pensar que para los animales de 3 meses de edad el parecido con su grupo control, es resultado de la homeostasis, que intenta revertir el daño provocado por inducción de la diabetes con la STZ. Dicha homeostasis se ve totalmente alterada en los grupos diabéticos de 6 meses de edad, quienes, incluso presentan diferencias significativas con los demás grupos diabéticos, lo que posiblemente sea el reflejo de la progresión de la enfermedad, ya que de acuerdo a Rull *et al* (2009) la DM2

inducida por resistencia, es progresiva con grados variables de resistencia a la insulina, donde inicialmente este evento es compensado por el páncreas manteniendo las concentraciones glucémicas adecuadas y conforme el síndrome avanza se conduce a estados progresivos de hiperglucemia, que de acuerdo a Zorzano *et al* (2004) la fisiopatología podría estar asociada entre la morfología mitocondrial y el metabolismo mitocondrial.

En cuanto a la fluidez que describe las Ea's, nos indican una mayor fluidez para los grupos diabéticos de 1,3 y 6 meses de edad, en comparación a sus respectivos grupos controles, sin embargo, la Ea necesaria para los cambios de transición de fases son muy similares, indicando que para esa región de la membrana, no se distinguen claramente los cambios de fase. También observamos que la transición de fases para los grupos diabéticos sucede a una menor temperatura que para los grupos controles, lo que nos confirma el aumento de fluidez, sin importar la etapa de desarrollo de los animales. Resultados que concuerda con Pérez-Hernández *et al*, (2017) quien encuentra una mayor fluidez para las ratas diabéticas, mencionando que este aumento en la fluidez es debido a los cambios fisicoquímicos que se dan en la membrana mitocondrial de ratas diabéticas. Donde el aumento del cociente U/S (ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados), conducen al aumento del control respiratorio, sin embargo, sólo se puede coincidir, en que el cambio de fluidez es debido a los cambios fisicoquímicos. Al contrario a lo que reporta Pérez-Hernández *et al* (2017) los resultados del presente estudio indican una disminución del cociente U/S (resultados presentados en la tesis de Perusquia, 2018) y una disminución del CR, comportamiento que se ve en las diferentes etapas del desarrollo del animal en las mitocondrias hepáticas. En cuanto a la lipoperoxidación observamos un aumento significativo de MDA para los animales de 1, 3 y 6 meses de edad, coincidiendo todos estos resultados con lo observado por Figueroa-García *et al* (2015) quien dice que el aumento de la fluidez membranal en ratas diabéticas, causas una disminución de la actividad mitocondrial y aumento de la lipoperoxidación.

Para lo visto con la suplementación de los AG ω 3, se aprecia que a una menor concentración de AG ω 3 en las membranas celulares conduce a cambios en la composición de ácidos grasos, fosfolípidos y propiedades fisicoquímicas de la membrana plasmática y disminuye su fluidez, que de acuerdo, a lo observado por Ganapati y Roy en el 2016 la suplementación con aceite de pescado rico en AG ω 3 aumentó la fluidez de la membrana en el hígado, riñón y tejido del corazón hacia la observada en animales no

diabéticos, resultados que en este trabajo coinciden, con lo visto, para los animales de 3 meses de edad donde se ve que los AG ω 3 llevan a condiciones similares del grupo control a las ratas diabéticas, sin embargo, en las ratas normoglucémicas los AG ω 3 provocan una menor fluidez parecida al grupo diabético, en cuanto a los animales de 6 meses de edad este comportamiento sólo es similar para las ratas con suplementación de 1 y 3 días a la semana con AG ω 3, ya que para los animales con suplementación de 7 días a la semana la Ea del estado gel es el doble al del grupo control.

8.3. Análisis electroforético

Se estima que hay aproximadamente unas 1500 proteínas diferentes en las mitocondrias de mamíferos, la mayoría de estas se encuentran formando complejos como la cadena respiratoria o las translocasas de proteínas mitocondriales. Debido al origen endosimbiótico, en la mitocondria se alberga un pequeño genoma que codifica principalmente proteínas que forman parte de las subunidades de los complejos de la cadena respiratoria y de F₁F₀-ATP sintetasa, 13 y 8 proteínas, en mamíferos y levaduras, respectivamente, algo menos de 1% del proteoma de este orgánulo (**figura 23**). El restante 99% de las proteínas mitocondriales están codificadas por genes nucleares, sintetizadas en ribosomas citoplásmicos y posteriormente transportadas a la mitocondria, e incorporadas a uno de los cuatro subcompartimientos mitocondriales formados por membrana externa mitocondrial, espacio intermembrana (IMS), membrana interna mitocondrial y finalmente matriz mitocondrial (Reinders *et al.*, 2006; Pagliarini *et al.*, 2008; Fox, 2012).

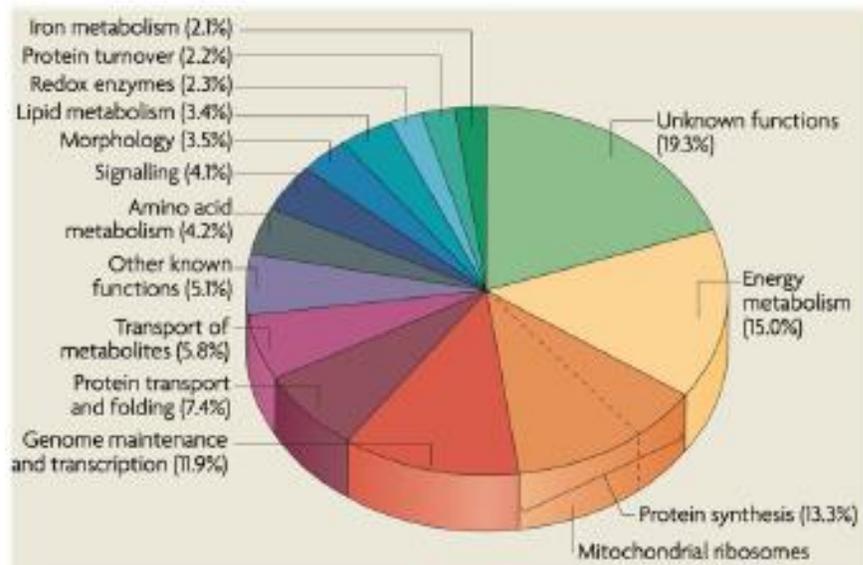


Figura 23. Clasificación de las proteínas mitocondriales identificadas según su función (Fox, 2012).

Como se vio en los resultados para los perfiles electroforéticos (figuras 14, 18 y 21) el promedio de proteínas que se aprecian en el gel es de 23, por lo que está lejos de observarse las 1500 proteínas que se han registrado para las mitocondrias de mamíferos; esto ocurre debido a que existen dificultades de fraccionar proteínas de membrana para permitir su análisis proteómico, aparte que muchas de las proteínas no logran ingresar al gel y se pierden. Otras no se detectan por tinción porque su concentración es muy baja. Aproximadamente un tercio de las proteínas codificadas en genomas son proteínas de membrana hidrófobas, que son muchas de las que podrían ser visualizadas con SDS-PAGE, por lo que sólo una combinación de métodos es capaz de otorgar una visión imparcial y general del proteoma mitocondrial (Carroll *et al.*, 2006., Reinders *et al.*, 2006).

Durante las últimas dos décadas, las mejoras continuas en las tecnologías "ómicas" han impulsado una capacidad cada vez mayor para definir las relaciones entre la genética, las vías moleculares y los fenotipos generales. A pesar de este progreso, la mayoría de los factores genéticos que influyen en los rasgos complejos siguen siendo desconocidos. Esto se ejemplifica mediante el ensamblaje de los supercomplejos mitocondriales, componentes de la cadena de transporte de electrones, que sigue estando mal caracterizado, por lo que es importante el uso de estas herramientas moleculares que ahora son capaces de identificar miles de factores que impulsan diversas

vías moleculares, sus mecanismos y los fenotipos consiguientes, y contribuyen sustancialmente a la comprensión de los sistemas complejos (Williams *et al.*, 2016). En este trabajo, hicimos uso de la electroforesis como una herramienta que nos permitiera conocer si existen cambios importantes en la expresión de proteínas mitocondriales. Con esto, se obtuvo el perfil general de las proteínas mitocondriales para todos los grupos estudiados; sin embargo, no se usaron técnicas o métodos para la identificación de las proteínas de los análisis electroforéticos que se realizaron, como un western blot, cromatografía o un análisis de péptidos por espectrometría de masas, razón por la cual no se puede saber con exactitud qué proteínas fueron las que modificaron su expresión. Sin embargo, se puede suponer las posibles identidades de estas proteínas, mediante los artículos que han realizado análisis similares.

En este trabajo se puede inferir la posible identidad de las siguientes proteínas, uMUP-VIII principal proteína urinaria de 18.7 kDa, piruvato deshidrogenasa beta de 35 kDa, proteína reguladora de glucosa de 58kDa; sarcosina deshidrogenasa de 100kDa; nitralasa de 30.5 kDa; aldehído deshidrogenasa 2 de 56.5 kDa; subunidad alfa de flavoproteína de transferencia del electrón de 35kDa; ubiquinol-citocromo c reductasa, polipéptido de hierro-azufre Rieske 1 de 29.3 kDa; *alfa-metilacil-CoA racemasa* de 39.6 kDa; 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa 2 de 56.8 kDa; tiosulfato sulfurtransferasa de 33.4 kDa; ATP sintasa, F1 alfa de 59.7 kDa y malato deshidrogenasa de 35.6 kDa (Eccleston *et al.*, 2011). Para la posible identidad de la proteína de 165 KDa que es la de mayor importancia para este trabajo, debido a que es la que en los perfiles electroforéticos cambia drásticamente, podría tratarse de una subunidad SUR típica de un canal K_{ATP} , que está ligado a sitios de unión a sulfonilurea dentro de las mitocondrias, se ha sugerido que en combinación con subunidades Kir6.0 contribuyen a la diversidad funcional de los canales K_{ATP} (Dang *et al.*; 2005). También podría tratarse de la carbamoilfosfato sintetasa 1 (CPS 1), que participa la degradación de aminoácidos y la secreción de urea (Corvi *et al.* 2001), porque se conoce que en la diabetes hay mayor degradación de aminoácidos para obtención de energía.

Las ratas diabéticas tienen una mayor expresión de algunas proteínas, sin embargo, se menciona que las proteínas que cambian son las de 15 y 45 KDa, del complejo IV, proteínas de menor peso molecular de las que se obtuvieron en los perfiles proteicos de este trabajo, siendo la proteína de 165 KDa la que muestra más cambios en este estudio. En general se observa una menor expresión de proteínas para todos los

grupos diabéticos con tratamientos de 1,3 y 7 días a la semana con AG ω 3 en comparación al grupo control que de acuerdo a Friday *et al*, (2017) las ROS generadas en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones contribuyen a la patogénesis de la diabetes y que en el estado diabético, las proteínas mitocondriales están alteradas reduciendo la actividad del complejo IV, lo que posiblemente podría explicar la disminución del CR de todos los grupos diabéticos sin suplementación a diferentes edades.

Se observó que una dieta rica en grasas puede estar vinculada a cambios en el proteoma y por lo tanto participar en la disfunción bioenergética que se produce en respuesta a la exposición crónica de estos tipos de dietas. Asimismo, también podría participar en los cambios en la producción de ROS mitocondriales (Eccleston *et al.*, 2011). En este trabajo se perciben algunos cambios en el perfil electroforético de los grupos con suplementación de AG ω 3 tanto en los grupos diabéticos como normoglucémicos; y como vimos anteriormente, también se encontraron cambios en la lipoperoxidación, lo que confirma que la exposición a una dieta rica en grasa está vinculada a cambios en el proteoma, lo cual altera la bioenergética de la mitocondria.

Para los grupos normoglucémicos suplementados con AG ω 3 de 3 meses de edad, se observaron cambios en las bandas correspondientes a las proteínas con mayor peso molecular como las de 165, 150, 122 y 99 KDa en comparación al grupo control, mientras que en los animales de 6 meses de edad se pudo observar que los AG ω 3 cambian la expresión de las proteínas de todos los pesos moleculares en el perfil, teniendo una constante en la mayoría de las proteínas de aumentar la expresión conforme se aumentan los días de suplementación, con excepción de las proteínas de 14, 20, 22, 24, 59 y 87 KDa. En los grupos diabéticos, tanto para los animales de 3 y 6 meses de edad, existe una disposición a valores cercanos a la unidad conforme se aumentan los días de tratamiento, lo que nos habla de valores cercanos al grupo control o “cercanos a lo normal”. Así por ejemplo, para el grupo con 7 días de suplementación de AG ω 3 se tiene un perfil proteico similar al del grupo control. Los AG ω 3 podría ser responsables de un efecto proteolítico y regulación del metabolismo de los lípidos mediante la regulación de los genes clave SREBP1 (que controlan la expresión de numerosos enzimas necesarias para la síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos) y PPAR α (Ganapati y Roy, 2016). Los PPAR podrían ser uno de los primeros sitios blanco de los AG ω 3 para mantener la homeostasis de los lípidos en el cuerpo mediante diferentes

mecanismos (Poudyal *et al.*, 2011). Por ejemplo, existen elementos de respuesta PPAR- α funcionales en los genes que codifican para la acil-CoA oxidasa peroxisomal (Varanasi *et al.*, 1996), CPT (Brandt *et al.*, 1998), HMG-CoA sintasa (Rodriguez *et al.*, 1994) y proteínas de desacoplamiento mitocondrial.

Como observamos en este trabajo, las mitocondrias hepáticas sufrieron cambios tanto por la inducción de la DM2, como por los distintos tratamientos de AG ω 3, (independientemente de si eran animales inducidos a DM o normoglucémicos); cambios que van desde el peso de los animales, la glucosa sanguínea, el metabolismo de lípidos, la composición de membrana y la lipoperoxidación, hasta el cambio tanto en la actividad mitocondrial, la fluidez membranal y el perfil proteico, este último de gran importancia ya que tiene diversas implicaciones para toda la célula y por consiguiente para todo el organismo. Por ejemplo, podemos encontrar que la homeostasis y el recambio de las proteínas mitocondriales dependen mayoritariamente del transporte desde el citoplasma de las diferentes proteínas por lo que, los procesos de transporte de proteínas resultan cruciales para la biogénesis y el mantenimiento de la función mitocondrial, sin embargo, los mecanismos moleculares de estos procesos no están completamente establecidos y se ha visto una posible co-evolución de los mecanismos de transporte, de proteínas mitocondriales y los complejos de la cadena respiratoria, lo que parece tener relación con la morfología y dinámica mitocondriales, un ejemplo es la Mdm10 (proteína β -barril de la membrana mitocondrial externa) que no sólo se localiza en el complejo SAM (maquinaria de asociación y ensamblaje de la membrana externa), sino que es una de las subunidades del complejo de morfología y dinámica mitocondrial, o MDM (Mitochondrial Dynamics and Morphology), encargado de mantener la morfología mitocondrial y de proporcionar la distribución de las mitocondrias entre la célula en división (Gebert *et al.*, 2011., Yamano *et al.*, 2010).

Los cambios en el proteoma mitocondrial están fuera del alcance del presente estudio, ya que sólo se pudo observar el perfil proteico general y no se alcanzaron a analizar las identidades de las proteínas por lo que es importante mencionar la importancia que tiene la necesidad de estudiar a detalle los mecanismos de regulación de fosfolípidos de membrana ya que los cambios en el perfil proteico que se observaron en este trabajo, nos sugieren un papel importante para los AG ω 3 tanto para una dieta adecuada en sujetos normoglucémicos como en la diabetes, ya que, como vimos se sugiere la modificación en una variedad de procesos celulares.

9. CONCLUSIONES

- En la respiración mitocondrial disminuye el CR por efecto de la diabetes. El tratamiento con los ácidos grasos omega 3 mejora el CR para las ratas diabéticas de 6 meses de edad, pero tiene el efecto contrario en el grupo de ratas normoglucémicas.
- El análisis termotrópico de las membranas mitocondriales indica que a temprana edad (1 mes) la diabetes aumenta la fluidez membranal; con el paso del tiempo, la diabetes disminuye la fluidez membranal (6 meses). El tratamiento con los ácidos grasos omega 3 en ratas diabéticas no parece tener un comportamiento único. En ratas normoglucémicas en términos generales aumenta la energía de activación, lo que significa la disminución de la fluidez membranal.
- En general la expresión de proteínas de mitocondria es modificada, tanto en ratas diabéticas como normoglucémicas, por la administración de ácidos grasos omega 3. Sin embargo, para las ratas diabéticas de 6 meses la expresión de proteínas se ve normalizada con respecto al grupo control.
- Las ratas diabéticas de 1, 3 y 6 meses presentaron cambios particularmente en la expresión de la proteína de 165 kDa.
- El modelo generado de diabetes mellitus tipo 2, provoca cambios en las propiedades fisicoquímicas de las membranas mitocondriales hepáticas, tales como el cambio de la fluidez membranal, que tiene relación con la actividad mitocondrial de las membranas hepáticas, disminuyendo el CR.
- La administración de AG ω 3 en animales inducidos a diabetes tipo 2, puede llevar a la normalización de las propiedades fisicoquímicas de las membranas, “normalizando” con ello la actividad mitocondrial, lo que aparentemente puede favorecer el control de daños causado por la patología. Sin embargo, para los grupos normoglucémicos el comportamiento es contrario, ya que parece favorecer el desarrollo de diabetes.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo, en conjunto con los de Vicenteño (2018) y Perusquia (2018) nos indican que existen cambios importantes en el metabolismo de lípidos durante el desarrollo de la diabetes. La administración de AG ω 3 tuvo aparentemente efectos benéficos en los grupos inducidos a diabetes mellitus tipo 2, sin embargo, para los grupos normoglucémicos se observó un efecto perjudicial, llevando a las ratas a condiciones alteradas del metabolismo parecidas a una prediabetes. Este resultado nos hace pensar que mientras más tiempo se dé la administración de los AG ω 3 conducirá al desarrollo de la diabetes. Por lo que se sugiere hacer más experimentos con esquemas de dosificación como los que se llevaron a cabo en este trabajo por un periodo de tiempo más largo.

También vimos que la mitocondria juega un papel importante en la bioenergética de la célula, y de acuerdo a los resultados de esta tesis se observó que durante el desarrollo de la diabetes y la administración de los AG ω 3, esta sufre de modificaciones fisicoquímicas importantes que alteran su función significativamente, por lo que consideramos importante continuar estudiando su dinámica, ya que aún se desconocen muchos de los procesos que se llevan a cabo para el mantenimiento de la membrana mitocondrial, que resulta ser un aspecto importante para su función óptima.

Por lo anteriormente visto se sugieren investigaciones que incluyan el uso de más monitores fluorescentes, como son el 1,3-dipirenil-propano (DPiP) y el trimetil amonio difenil 1,3,5-hexatrieno (TMA-DPH), para ver la fluidez en diferentes puntos de la bicapa de la membrana mitocondrial, entre el uso de otros monitores fluorescentes, con los que se pueda estudiar, mediante microscopia, un enfoque más detallado del proceso de fusión y fisión que se lleva a cabo en la membrana mitocondrial para su mantenimiento. También sería conveniente llevar a cabo una investigación más profunda de las proteínas que conforman la mitocondria, mediante el uso de Western blot, previo a la separación de los complejos mitocondriales, para poder estudiar con más detalle las proteínas que los componen en especial las del complejo 4, mediante el uso de la cromatografía o un análisis de péptidos por espectrometría de masas, con los cuales tal vez, poder estudiar la interacciones que las proteínas tienen para el mantenimiento de la membrana mitocondrial, como por ejemplo la interacción con los PPARs.

11. LITERATURA CITADA

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 2002. Biología molecular de la célula, 3^{ra} ed. Barcelona, Omega. 697-765.

Amaya-Chávez A, Dolores-Ledezma E, Álvarez-Sánchez P, Ferreira-Rubio G, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M. 2007. Evaluación de un modelo de diabetes tipo 2 para estudiar la actividad hipoglicémica de la glibenclamida. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 38 (3). 5-11.

American Diabetes Association. 2011. Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care*. 34, (Supl. 1)S62-S69.

American Diabetes Association. 2017. Classification and diagnosis of diabetes. Sec. 2. En: Standards of medical care in diabetes, *Diabetes Care*;40(Supl. 1). S11–S24

Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. 1997. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diab Med*, 14 (Supl. 5). S1-S85.

Bartlett G. 1959. Phosphorous assay in column chromatography. *J. Biol. Chem*. 234. 97-104.

Bełtowski J, Wójcicka G, Jamroz-Wisniewska A. 2018. Hydrogen sulfide in the regulation of insulin secretion and insulin sensitivity: Implications for the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus, *Biochem Pharmacol*.149. 60-76.

Bennett, HP. 2003. Capítulo 53: Aspectos epidemiológicos de la diabetes mellitus de tipo 2. En LeRoith, D; Taylor, SI; Olefsky, J.M. *Diabetes Mellitus: Fundamentos y clínica*, Segunda edición, Mc Graw Hill. 674-679.

Bligh EG, Dyer WJ. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Physiol*. 37. 911-917.

Boveris A, Costa LE, Junqueira VBC. 2000. Envejecimiento mitocondrial, *Ciencia e investigación*, 3(1). 13-23.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72. 248-254.

Brandt JM, Djouadi F, Kelly DP. 1998. Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem.* 273(37). 23786–92.

Carroll J, Fearnley IM, Walker JE. 2006. Definition of the mitochondrial proteome by measurement of molecular masses of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(44). 16170-5.

Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación (EUFIC). 2008. Secretos del colesterol. La importancia de los ácidos grasos omega-3 y omega6. Natura Center. [Consultado 28 de febrero del 2018]. Disponible en: <http://www.nutracentor.org/Secretos-del-colesterol--La-importancia-de-los-acidos-grasos-omega-3-y-omega-6-7-nutart>

Corvi MM, Carrie-Lynn MS, Luc GB. 2001. Regulation of Mitochondrial Carbamoyl-phosphate Synthetase 1 Activity by Active Site Fatty Acylation. *J. Biol. Chem.* 276 (49). 45704–45712.

Dang VC, Nari K, Hyun J, Jae BY, Joon-Yong C, Youngsuk L, Won SP, Euiyong K, Young SP, Jin H. 2005. Subunit composition of ATP-sensitive potassium channels in mitochondria of rat hearts. 5. 121–133.

Dyerberg J. 1986. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutrition* 44.125-34.

Eccleston BH, Andringa KK, Betancourt MA, King LK, Mantena KS, Swain MT, Tinsley NH, Nolte NR, Nagy RT, Abrams AG, Bailey MS. 2011. Chronic Exposure to a High-Fat Diet Induces Hepatic Steatosis, Impairs Nitric Oxide Bioavailability, and Modifies the Mitochondrial Proteome in Mice. *Antioxid Redox Signl.* 15. 447-459.

Figuroa-García MdC, Espinosa-García MT, Martínez-Montes F, Palomar-Morales M, Mejía-Zepeda R. 2015. Even a Chronic Mild Hyperglycemia Affects Membrane Fluidity and Lipoperoxidation in Placental Mitochondria in Wistar Rats, *PLoS ONE* 10(12).1-15.

Forbes MJ, Thorburn RD. 2018. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease, Nature reviews, Nephrology. 2-22.

Fox, T. D. 2012. Mitochondrial Protein Synthesis, Import, and Assembly. Genetics, 192(4).1203–1234.

Franciscus A. y Highleyman L. 2012. El VHC y el Hígado. Hepatitis C Support Project. [Consultado 15 de febrero de 2017]. Disponible en: http://hcvadvocate.org/hepatitis/sp_factsheets/EI%20h%C3%ADgado.pdf

Friday DP, Alleyne TA, Ignacio DN, Arrindell D, Rao SR, Legall G. 2017. The Impact of Diabetes Mellitus on Oxygen Utilization by Complex IV: Preliminary Insights. J Endocrinol Metab. 7(1).18-24

Fundación Mídete. 2016. Asumiendo el control de la diabetes. México 2016. (Consultado 17 de agosto del 2017). Disponible en: http://oment.uanl.mx/wp-content/uploads/2016/11/FMidete_Asumiendo-Control-Diabetes-2016.pdf.

Ganapati KS, Roy R. 2016. Evaluation of the effect of n-3 PUFA-rich dietary fish oils on lipid profile and membrane fluidity in alloxan-induced diabetic mice (Mus musculus). Mol Cell Biochem. 416.117–129.

Garcia, PHM. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia, UNIV DIAG, 1(2).31-41.

Garfin DE. 1990. One dimensional gel electrophoresis. Methods in enzymology. Academic Press. 463.497-513.

Gebert N., M. Gerbert, S. Oeljeklaus, K. von der Malsburg, D.A. Stroud, B. Kulawiak, C. Wirth, R. P. Zahedi, P. Dolezal, S. Wiese, O. Simon, A. Schulze- Specking, K.N. Truscott, A. Sickmann, P. Rehling, B. Guiard, C. Hunte, B. Warscheid, M. van der Lann, N. Pfanner and N. Wiedemann. 2011. Dual function of Sdh3 in the respiratory chain and TIM22 protein translocase of the mitochondrial inner membrane. Mol Cell 44 (5). 811-818.

German, Michael. 2003. Capítulo 2, Regulación del gen de la insulina, En LeRoith, D; Taylor, SI; Olefsky, J.M. Diabetes Mellitus: Fundamentos y clínica, Segunda edición, Mc Graw Hill.13-24.

Guyton. A.C. 1987. Regulación de la respiración y fisiopatología respiratoria. En: fisiología humana, interamericana. 6ª. Edición. México.463-477.

Harris, MI. 2003. Capítulo 32, Definición y clasificación de la diabetes mellitus y criterios actuales para el diagnóstico. En LeRoith, D; Taylor, SI; Olefsky, J.M. Diabetes Mellitus: Fundamentos y clínica, Segunda edición, Mc Graw Hill. 406-415.

INEGI. 2017. "Estadísticas a propósito del día de muertos" (2 de noviembre) datos nacionales. [Consultado 13 de abril del 2018]. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/muertos2017_Nal.pdf.

International Diabetes Federation. Atlas de Diabetes. Update. 2015. 7th edicion. [Consultado 28 de agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.diabetesatlas.org/>

International Diabetes Federation. Atlas de Diabetes. Update. 2017. 8th edicion. [Consultado 14 de marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.diabetesatlas.org/>

Kaiser RD, London E. 1998. Location of diphenylhexatriene (DPH) and its derivatives within membranes: comparison of different fluorescence quenching analyses of membrane depth. Biochemistry. 2;37(22). 8180-90.

Karp G. 2013. Biología celular y molecular: conceptos y experimentos, 7^{ma} ed, México, Mc Graw Hill.178-210.

Lang, PJ; Márquez, GA. 2009. Diabetes gestacional, En Rosas GJ, Lyra R, Cavalcanti N. Diabetes Mellitus: Visión Latinoamericana. Intersistemas. 462-471.

Liu R, Jin P, Yu L, Wang Y, Han L, Shi T, Li X. 2014. Impaired Mitochondrial Dynamics and Bioenergetics in Diabetic Skeletal Muscle. PLoS ONE 9(3).

Lyra R, Galindo V, Cavalcanti, N. 2009. Definición Diagnostico y clasificación de las alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono en: Rosas GJ, Lyra R, Cavalcanti N. Diabetes Mellitus: Visión Latinoamericana. Intersistemas. 28-37.

Mantena SK, Vaughn DP Jr, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-USmar V, Bailey SM. 2009. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. Biochem J 417.183–193.

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

Mckee T, Mackee R. 2009. Bioquímica las bases moleculares de la Vida. 4^{ta} ed, Oxford, Mc Graw Hill.

Meza U, Romero-Méndez AC, Licón Y, Sánchez-Armás S. 2010. La membrana plasmática: modelos, balsas y señalización. REB. 29(4).125-134.

Nasiff-Hadad A, y Meriño-Ibarra E. 2003. Ácidos grasos omega-3: pescados de carne azul y concentrados de aceites de pescado. Lo bueno y lo malo. Rev Cubana Med; 42(2). 49-55.

National Diabetes Data Group. 1979. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes 98.1039.

Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, Dumon H. 2008. Liver lipid metabolism. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 92. 272–283.

Norris JM, Yin X, Lamb MM, Barriga K, Seifert J, Hoffman M, Orton HD, Barón AE, Clare-Salzler M, Chase HP, Szabo NJ, Erlich H, Eisenbarth GS, Rewers M. 2007. Omega-3 polyunsaturated fatty acid Intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. JAMA. 298 (12).1420-1428.

OMS. 1980. Second Report Series 646. Ginebra.

OMS. 2016. Informe Mundial Sobre la Diabetes. (Consultado 17 de agosto del 2017). Disponible en: ww.who.int/diabetes/global-report/es/

OMS/FAO. 2003. OMS, Serie de Informes Técnicos 916. Dieta, Nutrición y Prevención de Enfermedades Crónicas. Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. Organización Mundial de la Salud Ginebra. [Consultado 28 de agosto del 2016]. Disponible en: <http://www.fao.org/wairdocs/who/ac911s/ac911s00.htm>

Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha

VK. 2008. "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology". *Cell* 134 (1). 112-123.

Perez-Hernandez IH, Avendaño-Flores YS, Mejía-Zepeda R. 2009. Analysis of the membrane fluidity of erythrocyte ghosts in diabetic, spontaneously hypertensive rats. *Acta Diabetol* 47 (Suppl 1). S47–S55

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

Perusquia GR. 2018. Composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas en diabetes mellitus tipo-2: efecto de ácidos grasos omega-3. (Tesis para obtener el título de Biólogo), FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

Pilon M. 2016. Revisiting the membrane-centric view of diabetes, *Pilon Lipids in Health and Disease* 15. 167.

Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. 2011. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Progress in Lipid Research* 50. 372–387.

Pugliese, A. 2003. Genetics of Type 1 diabetes. En Raz, I; Skyler, JS; Shafrir, E, 2003, *Diabetes from Research to Diagnosis and Treatment*. Segunda edición, Martin Dunitz. Capítulo 2. 11-34.

Reinders, J., R. P.Zahedi, N. Pfanner, C.Meisinger and A. Sickmann. 2006. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. "*JProteome Res* 5(7). 1543-1554.

Rodriguez JC, Gil-Gomez G, Hegardt FG, Haro D. 1994. Peroxisome proliferatoractivated receptor mediates induction of the mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase gene by fatty acids. *J Biol Chem*. 269(29). 18767–72.

Rull AJ; Valdés AP; Ramos CD, Gómez PFJ. 2009. Historia natural de la diabetes mellitus tipo 2, En LeRoith, D; Taylor, SI; Olefsky, J.M. *Diabetes Mellitus: Fundamentos y clínica*, Segunda edición, Mc Graw Hill. 75-81.

- Sánchez R, Arboleda G. 2008. Mitocondria y muerte celular. *NOVA*. 6 (10). 101-236.
- Serrano RM, Gutiérrez FJA. 2010. *Type 2: Diabetes Mellitus*, Elsevier, España. 89-104.
- Shinitzky M, Barenholz Y. 1978. Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Biomemb.* 515. 367–394.
- Simoneau JA, Kelley DE. 1997. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol*;83. 166-71.
- Stöckl MT, Herman A. 2010. Detection of lipid domains in model and cell membranes by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798. 1444–1456.
- Tahrani A, Barnett A, Bailey C. 2016. Pharmacology and therapeutic implications of current drugs for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 12. 566–592.
- Tajuddin N, Shaikh A, Hassan A. 2016. Prescription omega-3 fatty acid products: considerations for patients with diabetes mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy.* 9. 109–118.
- Tuena de Gómez PM, García TJJ. 2015. La bioenergética, las mitocondrias y la fosforilación oxidativa: Cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa. *Revista digital universitaria.* 16(1).1-15.
- Varanasi U, Chu R, Huang Q, Castellon R, Yeldandi AV, Reddy JK. 1996. Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem.* 273(37). 2147–55.
- Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Näslén C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD., Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH, Kanwu Study. 2001. Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: the KANWU Study. *Diabetologia.* 44. 312-319.

Vicenteño MUA. 2018, Análisis de diferentes dosis de ácidos grasos omega 3 (alfa-linolénico) en fantasmas de eritrocitos de ratas inducidas a diabetes tipo 2. (Tesis para obtener el título de Biólogo), FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.

Voet D, Voet JG. 2006. Bioquímica. Médica Panamericana. 3ª Ed. 397-470.

Waczulíková I, Šikurová L, Čársky J, Štrbová L, Krahulec and B. 2000. Decreased Fluidity of Isolated Erythrocyte Membranes in Type 1 and Type 2 Diabetes. The Effect of Resorcylic Acid Aminoguanidine. *Gen. Physiol. Biophys.* 19. 381-392.

Williams GE, Wu Y, Jha P, Dubuis S, Blattmann P, Argmann AC, Houten MS, Amariuta T, Wolski W, Zamboni N, Aebersold R, Auwerx J. 2016. Systems proteomics of liver mitochondria function. *Science* 352. Issue 6291, aad0189.

Xia X, Yan J, Shen Y, Tang K, Yin J, Zhang Y, Yang D, Liang H, Ye J, Weng J. 2011. Berberine Improves Glucose Metabolism in Diabetic Rats by Inhibition of Hepatic Gluconeogenesis. *PLoS ONE* 6(2). doi: 10.1371/journal.pone.0016556.

Yamano K, Tanaka-Yamano S, Endo T. 2010. Mdm10 as a dynamic constituent of the TOB/SAM complex directs coordinated assembly of Tom40. *EMBO Rep* 11(3).187-193.

Zorzano DA, Bach S, Pich M, Palacín. 2004. Papel de nuevas proteínas mitocondriales en el balance energético. *Rev Med Univ Navarra.* 48(2).30-35.

12. ANEXOS

12.1. Cálculo de la fluidez membranal por el gráfico de Arrhenius

Después de obtener las mediciones de la polarización del DPH para la caracterización termotrópica, se realizó el gráfico de Arrhenius, que mediante una linealización entre las variables K y T^{-1} de la ecuación de Arrhenius se puede obtener la energía de activación.

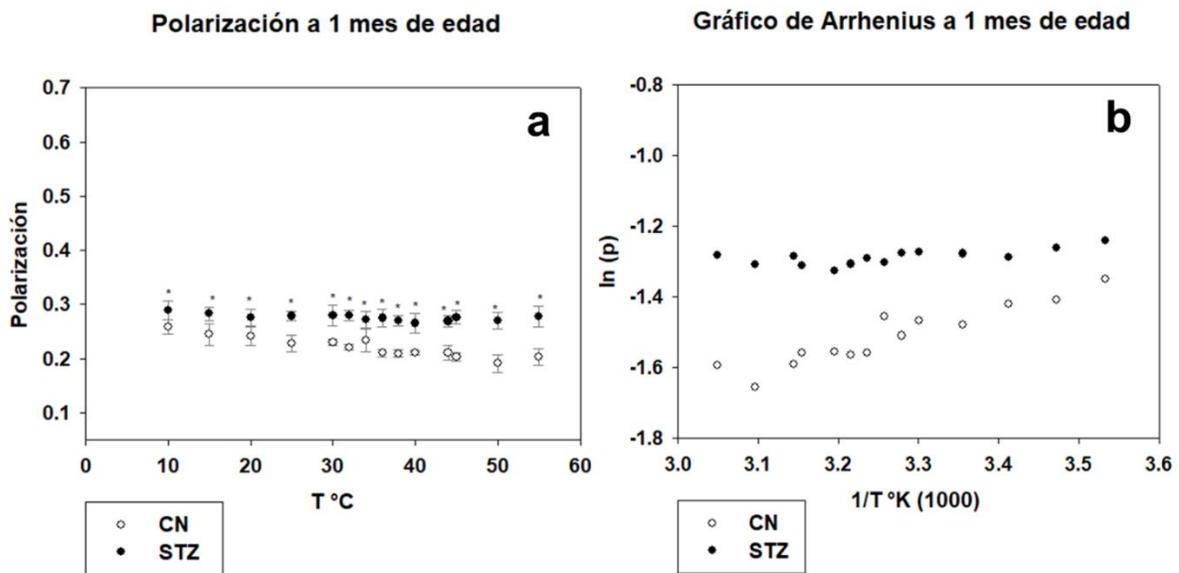


Figura 24. *; Caracterización termotrópica de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar, a) 1 mes de edad. * $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1mes. b) Gráfico de Arrhenius de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 1 mes de edad. $n=4$.

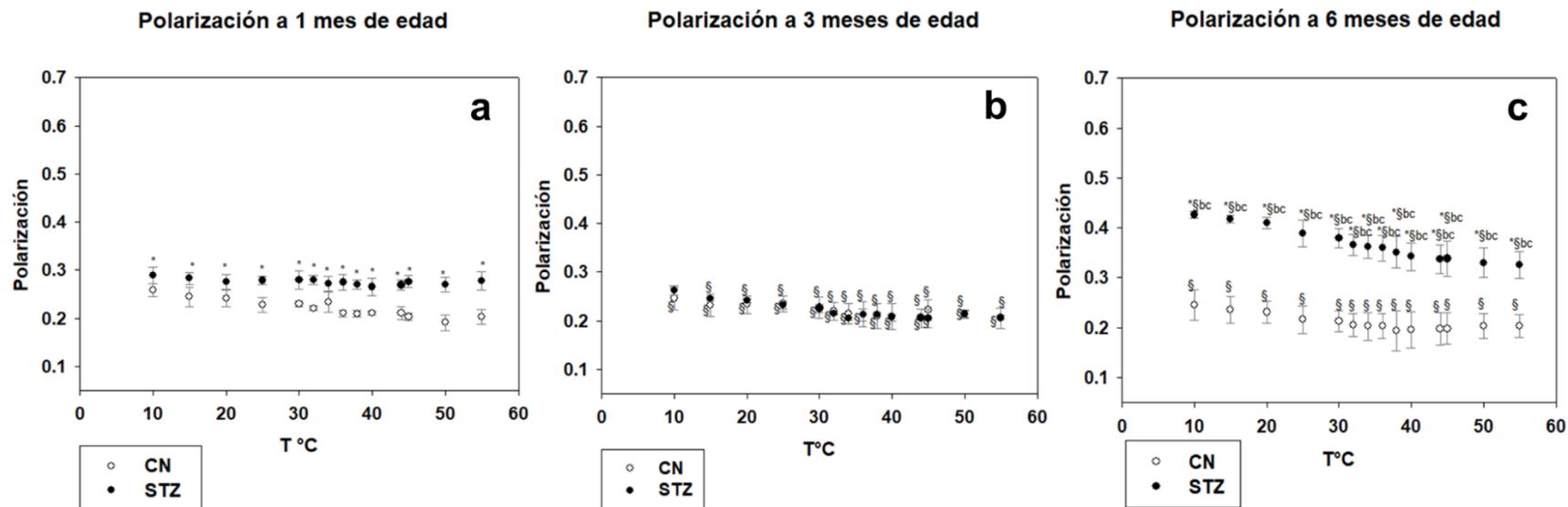


Figura 25. Caracterización termotrópica de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar a diferentes edades. a) 1 mes de edad, b) 3 meses de edad y c) 6 meses de edad. * $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1mes; \$ $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 1mes de edad; b $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3meses de edad y c $p < 0.05$, con relación al grupo CN 6meses de edad. n=3 a 5.

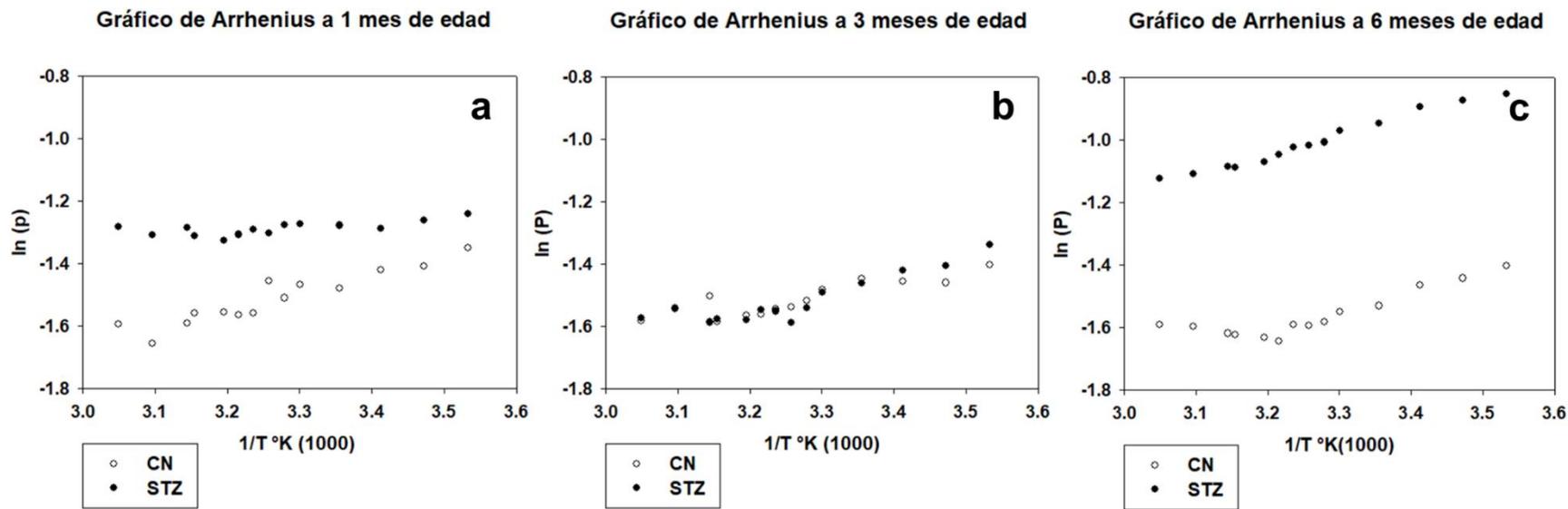


Figura 26. Gráfico de Arrhenius de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar a diferentes edades. a) 1 mes de edad, b) 3 meses de edad y 7 meses de edad.

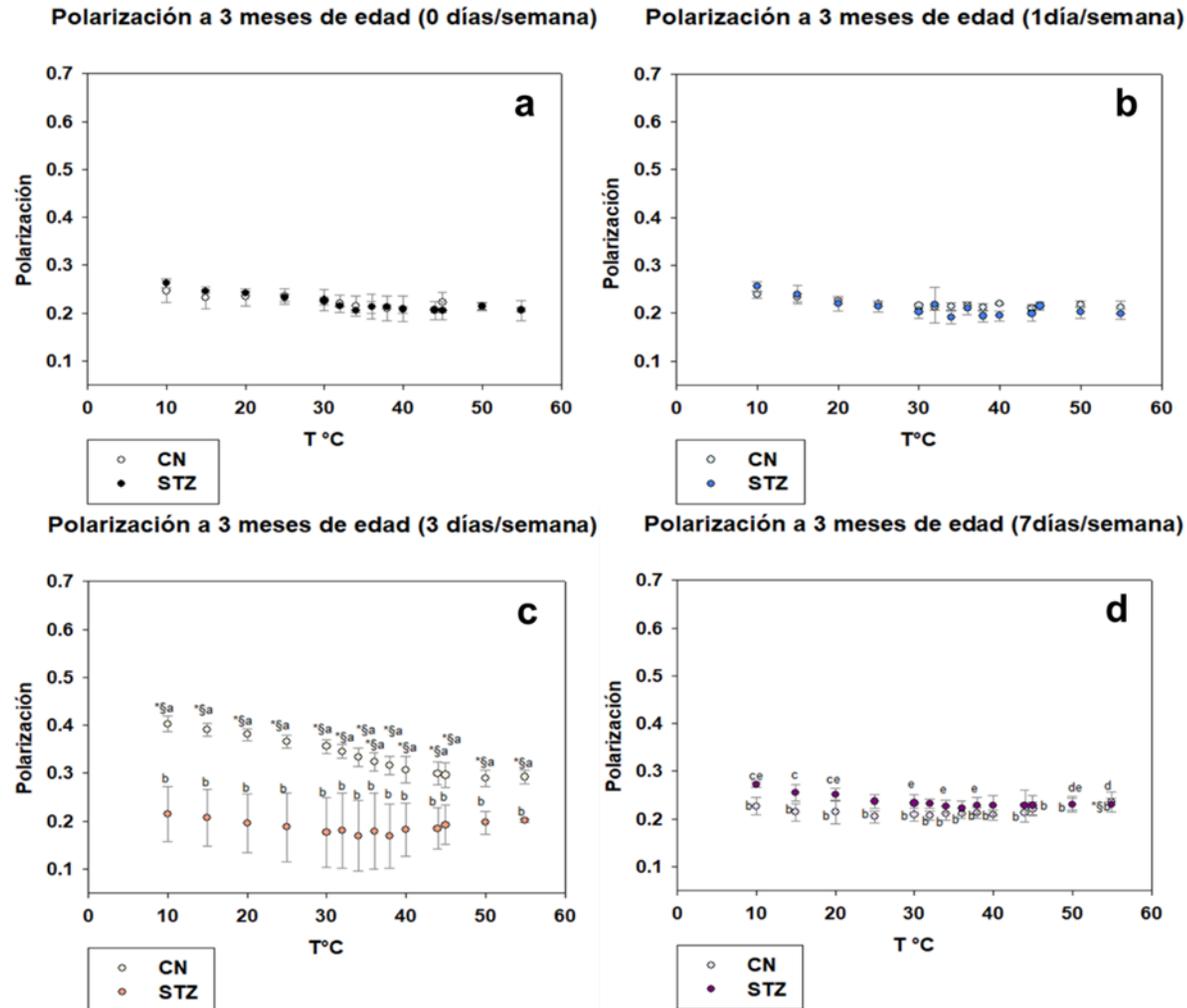


Figura 27. Caracterización termotrópica de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 3 meses de edad. a) Sin tratamiento de AG ω 3; b) Con AG ω 3 1 día/semana; c) Con AG ω 3 3 días/semana y d) Con AG ω 3 7 días/semana. * $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3 meses; § $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 3 meses; **a** $p < 0.05$, con relación al grupo CN 1d-3m; **b** $p < 0.05$, con relación al grupo CN 3d-3m; **c** $p < 0.05$, con relación al grupo CN 7d-3m; **d** $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 1d-3m, **e** $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 3d-3m. n=3 y 5.

Gráfico de Arrhenius a 3 meses de edad (0días/semana) Gráfico de Arrhenius a 3 meses de edad (3días/semana)

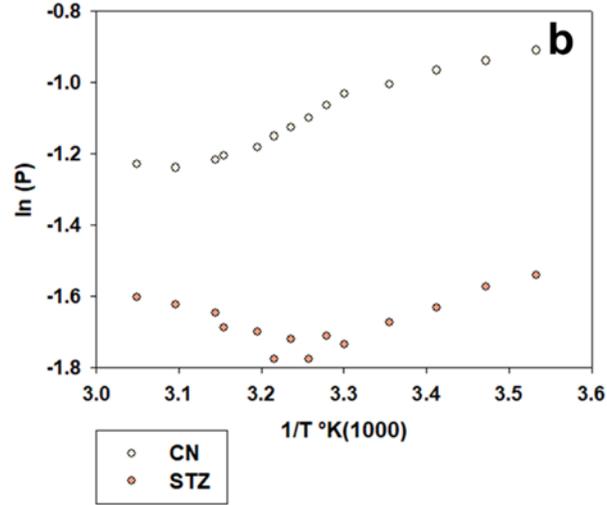
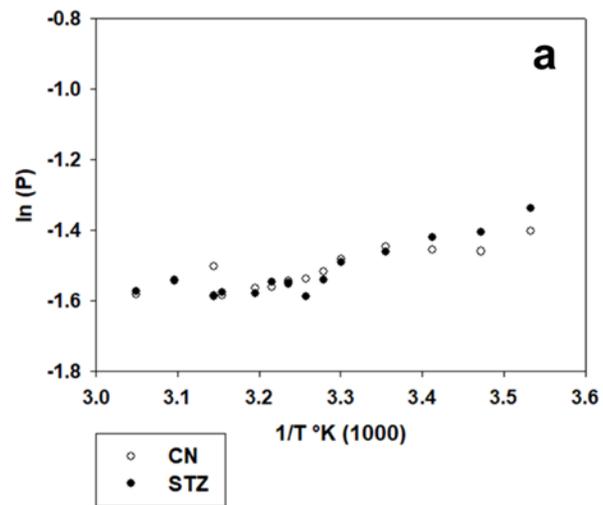


Gráfico de Arrhenius a 3 meses de edad (1día/semana) Gráfico de Arrhenius a 3 meses de edad (7días/semana)

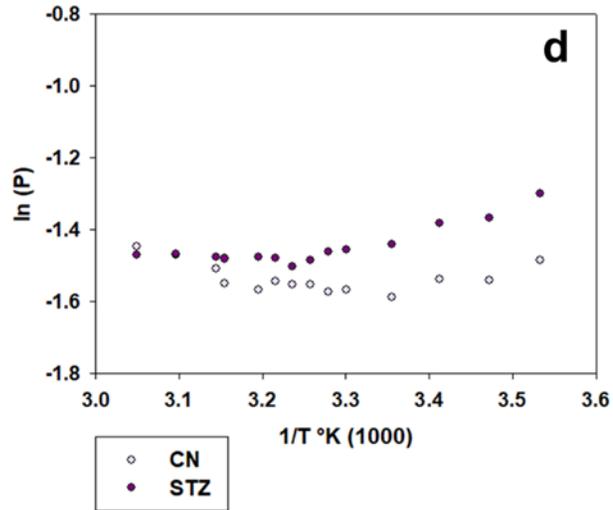
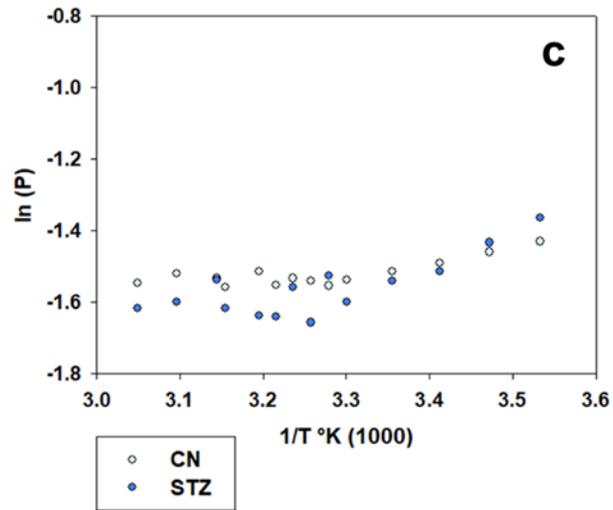


Figura 28. Gráfico de Arrhenius de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 3 meses de edad. a) 1 mes de edad, b) 3 meses de edad y 7 meses de edad.

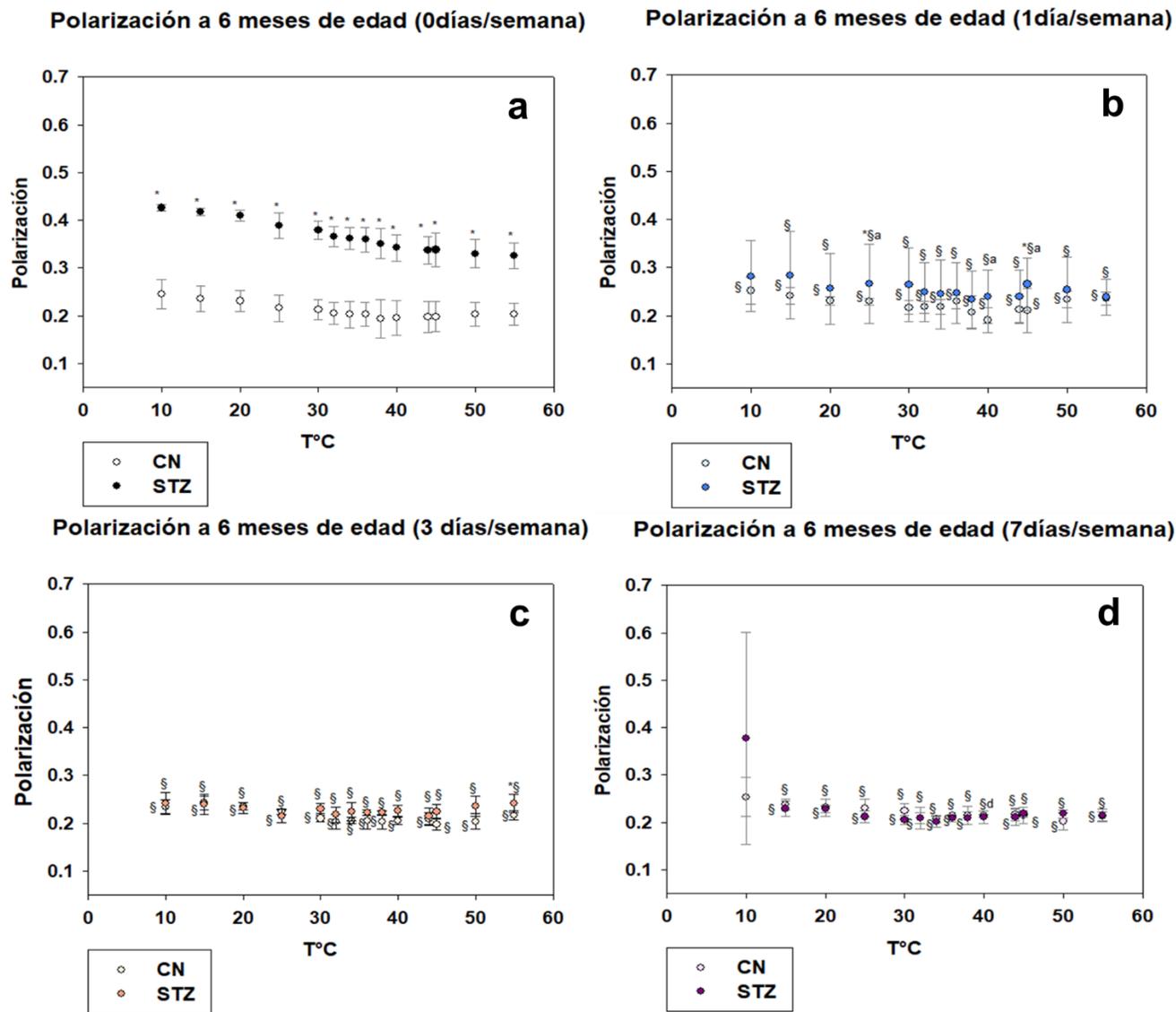


Figura 29. Caracterización termotrópica de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 6 meses de edad. a) Sin tratamiento de AGω3; b) Con AGω3 1día/semana; c) Con AGω3 3 días/semana y d) Con AGω3 7 días/semana. * $p < 0.05$, con relación al grupo CN 6meses; § $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 6meses; **a** $p < 0.05$, con relación al grupo CN1d-6m; **d** $p < 0.05$, con relación al grupo STZ 1d-6m. n=3 y 5.

Gráfico de Arrhenius a 6 meses de edad (0días/semana)

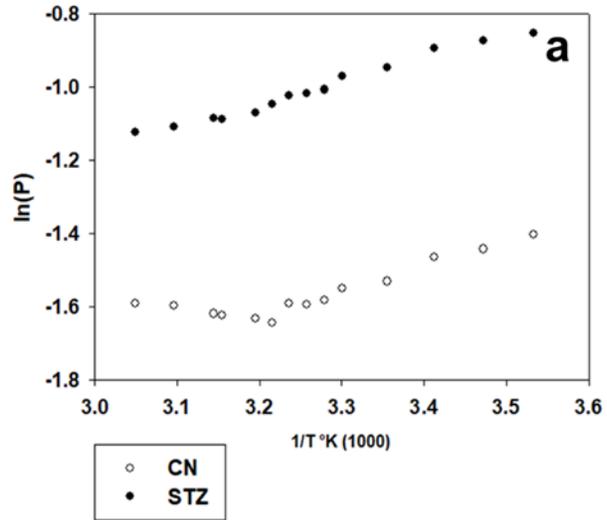


Gráfico de Arrhenius a 6 meses de edad (1día/semana)

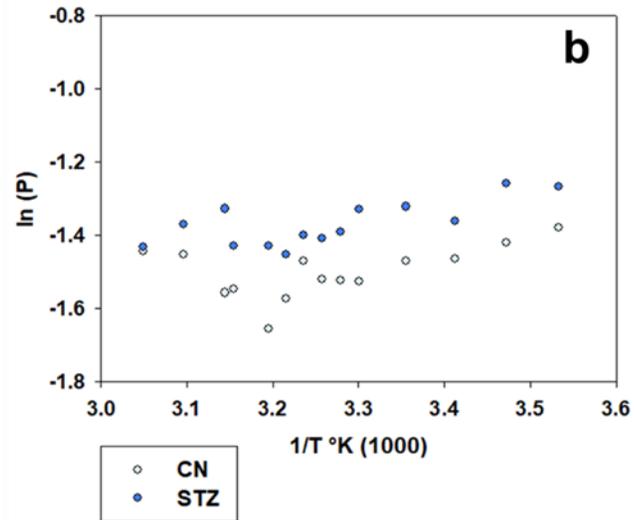


Gráfico de Arrhenius a 6 meses de edad (3días/semana)

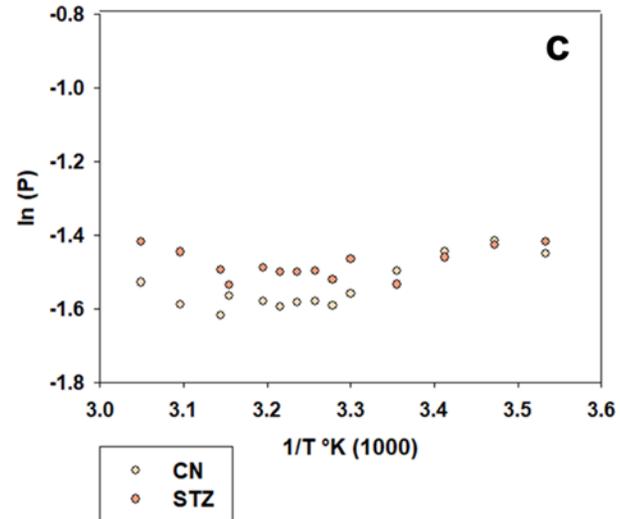


Gráfico de Arrhenius a 6 meses de edad (7días/semana)

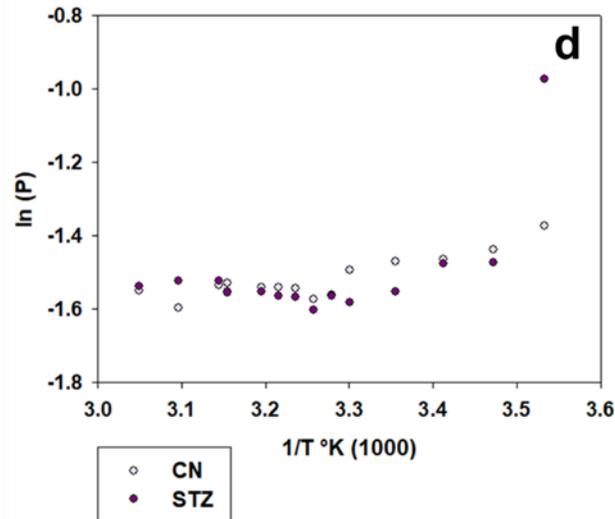


Figura 30. Gráfico de Arrhenius de la membrana mitocondrial de hígado de ratas Wistar de 6 meses de edad. a) Sin tratamiento de AGω3; b) Con AGω3 1día/semana; c) Con AGω3 3 días/semana y d) Con AGω3 7 días/semana.

