



EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE ORIGEN MARINO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO

Laura Lluís Rodríguez

Dipòsit Legal: T. 1427-2012

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Laura Lluís Rodríguez

**EFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE
ORIGEN MARINO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS
CON SÍNDROME METABÓLICO**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por la Dra Maria Rosa Nogués Llort
y la Dra Montserrat Giralt Batista

Departamento de Ciencias Médicas Básicas



Reus, 2012

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE ORIGEN MARINO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS
CON SÍNDROME METABÓLICO

Laura Lluís Rodríguez

Dipòsit Legal: T. 1427-2012

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE ORIGEN MARINO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS
CON SÍNDROME METABÓLICO

Laura Lluís Rodríguez

Dipòsit Legal: T. 1427-2012

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

EFFECTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS DE ORIGEN MARINO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS
CON SÍNDROME METABÓLICO

Laura Lluís Rodríguez

Dipòsit Legal: T. 1427-2012



FEM CONSTAR que aquest treball, titulat "Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados de origen marino sobre el estrés oxidativo en ratas con síndrome metabólico", que presenta Laura Lluís Rodríguez per a l'obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al departament de Ciències Mèdiques Bàsiques d'aquesta universitat.

Reus, 11 de maig de 2012

Les directores de la tesi doctoral
Dra. Montserrat Giralt
Dra. M. Rosa Nogués

Autorització del director/a o codirector/s/a/es de la tesi

DADES IDENTIFICATIVES DE LA TESI DOCTORAL	
Títol de la tesi doctoral: Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados de origen marino sobre el estrés oxidativo en ratas con síndrome metabólico.	
Doctoranda: Laura Lluís Rodríguez	
Programa de Doctorat / Programa Oficial de Postgrau: Biomedicina	
Departament: Ciències Mèdiques Bàsiques	Grup de recerca : Farmacobiologia Cel·lular
Directores: Montserrat Giralt batista M. Rosa Nogués Llort	Correu electrònic de les Directores: montse.giralt@urv.cat mariarosa.nogues@urv.cat

INFORME DEL DIRECTOR/A DE TESI		
El/s (co)director/s sotasignats emeten informe de la tesi doctoral presentada a tràmit de dipòsit, en base a la revisió dels següents elements de qualitat:		
	SI	NO
La tesi consisteix en un treball original de recerca	x	
El títol reflecteix acuradament el contingut de la tesi	x	
La hipòtesis i/o els objectius de la tesi estan clarament formulats	x	
La metodologia està descrita	x	
Hi consta el procediment	x	
Hi consten els resultats i la discussió dels mateixos	x	
Les conclusions de la tesi corresponen a les hipòtesis i/o objectius formulats	x	
La bibliografia està ben reflectida	x	
D'aquesta tesi es deriven les següents aportacions científiques:		
<ul style="list-style-type: none">- Lluís L et al. Effects of subchronic ingestion of different EPA/DHA treatments on oxidative stress and cardiovascular risk factors in healthy rats. Article en fase de revisió.- Muñoz M, Taltavull N, et al. Tissue damage by PUFA n-3 (EPA/DHA) in Metabolic Syndrome. Experimental study in rat. Article en fase de revisió.- Fortuño A, Lluís L, Muñoz M, Taltavull N, Romeu M, Sánchez-Martos V, Giralt M, Jové M, Nogués MR. Estudio experimental en rata de la afectación hepática por dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de origen marino en el síndrome metabólico.(I). Congreso: XXV Congreso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica. Zaragoza, 18-21 de mayo 2011. Revista Española de Patología 2011; 44 (supl.1): 206.- Fortuño A, Lluís L, Muñoz M, Taltavull N, Romeu M, Sánchez-Martos V, Giralt M, Jové M, Nogués MR. Afectación tisular por dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de origen marino en el síndrome metabólico. Estudio experimental en rata (II). Congreso: XXV Congreso de la Sociedad Española de Anatomía Patológica. Zaragoza, 18-21 de mayo 2011. Revista Española de Patología 2011; 44 (supl.1): 207.		

I en conclusió, s'emet l'informe FAVORABLE pel tràmit de dipòsit de la tesi doctoral i posterior defensa pública.

Reus, 10 de maig de 2012

Nom i cognoms: Montserrat Giralt Batista i M. Rosa Nogués Llort .

Directores de la tesi

AGRADECIMIENTOS

Esta parte de la tesis está siendo difícil de redactar ya que es a mucha gente a la que debo nombrar, que con sus enseñanzas y apoyo, han contribuido a la elaboración de este trabajo.

Mi primer agradecimiento va dirigido a mis directoras de tesis, la Dra. Rosa Nogués y la Dra. Montserrat Giralt. Por toda la confianza que depositaron en mí al concederme la oportunidad de elaborar esta tesis, por su paciencia a la hora de enseñarme, por su apoyo incondicional y sus ánimos durante estos cuatro años, por enseñarme todo lo que sé sobre investigación científica. Gracias, sois grandes profesionales y mejores personas.

Gracias a la Universidad Rovira i Virgili por estos cuatro años de beca que me han permitido elaborar esta tesis. Este agradecimiento debo personificarlo en la Dra. Rosa Solà por haber confiado en mí para la concesión y renovación año tras año de la beca predoctoral.

Gracias a la Dra. Marta Romeu, siempre dispuesta a ayudar, por haber tenido siempre tiempo de aclarar todas mis dudas en el laboratorio y por hacer que todas mis presentaciones parecieran profesionales. Te debo mucha parte de lo que he aprendido en estos cuatro años.

Al Dr. Francesc Sureda, que aunque no haya participado activamente en esta tesis, ha sido una parte importante en mi formación como investigadora. Gracias por estar siempre dispuesto a compartir parte de tus conocimientos farmacológicos, por darnos tantos ánimos a todos y por tantos ratos de RENFE.

A Mónica, Nuri y Vane. Con vosotras he aprendido infinidad de cosas nuevas, pero sobretodo junto a vosotras he aprendido a ser mejor, espero que nuestra amistad continúe más allá del laboratorio y que siempre estéis ahí para hacerme sonreír en todos los momentos como hasta ahora. Gracias por ser tan especiales.

A todo "Fàrmaco", os echare de menos, creo haber aprendido grandes cosas de grandes profesionales y grandes personas. MUCHAS GRACIAS.

Gracias a la profesora Carme Casajuana por haberme presentado al grupo de Farmacología, haberme informado sobre la beca predoctoral y sus ánimos durante estos cuatro años.

Gracias a la Dra. Montserrat Jové por transmitirnos parte de los conocimientos de histología necesarios para la elaboración de esta tesis.

Gracias a mis primeras compañeras de laboratorio, Meri, Tania, Marta y Espe que fueron el primer apoyo becario que me encontré al llegar a Reus. Gracias por todos los momentos de risas, de estrés, de cenas y sobretodo por vuestros ánimos. Sois grandes amigas, llegaréis muy lejos.

A las últimas incorporaciones, Tere y Merche, por traer aire fresco a Reus, por las cenas, las salidas y transmitirnos tantas ganas de hacer cosas.

A Jordi, Nacho y Xavi, por ser la parte masculina que necesitaba el laboratorio para estar equilibrado. Gracias por tantos ratos de conversaciones y risas en cualquier momento del día.

A Anabel por ayudarnos en todo. Has conseguido que las horas de experimentación resultaran más amenas.

A Amparo, Esperanza y Juan por toda su ayuda en el estabulario, gracias.

A Montse e Imma por ayudarme siempre con todos los trámites administrativos y resolver todas mis dudas. Gracias.

A los equipos con los que hemos colaborado durante la parte experimental de este trabajo: al grupo del CSIC de Barcelona, los doctores Josep Lluís y Jara, Eunice y Aníbal; al grupo del CSIC de Vigo, la Dra. Isabel, el Dr. Manuel y Lucía y al equipo del Pius Hospital de Valls, especialmente a la Dra. Àngels Fortuño. Gracias por todos los conocimientos transmitidos.

Gracias a Lali, Canals, Ana y Rubén. Por ser esos amigos de siempre que han estado ahí en todos los momentos difíciles apoyándome y consiguiendo que creyera más en mí misma.

A mi pequeña familia UdG: Gemma, Irene, Vero, Laura, Lidia, Cris, Ana, Sarai, Raixel, Caste y Valdi porque fue con vosotros que descubrimos lo mucho que nos gustaba la Biología y hemos crecido juntos en la ciencia. Seréis grandes en todo lo que hagáis, valéis millones.

A mis padres y mi hermano porque no se puede tener una familia mejor. Todo lo que soy ahora es gracias a vosotros. Sobran las palabras.

A Albert, mi compañero de viaje, gracias por ser la parte calmada que necesitaban mis nervios, la alegría que necesitaba mi tristeza, la fortaleza que necesitaba mi flaqueza y las sonrisas que necesitaba mi vida. Gracias por ser tú. Te quiero.

La beca predoctoral que me ha permitido realizar este trabajo ha sido financiada por el Proyecto CENIT 2006-2009, MET-DEV-FUN del Ministerio de Industria y la empresa Shirota Functional Foods (Reus, Catalunya).

El trabajo de investigación ha sido posible gracias a la ayuda para Proyectos de Investigación Fundamental no orientada AGL2009-12374-C03-02 del Plan Nacional de I+D+I 2008-2011 del Ministerio de Ciencia e Innovación.

Gracias a la Fundación Privada Reddis por concederme la ayuda predoctoral para la realización de la tesis doctoral en el 2009.

ÍNDICE

Certificado de la dirección de tesis	i
Informe de las directoras de la tesis doctoral	iii
Agradecimientos	v
Índice	ix
Abreviaturas	xiii
Introducción	1
1. Estrés oxidativo (EO)	3
1.1 Definición	3
1.2 Radicales libres oxigenados y especies reactivas de oxígeno	3
1.2.1 Tipos de radicales libres oxigenados	3
1.2.2 Origen de los radicales libres oxigenados	5
1.3 Sistemas antioxidantes	7
1.3.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos	8
1.3.2 Sistemas antioxidantes no enzimáticos	12
1.4 Acción de las especies reactivas de oxígeno	13
1.4.1 Daño a DNA	13
1.4.2 Daño a proteínas	14
1.4.3 Daño a lípidos	14
2. Síndrome metabólico	16
2.1 Definición y diagnóstico	16
2.2 Fisiopatología del síndrome metabólico	18
2.3 Relación con el EO	22
2.4 Modelos animales en estudios de síndrome metabólico	24
3. Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega 3 de origen marino y omega 6	25
3.1 Origen y biosíntesis AGPI n-3 y n-6	25
3.2 Mecanismos de acción de los AGPI n-3 y n-6	28
3.3 Clasificación AGPI n-3	32
3.3.1 Ácido Eicosapentaenoico (EPA)	32
3.3.2 Ácido Docosahexaenoico (DHA)	33
3.4 Productos pesqueros y AGPI n-3	34
3.5 Efectos beneficiosos de los AGPI n-3	35
Hipótesis y objetivos	39
Material y métodos	43
1. Diseño del experimento	45
1.1 Modelo animal	46

1.2 Tratamientos	48
2. Obtención, procesamiento y conservación de las muestras	49
2.1 Muestras sangre total	49
2.2 Muestras eritrocitos	49
2.3 Muestras plasma	50
2.4 Muestras suero	50
2.5 Muestras tejidos (hígado, tejido adiposo, riñón)	50
3. Parámetros relacionados con el síndrome metabólico	51
3.1 Peso corporal	51
3.2 Presión arterial	51
3.3 Glucosa	52
3.4 Insulina	52
3.5 Índice Homa	53
3.6 Hemoglobina glicosilada	53
4. Estudio de parámetros de EO en eritrocitos y tejidos	54
4.1 Determinaciones previas	54
4.1.1 Hemoglobina	55
4.1.2 Hematocrito	55
4.1.3 Concentración de proteínas	55
4.2 Sistemas antioxidantes enzimáticos	56
4.2.1 Superoxido dismutasa (SOD)	56
4.2.2 Catalasa (CAT)	57
4.2.3 Glutación peroxidasa (Gpx)	58
4.2.4 Glutación reductasa (GR)	59
4.3 Indicadores del estado oxidativo	59
4.3.1 Capacidad antioxidante total del plasma (ORAC)	59
4.3.2 Glutación reducido y Glutación oxidado (GSH/GSSG)	61
4.3.3 Productos de peroxidación lipídica (TBARS)	62
4.3.4 LDL oxidada (LDL-ox)	63
5. Factores de riesgo cardiovascular: perfil lipídico	63
5.1 Triglicéridos	63
5.2 Colesterol	64
5.3 HDL colesterol	65
5.4 LDL colesterol	65
5.5 APO A1 y APO B100	66
6. Estudio de biomarcadores de riesgo cardiovascular	67
7. Estudio histopatológico	67

7.1 Valoración hígado	68
7.2 Valoración tejido adiposo	69
7.3 Valoración riñón	70
8. Estudio estadístico	73
Resultados y discusión	75
1. Parámetros relacionados con el síndrome metabólico	75
1.1 Peso corporal	75
1.2 Presión arterial	76
1.3 Glucosa	78
1.4 Insulina	78
1.5 Índice Homa	79
1.6 Hemoglobina glicosilada	81
2. Sistemas antioxidantes enzimáticos en eritrocitos	82
3. Indicadores del estado oxidativo en plasma	85
3.1 Capacidad antioxidante total (ORAC)	85
3.2 LDL-ox	86
4. Factores de riesgo cardiovascular	88
5. Biomarcadores de riesgo cardiovascular	92
6. Sistemas antioxidantes enzimáticos en tejidos	95
7. Indicadores del estado oxidativo en tejidos	99
7.1 Glutatión reducido y Glutatión oxidado (GSH y GSSG)	99
7.2 Productos de peroxidación lipídica (TBARS)	103
8. Histopatología	105
8.1 Hígado	105
8.2 Tejido adiposo	110
8.3 Riñón	114
Discusión global	117
Conclusiones	125
Bibliografía	129

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AAPH	2,2'-Azo-bis (2-amidinopropano) dihidrocloruro
ADP	Adenosin-5-difosfato
AG	Ácidos grasos
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI n-3	Ácidos grasos poliinsaturados omega-3
AGPI n-6	Ácidos grasos poliinsaturados omega-6
APO A1	Apolipoproteína A1
APO B100	Apolipoproteína B100
ATP	Adenosin-tri-fosfato
Avidina-HRP	Peroxidasa de rabano picante conjugada a avidina
CAT	Catalasa
COX	Ciclooxigenasa
DAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
EC SOD	Superóxido dismutasa extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EO	Estrés oxidativo
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAS	Ácidos grasos sintasa
FFA	Ácidos grasos libres
FL	Fluoresceína
GK	Glicerol quinasa
GPO	Glicerolfosfato deshidrogenasa
Gpx	Glutati3n peroxidasa
G3P	Glicerol-3-fosfato
GR	Glutati3n reductasa
GSH	Glutati3n reducido
GSSG	Glutati3n oxidado

HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HDL-c	Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad
HF-HS	High- fat-high sucrose
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HOMA	Modelo de evaluación de la homeostasis
HSL	Hormona sensitiva lipasa
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IDF	International diabetes foundation
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de masa corporal
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLc	Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad
LDL-ox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LNA	Ácido linolénico
LO	Lipooxigenasa
L-OOH	Lipoperóxidos
LPL	Lipoproteinlipasa
LT	Leucotrieno
MDA	Malondialdehido
NADPH	Nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido
NCEP-ATPIII	National cholesterol education program, adult treatment panel III
NEM	N-etilmaleimida
NK	Naturall Killer
NFkB	Factor de transcripción nuclear kappa B
NOS	Óxido-nítrico sintasa
OH•	Radical hidroxilo
ONOO•	Radical peroxinitrito

OL	Ácido oleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPT	o-ftalaldehído
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno
O₂-•	Radical superóxido
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PCR	Proteína C reactiva
PG	Prostaglandina
PHL-OOH	Fosfolipoperóxidos
PPAR	Receptor del activador de la proliferación de peroxisomas
POD	Peroxidasa
RI	Resistencia a la insulina
RL	Radicales libres
RLO	Radicales libres de oxígeno
SM	Síndrome metabólico
SHROB	Ratas obesas espontáneamente hipertensas
SOD	Superóxido dismutasa
SREB-1	Proteína de unión al elemento regulador de los esteroides
TAG	Triacilgliceroles
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TE	Equivalentes en Trolox
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral-α
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2 carboxílico
VCAM-1	Moléculas de adhesión vascular-1
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
WKY	Wistar Kioto
4-AF	4-Aminofenazona
8-OHdG	7,8-Dihidro-8-oxo-2'-deoxiguanosina

INTRODUCCIÓN

1. ESTRÉS OXIDATIVO (EO)

1.1 DEFINICIÓN

El EO se define como una perturbación del equilibrio que existe en el organismo entre prooxidantes y antioxidantes. Cuando el aumento del contenido intracelular de prooxidantes sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce EO que induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. Es decir, la agresión oxidativa se producirá cuando la velocidad de generación de prooxidantes supere la capacidad de la célula para eliminarlos.

Todas las formas de vida aerobias mantienen un estado reductor en el interior de sus células. Este entorno reductor es preservado por determinados sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos a través de un constante aporte de energía metabólica.

El EO se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular como: aterogénesis, diabetes, insuficiencia renal aguda, enfermedad de Alzheimer, Parkinson, cáncer, etc. (*Lee et al., 2012; Gosmanova y Le, 2011; Oyatsi y Whiteley, 2012; Rybakowska et al., 2011; Valko et al., 2006*).

1.2 RADICALES LIBRES OXIGENADOS (RLO) Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO)

1.2.1 TIPOS DE RLO

Los radicales libres (RL) se definen como moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en la órbita más externa (*Halliwell y Gutteridge, 1999*). Debido a su inestabilidad electrónica son muy reactivos, siendo esta reactividad la base de su toxicidad y de su corta vida media.

Los RLO representan la clase más importante de RL generados en los sistemas vivos (*Miller et al., 1990*).

El término RLO es frecuentemente utilizado de forma errónea porque se asigna a todos los reactivos intermedios de las especies de oxígeno, incluyendo todas las

formas moleculares que no son radicales (agentes oxidantes y/o fácilmente convertibles en radicales). Por este motivo es más correcto hablar de ERO.

Las ERO son productos del metabolismo celular normal, pueden generarse de manera enzimática o no enzimática como subproductos o productos esenciales de las reacciones.

Incluyen: el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que se genera de forma no enzimática a partir de la coenzima Q, o a partir de reacciones catalizadas por enzimas que contienen metales (como la citocromo P450, la xantina oxidasa o la NADPH oxidasa); el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) cuya liposolubilidad le permite la difusión fácil a través de las membranas causando daño oxidativo en distintas localizaciones celulares; y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el agente oxidante más potente y reactivo, que se origina de manera no enzimática a partir del $O_2^{\bullet-}$ por la reacción de Haber-Weiss, o a partir del H_2O_2 en presencia de iones metálicos por la reacción de Fenton. Todos ellos son producidos durante la reducción parcial del oxígeno molecular (figura 1). El H_2O_2 también es precursor del ácido hipocloroso ($HOCl$), un potente agente oxidante que se produce de manera endógena y enzimática por las células fagocíticas (*Collen Smith et al., 2006*). Además de las ERO citadas, se deben considerar las que incorporan también nitrógeno en su estructura, las llamadas especies reactivas de nitrógeno (ERN).

Las ERN están presentes en el ambiente; pero también pueden generarse en las células. Incluyen, entre otros, el óxido nítrico (NO), que participa en diferentes procesos biológicos como el funcionamiento de los tejidos vasculares, y que en presencia del $O_2^{\bullet-}$ genera el anión peroxinitrito ($ONOO^-$).

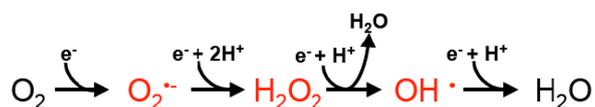


Figura 1. Reducción parcial del oxígeno y generación de radicales libres. $O_2^{\bullet-}$: anión superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrógeno, OH^{\bullet} : radical hidroxilo.

Tabla 1. Tipos de ERO y ERN

Especies reactivas	Propiedades
$O_2^{\cdot -}$ (anión superóxido)	Producido en la cadena de transporte electrónico.
H_2O_2 (peróxido de hidrógeno)	No es un radical libre pero puede generarlos por reacción con un metal de transición (Fe^{2+}).
$OH\cdot$ (radical hidroxilo)	Especie más reactiva atacando moléculas biológicas. Producida a través del H_2O_2 en la reacción de Fenton, en presencia de Fe^{2+} y Cu^+ .
HOCl (ácido hipocloroso)	Producido por los neutrófilos durante el estallido respiratorio para destruir organismos invasores.
NO (óxido nítrico)	Molécula muy inestable que se oxida fácilmente, producida de forma endógena por la enzima óxido nítrico sintasa.
$ONOO^{\cdot -}$ (anión peroxinitrito)	Fuerte agente oxidante que no es un radical libre pero puede generarlos.

1.2.2 ORIGEN DE LAS ERO

Las ERO se producen de forma natural como productos de numerosas reacciones oxidativas de las células o a través de diversos procesos físico-químicos. Existen también fuentes externas, por lo tanto se ha considerado un origen tanto endógeno como exógeno.

Fuentes exógenas

Las principales fuentes exógenas que incrementan la producción de ERO son:

- Contaminantes: ozono, monóxido de carbono, óxido nítrico, solventes, toxinas, etc.
- Fármacos: antidepresivos, antidiabéticos, doxorubicina, etc.
- Iones metálicos: hierro, cobre, cadmio, níquel, cromo, mercurio, etc.
- Radiaciones: ultravioletas, rayos X y rayos gamma (*Karownik y Reiter, 2000*).
- Dieta: ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), glucosa, alimentación insuficiente en antioxidantes, alimentación hipercalórica, etc.

- Ejercicio físico extenuante (*Viña et al., 2000*).
- Tabaco: óxidos de nitrógeno del humo del tabaco (*Elsayed y Bendich, 2001*).

Fuentes endógenas

Podemos distinguir las siguientes fuentes endógenas de ERO:

- Metabolismo celular del oxígeno:

La producción del $O_2^{\bullet-}$ se origina principalmente en la mitocondria (*Cadenas y Sies, 1998*). La cadena de transporte de electrones es la principal fuente de adenosin-trifosfato (ATP) en las células de mamíferos y es, por tanto, esencial para la vida. En el transcurso normal de la respiración celular las mitocondrias consumen oxígeno transformándolo en H_2O (figura 1). Se estima que un 2-4% del oxígeno consumido durante el transporte de electrones no se reduce a agua por la citocromo C oxidasa, sino que se forma el anión semiquinona que puede transferir uno o dos electrones al oxígeno molecular con la subsecuente formación del $O_2^{\bullet-}$.

- Reacciones de óxido-reducción llevadas a cabo por células fagocíticas:

Las células fagocitarias generan una importante cantidad de H_2O_2 , mediante el sistema NADPH oxidasa generando $O_2^{\bullet-}$.

Como mecanismo de defensa contra agentes extraños, dichas células también generan NO, por acción de la óxido-nítrico sintasa (NOS) sobre la arginina intracelular.

Es decir, las células fagocitarias delante de estímulos proinflamatorios o bacterianos generan ERO y enzimas proteolíticas para la defensa contra microorganismos, pudiendo al mismo tiempo estas ERO producir daño celular como se ha descrito en varias enfermedades.

- Producción de H_2O_2 por parte de los peroxisomas:

Los peroxisomas son orgánulos encargados de la degradación de determinadas biomoléculas. La β -oxidación de ácidos grasos (AG), catalizada por flavin-oxidasas, llevada a cabo en estos orgánulos produce H_2O_2 . Se estima que el 35% de todo el H_2O_2 formado en hígado de rata es producido por estas reacciones (*Boveris et al., 1972*).

El H_2O_2 es degradado de forma natural por la enzima catalasa (CAT); pero es posible que, bajo ciertas condiciones, la CAT falle en su degradación y algunos peróxidos escapen a su acción y se liberen en otros compartimentos celulares provocando daño oxidativo (Kasai et al., 1989).

En la figura 2 se esquematizan las distintas fuentes de ERO.

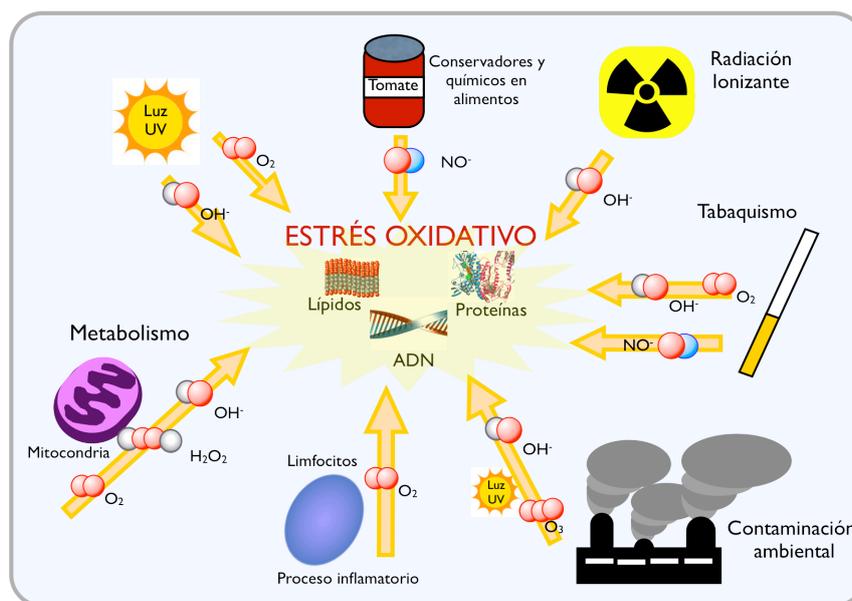


Figura 2. Fuentes exógenas y endógenas productoras de ERO.

1.3 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Para prevenir la oxidación de los componentes celulares producida por las ERO, los organismos aerobios han desarrollado mecanismos de defensa antioxidantes (Diplock et al., 1998). Las células se protegen a sí mismas contra el daño de las ERO mediante procesos de reparación, compartimentación de la producción de RL, enzimas de defensa y antioxidantes endógenos y exógenos.

Halliwell en el 2007 definió un antioxidante como "cualquier sustancia (o acción) que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo de una molécula diana".

En condiciones normales existe un equilibrio entre las ERO y las defensas antioxidantes para que los organismos se encuentren en las condiciones necesarias para la supervivencia.

La protección antioxidante se presenta en dos niveles diferentes:

- A nivel fisiológico: El sistema microvascular mantiene los niveles tisulares de O₂ siempre dentro de presiones parciales relativamente bajas.
- A nivel bioquímico: La defensa antioxidante, formada por distintos tipos moleculares, puede ser de tipo enzimático y no enzimático.

1.3.1 SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

La defensa antioxidante de tipo enzimático está formada por enzimas endógenas que no se consumen al reaccionar con las ERO. Estas enzimas dependen de cofactores metálicos como el cobre, el zinc, el magnesio, el selenio o el hierro.

Las enzimas más importantes que forman la primera barrera de defensa contra las ERO son: Superóxido dismutasa (SOD), Catalasa (CAT), Glutatión peroxidasa (Gpx) y Glutatión Reductasa (GR).

- Enzima Superóxido Dismutasa (SOD)

La enzima SOD descubierta a finales de los años 60 (*McCord et al., 1970*) está presente en todos los tipos celulares y tiene un papel muy importante frente al EO. Cataliza la reacción de dismutación de dos moléculas de O₂^{•-} hasta H₂O₂ y O₂:



La Cu,Zn SOD representa el 90 % de la actividad SOD en las células eucariotas, se encuentra en el citosol de todos los tejidos, siendo superior su actividad en hígado y en cerebro (*Lori A. Sturtz et al., 2001*). Es una proteína homodimérica con un peso molecular de 32,5 kDa. El cobre es esencial para la reacción catalítica, mientras que el zinc es importante para mantener la estructura de la proteína (*Fridovich, 1975*). En humanos, el gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 21.

La MnSOD tiene localización mitocondrial y un tamaño de 85,3 kDa. Presenta 4 subunidades idénticas cada una con un átomo de manganeso. El gen humano de la MnSOD se encuentra en el cromosoma 6. Está presente en todos los tipos celulares excepto en los eritrocitos y tiene una mayor actividad en corazón, páncreas e hígado.

En 1982, Stefan Marklund, aisló un tercer tipo de SOD en tejido pulmonar humano. Se trataba de cuatro subunidades unidas de forma no covalente de localización extracelular (EC SOD) con 135 kDa de tamaño y un átomo de cobre por cada subunidad. Encontramos el gen EC SOD en el cromosoma 4 humano. Esta enzima tiene una mayor actividad en el espacio extracelular del útero, glándula tiroides y páncreas. Su actividad es menor si se compara con las otras isoformas intracelulares.

En las células procariotas encontramos básicamente MnSOD y FeSOD. La MnSOD procariota tiene un peso molecular de 40 kDa y dos subunidades. La FeSOD se encuentra en bacterias aerobias y pesa 39 kDa. Esta formada por dos subunidades idénticas que contienen un átomo de Fe^{3+} por cada subunidad.

- Enzima Catalasa (CAT)

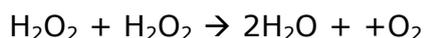
La enzima CAT protege de los efectos tóxicos del H_2O_2 ya que cataliza su descomposición en H_2O y O_2 .

Es una de las enzimas más abundantes en la naturaleza y se encuentra ampliamente distribuida en el organismo. Su actividad varía dependiendo de su localización: es más elevada en hígado y riñones, más baja en tejido conectivo y epitelios, y prácticamente nula en tejido nervioso (*Chance y Maehly, 1955*). En las células se localiza generalmente a nivel mitocondrial y en los peroxisomas, excepto en los eritrocitos, se encuentra en el citosol. Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kDa. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético hemo.

Se caracteriza por su alta eficiencia catalítica pero relativamente poca afinidad por el sustrato. Es por ello que estas enzimas son muy eficientes en la reducción de H_2O_2 cuando la concentración de este sustrato es muy elevada, como por ejemplo en los peroxisomas de las células eucariotas.

Presenta 2 funciones: la catalítica y la peroxidativa.

En la función catalítica, el donador de hidrógeno es otra molécula de H_2O_2 . Esta función sólo puede ser realizada por la enzima en su forma tetramérica (*Srivastava et al., 1980*).



En la reacción peroxidativa, la enzima puede utilizar como donadores de hidrógeno al metanol, etanol, ácido fórmico, fenol y formaldehído. Esta función se puede realizar con monómeros, dímeros y tetrámeros (*Srivastava et al., 1980; Havir y McHale, 1989*).

- Enzima Glutación Peroxidasa (Gpx)

La Gpx es una enzima selenio dependiente que participa en las transformaciones de ERO, catalizando la reducción del H_2O_2 o lipoperóxido (L-OOH), para lo cual utiliza como agente reductor al glutatión reducido (GSH) (figura 3). Al evitar la oxidación de los L-OOH se producen hidróxidos que son elementos potencialmente dañinos y que al oxidarse se convierten en radicales alcohólicos, para los que no se conoce enzima que los metabolice (*Lam et al., 1993*).

La Gpx desempeña un importante papel en la defensa antioxidante por su localización en todos los órganos y tejidos, como parte del sistema antioxidante del glutatión, y además tiene una amplia especificidad de sustrato y una mayor afinidad por H_2O_2 que la enzima CAT. A concentraciones bajas de H_2O_2 actúa la Gpx, mientras que la CAT precisa de concentraciones más elevadas, lo que demuestra una correlación inversa en la actuación de ambas enzimas.

Existen al menos 3 formas de Gpx:

- Forma intracelular o celular (Gpx-c).
- Forma extracelular o plasmática (Gpx-p).
- Forma con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (PHL-OOH) (Gpx-PH) asociada a la membrana.

La GPx-c y la GPx-p utilizan como sustratos el H_2O_2 y los L-OOH aunque la Gpx-c tiene mayor afinidad por el H_2O_2 y la Gpx-p tiene una afinidad semejante para los dos sustratos. Sin embargo, ninguna de las dos isoformas es capaz de utilizar los fosfolipoperóxidos que son los sustratos principales para la Gpx-PH (*Vertechy et al., 1993*).

En el centro activo de la enzima se encuentra un átomo de selenio unido de manera covalente a un residuo de cisteína con actividad durante la catálisis. En el centro activo se describe también un grupo tiol que proviene de un residuo de cisteína. Se conserva casi intacta la estructura del centro catalítico en las diferentes Gpx, lo que refuerza la hipótesis de que el mecanismo de acción para las 3 formas es el mismo (*Nakano et al., 1992*).

- Enzima Glutatió Reductasa (GR)

La GR es una flavoenzima dependiente de nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH) que cataliza la reducción del glutatió oxidado (GSSG) a GSH, el cual será utilizado por la Gpx (figura 3).

Es una enzima homodimérica compuesta por 2 subunidades idénticas unidas por un puente disulfuro.

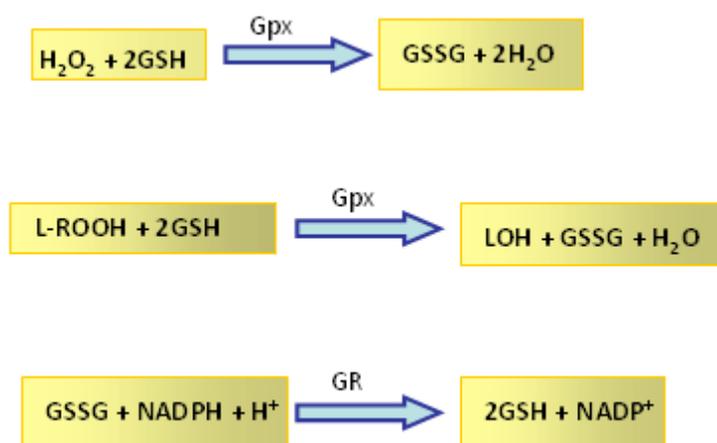


Figura 3. Reacciones catalizadas por la Gpx y por la GR.

En la figura 4 se esquematiza de forma global y relacionada los distintos sistemas antioxidantes enzimáticos.

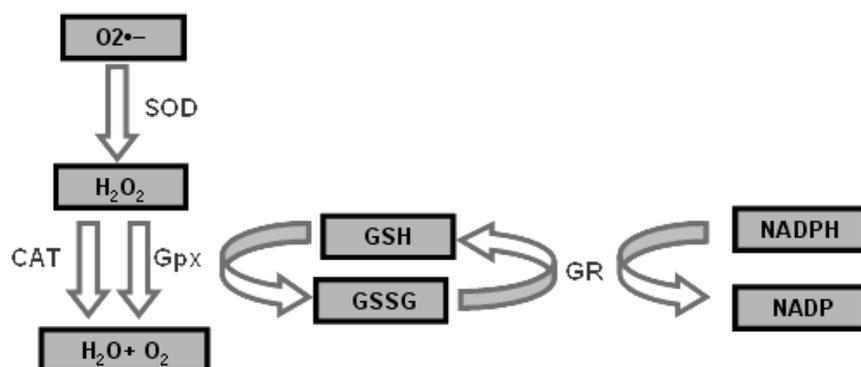


Figura 4. Esquema global de la actuación de los enzimas antioxidantes.

1.3.2 SISTEMAS ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS

El sistema antioxidante no enzimático constituye la segunda línea de defensa y está constituido básicamente por moléculas de bajo peso y generalmente de origen exógeno (vitamina E, vitamina C, betacarotenos, polifenoles, flavonoides y oligoelementos), aunque también existen moléculas de origen endógeno (proteínas de elevado peso molecular, el GSH, urato, ubiquinol y melatonina). Todas ellas forman un numeroso conjunto de compuestos capaces de prevenir el daño oxidativo por interacción directa o indirecta con las ERO (Kohen, 1999). Estos compuestos, a diferencia de las enzimas antioxidantes, se consumen durante su actuación y deben sustituirse por diferentes vías, por ejemplo a través de la dieta.

Los mecanismos de acción propuestos para estos sistemas son:

Interacción indirecta: quelación de metales de transición para evitar su participación en reacciones tipo Fenton o Haber-Weiss (figura 5) (Kehrer et al., 2000). Algunas de estas moléculas presentes en el plasma son proteínas de alto peso molecular como albúmina, ceruloplasmina, transferrina y haptoglobulina (Halliwell et al 1989).

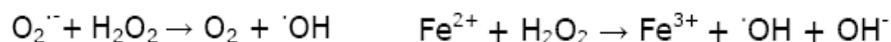


Figura 5. Reacción de Haber-Weiss y reacción de Fenton.

Interacción directa con las ERO: transferencia de electrones o secuestro de radicales (moléculas conocidas con el término inglés *scavengers*), evitando así que actúen sobre moléculas diana causando daño oxidativo. Son moléculas reductoras de pequeño tamaño, hidrosolubles, capaces de atravesar las membranas celulares, como el GSH, la vitamina C (ácido ascórbico), la melatonina y el ácido úrico.

1.4 ACCIÓN DE LAS ERO

Debido a su elevada inestabilidad atómica, las ERO colisionan con una biomolécula cercana y le sustraen un electrón, oxidándola, pudiendo perder de esta manera su funcionalidad específica en la célula.

Cuando las biomoléculas afectadas son esenciales para la vida como el ácido desoxirribonucleico (DNA), las proteínas o los lípidos se pueden desencadenar patologías graves como enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades intestinales que cursan con acción inflamatoria, enfermedades neurodegenerativas, etc. Por eso, se ha descrito que en la etiopatogenia de estas enfermedades están implicadas las ERO y que su presencia puede acelerar el curso de la enfermedad (*Dhalla et al., 2000; Valko et al., 2007; Tretter et al., 2004*).

1.4.1 DAÑO A DNA

La molécula de DNA es una de las principales dianas del ataque por ERO, y las modificaciones que sufre como consecuencia de esos ataques son relevantes para la pérdida de la homeostasis celular. Se pueden provocar mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por daño a un gen específico. Los RL derivados del oxígeno son la fuente mayoritaria del daño al DNA. En la molécula de DNA, los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico de las ERO.

Existen diferentes tipos de daño oxidativo al DNA (*Zorrilla et al., 2004*):

- Ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las dos hebras.
- Modificación de las bases nitrogenadas (saturación y fragmentación del anillo de timina).
- Formación de uniones cruzadas (*cross-links*) DNA-DNA ó DNA- proteínas.
- Oxidación de bases de DNA, tanto genómico como mitocondrial.

Entre todas las bases la más propensa a ser modificada es la guanina. La lesión oxidativa más y mejor estudiada es la acción de un radical hidroxilo sobre la posición C8 de la guanina, con formación de la 8-hidroxi guanina y de la 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-OHdG). La 8-OHdG se considera un importante biomarcador de EO en el DNA (*Nakabeppu et al., 2004*) y se correlaciona también con la medida de la severidad de la diabetes (*De Ferranti y Mozaffarian et al, 2008*).

1.4.2 DAÑO A PROTEÍNAS

Las ERO oxidan preferentemente los aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina y como consecuencia se forman cruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de proteínas y formación de grupos carbonilos. De esta forma se impide el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores, mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc.) (*Oteiza, 1995*).

Un método indirecto para determinar el daño a proteínas causado por los RL es la determinación de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) que se forma a través del proceso de glicosilación proteica.

La glicosilación no enzimática de las proteínas ocurre en los grupos aminoterminal y en los grupos épsilonamino de los aminoácidos intracatenarios. La proteína glicosilada se forma por la adición de glucosa a la proteína mediante una reacción continua y lenta que es función del tiempo de contacto entre los reactantes y de la concentración de glucosa integrada durante dicho periodo de contacto.

El hierro de la oxihemoglobina (hemoglobina unida a átomos de oxígeno) puede reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$ o con el H_2O_2 para formar metahemoglobina (hemoglobina oxidada) y por la acción de la enzima metahemoglobina reductasa puede volver al estado normal. Si por algún déficit, esta enzima no actúa correctamente, no se produce la reversión y a partir de la metahemoglobina podrá formarse la HbA1c. Cuanto más elevada sea la concentración de HbA1c en sangre mayor será el nivel de daño a proteínas causado por los RL.

1.4.3 DAÑO A LÍPIDOS

La acción de las ERO sobre los lípidos causa alteraciones en las membranas celulares y en las lipoproteínas. En las membranas celulares se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular; y en el caso de las lipoproteínas, la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) comporta la génesis de la placa aterosomatosa.

La oxidación lipídica, por parte de las ERO, trata de una reacción en cadena en la que el AG al oxidarse, se convierte en radical de AG con capacidad de oxidar a otra molécula próxima. Este proceso se conoce como lipoperoxidación (figura 6). Genera numerosos subproductos, como el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos de evaluación del EO. Además, los aldehídos formados pueden entrecruzar proteínas.

Cuando los lípidos implicados son constituyentes de las membranas biológicas, se rompe la disposición cohesiva de la bicapa lipídica. La ruptura de la integridad de la membrana mitocondrial puede provocar una posterior producción de más RL (*Smith et al., 2006*).

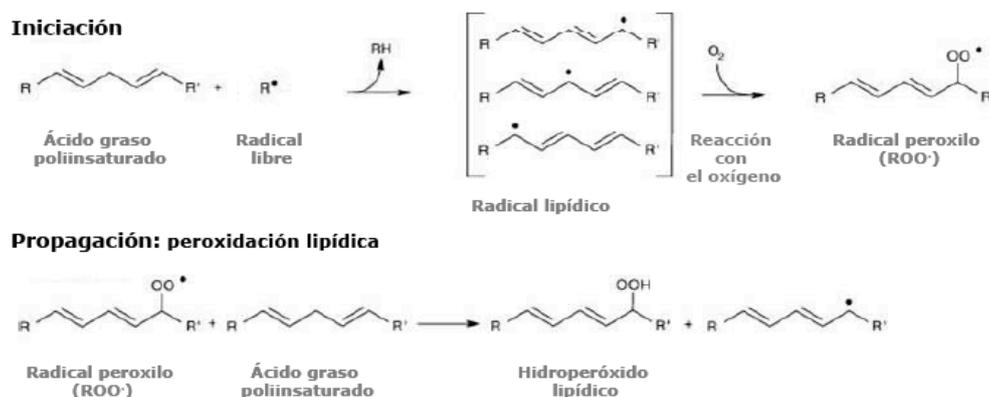


Figura 6. Proceso de peroxidación lipídica iniciada por el radical R (*Boots et al., 2008*).

2. SÍNDROME METABÓLICO (SM)

2.1 DEFINICIÓN Y DIAGNÓSTICO

Se denomina SM a la combinación de tres o más enfermedades o factores de riesgo en un mismo individuo que aumentan su probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular o diabetes mellitus. No hay un criterio único para la inclusión de estos factores de riesgo en la definición del SM.

En la tabla siguiente se esquematizan los factores de riesgo a considerar para diagnosticar SM según tres organizaciones de referencia mundial: 1) la *National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III* (ATPIII); 2) la organización mundial de la salud (OMS), y 3) la *International Diabetes Foundation* (IDF).

Tabla 2. Criterios de definición del SM

Factor de riesgo	NCEP-ATPIII	OMS	IDF
Obesidad central	Circunferencia abdominal: > 102 cm en varones > 88 cm en mujeres	Cintura a cadera: > 0,90 cm en varones > 0,85 cm en mujeres	Circunferencia abdominal: ≥ 94 cm en varones ≥ 80 cm en mujeres
Hipertrigliceridemia	≥ 150 mg/dl	≥ 150 mg/dl	≥ 150 mg/dl
Colesterol HDL bajo	< 40 mg/dl en varones < 50 mg/dl en mujeres	< 35 mg/dl en varones < 39 mg/dl en mujeres	< 40 mg/dl en varones < 50 mg/dl en mujeres
Hipertensión arterial	Sistólica: ≥ 130 mmHg Diastólica: ≥ 85 mmHg	≥ 140 mmHg ≥ 90 mmHg	≥ 130 mmHg ≥ 85 mmHg
Glicemia alterada en ayunas	100 mg/dl o fármaco específico o diabetes tipo 2 diagnosticada	≥ 110 mg/dl y/o 2 hs poscarga ≥ 140 mg/dl	100 mg/dl o diabetes tipo 2 diagnosticada

NCEP-ATPIII: *National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel III*; OMS: Organización Mundial de la Salud; IDF: *International Diabetes Foundation*.

La OMS señala que es indispensable para el diagnóstico de SM la presencia de resistencia a la insulina (RI) y/o alteración en la tolerancia a la glucosa, además de otros dos factores.

La definición de la NCEP-ATPIII se basa en la coexistencia de cualquier combinación de tres alteraciones de la tabla anterior. A diferencia de lo establecido por la OMS, la NCEP-ATPIII no recomienda una medición rutinaria de la insulinemia por no considerarla esencial para el diagnóstico de SM; mientras que la IDF considera indispensable el criterio del perímetro abdominal.

Acompañando a los diagnósticos explicados anteriormente deben incluirse los antecedentes personales y los cuestionarios específicos para evaluar apnea obstructiva del sueño en todos los pacientes y síndrome de ovario poliquístico en mujeres premenopáusicas.

Los antecedentes familiares serán útiles para identificar y evaluar el riesgo de enfermedades cardiovasculares y diabetes mellitus.

La prevalencia del SM varía de una población a otra y dependiendo, en parte, de la edad y la composición étnica de las poblaciones. Generalmente, la prevalencia de dicho síndrome aumenta con el envejecimiento (*Fauci et al., 2009*).

El SM está asociado a un mayor riesgo de padecer otras enfermedades, algunas de las cuales se explican a continuación (*Fauci et al., 2009*):

- Enfermedades cardiovasculares

El riesgo relativo de enfermedad cardiovascular de comienzo reciente en sujetos con SM, en caso de no existir diabetes, es de 1,5 a 3 veces mayor que en individuos sin SM.

En diversas investigaciones, la presencia de SM y diabetes anticiparon la aparición de accidentes vasculares cerebrales isquémicos, con un mayor peligro para pacientes con SM respecto a los que tenían diabetes únicamente. Las personas que padecen SM también están más expuestas a vasculopatías periféricas.

- Esteatosis Hepática no Alcohólica (EHNA)

La esteatosis hepática es relativamente frecuente. Sin embargo, en la no alcohólica coexisten la acumulación de triglicéridos y la inflamación.

Afecta al 2-3% de la población estadounidense y de otros países del mundo occidental. Al incrementarse la prevalencia de sobrepeso/obesidad y del SM, la EHNA se ha considerado una de las causas más frecuentes de hepatopatía terminal y carcinoma hepatocelular.

- Síndrome de ovario poliquístico

El síndrome de ovario poliquístico acompaña muy frecuentemente al SM y su prevalencia está entre el 40-50%. Las mujeres con este síndrome tienen una probabilidad de dos a cuatro veces mayor de presentar SM, en comparación con las que no lo padecen.

- Apnea obstructiva del sueño

La apnea mencionada suele acompañar a la obesidad, la hipertensión, el incremento de las citocinas circulantes y la RI. Cuando se comparan los biomarcadores de RI entre individuos con apnea y controles de igual peso, la resistencia a dicha hormona es más grave en pacientes con apnea.

2.2 FISIOPATOLOGÍA DEL SM

Los factores de riesgo más importantes para el SM son: el sobrepeso o la obesidad, la vida sedentaria, el envejecimiento, la diabetes mellitus, la cardiopatía coronaria y los trastornos lipodistróficos.

Los factores de riesgo de una enfermedad se definen como características biológicas medibles en un individuo que preceden a la enfermedad propiamente dicha, y están directamente implicados en la ruta causal biológica (*Prabhakaran et al., 2011*).

La patogénesis del SM es compleja y deja muchos interrogantes. Intervienen tanto factores genéticos como ambientales, que van a influir sobre el tejido adiposo y sobre la inmunidad innata (figura 7).

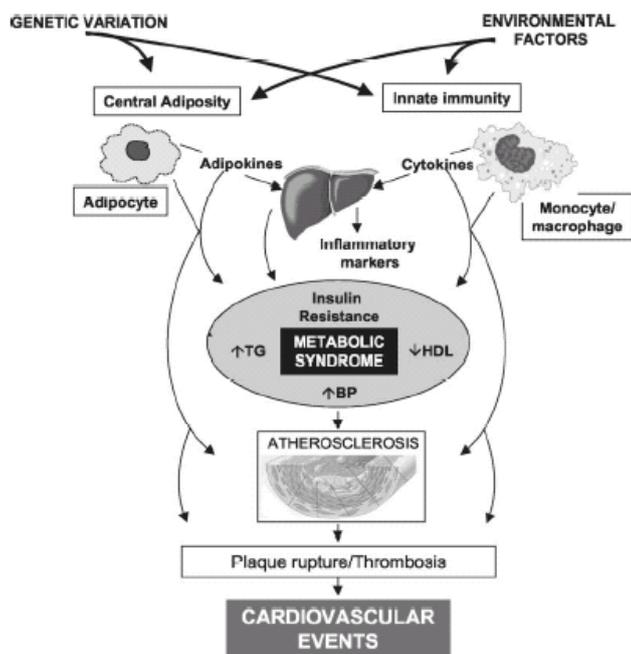


Figura 7. Fisiopatología del SM y su relación con las enfermedades cardiovasculares (extraído de Reilly et al., 2003).

Los ácidos grasos libres (FFA) se liberan a partir de la masa total de tejido adiposo. En el hígado, la presencia de dichos FFA aumenta la producción de glucosa, triglicéridos y la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Los FFA disminuyen la sensibilidad a la insulina en los músculos al inhibir la captación de glucosa mediada por dicha hormona, también disminuye el fraccionamiento de glucosa para formar glucógeno y se acumulan triglicéridos. Los incrementos en la glucosa circulante y en los FFA aumentan la secreción de insulina por el páncreas y con ello surge hiperinsulinemia. Ésta última intensifica la reabsorción de sodio y agua, y aumenta la actividad del sistema nervioso simpático (SNS) contribuyendo al aumento del gasto cardíaco y la vasoconstricción; de esta manera se aumentan la tensión arterial y los niveles de FFA circulantes.

Contribuyendo a la RI generada por el exceso de los FFA aparece un estado proinflamatorio. Este estado se mide en el individuo a través de diversos nuevos biomarcadores de riesgo cardiovascular.

Los biomarcadores son indicadores biológicos para los procesos que están implicados en el desarrollo de una enfermedad, y pueden o no ser la causa de ésta

(Prabhakaran *et al.*, 2011). Entre estos biomarcadores de riesgo cardiovascular implicados en el SM encontramos:

Una mayor secreción de **interleucina 6 (IL-6)** y de **factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)**, generado por adipocitos y macrófagos, que intensifican la RI y la lipólisis de los depósitos de triglicéridos en tejido adiposo. La IL-6 también aumenta la producción de glucosa y de VLDL por el hígado y la RI en los músculos.

Las citocinas y los FFA aumentan la producción de fibrinógeno por el hígado y la producción del **inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1)** por adipocitos que inhibe la fibrinólisis; por tanto, se relaciona con una mayor tendencia a la trombosis. En enfermedades inflamatorias en las que la fibrina se deposita en los tejidos, el PAI-1 tiene un papel significativo en la progresión de la fibrosis. Este biomarcador está elevado en la obesidad y el SM.

Los niveles mayores de citocinas circulantes estimulan también la producción de **proteína C reactiva por el hígado (PCR)**. La PCR, aunque es un biomarcador inespecífico, aumenta sus niveles drásticamente en estados inflamatorios agudos.

La menor producción de **adiponectina** por los adipocitos, citocina antiinflamatoria y sensibilizante a la insulina, también influye en la aparición del SM, ya que sus niveles circulantes son inversamente proporcionales al índice de masa corporal (IMC) y al porcentaje de grasa corporal (Fauci *et al.*, 2009).

El aumento de **molécula de adhesión célula-vascular (sVCAM-1)** también influye en la aparición de SM ya que se relaciona con la adhesión de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos al endotelio vascular; por tanto, tiene un papel en el desarrollo de la aterosclerosis y se encuentra aumentada en células endoteliales y musculares en respuesta a varias citocinas como el TNF- α y las interleucinas 1 y 4 (IL-1 e IL-4).

La **molécula de adhesión intercelular (sICAM-1)**, también implicada en el proceso inflamatorio y elevada en el SM, es una glicoproteína transmembrana presente en células endoteliales y del sistema inmune. Promueve y estabiliza las interacciones entre células, macrófagos, leucocitos, fibrinógeno, y facilita la

migración de los leucocitos a través del endotelio vascular en procesos como la extravasación y la respuesta inflamatoria. Su síntesis puede ser inducida por IL-1.

La apolipoproteína B-100 (APO B100) es el principal componente polipeptídico de las LDL y la apolipoproteína A1 (APO A1) de las HDL, tienen un papel importante en el transporte de lípidos interviniendo en la unión del colesterol unido a lipoproteínas de baja y alta densidad (LDL-c y HDL-c) a sus receptores celulares correspondientes.

En general, a medida que aumentan los niveles de HDL-c, aumentan los valores de APO A1, y lo mismo sucede para los niveles de LDL-c respecto APO B100.

La APO B100 es el principal mecanismo de transporte para el colesterol endógeno interviniendo en la deposición celular de éste.

Debido a todo esto, algunos estudios describen las determinaciones de las concentraciones de APO B100 y de APO A1 como mejores indicadores de enfermedad cardiovascular que las LDL y HDL (*Burtis et al., 1999*).

Por lo tanto, actualmente es más útil la evaluación de la **proporción APO B100/ APO A1** como biomarcador de riesgo cardiovascular que la proporción convencional de colesterol LDL/ HDL.

En la figura 8, se esquematizan los cambios en los triglicéridos y las lipoproteínas que conducen a la formación de la placa de ateroma.

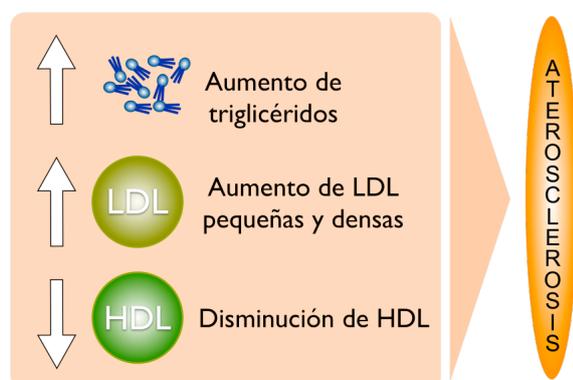


Figura 8. Los pacientes que padecen SM exhiben un perfil lipídico denominado "hiperlipidemia aterogénica".

2.3 RELACIÓN CON EL EO

El EO juega un papel crítico en la patogénesis de diferentes enfermedades. Se ha demostrado su presencia en la fisiopatología de la obesidad, la hipertensión, la disfunción endotelial y desórdenes cardiovasculares, la RI, la intolerancia a la glucosa y el SM (*Ceriello, 2008*).

Parece ser uno de los enlaces para el desarrollo de la resistencia periférica a la insulina en los pacientes obesos; ya que afecta la captación de glucosa en el músculo y el tejido adiposo y disminuye la secreción de insulina de las células β pancreáticas a través de la fosforilación de los receptores de insulina. La insulinoresistencia está, por lo tanto, relacionada al EO (*Maritim et al., 2003*).

Una concentración de ERO elevada se correlaciona inversamente con el grado de control glucémico de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (*Nourooz-Zadeh et al., 1997*).

El contenido de $O_2\bullet^-$ en el músculo esquelético de modelos animales resistentes a la insulina está elevado. Y, el tratamiento con antioxidantes mejora la tolerancia a la glucosa estimulando su transporte por parte de la insulina en el músculo esquelético aislado en estos animales (*Blendea et al., 2005; Henriksen, 2006*).

También, un tratamiento con H_2O_2 en líneas celulares sensibles a la insulina, como adipocitos 3T3-1 y miocitos L6, induce RI; mientras que la adición de antioxidantes, revierte este efecto (*Houstis et al., 2006*).

Existen evidencias de que el incremento en la glucemia disminuye defensas antioxidantes endógenas como el GSH y la vitamina C (*Inouye et al., 1999*) y que pacientes con SM presentan biomarcadores de peroxidación en plasma y orina como F-2 isoprostanos, TBARS (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) que indica la formación de productos de la peroxidación lipídica como el MDA, proteínas carboniladas y PCR (*Armutcu et al., 2008*). Estos datos corroboran que el EO puede ser causa y/o consecuencia en la RI y por tanto, en la aparición del SM (*Wei et al., 2008*).

El EO también se relaciona con el SM a través de las citocinas pro-inflamatorias cuyos niveles se encuentran elevados. Probablemente estas moléculas inflamatorias contribuyen a reforzar la relación existente entre inflamación, EO y RI (*Wei et al., 2008*).

La activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) también está involucrado en la producción de ERO y el consiguiente daño endotelial en el SM. El SRAA juega un papel fundamental en la homeostasis cardiovascular y renal. La elevada actividad del SR y los niveles elevados de angiotensina II (ANG II) generan ERO que pueden contribuir a la aparición de RI sistémica (*Cooper et al., 2007*). Por ejemplo, la infusión sistémica o local de ANG II ha demostrado causar RI en el músculo esquelético independientemente de las influencias hemodinámicas, lo que apoya la idea de que la ANG II puede modular directa y negativamente el sistema de transporte de la glucosa en el músculo. Por otra parte, los pacientes con hipertensión esencial presentan altos niveles de $O_2\bullet^-$ y $ONOO^-$, así como también bajos niveles de antioxidantes endógenos como SOD, CAT y Gpx (*Lazy et al. 2008*).

La relación existente entre el EO y el SM responsabiliza al estado oxidativo de importantes daños que ocurren en el SM como: la peroxidación lipídica, daño en las membranas celulares, daño del DNA y trastorno en la expresión de genes.

El EO también está presente en la hipoadiponectinemia relacionada con la obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y enfermedad arterial coronaria (*Stern et al., 2007*).

El EO induce la disfunción endotelial, afectando directamente a las células de la pared vascular (*Ceriello et al., 2004*). El aumento de la insulina, de los AG y de los niveles de glucosa libre pueden dar lugar a un aumento de las ERO y por lo tanto un aumento del EO y del estado de inflamación (*Simão et al., 2010*).

Algunos estudios sugieren que la obesidad por si misma puede inducir EO y el aumento del EO en el tejido adiposo es, al menos en parte, la causa subyacente de la desregulación de adipocitocinas y el subsecuente desarrollo del SM (*Furukawa et al., 2004*).

2.4 MODELOS ANIMALES EN ESTUDIOS DE SM

Al ser el SM un trastorno multifactorial, deben ser utilizados diferentes tratamientos para los diferentes pacientes, y es difícil en la práctica desarrollar cepas de origen animal que representen a todos los diferentes tipos de pacientes con este síndrome. Existen algunas cepas animales y, en particular algunas cepas de ratas, con un perfil de anomalías muy similar al que caracteriza a la mayoría de los pacientes con SM, permitiendo hoy en día evaluar los medicamentos y las intervenciones en el estilo de vida para tratar o prevenir este síndrome.

Ejemplos de cepas de ratas utilizadas para el estudio de SM:

- La rata Zucker obesa (Zucker *fa / fa*): es conocida y ampliamente utilizada como modelo animal de obesidad genética. La mutación *fa* se descubrió en 1961 por Lois Zucker y es un cruce entre las ratas Merck M-deformación y Sherman. Estos animales presentan una mutación en el receptor de leptina, que es la base molecular de su fenotipo. La leptina es producida por el tejido adiposo y desempeña un papel importante en la regulación del balance energético. Esta hormona se libera en el sistema circulatorio por el tejido adiposo en proporción a la cantidad de lípidos almacenados, y actúa en el cerebro, en los receptores de leptina, determinando una disminución en la ingesta de alimentos y un aumento en el gasto de energía. Además de su obesidad típica, las ratas Zucker presentan una serie de anomalías como la dislipidemia, la intolerancia a la glucosa, la hiperinsulinemia moderada y el daño renal (*Aleixandre de Artiñano A y Miguel Castro M, 2009*).

- La rata SHR (rata espontáneamente hipertensa): es un modelo experimental bien definido para el estudio de la hipertensión y ha sido también propuesto como un modelo de RI. Estas ratas muestran hipertrigliceridemia, obesidad abdominal e hipertensión (*Aleixandre de Artiñano A y Miguel Castro M, 2009*).

- La rata SHROB (rata obesa espontáneamente hipertensa): es una cepa desarrollada por Koletsky *et al.* en 1969. Se trata de ratas obesas e hipertensas homocigotas para una mutación en un alelo del gen del receptor de la leptina. Presentan un fenotipo que incluye: hipertensión severa, hiperlipidemia (marcada hipertrigliceridemia y moderado aumento del colesterol), RI, valores normales de glucosa en ayunas, obesidad, y enfermedad renal con proteinuria y glomeruloesclerosis. Todas estas

características presentan más paralelismo con los síntomas del SM en humanos que las cepas explicadas anteriormente, lo que las hace mejor modelo para su estudio (*Aleixandre de Artiñano A y Miguel Castro M, 2009; Ernsberger et al., 1999*) y las indicadas para la experimentación en este trabajo.

Como controles sanos se escogieron ratas Wistar Kyoto (WKY). Se trata de una cepa de rata normotensa, polivalente, que debido a su vida media, fácil manejo y su docilidad es ampliamente utilizada en investigación biomédica como grupo control en estudios de hipertensión.

3. ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA 3 (AGPI n-3) DE ORIGEN MARINO Y OMEGA 6 (AGPI n-6)

3.1 ORÍGEN Y BIOSÍNTESIS AGPI n-3 y n-6

Los AG son biomoléculas lipídicas con una estructura de cadena hidrocarbonada lineal que contiene uno (Ácidos grasos monoinsaturados: AGMI) o más dobles enlaces (Ácidos grasos poliinsaturados: AGPI) delimitados por un extremo metilo (H₃C) y otro carboxilo (COOH). También existen los AG saturados, es decir, sin dobles enlaces en su estructura.

Tanto la longitud de la cadena carbonada como la presencia y localización de las instauraciones caracterizan las propiedades físicas de los AG, como su punto de fusión y su fluidez. Estas propiedades son muy importantes para la fisiología del organismo. Desde un punto de vista bioquímico la posición de los dobles enlaces respecto al final de la cadena es muy importante por tratarse de una estructura muy conservada en las rutas metabólicas.

Los AGPI n-3 y n-6 contienen el primer doble enlace cis- entre los átomos de carbono tercero y cuarto en el caso de n-3 o entre el sexto y el séptimo en el caso de n-6, siempre contando desde el extremo metilo del AG (*Poudyal et al., 2011; Rueda et al., 2010*).

En la figura 9 aparecen las fórmulas del linoleico (LA) y del α -linolénico (LNA). En la nomenclatura se suele especificar también, entre paréntesis, el número de carbonos

y el número de dobles enlaces. Así, el LA tiene 18 carbonos, con dos dobles enlaces, el primero de los cuales en la posición del carbono 6; es por tanto un AGPI n-6. El LNA es un AGPI n-3 de 18 carbonos con tres dobles enlaces.

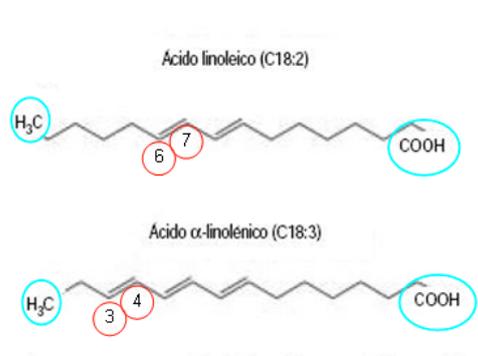


Figura 9. Estructura del LA (AGPI n-6) y del ácido LNA (AGPI n-3).

En la figura 10 se clasifican los distintos AG según el número y posición de sus dobles enlaces.

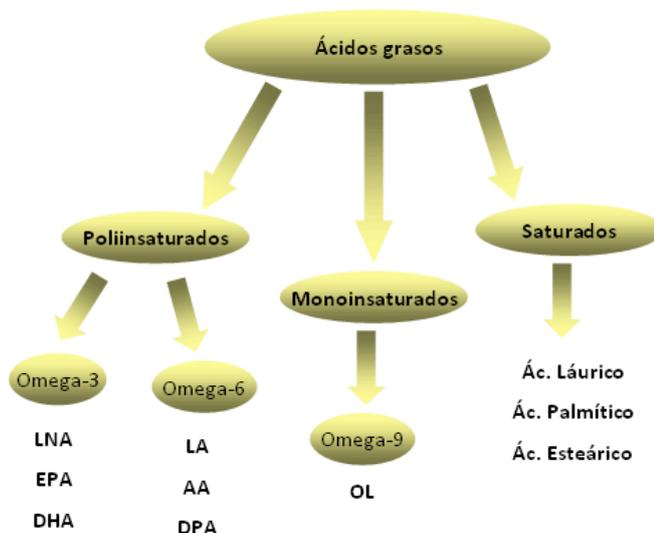


Figura 10. Clasificación de AG: AGPI n-3, AGPI n-6, AGPI n-9 y saturados. *LNA*: Ácido α-Linolénico; *EPA*: Ácido Eicosapentaenoico; *DHA*: Ácido Docosahexaenoico; *LA*: Ácido Linoleico; *AA*: Ácido Araquidónico; *DPA*: Ácido Docosapentaenoico; *OL*: Ácido Oleico.

Los AGPI n-3 y AGPI n-6 son AGPI de cadena larga. Son las dos clases principales de AGPI esenciales. Las enzimas celulares no pueden introducir enlaces dobles más allá del carbono 9, y por este motivo estos AG deben obtenerse a través de la dieta. Esta falta en la capacidad de síntesis de los AGPI n-3 y AGPI n-6 implica que la

regulación del balance orgánico de los AGPI n-6/AGPI n-3 dependa principalmente de la alimentación.

El LA (18:2 n-6) es el AGPI n-6 predominante derivado de las plantas y abundante en las semillas. Es un precursor del AA (20:4 n-6) y los eicosanoides.

El ácido LNA (18:3 n-3) es el principal AGPI n-3 de origen vegetal que se encuentra en los cloroplastos de las hortalizas de hoja verde y en las semillas de lino, colza, albahaca, chía y nueces. Es un precursor del DHA (22:6 n-3).

El LA, el AA y el DHA son los predominantes en los fosfolípidos celulares, de ahí su gran importancia biológica ya que determinan la fluidez de las membranas y, por tanto, el comportamiento de las enzimas y receptores de éstas (*Jump, 2002*).

Ambos AG esenciales (LA y LNA) se metabolizan a otros más insaturados a partir de una serie alternada de reacciones específicas llevadas a cabo por elongasas y desaturasas, principalmente en el hígado. Estas enzimas específicas están localizadas en el retículo endoplasmático y en los peroxisomas de las células. Las dos vías metabólicas (figura 11), la de los AGPI n-3 y la de los AGPI n-6, utilizan los mismos complejos enzimáticos para sus transformaciones; es por esto que existe una competencia entre ellos por las enzimas específicas en cada reacción. Por ejemplo, la enzima $\Delta 6$ -desaturasa posee mayor afinidad por los AGPI n-3 que por los AGPI n-6.

Esta enzima se reconoce como la limitante de estas reacciones y algunas evidencias señalan que su actividad decrece con la edad (*Rueda et al., 2010*).

La mayor afinidad de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa por los AGPI n-3 hace que se requieran cantidades mucho mayores de éstos para mantener una velocidad de síntesis adecuada a los requerimientos del organismo.

De esta forma, un aporte dietético mayoritariamente constituido por AGPI n-6, como ocurre a partir del consumo de aceites vegetales, puede inhibir significativamente la formación endógena de AGPI n-3, en especial de EPA y DHA (AGPI n-3 procedentes de origen marino). La dieta occidental aporta principalmente AGPI n-6 y muy pocos AGPI n-3; por tanto, los efectos del consumo de este tipo de dieta son motivo de

estudio actualmente. Esto se agrava más aún, cuando el consumo de pescado (la mejor fuente nutricional de DHA preformado) es baja.

La enzima $\Delta 15$ -desaturasa (figura 11) sólo se encuentra en las plantas y metaboliza la conversión de AGPI n-6 a AGPI n-3. Debido a la ausencia de esta enzima, los mamíferos no pueden realizar esta conversión.

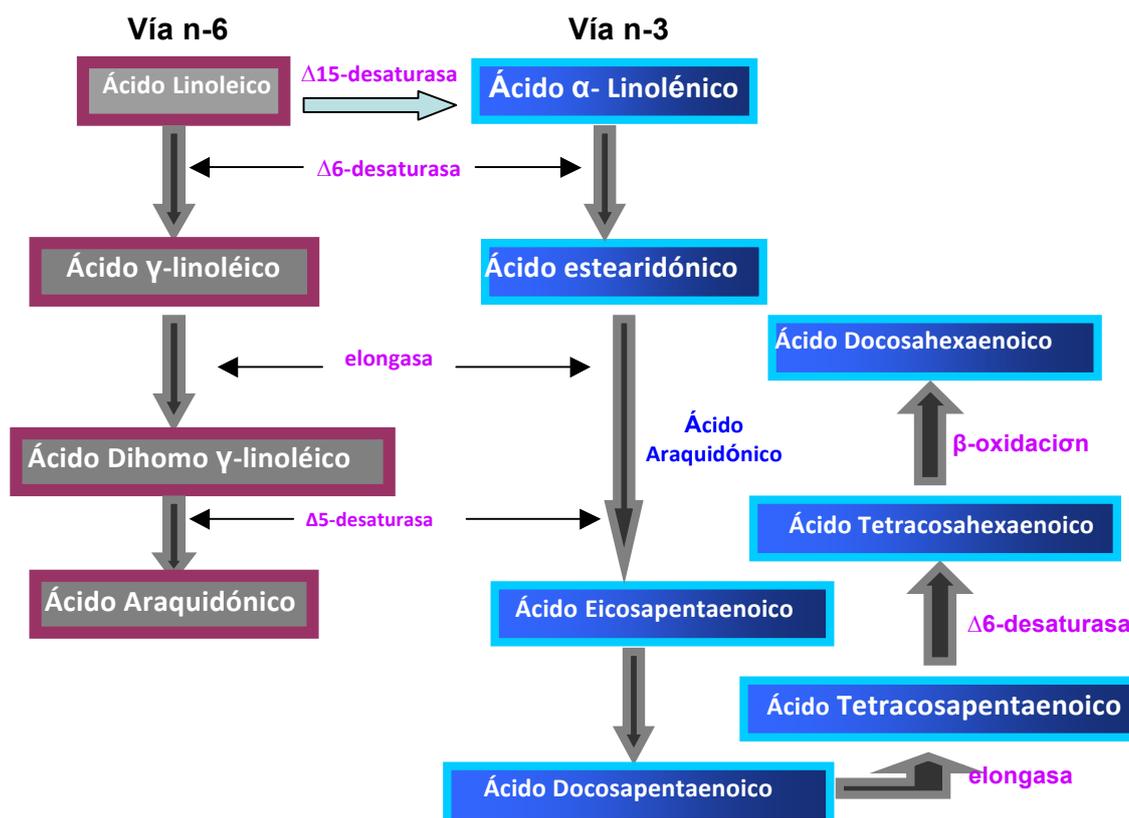


Figura 11. Vías metabólicas de los AGPI n-3 y n-6.

3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGPI n-3 Y n-6

Con la alimentación se ingieren AGPI que se incorporan a las células. Normalmente formarán parte de los fosfolípidos de membrana, preferiblemente de los fosfoglicéridos.

Cuando la célula se activa recibiendo estímulos específicos, los AGPI son liberados a través de las fosfolipasas A_2 que hidrolizan los fosfoglicéridos.

El AA una vez liberado vía fosfolipasa A_2 es el principal precursor de una familia de moléculas llamadas eicosanoides con importantes funciones en los procesos de la

inflamación, ya que modulan la intensidad y la duración de las respuestas inflamatorias y la respuesta inmune. Los eicosanoides son la conexión existente entre los AGPI y el sistema inmune (*Calder y Grimble, 2002; Calder, 2006*).

El AA una vez libre actúa como sustrato de la enzima ciclooxigenasa (COX), para formar las prostaglandinas (PG) de la serie 2, o de la lipooxigenasa (LO) para formar los leucotrienos (LT) de la serie 4 (figura 12).

De las PG de serie 2, la más estudiada es la PGE₂ que tiene importantes funciones proinflamatorias como la inducción de fiebre, el aumento de la permeabilidad vascular, la vasodilatación y el aumento del dolor y el edema causados por otros agentes como la histamina. Por otra parte, la PGE₂ suprime la proliferación de linfocitos y la actividad de células *Natural Killer* (NK), inhibe la producción del TNF- α y de las interleucinas 1, 2 y 6 (IL-1, IL-2, IL-6); teniendo también, de este modo, una actividad antiinflamatoria.

Los LT de serie 4 (LTB₄, es el más estudiado) aumentan la permeabilidad vascular, mejoran el flujo sanguíneo local, son potentes agentes quimiotácticos para leucocitos, inducen la liberación de enzimas lisosomales, aumentan la generación de ERO, inhiben la proliferación de linfocitos y promueven la actividad de las células NK, regulan la producción de moléculas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-2.

Así, el AA da lugar a una serie de mediadores (PG₂ y LT₄) que tienen efectos opuestos entre sí, por lo que el efecto fisiológico general en el organismo se regirá por su concentración, el momento de su producción y la sensibilidad de las células diana a sus efectos (*Calder y Grimble, 2002*).

Los AGPI n-3 (EPA y DHA principalmente) sustituyen al AA en las membranas celulares provocando una disminución de la síntesis de los eicosanoides derivados de él, ya que el sustrato para su formación se ve disminuido (*Yaqoop et al., 2000; Sperling et al., 1993*). Por lo tanto, se podría considerar a los AGPI n-3 como antagonistas del AA ya que comparten receptores en las mismas células diana y resultan como alternativa a la formación de eicosanoides. Asimismo, el EPA inhibe competitivamente la oxigenación del AA por la enzima COX. Por todo esto, se podría

decir que la ingesta de aceite de pescado comporta una disminución de síntesis de eicosanoides derivados del AA (*Calder y Grimble, 2002; Calder, 2006*).

El metabolismo del EPA por la COX y la LO da lugar a LT y tromboxanos (TX) de la serie 5 (LT5 y TX5) y PG de la serie 3 (PG3) (*Sperling et al., 1993*). Éstos se consideran biológicamente menos potentes que sus análogos derivados del AA. Por ejemplo, el LTB5 tiene solamente un 10% de la potencia del LTB4 en relación a la actividad quimiotáctica y a la liberación de enzimas lisosomales (*Calder y Grimble, 2002*). Las PG3 también poseen un efecto inflamatorio menor que las PG2, ya que las PG3 inducen una menor expresión génica de COX-2 y una menor producción de IL-6 en estudios realizados en líneas celulares (*Bagga D et al., 2003*).

Los eicosanoides derivados del EPA y la consecuente reducción de los eicosanoides derivados del AA tienen, por lo tanto, efectos antiinflamatorios positivos sobre el organismo y podrían mejorar la función inmunológica, constituyendo una de las claves del funcionamiento de los AGPI n-3 y de sus efectos beneficiosos (*Calder y Grimble, 2002; Calder, 2006*).

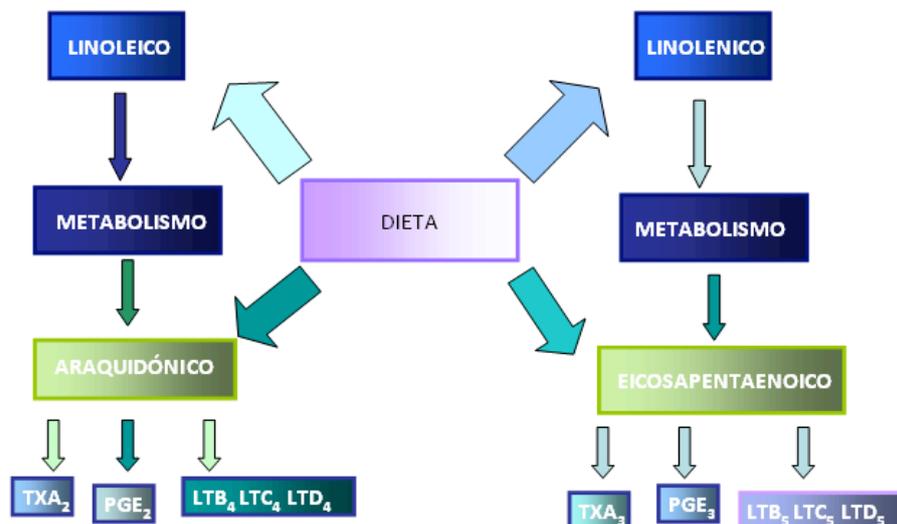


Figura 12. Formación de eicosanoides relacionados con los procesos de inflamación. TX, tromboxanos; PG, prostaglandinas; LT, leucotrienos.

Además, está descrito que tanto EPA como DHA producen metabolitos oxigenados denominados resolvinas con potente actividad antiinflamatoria y inmunoreguladora (*Calder PC, 2006; Serhan et al., 2008*).

Las PG y los LT activan factores de transcripción como NFκB (Factor de transcripción nuclear Kappa B) involucrado en la expresión de multitud de proteínas como citocinas o proteínas reactivas de fase aguda de la inflamación. Las resolvinas inhiben la transcripción de NFκB por diversas vías, como por ejemplo, activando transcripcionalmente PPARγ (Receptor del activador de la proliferación de peroxisomas). A partir de esta activación se formará un heterodímero con otro receptor nuclear, el receptor retinoico (RXR) que se unirá a un "elemento de respuesta" (PPRE) en la molécula de DNA. De esta manera se estimula la expresión de genes que codifican proteínas para la oxidación de los AG, deteniéndose así la producción de los diferentes mediadores que desencadenan los procesos de inflamación (*Mataix y Gil, 2004; Rueda et al., 2010*).

En la tabla 3 se resumen los efectos de los AGPI n-3 sobre factores reguladores de la inflamación.

Tabla 3. Efectos de los AGPI n-3 sobre los factores reguladores de la inflamación

Efecto	Factor	Función
Descenso	Prostaglandina E ₂	Proinflamatoria.
Descenso	Tromboxano A ₂	Potente agregador plaquetario y vasoconstrictor.
Descenso	Leucotrienos B ₄	Proinflamatorios, quimiotáctico para neutrófilos.
Elevación	Prostaciclina I _{2/3}	Inhibidores de la agregación plaquetaria y vasodilatador.
Descenso	Factor activador de plaquetas (PAF)	Activador de plaquetas y leucocitos.
Descenso	Radicales libres de O ₂	Daño tisular, EO.
Descenso	Hidroperóxidos lipídicos	EO.
Descenso	Interleucina 1 y factor de necrosis tumoral (TNF)	Proinflamatorias, estimulan neutrófilos, proliferación de linfocitos y estimulan PAF.
Descenso	Interleucina 6	Proinflamatorias, estimulan la síntesis de proteínas reactivas de fase aguda.
Descenso	Proteína C reactiva (PCR)	Proteína reactiva de fase aguda, factor de riesgo en enfermedades cardiovasculares.

(Extraído de *Rueda et al., 2010*).

En conclusión, esta demostrado que todos estos mediadores químicos derivados del AA, del EPA y del DHA tienen un papel decisivo en los procesos patológicos que cursan con inflamación de tejidos. Según sean de un signo u otro conducirán a la prolongación del proceso inflamatorio pudiendo derivar en enfermedades inflamatorias crónicas u otros procesos patológicos asociados, como arterosclerosis,

cáncer o enfermedades cardiovasculares; o por el contrario conducirán a la resolución de la inflamación (*Rueda et al., 2010*).

3.3 CLASIFICACIÓN DE LOS AGPI n-3

Una vez estudiada la importancia biológica de los AGPI n-3 y AGPI n-6 y los posibles efectos fisiológicos beneficiosos del EPA y del DHA, en esta tesis nos centraremos en el estudio de estos dos AGPI n-3.

3.3.1 ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO (EPA)

El EPA contiene 20 átomos de carbono y cinco insaturaciones o dobles enlaces ($C_{20:5n-3}$) (figura 13).

Se encuentra predominantemente en pescados y en aceites de pescado. Se considera, junto con el DHA, el responsable de los efectos beneficiosos de los aceites de pescado en el sistema cardiovascular por su papel en procesos fisiológicos como la coagulación sanguínea o las respuestas inflamatoria e inmunológica a partir de la síntesis de eicosanoides (*Poudyal et al., 2011*). El EPA reduce la viscosidad de la sangre y aumenta la deformabilidad de los glóbulos rojos. También reduce la agregación plaquetaria aunque no afecta a los factores de la coagulación, las concentraciones de fibrinógeno, el PAI-1 o la actividad del activador del plasminógeno tisular-1 (tPA1) (*Finnegan et al., 2003*).

En sujetos con una hipercolesterolemia moderada, el EPA reduce las concentraciones séricas de triglicéridos y aumenta las concentraciones de glucosa e insulina en ayunas sin afectar las LDL y el colesterol total; en cambio aumenta las HDL (Lipoproteínas de Alta Densidad) (*Woodman et al., 2002*).

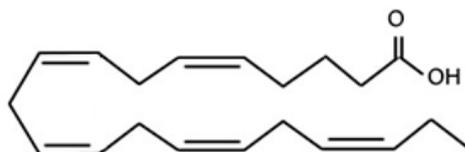


Figura 13. Fórmula química del Ácido Eicosapentaenoico (EPA)

3.3.2 ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA)

El DHA contiene 22 átomos de carbono y 6 insaturaciones o dobles enlaces (C₂₂:6n-3) (figura 14).

El DHA no está presente en las fuentes nutricionales de AG de origen terrestre, aunque sí lo está su precursor más importante, el LNA, que se encuentra en aceites vegetales extraídos de determinadas semillas.

La fuente más importante de DHA son los organismos vegetales y animales de origen marino. Los componentes del fitoplancton lo sintetizan con mucha eficiencia. Los peces y los animales marinos en general lo incorporan a sus estructuras celulares a partir de la alimentación. Desde el punto de vista de la alimentación humana, los peces, especialmente aquellos de constitución más grasa (jurel, atún, anchoa, sardina, salmón...) constituyen la principal fuente nutricional de DHA.

El DHA proveniente de la dieta o de la síntesis endógena, se encuentra prácticamente en todos los tejidos; siendo, particularmente abundante en cerebro, en los conos y bastoncitos de la retina y en las gónadas. También se puede identificar en el plasma sanguíneo y en la membrana de los eritrocitos.

Es de suma importancia en el desarrollo y función del sistema nervioso y del órgano visual en el feto y recién nacido; ya que representa del 30 al 40% de la composición de AG en los fotoreceptores de la retina del ojo humano (*Bazan et al., 1990*). Por ello, es de vital importancia su consumo durante la gestación y la lactancia (*Simopoulos et al., 1999*).

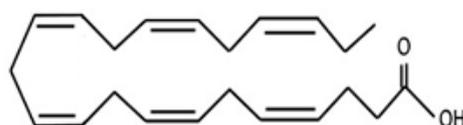


Figura 14. Fórmula química del Ácido Docosahexaenoico (DHA)

3.4 PRODUCTOS PESQUEROS Y AGPI n-3

El clima de los mares fríos induce la síntesis de AGPI n-3 por parte de las algas y microorganismos que forman el plancton para aumentar la fluidez de sus membranas celulares y mantener su funcionalidad a bajas temperaturas.

Estos organismos son la base de la cadena trófica; son consumidos por peces y otros animales marinos que incorporan los AGPI n-3 a sus componentes celulares y a través de ellos llegan al hombre que los consume con la dieta.

Desde el punto de vista nutritivo los pescados se clasifican según su contenido en grasa y se dividen en pescados magros (o pescado blanco) y grasos (o pescado azul):

Pescado magro o blanco:

Acumulan la grasa en el hígado en forma de triglicéridos como el bacalao. Su contenido en grasa es aproximadamente de un 2%.

Pescado azul o graso:

Su contenido en grasa puede alcanzar hasta el 10%, según las especies. La sardina, por ejemplo, alcanza según la temporada entre un 8 y un 10% de grasa. Esta grasa se almacena debajo de la piel y en la carne oscura del pescado siendo rica en AGPI n-3.

Otros ejemplos de pescado azul: boquerón, caballa, palometa, chicharro, atún, bonito del norte, salmón, anguila, pez espada...

La fuente principal de AGPI n-3 es el consumo de este tipo de pescado, aunque no es la única, también podemos encontrar AGPI n-3 por ejemplo en frutos secos, mariscos o pescados blancos.

Es difícil encontrar valores regulares de AGPI n-3 en los peces a lo largo de las estaciones. La cantidad de grasa en los peces es mayor en verano y en otoño cuando hay gran disponibilidad de alimentos para estas especies y menor en invierno. También las hembras antes del desove presentan mayores niveles de grasa (*Mataix y Gil, 2004*).

3.5 EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS AGPI n-3

El consumo de pescado contribuye significativamente a una "alimentación sana", debido a su alto contenido en AGPI n-3, como el EPA y el DHA, y otros componentes importantes como proteínas de alta calidad y vitaminas o minerales (*Ackman, 1989*).

En contraste con los beneficios atribuidos a su ingesta (*Bang et al., 1971*), hoy en día hay una reducción en el consumo de pescado, especialmente entre los jóvenes, en el mundo occidental. Existen diversos factores implicados en esta reducción, como el estilo de vida o la escasez de tiempo. La falta de información sobre los verdaderos efectos beneficiosos del pescado sobre la salud, en particular el papel de los AGPI n-3 y la publicidad sobre la presencia de contaminantes, han afectado de manera negativa al impulso del consumo de pescado. Es por esta razón que se cree positiva la suplementación dietética de AGPI n-3.

De los AGPI n-3 se conoce su efecto antiinflamatorio y regulador del metabolismo lipídico, reduciendo de esta manera el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Debido a los efectos beneficiosos descritos en sus consumidores están siendo objeto de interés por parte de expertos en nutrición (*Poudyal et al., 2011; Eckel, 2010; Russo, 2009; Jump, 2002; Connor, 2000; Kinsella et al., 1990*).

A parte del efecto antiinflamatorio, descrito anteriormente, existen otros mecanismos involucrados en el efecto cardioprotector de los AGPI n-3: efecto antitrombótico, acción antiarrítmica, mejora del perfil lipídico, disminución de la glucemia y disminución de la presión arterial.

- Efecto antitrombótico

Una de las principales propiedades de los AGPI n-3, particularmente del EPA, es que su consumo reduce el contenido de AA en los fosfolípidos de la membrana de las plaquetas y probablemente también de las células endoteliales, por un mecanismo de competición entre sustratos como se explicó anteriormente. Por lo tanto, el consumo de AGPI n-3 favorece una menor formación de tromboxano A₂, potente agregador plaquetario con capacidad trombótica (*López et al., 2006*) (*Andriamampandry, 1999; Din, 2004*).

- Acción antiarrítmica

Muchas de las muertes por enfermedades cardiovasculares se deben a la inestabilidad eléctrica del miocardio.

Los efectos antiarrítmicos de los AGPI n-3 han sido atribuidos a su capacidad para estabilizar la contracción cardíaca modulando diferentes canales iónicos, particularmente canales de Na^+ , involucrados en la génesis y/o el mantenimiento de los potenciales de acción cardiacos (*Mataix y Gil, 2004*). Los AGPI n-3 pueden prevenir las arritmias ventriculares en pacientes que han sufrido un infarto de miocardio. La investigación básica ha demostrado que el enriquecimiento de las membranas de los cardiomiocitos con estos AGPI reduce la vulnerabilidad a las arritmias cardíacas (*Kromhout et al., 2010*).

- Mejora del perfil lipídico

La sustitución de los AG saturados por AGPI en la dieta produce una disminución en los niveles de triglicéridos en plasma e hígado, una disminución del colesterol total a expensas del LDL-c, un aumento del HDL-c y se evita la hipertrigliceridemia postprandial (*Durrington et al., 2001; Lombardo y Chicco, 2006; Spady, 1993*). El mecanismo de estos efectos sobre el perfil lipídico no está claro; pero se cree que la distinta composición en los fosfolípidos de las membranas, puede afectar a receptores de las lipoproteínas y a enzimas involucradas en su metabolismo (*Mata et al., 1997; Connor, 2000; Poudya et al., 2011*).

- Mejora de los niveles de glucemia:

Una dieta rica en aceites de pescado, EPA y DHA principalmente, mejora la acción de la insulina sobre la utilización de glucosa y/o su almacenamiento y evita el desarrollo de RI (*Lombardo y Chicco, 2006; Poudyal et al., 2011*). Los receptores PPAR- α parecen jugar un papel fundamental en la modulación de los efectos de los AGPI n-3, ya que la suplementación con aceite de pescado restaura la sensibilidad hepática a la insulina únicamente en cepas salvajes de ratones, pero no en ratones deficientes en receptores PPAR- α . Esto sugiere que la relación EPA/DHA en el aceite de pescado puede mejorar la sensibilidad a la insulina de una forma PPAR- α dependiente (*Neschen et al., 2006*).

- Presión arterial:

La presión arterial es un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y en la aparición del SM.

De manera general, se puede afirmar que una dieta rica en AG saturados favorece la aparición de hipertensión; mientras que la sustitución por AGPI tiene un efecto hipotensor (*Appel et al., 1993; Morris, 1993*).

El DHA parece ser más eficiente que el EPA en la reducción de la presión arterial, mejorando la relajación del endotelio y atenuando la constricción vascular (*Abeywardena et al., 2011*). La deficiencia de AGPI n-3 en la dieta prenatal puede causar hipertensión (*Armitage et al., 2003*) y el aceite de pescado con dosis diferentes de AGPI n-3 modula las respuestas vasculares inducidas por angiotensina II (*Poudyal et al., 2011*).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El SM ha sido definido como la agrupación de diferentes factores de riesgo cardiovascular y diabetes tipo 2 relacionados entre sí; incluyendo hiperglucemia, RI, hipertensión, hipertrigliceridemia, disminución del HDL-colesterol y obesidad (*Poudyal et al., 2011*).

Los efectos cardioprotectores de los AGPI n-3, especialmente EPA y DHA, han sido definidos tanto en humanos como en animales (*Yashodhara et al., 2009; Lee et al., 2009; Saremi et al., 2009*).

El EO tiene un papel potencialmente perjudicial como evento temprano en el SM y las enfermedades cardiovasculares (*Roberts y Sindhu, 2009*). Puede relacionarse con la etiología de diversos parámetros que definen el SM, incluyendo la aterosclerosis, la hipertensión, la diabetes tipo 2, la obesidad y la RI (*Roberts y Sindhu, 2009*).

El papel de los AGPI n-3 en la reducción del daño oxidativo no se conoce completamente (*Prasad, 2009*).

Por todo lo descrito, se podría suponer que una posible intervención, aumentando los AGPI n-3 en la dieta, sería útil para reducir el riesgo cardiovascular en el SM a través de la mejora del EO (*Yashodhara et al., 2009*).

Basándonos en estos antecedentes, se plantea la siguiente **hipótesis de trabajo**:

Una dieta rica en EPA y DHA mejora los marcadores que definen el SM, parámetros de EO y nuevos marcadores de riesgo cardiovascular, tanto en un modelo animal con metabolismo normal (ratas Wistar) como en uno con SM (ratas SHROB).

Objetivo principal:

Valorar la eficacia de varias dietas con distintas proporciones de EPA:DHA frente a dietas con soja y lino en animales sanos y en animales con SM.

Objetivos específicos:

Objetivo 1:

Comprobar si la rata SHROB es un buen modelo de SM para estudios de intervención nutricionales.

Objetivo 2:

Valorar qué parámetros, de todos los estudiados, presentan diferencias entre animales sanos y animales con SM y, por tanto, son útiles para la valoración de la enfermedad.

Objetivo 3:

Comparar los resultados entre animales control Wistar y animales SHROB.

Objetivo 4:

Valorar los efectos de las dietas con diferentes proporciones de EPA:DHA en cada cepa animal, en comparación con las dietas control.

Objetivo 5:

Determinar qué proporción de EPA:DHA es la más adecuada para mejorar los distintos biomarcadores estudiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta tesis engloba los resultados obtenidos en un estudio interdisciplinario el cual forma parte del programa de proyectos de investigación fundamental no orientada y tiene por título: mecanismos de acción de ácidos grasos poliinsaturados de origen marino en el síndrome metabólico y sinergismo con polifenoles e iminociclitoles. Los participantes, además del grupo FAR-ox, fueron el Instituto de Química Avanzada de Cataluña-CSIC de Barcelona y el Instituto de Investigaciones Marinas CSIC de Vigo. Esto explica que algunos resultados se hayan determinado en los grupos de investigación mencionados.

1. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Para lograr los objetivos descritos se planificó el siguiente experimento:

Dos grupos de ratas, uno control y otro con SM, fueron tratados durante 3 meses con tres dietas diferentes con distintas proporciones de AGPI de origen marino EPA y DHA (1:1), (2:1) y (1:2). En las tres dietas se mantenía la proporción AGPI n-6:AGPI n-3 2:1. Se incluyeron también grupos alimentados con dietas "control": una a base de soja que contiene AGPI n-6 pero pocos AGPI n-3, y otra a base de lino que contiene AGPI n-3 de origen vegetal.

Se controló el consumo de comida y el peso de los animales semanalmente; y la glucosa, la insulina y la presión arterial cada quince días.

Después del tratamiento, los animales se sacrificaron para obtener muestras de plasma y tejidos que fueron analizados para determinar biomarcadores de EO y relacionados con la inflamación, así como parámetros bioquímicos que definen el SM.

En esta tesis se presentan únicamente los resultados de los parámetros obtenidos durante el tratamiento y de las muestras procedentes del sacrificio.

La figura 15 muestra un esquema cronológico sobre el diseño del experimento.

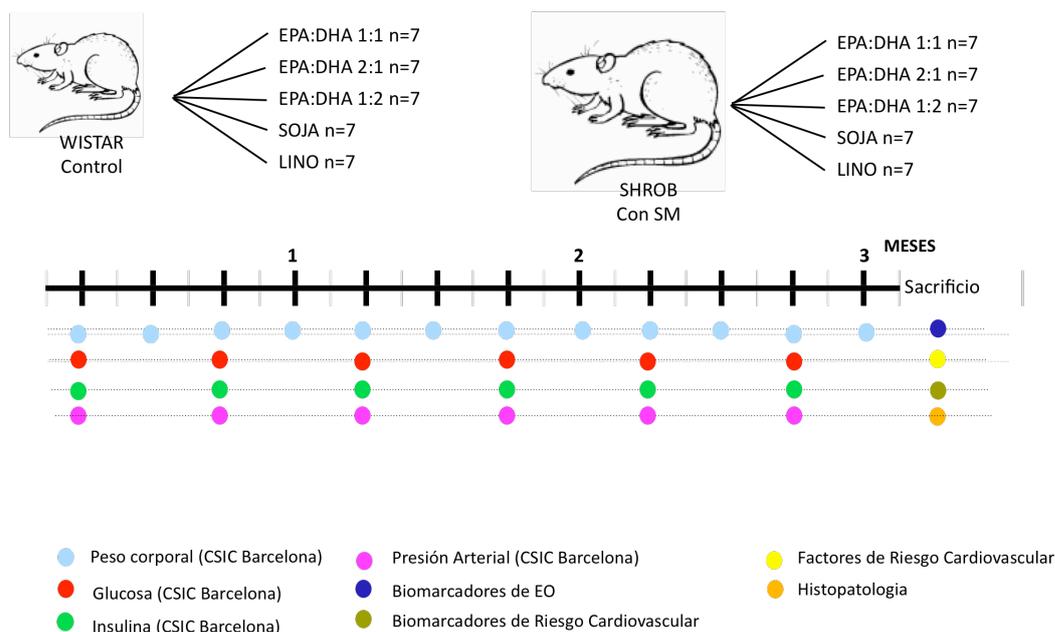


Figura 15. Esquema cronológico del diseño del experimento.

1.1 MODELO ANIMAL

Los animales utilizados en este estudio fueron:

- Treinta y cinco ratas hembras WKY, (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) de quince semanas con un peso corporal entre 225 y 250 gramos. Constituyeron el grupo control sano (denominado Wistar) y se dividieron aleatoriamente en cinco grupos que recibieron, respectivamente, las cinco dietas descritas en el apartado siguiente.

- Treinta y cinco ratas hembras SHROB, de 15 semanas con un peso entre 450 y 500 gramos. Este grupo se utilizó como modelo con SM y también se dividió aleatoriamente en cinco subgrupos que siguieron las cinco dietas propuestas.

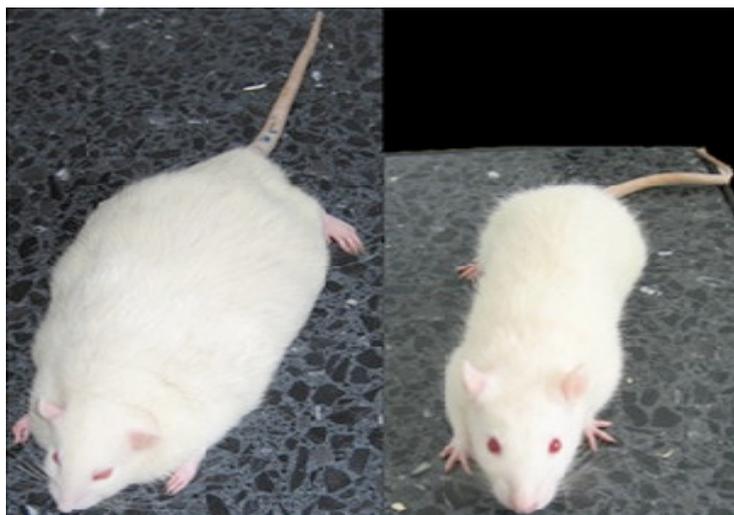


Figura 16. Izquierda: rata *SHROB*, derecha: rata *Wistar Kyoto*.

Los animales se estabularon en el Instituto de Química Avanzada de Cataluña-CSIC bajo las siguientes condiciones:

- Ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.
- Humedad relativa del 50 ± 10 %.
- Temperatura adecuada de 22 ± 2 °C.
- Período de aclimatación de 8 días antes de iniciar el estudio.
- Dieta estándar (Panlab A04, Panlab, Barcelona, España).
- Agua del Montseny (Agua de Ribes, Barcelona, España).
- El Comité Ético de animales de experimentación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC-Madrid) aprobó todos los procedimientos necesarios para este estudio.



Figura 17. Estabulario del Instituto de Química Avanzada de Cataluña-CSIC.

1.2 TRATAMIENTOS

Los AGPI procedían de aceites de pescado azul comerciales preparados en distintas proporciones EPA/DHA en el Instituto de Investigaciones Marinas del CSIC en Vigo. Las recomendaciones de ingesta mínima diaria de la mezcla EPA+DHA, según la EFSA son de 250 mg/día.

La dosis final administrada fue de 0,8 ml de aceite/kg/semana que se corresponde a una dosis 32 veces superior a la recomendada.

Las mezclas de aceites se administraron mediante sondas gástricas, una vez a la semana.



Figura 18. Administración de los tratamientos por sonda gástrica.

Grupos de tratamiento:

- Proporción **EPA/DHA 1:1**.
- Proporción **EPA/DHA 2:1**.
- Proporción **EPA/DHA 1:2**.
- Aceite de **Soja**.
- Aceite de **Lino**.

Después del tratamiento todos los animales fueron sacrificados previa anestesia con ketamina (Imalgene 1000, Merial Laboratorios S.A., Barcelona, España) y xilacina (Rompun 2 %, Química Farmacéutica S.A., Barcelona, España) a las concentraciones de 80 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente mediante una inyección intraperitoneal.

El sacrificio se realizó mediante exsanguinación por punción aórtica. Esta técnica permitía la obtención del mayor volumen de sangre posible.

La extracción se efectuaba con jeringuillas de 5 ml (Bs-05s Terumo) las agujas de las cuales estaban impregnadas de heparina (1% 5000 UI) para evitar la coagulación sanguínea en el momento de la aspiración.

2. OBTENCIÓN, PROCESAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre de todos los animales se recogieron en diferentes tubos:

- Tubos de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) (BD Vacutainer, ref. 367864).
- Tubos de suero (BD Vacutainer, ref. 369032).
- Tubos de heparina- Litio (BD Vacutainer, ref. 368884).

2.1 MUESTRAS SANGRE TOTAL

Antes de separar los eritrocitos del plasma, se recogieron dos alícuotas de sangre, una del tubo de EDTA para determinar la HbA1c; y otra del tubo de heparina- litio para determinar la hemoglobina total y el hematocrito.

2.2 MUESTRAS ERITROCITOS

Los eritrocitos se separaron del plasma centrifugando durante 15 minutos a 850 *xg* y a una temperatura de 4 °C (Sorvall RT 6000D).

Después de la centrifugación se observaban tres capas en el tubo: plasma, leucocitos (fina capa intermedia) y eritrocitos. Se separaron las dos capas sin aspirar los leucocitos.

Los eritrocitos se lavaron con suero fisiológico y realizando sendas centrifugaciones de 5 minutos a 1300 *xg* a una temperatura de 4 °C, antes de usarlos.

Los eritrocitos se utilizaron para la determinación de las principales enzimas antioxidantes: SOD, CAT, Gpx y GR.

Para la conservación de las muestras que se utilizaron para determinar la SOD se requirió la realización de un procesamiento especial:

Los eritrocitos se congelaron a -20 °C y descongelaron. Se añadió agua destilada fría para su lisis. Se añadió una mezcla de etanol: cloroformo (6,25:3,75) para la extracción de la hemoglobina. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 5 minutos a 1900 *xg* a una temperatura de 4 °C. La SOD se encontraba contenida en el sobrenadante y esta fase se guardó a -20 °C.

Para la conservación de las muestras para determinar CAT, Gpx y GR se realizó un proceso distinto:

Se realizó una dilución 1:10 de eritrocitos con agua destilada, para obtener el hemolizado correspondiente. Se conservó todo a -20 °C.

2.3 MUESTRAS PLASMA

El plasma obtenido se separó en alícuotas y se congeló a -20 °C para las determinaciones de:

- Concentraciones de diferentes biomarcadores de riesgo cardiovascular: Moléculas de adhesión celular (VCAM-1, ICAM-1), PCR y PAI-1.
- Capacidad antioxidante total del plasma: Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).
- Indicador del estado oxidativo: LDL oxidada (LDL-ox).

2.4 MUESTRAS SUERO

Para la obtención del suero se realizó una centrifugación de la sangre durante 15 minutos a 850 *xg* y a una temperatura de 20 °C (Jouan RB3.11). Se separaron en alícuotas que se conservaron congeladas a -20 °C. Las determinaciones que se realizaron en suero fueron:

- Factores de Riesgo Cardiovascular: Perfil lipídico (colesterol, triglicéridos, HDL-c, LDL-c y APOs A1 y B100).

2.5 MUESTRAS TEJIDOS

Se realizó una extracción de órganos (hígado, tejido adiposo y riñón) de todos los animales de estudio.

Para el estudio histopatológico se almacenó una parte del tejido adiposo, hígado y riñón, previamente lavados con suero fisiológico, en formol 10 %.

Para el análisis de los parámetros relacionados con el EO, parte de los órganos se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -20 °C.

Los tejidos se descongelaron y homogeneizaron con tampón fosfato 200 mM pH 6,25 (Na_2HPO_4 y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Panreac 121677.1210 y 131679.1211) a las diluciones de:

Hígado: dilución 1:20.

Riñón: dilución 1:5.

Tejido adiposo: dilución 1:2.

Las fracciones solubles de estos órganos se obtuvieron después de una ultracentrifugación a 129000 xg durante 1 hora a 4 °C (Centrikon T1045) y fueron congelados a -20 °C hasta su uso.

3. ESTUDIO DE PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL SM

La determinación de todos los biomarcadores se realizó como mínimo por duplicado.

3.1 PESO CORPORAL

Se determinó el peso corporal de todos los animales una vez por semana durante el tiempo de estudio.

Se realizaron las medidas del peso con una balanza Shimadzu modelo EB-2800M.

3.2 PRESIÓN ARTERIAL

Se midió la presión arterial cada 15 días siempre entre las 10:00 de la mañana y las 15:00 de la tarde evitando así variaciones debidas al ciclo circadiano (*Buñag RD et al., 1973*).

Los animales se colocaron en un cepo para ratas de diferentes tamaños: 150 g, 250 g, 400 g y 500 g e individualmente.

Se les calentaba la cola con un calentador y una lámpara infrarrojo (Philips de 250 w). De esta manera se dilataba la vena caudal donde se medía la presión arterial. El medidor de presión estaba acoplado a un transductor de pulso para rata.

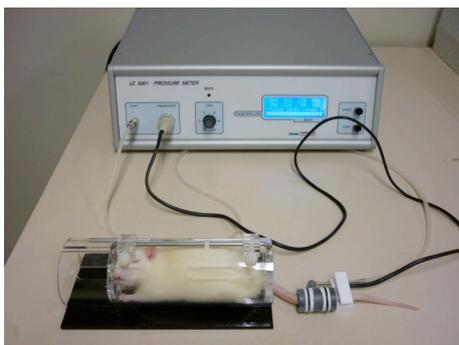


Figura 19. Medida de la presión arterial en la cola de los animales.

3.3 GLUCOSA

Para la determinación de la glucosa, se depilaron las patas traseras del animal y se dejaron los animales en ayunas 24 horas antes.

En el momento de la determinación se localizó la vena safena situada por encima de la flexura de la rodilla de la pata trasera del animal. Se aplicó vaselina en la zona depilada y, realizando presión para localizar mejor la vena, se accedió a ella con la aguja 23G obteniendo una muestra de sangre.

Se puso en contacto la gota de sangre con el extremo de la tira reactiva de un glucómetro Ascensia ELITE XL (Bayer Consumer Care AG, Basel, Switzerland). Los resultados se expresaron en mg/dl.

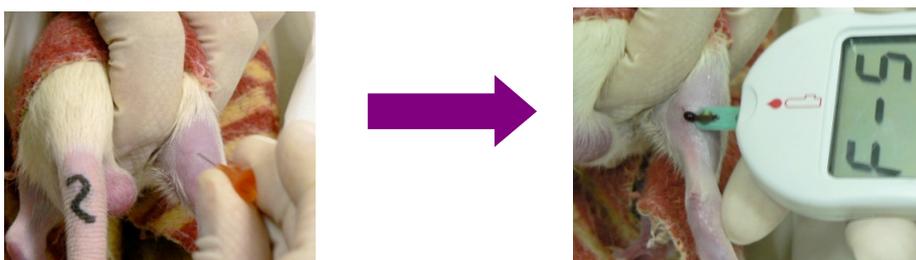


Figura 20. Procedimiento para la determinación de la glucosa.

3.4 INSULINA

La determinación de la insulina se realizó con un kit ELISA de la casa comercial Millipore Corporation, Billerica, MA, USA.

Este ensayo ELISA se realizó de forma secuencial:

- 1) Las muestras de 10 μ l de plasma cada una, se incubaron en los pocillos previamente recubiertos por anticuerpos monoclonales de ratón anti-insulina de rata durante 1 hora permitiendo la captura de las moléculas de insulina.
- 2) Se añadieron 80 μ l de la solución de anticuerpo policlonal conjugado con biotina que se unió a la insulina capturada. Se incubó la placa durante 1 hora.
- 3) Se realizó un proceso de lavado de los reactivos en exceso.
- 4) Se añadieron 100 μ l de la solución de peroxidasa de rábano picante conjugada a avidina (avidina-HRP) que se unió a los anticuerpos con biotina inmovilizados. Se incubó la placa durante 30 minutos.
- 5) Se realizó otro proceso de lavado de los reactivos en exceso.
- 6) Se añadió el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) que se unió a la avidina-HRP. Se incubó la placa de 5 a 20 minutos hasta que apareció coloración azul intensa.

La actividad enzimática se midió espectrofotométricamente por el aumento de absorbancia a 450 nm en un lector de placas *SpectraMax M5*. La concentración de insulina se determinó comparando la densidad óptica de las muestras con la curva estándar. Los resultados se expresaron en ng/ml.

3.5 ÍNDICE HOMA

El índice Homa (Modelo de evaluación de la homeostasis) es una estimación de RI y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Insulina en ayunas } (\mu\text{U/ml}) * \text{glucemia en ayunas } (\text{mg}\%) / 405$$

Con este método, los valores altos de Homa denotan baja sensibilidad a la insulina o gran RI.

El valor de Homa no mide la cantidad de glucosa metabolizada por unidad de peso, más bien explora las características homeostáticas de un sistema metabólico deduciendo que grado de sensibilidad a la insulina es compatible con estas características homeostáticas.

3.6 HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c)

Se utilizó un ensayo turbidimétrico para cuantificar la HbA1c en sangre total (Spinreact).

La molécula de hemoglobina liberada como consecuencia de la lisis de los hematíes, se hidroliza por acción de una proteasa, y los derivados de la hemoglobina resultantes se transforman en hematina alcalina que presenta una absorción a 600 nm.

La HbA1c se midió empleando un método de inhibición de la aglutinación de partículas de látex. Estas partículas recubiertas con anticuerpos monoclonales anti-HbA1c, compiten con la HbA1c de la muestra cuando se mezclan con un reactivo constituido por partículas de polímero sensibilizadas con haptenos de HbA1c.

La presencia de HbA1c en la muestra inhibe la aglutinación de estas partículas de látex. El grado de aglutinación de las partículas es indirectamente proporcional a la concentración de HbA1c de la muestra y puede cuantificarse por comparación con un calibrador de concentración conocida. El grado de aglutinación se midió en un autoanalizador Cobas MIRA.

Los resultados se expresaron como porcentaje de concentración de HbA1c sobre la hemoglobina total de la muestra (*Sharp P et al., 2002*).

4. ESTUDIO DE PARÁMETROS DE EO EN ERITROCITOS Y TEJIDOS DIANA

4.1 DETERMINACIONES PREVIAS

Es necesaria la determinación de la hemoglobina, del hematocrito y de la concentración proteica antes de la realización del estudio de los parámetros de EO, ya que algunos de éstos se expresaron según mg de proteína o g de hemoglobina.

4.1.1 HEMOGLOBINA

La cantidad de hemoglobina contenida en sangre total se determinó mediante la reacción de Drabkin (QCA ref. 994933) a partir de sangre recogida en heparina- litio.

El Fe (II) de la hemoglobina, oxihemoglobina y carboxihemoglobina se oxida a Fe (III) por el ferricianuro, dando lugar a la metahemoglobina que, en presencia del ión cianuro, origina la cianmetahemoglobina, compuesto de color rojo estable que se midió en el espectrofotómetro *Perkin Elmer Lambda 25* a 540 nm (*Drabkin y Austin, 1935*).

Los resultados se expresaron en g hemoglobina por cada 100 ml de sangre. La concentración se determinó mediante una recta patrón (QCA ref. 999523).

4.1.2 HEMATOCRITO (HTC)

Esta técnica consiste en el cálculo del porcentaje de glóbulos rojos que tiene una muestra de sangre entera.

Se introdujo un capilar (Hirschmann- Laborgerate ref.9100270) en cada uno de los tubos de heparina- litio (unas $\frac{3}{4}$ partes de la longitud del capilar) y por capilaridad se llenaron de sangre.

Se centrifugaron los capilares de cada una de las muestras de sangre entera a 8064 *xg* durante 3 minutos en la centrífuga para capilares (microcentrífuga MPW-55).

Se calculó el porcentaje de eritrocitos presentes en la muestra mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ eritrocitos} = (\text{cm eritrocitos} / \text{cm totales}) * 100$$

4.1.3 CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Se determinaron las proteínas mediante el test Bradford que se basa en la formación de un complejo entre el azul Brillante G y las proteínas de la muestra a partir de la utilización del reactivo de Bradford (Sigma B6916). Las muestras en las que se determinó la concentración proteica fueron de dos tipos, y se diluyeron con agua destilada de la siguiente manera:

- Muestras de plasma (1:100).
- Muestras de fracción soluble de los órganos: tejido adiposo (1:2), hígado (1:40) y riñón (1:50).

Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro *Perkin Elmer Lambda 25* a 595 nm. La absorbancia es proporcional a la presencia de proteínas, la cual se compara con una recta patrón de albúmina de concentración conocida (QCA ref. 999523) (*Bradford, 1976*).

Los resultados se expresaron en g proteínas por cada 100 ml de sangre.

4.2 SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMATICOS

4.2.1 SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad enzimática de la SOD se midió siguiendo el método descrito por Misra y Fridovich (*Misra y Fridovich, 1972*).

La epinefrina se oxida a pH básico. En la oxidación se forman radicales superóxidos que actúan sobre la propia epinefrina y forman un adenocromo que se detecta por espectrofotometría. Si en la cubeta donde se produce la oxidación, se añade una muestra que contenga enzimas SOD, éstas captarán el $O_2^{\bullet-}$ transformándolo hasta H_2O_2 y oxígeno, y se inhibirá la formación del adenocromo.

Reactivos:

Epinefrina 6 mM a la concentración de 19,9 mg/10 ml de ácido clorhídrico (HCl) 1 mM (Panreac ref.131020), se dejó sobre hielo.

Tampón carbonado 50 mM pH 10,2 (Na_2CO_3 Merck ref.6392, $NaHCO_3$ Probus ref.2030) y EDTA Na^{2+} 0,1mM (Merck ref. 1.08418.0100).

Para la obtención de la concentración que inhibe el 50% de la formación del adenocromo (I_{50}) se hicieron diluciones de la muestra con agua bidestilada:

Tabla 4 Diluciones muestras SOD

Dilución hemolizado	Dilución riñón	Dilución tejido adiposo	Dilución hígado
1:100	1:30	1:30	1:30
1:50	1:15	1:15	1:15
1:25	1:10	1:10	1:10
3:50	1:7,5	1:7,5	1:7,5
2:25	1:6	1:5	1:6

Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro *Perkin Elmer Lambda 25* para lectura en cubetas a 480 nm.

Los resultados se expresaron en Unidades/g Hb para los hemolizados y en Unidades/mg Proteínas para las muestras de tejido; donde una unidad es la cantidad de muestra que inhibe en un 50 % la transformación de la epinefrina en adenocromo a pH alcalino.

4.2.2 CATALASA (CAT)

La actividad enzimática CAT se midió siguiendo el método descrito por Cohen *et al.* (Cohen *et al.*, 1970).

La CAT interviene en la transformación del H_2O_2 en oxígeno y agua.

Reactivos:

- Tampón fosfato potásico 100 mM pH de 7,5: KH_2PO_4 (Panreac ref. 121509.1210) y K_2HPO_4 (Panreac ref.141512.1210).
- Tampón fosfato potásico + H_2O_2 (Merck ref. 8599) 17 %.

Diluciones de las muestras:

- Hemolizado de eritrocitos 1:10 con agua destilada
- Hígado 1:20 con tampón fosfato 200 mM.
- Tejido adiposo sin diluir.
- Riñón 1:20 con tampón fosfato 200 mM.

Una vez preparados los reactivos y las muestras se llevó a cabo la determinación de la desaparición del H_2O_2 durante 1 minuto en el espectrofotómetro *Perkin Elmer Lambda 25* a 240 nm.

Los resultados se expresaron como mmol H_2O_2 /min/g Hb en el caso de eritrocitos y mmol H_2O_2 /min/mg proteína en el caso de tejidos.

4.2.3 GLUTATIÓN PEROXIDASA (Gpx)

La actividad Gpx se determinó siguiendo el método descrito por Wheeler *et al.* (Wheeler *et al.*, 1990).

Esta enzima utiliza el GSH para catalizar la reducción del H_2O_2 y de los hidroperóxidos formando GSSG. Su eficacia va ligada a la GR, la cual necesita NADPH para reducir el GSSG.

Reactivos necesarios:

- Tampón fosfato 100 mM 1 mM EDTA pH 7,0 (K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , Panreac ref. 141512.1210 y 121509.1210 respectivamente).
- NADPH (β - Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate) 2,25 mM (Sigma ref. N7505 25 MG).
- GReductasa (*Glutathione Reductase from bakers yeast*) 25 U/0,25 ml (Sigma ref. G3664-500 UN 060M7405).
- GSH (*L-Glutathione Reduced minimum 99%*) 11,5 g/l (Sigma ref. 64251-106045K0693).
- REAGENT SR-1: t-BuOOH (*tert-Butyl hidroperoxide solution*) 15 mM (Sigma ref. 458139- 100ML).
- REAGENT ASSAY: 11,1 ml Tampón fosfato 100 mM 1 mM EDTA pH 7,0 + 1,5 ml NADPH + 0,3 ml GR + 0,6 ml GSH.

Los hemolizados de eritrocitos congelados a $-20^\circ C$ se volvieron a diluir 1:5 para la determinación.

En el caso de fracción soluble de tejidos se realizaron las siguientes diluciones con tampón fosfato 100 mM 1 mM EDTA:

Hígado: dilución 1:5.

Tejido adiposo: sin diluir.

Riñón: dilución 1:10.

Se valoró el nivel de desaparición del NADPH o NADP⁺ en un autoanalizador COBAS Mira a 340 nm.

Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Hb en el caso de las muestras de eritrocitos o en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína en el caso de fracciones solubles de tejidos.

4.2.4 GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)

Para la determinación de la GR se siguió el método descrito por Wheeler *et al.* (Wheeler *et al.*, 1990). La GR reduce el GSSG a GSH utilizando NADPH.

Reactivos:

- Tampón fosfato 0,25 M 2 mM EDTA pH 7,4 (PO_4HK_2 y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ Panreac ref. 141512.1210 y 121509.1210 respectivamente)
- REAGENT SR-1: GSSG (*L- Glutathione oxidized*) 20mM (Sigma ref. G4501-250MG).
- REAGENT SR-2: NADPH 2mM (Sigma ref. N7505 25 MG).
- REAGENT ASSAY: 18,72 ml H_2O + 24 ml Tampón fosfato 0,25 M.

Se valoró el nivel de generación del NADP⁺ a partir del NADPH utilizando un autoanalizador COBAS Mira a 340 nm.

Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ Hb en el caso de eritrocitos y en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína en el caso de tejidos.

4.3 INDICADORES DEL ESTADO OXIDATIVO

4.3.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DEL PLASMA (ORAC)

Esta técnica mide la capacidad de atrapar radicales peroxilo inducidos por 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro (AAPH 0,384 M, ref. Aldrich 44,091-4) a una temperatura de 37 °C (Ou B *et al.*, 2001).

La fluoresceína sódica es un marcador de fluorescencia (FL 48 nM, ref. Aldrich 16,630-8) que al ser dañado por radicales libres, pierde su capacidad de emitir fluorescencia. A mayor capacidad antioxidante de la muestra, la fluorescencia se mantiene más en el tiempo.

Se midió la capacidad antioxidante de las muestras de plasma durante dos horas a intervalos de un minuto, transcurridas las dos horas las muestras pierden la fluorescencia.

Los blancos de las muestras son FL, AAPH y tampón fosfato potásico 75 mM pH 7,4 (KH_2PO_4 y K_2HPO_4 Panreac ref. 141512.1210 y 121509.1210 respectivamente). La función de los blancos es establecer la pérdida máxima de fluorescencia de la FL a través de los radicales peroxilo generados por el AAPH sin la presencia de sustancias pro o antioxidantes en la cubeta.

Reactivos:

- Tampón fosfato potásico 75 mM pH 7,4.
- FL 48 nM.
- AAPH 0,384 M.
- Ácido 6-Hidroxi-2, 5, 7,8-tetrametilcroman-2carboxílico (Trolox) 100 μM (Sigma ref. 23,881-3). Se utilizó para hacer una recta patrón de concentraciones conocidas.

Una vez preparados los reactivos se cargó una placa de 96 pocillos con las muestras diluidas de plasma 1:500, las concentraciones conocidas de la recta de Trolox y los blancos.

Por último se añadieron los reactivos y se procedió a la lectura en un fluorímetro *Fluoroskan Ascent Labsystems* a una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 538 nm.

Los resultados se expresaron en μmol de TE (Equivalentes en Trolox)/ml plasma.

4.3.2 GLUTATIÓ N REDUCIDO Y GLUTATIÓ N OXIDADO (GSH/GSSG)

El equilibrio GSSG/GSH se mide por fluorimetría con el método de *Hissin y Hilf* (*Hissin y Hilf, 1976*).

El GSH reacciona con el o-ftalaldehído (OPT, MERCK ref.11452) a un pH de 8, el GSSG reacciona con el OPT a un pH de 12.

Para determinar la concentración de GSH y GSSG en las muestras de tejido, se hicieron alícuotas de fracción soluble y se añadió ácido tricloroacético (TCA Panreac 131067.1609) al 70 %. Después se centrifugó a 850 *xg* durante 10 minutos a 4 °C.

Por último, el sobrenadante se guardó a -20 °C para la posterior realización de las determinaciones. La conservación con TCA evita la oxidación del glutatió n contenido en las muestras de tejido y precipita las proteínas.

Una vez realizado este proceso, todas las muestras se conservaron congeladas en medio ácido hasta la posterior determinación.

Reactivos necesarios:

- OPT 1mg/ml.
- NEM (N-etilmaleimida) 5mg/ml.
- Tampó n fosfato só dico pH 8 100 mM EDTA 5mM (Na₂PO₄H Panreac ref. 131679 y NaH₂PO₄. 2 H₂O Panreac ref. 131677).
- Tampó n NaOH (Panreac 131687.1210) 0,1 N.

Se prepararon dos rectas patró n (GSH y GSSG) para la validació n de los resultados obtenidos y para determinar la concentració n de la muestra (tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones recta patró n GSH y GSSG

Concentraci3n	GSH 2 µg/ 100µL	Tamp3n GSH
1.5 µg/100 µl	7.5 ml	2.5 ml
1 µg/100 µl	5 ml	5 ml
0.5 µg/ µl	2.5 ml	7.5 ml
0.1 µg/ µl	0.5 ml	9.5 ml
0.05 µg/ µl	0.25 ml	9.75 ml
0.01 µg/ µl	0.05 ml	9.95 ml

Para realizar las lecturas se utilizó un espectrofluorímetro *Perkin Elmer LS50B* para lectura en cubetas a una longitud de onda de excitación de 350 nm y 420 nm de emisión.

Los resultados se expresaron en nmol/mg proteína.

4.3.3 PRODUCTOS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (TBARS)

La medida de los productos de degradación de hidroperóxidos lipídicos como el MDA, es uno de los procedimientos para conocer el grado de peroxidación lipídica en sistemas biológicos. El test utilizado es el llamado TBARS y mide todas las sustancias capaces de reaccionar con el ácido tiobarbitúrico.

La determinación de los TBARS se realizó según el método de Buege y Aust (*Buege y Aust, 1978*), pero midiendo la fluorescencia en un espectrofluorímetro *Perkin Elmer LS50B* a 515 nm de longitud de onda de excitación y 548 nm de longitud de onda de emisión, tal como se describe por Richards *et al.* (*Richards et al., 1992*).

Reactivos necesarios para la determinación:

- Reactivo TBARS (solución TCA-TBA-HCl: ácido tricloroacético al 15 %, ácido tiobarbitúrico al 0,375 % Merck ref. 8180 y ácido clorhídrico 0,25 N Probus ref. 17750 35 %).
- Suero Fisiológico para realizar los blancos de la reacción.

Se utilizó una recta patrón de bis-dietilacetato malonaldehído a partir de la concentración madre de 41 μ M MDA.

Seguidamente se realizó la preparación de las muestras de tejidos diluyéndolas con suero fisiológico:

Tejido adiposo e hígado 1:25 y riñón 1:50.

Los resultados se expresaron en nmol MDA/g tejido.

4.3.4 LDL OXIDADA (LDL-ox)

La concentración de LDL-ox se midió en muestras de plasma.

Esta determinación se realizó con un Kit ELISA de la marca CUSABIO Biotech Co., LTD (ref. CSB-E07932r) que contenía una placa de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo primario específico para detectar LDL-ox de rata.

Se añadieron a la placa los estándares y las muestras de plasma junto con un anticuerpo específico para LDL-ox de rata conjugado a biotina.

Después se añadió a cada pocillo la enzima avidina-HRP y se incubó la placa a una temperatura de 37 °C. Tras la incubación se añadió una solución de sustrato de TMB.

De esta manera sólo las muestras que contenían LDL-ox, mostraron un cambio de color.

La reacción enzima-sustrato finalizó con la adición de una solución de ácido sulfúrico y el cambio de color se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas *Biotek Power Wave XS2*.

La concentración de LDL-ox se determinó comparando la densidad óptica de las muestras con la curva estándar.

Los resultados se expresaron en ng/ml.

5. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR: PERFIL LIPÍDICO

5.1 TRIGLICÉRIDOS

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y AG libres. El glicerol se fosforila a través de la reacción catalizada por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) y produce glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosin-5-difosfato (ADP). El G3P se convierte a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y H₂O₂.

Al final, el H₂O₂ reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja (*Young DS, 2001*).

La intensidad del color formado en estas reacciones es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra y se determinó mediante un autoanalizador Cobas Mira a una longitud de onda de 500 nm.

Los reactivos Spinreact fueron:

- Calibrador primario *Triglycerides* (ref. 1002380- 5 ml): se reconstituyó con agua destilada.
- Reactivo de trabajo (ref. 41033- 500 ml) listo para su uso.
- Dos controles:
 - SPINTROL -H- Normal (ref. 1002120- 4X5 ml): Se reconstituyó con agua destilada.
 - SPINTROL -H- Patológico (ref. 1002210- 4X5 ml): Se reconstituyó con agua destilada.

Las muestras de suero se utilizaron sin diluir y los resultados se expresaron en mg/dl.

5.2 COLESTEROL

El colesterol presente en la muestra origina un compuesto coloreado, la intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada. Se determinó con un autoanalizador Cobas Mira a una longitud de onda de 500 nm (*Young DS, 2001*).

Los reactivos Spinreact fueron:

- Calibrador primario *Cholesterol* (ref. 1002320): se reconstituyó con agua destilada.
- Reactivo de trabajo (ref. 41021-250 ml) listo para su uso.
- Dos controles:
 - SPINTROL -H- Normal (ref. 1002120- 4X5 ml): Se reconstituyó con agua destilada.
 - SPINTROL -H- Patológico (ref. 1002210- 4X5 ml): Se reconstituyó con agua destilada.

El tratamiento de las muestras fue el mismo que en la determinación anterior y los resultados se expresaron en mg/dl.

5.3 HDL COLESTEROL

El método se basa en las propiedades de un detergente que solubiliza sólo la fracción HDL, de forma que el HDL-c se libera reaccionando con la colesterol esterasa, la colesterol oxidasa y los cromógenos. Se determina directamente el HDL-c sin la necesidad de un tratamiento previo o centrifugación de las muestras (Spinreact).

Las lipoproteínas LDL, VLDL y quilomicrones son inhibidos debido a la adsorción del detergente en sus superficies haciéndolas resistentes a la enzima (*Young DS, 2001*).

La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de HDL-c presente en la muestra ensayada y se determinó en el autoanalizador Cobas Mira a una longitud de onda de 600 nm.

Se prepararon los siguientes reactivos:

- Calibrador primario *HDL-c* (ref. 33901-1 ml): suero humano liofilizado y reconstituido con agua destilada.

- Reactivos de trabajo listos para su uso:

R1 (*reagent assay*) (ref. 1001096-60 ml).

R2 (*reagent 1*) (ref. 1001096-20 ml).

Los resultados se expresaron en mg/dl.

5.4 LDL COLESTEROL

La determinación se realizó en dos pasos sin la necesidad de tratar previamente las muestras (Spinreact):

Primero se eliminaron las lipoproteínas no-LDL y después se midió el LDL-c.

La intensidad del color formado fue proporcional a la concentración de LDL- c presente en la muestra. Se midió en un autoanalizador Cobas Mira a una longitud de onda de 600 nm (*Burtis A et al., 1999*).

Se prepararon los siguientes reactivos:

- Calibrador primario *LDL-c* (33901-1 ml): suero humano liofilizado y reconstituido con agua destilada.

- Reactivos de trabajo listos para su uso:

R1 Enzimas (*reagent assay*) (ref. 41023-30 ml).

R2 Enzimas (*reagent 1*) (ref. 41023-10 ml).

Los resultados se expresaron en mg/dl.

5.5 APO A1 Y APO B100

Las concentraciones de APO A1 y de APO B100 se midieron en muestras de suero. Estas determinaciones se realizaron a partir de dos Kits ELISA de la marca CUSABIO BIOTECH CO., LTD.

Cada uno de los Kits contenía una placa de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo primario específico para detectar APO A1 o APO B100 de rata. Se añadieron a cada placa los estándares y las muestras de suero junto con un anticuerpo conjugado de biotina específico para APO A1 o para APO B100 de rata.

Seguidamente se añadió a cada pocillo enzima avidina-HRP y se incubaron las placas a una temperatura de 37 °C. Después se añadió una solución de sustrato de TMB. De esta manera sólo las muestras que contenían APO A1 o APO B100, mostraron un cambio de color.

La reacción enzima-sustrato finalizó con la adición de una solución de ácido sulfúrico y el cambio de color se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 450nm en un lector de placas *Biotek Power Wave XS2*.

La concentración de APO A1 o de APO B100 se determinó comparando la densidad óptica de las muestras con una curva estándar.

Los resultados se expresaron en mg /ml en ambos casos.

6. ESTUDIO DE BIOMARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Los biomarcadores PCR, PAI-1 y moléculas de adhesión celular (VCAM-1 / ICAM-1) se determinaron mediante Kits ELISA de la casa comercial CUSABIO BIOTECH CO., LTD.

Cada uno de los Kits contenía una placa de 96 pocillos recubiertos con un anticuerpo primario específico para detectar PCR, PAI-1, VCAM-1 y ICAM-1 de rata. Se añadieron a cada placa los estándares y las muestras de plasma junto con un anticuerpo conjugado de biotina específico para cada uno de los biomarcadores de rata. Seguidamente se añadió a cada pocillo enzima avidina-HRP y se incubaron las placas a una temperatura de 37 °C. Después se añadió una solución de sustrato de TMB.

De esta manera sólo las muestras que contenían los biomarcadores en cada caso, mostraron un cambio de color.

La reacción enzima-sustrato finalizó con la adición de una solución de ácido sulfúrico y el cambio de color se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 450 nm en un lector de placas *Biotek Power Wave XS2*.

La concentración de cada uno de los biomarcadores se determinó comparando la densidad óptica de las muestras con una curva estándar.

Los resultados se expresaron en µg/ ml para PCR, PAI-1 y VCAM-1. La ICAM-1 en ng/ml.

7. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Las muestras de hígado, tejido adiposo y riñón fijadas en formol (Panreac ref. 141328.1211) diluido al 10 % se procesaron para el estudio histopatológico en el Servicio de Anatomía Patológica del Pius Hospital de Valls.

Se realizó inclusión en parafina de los tejidos.

En todos los casos se practicaron las oportunas secciones con el microtomo (Microm HN 355s). Estos cortes, de 3 micras de grosor, fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

El material se incluyó en su totalidad. El estudio se realizó valorando la totalidad de la extensión de la muestra al microscopio óptico digital (Leica DMD 108) por 3 observadores analizando diferentes variables categóricas. En los casos de discrepancia en los resultados entre observadores, se realizó una discusión posterior para concordar los datos.

La mayoría de resultados se han expresado en porcentaje de frecuencia de aparición de las diversas categorías en cada variable.

7.1 VALORACIÓN HÍGADO

En este órgano, según bibliografía (*Rector RS et al., 2010*), (*Zago V et al., 2010*), (*Qi NR et al., 2005*), se valoraron los siguientes parámetros:

- **Esteatosis:** definida como el depósito anormal de lípidos en más del 5% de los hepatocitos (hasta un 5% se considera un proceso fisiológico propio del envejecimiento) fue valorada como:

0% (ausencia).

<5%.

5%-33%.

>33-66%.

>66%.

- **Localización de la esteatosis:** una localización centrolobulillar en un 5% del tejido se considera normal, pero una localización distinta a ésta puede ser signo de un proceso patológico. Este parámetro se valoró como:

0: centrolobulillar (localización normal).

1: periportal (esteatosis alrededor del espacio porta).

2: azonal (esteatosis de localización errática).

- **Fibrosis:** consiste en la formación de tejido fibroso entre los espacios portas o a nivel sinusoidal como resultado de un proceso patológico subyacente. Fue valorada como:

0: no fibrosis.

1: perisinusoidal o periportal.

2: puentes fibrosis.

3: cirrosis.

- **Inflamación lobulillar:** consiste en una reacción del tejido ante cualquier noxa con la finalidad de neutralizar la agresión. Fue valorada como:

0: no inflamación.

1-: <2 focos.

2-: 2-4 focos.

3-: >4 focos.

- **Microgranulomas:** pequeños agregados de macrófagos. Se valoraron:

0: ausencia.

1: presencia.

- **Lipogranulomas:** nódulos de inflamación granulomatosa asociada con el material lipídico depositado en los tejidos. Se valoraron:

0: ausencia.

1: presencia.

- **Inflamación portal:** aparece como respuesta a cualquier agente agresivo. Se valoró:

0: ausencia.

1: presencia.

7.2 VALORACIÓN TEJIDO ADIPOSO

En el tejido adiposo se valoraron los siguientes parámetros (*Nov O et al., 2010*), (*Muñoz MC et al., 2009*):

- **Macrófagos:**

0: ausencia.

1: presencia.

- **Mastocitos:**

0: ausencia.

1: presencia.

- **Inflamación:**

0: ausencia.

1: leve.

2: moderada.

3: marcada.

- **Variabilidad en el tamaño de los adipocitos:**

0: ausencia.

1: presencia.

7.3 VALORACIÓN RIÑÓN

En los cortes histológicos de riñón se valoraron (*Ishii Y et al., 2010*), (*Dobrian AD et al., 2003*):

- **Glomeruloesclerosis:** proceso de origen diverso (por ejemplo: inflamatorio) caracterizado por la fibrosis del glomérulo y la consecuente pérdida de su actividad funcional. Se valoró:

0: ausencia.

1: presencia.

- **Atrofia:** se considera una degeneración tisular después de ciertas enfermedades o lesiones consistentes en una disminución del número de componentes normales del tejido. Fue valorada como:

0: ausencia.

1: leve.

2: moderada.

3: marcada.

- **Inflamación** valorada como:

0: ausencia.

1: leve.

2: moderada.

3: marcada.

- **Tiroidización:** proceso por el cual un tejido adopta un aspecto parecido al de la glándula tiroide debido a la fase final de una atrofia importante. Consiste en una dilatación tubular marcada con secreción densa intratubular. Fue valorada como:

0: ausencia.

1: leve.

2: moderada.

3: marcada.

- **Depósitos lipídicos** valorados como:

0: ausencia.

1: presencia.

- **Fibrosis** valorada como:

0: ausencia.

1: presencia.

8. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Los resultados se trataron estadísticamente con el programa SPSS v.17 (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows. Se hicieron los siguientes análisis:

- Descriptivos: tamaño muestral (n), valores máximos y mínimos, media de la población, desviación estándar e intervalo de confianza al 95 %.
- Prueba de Kolmogorov- Smirnov: se contrastó si cada una de las variables analizadas seguía una distribución normal. El nivel de significación utilizado fue $p < 0,05$.
- Prueba t para muestras independientes: para comparar las medias de los diferentes grupos. A partir de este método se observaron las diferencias

significativas entre *SHROB* y *Wistar* en cada uno de los tratamientos. El nivel de significación fue de $p < 0,05$.

- ANOVA de un factor (análisis de la varianza): para comparar medias de más de dos grupos. El nivel de significación fue de $p < 0,05$ y se aplicó el método *a posteriori* Scheffé para determinar la significación de todos los pares de grupos. De esta manera se comprobó si existían diferencias en cada una de las variables analizadas entre los 5 tratamientos administrados (EPA:DHA 1:1, EPA:DHA 2:1, EPA:DHA 1:2, soja y lino) en cada una de las cepas (*Wistar* y *SHROB*).
- En los parámetros no normales se han aplicado las técnicas no paramétricas correspondientes: U de Mann-Whitney para comparar dos grupos y Kruskal-Wallis cuando comparamos más de dos grupos. El nivel de significación también fue de $p < 0,05$.
- Para las variables categóricas (valoración histopatológica de los tejidos) se realizaron tablas de contingencia y se utilizó el estadístico chi cuadrado (χ^2). Nivel de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL SM

1.1 PESO CORPORAL

Antes del inicio del estudio, el peso de las ratas Wistar fue de 238 ± 14 gramos y el de las SHROB de 485 ± 39 gramos, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Al final del estudio los pesos fueron 260 ± 10 g y 596 ± 39 g respectivamente, también con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$). Las ratas Wistar durante los 3 meses de tratamiento aumentaron un 9% su peso, mientras las SHROB lo hacían en un 23%.

Para poder comparar ambos grupos, se ha calculado la variable "variación del peso" como la diferencia de peso después del tratamiento respecto al inicio. En la tabla 6 se muestran los valores de esta variable.

Tabla 6. Variación del peso corporal al final del estudio respecto al inicio (g)

TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	$11,86 \pm 7,58$	$120,43 \pm 25,16$	<0,001
EPA:DHA 2:1	$20,86 \pm 15,17$	$109,86 \pm 18,78$	<0,001
EPA:DHA 1:2	$25,50 \pm 9,91$	$112,29 \pm 20,48$	<0,001
SOJA	$26,33 \pm 6,92$	$115,67 \pm 24,67$	<0,001
LINO	$26,14 \pm 6,67$	$94,50 \pm 24,15$	0,001

Media \pm desviación estándar del aumento de peso en Wistar (W) y SHROB (S). pw-s: Diferencias significativas entre las dos cepas.

En la tabla 6, se muestra el aumento de peso de las dos cepas según la dieta administrada. Este aumento es mayor en todos los grupos de SHROB que en los grupos correspondientes de Wistar, con diferencias estadísticamente significativas.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas de peso debido a las dietas, ni en ratas Wistar ni en SHROB. La administración de AGPI n-3 a los animales no provocó cambios significativos ni en el aumento de peso ni en el porcentaje de grasa abdominal respecto al peso total del animal (resultados no mostrados).

La mayoría de estudios revisados por Li JJ *et al.* concluyen, igual que en nuestro caso, que EPA y DHA muestran poco efecto sobre el peso de los animales; pero, en algunos casos, existen evidencias claras de disminución de la masa grasa retroperitoneal y epididimal. Los mecanismos propuestos para lograr este efecto son diversos.

EPA y DHA inhiben algunas enzimas claves en la síntesis lipídica, como ácido graso sintetasa y algunas desaturasas, impiden la entrada en los adipocitos de los AG libres para realizar la lipogénesis, inducen la termogénesis en el tejido adiposo y ejercen efectos represivos sobre varios factores implicados en la diferenciación de los adipocitos (*Li et al., 2008*).

En el estudio de Sener *et al.* se demostró que la privación de ácido α -linolénico en la dieta, precursor del EPA y del DHA, aumentó la masa de tejido adiposo en ratas (*Sener et al., 2009*).

Cummings *et al.* observaron una disminución del peso corporal durante la administración de EPA o de una dieta rica en aceites de pescado. Los autores lo atribuyen, en parte, al aumento de la concentración de leptina circulante (*Cummings et al., 2010*).

1.2 PRESIÓN ARTERIAL

La cepa SHROB expresó hipertensión al inicio del estudio (es una característica del fenotipo de esta cepa) con valores medios de presión sistólica y diastólica de 176 y 144 mm de Hg respectivamente. Las medias en ratas Wistar fueron 120 y 95 respectivamente. Entre cepas existían diferencias estadísticamente significativas al inicio del estudio. Al final del tratamiento, las ratas SHROB presentaban unos valores medios de presión arterial sistólica y diastólica de 181 y 139 mm Hg respectivamente, y las ratas Wistar de 125 y 105, con diferencias estadísticamente significativas. Para poder comparar ambos grupos, se calculó la variable "variación de la presión arterial" como la diferencia de presión después del tratamiento respecto al inicio. En la tabla 7 se muestran los valores de esta variable.

Tabla 7. Variación de la presión arterial al final del estudio respecto al inicio (mm Hg)

Presión sistólica				Presión diastólica			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	11,4 ± 19,4	31,3 ± 81,3	0,54	EPA:DHA 1:1	-0,4 ± 23,3	5,0 ± 49,1	0,793
EPA:DHA 2:1	-8,4 ± 13,0	8,1 ± 20,1	0,092	EPA:DHA 2:1	24,1 ± 91,1	-2,9 ± 33,1	0,473
EPA:DHA 1:2	9,0 ± 12,8	-11,6 ± 54,1	0,384	EPA:DHA 1:2	7,1 ± 16,0	-19,7 ± 43,6	0,182
SOJA	-1,4 ± 15,8	7,3 ± 71,4	0,776	SOJA	14,5 ± 18,3	-5,2 ± 46,8	0,358
LINO	13,0 ± 8,7	-15,4 ± 50,1	0,225	LINO	-1,4 ± 17,5	-3,5 ± 55,5	0,928

Media ± desviación estándar de los valores de variación de presión sistólica y diastólica en Wistar (W) y SHROB (S). pw-s: Diferencias significativas entre las dos cepas.

Existe una gran variabilidad en este parámetro; por eso, aunque las diferencias en el cambio de presión arterial son grandes entre Wistar y SHROB, no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Los efectos de la dieta en la presión arterial no siguen un patrón homogéneo. Algunos tratamientos aumentaron la presión arterial en una cepa y la disminuyeron en otra; o bien aumentaron la sistólica y disminuyeron la diastólica o viceversa. Únicamente las dietas EPA:DHA 1:2 y lino disminuyeron ambas presiones en la cepa SHROB.

Al comparar los distintos grupos de tratamiento, tampoco observamos diferencias estadísticamente significativas ni en la presión sistólica ni en la diastólica.

Los efectos beneficiosos de los AGPI n-3 sobre la presión arterial, en especial el EPA y el DHA, están ampliamente descritos (*Abeywardena et al., 2011*) y algunos de estos beneficios se concretan más en el DHA (*Cottin et al., 2011; Mori et al., 2006*). Los datos actuales en estudios en humanos sugieren que la ingesta de una dieta adecuada de AGPI n-3 podría reducir ligeramente los niveles de presión sistólica y diastólica y prevenir el aumento de la presión arterial ya sea en pacientes dislipémicos, diabéticos, pacientes normotensos o hipertensos; contribuyendo así a su efecto cardioprotector (*Borghetti et al., 2006; Cicero et al., 2010*).

En animales, se ha descrito la existencia de una relación directa entre una dieta deficiente en AGPI n-3 y la aparición de hipertensión en ratas hembras jóvenes (*Begg et al., 2009*).

A pesar de las evidencias bibliográficas sobre el efecto hipotensor de los AGPI n-3, la gran variabilidad en los valores de nuestro estudio provoca que no se observen diferencias significativas ni entre tratamientos, ni entre las dos cepas.

Esta gran variabilidad quizás pueda ser debida a que la toma de la presión arterial en ratas es un proceso lento. En nuestro caso, ha sido particularmente laborioso debido al gran número de animales que debían ser sometidos semanalmente a este proceso.

Además, las mediciones fueron llevadas a cabo por dos investigadores distintos y con las ratas conscientes. Quizás los tiempos de adaptación de los animales a la jaula de medición deberían haber sido mayores para conseguir un menor nivel de estrés en los animales.

1.3 GLUCOSA

Tabla 8. Glucosa (mg/dl)

TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	58 ± 4,55	62,29 ± 2,50	0,049
EPA:DHA 2:1	55,14 ± 5,49	60,14 ± 3,93	0,074
EPA:DHA 1:2	58,33 ± 6,09	60,57 ± 3,82	0,437
SOJA	62,67 ± 3,67	61 ± 5,44	0,548
LINO	57,86 ± 4,77	62,67 ± 4,96	0,103

Media ± desviación estándar de los valores de glucosa en Wistar (W) y SHROB (S). pw-s: Diferencias significativas entre las dos cepas.

Los valores de glucosa plasmática al final del estudio (tabla 8) están dentro del rango de la normalidad (<150mg/dl), y se corresponden a los encontrados en otros estudios y en manuales sobre biología y manejo de animales de experimentación (Ribau et al., 2000; Hassanali et al., 2010; Salvador, 2001). La cepa SHROB no presenta niveles más altos de glucosa que la Wistar, y de hecho, la hiperglucemia no es un fenotipo característico de esta cepa. No observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glucosa plasmática por efecto de la dieta, ni en Wistar ni en SHROB. Sólo se observó un nivel ligeramente mayor de glucosa en las ratas SHROB alimentadas con la dieta EPA:DHA 1:1 respecto a las Wistar alimentadas con la misma dieta.

1.4 INSULINA

Tabla 9. Insulina (ng/ml)

TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	2,21 ± 0,90	12,17 ± 5,24	0,002
EPA:DHA 2:1	1,38 ± 0,66	9,76 ± 2,39	<0,001
EPA:DHA 1:2	1,19 ± 0,40	6,81 ± 2,14*^	<0,001
SOJA	1,99 ± 1,07	5,8 ± 2,53*^	0,012
LINO	0,93 ± 0,39	6,17 ± 1,63*^	<0,001

Media ± desviación estándar de los valores de insulina en Wistar (W) y SHROB (S). pw-s: Diferencias significativas existentes entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1; ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1.

Los valores de insulina al final del estudio (tabla 9) fueron más altos en SHROB que en Wistar, con diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos de

tratamiento. Los valores hallados en las ratas Wistar entran dentro del rango de normalidad ($<4,4$ ng/ml) descrito en otros estudios (*Hassanali et al., 2010; Shah et al., 2009*); pero, como se observa en la tabla 9, todos los grupos de SHROB presentaron hiperinsulinemia.

En las ratas Wistar no existieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos; mientras que en las SHROB, los grupos alimentados con EPA:DHA en las proporciones 1:1 y 2:1 mostraron valores de insulina significativamente más altos que el resto de los grupos.

1.5 ÍNDICE HOMA

Tabla 10. Índice HOMA

TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	7,0 ± 3,0	41,4 ± 17,4	0,002
EPA:DHA 2:1	4,1 ± 1,8	32,1 ± 8,1	<0,001
EPA:DHA 1:2	3,8 ± 1,5	22,4 ± 6,2*^	<0,001
SOJA	6,9 ± 3,8	19,2 ± 8,1*^	0,012
LINO	2,9 ± 1,1* ^a	21,3 ± 6,3^	0,001

Media ± desviación estándar de los valores del índice HOMA en Wistar y SHROB. pw-s: Diferencias significativas existentes entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1. ^a: Diferencias significativas respecto al tratamiento a base de soja.

Según la bibliografía consultada, el rango de los valores normales del índice HOMA en ratas Wistar es de 4-14 (*Ferreira L et al., 2010; Shah KB et al., 2009*).

En nuestro estudio, las ratas Wistar presentaron valores de HOMA dentro de la normalidad después de los distintos tratamientos (tabla 10), con diferencias estadísticamente significativas entre el grupo del lino y los grupos EPA:DHA 1:1 y soja.

Todos los grupos de ratas SHROB presentaron RI con valores de HOMA de 3 a 8 veces superiores a los correspondientes en Wistar (tabla 10).

En las ratas SHROB se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos EPA:DHA 1:2, soja y lino (valores más bajos) y los grupos EPA:DHA 1:1 y 2:1 (valores más altos).

Actualmente los datos sobre la actuación de los AGPI n-3 en la homeostasis de la glucosa y la RI en humanos y en animales son contradictorios tal y como se relata a continuación (*Zhou et al., 2009; Fedor y Kelley, 2009*).

Algunos estudios demostraron que la ingesta de DHA y/o EPA disminuía los niveles de glucosa sérica y mejoraba la sensibilidad a la insulina en ratas Wistar (*Andersen, 2008*), en modelos murinos de SM y diabetes tipo 2 (*Sener et al., 2009; Jucker et al., 1999*) y en humanos (*Delarue et al., 1996; Ebbesson et al., 2007; Fedor y Kelley, 2009*). En otros trabajos, no se observaron diferencias en los niveles de glucosa e insulina después del tratamiento (*Park y Park, 2009; Egert et al., 2008; Mori et al., 1999; Fasching et al., 1991; Cummings et al., 2010*). Y finalmente, en humanos la ingesta de 3g/día de EPA/DHA durante 3 meses mostró un efecto negativo, ya que los valores de glucosa e insulina en pacientes con SM fueron más altos después del tratamiento que al inicio (*Simao et al., 2010*).

Las discrepancias entre los resultados de estos estudios pueden ser debidas a la diferente metodología empleada en los diversos estudios ya que los participantes tenían diferente estado de salud, las dietas basales utilizadas eran diversas, así como la cantidad, duración, composición de los AGPI n-3 también era diverso.

De todas formas y respecto a los niveles de glucosa, la mayoría de ensayos concluyen que la ingesta de cantidades moderadas de AGPI n-3 no modifica los niveles de este parámetro en pacientes con diabetes tipo 2 (*Fedor y Keller, 2009*).

Una posible explicación a este hecho podría ser que el mayor aporte de AG provoca también mayor oxidación de los mismos y, en consecuencia, un aumento en la producción hepática de glucosa y una disminución de su oxidación, que daría lugar a un incremento en la concentración plasmática (*Cummings et al., 2010*).

Holness también describió que la inhibición de la producción de glucosa mediada por insulina se ve afectada por una dieta suplementada con EPA y DHA siendo el resultado final un aumento de la glucosa (*Holness et al., 2003*).

En nuestro estudio, tanto para el modelo de rata Wistar como para el modelo SHROB, tampoco se observó una mejora en el control glucémico.

Si nos fijamos en los valores de insulina y del Índice HOMA, las dietas que mostraron los valores más bajos en ratas SHROB, fueron las de lino, soja y EPA:DHA 1:2 a diferencia de las dietas de EPA:DHA 1:1 y 2:1 demostrando de esta forma una mayor participación del DHA que del EPA en la mejora de la RI en ratas obesas.

1.6 HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c)

Tabla 11. Hemoglobina glicosilada (%)

Hemoglobina glicosilada			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	4,14 ± 0,24	4,19 ± 0,24	0,696
EPA:DHA 2:1	4,43 ± 0,72	4,54 ± 0,30	0,741
EPA:DHA 1:2	4,17 ± 0,30	4,96 ± 1,68	0,283
SOJA	6,39 ± 0,99*^#	6,76 ± 1,01*^	0,537
LINO	6,34 ± 1,84*#	3,85 ± 1,11 ^a	0,015

Media ± desviación estándar de los valores porcentuales de hemoglobina glicosilada. pw-s: Diferencias entre Wistar y SHROB. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1, ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1, #: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:2. ^a: Diferencias significativas respecto al tratamiento de soja.

El porcentaje de HbA1c al final del estudio está dentro del rango de la normalidad (4-6%) (tabla 11), y se corresponde a los encontrados en otros estudios (*El-Seweidy et al., 2011; Cummings et al., 2010*). Recordemos que los valores de glucemia tampoco estaban aumentados en ningún grupo.

Para la HbA1c se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB únicamente en el tratamiento a base de lino siendo superior el % de HbA1c en las ratas Wistar. Este hecho indica un efecto protector del lino en el daño a proteínas en ratas obesas.

En la valoración de las diferencias entre grupos de tratamiento, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en las dos cepas.

En Wistar, el porcentaje de HbA1c fue menor en los tres tratamientos a base de AGPI n-3 de origen marino respecto a los tratamientos a base de soja y de lino. En SHROB, los tratamientos EPA:DHA 1:1 y EPA:DHA 2:1 también proporcionaron valores menores de HbA1c que el tratamiento a base de soja.

La HbA1c se forma por la unión de la hemoglobina a la glucosa en un proceso no enzimático irreversible, dependiente de las concentraciones crónicas de glucosa y permite evaluar el grado de control glucémico.

Como ya se mencionó en la discusión sobre los valores de glucosa e insulina, en algunos estudios se demuestra que la ingesta de DHA y/o EPA disminuye los niveles de glucosa sérica y mejora la sensibilidad a la insulina en ratas Wistar (*Andersen, 2008*). En nuestro caso, aunque la glucemia no estaba alterada, los grupos de tratamiento a base de aceite de pescado obtenían los valores menores de HbA1c sobretodo respecto al tratamiento con soja en ambas cepas de ratas; proporcionando un efecto protector de estos aceites a la glicación proteica.

2. SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS EN ERITROCITOS

Tabla 12. Actividad enzimática eritrocitaria

SOD (U/g Hb)				Gpx (U/g Hb)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	2129 ± 587	1605 ± 313	0,059	EPA:DHA 1:1	107,07 ± 14,97	87,12 ± 5,77	0,011
EPA:DHA 2:1	1881 ± 341	1486 ± 685	0,197	EPA:DHA 2:1	116,66 ± 30,71	106,79 ± 14,98	0,471
EPA:DHA 1:2	1226 ± 517*	1454 ± 431	0,403	EPA:DHA 1:2	67,67 ± 34,49*^	48,6 ± 14,44	0,207
SOJA	1444 ± 426	768 ± 593	0,047	SOJA	101,49 ± 38,19	51,46 ± 27,44	0,044
LINO	1231 ± 284*	1501 ± 345	0,149	LINO	71,09 ± 9,58*^	54,94 ± 3,97	0,003

CAT (mmol/min/g Hb)				GR (U/g Hb)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	57,42 ± 11,06	71,83 ± 23,3	0,165	EPA:DHA 1:1	0,4 ± 0,08	0,76 ± 0,29	0,011
EPA:DHA 2:1	76,73 ± 28,25	114,56 ± 24,4*	0,02	EPA:DHA 2:1	0,74 ± 0,21	1,02 ± 0,48	0,195
EPA:DHA 1:2	61,44 ± 13,19	70,54 ± 23,42^	0,418	EPA:DHA 1:2	0,63 ± 0,35	0,97 ± 0,17	0,068
SOJA	41,55 ± 34,62	51,93 ± 10,78^	0,499	SOJA	0,93 ± 0,18	0,86 ± 0,27	0,624
LINO	37,18 ± 20,93	88,35 ± 5,51	<0.001	LINO	0,75 ± 0,2	1,15 ± 0,39	0,035

Media ± desviación estándar de los valores de actividad enzimática eritrocitaria en Wistar y SHROB. pw-s: Diferencias significativas existentes entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1.

La actividad de la SOD (tabla 12) fue diferente entre Wistar y SHROB únicamente en el tratamiento a base de soja, disminuyendo significativamente a la mitad en las ratas SHROB respecto a las Wistar.

Cuando se analizó la actividad de la Gpx (tabla 12) se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB pertenecientes a los grupos de tratamiento EPA:DHA 1:1 y soja. En los dos tratamientos la actividad de la Gpx fue mayor en Wistar.

El análisis de las diferencias entre Wistar y SHROB en el caso de la enzima CAT (tabla 12) mostró significación en el grupo EPA:DHA 2:1 y lino. En ambos casos la actividad enzimática fue mayor en las ratas SHROB respecto a las Wistar.

Los valores de actividad GR (tabla 12) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en los tratamientos EPA:DHA 1:1 y lino, siendo la actividad GR más elevada en SHROB en ambos tratamientos.

Si analizamos el efecto tratamiento, observamos que las actividades de la SOD y de la Gpx presentaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos únicamente en ratas Wistar. Las ratas que consumieron el tratamiento EPA:DHA 1:1 obtuvieron valores de actividad SOD y Gpx significativamente superiores a las ratas que consumieron el tratamiento EPA:DHA 1:2 y el tratamiento de lino. Este efecto también se observó para la dieta EPA:DHA 2:1 en el caso de la Gpx.

Por el contrario, el tratamiento afectó a los valores de la CAT sólo en las ratas SHROB. El tratamiento EPA:DHA 2:1 aumentó la actividad CAT con diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos que consumieron EPA:DHA 1:1, 1:2 y soja.

Las distintas dietas no afectaron a la GR ni en Wistar ni en SHROB.

Las enzimas antioxidantes eritrocitarias se ven afectadas en cierta medida por la administración de los diferentes tratamientos, preferentemente las enzimas de la primera línea defensiva, SOD y Gpx, en ratas Wistar.

Los tratamientos con mayor proporción de EPA (1:1 y 2:1) aumentaron la actividad de SOD y Gpx en ratas Wistar, pero no modificaron la actividad enzimática en ratas SHROB.

Las enzimas de segunda línea, CAT y GR, no se vieron afectadas por la dieta en ratas Wistar y sólo el tratamiento con mayor proporción de EPA (EPA:DHA 2:1) aumentó la actividad de la CAT en ratas SHROB.

Estos datos podrían indicar un beneficio mayor de los tratamientos a base de AGPI n-3 de origen marino en animales normales (Wistar) que en animales con SM (SHROB). Es decir, el efecto sobre el EO sería más preventivo que reparador.

Posiblemente las ratas SHROB muestran alteraciones metabólicas demasiado importantes como para presentar mejorías en la actividad de enzimas antioxidantes con la dieta.

Aunque el papel de los AGPI n-3 de origen marino en la reducción del EO y la recuperación de la homeostasis de los radicales libres en el organismo no está del todo claro, algunos estudios sugieren que el EPA y el DHA podrían reducir el daño oxidativo en humanos y animales, pero los resultados hasta el momento no son concluyentes (*Poudyal et al., 2011; McNulty et al., 2011*).

Así, por ejemplo, las enzimas antioxidantes no se afectaron después de la ingesta aguda de 400 y 200 mg de EPA y DHA en pacientes obesos (*Bloomer et al., 2009*), ni tampoco después de la ingesta de más de 2 gramos/día de ambos AGPI durante seis meses en atletas (*Hanwell et al., 2009*). En cambio, pacientes sometidos a hemodiálisis y suplementados con 3 g/día de EPA+DHA durante dos meses, incrementaron sus niveles de SOD y Gpx.

Los estudios en animales presentan también resultados diversos. En ratas Wistar y en un modelo de rata con nefrotoxicidad inducida, la actividad CAT eritrocitaria se incrementó después de la suplementación con aceites de pescado, pero ni SOD ni Gpx sufrieron ninguna modificación (*Iraz et al., 2005; Priyamvada et al., 2009*).

Aunque existen pocos datos para determinar los mecanismos antioxidantes subyacentes de los AGPI n-3, se sugiere que probablemente sean como consecuencia de una reducción de la síntesis del AA. El AA es el componente principal en la activación de NADPH oxidasa (*Vignais, 2002*). Además, se postula que la incorporación de AGPI en los fosfolípidos de las membranas celulares conduce a

cambios conformacionales que disminuyen la disponibilidad de los dobles enlaces para la lipoperoxidación (*Kremmyda et al., 2011*).

3. INDICADORES DEL ESTADO OXIDATIVO EN PLASMA

3.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (ORAC)

En este estudio se determinó la capacidad antioxidante del plasma para inhibir la producción de radicales peroxilo mediante el método ORAC, en los diferentes animales.

En la tabla 13 se muestran los resultados del ORAC.

Tabla 13. ORAC ($\mu\text{mol TE/ml plasma}$)

TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	48,15 \pm 16,96	35,34 \pm 4,75	0,078
EPA:DHA 2:1	23,56 \pm 5,97*	24,27 \pm 13,79	0,902
EPA:DHA 1:2	26,39 \pm 9,01*	32,4 \pm 4,87	0,181
SOJA	30,32 \pm 9,64*	44,77 \pm 8,57	0,021
LINO	24,71 \pm 9,7*	37,27 \pm 6	0,019

Capacidad antioxidante total en plasma (método ORAC) en ratas Wistar y SHROB en cada uno de los tratamientos. pw-s: Diferencias significativas existentes entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1.

En la comparación entre cepas, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ratas Wistar y SHROB pertenecientes a los grupos de tratamiento a base de soja y lino, siendo superior en ambos casos la capacidad antioxidante en ratas SHROB.

Entre grupos de tratamiento sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en ratas Wistar. Las que consumieron el tratamiento EPA:DHA 1:1 presentaron una media de capacidad antioxidante total en plasma significativamente superior al resto de grupos.

En ratas Wistar el tratamiento EPA:DHA 1:1 aumentó la capacidad antioxidante total del plasma (ORAC). Este resultado se podría explicar a través de los niveles de SOD que también eran más altos en las ratas que consumieron el mismo tratamiento respecto a los otros grupos.

En cambio, en ratas SHROB, los niveles de ORAC tienden a ser más elevados en los animales que consumieron los tratamientos a base de soja y lino. Esto podría

demostrar que la soja y el lino aportan ciertos efectos antioxidantes con más eficacia en animales con SM (ratas SHROB) que en animales sanos (ratas Wistar).

Hay pocos estudios que determinen la implicación de un tratamiento rico en AGPI n-3 en la capacidad antioxidante total del plasma determinada a partir del método ORAC. Por ejemplo, *Yessoufou et al.* publicaron un estudio en 2006 donde demostraron que una dieta con un 2,1% de AGPI n-3 (EPA:DHA 5,8:1) durante 15 días corregía los niveles disminuidos de ORAC en plasma de ratas diabéticas. Concluyeron que podría ser debido a una mejora en el total de enzimas antioxidantes eritrocitarias SOD y Gpx y al aumento de los niveles plasmáticos de vitamina A (*Yessoufou et al., 2006*).

En humanos, la suplementación diaria con 1,2 g de EPA y 0,83 g de DHA en 4 g de aceite de pescado durante 3 semanas no modificó los valores de ORAC en plasma (*Roberts et al., 2003*).

3.2 LDL-ox

En la tabla 14 se presentan los resultados correspondientes a la concentración de LDL-ox.

Tabla 14. LDL-ox (ng/ml)

TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	161,53 ± 30,87	279,32 ± 38,58	<0,001
EPA:DHA 2:1	212,25 ± 57,44	343,41 ± 48,73	0,001
EPA:DHA 1:2	239,43 ± 70,02	292,05 ± 80,85	0,24
SOJA	109,03 ± 27,34 [^] #	154,59 ± 57,37* [^] #	0,11
LINO	94,52 ± 14,08 [^] #	145,35 ± 27,77* [^] #	0,001

Concentraciones de LDL-ox en Wistar y SHROB en cada uno de los tratamientos. pw-s: Indica diferencias significativas entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1. #: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:2.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en los tratamientos EPA:DHA 1:1, EPA:DHA 2:1 y lino. En los tres casos, la concentración de LDL-ox, fue significativamente superior en las ratas SHROB.

Entre tratamientos se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto en las ratas Wistar como en las SHROB.

En Wistar se obtuvieron valores de LDL-ox significativamente superiores en los tratamientos EPA:DHA 2:1 y EPA:DHA 1:2 respecto a los tratamientos a base de soja y lino.

En SHROB, los tratamientos a base de AGPI n-3 de origen marino presentaron valores de LDL-ox significativamente superiores respecto a los tratamientos a base de soja y lino.

La oxidación de las LDL es un proceso de peroxidación lipídica durante el cual, los AGPI de los fosfolípidos de las lipoproteínas son atacados por radicales libres. La oxidación de las LDL incrementa su aterogenicidad, de manera que este parámetro es uno de los principales predictores de riesgo cardiovascular. La susceptibilidad de las LDL a la peroxidación puede depender de su contenido en AGPI, sustratos disponibles para su oxidación, y de su contenido en antioxidantes que les confiere resistencia a la oxidación (*Mazière et al., 1998; Ferreri et al., 2009*). Como el contenido de AGPI en las LDL es un reflejo de la ingesta dietética, es lógico pensar que las dietas con alto contenido en EPA y DHA confieran valores más altos de LDL-ox. Además existen estudios en los que se demuestra que los aceites de pescado disminuyen significativamente la "lag fase" en la oxidación de las LDL (*Tsai y Lu, 1997; Suzukawa et al., 1995*).

Sin embargo, otros estudios están en desacuerdo con estos resultados y tampoco está claro si los dos AG mayoritarios en los aceites de pescado, EPA y DHA, ejercen el mismo efecto. DHA parece no incrementar la susceptibilidad a la oxidación de las LDL en el mismo grado que EPA (*Mesa et al., 2004*).

Por otra parte, diversos estudios confirman que el consumo moderado de aceites de pescado tiene efectos beneficiosos protegiendo contra enfermedades cardiovasculares a través de mecanismos diversos (*Burr et al., 1989; Schmidt et al., 1993; Levine et al., 1989; Singer et al., 1985; Green et al., 1990; Kinsella et al., 1990*). Uno de estos mecanismos es la disminución de la apoptosis, inducida por las LDL-oxs, de diversos grupos celulares como células musculares, fibroblastos, linfocitos, monocitos y macrófagos, que constituyen la placa de ateroma (*Lee y Wander, 2005*).

En nuestro estudio, aunque la oxidación de las LDL fue mayor en los grupos tratados con EPA y DHA, en Wistar la dieta 1:1 no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a soja y lino. Este hecho podría indicar que la proporción EPA:DHA 1:1 minimiza el riesgo a la oxidación de las LDL en animales sanos.

4. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

En las tablas 15, 16 y 17 se presentan los resultados correspondientes al análisis del perfil lipídico.

Tabla 15. Perfil lipídico (mg/dl)

Triglicéridos				HDL- colesterol			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	86,3 ± 65,1	569,6 ± 200,3	<0,001	EPA:DHA 1:1	37,4 ± 11,1	72,4 ± 13,6	<0,001
EPA:DHA 2:1	124,5 ± 102,2	591,2 ± 160,4	<0,001	EPA:DHA 2:1	50,4 ± 25,9	58,8 ± 7,7	0,426
EPA:DHA 1:2	83,1 ± 10,4	987,9 ± 505,2	0,003	EPA:DHA 1:2	47,3 ± 8,1	67,7 ± 12,8	0,011
SOJA	108,5 ± 51,9	1225,8 ± 947,8	0,028	SOJA	51,3 ± 7,9	76,7 ± 14,5	0,009
LINO	73,5 ± 25,2	595,4 ± 306,9	0,003	LINO	46,8 ± 5,5	54,3 ± 12,7	0,222

Colesterol				LDL- colesterol			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	93,3 ± 26,4	187,4 ± 33,1	<0,001	EPA:DHA 1:1	7,6 ± 3,3	16,4 ± 5,7	0,005
EPA:DHA 2:1	98 ± 14,8	169,1 ± 29,6	<0,001	EPA:DHA 2:1	7,4 ± 0,8	14,6 ± 3,9	0,001
EPA:DHA 1:2	112,3 ± 20,8	166,4 ± 31,6	0,01	EPA:DHA 1:2	8,3 ± 1,3	34,2 ± 29,7	0,061
SOJA	125,8 ± 16,5	322 ± 122,9	0,007	SOJA	10,4 ± 2,2	91,8 ± 61,5*^	0,042
LINO	118,5 ± 13,5	183,7 ± 23,8	0,001	LINO	7,4 ± 1,6	12,5 ± 7 ^a	0,118

Media ± desviación estándar de los valores de triglicéridos, colesterol, HDL-c y LDL-c. pw-s: Diferencias entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1, ^: diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1, ^a: diferencias significativas respecto al tratamiento con soja.

Estos cuatro parámetros mostraron valores dentro de la normalidad (triglicéridos: 70-80 mg/dl, Colesterol: 60-100 mg/dl, HDL-c: 30-52 mg/dl, LDL-c: < 20 mg/dl) en el grupo de las ratas Wistar similares a los descritos en otros trabajos (*Rusiñol et al., 1996; Levy et al., 2007; Engström et al., 2010; Shah et al., 2009*).

Se observaron diferencias significativas en los niveles de triglicéridos y colesterol entre Wistar y SHROB en todos los grupos de tratamiento, siendo mayores en las ratas SHROB.

También las ratas SHROB presentaron valores más altos de HDL-c y LDL-c con diferencias estadísticamente significativas en prácticamente todos los grupos excepto el tratado con lino.

Las distintas dietas sólo afectaron al LDL-c de las ratas SHROB, en las que la dieta con soja aumentó este parámetro respecto al resto.

Tabla 16. Concentraciones APO A1 y APO B100 (mg/ml)

APO A1				APO B100			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	42,96 ± 11,36	57,59 ± 13,62	0,079	EPA:DHA 1:1	116,51 ± 16,77	196,6 ± 26,9	<0,001
EPA:DHA 2:1	51,7 ± 11,94	60,17 ± 8,81	0,17	EPA:DHA 2:1	137 ± 6,39	210,88 ± 33,78	<0,001
EPA:DHA 1:2	47,92 ± 13,79	64,13 ± 11,77	0,1	EPA:DHA 1:2	139,35 ± 23,84	202,82 ± 20,05	0,07
SOJA	51,42 ± 13,33	68,3 ± 4,98	0,02	SOJA	126,82 ± 13,99	205,42 ± 49,5	0,016
LINO	30,64 ± 2,06	56,81 ± 6,23	<0,001	LINO	152,73 ± 35,65* ^{#a}	282,54 ± 45,13	<0,001

Media ± desviación estándar de los valores de APO A1 y APO B100. pw-s: Diferencias entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1, #: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:2, ^a: Diferencias significativas respecto al tratamiento a base de soja.

Tabla 17. Ratio APO B100/APO A1

APO B100/APO A1			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	2,79 ± 0,51	3,62 ± 1,14	0,16
EPA:DHA 2:1	2,75 ± 0,54	3,55 ± 0,7	0,04
EPA:DHA 1:2	3,1 ± 1,01	3,28 ± 0,77	0,74
SOJA	2,67 ± 1,11	3,04 ± 0,82	0,56
LINO	5,02 ± 1,29* ^{^a}	5,2 ± 1,41 ^a	0,85

Media ± desviación estándar de los valores de APO B100/APO A1. pw-s: Diferencias existentes entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1, [^]: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1, ^a: Diferencias significativas respecto al tratamiento a base de soja.

La APO A1 aumentó significativamente en SHROB respecto a Wistar en los grupos de tratamiento a base de soja y lino. En el análisis de la APO B100 se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en los grupos de tratamiento EPA:DHA 1:1, EPA:DHA 2:1, soja y lino. En los cuatro casos las SHROB presentaron valores más altos.

En la ratio APO B100/APO A1 sólo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en el grupo de tratamiento EPA:DHA 2:1 siendo mayor el valor de esta relación en ratas SHROB.

Si analizamos el efecto de las dietas, únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de APO B100 en ratas Wistar. La dieta con lino mostró valores más altos de APO B100 que los grupos de tratamiento EPA:DHA 1:1, EPA:DHA 1:2 y soja.

La dieta con lino también dio lugar a los valores más altos en la ratio APO B100/APO A1; con diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos de tratamiento EPA:DHA 1:1, EPA:DHA 2:1 y soja en ratas Wistar y respecto al grupo de la soja en ratas SHROB.

En resumen, ninguna dieta afectó los niveles de triglicéridos, colesterol, HDL-colesterol y APO A1. En cambio, las dietas con AGPI n-3 disminuyeron favorablemente los niveles de LDL-colesterol en ratas obesas y de APO B100 en ratas Wistar.

Existen numerosos estudios e investigaciones clínicas que se han centrado en el efecto positivo de los AGPI n-3 sobre la regulación de los niveles lipídicos en animales y humanos (*Poudyal et al., 2011; Cummings et al., 2010; Puglisi et al., 2009; Lombardo et al., 2006; Durrington et al., 2001; Connor, 2000; Spady et al., 1993*).

Durrington realizó un estudio en humanos donde a los pacientes con enfermedad coronaria e hipertrigliceridemia persistente tratados con simvastatina, se les administraba un concentrado a base de AGPI n-3 para comprobar si disminuían los triglicéridos. Obtuvieron un descenso significativo entre un 20 y un 30% en la concentración de triglicéridos y entre un 30 y 40% en la concentración de VLDL en comparación a los pacientes que sólo tomaron placebo más su tratamiento habitual de simvastatina. Concluyeron que el consumo de aceite de pescado podría aumentar la supervivencia en pacientes con infarto agudo de miocardio gracias a la hipolipidemia producida por los AGPI n-3 (*Durrington et al., 2001*).

Spady *et al.* comprobaron que tratamientos con EPA o DHA, administrados a ratas, aumentaban la actividad del receptor hepático para LDL-c, disminuyendo la entrada de LDL-c en plasma y en consecuencia provocando un descenso entre el 54-60% de sus niveles respecto a dietas con LNA y LA. Concluía su estudio afirmando que las dietas a base de EPA y DHA tenían un mayor efecto en la mejora del perfil lipídico que las dietas a base de LA (AGPI n-6) o LNA (precursor de EPA y DHA y muy abundante en el lino); ya que después de la ingesta de AGPI n-3 las concentraciones de estos AG aumentaban más de tres veces su presencia en los fosfolípidos de las membranas de los hepatocitos (*Spady et al., 1993*).

En la revisión de Connor también se afirmaba que dosis elevadas de AGPI n-3 reducían la síntesis de LDL-c y sus concentraciones en plasma, sin afectar el HDL-c; mientras que dietas ricas en AGPI n-6 disminuían las concentraciones de HDL-c (*Connor, 2000*).

Cummings demostró que dietas a base de EPA o en general ricas en aceite de pescado, disminuían los triglicéridos en animales diabéticos y prediabéticos. Este efecto podría ser debido en parte a la activación llevada a cabo por EPA y DHA de los receptores PPAR que producen una secreción mayor de adiponectina por parte de los adipocitos. También se puede atribuir a la disminución de la lipogénesis *de novo* llevada a cabo por la inhibición SREB-1 (proteína de unión al elemento regulador de los esteroides) y a un aumento de la oxidación de AG en hígado y músculo debida a la activación de PPAR- α (*Cummings et al., 2010*).

Poudyal, en su revisión, analiza varios estudios, concluyendo que el LNA modula la concentración de lipoproteínas y en cambio el EPA y el DHA reducen la síntesis de triacilglicéridos (TAG). La suplementación de 38-40 gramos de linaza al día (fibras de lino, ricas en α -linolénico) redujo los niveles de APO A, APO A1 y APO B100 en mujeres postmenopáusicas. Y 4 gramos al día de EPA + DHA, en pacientes con diabetes tipo II e hiperlipidemia, reducían significativamente los niveles de TAG, VLDL-colesterol y la ratio TAG/HDL-colesterol, mientras que aumentaba significativamente la concentración de HDL-colesterol en sangre (*Poudyal et al., 2011*).

Puglisi afirmó que el tejido adiposo está involucrado en los efectos beneficiosos de los AGPI n-3. Cuando el tejido adiposo es obeso, hay un exceso de AG libres en la circulación favoreciendo la lipólisis. Por lo tanto la velocidad de lipólisis en tejido adiposo será inversamente proporcional a la capacidad de almacenaje de triglicéridos del tejido adiposo. El aceite de pescado mejora esta capacidad gracias a la modulación de: Lipoproteína Lipasa (LPL), Hormona Sensitiva Lipasa (HSL) y Ácidos Grasos Sintasa (FAS). Las dos primeras se caracterizan por liberar AG del tejido adiposo, mientras la enzima FAS facilita el almacenaje de los AG convertidos en triglicéridos en el tejido adiposo. El mRNA de LPL y HSL disminuyó en tejido adiposo de ratas que consumieron una dieta rica en AGPI n-3 y aumentó la actividad de FAS (*Puglisi et al., 2009*).

5. BIOMARCADORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Los parámetros descritos en este apartado constituyen nuevos biomarcadores de riesgo cardiovascular en el caso que estén presentes en plasma o con valores superiores a los normales (tabla 21).

Tabla 18. Biomarcadores de riesgo cardiovascular

PCR (pg/ml)				VCAM-1 (µg/ml)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	147,03 ± 20,49	205,95 ± 42,07	0,006	EPA:DHA 1:1	3,41 ± 0,7	3,82 ± 0,38	0,204
EPA:DHA 2:1	147,15 ± 22,38	205,21 ± 42,44	0,008	EPA:DHA 2:1	3,01 ± 0,45	3,57 ± 1,11	0,24
EPA:DHA 1:2	140,06 ± 52,72	249,58 ± 51,65	0,005	EPA:DHA 1:2	4,4 ± 1,33 [^]	5,64 ± 1,88* [^]	0,206
SOJA	172,85 ± 38,16	285,91 ± 58,26	<0,001	SOJA	3,36 ± 1,69	2,67 ± 0,76* [#]	0,383
LINO	142,9 ± 52,02	202,11 ± 43,55	0,065	LINO	2,1 ± 0,38* ^{^#}	2,71 ± 1,17* [#]	0,22

PAI-1 (µg/ml)				ICAM-1 (ng/ml)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	7,48 ± 1,27	10,46 ± 2,03	0,007	EPA:DHA 1:1	0,59 ± 0,21	0,91 ± 0,16	0,008
EPA:DHA 2:1	8,75 ± 1,86	10,85 ± 1,39	0,034	EPA:DHA 2:1	0,61 ± 0,22	1,14 ± 0,33	0,004
EPA:DHA 1:2	9,18 ± 1,3	12,47 ± 3,23	0,04	EPA:DHA 1:2	0,53 ± 0,24	0,93 ± 0,14	0,006
SOJA	6,45 ± 0,81 [#]	11,57 ± 1,37	<0,001	SOJA	0,52 ± 0,09	0,96 ± 0,16	<0,001
LINO	7,76 ± 1,08	10,53 ± 2,5	0,032	LINO	0,59 ± 0,29	1,25 ± 0,33	0,002

Media ± desviación estándar de los valores de concentración en plasma de PCR, PAI-1, VCAM-1 e ICAM-1 en Wistar y SHROB. pw-s: Diferencias entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1, [^]: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1, [#]: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:2.

PCR, PAI-1 y ICAM-1 estaban aumentadas en ratas SHROB respecto a Wistar; en cambio VCAM-1 no presentó diferencias entre Wistar y SHROB.

Por otra parte, sólo VCAM-1 mostró diferencias estadísticamente significativas según las dietas. La dieta con los valores más bajos de VCAM-1 fue la de lino, tanto en ratas Wistar como en obesas, con diferencias estadísticamente significativas respecto a las dietas con AGPI n-3. Comparando entre sí las tres dietas n-3, se deduce que los mejores resultados para VCAM-1 se presentaron en las dietas 1:1 y 2:1 en las dos cepas.

Existen estudios en los que, igual que en nuestro caso, la PCR está aumentada en procesos relacionados con el SM; y que la ingesta de AGPI n-3 no modifica estos valores (Pischon *et al.*, 2010; Madsen *et al.*, 2003; Cummings *et al.*, 2010). En cambio, en otros estudios se asocia el consumo de AGPI n-3 a una disminución de los niveles de PCR (López-García *et al.*, 2004; Farzaneh-Far *et al.*, 2009; Kalogeropoulos *et al.*, 2010; Mugabo *et al.*, 2010).

Un estudio llevado a cabo por Ferrucci demostró que una suplementación con altos niveles de LNA y EPA se relaciona con una disminución de la inflamación pero no con una disminución de la concentración de PCR (*Ferrucci et al., 2006*).

Mugavo, en un trabajo sobre el ácido graso saturado palmitato y su efecto sobre la PCR, afirma que la diabetes, obesidad y otros estados de RI están asociados a un proceso de inflamación sistémica y por lo tanto a un aumento de biomarcadores de la inflamación como la PCR (*Mugabo et al., 2010*).

Estos resultados contradictorios sobre el efecto del EPA u otros aceites de pescado sobre los valores de PCR, sugieren que los efectos pueden depender de la condición metabólica individual y/o de las dosis administradas (*Cummings et al., 2010*).

Respecto a PAI-1, Montegaard afirma que individuos con SM presentan concentraciones elevadas de PAI-1 contribuyendo a un aumento del riesgo cardiovascular (*Montegaard et al., 2010*). En nuestro estudio también observamos cómo las ratas SHROB, tienen concentraciones superiores de PAI-1 en todos los grupos de tratamiento en comparación con las ratas Wistar.

Respecto al efecto del consumo de AGPI n-3 los resultados en diferentes estudios no son concluyentes; y, en muchos casos, son controvertidos. Por ejemplo, en algunos casos se concluye que los aceites de pescado tienen efectos negativos en las concentraciones y actividad de PAI-1 (*Emeis et al., 1989; Jellema et al., 2004*); mientras que en otros se demuestra lo contrario (*Hansen et al., 2000; Dunstan et al., 1999; Eritsland J et al., 1995*).

Jellema observó una mejora en la reducción del peso corporal de sujetos con obesidad moderada que fueron tratados con aceite de pescado; pero no observó una mejora de las concentraciones de marcadores de inflamación como PAI-1 (*Jellema et al., 2004*).

El estudio de Montegaard, en cambio, demostró un efecto positivo en las concentraciones de PAI-1, en sujetos con SM, después de una administración crónica de AGPI n-3 a dosis bajas; pero no después de una ingestión aguda a dosis superiores (*Montegaard et al., 2010*). Esto podría explicar, en parte, porque en

nuestro estudio las dietas a base de AGPI n-3 no presentan una mejora en la concentración de PAI-1 respecto las dietas control; ya que aunque la administración se realizó durante 3 meses, la dosis era una semanal.

Aunque en nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos en el caso de las concentraciones de ICAM-1, sí se observaron en las concentraciones de VCAM-1. En este último caso las dietas con una proporción mayor de EPA y las dietas de soja y lino tenían las concentraciones más bajas de VCAM-1.

Como se ha explicado en la introducción, la interacción de distintos grupos celulares y/o proteínas con las células endoteliales puede tener un papel crucial en la formación de la placa aterosclerótica. La adhesión de los monocitos circulantes a la monocapa íntima de células endoteliales se cree que es uno de los primeros acontecimientos en la aterosclerosis mediada por ICAM y VCAM. Por todo ello, la modulación de la adhesión de los monocitos al endotelio vascular puede representar una atractiva diana terapéutica para la aterosclerosis. Así, los AGPI n-3 tales como el EPA y el DHA pueden antagonizar el efecto proinflamatorio de algunos AG saturados (*Yamada et al., 2008*).

En el estudio de Yamada en humanos se observó una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas de sICAM-1 y sVCAM-1 en pacientes con SM después de una administración durante 3 meses de EPA altamente purificado (1,8g al día). Por lo tanto, este estudio proporcionó evidencias de que el EPA inhibe la adhesión de los monocitos a las células endoteliales en paralelo con la supresión de moléculas de adhesión endoteliales. En nuestro estudio, también encontramos VCAM con valores menores en las dietas con mayor proporción de EPA que en la dieta EPA:DHA 1:2 (*Yamada et al., 2008*).

En otro estudio se sugiere que una dieta rica en aceites de pescado podría alterar la expresión de moléculas de adhesión, como sICAM-1, disminuyendo la capacidad de los linfocitos para unirse a macrófagos y a células endoteliales. Los resultados de este estudio también sugieren que una reducción en la infiltración celular podría explicar el efecto protector contra el desarrollo de enfermedades inflamatorias y cardiovasculares de este tipo de dietas (*Sanderson y Calder, 1998*). Por el contrario,

en nuestro estudio, la concentración de sICAM-1 no se vió modificada por las dietas de AGPI n-3.

6. SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS EN TEJIDOS

En las tablas 19, 20 y 21 se presentan los resultados referentes a las enzimas antioxidantes en hígado, tejido adiposo y riñón respectivamente.

Tabla 19. Actividad enzimática en hígado

SOD (U/g Hb)				Gpx (U/g Hb)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	6,12 ± 2,41	9,83 ± 4,15	0,076	EPA:DHA 1:1	325 ± 115,3	329,1 ± 116,2	0,95
EPA:DHA 2:1	9,51 ± 1,96	8,55 ± 1,24	0,259	EPA:DHA 2:1	366,6 ± 124,4	229,5 ± 71,6	0,03
EPA:DHA 1:2	9,85 ± 1,66	10,73 ± 2,68	0,467	EPA:DHA 1:2	404,7 ± 65	282,3 ± 145,1	0,15
SOJA	8,74 ± 1,55	8,25 ± 1,23	0,588	SOJA	383,8 ± 98,2	245,4 ± 82,1	0,02
LINO	9,77 ± 2,51	10,3 ± 0,86	0,66	LINO	408 ± 75,3	274,8 ± 113	0,03

CAT (mmol/min/g Hb)				GR (U/g Hb)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	46,11 ± 18,38	78,19 ± 18,18	0,012	EPA:DHA 1:1	59,03 ± 17,96	62,25 ± 10,76	0,7
EPA:DHA 2:1	67,04 ± 30,80	73,92 ± 13,65	0,578	EPA:DHA 2:1	63,41 ± 20,74	56,16 ± 11,18	0,43
EPA:DHA 1:2	84,41 ± 18,15	74,81 ± 16,45	0,435	EPA:DHA 1:2	91,42 ± 24,33	73,03 ± 15,41	0,13
SOJA	81,13 ± 28,73	70,78 ± 25,80	0,508	SOJA	88,8 ± 22	66,71 ± 8,23	0,04
LINO	97,51 ± 12,66*	77,01 ± 23,36	0,086	LINO	85,72 ± 11,79	68,16 ± 19,3	0,07

Media ± desviación estándar de las actividades enzimáticas en hígado. pw-s: indica diferencias significativas entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1.

En el hígado se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas en el análisis de la actividad enzimática de la Gpx en el tratamiento EPA:DHA 2:1, soja y lino. Siendo superior la actividad de esta enzima en ratas Wistar en los tres casos.

En el análisis de la actividad CAT se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en el tratamiento EPA:DHA 1:1, siendo significativamente superior la actividad CAT en ratas SHROB respecto Wistar.

En la comparación entre tratamientos sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el valor de actividad de la CAT entre los tratamientos EPA:DHA 1:1 y lino siendo superior la actividad en este último grupo.

Tabla 20. Actividad enzimática en tejido adiposo

SOD (U/g Hb)				Gpx (U/g Hb)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	10,8 ± 6,43	7,64 ± 3,44	0,284	EPA:DHA 1:1	39,04 ± 7,94	50,39 ± 21,29	0,288
EPA:DHA 2:1	8,16 ± 1,8	5,68 ± 0,78	0,017	EPA:DHA 2:1	27,74 ± 9,33	51,69 ± 12,63	0,004
EPA:DHA 1:2	5,62 ± 2,71	3,71 ± 1,45* [^]	0,16	EPA:DHA 1:2	19,27 ± 12,58	42,68 ± 9,71	0,011
SOJA	6,45 ± 3,68	4,21 ± 1,85*	0,212	SOJA	15,76 ± 10,51*	38,69 ± 6,89	0,001
LINO	4,97 ± 2,21	3,44 ± 1,21* [^]	0,193	LINO	29,91 ± 10,67	46,40 ± 12,61	0,027

CAT (mmol/min/g Hb)				GR (U/g Hb)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	34,85 ± 12,25	35,92 ± 9,44	0,858	EPA:DHA 1:1	41,06 ± 5,75	32,59 ± 16,11	0,249
EPA:DHA 2:1	38,51 ± 11,07	25,44 ± 17,13	0,125	EPA:DHA 2:1	39,64 ± 20,13	42,56 ± 18,52	0,792
EPA:DHA 1:2	29,37 ± 17,37	31,41 ± 16,81	0,84	EPA:DHA 1:2	26,94 ± 11,3	44,41 ± 15,9	0,053
SOJA	28,28 ± 6,68	27,81 ± 12,84	0,938	SOJA	28,28 ± 5,49	31,20 ± 19,38	0,735
LINO	48,90 ± 33,22	29,63 ± 14,11	0,22	LINO	43,39 ± 15,46	38,27 ± 12,56	0,53

Media ± desviación estándar de las actividades enzimáticas en tejido adiposo. pw-s: indica diferencias significativas entre las dos cepas. *: indica diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: indica diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1.

En el tejido adiposo, en el análisis de la SOD, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB que consumieron el tratamiento EPA:DHA 2:1, siendo superior la actividad enzimática en Wistar.

La actividad Gpx fue superior en SHROB que en Wistar en todos los tratamientos exceptuando el grupo EPA:DHA 1:1, aunque esta dieta en SHROB presentó valores de Gpx tan altos como el resto de tratamientos.

El tratamiento 1:1 dio lugar a valores significativamente más altos de Gpx que la dieta a base de soja en el tejido adiposo de ratas Wistar.

Los tratamientos 1:1 y 2:1 aumentaron significativamente la SOD en tejido adiposo de ratas SHROB respecto al resto de dietas.

Tabla 21. Actividad enzimática en riñón

SOD (U/g Hb)				Gpx (U/g Hb)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	5,89 ± 1,74	3,35 ± 0,5	0,03	EPA:DHA 1:1	73,60 ± 11,85	106,89 ± 27,28	0,01
EPA:DHA 2:1	5,54 ± 2,15	5,4 ± 2,74	0,92	EPA:DHA 2:1	90,32 ± 35,46	174,18 ± 58,38*	0,01
EPA:DHA 1:2	4,81 ± 2,60	1,54 ± 0,33*^	0,03	EPA:DHA 1:2	77,31 ± 31,16	70,49 ± 30,3*^	0,70
SOJA	2,79 ± 0,94*	2,15 ± 0,67*^	0,21	SOJA	48,03 ± 10,08^	57,22 ± 24,04*^	0,41
LINO	2,77 ± 0,83*^	1,77 ± 1,17*^	0,11	LINO	45 ± 11,31^	71,21 ± 19,93*^	0,01

CAT (mmol/min/g Hb)				GR (U/g Hb)			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	26,77 ± 7,32	39,39 ± 18,34	0,11	EPA:DHA 1:1	76,2 ± 16,16	71,5 ± 21,34	0,65
EPA:DHA 2:1	42,7 ± 15,78	65,3 ± 23,8*	0,05	EPA:DHA 2:1	83,76 ± 28,45	118,16 ± 49,46*	0,14
EPA:DHA 1:2	31,2 ± 12,03	24,56 ± 5,33^	0,21	EPA:DHA 1:2	58,27 ± 21,52	38,37 ± 15,07*^	0,08
SOJA	33,48 ± 20,5	24,14 ± 8,08*^	0,32	SOJA	41,64 ± 10,36*^	47,12 ± 31,05^	0,70
LINO	23,4 ± 9,04	28,71 ± 4,83^	0,27	LINO	29,76 ± 5,47*^	35,24 ± 7,95*^	0,01

Media ± desviación estándar de las actividades enzimáticas en riñón. pw-s: indica diferencias significativas entre las dos cepas. *: Indica diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Indica diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1.

En el riñón, la actividad SOD presentó diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en el tratamiento EPA:DHA 1:1 y EPA:DHA 1:2, siendo mayor en Wistar que en SHROB para los dos casos.

Los valores de actividad Gpx presentaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas en el tratamiento EPA:DHA 1:1, EPA:DHA 2:1 y en el tratamiento a base de lino. La actividad enzimática fue mayor en ratas SHROB que en Wistar en los tres casos.

En cuanto a los valores de GR, sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas en el tratamiento a base de lino. La actividad enzimática, igual que en el análisis de la Gpx, fue superior en ratas SHROB.

En el análisis entre los tratamientos, hemos constatado que el riñón ha sido el tejido donde se observaron más efectos sobre las enzimas antioxidantes provocados por el tratamiento. Las dietas 1:1 y 2:1 aumentaron los valores de las cuatro enzimas renales en ratas SHROB respecto a los otros tres grupos de tratamiento, y también aumentaron SOD, Gpx y GR en Wistar respecto a los grupos de soja y lino.

Resumiendo, el estudio de los enzimas antioxidantes en tejidos muestra poca relevancia en hígado y tejido adiposo. El impacto de las dietas ha sido nulo en hígado

y pequeño en tejido adiposo, donde únicamente hemos constatado que EPA:DHA 1:1 aumentó la actividad SOD en ratas con SM.

Otros estudios coinciden con nuestros resultados en hígado. Furukawa no observó diferencias estadísticamente significativas en los niveles de SOD, Gpx y CAT entre ratones genéticamente obesos (KKAy) y los controles (C57BL/6) así como tampoco entre la expresión del RNAm de estas enzimas (*Furukawa et al., 2004*).

Como los aceites de pescado son fácilmente peroxidados a hidroperóxidos que incrementan el EO, parece lógico pensar que algunos mecanismos de defensa, como las enzimas analizadas, podrían estar aumentados. En nuestro estudio no encontramos diferencias en hígado debidas a las dietas. En cambio Garrel *et al.* demostraron que EPA y DHA aumentan la lipoperoxidación, incrementando los valores de MDA en hígado de ratas y, al mismo tiempo, incrementaron la actividad SOD mitocondrial hepática como mecanismo compensatorio de respuesta a la peroxidación lipídica (*Garrel et al., 2012*). Además, en otro estudio, una dieta de aceite de pescado, rica en EPA y DHA, durante 6 meses en ratones, aumentó la expresión génica de enzimas antioxidantes, como SOD mitocondrial y glutatión S-transferasas (*Takahashi et al., 2002*).

Mientras que el efecto antioxidante de los AGPI n-3 está demostrado ampliamente en otros tipos celulares, no existen demasiados estudios realizados en tejido adiposo. EPA y DHA, procedentes de la dieta, se incorporan a las fracciones lipídicas de los adipocitos, tanto en fosfolípidos de las membranas como en los triglicéridos, y desde allí modulan procesos que alteran la actividad metabólica del tejido adiposo: reducen la lipólisis aumentando el almacenaje de triglicéridos, reducen la inflamación y aumentan la secreción de adipocinas que inducen cambios en los niveles plasmáticos de adiponectina y leptina. Esto se relaciona con un incremento de la sensibilidad a la insulina en adipocitos y un aumento en el consumo de glucosa (*Puglisi et al., 2011*).

En principio, el EO debería estar aumentado en animales con problemas metabólicos asociados a obesidad, diabetes o SM. El EO aumentado en el tejido graso es un importante mecanismo involucrado en la patogénesis del SM asociado a obesidad. Y además, el cúmulo de grasa correlaciona con el EO sistémico tanto en humanos como en roedores (*Furukawa et al., 2004*). En este mismo estudio, se comprobó que

SOD, Gpx y CAT estaban significativamente disminuidas en tejido adiposo de ratones KKAY (obesos genéticamente) respecto a sus controles, la cepa C57BL/6.

En otro estudio, una suplementación con EPA/DHA en ratones ateroscleróticos LDLR^{-/-}, se asoció a una reducción significativa de los niveles de EO en tejido adiposo. Esta conclusión se llevó a cabo mediante la valoración de la concentración de isoprostanos F₂ en el tejido y no con niveles de enzimas antioxidantes (*Saraswathi et al., 2007*).

En nuestro caso, no encontramos diferencias entre Wistar i SHROB ni en la actividad SOD, ni CAT ni GR. Sí observamos diferencias en Gpx, pero estaba aumentada en la cepa obesa. Por tanto, podríamos pensar que el no deterioro de los antioxidantes en SHROB puede ser debido al efecto dieta; todos los grupos consumieron algún tipo de AGPI que evitó el aumento del EO en tejido adiposo.

En el riñón, al contrario que en los otros dos tejidos analizados, si observamos diferencias estadísticamente significativas muy relevantes que guardan paralelismo con los resultados obtenidos para las enzimas antioxidantes eritrocitarias. Los tratamientos EPA:DHA 1:1 y 2:1 serían los más beneficiosos a nivel de aumento de la actividad enzimática antioxidante, tanto en ratas Wistar como en SHROB.

En otros estudios también se obtuvieron resultados indicativos de que el DHA y el EPA ejercen acciones antioxidantes en el riñón al reducir los niveles celulares de ERO, de mediadores pro-inflamatorios, de niveles de nitrito y al mantener altos los niveles de enzimas antioxidantes (*Kim y Chung, 2007*).

7. INDICADORES DEL ESTADO OXIDATIVO EN TEJIDOS

7.1 GLUTATIÓ N REDUCIDO (GSH) Y GLUTATIÓ N OXIDADO (GSSG)

En las tablas 22, 23, 24, 25, 26 y 27 se presentan los resultados correspondientes a los valores de GSH, GSSG y la ratio GSSG/GSH en hígado, tejido adiposo y riñón respectivamente.

Tabla 22. Glutati3n reducido y oxidado en h3gado (nmol/mg prot)

GSH				GSSG			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	40,01 ± 22,81	47,61 ± 12,62	0,46	EPA:DHA 1:1	47,61 ± 12,62	178,37 ± 57,3	0,01
EPA:DHA 2:1	22,14 ± 3,04	23,03 ± 6,98*	0,78	EPA:DHA 2:1	23,03 ± 6,98	106,83±16,24*	0,16
EPA:DHA 1:2	17,22 ± 12,27	30,78 ± 8,58*	0,04	EPA:DHA 1:2	30,78 ± 8,58	135,2 ± 34,3	0,63
SOJA	29,85 ± 6,84^#	61,22 ± 25,39^#	0,01	SOJA	61,22 ± 25,39	133,74 ± 32,05	0,26
LINO	54,7 ± 18,04^#a	56,08 ± 14,15^#	0,88	LINO	56,08 ± 14,15*^	157,23 ± 41,3	0,60

Media ± desviaci3n est3ndar de las concentraciones de glutati3n reducido (GSH) y glutati3n oxidado (GSSG) en h3gado. pw-s: indica diferencias significativas entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1. #: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:2. a: Diferencias significativas respecto al tratamiento con soja.

Tabla 23. Ratio GSSG/GSH en h3gado

GSSG/GSH			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	3,07 ± 1,73	3,83 ± 1,03	0,351
EPA:DHA 2:1	4,26 ± 1,04	4,93 ± 1,46	0,365
EPA:DHA 1:2	15,84 ± 1,89*	4,55 ± 1,28	0,163
SOJA	3,9 ± 1,3#	2,36 ± 0,61^#	0,034
LINO	2,89 ± 0,77^#	2,92 ± 0,85	0,959

Media ± desviaci3n est3ndar de la ratio GSSG/GSH en h3gado. pw-s: Diferencias significativas entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1. #: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:2.

En el h3gado se observaron diferencias estad3sticamente significativas en los niveles de GSH entre Wistar y SHROB en los grupos de tratamiento EPA:DHA 1:2 y soja, siendo superiores los niveles en ratas SHROB.

En el GSSG se observaron diferencias estad3sticamente significativas entre las dos cepas 3nicamente en las que consumieron el tratamiento EPA:DHA 1:1 y los valores fueron superiores significativamente en las ratas SHROB.

Respecto a la ratio GSSG/GSH se observaron diferencias estad3sticamente significativas entre Wistar y SHROB en el grupo a base de soja, siendo superior la ratio en ratas Wistar.

Al comparar tratamientos en ratas Wistar, observamos que el GSH fue superior en el grupo de lino respecto a los tratamientos enriquecidos con AGPI n-3 de origen marino y soja. 3nicamente la dieta EPA:DHA 1:1 no mostr3 valores de GSH significativamente menores que el lino. La soja y el lino aumentaron los valores de GSSG en estos animales.

En ratas SHROB, soja, lino y EPA:DHA 1:1 presentaron los valores más altos de GSH con diferencias estadísticamente significativas respecto a las otras dos dietas con AGPI n-3.

La ratio GSSG/GSH es mayor para las dietas 2:1 y 1:2 tanto en Wistar como en SHROB.

En resumen, las dietas EPA:DHA 1:1, soja y lino proporcionaron valores más beneficiosos en los parámetros del glutatión hepático ya que el GSH era más elevado.

Tabla 24. Glutatión reducido y oxidado en tejido adiposo (nmol/mg proteína)

GSH				GSSG			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	139,14 ± 94,99	96,05 ± 55,8	0,32	EPA:DHA 1:1	11,44 ± 6,26	11,44 ± 4,04	0,2
EPA:DHA 2:1	62,51 ± 40,05	71,92 ± 20,28	0,64	EPA:DHA 2:1	25,15 ± 14,95*	28,1 ± 6,47	0,67
EPA:DHA 1:2	55,8 ± 33,62	47,67 ± 20,04	0,62	EPA:DHA 1:2	30,57 ± 13,55*	68,99 ± 13,64*^	0,02
SOJA	41,74 ± 16,89*	110,36 ± 65,79	0,08	SOJA	47,7 ± 7,95*^#	49,8 ± 12,63*^	0,74
LINO	78,97 ± 32,78 ^a	70,1 ± 29,68	0,62	LINO	43,54 ± 20,5*^	69,69 ± 30,8*^	0,09

Media ± desviación estándar de las concentraciones de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en tejido adiposo. pw-s: indica diferencias significativas entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1. #: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:2. ^a: Diferencias significativas respecto al tratamiento a base de soja.

Tabla 25. Ratio GSSG/GSH en tejido adiposo

GSSG/GSH			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	0,10 ± 0,041	0,19 ± 0,077	0,01
EPA:DHA 2:1	0,571 ± 0,525*	0,40 ± 0,0167*	0,41
EPA:DHA 1:2	0,70 ± 0,364*	1,73 ± 0,881*^	0,04
SOJA	1,29 ± 0,488*^	0,56 ± 0,304*	0,02
LINO	0,57 ± 0,216* ^a	1,25 ± 0,976*	0,1

Media ± desviación estándar de la ratio GSSG/GSH en tejido adiposo. pw-s: indica diferencias significativas entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1. ^a: Diferencias significativas respecto al tratamiento a base de soja.

En el tejido adiposo, lo más destacable fue que la dieta EPA:DHA 1:1 proporcionó los valores de GSH más altos en Wistar y los valores más bajos de GSSG tanto en Wistar como en SHROB. En consecuencia, la ratio GSSG/GSH también mostró los valores inferiores de EO en este grupo de tratamiento.

Tabla 26. Glutati6n reducido y oxidado en ri6n (nmol/mgprote6na)

GSH				GSSG			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s	TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	37,5 ± 6,44	34,03 ± 7,3	0,363	EPA:DHA 1:1	1,15 ± 0,34	1,10 ± 0,18	0,703
EPA:DHA 2:1	48,13 ± 23,71	54,53 ± 11,76*	0,562	EPA:DHA 2:1	1,16 ± 0,56	1,48 ± 0,23*	0,23
EPA:DHA 1:2	29,99 ± 10,27	31,45 ± 5,63^	0,757	EPA:DHA 1:2	0,73 ± 0,44	0,41 ± 0,09*^	0,18
SOJA	36,75 ± 9,67	33,35 ± 19,5	0,713	SOJA	0,57 ± 0,14	0,47 ± 0,17*^	0,31
LINO	27,67 ± 6,08	38,5 ± 5,79^	0,011	LINO	0,45±0,22*^	0,52±0,04*^#	0,44

Media ± desviaci6n est6ndar de las concentraciones de glutati6n reducido (GSH) y glutati6n oxidado (GSSG) en ri6n. pw-s: Diferencias significativas entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1. #: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:2.

Tabla 27. Ratio GSSG/GSH en ri6n

GSSG/GSH			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	0,031 ± 0,007	0,032 ± 0,0106	0,521
EPA:DHA 2:1	0,024 ± 0,0003*	0,027 ± 0,0108	0,877
EPA:DHA 1:2	0,018 ± 0,016	0,0131 ± 0,002*^	0,462
SOJA	0,0133 ± 0,006*^	0,0134 ± 0,007*^	0,988
LINO	0,016 ± 0,008*^	0,009 ± 0,007*^	0,107

Media ± desviaci6n est6ndar de la ratio GSSG/GSH en ri6n. pw-s: Diferencias significativas entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1.

En el ri6n, pr6cticamente no se observaron diferencias estad6sticamente significativas en estos par6metros entre Wistar y SHROB.

Al comparar los diferentes tratamientos en cada cepa, observamos mayores diferencias en SHROB. En este grupo, las dietas con mayor contenido de EPA aumentaron el GSSG respecto a los otros tratamientos. Y aunque la dieta 2:1 tambi6n aument6 el GSH no fue suficiente para proporcionar un valor de la ratio GSSG/GSH menor que otros grupos. Para estos par6metros renales, las mejores dietas para prevenir el EO fueron las de soja y lino tanto en Wistar como en SHROB.

El GSH es una de las mol6culas intracelulares que proporciona mayor protecci6n en las membranas contra el da6o de las ERO. Es el sustrato principal de la Gpx. Se sabe que el total de GSH disminuye despu6s de la exposici6n a situaciones de EO y aumenta en presencia de antioxidantes (Conde et al., 2012; Christon et al., 1995). El contenido de AGPI en la dieta se cree que est6 relacionada con el aumento de las insaturaciones en los AG de las membranas. 6stas provocan mayor peroxidaci6n lip6dica y consecuentemente se incrementa la actividad de la Gpx produciendo una disminuci6n de la concentraci6n de GSH (Christon et al., 1995).

7.2 PRODUCTOS DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (TBARS)

En la tabla 28 se presentan los resultados correspondientes a los niveles de TBARS en hígado, tejido adiposo y riñón.

Tabla 28. TBARS (nmol MDA/mg Prot)

Hígado			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	10,29 ± 2,82	11,59 ± 1,53	0,305
EPA:DHA 2:1	7,57 ± 2,55	8,67 ± 1,92	0,381
EPA:DHA 1:2	8,81 ± 3,28	9,76 ± 1,09	0,517
SOJA	8,12 ± 2,53	9,86 ± 2,15	0,228
LINO	6,53 ± 1,24	8,76 ± 1,48	0,013
Tejido adiposo			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	13,28 ± 11,53	8,26 ± 12,47	0,450
EPA:DHA 2:1	10,53 ± 4,14	3,77 ± 1,89	0,004
EPA:DHA 1:2	11,41 ± 7,85	4,40 ± 4,18	0,082
SOJA	7,08 ± 3,95	2,25 ± 1,42	0,029
LINO	9,26 ± 6,13	7,62 ± 5,44	0,622
Riñón			
TRATAMIENTOS	Wistar	SHROB	pw-s
EPA:DHA 1:1	1,32 ± 0,50	1,43 ± 0,27	0,625
EPA:DHA 2:1	1,10 ± 0,88	1,21 ± 0,37	0,585
EPA:DHA 1:2	0,89 ± 0,68	0,59 ± 0,26*^	0,734
SOJA	0,83 ± 0,33	0,67 ± 0,25*	0,378
LINO	0,58 ± 0,25	0,66 ± 0,34*	0,659

Media ± desviación estándar de TBARS en hígado, tejido adiposo y riñón. pw-s: Diferencias significativas entre las dos cepas. *: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1. ^: Diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 2:1.

No se obtuvieron diferencias muy relevantes a nivel de TBARS en los tres tejidos estudiados.

En hígado sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en el tratamiento a base de lino siendo superior la concentración de MDA en SHROB; pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en ninguna de las dos cepas.

En tejido adiposo tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos en ninguna de las dos cepas y entre Wistar y SHROB se observaron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos EPA:DHA 2:1 y soja. Siendo superior el nivel de MDA en ratas Wistar.

En riñón no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en ningún tratamiento pero sí entre tratamientos en SHROB. El nivel de peroxidación lipídica era superior significativamente en el grupo de tratamiento EPA:DHA 1:1 respecto EPA:DHA 1:2, soja y lino. Los niveles de MDA eran superiores también en el tratamiento EPA:DHA 2:1 respecto al 1:2.

Kikugawa *et al.* estudiaron el efecto de la suplementación de aceite de pescado en dos grupos de ratas Wistar macho. Al primer grupo se le administró un tratamiento de aceite de pescado y al segundo uno de aceite de cártamo (rico en AGPI n-6). Luego se inducía EO a las ratas mediante una inyección intraperitoneal de nitrilotriacetato. La peroxidación lipídica medida a través del método TBARS en el hígado de las ratas del grupo de aceite de pescado estaba elevada en relación al grupo de aceite de cártamo, por lo tanto no mejoraba la peroxidación lipídica con la suplementación de AGPI n-3 (Kikugawa *et al.*, 2003).

Ando *et al.* también estudiaron la suplementación con AGPI n-3 de origen marino en ratas Wistar macho realizando los mismos grupos, uno con aceites de pescado y el otro con aceite de cártamo. En este caso los niveles de MDA en hígado y riñón eran similares en los dos grupos sin diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados mostraban que el consumo de aceites de pescado, en las condiciones de este estudio, no inducía mayores niveles de TBARS (Ando *et al.*, 2000).

En nuestro estudio tampoco se observó una mejora de la peroxidación lipídica en hígado y riñón de las ratas que consumieron un tratamiento rico en AGPI n-3 de origen marino. Es más, en riñón el tratamiento EPA:DHA 1:1 tenía valores superiores significativamente de MDA que los tratamientos de soja y lino.

No existe mucha bibliografía descrita sobre los niveles de TBARS en tejido adiposo cuando se administran dietas ricas en AGPI n-3. En nuestro estudio no se observaron diferencias relevantes en ningún tratamiento pero sí que se observaron los niveles de MDA más elevados en las dietas de AGPI n-3, pudiendo relacionarse este hecho con el aumento de la peroxidación lipídica debido al aumento de AG con más insaturaciones en las membranas de los adipocitos. Aunque este aumento de la peroxidación lipídica en los grupos de AGPI n-3 no muestra diferencias estadísticamente significativas, sólo una tendencia.

8. HISTOPATOLOGÍA

Se analizaron diferentes variables categóricas en cada tejido para valorar si presentaban o no alteraciones en la histología normal y si estos cambios podían mantener relación con los tratamientos administrados.

8.1 HÍGADO

En las tablas 29, 30, 31 y 32 se presentan los resultados correspondientes a las variables analizadas en el hígado.

Tabla 29. Grado de esteatosis		0%	<5%	5-33%	33-66%	>66%	pw-s
EPA:DHA 1:1	Wistar	100					0,001
	SHROB			71,4	28,6		
EPA:DHA 2:1	Wistar	100					0,001
	SHROB			28,6	71,4		
EPA:DHA 1:2	Wistar	100					0,031
	SHROB		28,6	57,1	14,3		
SOJA	Wistar	100					0,023
	SHROB		20	60	20		
LINO	Wistar	100					0,009
	SHROB		16,7	50	33,33		

Frecuencia (%) de aparición de los diferentes grados de esteatosis en muestras de hígado. pw-s: Indica diferencias significativas entre Wistar y SHROB.

Las muestras de hígado de las ratas Wistar no presentaron esteatosis.

Las ratas SHROB que presentaron un % de frecuencia mayor de esteatosis (entre el 33-44%) fueron las que consumieron el tratamiento EPA:DHA 2:1, y las que presentaron menor grado fueron las del grupo de tratamiento EPA:DHA 1:2. Sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de tratamiento.

Tabla 30. Localización de la esteatosis

TRATAMIENTOS		centrolobulillar	periportal	azonal
EPA:DHA 1:1	Wistar			
	SHROB	14,29	57,14	28,57
EPA:DHA 2:1	Wistar			
	SHROB		57,14	42,86
EPA:DHA 1:2	Wistar			
	SHROB	28,57	71,43	
SOJA	Wistar			
	SHROB	20	80	
LINO	Wistar			
	SHROB	16,67	66,67	16,67

Frecuencia (%) de aparición de las diferentes localizaciones de la esteatosis en hígado de ratas SHROB.

En la esteatosis presente en animales SHROB existió una mayor tendencia de localización periportal; pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Tabla 31. Inflamación lobulillar

TRATAMIENTOS		No inflamación	<2 focos	2-4 focos	>4 focos	pw-s
EPA:DHA 1:1	Wistar	100				
	SHROB	42,9	42,9	14,3		
EPA:DHA 2:1	Wistar	85,7	14,3			0,025
	SHROB	14,3	57,1	28,6		
EPA:DHA 1:2	Wistar	100				0,02
	SHROB	14,3	85,7			
SOJA	Wistar	83,3	16,7			
	SHROB	20	60	20		
LINO	Wistar	28,6	57,1	14,3		
	SHROB		50	50		

Frecuencia (%) de aparición de los diferentes grados de inflamación lobulillar en hígado de ratas Wistar y SHROB. pw-s: Indica diferencias significativas entre Wistar y SHROB.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en los grupos de tratamiento EPA:DHA 2:1 y 1:2. En ambos casos la inflamación lobulillar fue mayor en ratas SHROB que en Wistar.

Se observó una tendencia mayor de inflamación lobulillar en las ratas que consumieron los tratamientos a base de soja y lino respecto a las ratas que consumieron los tratamientos a base de AGPI n-3 de origen marino; de todas formas no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

En la valoración de los microgranulomas, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en los grupos de tratamiento EPA:DHA 2:1 (pw-s=0,005), soja (pw-s=0,006) y lino (pw-s=0,009). En los tres casos las ratas SHROB

presentaban microgranulomas a diferencia de las ratas Wistar que no los presentaron.

La presencia de microgranulomas fue menor en el grupo de tratamiento EPA:DHA 1:1 y EPA:DHA 1:2 en las ratas SHROB, pero sin diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros grupos.

En el análisis de los lipogranulomas, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en todos los grupos de tratamiento, EPA:DHA 1:1 (pw-s<0,001), EPA:DHA 2:1 (pw-s=0,001), EPA:DHA 1:2 (pw-s=0,002), soja (pw-s=0,02) y lino (pw-s<0,001). La comparación entre dietas no mostró diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 32. Inflamación portal

TRATAMIENTOS		presencia	ausencia	pw-s
EPA:DHA 1:1	Wistar	0	100	0,001
	SHROB	85,7	14,3	
EPA:DHA 2:1	Wistar	71,4	28,57	
	SHROB	71,4	28,57	
EPA:DHA 1:2	Wistar	33,3	66,7	
	SHROB	57,1	42,9	
SOJA	Wistar	50	50	
	SHROB	0	100	
LINO	Wistar	57,1	42,9	
	SHROB	0	100	

Frecuencia (%) de presencia de inflamación portal en hígado de ratas Wistar y SHROB. pw-s: Indica diferencias significativas entre Wistar y SHROB.

La inflamación portal se encontró tanto en ratas Wistar como en SHROB.

Entre Wistar y SHROB sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el grupo EPA:DHA 1:1.

Se observó una tendencia mayor de inflamación portal en las ratas que consumieron algún tratamiento de AGPI n-3 de origen marino (EPA:DHA 2:1 o EPA:DHA 1:2), pero sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

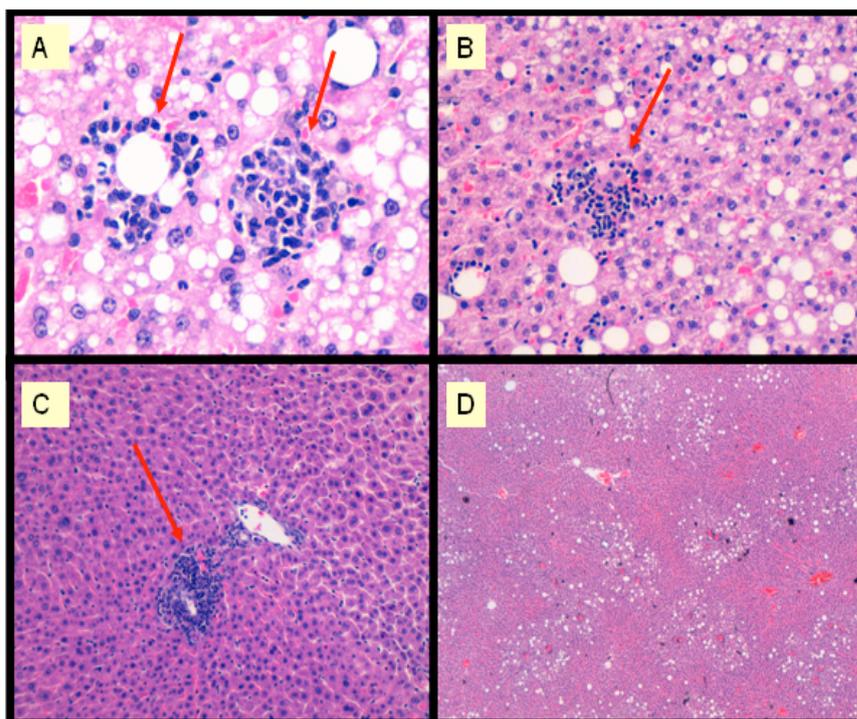


Figura 24. Imágenes de cortes histológicos de hígado de ratas Wistar y SHROB teñidos con hematoxilina-eosina. A: microgranuloma (flecha de la derecha) y lipogranuloma (flecha de la izquierda) 600x, rata SHROB y tratamiento EPA:DHA 2:1; B: inflamación lobulillar 400x, rata SHROB y tratamiento EPA:DHA 2:1; C: inflamación portal 200x, rata Wistar y tratamiento EPA:DHA 2:1; D: esteatosis con localización periportal 40x, rata SHROB y tratamiento EPA:DHA 2:1.

El lobulillo hepático consiste en la unidad funcional hepática y comprende la porción de parénquima hepático de morfología hexagonal centrada por una vena centrolobulillar y cuyos vértices están constituidos por seis espacios porta.

Esta estructura está al servicio del establecimiento de la mayor cantidad posible de contacto entre los hepatocitos y la sangre que circula por el hígado (*Wheater et al., 1987*).

Los hepatocitos cargados de grasa, a veces, llegan a romperse con la formación de una vesícula de grasa. Esto provoca una reacción inflamatoria con infiltrado de macrófagos, linfocitos, eosinófilos, dando lugar a la aparición de un lipogranuloma (*Oriani y Sagardoy, 2007*).

En la imagen A se puede observar un microgranuloma junto a un lipogranuloma.

En la imagen B vemos la zona lobulillar con un foco de inflamación inespecífica.

En la imagen C se muestra un espacio porta donde aparece un foco inflamatorio inespecífico.

En la imagen D se observa una marcada esteatosis. La esteatosis macrovesicular es el tipo más frecuente y la observada en esta imagen. Se trata de gotas de grasa que forman vacuolas grandes que desplazan el núcleo celular hacia la periferia. En las imágenes A y B se muestra también la esteatosis a mayor aumento (600x y 400x respectivamente).

No existe mucha bibliografía que describa la histopatología del hígado durante el tratamiento con AGPI n-3 y además las escasas fuentes bibliográficas no parametrizan las variables morfológicas.

Por ejemplo, Pachikian comprobó que la relación AGPI n-3/AGPI n-6 estaba disminuida en los fosfolípidos de los hepatocitos en animales con un hígado graso. Además, los animales tratados con una dieta pobre en AGPI n-3 presentaron RI y esteatosis hepática asociada a una disminución de la oxidación lipídica. Estos animales presentaron también un aumento en la actividad de enzimas de la lipogénesis y un aumento de la expresión y activación de SREBP-1c que contribuye a la aparición de esteatosis hepática (*Pachikian et al., 2011*).

Por otro lado, Kajikawa demostró una prevención del progreso de la esteatosis hepática llevada a cabo por un consumo de EPA altamente purificado en ratones alimentados con una dieta *high-fat-high sucrose* (HF-HS) (*Kajikawa et al., 2009*).

8.2 TEJIDO ADIPOSO

Para las variables analizadas en el tejido adiposo se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB y entre los grupos de tratamiento.

En las tablas 33, 34, 35 y 36 se presentan los resultados de las variables analizadas en tejido adiposo.

Tabla 33. Inflamación

TRATAMIENTOS		ausencia	leve	moderado	marcado	pw-s
EPA:DHA 1:1	Wistar	71,43	28,57			
	SHROB	28,57	71,43			
EPA:DHA 2:1	Wistar	85,71	14,29			0,001
	SHROB	0	100			
EPA:DHA 1:2	Wistar	66,67	33,33			
	SHROB	42,86	57,1			
SOJA	Wistar	83,33	16,67			
	SHROB	42,86	66,7	16,67		
LINO	Wistar	85,71	14,29			
	SHROB	42,86	50	16,67	16,67	

Frecuencia (%) de los diferentes grados de inflamación en las muestras de tejido adiposo en ratas Wistar y SHROB. pw-s: Indica diferencias significativas entre Wistar y SHROB.

En el análisis de la inflamación no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de tratamiento ni en Wistar ni en SHROB. Sin embargo si se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas en el grupo de tratamiento EPA:DHA 2:1, donde las SHROB presentaron un grado mayor de inflamación respecto las Wistar.

Existe una tendencia en las SHROB a una inflamación más marcada en aquellas que consumieron los tratamientos EPA:DHA 2:1 o lino.

Tabla 34. Mastocitos

TRATAMIENTOS		presencia	ausencia	pw-s
EPA:DHA 1:1	Wistar	0	100	0,01
	SHROB	85,71	14,29	
EPA:DHA 2:1	Wistar	57,14	42,86	
	SHROB	42,86*	57,14	
EPA:DHA 1:2	Wistar	100*	0	
	SHROB	100^	0	
SOJA	Wistar	100*	0	
	SHROB	83,33	16,67	
LINO	Wistar	85,71*	14,29	
	SHROB	100^	0	

Frecuencia (%) de la presencia/ausencia de mastocitos en tejido adiposo en ratas Wistar y SHROB. pw-s: Indica diferencias significativas entre Wistar y SHROB. *: diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1, ^: diferencias significativas respecto al grupo de tratamiento EPA:DHA 2:1.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en el tratamiento EPA:DHA 1:1 donde las ratas SHROB tenían mastocitos y las Wistar no.

En las ratas Wistar se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento EPA:DHA 1:1 y EPA:DHA 1:2, soja y lino. En el tratamiento 1:1 no se contabilizaron mastocitos, en cambio en los otros tres tratamientos sí.

En las ratas SHROB se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento EPA:DHA 2:1 y EPA:DHA 1:1, EPA:DHA 1:2 y lino; siendo el tratamiento 2:1 el de menor presencia de mastocitos.

Tabla 35. Macrófagos

TRATAMIENTOS		presencia	ausencia
EPA:DHA 1:1	Wistar	14,29	85,71
	SHROB	0	100
EPA:DHA 2:1	Wistar	42,86	57,14
	SHROB	14,3	85,71
EPA:DHA 1:2	Wistar	16,67	83,33
	SHROB	0	100
SOJA	Wistar	33,33	66,67
	SHROB	50*#	50
LINO	Wistar	28,57	71,43
	SHROB	0 ^a	100

Frecuencia (%) de la presencia de macrófagos en tejido adiposo en ratas Wistar y SHROB. *: diferencias significativas respecto al grupo de tratamiento EPA:DHA 1:1, #: diferencias significativas respecto al grupo de tratamiento EPA:DHA 1:2, ^a: diferencias significativas respecto al grupo de tratamiento a base de soja.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en ninguno de los grupos de tratamiento, en cambio si se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos de tratamiento en las ratas SHROB.

Las ratas que consumieron el tratamiento EPA:DHA 1:1, el EPA:DHA 1:2 y lino no presentaron macrófagos en el tejido adiposo, siendo estos resultados significativamente inferiores a las ratas que consumieron el tratamiento a base de soja.

Tabla 36. Variabilidad en el tamaño de los adipocitos

TRATAMIENTOS		presencia	ausencia	pw-s
EPA:DHA 1:1	Wistar	28,57	71,43	
	SHROB	85,71	14,29	0,001
EPA:DHA 2:1	Wistar	71,43	28,57	
	SHROB	57,14	42,86	
EPA:DHA 1:2	Wistar	33,33	66,67	
	SHROB	42,86	57,14	
SOJA	Wistar	0 [^]	100	
	SHROB	16,67	83,33	
LINO	Wistar	0 [^]	100	
	SHROB	16,67	83,33	

Frecuencia (%) de la presencia/ausencia de variabilidad en el tamaño de los adipocitos en ratas Wistar y SHROB. pw-s: Indica diferencias significativas entre Wistar y SHROB. [^]: diferencias significativas respecto al grupo de tratamiento EPA:DHA 2:1.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en el grupo de tratamiento EPA:DHA 1:1, donde es mayor la variabilidad en el tamaño de los adipocitos en ratas SHROB que en Wistar.

Entre grupos de tratamiento también se observaron diferencias estadísticamente significativas en las ratas Wistar: las pertenecientes a los grupos de tratamiento con soja y lino no presentaron variabilidad en el tamaño de los adipocitos en comparación con las ratas del grupo EPA:DHA 2:1 que presentaron un porcentaje elevado.

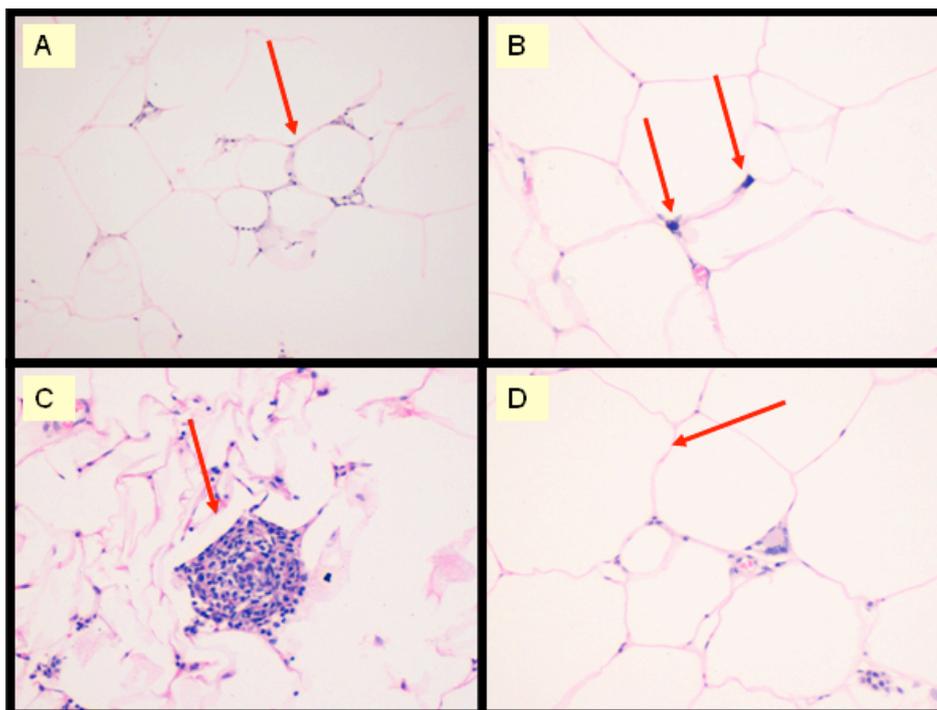


Figura 25. Imágenes de cortes histológicos de tejido adiposo de las ratas Wistar y SHROB teñidos con hematoxilina-eosina. A: inflamación 200x, rata SHROB y tratamiento EPA:DHA 1:1; B: presencia de mastocitos 300x, rata SHROB y tratamiento EPA:DHA 1:2; C: macrófagos formando un microgranuloma 300x, rata SHROB y tratamiento soja; D: variabilidad en el tamaño de los adipocitos 300x, rata SHROB y tratamiento EPA:DHA 1:1.

El tejido adiposo blanco está formado por adipocitos uniloculares. La grasa almacenada en los adipocitos se acumula en forma de gotas lipídicas que se funden para formar una vesícula única que ocupa y distiende la mayor parte del citoplasma. El núcleo del adipocito queda desplazado a un lado por la vesícula de lípido almacenado y el citoplasma se reduce a un pequeño anillo alrededor de la periferia (*Wheater et al., 1987*).

Actualmente existen estudios en animales y humanos que demuestran una relación directa entre el aumento de la presencia de macrófagos e inflamación en el tejido adiposo blanco y la obesidad, la RI y el SM. Los macrófagos son responsables de la producción de muchas de las citocinas proinflamatorias en el estado de obesidad (*Muñoz et al., 2009; Kalupahana et al., 2011; Tordjman et al., 2012*).

Kalupahana en su estudio demuestra una mejora en la inflamación y la RI con el consumo de AGPI n-3 (*Kalupahana et al., 2011*).

En el estudio de Tordjman, además, se relaciona el aumento de la acumulación de macrófagos e inflamación en tejido adiposo visceral con la severidad de las lesiones histológicas de hígado en rata (*Tordjman et al., 2012*).

En las imágenes A y C se observa un estado inflamatorio y la presencia de macrófagos respectivamente.

El aumento del tamaño de los adipocitos está muy asociado con aparición de RI y el desarrollo de diabetes. Estudios en humanos y animales demostraron la importancia del tejido adiposo, tanto los estados de lipodistrofia como de obesidad pueden desencadenar RI y diabetes (*Hussein et al., 2006*). En la imagen D se observa variabilidad en el tamaño de los adipocitos.

El tejido adiposo blanco en humanos obesos contiene un gran número de mastocitos. Los niveles séricos de triptasa procedentes de mastocitos son también significativamente superiores en sujetos obesos que en sujetos normo-peso, lo que sugiere un papel de estas células inflamatorias en la obesidad y la diabetes (*Wang J y Shi GP, 2011*). En la imagen B se observan mastocitos.

8.3 RIÑÓN

Para las variables analizadas en el riñón se observaron diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB y también entre los grupos de tratamiento.

En las tablas 37, 38 y 39 se presentan los resultados referentes a las variables analizadas en riñón.

Tabla 37. Glomeruloesclerosis

TRATAMIENTOS		presencia	ausencia	pw-s
EPA:DHA 1:1	Wistar	0	100	0,005
	SHROB	71,43	28,57	
EPA:DHA 2:1	Wistar	14,29	85,71	
	SHROB	57,14	42,86	
EPA:DHA 1:2	Wistar	0	100	
	SHROB	42,86	57,14	
SOJA	Wistar	0	100	
	SHROB	33,33	66,67	
LINO	Wistar	0	100	
	SHROB	16,67	83,33	

Frecuencia (%) de la presencia/ausencia de glomeruloesclerosis en muestras de riñón en ratas Wistar y SHROB. pw-s: Indica diferencias significativas entre Wistar y SHROB.

Sólo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas pertenecientes al grupo de tratamiento EPA:DHA 1:1 siendo la presencia de glomeruloesclerosis más elevada en ratas SHROB que en Wistar.

Tabla 38. Atrofia

TRATAMIENTOS		ausencia	leve	moderado	marcado	pw-s
EPA:DHA 1:1	Wistar	100				
	SHROB	100				
EPA:DHA 2:1	Wistar	85,71		14,29		
	SHROB	71,43	28,57			
EPA:DHA 1:2	Wistar	100				
	SHROB	85,71		14,29		
SOJA	Wistar	100				0,014
	SHROB	16,67*#	33,33	50		
LINO	Wistar	100				0,034
	SHROB	33,33*	50	16,67		

Frecuencia (%) de los diferentes grados de atrofia en muestras de riñón en ratas Wistar y SHROB. pw-s: Indica diferencias significativas entre Wistar y SHROB. *: diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:1, #: diferencias significativas respecto al tratamiento EPA:DHA 1:2.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas en los tratamientos a base de soja y a base de lino, siendo superior la atrofia en el riñón de las ratas SHROB en ambos casos.

En ratas SHROB hubo diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento a base de soja y los tratamientos EPA:DHA 1:1 y EPA:DHA 1:2, siendo superior el nivel de atrofia en las ratas alimentadas con soja en ambas comparaciones.

Tabla 39. Tiroidización

TRATAMIENTOS		ausencia	leve	moderado	marcado	pw-s
EPA:DHA 1:1	Wistar	100				
	SHROB		57,14	28,57	14,29	0,003
EPA:DHA 2:1	Wistar	71,43	14,29	14,29	14,29	
	SHROB		57,14	14,29	28,57	0,032
EPA:DHA 1:2	Wistar	100				
	SHROB		57,14	14,29	28,57	0,005
SOJA	Wistar	100				
	SHROB			66,67	33,33	0,002
LINO	Wistar	100				
	SHROB		50	50		0,002

Frecuencia (%) de los diferentes grados de tiroidización en muestras de riñón en ratas Wistar y SHROB. pw-s: Indica diferencias significativas entre Wistar y SHROB.

Hubo diferencias estadísticamente significativas entre Wistar y SHROB en cada grupo de tratamiento, siendo superior el grado de tiroidización en ratas SHROB respecto a Wistar. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre dietas.

Se evaluaron otros parámetros en el riñón como la fibrosis, la presencia de depósitos lipídicos y la inflamación pero no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

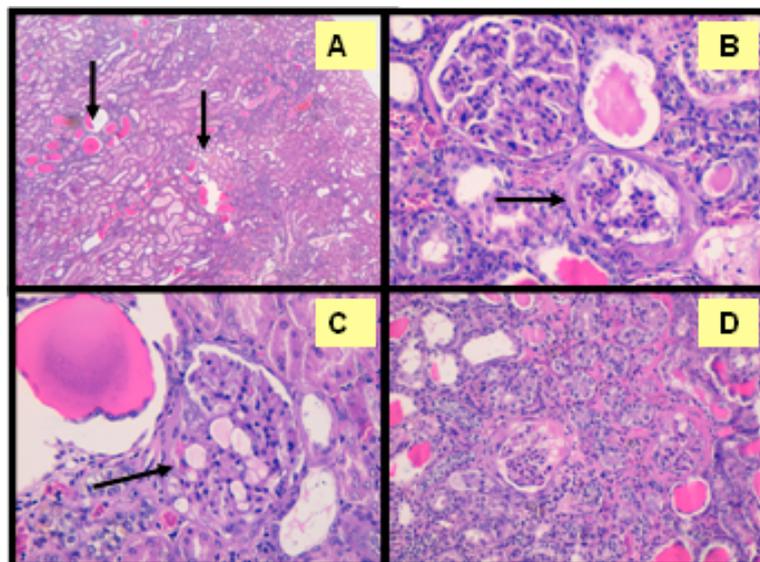


Figura 26. Imágenes de cortes histológicos de riñón de las ratas Wistar y SHROB teñidos con hematoxilina-eosina. A: tiroidización 40x, rata SHROB y tratamiento EPA:DHA 1:1; B: glomerulosclerosis 300x, rata SHROB y tratamiento a base de lino; C: depósitos lipídicos 400x, rata SHROB y tratamiento EPA:DHA 1:1; D: inflamación 200x, rata SHROB y tratamiento a base de lino.

La nefrona, unidad funcional del riñón, está formada por dos componentes principales: el corpúsculo (incluye la cápsula de Bowmann, el glomérulo y el espacio de Bowmann) y el túbulo renal.

El glomérulo es el componente responsable de la filtración del plasma. El resultado de este filtrado pasa luego hacia el túbulo renal (*Wheater et al., 1987*).

El daño tisular renal es interpretado como un cambio inespecífico en relación a diferentes causas. Por ejemplo *Dobrian* en un estudio en el 2003 evaluó el efecto del aumento de la ingesta de sal en el desarrollo de la hipertensión y del daño renal asociados a la aparición de EO en ratas obesas. En este caso la histología del riñón indicó un mayor grado de glomerulosclerosis en ratas obesas que consumieron las dietas con un alto contenido en sal, a la vez que aumentaba el EO, siendo este factor una posible causa del daño histológico (*Dobrian et al., 2003*).

DISCUSIÓN GLOBAL

En este estudio hemos observado que algunos parámetros no presentan diferencias a causa de la dieta. Así, la variación de peso corporal, la variación de presión arterial, la glucosa, la GR eritrocitaria, la concentración de triglicéridos, de HDL-c, de colesterol, de APO A1, los TBARS y los GSH-GSSG en tejidos, la PCR, la sICAM-1, no han proporcionado información sobre cual de las dietas ha resultado ser mejor. En cambio, algunas dietas han modificado otros parámetros que, claramente, mejoran el SM de las ratas SHROB o bien presentan valores más beneficiosos para su prevención en ratas Wistar.

A modo de resumen final, y para poder esclarecer cual de las diferentes dietas es la mejor, en las tablas 40, 41 y 42 se muestran los parámetros estudiados, clasificados por dietas y por cepas, que presentan mejores valores al final del tratamiento con diferencias significativas entre dietas. Las celdas coloreadas de verde oscuro indican la dieta que ha proporcionado el mejor valor del parámetro correspondiente en la cepa SHROB y las celdas coloreadas en verde claro indican lo mismo en las ratas Wistar.

SM Parámetros	EPA:DHA 1:1		EPA:DHA 2:1		EPA:DHA 1:2		SOJA		LINO	
	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB
Insulina										
HOMA										

Parámetros con diferencias significativas entre dietas. Se señalan las dietas que muestran los valores más beneficiosos de cada parámetro en SHROB (verde oscuro) y en Wistar (verde claro).

En la tabla 40 se muestran los parámetros que definen el SM que han mostrado diferencias entre dietas: insulina e índice HOMA. En esta tabla están marcadas en verde oscuro las casillas de las dietas EPA:DHA 1:2, soja y lino en ambos parámetros. Esto significa que estas dietas proporcionaron los valores más bajos de insulina y de HOMA en plasma en las ratas SHROB. Se podría destacar que el DHA tiene un efecto mayor sobre la mejora en la RI que el EPA, y que los tratamientos de soja y lino tienen un mayor impacto en estos parámetros que los AGPI n-3.

La dieta a base de lino también proporcionó los valores más bajos de índice HOMA en ratas Wistar; por lo que podríamos concluir que esta dieta resultó ser la mejor para disminuir la RI tanto en animales enfermos como en animales sanos.

Estos resultados estarían en concordancia con otros estudios donde el efecto beneficioso del EPA y el DHA sobre la disminución de la glucosa sérica y la RI no está demostrado (*Park y Park et al., 2009*).

En cambio, estarían en desacuerdo con otros trabajos en los que la ingesta de DHA y/o EPA sí disminuía los niveles de glucosa y mejoraba la sensibilidad a la insulina (*Andersen, 2008*).

Tabla 41. Parámetros de EO

EO sangre Parámetros	EPA:DHA 1:1		EPA:DHA 2:1		EPA:DHA 1:2		SOJA		LINO	
	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB
SOD eritrocitaria										
CAT eritrocitaria										
GPX eritrocitaria										
ORAC										
LDL ox										

Parámetros con diferencias significativas entre dietas. Se señalan las dietas que muestran los valores más beneficiosos de cada parámetro en SHROB (verde oscuro) y en Wistar (verde claro).

En la tabla 41 se muestran los parámetros de EO influenciados de manera beneficiosa por las dietas. Consideramos como efectos beneficiosos tener las enzimas y la capacidad antioxidante total más altas y la LDLox menor.

Los animales más beneficiados por el efecto de las dietas fueron las ratas Wistar, siendo el tratamiento EPA:DHA 1:1 el que proporcionó los valores más altos de antioxidantes y los valores más bajos de LDLox. Este hecho demuestra un efecto positivo de los tratamientos con AGPI n-3, especialmente en la proporción EPA:DHA 1:1, frente al EO en ratas sanas pero no en SHROB; ya que únicamente la enzima CAT estaba elevada en la cepa con SM alimentada con EPA:DHA 2:1.

En cambio, las dietas con soja y lino dieron lugar a las concentraciones de LDL-ox más bajas tanto en Wistar como en SHROB.

Respecto al EO podríamos concluir que la dieta EPA:DHA 1:1 es la más beneficiosa en ratas sanas, mientras que las dietas de soja y lino son más efectivas en ratas obesas.

Tabla 42. Otros parámetros relacionados con riesgo cardiovascular y SM

Otros parámetros	EPA:DHA 1:1		EPA:DHA 2:1		EPA:DHA 1:2		SOJA		LINO	
	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB	WISTAR	SHROB
LDLc										
APO B100										
VCAM										
HbA1c										

Parámetros con diferencias significativas entre dietas. Se señalan las dietas que muestran los valores más beneficiosos de cada parámetro en SHROB (verde oscuro) y en Wistar (verde claro).

En la tabla 42 se muestran los cuatro parámetros plasmáticos restantes que mostraron diferencias entre tratamientos: el colesterol LDL y la APO B100 como factores de riesgo cardiovascular, la VCAM como biomarcador de riesgo cardiovascular y la HbA1c como parámetro que mide el daño a proteínas.

Considerando beneficioso para la salud tener los cuatro parámetros con los niveles más bajos, observamos que las dietas afectaron de forma desigual a estas variables, sin un patrón concreto. Se observó efecto dieta sólo en SHROB respecto al LDL-c y sólo en Wistar respecto a la APO B100. Únicamente el tratamiento EPA:DHA 1:1 afectó de manera beneficiosa a ambos parámetros.

Numerosos estudios demuestran una mejora en la concentración de LDL-c en animales y/o humanos tratados con EPA y/o DHA debido a un aumento en la actividad del receptor hepático para LDL-c y una reducción de su síntesis. De esta manera se disminuye la entrada de LDL-c en plasma y se produce un descenso en sus niveles (*Spady et al., 1993; Connor et al., 2000*). La APO B100, apolipoproteína mayoritaria en el LDL-c, al encontrarse reducida en los tratamientos EPA:DHA 1:1 y 1:2 demostró parte del efecto positivo de éstos AGPI n-3 sobre el perfil lipídico en ratas sanas.

La dieta con una proporción mayor de EPA (2:1) y las dietas de soja y lino proporcionaron las concentraciones más bajas de VCAM-1 en ratas SHROB. El EPA podría antagonizar el efecto proinflamatorio de algunos ácidos grasos saturados de manera más eficaz que el DHA, como también está descrito en otros estudios (*Yamada et al., 2008*). De todas formas el efecto beneficioso de los AGPI n-3 sobre VCAM-1 no queda del todo demostrado a partir de los resultados obtenidos en

nuestro estudio, ya que la soja y el lino son más efectivos en la disminución de SVCAM-1.

Respecto a la HbA1c, se observan claramente valores inferiores en los tratamientos a base de AGPI n-3 en el caso de ratas Wistar y en los tratamientos EPA:DHA 1:1, 2:1 y lino en SHROB. Existe, por lo tanto, un efecto protector de los AGPI n-3 respecto a la glicación proteica sobretodo en ratas Wistar.

El análisis del EO en tejidos (hígado, tejido adiposo y riñón) no proporcionó, de manera concluyente, una única dieta como claramente beneficiosa respecto al SM. Podríamos concluir que las tres dietas que afectaron de mejor manera estos parámetros fueron EPA:DHA 1:1, EPA:DHA 2:1 y lino. La primera mejoró los valores de SOD en tejido adiposo (Tabla 20) y riñón (Tabla 21) y los valores del sistema del glutati3n en tejido adiposo (Tabla 24). La dieta EPA:DHA 2:1 mejoró fundamentalmente CAT, Gpx y GR en tejido renal (Tabla 21) y el tratamiento a base de lino afectó de forma beneficiosa al sistema del glutati3n hepático (Tabla 22) y renal (Tabla 26).

Respecto a la histopatología, aunque se observó claramente un mayor daño histol3gico en las ratas SHROB respecto a las Wistar, las dietas tampoco mostraron muchas diferencias entre sí. Podríamos concluir que la dieta EPA:DHA 1:1 fue la más efectiva en animales SHROB disminuyendo la atrofia renal (Tabla 38) y la infiltraci3n de macrófagos en tejido adiposo (Tabla 35), y evitando la presencia de mastocitos en tejido adiposo de animales Wistar (Tabla 34).

En resumen, los AGPI n-3 mostraron un efecto preventivo en ratas sanas (Wistar) modificando fundamentalmente el EO en sangre y tejidos, y la HbA1c. Las dietas con AGPI n-3, junto con el tratamiento a base de lino, proporcionaron también los mejores valores de HbA1c, LDLc (dietas 1:1 y 2:1), insulina e índice HOMA (dieta 1:2) en ratas con SM.

Las dietas con AGPI n-3 de origen marino no afectaron al resto de parámetros estudiados. Quizás estos parámetros se modificarían aumentando el período de tratamiento y/o las dosis, o administrando los aceites incorporados en el pienso, para proporcionar dosis diarias en lugar de semanales de forma puntual. El peligro de

incorporar los aceites en el pienso es su fácil oxidación por exposición a la luz o al aire.

El cambio de modelo animal de SM también podría influir positivamente en el estudio. Las ratas SHROB presentaban obesidad, hipertensión, colesterol moderado, RI, glucosa normal y glomeruloesclerosis renal siendo un buen modelo de SM. Pero, podría ser más útil un modelo animal que manifestara estos problemas metabólicos con menor severidad que las ratas SHROB, para poder establecer mayores diferencias entre los tratamientos.

Probablemente, hubiese sido más eficaz y más representativo del SM real en humanos, provocar esta alteración metabólica en animales sanos a base de una dieta rica en grasas y azúcares (*high fat-high sucrose*).

CONCLUSIONES

1. En la cepa SHROB no observamos diferencias significativas en los principales parámetros que definen el SM tras la intervención nutricional; por lo que no parece un modelo adecuado para este tipo de estudios debido al alto grado de severidad de los síntomas.
2. Los parámetros que han presentado diferencias entre Wistar y SHROB en todos los grupos de tratamiento, independientemente de la dieta, han sido: peso, presión arterial, insulina plasmática, índice HOMA, triglicéridos, colesterol, APO B100, PCR, PAI-1, ICAM-1, esteatosis hepática y tiroidización en células renales.

Los parámetros que presentaron resultados distintos entre Wistar y SHROB dependiendo del tratamiento fueron: HbA1c, enzimas antioxidantes eritrocitarios, ORAC, LDLox, HDL-c, LDLc, APO A1, ratio APO B100/APO A1, enzimas antioxidantes hepáticas, SOD y Gpx de tejido adiposo, SOD, Gpx y GR renales, sistema del glutatión en los tres tejidos estudiados, TBARS en hígado y tejido adiposo, inflamación lobulillar y portal; inflamación, mastocitos y diferencias en adipocitos de tejido adiposo y glomeruloesclerosis y atrofia renal.

Los parámetros sin diferencias entre Wistar y SHROB en los cinco grupos de tratamiento fueron: glucosa, VCAM-1, SOD hepática, CAT y GR en tejido adiposo, CAT en riñón; TBARS, GSSG y la ratio GSSG/GSH en riñón y la presencia de macrófagos en tejido adiposo.

3. En ratas SHROB los parámetros implicados en los criterios de la definición del SM y algunos marcadores de riesgo cardiovascular como APO B100, PCR, PAI-1, ICAM-1, esteatosis hepática y tiroidización en células renales estaban aumentados respecto a las ratas Wistar.
4. En ratas Wistar, las dietas con AGPI n-3 de origen marino mejoraron hasta 15 parámetros diferentes de riesgo de SM frente a 7 parámetros mejorados con la dieta de lino y 1 con la dieta de soja. La mayor aportación en la normalización de dichos parámetros por parte de las dietas con EPA:DHA fue debida a la dieta con la proporción 1:1 (mejora en 11 parámetros); el tratamiento 2:1 (mejora en 5 parámetros) y el tratamiento 1:2 (mejora en 2 parámetros).

Concretamente, las dietas con AGPI n-3 presentaron los valores más bajos en HbA1c y, por parte de la dieta EPA:DHA 1:1 se observó una disminución de APO B100 y LDLox, así como un aumento de SOD, GPX y ORAC en sangre.

En ratas SHROB, las dietas con AGPI n-3 de origen marino mejoraron hasta 18 parámetros diferentes de SM frente a 12 parámetros mejorados con la dieta de lino y 7 con la dieta de soja. La mayor aportación en la normalización de dichos parámetros por parte de las dietas con EPA:DHA fue debida a las dietas con la proporción 1:1 (mejora en 8 parámetros) y la 2:1 (mejora en 8 parámetros); el tratamiento 1:2 (mejora en 5 parámetros).

Las dietas con AGPI n-3 proporcionaron los niveles más bajos de insulina (1:2), de LDLc (1:1 y 2:1) y HbA1c (1:1).

Las dietas control (soja y lino) dieron lugar a los niveles más bajos de insulina e índice HOMA, y la dieta con lino disminuyó también LDLc, HbA1c y la glomeruloesclerosis renal.

Respecto al EO, todas las dietas mejoraron más parámetros tisulares que sanguíneos.

5. En ratas Wistar, el tratamiento con EPA:DHA 1:1 fue el más eficaz para prevenir el SM.

En ratas SHROB, la dieta a base de lino fue la más eficaz en el tratamiento del SM. Aunque las dietas con mayor proporción de EPA, 1:1 y 2:1, también mejoraron los parámetros relacionados con el SM de manera más eficaz que la proporción 1:2.

BIBLIOGRAFIA

A

Abeywardena MY, Patten GS. Role of ω 3 Long chain polyunsaturated fatty acids in reducing cardio-metabolic risk factors. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2011; 11(3):232-46.

Ackman, RG. Marine biogenic lipids, fats and oils. Florida: CRC Press, Boca Raton; 1989.

Aleixandre de Artiñano A, Miguel Castro M. Experimental rat models to study the metabolic syndrome. *Br J Nutr* 2009; 102(9):1246-53.

Andersen G, Harnack K, Erbersdobler HF, Somoza V. Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are more effective than alpha-linolenic acid in improving insulin sensitivity in rats. *Ann Nutr Metab* 2008; 52(3):250-6.

Andriamampandry MD, Leray C, Freund M, Cazenave JP, Gachet C. Antithrombotic effects of (n-3) polyunsaturated fatty acids in rat models of arterial and venous thrombosis. *Thromb Res* 1999; 93(1):9-16.

Anthony S. Fauci, Eugene Braunwald, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, Joseph Loscalzo. *Harrison Principios de Medicina Interna*. 17ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana editores, S.A. de C.V., 2009.

Appel LJ, Miller ER, Seidler AJ, Whelton PK. Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Arch Intern Med* 1993; 153(12):1429-1438.

Armitage JA, Pearce AD, Sinclair AJ, Vingrys AJ, Weisinger RS, Weisinger HS. Increased blood pressure later in life may be associated with perinatal n-3 fatty acid deficiency. *Lipids* 2003; 38:459-64.

Armutcu F, Ataymen M, Atmaca H, Gurel A. Oxidative stress markers, C-reactive protein and heat shock protein 70 levels in subjects with metabolic syndrome. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(6):785-90.

B

Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(4):1751-6.

Balagopal PB, de Ferranti SD, Cook S, Daniels SR, Gidding SS, Hayman LL, McCrindle BW, Mietus-Snyder ML, Steinberger J. Nontraditional risk factors and biomarkers for cardiovascular disease: mechanistic, research, and clinical considerations for youth: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2011;123(23):2749-69.

Bang H.O, Dyerberg J., Nielsen A.B. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *Lancet* 1971; 1:1143- 1145.

Bazan HE, Bazan NG, Feeney-Burns L, Berman ER. Lipids in human lipofuscin-enriched subcellular fractions of two age populations. Comparison with rod outer segments and neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31 (8):1433-1443.

Begg DP, Sinclair AJ, Stahl LA, Garg ML, Jois M, Weisinger RS. Dietary protein level interacts with omega-3 polyunsaturated fatty acid deficiency to induce hypertension. *Am J Hypertens* 2010; 23(2):125-8.

Blendea MC, Jacobs D, Stump CS, McFarlane SI, Ogrin C, Bahtyiar G, Stas S, Kumar P, Sha Q, Ferrario CM, Sowers JR. Abrogation of oxidative stress improves insulin sensitivity in the Ren-2 rat model of tissue angiotensin II overexpression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288(2):E353-9.

Bloomer RJ, Larson DE, Fisher-Wellman KH, Galpin AJ, Schilling BK. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on resting and exercise-induced inflammatory and oxidative stress biomarkers: a randomized, placebo controlled, cross-over study. *Lipids Health Dis* 2009; 8:36.

Borghi C, Cicero AF. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: Their potential role in blood pressure prevention and management. *Heart Int* 2006; 2(2):98.

Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to Nutraceutical. *RU J Pharmacol* 2008; 585(2-3), 325-337.

Boveris A., Oshino N., Chance B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1972; 128(3): 617-630.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-54.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1978; 52:302-10.

Buñag RD. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. *J Appl Physiol* 1973; 34(2):279-82.

Burr ML, Fehily AM, Gilbert JF, Rogers S, Holliday RM, Sweetnam PM, Elwood PC, Deadman NM. Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989; 2(8666):757-61.

Burtis A et al. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1999.

C

Cadenas, E., Sies, H. The lag phase. *Free Radical Res* 1998; 28 (6):601-609.

Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Rev Nutr Diet* 2001;88:109-16.

Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 2006;83 (6 Suppl):1505S-1519S.

Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(5):816-823.

Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. En: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in enzymology*. New York: Academic, 1955; p.764-765.

Christon R, Haloui RB, Durand G. Dietary polyunsaturated fatty acids and aging modulate glutathione-related antioxidants in rat liver. *J Nutr* 1995; 125(12):3062-3070.

Cicero AF, Derosa G, Di Gregori V, Bove M, Gaddi AV, Borghi C. Omega 3 polyunsaturated fatty acids supplementation and blood pressure levels in hypertriglyceridemic patients with untreated normal-high blood pressure and with or without metabolic syndrome: a retrospective study. *Clin Exp Hypertens* 2010; 32(2):137-44.

Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 1970; 34:30-8.

Collen Smith, Allan D.Marks, Michael Lieberman. *Bioquímica básica de Marks, un enfoque clínico*. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U; 2006.

Conde SV, Nunes da Silva T, Gonzalez C, Mota Carmo M, Monteiro EC, Guarino MP. Chronic caffeine intake decreases circulating catecholamines and prevents diet-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Br J Nutr* 2012; 107(1):86-95.

Connor WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71(1 Suppl):171S-5S.

Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 293(4):H2009-23.

Cottin SC, Sanders TA, Hall WL. The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc Nutr Soc* 2011;70(2):215-31.

Cummings BP, Stanhope KL, Graham JL, Baskin DG, Griffen SC, Nilsson C, Sams A, Knudsen LB, Raun K, Havel PJ. Chronic administration of the glucagon-like peptide-1 analog, liraglutide, delays the onset of diabetes and lowers triglycerides in UCD-T2DM rats. *Diabetes* 2010;59(10):2653-61.

Cummings BP, Stanhope KL, Graham JL, Griffen SC, Havel PJ. Supplementation with EPA or fish oil for 11 months lowers circulating lipids, but does not delay the onset of diabetes in UC Davis-type 2 diabetes mellitus rats. *Br J Nutr* 2010; 104(11):1628-34.

D

De Ferranti S, Mozaffarian D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem* 2008; 54(6):945-55.

Delarue J, Couet C, Cohen R, Bréchet JF, Antoine JM, Lamisse F. Effects of fish oil on metabolic responses to oral fructose and glucose loads in healthy humans. *Am J Physiol* 1996;270(2 Pt 1):E353-62.

Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 2000;18(6):655-73.

Din JN, Newby DE, Flapan AD. Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease--fishing for a natural treatment. *BMJ* 2004; 328(7430):30-5.

Diplock AT, Charleux JL, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vina-Ribes J. Functional food science and defense against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 1998; 80 suppl 1: s77-112.

Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285(4):F619-28.

Donald B. Jump. The Biochemistry of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Biol Chem* 2002; 277(11): 8755-8.

Drabkin D and Austin J. Spectrophotometric Studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide hemoglobin and sulfhemoglobin. *J Biol Chem* 1935; 112:51.

Dunstan DW, Mori TA, Puddey IB, Beilin LJ, Burke V, Morton AR, Stanton KG. A randomised, controlled study of the effects of aerobic exercise and dietary fish on coagulation and fibrinolytic factors in type 2 diabetics. *Thromb Haemost* 1999; 81(3):367-72.

Durrington PN, Bhatnagar D, Mackness MI, Morgan J, Julier K, Khan MA, France M. An omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrate administered for one year decreased triglycerides in simvastatin treated patients with coronary heart disease and persisting hypertriglyceridaemia. *Heart* 2001; 85(5):544-8.

E

Ebbesson SO, Tejero ME, Nobmann ED, Lopez-Alvarenga JC, Ebbesson L, Romenesko T, Carter EA, Resnick HE, Devereux RB, MacCluer JW, Dyke B, Laston SL, Wenger CR, Fabsitz RR, Comuzzie AG, Howard BV. Fatty acid consumption and metabolic syndrome components: the GOCADAN study. *J Cardiometab Syndr* 2007; 2(4):244-9.

Eckel RH. The fish oil story remains fishy. *Circulation* 2010; 122(21):2110-2.

Egert S, Fobker M, Andersen G, Somoza V, Erbersdobler HF, Wahrburg U. Effects of dietary alpha-linolenic acid, eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid on parameters of glucose metabolism in healthy volunteers. *Ann Nutr Metab* 2008; 53(3-4):182-7.

El-Seweidy MM, Sadik NA, Shaker OG. Role of sulfurous mineral water and sodium hydrosulfide as potent inhibitors of fibrosis in the heart of diabetic rats. *Arch Biochem Biophys* 2011; 506(1):48-57.

Elsayed NM, Bendich A. Dietary antioxidants: potencial effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutr Res* 2001; 21:551-567.

Emeis JJ, van Houwelingen AC, van den Hoogen CM, Hornstra G. A moderate fish intake increases plasminogen activator inhibitor type-1 in human volunteers. *Blood* 1989; 74(1):233-7.

Engström K, Saldeen AS, Yang B, Mehta JL, Saldeen T. Effect of fish oils containing different amounts of EPA, DHA, and antioxidants on plasma and brain fatty acids and brain nitric oxide synthase activity in rats. *Ups J Med Sci.* 2009;114(4):206-13.

Eritsland J, Arnesen H, Seljeflot I, Kierulf P. Long-term effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on haemostatic variables and bleeding episodes in patients with coronary artery disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6(1):17-22.

Ernsberger P, Koletsky RJ, Friedman JE. Molecular pathology in the obese spontaneous hypertensive Koletsky rat: a model of syndrome X. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 892:272-88.

F

Farzaneh-Far R, Harris WS, Garg S, Na B, Whooley MA. Inverse association of erythrocyte n-3 fatty acid levels with inflammatory biomarkers in patients with stable coronary artery disease: The Heart and Soul Study. *Atherosclerosis* 2009; 205(2):538-43.

Fasching P, Ratheiser K, Waldhäusl W, Rohac M, Osterrode W, Nowotny P, Vierhapper H. Metabolic effects of fish-oil supplementation in patients with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1991; 40(5):583-9.

Fedor D, Kelley DS. Prevention of insulin resistance by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12(2):138-46.

Ferreira L, Teixeira-de-Lemos E, Pinto F, Parada B, Mega C, Vala H, Pinto R, Garrido P, Sereno J, Fernandes R, Santos P, Velada I, Melo A, Nunes S, Teixeira F, Reis F. Effects of sitagliptin treatment on dysmetabolism, inflammation, and oxidative stress in an animal model of type 2 diabetes (ZDF rat). *Mediators Inflamm* 2010;2010:592760.

Ferreri C, Chatgililoglu C. Membrane lipidomics and the geometry of unsaturated fatty acids from biomimetic models to biological consequences. *Methods Mol Biol* 2009; 579:391-411.

Ferrucci L, Cherubini A, Bandinelli S, Bartali B, Corsi A, Lauretani F, Martin A, Andres-Lacueva C, Senin U, Guralnik JM. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(2):439-46.

Finnegan YE, Howarth D, Minihane AM, Kew S, Miller GJ, Calder PC, et al. Plant and marine derived (n-3) polyunsaturated fatty acids do not affect blood coagulation and fibrinolytic factors in moderately hyperlipidemic humans. *J Nutr* 2003; 133(7):2210-2213.

Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 1975; 44:147-159.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; 114(12):1752-1761.

G

Garrel C, Alessandri JM, Guesnet P, Al-Gubory KH. Omega-3 fatty acids enhance mitochondrial superoxide dismutase activity in rat organs during post-natal development. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(1):123-31.

Gosmanova EO, Le NA. Cardiovascular Complications in CKD Patients: Role of Oxidative Stress. *Cardiol Res Pract* 2011;2011:156326.

Green P, Fuchs J, Schoenfeld N, Leibovici L, Lurie Y, Beigel Y, Rotenberg Z, Mamet R, Budowski P. Effects of fish-oil ingestion on cardiovascular risk factors in hyperlipidemic subjects in Israel: a randomized, double-blind crossover study. *Am J Clin Nutr* 1990;52(6):1118-24

H

Halliwell B. Protection against tissue damage in vivo by desferrioxamine: what is its mechanism of action?. *Free Radic Biol Med* 1989; 7(6):645-651.

Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280(1):1-8.

Hansen J, Grimsgaard S, Nordoy A, Bonna KH. Dietary supplementation with highly purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid does not influence PAI-1 activity. *Thromb Res* 2000;98(2):123-32.

Hanwell HE, Kay CD, Lampe JW, Holub BJ, Duncan AM. Acute fish oil and soy isoflavone supplementation increase postprandial serum (n-3) polyunsaturated fatty acids and isoflavones but do not affect triacylglycerols or biomarkers of oxidative stress in overweight and obese hypertriglyceridemic men. *J Nutr* 2009; 139(6):1128-34.

Hassanali Z, Ametaj BN, Field CJ, Proctor SD, Vine DF. Dietary supplementation of n-3 PUFA reduces weight gain and improves postprandial lipaemia and the associated inflammatory response in the obese JCR:LA-cp rat. *Diabetes Obes Metab* 2010; 12(2):139-47.

Havir EA, McHale NA. Enhanced-peroxidatic activity in specific catalase isozymes of tobacco, barley, and maize. *Plant Physiol* 1989;91(3):812-5.

Henriksen EJ. Exercise training and the antioxidant alpha-lipoic acid in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(1):3-12.

Hepburn FN, Exler J, Weihrauch JL. Provisional tables on the content of omega-3 fatty acids and other fat components of selected foods. *J Am Diet Assoc* 1986; 86(6):788-793.

Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; 74(1):214-26.

Holness MJ, Greenwood GK, Smith ND, Sugden MC. Diabetogenic impact of long-chain omega-3 fatty acids on pancreatic beta-cell function and the regulation of endogenous glucose production. *Endocrinology* 2003;144(9):3958-68.

Houstis N, Rosen ED, Lander ES. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 2006;440(7086):944-8.

Hussein G, Nakagawa T, Goto H, Shimada Y, Matsumoto K, Sankawa U, Watanabe H. Astaxanthin ameliorates features of metabolic syndrome in SHR/NDmcr-cp. *Life Sci* 2007; 80(6):522-9.

I

Inouye M, Mio T, Sumino K. Link between glycation and lipoxidation in red blood cells in diabetes. *Clin Chim Acta* 1999; 285(1-2):35-44.

Iraz M, Erdogan H, Ozyurt B, Ozugurlu F, Ozgocmen S, Fadillioglu E. Brief communication: omega-3 essential fatty acid supplementation and erythrocyte oxidant/antioxidant status in rats. *Ann Clin Lab Sci* 2005; 35(2):169-73.

Ishii Y, Ohta T, Sasase T, Morinaga H, Ueda N, Hata T, Kakutani M, Miyajima K, Katsuda Y, Masuyama T, Shinohara M, Matsushita M. Pathophysiological analysis of female Spontaneously Diabetic Torii fatty rats. *Exp Anim* 2010;59(1):73-84.

J

Jellema A, Plat J, Mensink RP. Weight reduction, but not a moderate intake of fish oil, lowers concentrations of inflammatory markers and PAI-1 antigen in obese men during the fasting and postprandial state. *Eur J Clin Invest* 2004; 34(11):766-73.

Jucker BM, Cline GW, Barucci N, Shulman GI. Differential effects of safflower oil versus fish oil feeding on insulin-stimulated glycogen synthesis, glycolysis, and pyruvate dehydrogenase flux in skeletal muscle: a ¹³C nuclear magnetic resonance study. *Diabetes* 1999;48:134-40.

K

Kajikawa S, Harada T, Kawashima A, Imada K, Mizuguchi K. Highly purified eicosapentaenoic acid prevents the progression of hepatic steatosis by repressing monounsaturated fatty acid synthesis in high-fat/high-sucrose diet-fed mice. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2009;80(4):229-38.

Kalogeropoulos N, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Rousinou G, Toutouza M, Stefanadis C. Unsaturated fatty acids are inversely associated and n-6/n-3 ratios are

positively related to inflammation and coagulation markers in plasma of apparently healthy adults. *Clin Chim Acta* 2010;411(7-8):584-91.

Kalupahana NS, Claycombe KJ, Moustaid-Moussa N. (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. *Adv Nutr* 2011;2(4):304-16.

Kasai H, Okada Y, Nishimura S, Rao MS, Reddy JK. Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator. *Cancer Res* 1989; 49(10):2603-2605.

Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000; 149(1):43-50.

Kim YJ, Chung HY. Antioxidative and anti-inflammatory actions of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in renal epithelial cells and macrophages. *J Med Food* 2007; 10(2):225-31.

Kinsella JE, Lokesh B, Stone RA. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Am J Clin Nutr* 1990; 52(1):1-28.

Kohen R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress--new approaches for their evaluation. *Biomed Pharmacother* 1999; 53(4):181-192.

Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2011;155(3):195-218.

Kromhout D, Giltay EJ, Geleijnse JM. n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2010; 363(21):2015-26.

L

Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schönbein GW. Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 1998;16(3):291-303.

Lam KW, Wang L, Hong BS, Treble D. Purification of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from bovine retina. *Curr Eye Res* 1993; 12(1):9-15.

Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Harris WS. Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6(12):753-8.

Lee R, Margaritis M, Channon KM, Antoniades C. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: Methodological aspects and considerations. *Curr Med Chem* 2012; 19(16):2504-2520.

Lee YS, Wander RC. Reduced effect on apoptosis of 4-hydroxyhexenal and oxidized LDL enriched with n-3 fatty acids from postmenopausal women. *J Nutr Biochem* 2005; 16(4):213-21.

Levine PH, Fisher M, Schneider PB, Whitten RH, Weiner BH, Ockene IS, Johnson BF, Johnson MH, Doyle EM, Riendeau PA. Dietary supplementation with omega-3 fatty acids prolongs platelet survival in hyperlipidemic patients with atherosclerosis. *Arch Intern Med* 1989;149(5):1113-6.

Levy E, Brunet S, Alvarez F, Seidman E, Bouchard G, Escobar E, Martin S. Abnormal hepatobiliary and circulating lipid metabolism in the Long-Evans Cinnamon rat model of Wilson's disease. *Life Sci* 2007; 80(16):1472-83.

Li JJ, Huang CJ, Xie D. Anti-obesity effects of conjugated linoleic acid, docosahexaenoic acid, and eicosapentaenoic acid. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52(6):631-45.

Liu JC, Conklin SM, Manuck SB, Yao JK, Muldoon MF. Long-chain omega-3 Fatty acids and blood pressure. *Am J Hypertens* 2011; 24(10):1121-6.

Lombardo YB, Chicco AG. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A review. *J Nutr Biochem* 2006;17(1):1-13.

López Farré Antonio, Macaya Carlos. Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3. *Rev Esp Cardiol* 2006; 6 Supl D: 31-7.

Lopez-Garcia E, Schulze MB, Manson JE, Meigs JB, Albert CM, Rifai N, Willett WC, Hu FB. Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J Nutr* 2004;134(7):1806-11.

M

Madsen T, Christensen JH, Blom M, Schmidt EB. The effect of dietary n-3 fatty acids on serum concentrations of C-reactive protein: a dose-response study. *Br J Nutr* 2003;89(4):517-22.

Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17(1):24-38.

Mata P, Varela O, Alonso R, Lahoz C, de Oya M, Badimon L. Monounsaturated and polyunsaturated n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(10):2088-2095.

Mataix JM, Gil A. Libro Blanco de los Omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados Omega 3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. Madrid: Médica panamericana, SA; 2004.

Mazière C, Dantin F, Conte MA, Degonville J, Ali D, Dubois F, Mazière JC. Polyunsaturated fatty acid enrichment enhances endothelial cell-induced low-density-lipoprotein peroxidation. *Biochem J* 1998; 336 (Pt 1):57-62.

McAnulty SR, Nieman DC, McAnulty LS, Lynch WS, Jin F, Henson DA. Effect of mixed flavonoids, n-3 fatty acids, and vitamin C on oxidative stress and antioxidant capacity before and after intense cycling. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2011; 21(4):328-337.

McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II. The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem* 1970; 245(6):1374-1377.

Mesa MD, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on the oxidizability and thrombogenicity of low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* 2004;175(2):333-343.

Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990; 8(1):95-108.

Misra HP and Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247(10):3170-3175.

Montegaard C, Tulk HM, Lauritzen L, Tholstrup T, Robinson LE. Acute ingestion of long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids decreases fibrinolysis in men with metabolic syndrome. *J Nutr* 2010;140(1):38-43.

Mori TA, Bao DQ, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ. Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects. *Am J Clin Nutr* 1999;70(5):817-825.

Mori TA. Omega-3 fatty acids and hypertension in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(9):842-846.

Morris MC, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation*. 1993; 88(2):523-533.

Mugabo Y, Mukaneza Y, Renier G. Palmitate induces C-reactive protein expression in human aortic endothelial cells. Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction. *Metabolism* 2011;60(5):640-648.

Muñoz MC, Giani JF, Dominici FP, Turyn D, Toblli JE. Long-term treatment with an angiotensin II receptor blocker decreases adipocyte size and improves insulin signaling in obese Zucker rats. *J Hypertens* 2009; 27(12):2409-2420.

N

Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Ichinoe A, Ohno M, Ide Y, Hirano S, Yoshimura D, Tominaga Y, Furuichi M, Sakumi K. Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011:101-111.

Nakano T, Sato M, Takeuchi M. Partial purification and properties of GPx from carp hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol B* 1992; 102(1):31-35.

Neschen S, Morino K, Rossbacher JC, Pongratz RL, Cline GW, Sono S, et al. Fish oil regulates adiponectin secretion by a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent mechanism in mice. *Diabetes* 2006; 55:924-928.

Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B, Betteridge DJ. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40(6):647-653.

Nov O, Kohl A, Lewis EC, Bashan N, Dvir I, Ben-Shlomo S, Fishman S, Wueest S, Konrad D, Rudich A. Interleukin-1beta may mediate insulin resistance in liver-derived cells in response to adipocyte inflammation. *Endocrinology* 2010; 151(9):4247-4256.

O

Oriani D.S, Sagardoy M.A. Lesiones en *Mus musculus* inoculados con *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium kansasii* y *Mycobacterium fortuitum* aislados de suelos pampeanos (República Argentina). *InVet [revista en Internet]* 2007; 9(1): 43-51.

Oteiza PA. Modificación activa de las proteínas. *Antioxidantes calid. vida* 1995; 2:12-20.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem* 2001; 49(10):4619-4626.

Oyatsi F, Whiteley CG. Interaction of superoxide dismutase with the glycine zipper regions of β -amyloid peptides: Is there an implication towards Alzheimer's disease and oxidative stress?. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2012; 1-7.

P

Pachikian BD, Essaghir A, Demoulin JB, Neyrinck AM, Catry E, De Backer FC, Dejeans N, Dewulf EM, Sohet FM, Portois L, Deldicque L, Molendi-Coste O, Leclercq IA, Francaux M, Carpentier YA, Fougelle F, Muccioli GG, Cani PD, Delzenne NM. Hepatic n-3 polyunsaturated fatty acid depletion promotes steatosis and insulin resistance in mice: genomic analysis of cellular targets. *PLoS One* 2011;6(8):e23365.

Park S, Park Y. Effects of dietary fish oil and trans fat on rat aorta histopathology and cardiovascular risk markers. *Nutr Res Pract* 2009; 3(2):102-7.

Pischon T, Hankinson SE, Hotamisligil GS, Rifai N, Willett WC, Rimm EB. Habitual dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids in relation to inflammatory markers among US men and women. *Circulation* 2003; 108(2):155-60.

Poudyal H, Panchal SK, Diwan V, Brown L. Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: Effects and emerging mechanisms of action. *Prog Lipid Res* 2011; 50(4):372-387.

Prasad K. Flaxseed and cardiovascular health. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009; 54(5):369-77.

Priyamvada S, Khan SA, Khan MW, Khan S, Farooq N, Khan F, Yusufi AN. Studies on the protective effect of dietary fish oil on uranyl-nitrate-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2010; 82(1):35-44.

Puglisi MJ, Hasty AH, Saraswathi V. The role of adipose tissue in mediating the beneficial effects of dietary fish oil. *J Nutr Biochem* 2011; 22(2):101-8.

Q

Qi NR, Wang J, Zidek V, Landa V, Mlejnek P, Kazdová L, Pravenec M, Kurtz TW. A new transgenic rat model of hepatic steatosis and the metabolic syndrome. *Hypertension* 2005; 45(5):1004-11.

R

Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation* 2003; 108(13):1546-1551.

Rector RS, Thyfault JP, Uptergrove GM, Morris EM, Naples SP, Borengasser SJ, Mikus CR, Laye MJ, Laughlin MH, Booth FW, Ibdah JA. Mitochondrial dysfunction precedes insulin resistance and hepatic steatosis and contributes to the natural history of non-alcoholic fatty liver disease in an obese rodent model. *J Hepatol* 2010; 52(5):727-36.

Ribau JC, Samis JA, Senis YA, Maurice DH, Giles AR, DeReske M, Absher PM, Hatton MW, Richardson M. Aortic endothelial cell von Willebrand factor content, and circulating plasminogen activator inhibitor-1 are increased, but expression of endothelial leukocyte adhesion molecules is unchanged in insulin-dependent diabetic BB rats. *Atherosclerosis* 2000;149(2):331-42

Richard MJ, Portal B, Meo J, Coudray C, Hadjian A, Favier A. Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clin Chem* 1992; 38(5):704-9.

Roberts WG, Gordon MH, Walker AF. Effects of enhanced consumption of fruit and vegetables on plasma antioxidant status and oxidative resistance of LDL in smokers supplemented with fish oil. *Eur J Clin Nutr* 2003;57(10):1303-10.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci* 2009; 84(21-22):705-12.

Rueda. F, Domingo J.C., Mach.N. Effect of omega-3 fatty acids and other food supplements on elderly-related pathological processes. *Rev Esp Nutr Hum Diet* 2010; 15(1):20-29.

Rusiñol AE, Lysak PS, Sigurdson GT, Vance JE. Monomethylethanolamine reduces plasma triacylglycerols and apolipoprotein B and increases apolipoprotein A-I rats without induction of fatty liver. *J Lipid Res* 1996; 37(11):2296-304.

Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol* 2009; 77(6):937-46.

Rybakowska I, Szreder G, Kaletha K, Barwina M, Waldman W, Sein Anand J. Reactive oxygen species and 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde in pathogenesis of Parkinson disease. *Przegł Lek* 2011;68(8):486-7.

S

Salvador Cabos Nieves. *Biología general del reactivo biológico*. En: Zúñiga M Jesús, Tur Marí Josep A, Millocco Silvana N, Piñeiro González Ramón. *Ciencia y Tecnología en protección animal y experimentación animal*. Madrid: McGrawHill; 2001. p.23-82.

Sanderson P, Calder PC. Dietary fish oil diminishes lymphocyte adhesion to macrophage and endothelial cell monolayers. *Immunology* 1998;94(1):79-87.

Saraswathi V, Gao L, Morrow JD, Chait A, Niswender KD, Hasty AH. Fish oil increases cholesterol storage in white adipose tissue with concomitant decreases in inflammation, hepatic steatosis, and atherosclerosis in mice. *J Nutr* 2007; 137(7):1776-82.

Saremi A, Arora R. The utility of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease. *Am J Ther* 2009; 16(5):421-36.

Sarmiento Méndez L. M, Roca-Cusachs Coll A, Arroyo Díaz J. A, Benet Gustà M. T, Solé Villa M. J, Franco Peral M. Comparación de las definiciones de síndrome metabólico según ATP III e IDF. *Rev Clin Esp* 2008;208:333-8.

Schmidt EB, Kristensen SD, De Caterina R, Illingworth DR. The effects of n-3 fatty acids on plasma lipids and lipoproteins and other cardiovascular risk factors in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1993;103(2):107-21.

Sener A, Zhang Y, Bulur N, Louchami K, Malaisse WJ, Carpentier YA. The metabolic syndrome of omega3-depleted rats II. Body weight, adipose tissue mass and glycemic homeostasis. *Int J Mol Med* 2009;24:125-9.

Sener G, Jahovic N, Tosun O, Atasoy BM, Yegen BC. Melatonin ameliorates ionizing radiation-induced oxidative organ damage in rats. *Life Sci* 2003; 74(5):563-572.

Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(5):349-61.

Shah KB, Duda MK, O'Shea KM, Sparagna GC, Chess DJ, Khairallah RJ, Robillard-Frayne I, Xu W, Murphy RC, Des Rosiers C, Stanley WC. The cardioprotective effects of fish oil during

pressure overload are blocked by high fat intake: role of cardiac phospholipid remodeling. *Hypertension* 2009; 54(3):605-11.

Sharp P, Rainbow S. Continuous glucose monitoring and haemoglobin A(1c). *Ann Clin Biochem* 2002; 39(Pt 5):516-7.

Singer P, Wirth M, Berger I, Voigt S, Gerike U, Gödicke W, Köberle U, Heine H. Influence on serum lipids, lipoproteins and blood pressure of mackerel and herring diet in patients with type IV and V hyperlipoproteinemia. *Atherosclerosis* 1985; 56(1):111-8.

Simao AN, Godeny P, Lozovoy MA, Dichi JB, Dichi I. Effect of n-3 fatty acids in glycemic and lipid profiles, oxidative stress and total antioxidant capacity in patients with the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2010; 54(5):463-469.

Simopoulos AP, Leaf A, Salem N, Jr. Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids. *J Am Coll Nutr* 1999; 18(5):487-489.

Spady DK. Regulatory effects of individual n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on LDL transport in the rat. *J Lipid Res* 1993; 34(8):1337-46.

Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest* 1993; 91(2):651-60.

Srivastava SK, Ansari NH. The peroxidatic and catalatic activity of catalase in normal and acatalasemic mouse liver. *Biochim Biophys Acta* 1980; 633(3):317-22.

Stern N, Osher E, Greenman Y. Hypoadiponectinemia as a marker of adipocyte dysfunction--part II: the functional significance of low adiponectin secretion. *J Cardiometab Syndr* 2007; 2(4):288-294.

Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem* 2001; 276(41):38084-38089.

Suzukawa M, Ishikawa T, Yoshida H, Nakamura H. Effect of in-vivo supplementation with low-dose vitamin E on susceptibility of low-density lipoprotein and high-density lipoprotein to oxidative modification. *J Am Coll Nutr* 1995;14(1):46-52.

T

Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, Ezaki O. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARalpha activation and ROS production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282(2):G338-48.

Tordjman J, Divoux A, Prifti E, Poitou C, Pelloux V, Hugol D, Basdevant A, Bouillot JL, Chevallier JM, Bedossa P, Guerre-Millo M, Clement K. Structural and inflammatory heterogeneity in subcutaneous adipose tissue: Relation with liver histopathology in morbid obesity. *J Hepatol* 2012; 56(5):1152-8.

Tretter L, Sipos I, Adam-Vizi V. Initiation of neuronal damage by complex I deficiency and oxidative stress in Parkinson's disease. *Neurochem Res* 2004; 29(3):569-77.

Tsai PJ, Lu SC. Fish oil lowers plasma lipid concentrations and increases the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in healthy men. *J Formos Med Assoc* 1997; 96(9):718-26.

V

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.

Vertechy M, Cooper MB, Ghirardi O, Ramacci MT. The effect of age on the activity of enzymes of peroxide metabolism in rat brain. *Exp Gerontol* 1993; 28(1):77-85.

Vignais PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(9):1428-59.

Vina J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Minana JB, Pallardo FV, et al. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 2000; 50(4-5):271-277.

W

Wang J, Shi GP. Mast cell stabilization: novel medication for obesity and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2011; 27(8):919-24

Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294(3):R673-80.

Wheater PR, Burkitt HG, Daniels VG. Hígado y páncreas. En: Wheeler PR, Burkitt HG, Daniels VG. *Histología Funcional. Texto y Atlas en color*. 2ªed. Barcelona: JIMS; 1987. p. 225-235.

Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 1990; 184(2):193-9.

Woodman RJ, Mori TA, Burke V, Puddey IB, Watts GF, Beilin LJ. Effects of purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on glycemic control, blood pressure, and serum lipids in type 2 diabetic patients with treated hypertension. *Am J Clin Nutr* 2002; 76(5):1007-1015.

Y

Yamada H, Yoshida M, Nakano Y, Suganami T, Satoh N, Mita T, Azuma K, Itoh M, Yamamoto Y, Kamei Y, Horie M, Watada H, Ogawa Y. In vivo and in vitro inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and endothelial adhesion molecules by eicosapentaenoic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28(12):2173-9.

Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA, Calder PC. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest* 2000; 30(3):260-74.

Yashodhara BM, Umakanth S, Pappachan JM, Bhat SK, Kamath R, Choo BH. Omega-3 fatty acids: a comprehensive review of their role in health and disease. *Postgrad Med J* 2009;85(1000):84-90.

Yessoufou A, Soulaïmann N, Merzouk SA, Moutairou K, Ahissou H, Prost J, Simonin AM, Merzouk H, Hichami A, Khan NA. N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. *Int J Obes (Lond)*. 2006; 30(5):739-50.

Young DS. Effects of disease on Clinical Laboratory Tests. 4th ed. Washington, DC: AACC Press; 2001.

Z

Zago V, Lucero D, Macri EV, Cacciagiú L, Gamba CA, Miksztowicz V, Berg G, Wikinski R, Friedman S, Schreier L. Circulating very-low-density lipoprotein characteristics resulting from fatty liver in an insulin resistance rat model. *Ann Nutr Metab* 2010; 56(3):198-206.

Zhou YE, Kubow S, Dewailly E, Julien P, Egeland GM. Decreased activity of desaturase 5 in association with obesity and insulin resistance aggravates declining long-chain n-3 fatty acid status in Cree undergoing dietary transition. *Br J Nutr* 2009; 102(6):888-94.

Zorrilla García Adonis E, Eirez Izquierdo Mayté, Izquierdo Expósito Moreisby. Role of the free radicals on DNA: carcinogenesis and antioxidant therapy. *Rev Cubana Invest Bioméd* 2004; 23(1): 51-57.