

Universidad de la Laguna

Escuela de Doctorado y Estudios de Posgrado

Departamento de Medicina Interna, Dermatología y Psiquiatría y

Departamento de Biología Animal, Edafología y Geología

Búsqueda de biomarcadores preclínicos de enfermedad renal crónica (ERC) en el perfil lipídico del riñón de ratones macho y hembra obesos y hembras obesas ovariectomizadas

Searching for preclinical biomarkers of chronic kidney disease (CKD) in the lipid profile of the kidney of obese male and females and ovariectomized obese female mice



Trabajo de Fin de Máster

Aarón Afonso Ali

Tutorizado por Esteban Porrini y Nieves Guadalupe Acosta González

Co-supervisado por Covadonga Rodríguez González

Máster en Biomedicina. Septiembre 2021

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	1
3. INTRODUCCIÓN	2
3.1 Asociación entre el síndrome metabólico y enfermedad renal crónica.	2
3.2 Generalidades sobre los lípidos y su potencial patogénico en procesos de enfermedad. .	3
3.3 Relación entre los ácidos grasos y la inflamación.	6
3.4 Lipotoxicidad renal	9
5. OBJETIVOS	10
5.1. Objetivo general.	10
5.2 Objetivos específicos.	10
6. MATERIAL Y MÉTODOS	11
6.1 Diseño experimental y dietas	11
6.2 Extracción de lípido total.	13
6.3. Extracción lipídica de los piensos.....	14
6.4 Determinación de las clases lipídicas.	14
6.5 Determinación del perfil de ácidos grasos (FAMEs).	15
6.6 Determinación del perfil de ácidos grasos en cada clase lipídica (FAMEs).	16
6.7 Análisis estadísticos.	18
7. RESULTADOS	20
7.1 Perfil de ácidos grasos de los piensos	20
7.2 Perfil de clases lipídicas del tejido renal de ambos sexos en condiciones control.	21
7.4 Perfil de clases lipídicas del tejido renal de los grupos HFD, SD-OVX y HFD-OVX.	25
7.5 Perfil de ácidos grasos en las clases lipídicas seleccionadas.	26
7.6 Reducción de dimensiones de las variables y caracterización de los individuos en las componentes (PCA).....	36
8. DISCUSIÓN	40
8.1 Principales hallazgos del estudio.	40
8.2 Comparación con otros estudios y fisiopatología asociada a los perfiles.	42
8.3 Limitaciones del estudio	47
9. CONCLUSIONES	48
10. AGRADECIMIENTOS	48
11. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA	49
12. ANEXOS	53

1. RESUMEN

Se sospecha que la obesidad puede contribuir al desarrollo de la enfermedad renal crónica, sin embargo, no se conocen biomarcadores que predigan su transcurso, lo que supone un importante impedimento a la hora de desarrollar un correcto pronóstico para revertir su progresión, además, existen ciertas evidencias de que la menopausia puede contribuir y empeorar la situación de dislipemia asociada a la obesidad en la patología renal. En el presente estudio, se partió de un modelo animal de ratón donde se le aplicó una dieta con alto contenido en grasas (HFD) durante 6 meses. El experimento estuvo segregado por sexos, donde además, a un grupo de hembras se les retiraron los ovarios para simular la condición de menopausia. Se realizó un mapeo exhaustivo del perfil lipídico del tejido renal de todos los grupos, aislando e identificando los ácidos grasos esterificados en 4 clases lipídicas mayoritarias, 3 tipos de fosfolípidos y los triglicéridos, con el fin de encontrar posibles variaciones que pudieran servir como biomarcadores. Los resultados manifestaron varios candidatos a biomarcadores lipídicos, de los que se extrajeron índices que podrían servir como indicadores de estrés oxidativo y predisposición proinflamatoria en ambos sexos: el índice 16:0/18:1n-9 de los triglicéridos, el índice ARA/DGLA en el perfil general y un plasmalógeno de etanolamina (18:0 DMA). Además, las conclusiones obtenidas a partir del análisis lipidómico sugieren que la menopausia puede potenciar los efectos nocivos de la obesidad y contribuir a la progresión de la enfermedad renal crónica.

Palabras clave: Obesidad, enfermedad renal crónica, menopausia, biomarcadores lipídicos predictivos, índice 16:0/18:1n-9, índice ARA/DGLA, plasmalógeno de etanolamina.

2. ABSTRACT

It is known obesity can affect the development of chronic kidney disease; however, no potent biomarkers are known to predict the course of this, which is an important impediment to develop a correct prognosis to reverse its progression, in addition, there is certain evidence that menopause can contribute to and worsen the situation of dyslipidemia associated with obesity in the kidney pathology. In the present study, we started from a mouse animal model fed a diet with a high fat content (HFD) applied for 6 months. The experiment was segregated by sexes, in addition, the ovaries of one female group were removed to simulate the condition of menopause. An exhaustive mapping of lipid profiles as well as the fatty acid extraction and identification of 4 major lipid classes, 3 phospholipids and triglycerides, was carried out in kidney tissue of all groups assayed,

so as to find possible variations that could serve as biomarkers. The results revealed possible candidates for lipid biomarkers from which indices were extracted that could serve as indicators of oxidative stress and pro-inflammatory predisposition in both sexes: the 16:0/18:1 n-9 index, the ARA/DGLA index and an ethanolamine plasmalogen (18:0 DMA). In addition, the conclusions obtained from the lipidomic analysis suggest that menopause can potentiate the harmful effects of obesity and contribute to the progression of chronic kidney disease.

Key words: Obesity, chronic kidney disease, menopause, predictive lipid biomarkers, 16:0/18:1 n-9 index, ARA/DGLA index, ethanolamine plasmalogen.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Asociación entre el síndrome metabólico y enfermedad renal crónica.

El síndrome metabólico (SM) es una condición caracterizada por la presencia de al menos 3 de los siguientes factores: aumento de la presión arterial, intolerancia a la glucosa o diabetes, niveles elevados de triglicéridos (TAG), baja concentración de proteínas de alta densidad (HDL), un estado proinflamatorio y protrombótico persistente y una relación oxidativa/antioxidante alterada (Gluba et al., 2013). Desde hace unos años, diferentes estudios han demostrado una clara relación entre el SM y el riesgo de desarrollar hipertensión, resistencia a la insulina y una mayor tasa de proteinuria y albuminuria, factores a su vez asociados a una peor función renal (Francisco et al., 2018; Praga, 2006).

En la glomerulopatía asociada a la obesidad se producen daños que van más allá de desajustes metabólicos (dislipemia o la diabetes) o hemodinámicos (hipertensión arterial), donde un acúmulo de lípidos ectópicos en las células renales (mesangiales, tubulares y podocitos) produce un fenómeno conocido como “lipotoxicidad”, aumentando la tensión glomerular, transformando las células mesangiales en células espumosas (llenas de lípido y atrofiadas), produciendo resistencia a la insulina y atrofia de los podocitos, un aumento de la gluconeogénesis en las células tubulares, albuminuria y proteinuria (Ertunc & Hotamisligil, 2016). Además, la sobreexpresión de la enzima COX-2 en el tejido vascular renal y la síntesis aumentada de citoquinas y eicosanoides proinflamatorios, como PGE2, PGD2 y TXA2, da lugar a un ambiente oxidante y citotóxico, sometiendo a las células renales a una situación cada vez más alejada de la

homeostasis y contribuyendo a la pérdida lenta y progresiva de la función renal, lo que se conoce como enfermedad renal crónica (ERC) (Dasilva & Medina, 2019; Imig, 2006).

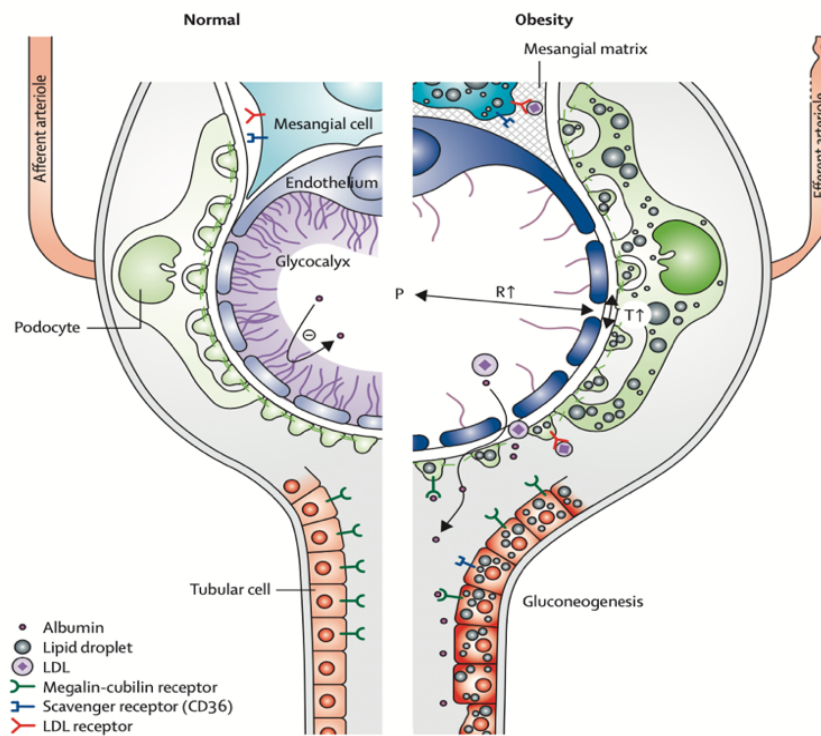


Figura 1. Fisiopatología del glomérulo renal causado por el acúmulo de lípidos ectópicos en la ERC (Vries et al., 2014)

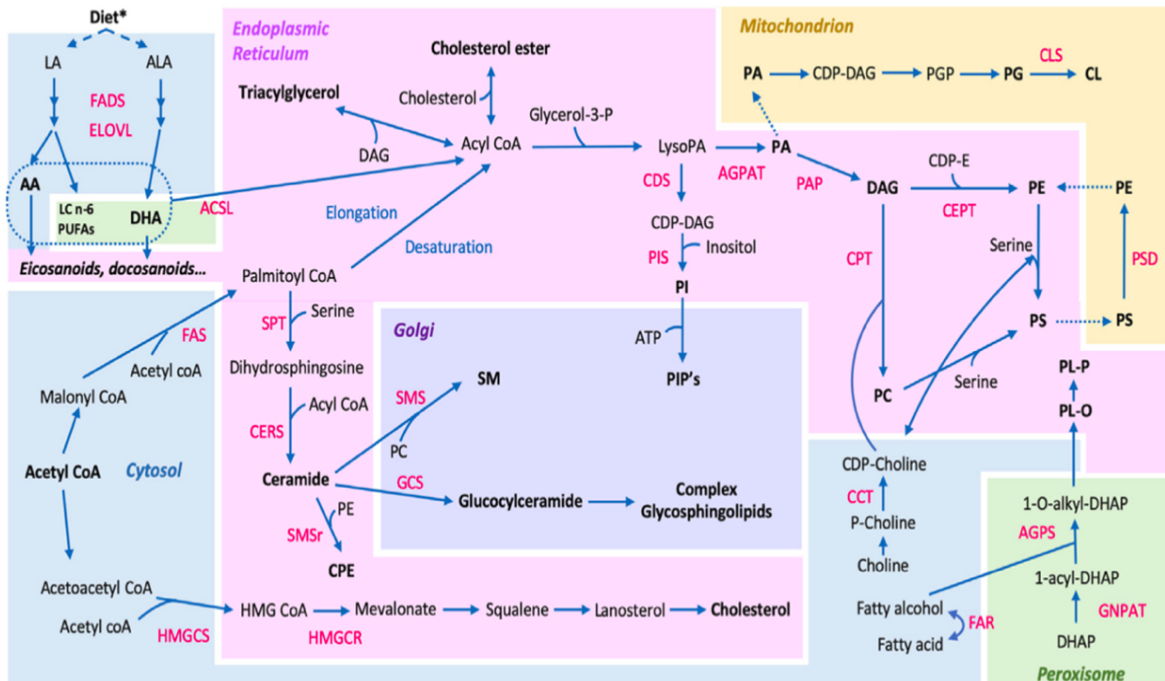
A pesar de los esfuerzos, aún se desconoce la patogenia del daño renal en la obesidad/SM (Gluba et. al., 2013; Vries et al., 2014), además, se ha observado que la ERC tiene una prevalencia considerable en las mujeres postmenopáusicas con SM, por lo que los estrógenos producidos en las células del folículo ovárico podrían tener un efecto protector en el tejido renal ante un aumento desproporcionado de colesterol, LDL, VLDL y triglicéridos (TAG) (Ahmed, 2017). A pesar de que existe una amplia bibliografía sobre los lípidos ectópicos y su patogénesis en la ERC, los cambios en los lípidos estructurales y el mapeo de la esterificación de los ácidos grasos en cada clase lipídica no han sido bien estudiados, centrándose la mayoría de los ensayos en la caracterización de colesterol, lipoproteínas, TAG y ácidos grasos libres (Henry et al., 2021; Gai et al., 2019; Bulbul et al., 2018).

3.2 Generalidades sobre los lípidos y su potencial patogénico en procesos de enfermedad.

Los fosfolípidos, junto al colesterol, controlan la mayoría de los parámetros físicos de las membranas celulares; como la fluidez, la permeabilidad, la curvatura, la tensión, el

empaquetamiento, el grosor y, por consiguiente, también el comportamiento de las proteínas integrales (Bestard-Escalas et al., 2019), por lo que una alteración a nivel de membrana podría desembocar en cambios drásticos en la dinámica y estructura celular, que podrían ser clave en el transcurso de la enfermedad.

Figura 2. Principales rutas de metabolismo, movilización y biosíntesis de las diferentes clases lipídicas (Bestard-Escalas et al., 2019)



Los fosfolípidos y triacilglicéridos pueden sintetizarse de novo a partir de precursores comunes de ácido fosfatídico o diacilglicerol mediante la denominada "vía Kennedy". El ácido fosfatídico se sintetiza mediante la adición sucesiva de dos acil-CoAs grasos al glicerol-3-fosfato, un producto de la glucólisis. Luego, el ácido fosfatídico se puede convertir en CDP-diacilglicerol, que se usa en la síntesis de fosfatidilinositol o cardiolipina, o se puede desfosforilar en diacilglicerol para la síntesis de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, así como triacilglicerol. Las cabezas polares de fosfatidiletanolamina, colina y serina pueden interconvertirse mediante reacciones de intercambio, descarboxilación y metilación. El equilibrio entre el ácido fosfatídico (PA) y el diacilglicerol (DAG) es un centro metabólico que une la síntesis de los principales fosfolípidos y triacilglicéridos.

Se ha demostrado, tanto in vitro como in vivo, que exponer a las membranas de mamíferos a lípidos de la dieta, conduce a una robusta remodelación del lipidoma en un intento de salvaguardar las propiedades físicas y preservar los fenotipos funcionales de las mismas (Levental et al., 2020; Zárte et al., 2017). Los ensayos realizados con ácidos grasos de cadena larga altamente insaturados (LC-PUFA) han mostrado que éstos se incorporan a las membranas plasmáticas, sugiriendo que la maquinaria de esterificación de las células de mamífero clasifica a los lípidos dietarios con un patrón general y consistente, incorporando a sus fosfolípidos preferentemente aquellos ácidos grasos que poseen alto número de carbonos (mayor o igual a 20 átomos de carbono) e insaturaciones

(3 ó más); como EPA (eicosapentaenoico; 20:5n-3), DHA (docosahexaenoico; 22:6n-3) y ARA (araquidónico; 20:4n-6), en la posición sn2 y un ácido graso saturado; como palmítico o esteárico, en la posición sn1. En los TAG, sin embargo, se esterifican preferentemente aquellos ácidos grasos con menor estado oxidativo o mayor estado energético, es decir, los saturados con 18 o menos átomos de carbono; como el palmítico (16:0) y el esteárico (18:0), monoinsaturados; como el oleico (18:1n-9), diinsaturados como el linoleico (18:2n-6) e incluso triinsaturados, como el linolénico (18:3n-3), aunque estos dos últimos también poseen un carácter estructural, pudiendo empaquetarse como fosfolípidos (Chen et al., 2020; Bestard-Escalas et al., 2019).

Los DMAs (dimetil-acetales) son compuestos derivados de la transmetilación en el proceso de conversión y volatilización de los ácidos grasos en ésteres metílicos de ácidos grasos (del inglés FAMES). Estos compuestos, en su forma biológica, se encuentran empaquetados en la célula en forma de lo que se conoce como plasmalógenos, y a diferencia de los ácidos grasos presentes en glicerofosfolípidos comunes (que se unen al esqueleto de glicerol mediante enlaces tipo éster), los plasmalógenos contienen una cadena de alquilo unida a vinil-éter en la posición sn-1 y, típicamente, una cadena de acilo graso poliinsaturado en la posición sn-2 (Paul & Meikle, 2019). En las vainas de mielina de la sustancia blanca de los plexos nerviosos, abundan los plasmalógenos de etanolamina (PlsEtn), mientras que en el músculo cardiaco abundan los de colina (PlsCho) (Braverman & Moser, 2012). La presencia de plasmalógenos también se ha relacionado directamente con el factor activador de plaquetas y con importantes actividades mediadoras de protección en patologías cardimetaabólicas y neurodegenerativas (Dorninger et al., 2020, Paul et al., 2019, Braverman & Moser, 2012), pero no han sido estudiados en la ERC.

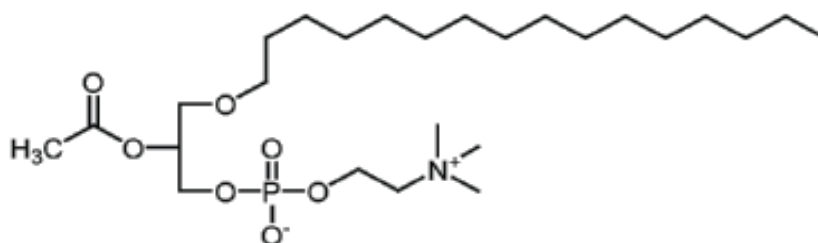


Figura 3. Estructura química de un plasmalógeno de fosfatidiletanolamina (Carrero & Herráez, s.f)

La dinámica de esterificación de los ácidos grasos y plasmalógenos en diferentes clases lipídicas no es homogénea, sino que varía de acuerdo con sus funciones y dependiendo de diversos factores, como por ejemplo la dieta, la actividad metabólica del tejido y la

estructura espacial y funcional de la célula, entre otras (Yang & Fairn, 2018), lo que sugiere que este perfil también podría ser susceptible a modificarse durante el transcurso de una enfermedad o una dieta desbalanceada (Zárate et al., 2017).

3.3 Relación entre los ácidos grasos y la inflamación.

El equilibrio entre los ácidos grasos omega 3 (n-3) y omega 6 (n-6), sobretodo de los LC-PUFA n-6; como ARA y n-3; como EPA y DHA, tiene repercusión directa en la mayoría de los procesos fisiológicos a diferentes niveles.

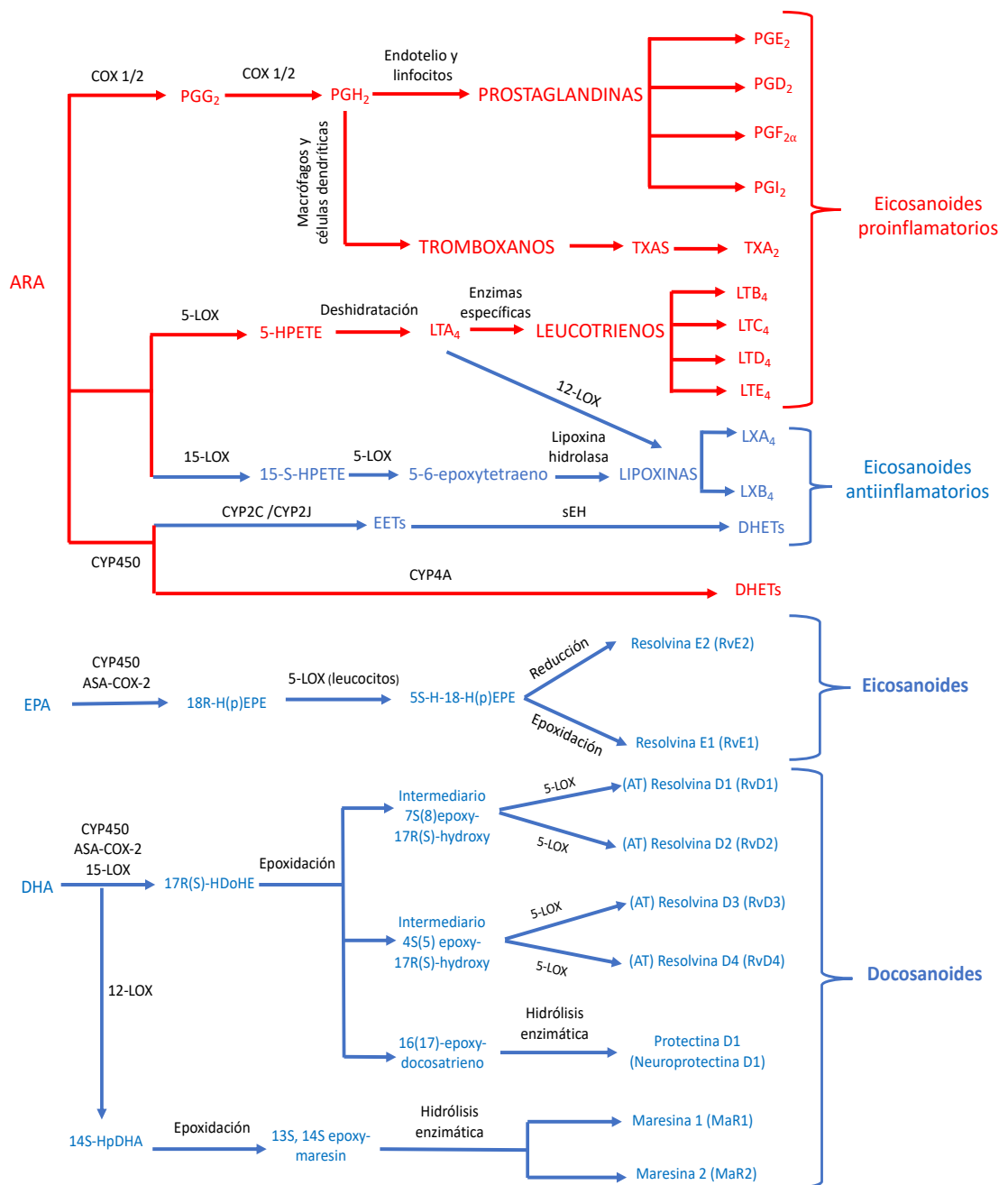


Figura 4. Síntesis de los principales eicosanoides derivados de ARA (modificado de Cantu et al., 2017) y eicosanoides y docosanoides derivados de EPA y DHA (modificado de Serhan & Levy, 2018)

Estos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (del inglés, LC-PUFA), pueden interactuar con factores de transcripción nucleares que controlan mecanismos críticos para la vida, entre ellos: factores moduladores de la inflamación del sistema kappa B (NF-kB), factores moduladores de receptores que intervienen en la homeostasis lipídica, la lipogénesis y el nivel de TAG en plasma; como la proteína de unión a elementos reguladores de esterol (SREBP) y el receptor activador de la proliferación del peroxisoma (PPARs) (Zárate et al., 2017). El ARA es el precursor de un número elevado de sustancias proinflamatorias como leucotrienos (LTs); prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs) (Cantu et al., 2017), mientras que EPA y DHA son precursores de otros eicosanoides y docosanoideos con propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y antiarrítmicas, como las maresinas (MRs), protectinas (PDs) y resolvinas (RVs). Diferentes estudios han demostrado que el equilibrio entre ambos derivados n-3 y n-6 determinan en gran proporción, junto al sistema NF-kB (Dasilva & Medina, 2019), la intensidad y duración de la respuesta inflamatoria (Serhan & Levy, 2018).

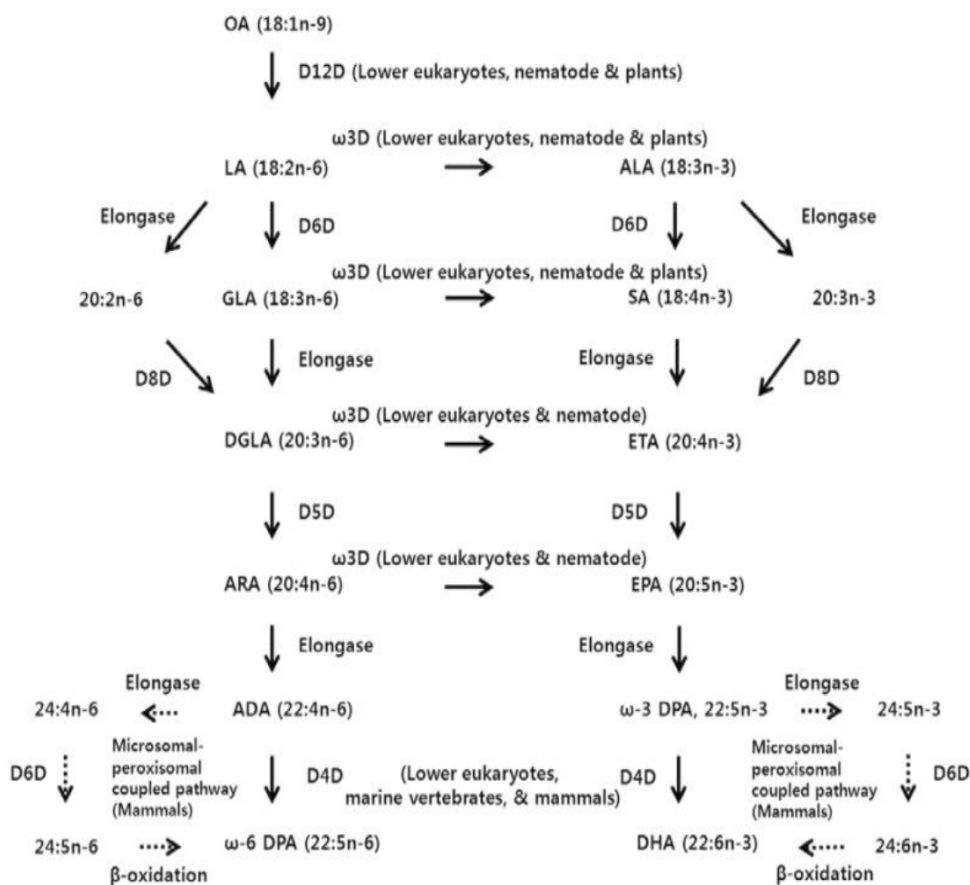


Figura 5. Ruta de biosíntesis de los ácidos grasos n-6 y n-3 LC-PUFA desde sus precursores (Lee et al., 2016)

La mayoría de los herbívoros terrestres (u omnívoros, en el caso del ser humano) poseen la maquinaria enzimática (elongasas-desaturasas) que permiten la síntesis de ARA, EPA y DHA a partir de sus precursores vegetales de 18 carbonos; el ácido linoleico (LA, 18:2n-6) para dar lugar a ARA (20:4n-6) y el ácido linolénico (ALA, 18:3n-3) para dar lugar a EPA (20:5n-3), y este a su vez a DHA (22:6n-3). Las enzimas permiten la elongación y desaturación de los precursores 18C, pero no hay descritos procesos que regulen su afinidad hacia ALA o LA, de tal manera que ambos tipos de enzimas actúan indistintamente para ambos sustratos, estando ligeramente aumentada hacia la síntesis de ARA en animales terrestres y hacia la síntesis de EPA en animales marinos (Lee et al., 2016). Por otro lado, los estudios realizados hasta la fecha indican que la capacidad para producir EPA y especialmente DHA a partir de sus precursores es muy limitada en el ser humano (Burdge & Calder, 2005; Brenna, 2002), lo que dificulta poder regenerar perfiles tisulares de ácidos grasos que se ven modificados en determinadas patologías (Zárate et al., 2017).

Se estima que para un efecto óptimo en la salud, el aporte lipídico dietario debe tener un ratio omega 6:omega 3 en una proporción 5:1, sin embargo, debido al actual consumo excesivo por parte de la población occidental, de carnes de herbívoros terrestres y derivados de semillas oleaginosas como pastas, productos derivados del maíz, girasol, trigo, soja y cebada (altamente ricos en omega 6, como el ácido linoleico), acompañado de un bajo consumo de productos de origen marino y productos vegetales de hoja verde (ricos en omega 3, como el EPA y DHA o el ácido linolénico), ha producido que esta proporción se encuentre actualmente en torno a 25:1 (Zárate et al., 2017), lo que se traduce en una predisposición hacia un estado metabólico proinflamatorio y protrómbico, suponiendo un importante factor de riesgo en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Khan et al., 2021; AbuMweis et al., 2021; Jang & Park., 2020), y que incluyen a la reciente enfermedad covid-19 (Chang et al., 2020).

En esta línea, los ácidos grasos omega 3 y 6 podrían actuar potencialmente como marcadores preclínicos de daño renal, debido a que su composición en los tejidos está condicionada fundamentalmente por la dieta, y sus efectos fisiológicos sobre la inflamación y regulación en multitud de mecanismos inherentes a la vida (más allá que el mero aporte de propiedades físicas a la membrana), han sido demostrados en diferentes enfermedades, desde el cáncer, hasta el Alzheimer (Zárate et al., 2017). Por otro lado, tanto los fosfolípidos como los triglicéridos interactúan con otras moléculas orgánicas

y pueden actuar como potentes señales para regular la transcripción de elementos esenciales para la vida (Mecatti et al., 2020; Afshinnia et al., 2018), lo que abre las puertas a la lipidómica para dilucidar la posible relación de la enfermedad renal crónica y el perfil de clases lipídicas y de ácidos grasos del tejido renal.

3.4 Lipotoxicidad renal

A pesar de que las vías por las que la obesidad inducen a desarrollar ERC son desconocidas, la fisiopatología asociada a la lipotoxicidad renal producida por el acúmulo de lípidos ectópicos ha sido estudiada en distintos modelos celulares y animales (murino y grandes animales) y en humanos. En todos los casos, se observó que la obesidad se asociaba a glomerulomegalia (hipertrofia de los glomérulos), que da lugar a hiperfiltración y a un aumento de la tensión glomerular. Estas condiciones inducen un proceso de compensación de las fuerzas, que produce hipertrofia de los podocitos con el fin de cubrir las secciones agrandadas y desnudas del mechón capilar, sin embargo, estas células no son capaces de adaptarse de una manera correcta, produciendo glomeruloesclerosis segmentaria focal secundaria, que da lugar finalmente al desprendimiento del mechón capilar y la pérdida de funcionalidad del glomérulo (Ertunc & Hotamisligil, 2016; Vries et al., 2014).

La situación de lipotoxicidad se ve agravada también por la presencia de metabolitos de lípidos tóxicos como diacilglicéridos y ceramidas, que cambian el ambiente redox a un estado más oxidado, reduciendo la función mitocondrial y su capacidad de oxidar lípidos (Vries et al., 2014). El exceso de ácidos grasos libres trasladados desde la albúmina hepática activa otro proceso de adaptación centrado en la expresión de receptores mTOR y receptores LDL, ApoB y ApoE en un intento de compensar la absorción de sodio y albúmina. Estas señales inducen al crecimiento y activación continua de rutas anabólicas como la gluconeogénesis tubular, que desemboca en un aumento de la resistencia a la insulina y la estimulación en la captación de ácidos grasos libres, aumento de tensión de los podocitos e hiperfiltración. La inflamación a través de la liberación de IL-6 y TNF- α por parte de los monocitos en el tejido renal, cumple un rol fundamental en la fisiopatología, ya que evita la regulación normal de la retroalimentación del receptor de LDL, lo que conduce a una acumulación de lípido sin oposición y a la inducción de los efectos nocivos antes mencionados (Vries et al., 2014). Existen muchas evidencias de que la grasa ectópica hepática está asociada a la ERC, lo que sugiere que una condición que da lugar al clásicamente conocido como “hígado graso”, podría producir también

lipotoxicidad glomerular, patología a la que recientemente le ha sido otorgado el nombre de “riñón graso”.

Sin embargo, la patogenia de la lipotoxicidad a nivel renal no se conoce con detalle, por lo que un análisis lipidómico exhaustivo del tejido renal en la obesidad podría dar una idea tanto de las causas de daño renal asociadas al depósito de lípidos como de posibles biomarcadores de enfermedad renal.

4. HIPÓTESIS

- La obesidad induce un distinto perfil lipidómico en el tejido renal, en especial en su perfil de clases lipídicas, y en el perfil de ácidos grasos de los lípidos totales y de los ácidos grasos esterificados en las distintas clases lipídicas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

- Obtener biomarcadores lipídicos útiles a partir de los cambios que se producen en el perfil de clases lipídicas y de ácidos grasos de diferentes fosfolípidos de membrana y triglicéridos renales cuando se administra una dieta comercial (SD) y una dieta con alto contenido calórico (HFD).

5.2 Objetivos específicos.

- Verificar si la actividad metabólica y susceptibilidad inflamatoria en base a la lipidómica renal varía dependiendo del sexo.
- Determinar cuál es la dinámica de esterificación de los ácidos grasos entre clases lipídicas polares y neutras y si ésta varía entre ambos sexos.
- Verificar si se producen alteraciones en el perfil de clases lipídicas y de ácidos grasos esterificados dentro de las mismas clases lipídicas, con la administración de la dieta HFD. Observar además, si estas alteraciones dan lugar a un perfil más proinflamatorio o protrómbico.
- Verificar si la retirada de los ovarios en hembras favorece el perfil lipídico inflamatorio tras la administración de una dieta hipercalórica.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental y dietas

El presente trabajo forma parte de un proyecto en marcha, con financiación competitiva, financiado por el ISCIII, FIS PI19/01756; IP: Esteban Porrini, Co-IP: Manuel Hernández Guerra, colaboradores, Ana Rodríguez Rodríguez, Sergio Luis Lima, del Laboratorio de Función Renal de la Facultad de Medicina de la ULL, del que recientemente se ha hecho una publicación que ha sido aceptada. La mayor parte del análisis lipídico que se presenta en este estudio se realizó en el laboratorio del grupo Nuthralipids, en el departamento de Biología Animal, Edafología y Geología de la ULL bajo la supervisión de la Dra Covadonga Rodríguez González. En el presente estudio, se trabajó con muestras de extracto de lípido total y con datos previos de perfiles de clases lipídicas de tejido renal de diferentes ratones (*Mus musculus*) de la cepa consanguínea B57BL/6, por su alta susceptibilidad a la obesidad inducida por la dieta y su fondo genético estable y conocido (The Jackson Laboratory, s.f.). A partir de estos extractos lipídicos, el autor del trabajo realizó el aislamiento de las distintas clases lipídicas de interés, la obtención e identificación de los perfiles de ácidos grasos de las mismas, y el tratamiento estadístico de los datos, además de la elaboración del presente documento.

El equipo perteneciente al proyecto antes nombrado se encargó de la estabulación durante el periodo que duró la experimentación, así como del sacrificio de los animales y de la extracción del lípido total. Los animales fueron sacrificados tras 6 meses de experimentación en el Animalario del Servicio General de Apoyo a la Investigación (SEGAI) de la Universidad de La Laguna, siguiendo el diseño experimental que se describe a continuación.

Se extrajeron muestras de un total de 95 animales, de los que se seleccionaron 24 para este trabajo, 8 machos (M) y 16 hembras (F). Los ratones de aproximadamente 6 semanas de edad al inicio del estudio, fueron alojados en jaulas a 22 °C, bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 h y una humedad relativa del 50%. El cuidado de los animales se llevó a cabo de acuerdo con las directrices institucionales en cumplimiento del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, (BOE, 8 de febrero de 2013, n: 34, p. 11370-11421) y las leyes y políticas internacionales (Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010), relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, y aprobadas por el Comité de Ética de la Investigación y de Bienestar Animal (CEIBA) de la Universidad de La Laguna, España.

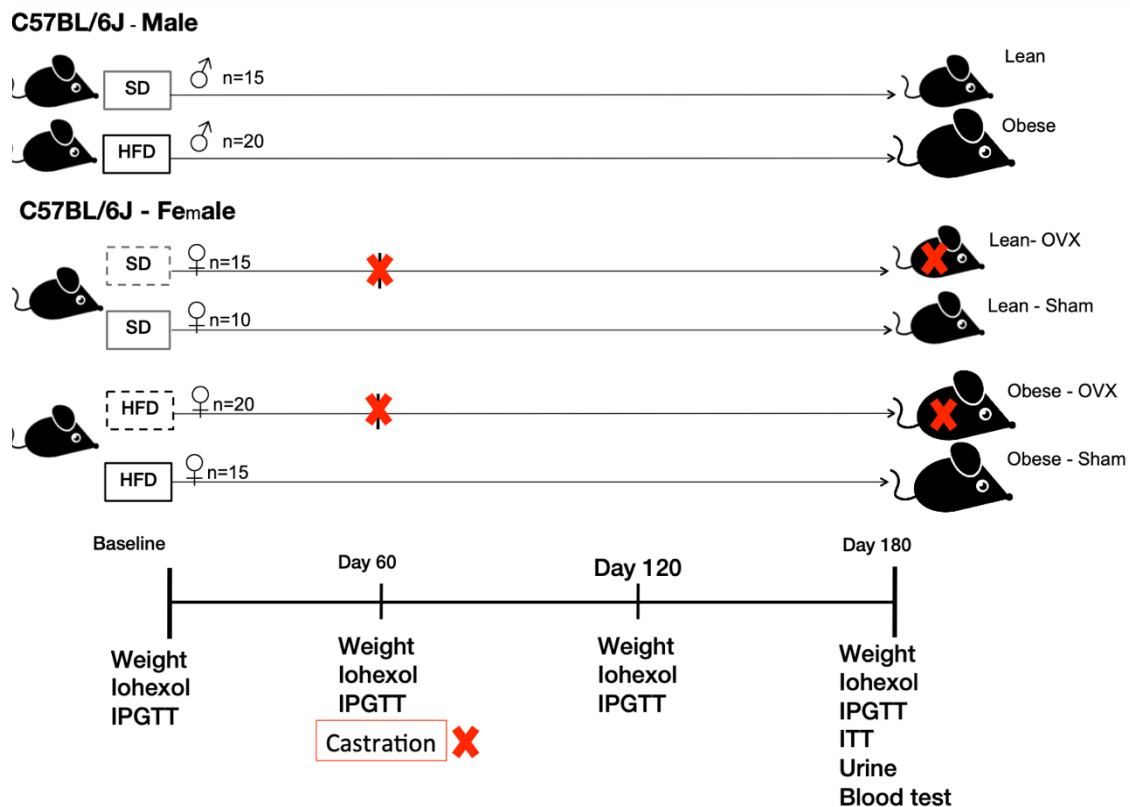


Figura 6. Diseño experimental

Los ratones fueron alimentados ad libitum con agua y con una dieta alta en grasas (HFD), para inducir la obesidad o con una dieta estándar (SD). En la HFD, las calorías proceden de las proteínas (20%), los hidratos de carbono (20%) y las grasas (60%), incluyendo 232 mg de colesterol (manteca de cerdo y colorante azul); para un total de 5,24 kcal por gramo (Research Diets, D12492). En SD, las calorías proceden de las proteínas (20%), los hidratos de carbono (67%) y las grasas (13%) (Teklad global diet, Envigo). Los animales fueron pesados una vez a la semana. Antes de cada procedimiento, se realizaron también pruebas de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT), pruebas de tolerancia a la insulina (ITT) y función renal, con el aclaramiento plasmático de iohexol. Para recoger la orina de 24 horas, los ratones se alojaron en jaulas metabólicas antes de finalizar el experimento. La albúmina y la creatinina urinarias se determinaron mediante ensayos comerciales (Exocell, Philadelphia, PA; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Los ratones fueron sacrificados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/kg).

Se recogió la sangre y se separó el suero. Se pesaron los riñones, de manera que uno fue inmediatamente congelado a -80°C, para el análisis lipídico que constituye el objetivo de este estudio, y el otro se incrustó en parafina para análisis histológicos. La duración

del experimento fue de 180 días. En el día 60, un grupo de ratones hembra fueron ovariectomizados (OVX). Así, se estudiaron 2 grupos de machos (M-SD y M-HFD) y 4 de hembras (F-SD, F-SD-OVX, F-HFD y F-HFD-OVX), que han sido tratados por separado.

En los análisis del perfil de clases lipídicas y el perfil de ácidos grasos del lípido total previamente realizados y cedidos por los investigadores Ana Rodríguez Rodríguez y Sergio Luis Lima, se seleccionaron todos los animales disponibles por grupo. Sin embargo, para el presente trabajo, nos centramos en el mapeo de los ácidos grasos esterificados en las clases lipídicas, donde se ha escogido un subgrupo de 4 individuos por tratamiento ($n = 4$) y analizado el perfil de los ácidos grasos esterificados en 4 clases lipídicas mayoritarias y aisladas de cada extracto de lípido total: fosfatidilcolina (PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y triglicéridos (TAG), de tal manera que el número total de perfiles de ácidos grasos procesados fue de 96 (4 individuos x 6 tratamientos x 4 clases lipídicas).

6.2 Extracción de lípido total.

Todos los procesos descritos a continuación se realizaron en presencia de hielo para evitar la degradación de los tejidos. Se procedió a la extracción de los lípidos según el método Folch (1957), descrito por Christie en 2003. Se recogió el riñón entero, previamente pesado, tomando 10 mL de cloroformo:metanol (2:1, v/v) por gramo de tejido. A continuación, se homogeneizó el tejido con 1/3 de cloroformo:metanol (2:1, v/v), batiendo con el Virtis Rotor unas 6 veces.

Se trasvasó el líquido del homogenizado a un tubo de ensayo con un embudo y un filtro previamente lavado con cloroformo:metanol (2:1, v/v), sin dejar caer restos del tejido. Se añadió otro tercio de cloroformo:metanol al potter y se volvió a batir, vertiendo todo, líquido y tejido, sobre el filtro. Se lavó el potter y el homogeneizador con el tercio de cloroformo:metanol restante y se volvió a verter sobre el filtro. Una vez filtrado todo el contenido, el filtro se lavó aproximadamente con un 1 mL de cloroformo:metanol (2:1, v/v). A continuación, se añadió 1/4 del volumen total de extracto (2,5mL) de KCl (0,88% w/v) al filtrado resultante, se agitó fuertemente y se centrifugó a 2000 revoluciones/minuto durante 5 minutos. Se eliminó la fase superior y la interfase con la punta de la pipeta, transfiriendo la parte inferior a un tubo limpio. Se evaporó la fase inferior con el vaporizador de nitrógeno, dejando aproximadamente 1 mL y se trasvasó a un bote pequeño previamente marcado y pesado, realizando 3 lavados de 300 μ L del tubo

de origen para asegurarnos el arrastre de todo el lípido al bote pequeño. Se evapora totalmente el bote pequeño para eliminar por completo el cloroformo:metanol y se colocan en vacío y oscuridad durante un día entero. Pasado este tiempo, se volvieron a pesar de nuevo los botes para calcular la cantidad de lípido, que se redisolvió a una concentración de 10 mg/mL con cloroformo:metanol (2:1, v/v) al 0,01% de BHT (Butilhidroxitolueno), un antioxidante para evitar la degradación de los lípidos. Finalmente, se sellaron con nitrógeno y se guardaron en un congelador a -80 °C.

6.3. Extracción lipídica de los piensos.

Después de moler los granos para tener un polvo fino, se pesaron 100 mg de pienso y se añadió 0,5 mL de agua destilada para su hidratación, durante media hora en la nevera y con una atmósfera de N₂ para evitar la oxidación. Posteriormente, se le añadió a cada tubo 5 mL de cloroformo:metanol (2:1, v/v), se homogenizó con el Virtis Rotor y se dejó actuar durante toda la noche con atmósfera de N₂. Al día siguiente, se añadieron 5 mL de cloroformo:metanol (2:1, v/v) y se homogeneizó dos veces, añadiendo posteriormente 2,5 mL de KCl (0,88% w/v). A continuación, se siguieron los mismos pasos descritos en la extracción del lípido del riñón. Además, se pesaron 100 mg de pienso y se determinó el % de humedad, dejando la muestra en una estufa a 110 °C durante un día entero, para poder calcular la proporción de mg de lípido por cada 100 mg de pienso seco.

6.4 Determinación de las clases lipídicas.

La separación de las diferentes clases lipídicas del lípido total se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina de alta resolución en placas de HPTLC (*High-performance thin-layer chromatography*), mediante un doble desarrollo unidimensional (Olsen & Henderson, 1989). Como fase móvil, se utilizó primero una disolución para separar los lípidos polares, consistente en isopropanol, cloroformo, metilacetato, metanol y KCl al 0,25% (5:5:5:2:1,8 en volumen). Una vez desarrollada la placa hasta la mitad, se introdujeron en vacío para eliminar todo resto de solventes y posteriormente se preparó otra fase móvil para separar los lípidos neutros, consistente en hexano, éter y ácido acético (20:5:0,5), desarrollando la placa hasta el final, para separar las clases lipídicas neutras.

Una vez desarrolladas las placas, se tiñeron de forma homogénea con una solución de acetato cúprico y ácido ortofosfórico en metanol y se quemaron en una estufa a 160°C durante 15 minutos. Las placas se escanearon en el CAMAG TLC Visualizer (CAMAG, Muttenz, Suiza), disponible en los laboratorios del grupo Nutrahlipids, mediante el software winCATS versión 1.4.4, con el fin de determinar las bandas de las diferentes

clases lipídicas por densitometría. Su procesamiento y cuantificación se realizó mediante el software VideoScan versión 1.02, de forma que se obtuvo la proporción de cada clase lipídica de la muestra.

6.5 Determinación del perfil de ácidos grasos (FAMES).

Se realizó la transmetilación de una cantidad del extracto de lípido total (máximo 1 mg), con el objetivo de obtener los ácidos grasos libres y metilados (del inglés *Fatty acid methyl esters*; FAMES), a partir de las clases lipídicas donde se encuentran esterificados. La transmetilación se realizó añadiendo al lípido total 1 mL de tolueno y 2 mL de metanol y ácido sulfúrico al 1% (v/v). El lípido total con los solventes fue incubado en oscuridad durante 16 horas en una manta calefactora a 50 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó, primero una extracción con Hexano: Dietiléter (1:1) y KHCO₃ al 2% (w/v), centrifugando a 2000 rpm durante 5 minutos, posteriormente, se realizó una segunda extracción sólo con Hexano:Dietiléter (1:1), que se volvió a centrifugar. En cada extracción se forman dos fases, encontrándose los FAMES en la fase superior del tubo. Previamente, se había añadido un 5% de estándar interno (19:0, ácido graso que no está presente en la muestra) para determinar los mg de ácidos grasos presentes en cada muestra (mg de ácidos grasos totales/ 100 gramos de pienso fresco), no obstante, los perfiles de cada ácido graso, tanto en riñón como en pienso, se dieron finalmente en porcentaje (%) de área relativa. La purificación de los FAMES se llevó a cabo por cromatografía en capa fina (TLC de 20 x 20 cm x 0,25mm), utilizando como fase móvil una mezcla de hexano, éter y ácido acético (90:10:1, v/v/v). Una vez desarrolladas las placas, se tiñeron con iodina (al 1% en cloroformo) por el lateral donde se encuentra el estándar y en la parte superior donde se ubica el BHT, pudiendo de esta forma, saber la localización de los FAMES. Posteriormente, éstos fueron extraídos de la placa raspando la sílice y añadiéndoles Hexano:Dietiléter (1:1, v/v). Una vez retirada la sílice, los FAMES fueron redisueltos en hexano y almacenados en viales de cristal, bajo atmósfera de nitrógeno, hasta su posterior determinación mediante un cromatógrafo de gases (TRACE-GC Thermo Scientific, Milán, Italia) y el software ChromQuest 5.0. Esto es posible gracias a que los FAMES poseen mayor volatilidad que los ácidos grasos libres, pudiendo entonces ser analizados mediante esta técnica (Christie, 2003).

La resolución de los FAMES por el cromatógrafo se consigue gracias a la interacción que se produce entre los ácidos grasos y la fase estacionaria de la columna, siendo arrastrados por la fase móvil (Helio, en este caso), que, sometidos a una programación de temperatura

creciente (disponible en Díaz López, 2010) proporcionada por un horno, permite separar los FAMES en función de su polaridad.



Figura 6. Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

La identificación de cada ácido graso se realizó con ayuda de un patrón multiestándar, que incluye aceite de pescado con composición y tiempos de retención conocidos y dos mezclas comerciales de ácidos grasos (BioSigma, Madrid). La identidad inequívoca de cada ácido graso fue, además, comprobada cuando fue necesario, por un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, que actúa ionizando las moléculas y separando los iones producidos en función de su relación masa/carga, gracias a campos electromagnéticos, lo que permitió analizar con gran precisión la estructura química de los diferentes ácidos grasos.

6.6 Determinación del perfil de ácidos grasos en cada clase lipídica (FAMES).

El protocolo para el aislamiento y purificación de las clases lipídicas a partir del extracto del lípido total se realizó de manera similar al de la determinación de clases lipídicas, con algunas variaciones. Del volumen de extracto de lípido total se tomaron de 1,5 a 4 mg (dependiendo de la disponibilidad de cada muestra), que se cargó en una placa TLC (20 x 20 cm x 0,25 mm). La muestra fue extendida sobre 4,5 cm de longitud, dejando una

separación de 2 cm entre muestra y muestra. La placa también fue procesada mediante TLC de doble desarrollo unidimensional (Olsen & Henderson, 1989), que se desarrolló hasta los 12 cm con el solvente polar para garantizar una buena separación de las clases lipídicas polares (fosfolípidos de membrana). La fase móvil para el lípido polar estaba compuesta de isopropanol, cloroformo, metilacetato, metanol y KCl al 0,25% (25:25:25:10:9 en volumen). Una vez el frente de la mezcla de solventes polares se desarrolló hasta la altura indicada (12 cm), la placa se depositó bajo campana para evaporar todo resto de solvente y fue depositada de nuevo en la cubeta conteniendo la mezcla de solventes neutros, compuesta de hexano, dietiléter y ácido acético (90:10:1 en volumen), para la separación de las clases lipídicas neutras (entre ellas, los triglicéridos). La placa fue desarrollada en la cubeta de solventes neutros hasta el final, dándonos como resultado la separación de las diferentes clases lipídicas polares en la parte inferior y las neutras en la parte superior. Las placas se tiñeron con Diclorofluoresceína con 0,5% de BHT. Posteriormente, se revelaron las bandas de cada clase lipídica bajo luz ultravioleta de 366 nm. Se eligieron Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidilinositol (PI) y Fosfatidiletanolamina (PE) de las clases lipídicas polares y Triacilgllicéridos (TAG), de las clases lipídicas neutras, que se rascaron y depositaron de manera independiente, en un tubo de vidrio para la posterior transmetilación. Tanto la transmetilación como la purificación de los FAMES de cada clase lipídica aislada, se realizó de manera similar al

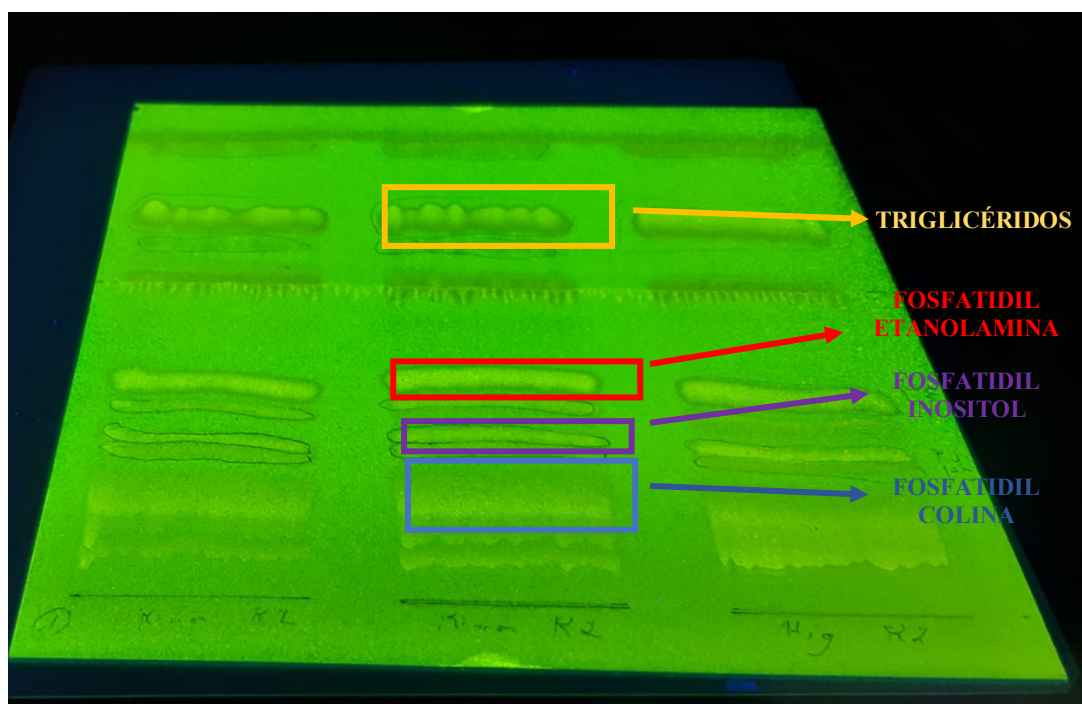


Figura 7. Separación en TLC de las diferentes clases lipídicas polares y neutras elegidas para el estudio

apartado 6.5, donde la única diferencia se produjo en la formación de las dos fases, utilizándose, en este caso, agua destilada en las dos primeras extracciones y KHCO_3 al 2% (w/v) en una tercera extracción adicional, con el fin de arrastrar bien y eliminar los restos de diclorofluoresceína de la tinción.

6.7 Análisis estadísticos.

6.7.1 Comparaciones entre controles y patrones de esterificación.

Se realizó una prueba t de muestras independientes para determinar si había diferencias en la composición de ácidos grasos de cada clase lipídica entre los grupos de machos SD y hembras SD y un ANOVA de dos vías para comprobar si se producían diferencias en la composición de ácidos grasos entre sexos (factor 1) y entre los ácidos grasos esterificados en cada clase lipídicas (factor 2). Con el fin de determinar la ubicación preferente de cada ácido graso dentro de cada clase lipídica, se verificó también la interacción entre ambos factores. En estos análisis preliminares, se comprobó que la dieta HFD no modificaba el patrón de esterificación de los ácidos grasos en las clases lipídicas seleccionadas, por lo que se descartó en estos análisis la influencia o interacción de la dieta (factor 3).

6.7.2 Comparaciones entre tratamientos.

Se realizó una prueba t de muestras independientes para determinar si había diferencias en la composición de ácidos grasos de cada clase lipídica entre los grupos de machos SD y machos HFD y un ANOVA de una vía para comprobar si se producían diferencias entre las hembras SD, hembras SD-OVX, hembras HFD y hembras HFD-OVX. Se realizaron las mismas pruebas mencionadas anteriormente para comparar el perfil de ácidos grasos, tanto en el grupo de machos como de hembras, en cada clase lipídica.

6.7.3 Bondad de las pruebas y test no paramétricos.

Se evaluaron los valores atípicos por inspección de cajas. La normalidad de cada una de las pruebas se verificó por medio del test de Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de varianzas por medio de la prueba de Levene. En los casos donde no se verificó la normalidad se hizo uso del test no paramétrico de comparación por pares U de Mann-Whitney. Para el análisis post hoc de pares de media en la prueba ANOVA se utilizó el test de Tukey. En los casos donde no se verificó la homocedasticidad se hizo uso de las transformaciones arcsen y logaritmo para estabilizar la varianza, y cuando dichas transformaciones no surtieron efecto, se aplicaron los test de Welch y de Brown Forsythe. En el caso de las ANOVAs, para el estudio post hoc de medias, se aplicaron los test T3

de Dunnett y T2 de Tamhane y para los casos donde no se verificó la normalidad, se hizo uso del test no paramétrico de Kruskal-Wallis, donde las comparaciones múltiples por pares se llevaron a cabo por medio de la U de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni.

6.7.4. Análisis de componentes principales (PCA).

Para evaluar y visualizar mejor el comportamiento de los ácidos grasos dependiente de la dieta y castración, se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA). El PCA se realiza con el objetivo de reducir las dimensiones de las variables y de hallar otras nuevas que sean combinaciones lineales de las variables originales, capaces de caracterizar los individuos (ratón/a) de una muestra. Para determinar si los datos eran factorizables se estudió la matriz de correlación, la medida general de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) y la prueba de esfericidad de Bartlett. Para mejorar la interpretabilidad de las componentes, se hizo uso de la rotación ortogonal Varimax. Los análisis estadísticos fueron realizados con el software IBM SPSS Statistics 25 software, USA.

7. RESULTADOS

7.1 Perfil de ácidos grasos de los piensos

En la tabla 1 se muestra el perfil de ácidos grasos de los piensos SD y HFD. El aporte de

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos, medido en % de área, de las dietas SD y HFD. Se incluyen los gramos de ácidos grasos totales y el % de lípido total, por cada 100 gramos de pienso fresco.

Ácidos grasos	Pienso SD	Pienso HFD
SFAs	18,72 ± 0,26	36,93 ± 0,30***
14:0	0,13 ± 0,01	1,14 ± 0,02***
15:0	0,14 ± 0,02	0,04 ± 0,03*
16:0	15,34 ± 0,32	22,32 ± 0,13***
17:0	0,11 ± 0,00	0,25 ± 0,01***
18:0	2,07 ± 0,03	12,95 ± 0,11***
20:0	0,33 ± 0,07	0,23 ± 0,00
MUFAs	22,01 ± 0,19	39,89 ± 0,08***
16:1 n-9	0,13 ± 0,01	0,34 ± 0,01***
16:1 n-7	0,25 ± 0,01	1,60 ± 0,01***
18:1 n-9	19,29 ± 0,04	34,29 ± 0,22***
18:1 n-7	1,28 ± 0,09	2,45 ± 0,11***
20:1 n-9	0,50 ± 0,02	0,60 ± 0,01**
n-6 PUFAs	54,16 ± 0,77	20,19 ± 0,27***
18:2 n-6	54,06 ± 0,77	19,39 ± 0,16***
18:3 n-6	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,01***
20:2 n-6	0,09 ± 0,01	0,55 ± 0,00***
20:3 n-6	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,00***
20:4 n-6	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,04**
22:4 n-6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
22:5 n-6	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
n-3 PUFAs	3,95 ± 0,17	1,94 ± 0,27***
18:3 n-3	3,71 ± 0,05	1,48 ± 0,01***
18:4 n-3	0,07 ± 0,02	0,09 ± 0,01
20:3 n-3	0,02 ± 0,03	0,12 ± 0,01*
20:4 n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:5 n-3	0,09 ± 0,10	0,02 ± 0,04
22:5 n-3	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,01**
22:6 n-3	0,05 ± 0,05	0,14 ± 0,20
n-3 LC-PUFA	0,16 ± 0,12	0,36 ± 0,26
n-6 LC-PUFA	0,00 ± 0,00	0,28 ± 0,01***
n3/n6	0,07 ± 0,00	0,10 ± 0,01*
C18:1 n-9/ C18:0	9,34 ± 0,17	2,65 ± 0,02***
MUFAs/SFAs	3,10 ± 0,02	0,60 ± 0,01***
PUFAs/ MUFAs	2,64 ± 0,05	0,56 ± 0,01***
PUFAs/SFAs	3,10 ± 0,02	0,60 ± 0,01***
Ácidos grasos totales (g ac. graso/ 100 g de pienso fresco)	2,76 ± 0,51	20,33 ± 1,34***
% Lípido total en peso fresco (g de lípido/ 100 g de pienso fresco)	4,92 ± 0,21	29,56 ± 2,04***

SD, dieta estándar; HFD, dieta alta en grasas; SFAs, sumatorio total de saturados; MUFAs, sumatorio total de monoinsaturados; n-6 y n-3 PUFAs, sumatorio de los poliinsaturados omega 3 ó 6; n-3 y n-6 LC PUFA, sumatorio de los poliinsaturados omega 3 y 6 de cadena larga. Los valores separados por una línea diagonal indican relaciones entre ácidos grasos o entre sus sumatorios. Medias ± desviación estándar, n = 3. * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001).

ácidos grasos n-6 y n-3 LC-PUFA (poliinsaturados mayores de 20 átomos de carbono con más de 3 insaturaciones) es insignificante o nula en ambas dietas.

El lípido total (saponificable y no saponificable), de la dieta HFD contiene 30 gramos de grasa HFD por cada 100 gramos de pienso fresco frente a los 5 gramos aportados en SD, por lo que la dieta HFD tiene casi 6 veces más grasa que la dieta SD, que a su vez coincide con un mayor aporte de ácidos grasos por cada 100 gramos de pienso fresco, unos 20 gramos de ácidos grasos en HFD frente a los 2,7 gramos en SD.

El contenido graso de la dieta HFD se compone, en su mayoría, de TAG (ver figura complementaria 1), mientras que la dieta SD contiene una fuente más variada de lípidos tanto polares como neutros.

Entre los ácidos grasos de HFD se observa una cantidad más elevada de SFAs (saturados) y de MUFAs (monoinsaturados), donde destacan el ácido palmítico (16:0), el esteárico (18:0) y el oleico (18:1n-9), que, en su conjunto, aportan alrededor del 75% de los ácidos que componen dicha dieta, frente al 40% en la dieta SD.

Los PUFAs (poliinsaturados) son aportados en mayor cantidad en la dieta SD, sobretodo se observa un aporte mayor de n-6 PUFAs, donde destaca el ácido linoleico (18:2n-6), que conforma más del 50% del contenido total de ácidos grasos, frente al 20% proporcionado en la dieta HFD. La dieta SD aporta más cantidad de n-3 PUFAs, principalmente de ácido linolénico 18:3n-3, aunque el contenido de este ácido graso es comparativamente más pobre en ambos piensos, aportando alrededor de un 3,7% y 1,5% en SD y HFD, respectivamente.

7.2 Perfil de clases lipídicas del tejido renal de ambos sexos en condiciones control.

En los machos encontramos mayor cantidad de lípido total que en las hembras, observándose, además, que los machos también poseen niveles más altos de lípidos neutros totales (LNT), TAG y ésteres de ceras y colesterol (SE) que las hembras. En contraste, en las hembras, encontramos más cantidad de fosfatidilserina (PS) y más monoglicéridos y diglicéridos (MAG + DAG) que en los machos.

Tabla 2. Perfil de clases lipídicas, medidos en % de área, de tejido renal de machos y hembras control.

Clases lipídicas	MACHOS CONTROL	HEMBRAS CONTROL
Esfingomiélinea	1,97 ± 0,08	2,41 ± 0,39
Fosfatidilcolina	16,17 ± 1,00	16,01 ± 1,55
Fosfatidilserina	3,14 ± 0,39	4,45 ± 0,45*
Fosfatidilinositol	5,85 ± 0,13	5,78 ± 0,76
Fosfatidilglicerol	7,39 ± 0,55	7,87 ± 0,90
Fosfatidiletanolamina	15,75 ± 1,15	16,69 ± 1,56
LPT	53,09 ± 1,92	53,46 ± 2,95
MAG + DAG	1,82 ± 0,09	2,32 ± 0,31*
Colesterol	15,94 ± 0,42	16,52 ± 1,67
Ácidos grasos libres	3,50 ± 0,57	3,45 ± 2,38
Triacilgliceridos	22,33 ± 1,90	14,60 ± 1,43*
SE	2,09 ± 0,59	0,33 ± 0,33**
LNT	45,05 ± 1,89	37,31 ± 5,35*
LÍPIDO TOTAL (mg de lípido/ 100 g de tejido fresco)	2,87 ± 0,32	1,80 ± 0,20*

LPT, sumatorio de lípidos polares totales; MAG + DAG, monoacilgliceridos y diacilgliceridos; SE, ésteres de ceras y colesterol; TLN, sumatorio de lípidos neutros totales. Medias ± desviación estándar, n = 4: * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001).

7.3 Diferencias en el perfil de ácidos grasos en las clases lipídicas del tejido renal de machos y hembras control, y en el patrón de esterificación de cada clase lipídica.

7.3.1 Fosfatidilcolina.

Las hembras poseen mayores cantidades de SFAs, MUFAs, n-6 LC-PUFAs y DMAs que los machos. Dentro de los ácidos grasos individuales se observan niveles más altos en hembras de 18:0, 18:1 n-9, 18:1 n-7, 20:2 n-6 y 20:4 n-6. Los machos poseen niveles más altos de n-3 PUFAs y n-3 LC-PUFAs totales y también de 18:1 n-7, 20:3 n-6, 22:5 n-6, 22:5 n-3 y 22:6 n-3.

7.3.2 Fosfatidiletanolamina.

Las hembras poseen niveles mayores de n-6 LC-PUFAs totales, 18:4 n-3 y 20:4 n-6 que los machos, mientras que los machos tienen cantidades mayores de n-3 PUFAs totales coincidiendo también con niveles más altos de n-3 LC-PUFAs. Se observan cantidades más altas en machos de 18:1 n-7, 20:3 n-6, 20:5 n-3, 22:5 n-3 y 22:6 n-3, de manera similar a lo descrito para la fosfatidilcolina.

7.3.5 Patrón de esterificación.

Los SFAs se esterifican en mayor cantidad en PI y PC en comparación con TAG y PE. El 14:0 se esterifica en mayor cantidad en TAG, seguido de PC y PI y en menor proporción en PE. El 15:0 se esterifica en mayor cantidad en TAG y PC y en menor proporción en PI y PE. El 16:0 se esterifica en cantidades superiores en PC, seguido de TAG, seguido de PE y en menores cantidades en PI. El 18:0 se esterifica en mayores cantidades en PI, seguido de PE, seguido de PC y en menor proporción en TAG.

Los MUFAs se esterifican en mayor cantidad en TAG, seguido de PE y PC, siendo en PI donde se esterifica en menores proporciones con respecto al resto de clases estructurales en machos. El 16:1 n-9 se esterifica en mayor cantidad en TAG y en menor proporción en PC, encontrándose ausente tanto en PE como en PI. El 16:1 n-7 y 18:1 n-9 se esterifican en mayor proporción en TAG en comparación con todas las demás. El 18:1 n-7 se esterifica en mayor proporción en TAG y PC en comparación con PE y PI. Finalmente el 20:1 n-9 se esterifica en mayor proporción en TAG, seguido de PC y PE, encontrándose en niveles inferiores en PI.

Los n-6 PUFAs se esterifican en mayor proporción en PE y PI y en menores cantidades en PC y TAG y los n-6 LC-PUFAs se esterifican en mayor proporción en PE y PI, seguido de PC encontrándose en menores cantidades en TAG. Dentro de los ácidos grasos individuales, el 18:2 n-6 y 18:3 n-6 se esterifican en mayor proporción en TAG, seguido de PC, encontrándose en menor proporción en PE y PI. El 20:2 n-6 se comporta de manera diferente en ambos sexos, encontrándose en machos en cantidades superiores en PC y PI, seguido de TAG y en cantidades inferiores en PE, y encontrándose en cantidades superiores en PC, seguido de TAG, seguido de PE y ausente en PI en las hembras. El 20:3 n-6 se encuentra esterificado en mayor proporción en PI, seguido de PC, seguido de PE y en cantidades inferiores en TAG. El 20:4 n-6 (ARA) se encuentra en mayor proporción en PI y PE, seguido de PC y finalmente en menor cantidad en TAG. El 22:4 n-6 se encuentra en mayor proporción en PE, seguido de PC y seguido de TAG, no obstante, los machos lo esterifican en menor proporción en PI con respecto a PE. El 22:5 n-6 se comporta de manera diferente entre sexos, esterificándose en mayor proporción en PE, PI y PC con respecto a TAG en machos y encontrándose en mayor proporción en PE y PI, seguido de PC y en menor cantidad en los TAG, en las hembras.

Los n-3 PUFAs totales se comportan de manera diferentes entre sexos, encontrándose esterificados en mayor proporción en PC, seguido de PE y PI en machos y en cantidades

mayores en PC y PE, seguido de PI en hembras. Los n-3 LC-PUFAs se comportan también de manera diferente entre ambos sexos, esterificándose en mayores proporciones en PC con respecto a PE y PI en machos y en mayores proporciones en PC y PE con respecto a PI en hembras, donde en ambos sexos, los TAG son los que esterifican en menor proporción tanto los n-3 PUFAs como los n-3 LC-PUFAs. El 18:3 n-3 se encuentra en mayor cantidad en TAG en ambos sexos y en proporciones menores en la PE de hembras, estando ausente en el resto. El 18:4 n-3 se encuentra ausente en PC de ambos sexos y en PE de machos. El 22:5 n-3 se encuentra ausente en los TAG de hembras, mientras que los machos lo esterifican en mayor proporción en PC, con respecto a PE y PI, encontrándose niveles inferiores en TAG. El 22:6 n-3 (DHA) también posee un patrón de esterificación diferente entre ambos sexos, encontrándose en mayor proporción en PC en machos y en cantidades más altas en PC y PE en hembras. En ambos sexos, los TAG esterifican el 22:6 n-3 en menor proporción.

Los DMAs (plasmalógenos) se encuentran ausentes en TAG, no obstante, se observa un diferente patrón de esterificación entre sexos, y aunque ambos los presentan en mayor proporción en PE con respecto a PC y PI, las hembras lo empaquetan en PC en mayor cantidad que en PI. En 16:0 DMA, 18:0 DMA y 18:1 n-9 DMA se observa una mayor presencia en PE con respecto al resto. El 18:1n-7 DMA, sin embargo, solo se encuentra presente en PE.

7.4 Perfil de clases lipídicas del tejido renal de los grupos HFD, SD-OVX y HFD-OVX.

En la tabla 4 se muestran los resultados perfiles de los tejidos renales de los machos y hembras a los que se les ha aplicado sus respectivos tratamientos.

En los machos, el grupo HFD posee mayor cantidad de lípido total y TAG que el grupo SD, sin embargo, el grupo SD posee mayor cantidad de SM, MAG+DAG, ácidos grasos libres (FFA) y SE.

En el perfil de las hembras, observamos que el grupo HFD posee niveles de SM inferiores que el resto de los grupos y también ausencia de MAG+DAG, hecho que no ocurre en los demás grupos. También se aprecia niveles mayores de colesterol (CHO) en el grupo HFD-OVX con respecto al grupo SD.

Tabla 4. Perfil de las diferentes clases lipídicas, medido en % de área, de machos y hembras a los que se les ha aplicado los diferentes tratamientos.

Clases lipídicas	MACHOS		HEMBRAS			
	SD	HFD	SD	SD-OVX	HFD	HFD-OVX
SM	1,97 ± 0,08	1,52 ± 0,12*	2,41 ± 0,39	2,72 ± 0,49	1,78 ± 0,17 a	2,11 ± 0,25
PC	16,17 ± 1,00	15,75 ± 0,86	16,01 ± 1,55	15,22 ± 2,34	17,54 ± 0,93	15,12 ± 1,35
PS	3,14 ± 0,39	3,42 ± 0,22	4,45 ± 0,45	3,12 ± 0,39	3,52 ± 0,11	3,98 ± 0,60
PI	5,85 ± 0,13	5,56 ± 0,81	5,78 ± 0,76	4,61 ± 0,72	5,52 ± 0,08	5,30 ± 0,29
PG	7,39 ± 0,55	6,65 ± 0,75	7,87 ± 0,90	5,71 ± 0,68	6,67 ± 0,21	5,67 ± 0,19
PE	15,75 ± 1,15	15,97 ± 1,29	16,69 ± 1,56	13,26 ± 1,22	15,50 ± 0,43	14,90 ± 0,29
LPT	53,09 ± 1,92	49,41 ± 3,52	53,46 ± 2,95	45,03 ± 4,24	53,22 ± 1,50	46,19 ± 2,79
MAG + DAG	1,82 ± 0,09	0,84 ± 0,28**	2,32 ± 0,31	1,40 ± 0,48	0,00 ± 0,00 a	1,05 ± 0,61
CHO	15,94 ± 0,42	13,57 ± 1,28	16,52 ± 1,67	19,00 ± 1,56	21,13 ± 0,83	23,90 ± 1,36 b
FFA	3,50 ± 0,57	0,48 ± 0,48*	3,45 ± 2,38	5,81 ± 2,30	5,11 ± 0,74	4,33 ± 0,31
TAG	22,33 ± 1,90	29,23 ± 2,06**	14,60 ± 1,43	20,95 ± 4,44	16,83 ± 1,00	18,34 ± 3,31
SE	2,09 ± 0,59	0,66 ± 0,66*	0,33 ± 0,33	1,93 ± 2,44	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
LNT	45,05 ± 1,89	44,80 ± 5,09	37,31 ± 5,35	50,89 ± 6,50	46,78 ± 1,49	53,81 ± 2,79
LÍPIDO TOTAL	2,87 ± 0,32	5,65 ± 1,01*	1,80 ± 0,20	1,70 ± 0,18	1,50 ± 0,20	2,35 ± 0,33

SD, dieta estándar; HFD, dieta alta en grasas; OVX, hembras castradas. SM, esfingomielina; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PG, fosfatidilglicerol; PE, fosfatidiletanolamina; LPT, lípidos polares totales; MAG + DAG, monoacilgliceridos y diacilgliceridos; CHO, colesterol; FFA, ácidos grasos libres; TAG, triacilgliceridos; SE, ésteres de ceras y colesterol; TLN, lípido neutro total; LIPIDO TOTAL: cantidad de lípido, expresado miligramos por cada 100 gramos de tejido.: * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001); a: HFD vs SD y vs SD-OVX y vs HFD-OVX: p < 0,05; b: HFD vs SD: p < 0,05.

7.5 Perfil de ácidos grasos en las clases lipídicas seleccionadas.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos esterificados en las tres clases lipídicas de membrana mencionadas (PC, PE y PI) y en TAG de los tejidos renales. Se ha adjuntado también en el anexo 2, el perfil de ácidos grasos de los lípidos totales, que fue realizado por el equipo del proyecto (ver tabla complementaria 1).

7.5.1 Fosfadidilcolina.

En los machos, se observa que el grupo SD posee niveles mayores de n-6 PUFAs y un índice superior de n6/n3. De los ácidos grasos individuales también se observan proporciones mayores en el grupo SD con respecto a HFD de 18:1 n-7, 20:1 n-9, 18:2 n-6 y 22:5 n-6.

Comparando el grupo HFD con SD de las hembras, se observa una proporción superior en el índice n6/n3 y ARA/DHA de SD con respecto a HFD. También se aprecia que los individuos SD poseen niveles mayores de 18:1 n-7, 18:2 n-6, 20:3 n-6 que los HFD, exceptuando al 22:5n-3, donde observamos niveles superiores en el grupo HFD.

Comparando ahora el grupo SD-OVX con los dos anteriores, vemos que este grupo posee proporciones superiores de n3/n6 y MUFAs/SFAs con respecto al grupo HFD.

Tabla 5. Perfil de los diferentes ácidos grasos esterificados en FOSFATIDILCOLINA, medidos en % de área, de los tejidos renales de machos y hembras a los que se les ha aplicado los diferentes tratamientos.

Ácidos grasos	MACHOS		HEMBRAS			
	SD	HFD	SD	SD-OVX	HFD	HFD-OVX
SFAs	41,92 ± 2,79	40,75 ± 7,37	46,12 ± 0,78	42,65 ± 0,74 a	46,07 ± 2,45	46,92 ± 1,67
14:0	0,20 ± 0,04	0,17 ± 0,12	0,29 ± 0,11	0,19 ± 0,15	0,18 ± 0,04	0,25 ± 0,13
15:0	0,16 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,13 ± 0,08	0,11 ± 0,13	0,08 ± 0,09	0,12 ± 0,12
16:0	31,73 ± 1,68	30,16 ± 5,82	31,21 ± 1,06	29,12 ± 1,14	31,81 ± 2,11	30,67 ± 1,15
17:0	0,24 ± 0,06	0,22 ± 0,04	0,29 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,28 ± 0,03	0,32 ± 0,03
18:0	9,32 ± 1,10	9,93 ± 2,06	13,91 ± 1,44	12,88 ± 0,60	13,55 ± 0,72	15,37 ± 1,05 b
20:0	0,18 ± 0,05	0,14 ± 0,02	0,23 ± 0,07	0,09 ± 0,11	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0,05
MUFAs	10,72 ± 0,48	10,10 ± 1,87	12,38 ± 1,07	13,14 ± 1,44	11,44 ± 0,51	13,38 ± 1,10
16:1 n-9	0,27 ± 0,05	0,36 ± 0,08	0,24 ± 0,17	0,38 ± 0,04	0,34 ± 0,09	0,41 ± 0,14
16:1 n-7	0,60 ± 0,01	0,39 ± 0,16	0,72 ± 0,37	0,66 ± 0,22	0,45 ± 0,11	0,33 ± 0,07
18:1 n-9	6,61 ± 0,65	7,21 ± 1,41	8,51 ± 0,78	8,78 ± 0,58	8,22 ± 0,24	9,69 ± 0,79
18:1 n-7	2,81 ± 0,26	1,88 ± 0,29**	2,50 ± 0,12	2,66 ± 0,26	2,17 ± 0,06 c	2,35 ± 0,05
20:1 n-9	0,28 ± 0,08	0,19 ± 0,02 *	0,23 ± 0,16	0,37 ± 0,11 d	0,21 ± 0,01	0,32 ± 0,07
n-6 PUFAs	22,44 ± 1,20	19,11 ± 0,84*	25,99 ± 2,07	26,30 ± 1,53	24,17 ± 1,65	23,96 ± 1,95
18:2 n-6	8,54 ± 0,97	5,64 ± 0,87 ***	8,58 ± 0,44	8,93 ± 0,19	7,03 ± 0,21 c	7,98 ± 0,04 b
18:3 n-6	0,14 ± 0,01	0,03 ± 0,07	0,21 ± 0,12	0,15 ± 0,12	0,10 ± 0,07	0,07 ± 0,07
20:2 n-6	0,26 ± 0,14	0,31 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,33 ± 0,05	0,41 ± 0,03	0,41 ± 0,03
20:3 n-6	1,17 ± 0,13	0,62 ± 0,05***	0,88 ± 0,11	0,93 ± 0,09	0,57 ± 0,02 e	0,66 ± 0,04
20:4 n-6	11,15 ± 1,15	11,89 ± 0,94	15,17 ± 1,82	15,36 ± 1,19	15,63 ± 1,39	14,22 ± 1,24
22:4 n-6	0,31 ± 0,03	0,30 ± 0,03	0,35 ± 0,03	0,39 ± 0,11	0,30 ± 0,01	0,34 ± 0,07
22:5 n-6	0,87 ± 0,29	0,32 ± 0,14*	0,38 ± 0,08	0,21 ± 0,15	0,14 ± 0,10	0,28 ± 0,08
n-3 PUFAs	22,80 ± 4,51	27,52 ± 7,66	12,01 ± 1,73	13,51 ± 2,17	15,51 ± 1,21	12,82 ± 1,69
18:3 n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18:4 n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:3 n-3	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,07	0,00 ± 0,00
20:4 n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:5 n-3	0,15 ± 0,02	0,13 ± 0,08	0,05 ± 0,10	0,21 ± 0,16	0,23 ± 0,02	0,12 ± 0,11
22:5 n-3	0,95 ± 0,29	0,85 ± 0,26	0,37 ± 0,04	0,38 ± 0,04	0,49 ± 0,02 e	0,47 ± 0,04
22:6 n-3	21,69 ± 4,24	26,52 ± 7,29	11,15 ± 2,58	12,93 ± 2,13	14,72 ± 1,15	12,22 ± 1,56
DMAs	0,80 ± 0,16	0,95 ± 0,22	1,16 ± 0,21	1,39 ± 0,23	1,30 ± 0,27	1,05 ± 0,47
16:0 DMA	0,38 ± 0,13	0,36 ± 0,07	0,65 ± 0,30	0,67 ± 0,37	0,55 ± 0,19	0,45 ± 0,18
18:0 DMA	0,13 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,10	0,16 ± 0,11	0,24 ± 0,05	0,16 ± 0,15
18:1 n-9 DMA	0,30 ± 0,04	0,42 ± 0,16	0,36 ± 0,24	0,57 ± 0,12	0,50 ± 0,10	0,45 ± 0,16
18:1 n-7 DMA	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
n-3 LC-PUFA	22,80 ± 4,51	27,52 ± 7,66	12,01 ± 1,73	13,51 ± 2,17	15,51 ± 1,21	12,82 ± 1,69
n-6 LC-PUFA	13,51 ± 1,11	13,13 ± 1,05	16,78 ± 1,85	16,89 ± 1,28	16,63 ± 1,51	15,51 ± 1,17
n-6/n-3	1,01 ± 0,22	0,73 ± 0,15*	2,18 ± 0,17	1,96 ± 0,22	1,56 ± 0,08 f	1,88 ± 0,18
ARA/DHA	0,53 ± 0,12	0,47 ± 0,09	1,40 ± 0,21	1,20 ± 0,13	1,06 ± 0,06 g	1,17 ± 0,07
18:1 n-9 / 18:0	0,71 ± 0,03	0,75 ± 0,21	0,61 ± 0,02	0,68 ± 0,06	0,61 ± 0,05	0,63 ± 0,01
MUFAs/SFAs	0,26 ± 0,02	0,25 ± 0,05	0,27 ± 0,02	0,31 ± 0,04. h	0,25 ± 0,02	0,28 ± 0,02
PUFAs/MUFAs	4,23 ± 0,48	4,82 ± 1,71	3,10 ± 0,53	3,08 ± 0,57	3,47 ± 0,30	2,77 ± 0,45
PUFAs/SFAs	1,09 ± 0,16	1,21 ± 0,47	0,83 ± 0,09	0,94 ± 0,08	0,87 ± 0,10	0,79 ± 0,10

Media ± desviación estándar. * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001). **a** = SD-OVX vs SD y vs HFD y vs HFD-OVX: p < 0,05; **b** = HFD-OVX vs HFD y vs SD-OVX y vs SD: p < 0,05; **c** = HFD vs SD y vs SD-OVX y vs HFD-OVX: p < 0,05; **d** = SD-OVX y HFD-OVX vs SD y vs HFD: p < 0,05; **e** = HFD y HFD-OVX vs SD y vs SD-OVX: p < 0,05; **f**: HFD vs SD-OVX y vs SD: p < 0,05; **g** = HFD vs SD: p < 0,05; **h** = SD-OVX vs HFD: p < 0,05.

Dentro de los ácidos grasos individuales, vemos que las hembras SD-OVX también tenían mayor proporción de 18:1 n-7, 18:2 n-6 y 20:3 n-6 que el grupo HFD, sin embargo, se

observan niveles más altos de SFAs en los grupos HFD y SD con respecto a SD-OVX y cantidades superiores de 22:5 n-3 en el grupo HFD con respecto a SD-OVX.

Por último, comparando el grupo HFD-OVX con el resto, vemos que estos individuos poseen proporciones superiores de SFAs con respecto a SD y SD-OVX y niveles más altos de 18:0 que todos los demás grupos, apreciándose cantidades más altas en HFD-OVX de 18:1 n-7 con respecto a HFD, de 20:1 n-9 con respecto a HFD y SD, de 18:2 n-6 en comparación con HFD y niveles más altos de 22:5 n-3 en comparación con SD y SD-OVX. Por último, se aprecian cantidades más altas de 18:2 n-6 y 20:3 n-6 en los grupos SD y SD-OVX con respecto a este grupo.

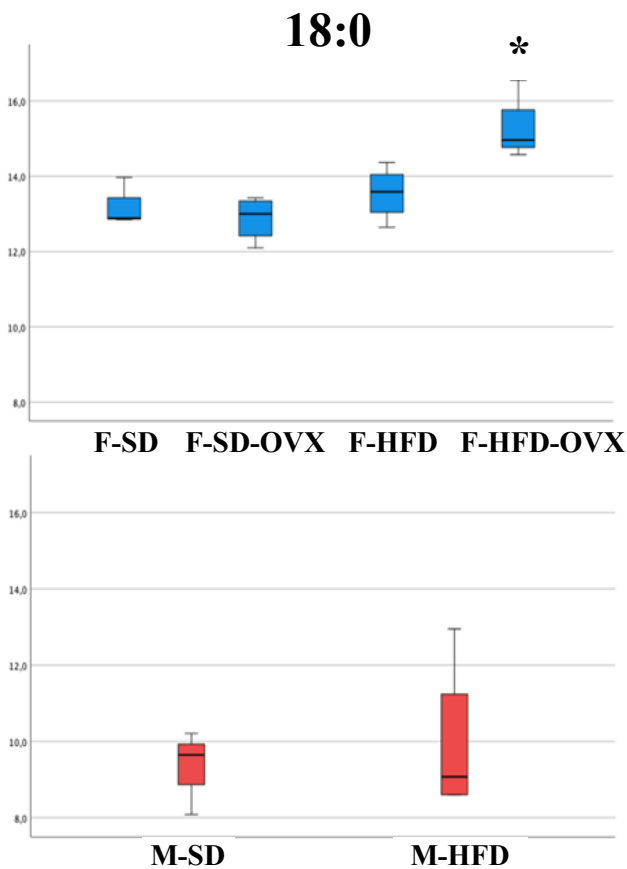


Gráfico 1. Ácido esteárico (18:0) esterificado en fosfatidilcolina. * = HFD-OVX vs HFD y vs SD y vs SD-OVX: $p < 0,05$.

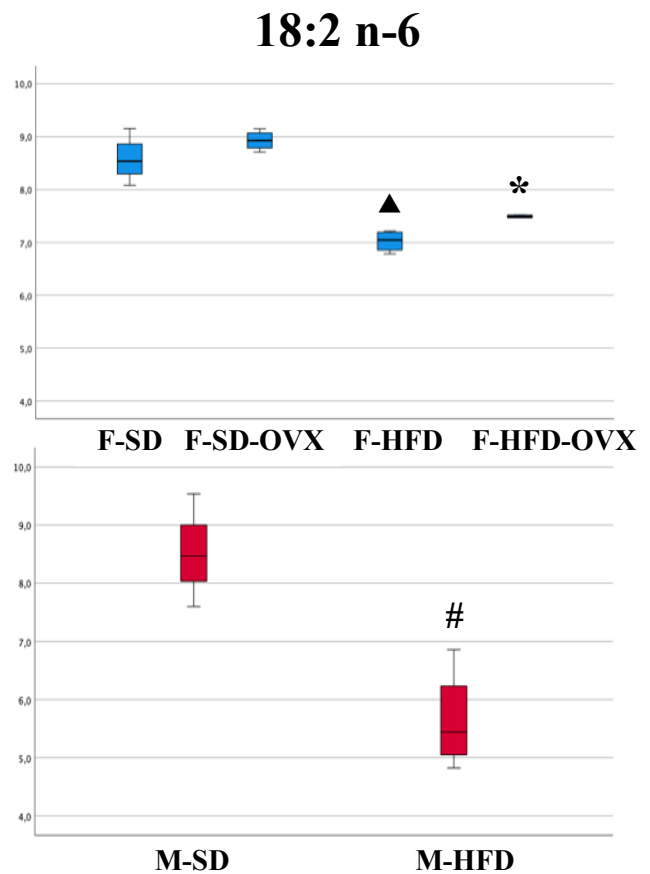


Gráfico 2. Ácido linoleico (18:2 n-6) esterificado en fosfatidilcolina. # = $p < 0,05$; * = HFD-OVX y HFD vs SD y vs SD-OVX: $p < 0,05$; ▲ = HFD vs HFD-OVX: $p < 0,05$

20:3 n-6

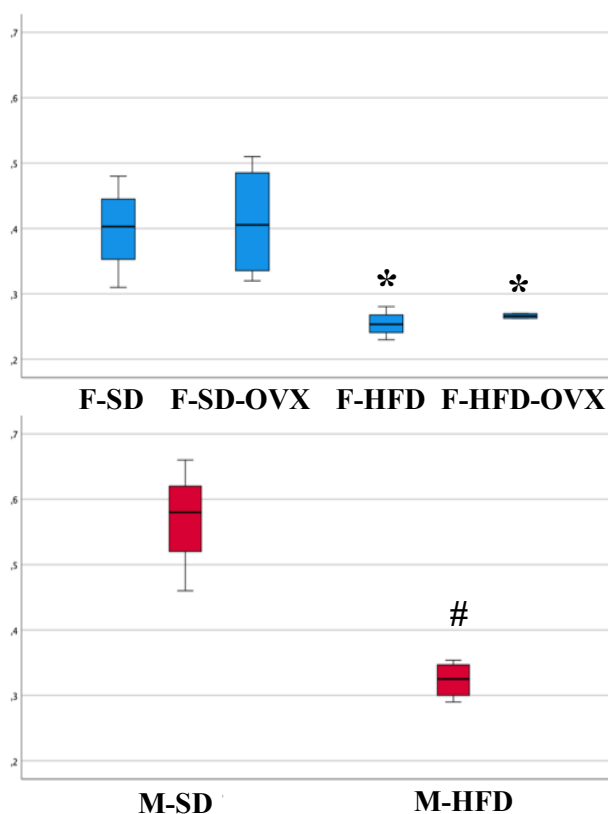


Gráfico 3. Ácido dihomo-gammalinoleico (20:3 n-6) esterificado en fosfatidilcolina. # = $p < 0,05$; * = HFD-OVX y HFD vs SD y vs SD-OVX: $p < 0,05$.

7.5.2 Fosfatidiletanolamina.

Observando primero los datos en machos, vemos que el grupo SD posee mayores niveles de 18:1 n-7, 20:1 n-9, 18:2 n-6, 20:3 n-6, 20:5 n-6 y 18:1 n-7 DMA que el grupo HFD y que este último grupo solo posee niveles superiores de 18:0 DMA respecto a SD.

De manera muy similar, comparando los grupos de hembras SD y HFD se observan niveles superiores de 18:1 n-7, 20:1 n-9, 18:2 n-6, 20:3 n-6, 22:4 n-6 y 18:1 n-7 en el grupo SD, siendo la única molécula que se encuentra en cantidades superiores en HFD el 18:0 DMA.

Comparando ahora el grupo SD-OVX con los dos anteriores se observa que los mismos ácidos grasos nombrados anteriormente se encuentran en cantidades mayores en SD-OVX con respecto a HFD, exceptuando el 18:0 DMA, que se encuentra en una proporción superior en HFD en comparación con SD-OVX.

Tabla 6. Perfil de los diferentes ácidos grasos esterificados en FOSFATIDILETANOLAMINA, medidos en % de área, de los tejidos renales de machos y hembras a los que se les ha aplicado los diferentes tratamientos.

Ácidos grasos	MACHOS		HEMBRAS			
	SD	HFD	SD	SD-OVX	HFD	HFD-OVX
<i>SFAs</i>	30,00 ± 1,43	30,39 ± 4,37	30,64 ± 4,07	29,29 ± 2,19	28,37 ± 1,30	27,14 ± 0,53
14:0	0,04 ± 0,06	0,09 ± 0,10	0,14 ± 0,10	0,17 ± 0,05	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,00
15:0	0,10 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,09	0,03 ± 0,04
16:0	7,77 ± 0,43	8,16 ± 1,17	7,87 ± 0,80	7,65 ± 0,46	7,34 ± 1,00	6,94 ± 0,38
17:0	0,29 ± 0,04	0,26 ± 0,03	0,26 ± 0,04	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,26 ± 0,03
18:0	21,53 ± 0,98	21,60 ± 3,19	21,91 ± 3,36	21,06 ± 1,76	20,56 ± 0,51	19,76 ± 0,06
20:0	0,11 ± 0,09	0,10 ± 0,07	0,19 ± 0,06	0,18 ± 0,04	0,09 ± 0,06	0,13 ± 0,02
<i>MUFAs</i>	10,71 ± 0,15	10,47 ± 1,24	11,28 ± 1,24	11,16 ± 0,71	9,65 ± 0,45	10,00 ± 0,44
16:1 n-9	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,04 ± 0,05
16:1 n-7	0,48 ± 0,06	0,44 ± 0,17	0,55 ± 0,23	0,51 ± 0,13	0,32 ± 0,08	0,23 ± 0,04
18:1 n-9	7,79 ± 0,63	8,51 ± 1,01	8,87 ± 0,75	8,98 ± 0,72	7,98 ± 0,21	8,24 ± 0,21
18:1 n-7	1,49 ± 0,17	1,11 ± 0,11*	1,12 ± 0,05	1,14 ± 0,07	0,92 ± 0,03	0,97 ± 0,02 a
20:1 n-9	0,29 ± 0,03	0,20 ± 0,02**	0,27 ± 0,03	0,25 ± 0,01	0,17 ± 0,01 b	0,24 ± 0,07
<i>n-6 PUFAs</i>	34,59 ± 2,05	32,36 ± 1,12	36,74 ± 1,02	36,29 ± 1,26	35,22 ± 2,01	35,33 ± 0,09
18:2 n-6	3,75 ± 0,34	2,85 ± 0,41*	3,45 ± 0,39	3,33 ± 0,24	2,82 ± 0,14 c	3,15 ± 0,31
18:3 n-6	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,06	0,07 ± 0,14	0,06 ± 0,07	0,06 ± 0,07	0,00 ± 0,00
20:2 n-6	0,08 ± 0,07	0,16 ± 0,04	0,07 ± 0,08	0,06 ± 0,08	0,07 ± 0,08	0,10 ± 0,00
20:3 n-6	0,57 ± 0,10	0,32 ± 0,03*	0,40 ± 0,07	0,41 ± 0,09	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,01 a
20:4 n-6	28,40 ± 1,86	27,78 ± 1,27	30,97 ± 1,37	30,99 ± 1,23	30,83 ± 2,03	30,50 ± 0,46
22:4 n-6	0,76 ± 0,10	0,73 ± 0,05	0,90 ± 0,11	0,87 ± 0,04	0,71 ± 0,04	0,71 ± 0,03 a
22:5 n-6	1,03 ± 0,23	0,49 ± 0,11**	0,90 ± 0,33	0,57 ± 0,14	0,47 ± 0,15	0,60 ± 0,03
<i>n-3 PUFAs</i>	13,33 ± 1,03	15,37 ± 2,40	10,65 ± 2,05	10,59 ± 2,86	13,60 ± 0,36	13,17 ± 0,52
18:3 n-3	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,06	0,14 ± 0,28	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18:4 n-3	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,05	0,21 ± 0,15	0,08 ± 0,09	0,20 ± 0,10	0,34 ± 0,38
20:3 n-3	0,07 ± 0,06	0,04 ± 0,09	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,07	0,00 ± 0,00
20:4 n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,14	0,00 ± 0,00
20:5 n-3	0,29 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,14 ± 0,10	0,23 ± 0,08	0,31 ± 0,04	0,28 ± 0,07
22:5 n-3	0,57 ± 0,08	0,45 ± 0,08	0,22 ± 0,15	0,25 ± 0,05	0,33 ± 0,02	0,34 ± 0,02
22:6 n-3	12,40 ± 1,00	14,58 ± 2,26	9,95 ± 2,23	10,04 ± 2,72	12,61 ± 0,38	12,21 ± 0,99
<i>DMAs</i>	8,56 ± 1,76	9,04 ± 3,25	8,53 ± 3,83	10,27 ± 1,44	11,43 ± 1,21	12,81 ± 0,66
16:0 DMA	3,32 ± 0,62	3,07 ± 1,14	3,04 ± 1,31	3,66 ± 0,51	3,68 ± 0,46	3,78 ± 0,14
18:0 DMA	2,53 ± 0,65	3,19 ± 1,07*	3,00 ± 1,28	3,58 ± 0,33	4,78 ± 0,41	5,58 ± 0,85 a
18:1 n-9 DMA	2,15 ± 0,50	2,39 ± 0,92	2,08 ± 0,96	2,44 ± 0,55	2,61 ± 0,33	3,01 ± 0,33
18:1 n-7 DMA	0,56 ± 0,01	0,39 ± 0,13*	0,53 ± 0,07	0,59 ± 0,10	0,37 ± 0,03 c	0,44 ± 0,06
<i>n-3 LC-PUFA</i>	13,33 ± 1,03	15,31 ± 2,38	10,31 ± 2,47	10,52 ± 2,78	13,40 ± 0,38	12,84 ± 0,90
<i>n-6 LC-PUFA</i>	30,75 ± 1,74	29,32 ± 1,32	33,16 ± 1,22	32,84 ± 1,15	32,27 ± 1,92	32,08 ± 0,41
<i>n-6/n-3</i>	2,60 ± 0,18	2,15 ± 0,38	3,56 ± 0,77	3,64 ± 1,10	2,59 ± 0,13	2,68 ± 0,10
<i>ARA/DHA</i>	2,30 ± 0,20	1,94 ± 0,33	3,24 ± 0,77	3,28 ± 0,97	2,44 ± 0,11	2,50 ± 0,16
<i>18:1 n-9 / 18:0</i>	0,36 ± 0,02	0,40 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,39 ± 0,02	0,42 ± 0,01
<i>MUFAs / SFAs</i>	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,02	0,34 ± 0,02	0,37 ± 0,02
<i>PUFAs / MUFAs</i>	4,47 ± 0,20	4,63 ± 0,82	4,25 ± 0,64	4,22 ± 0,47	5,07 ± 0,41	4,86 ± 0,27
<i>PUFAs / SFAs</i>	1,60 ± 0,06	1,60 ± 0,30	1,57 ± 0,26	1,61 ± 0,20	1,73 ± 0,14	1,79 ± 0,01

Medias ± desviación estándar. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). **a** = HFD-OVX y HFD vs SD-OVX y vs SD: $p < 0,05$; **b** = HFD vs HFD-OVX y vs SD-OVX y vs SD: $p < 0,05$; **c** = HFD vs SD-OVX y vs SD: $p < 0,05$.

Si contrastamos en el grupo HFD-OVX con los 3 anteriores, se observan niveles superiores 20:1 n-9 con respecto a HFD y de 18:0 DMA con respecto a SD y SD-OVX. Finalmente, los grupos SD y SD-OVX poseen mayor cantidad de 18:1 n-7, 20:3 n-6 y 22:4 n-6 en comparación con HFD-OVX.

18:0 DMA

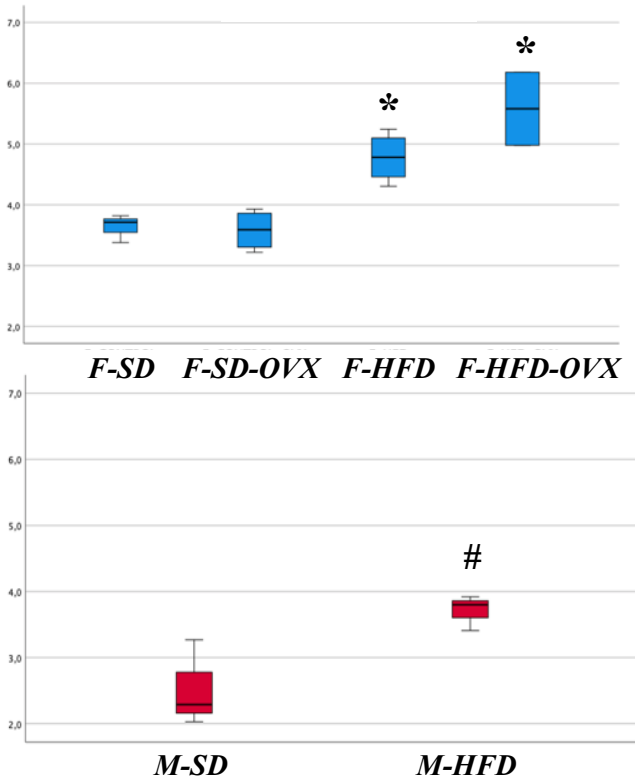


Gráfico 4. 18:0 DMA esterificado en fosfatidiletanolamina. # = $p < 0,05$; * = HFD vs SD y vs SD-OVX: $p < 0,05$.

18:2 n-6

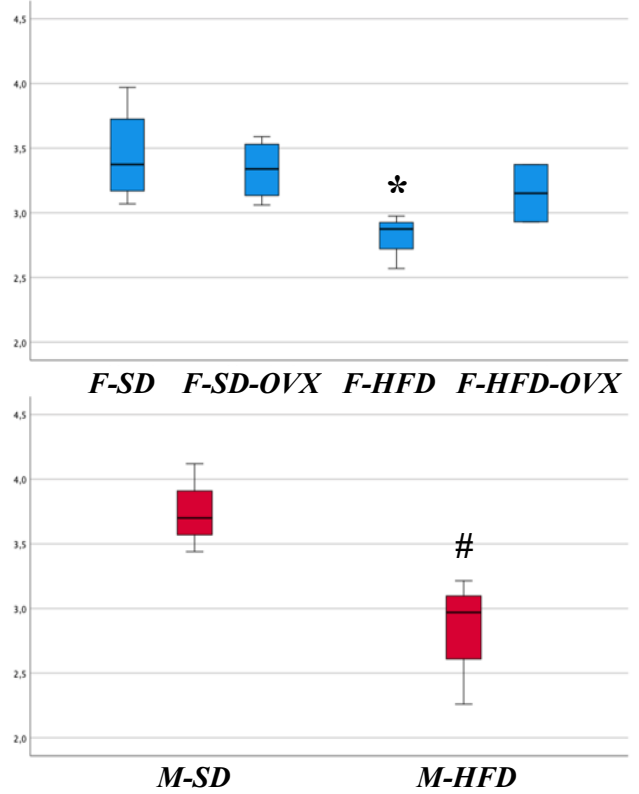


Gráfico 5. Ácido linoleico (18:2 n-6) esterificado en fosfatidiletanolamina. # = $p < 0,05$; * = HFD vs SD y vs SD-OVX: $p < 0,05$.

20:3 n-6

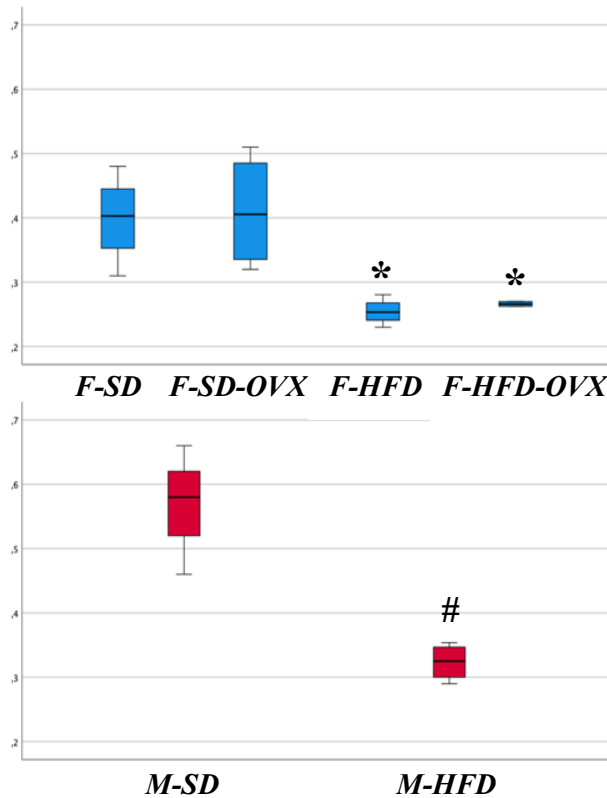


Gráfico 6. Ácido dihomo-gammalinolénico (20:3 n-6) esterificado en fosfatidiletanolamina. # = $p < 0,05$; * = HFD-OVX y HFD vs SD y vs SD-OVX: $p < 0,05$.

7.5.3 Fosfatidilinositol

Solo se observó variación en el 20:3 n-6 y 22:5 n-6 en ambos sexos. Tanto en machos como en hembras, se aprecian mayores cantidades de estos dos ácidos grasos en el grupo SD con respecto a HFD.

Tabla 7. Perfil de los diferentes ácidos grasos esterificados en FOSFATIDILINOSITOL, medidos en % de área, de los tejidos renales de machos y hembras a los que se les ha aplicado los diferentes tratamientos.

Ácidos grasos	MACHOS		HEMBRAS			
	SD	HFD	SD	SD-OVX	HFD	HFD-OVX
<i>SFAs</i>	41,07 ± 3,67	43,60 ± 1,65	44,84 ± 1,23	45,56 ± 0,51	45,42 ± 1,65	45,07 ± 3,17
14:0	0,17 ± 0,16	0,28 ± 0,19	0,44 ± 0,20	0,42 ± 0,21	0,15 ± 0,18	0,40 ± 0,33
15:0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,15
16:0	5,83 ± 0,25	6,82 ± 1,08	6,91 ± 1,33	6,36 ± 1,28	5,95 ± 1,92	7,31 ± 1,98
17:0	0,22 ± 0,03	0,18 ± 0,13	0,24 ± 0,32	0,14 ± 0,13	0,15 ± 0,10	0,16 ± 0,12
18:0	34,06 ± 3,46	35,41 ± 2,17	36,83 ± 2,49	38,04 ± 1,12	38,64 ± 2,65	36,92 ± 3,76
20:0	0,24 ± 0,04	0,19 ± 0,13	0,12 ± 0,15	0,17 ± 0,15	0,24 ± 0,06	0,05 ± 0,10
<i>MUFAs</i>	5,03 ± 0,63	7,67 ± 2,66	8,12 ± 3,26	6,87 ± 1,56	5,81 ± 1,29	8,17 ± 3,96
16:1 n-9	0,00 ± 0,00	0,21 ± 0,27	0,00 ± 0,00	0,16 ± 0,28	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
16:1 n-7	0,36 ± 0,09	0,45 ± 0,20	0,66 ± 0,44	0,55 ± 0,10	0,43 ± 0,16	0,54 ± 0,37
18:1 n-9	3,39 ± 0,75	5,49 ± 1,80	6,10 ± 2,54	5,05 ± 1,27	4,14 ± 0,78	5,71 ± 2,69
18:1 n-7	0,97 ± 0,12	1,25 ± 0,44	0,94 ± 0,22	0,95 ± 0,08	0,89 ± 0,21	1,09 ± 0,43
20:1 n-9	0,07 ± 0,13	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,20 ± 0,30	0,00 ± 0,00
<i>n-6 PUFAs</i>	37,75 ± 2,42	35,09 ± 3,49	34,85 ± 5,02	35,75 ± 4,08	37,35 ± 3,34	37,63 ± 3,40
18:2 n-6	3,54 ± 0,42	5,06 ± 1,74	3,36 ± 0,66	2,92 ± 0,32	2,67 ± 0,44	3,67 ± 1,19
18:3 n-6	0,04 ± 0,07	0,24 ± 0,19	0,35 ± 0,33	0,36 ± 0,15	0,33 ± 0,22	0,54 ± 0,38
20:2 n-6	0,23 ± 0,01	0,40 ± 0,16	0,00 ± 0,00	0,45 ± 0,21	0,14 ± 0,16	0,03 ± 0,07
20:3 n-6	4,21 ± 0,65	2,08 ± 0,38**	1,78 ± 0,39	1,91 ± 0,14	1,00 ± 0,12	1,03 ± 0,23 a
20:4 n-6	27,96 ± 1,39	26,21 ± 3,55	28,07 ± 5,75	29,28 ± 3,94	32,26 ± 3,61	31,24 ± 4,39
22:4 n-6	0,70 ± 0,11	0,60 ± 0,09	0,60 ± 0,08	0,44 ± 0,39	0,58 ± 0,08	0,47 ± 0,07
22:5 n-6	1,07 ± 0,19	0,51 ± 0,10**	0,70 ± 0,14	0,58 ± 0,07	0,37 ± 0,08 b	0,64 ± 0,14
<i>n-3 PUFAs</i>	12,00 ± 2,97	9,61 ± 0,30	6,03 ± 0,44	6,15 ± 0,98	7,11 ± 0,77	5,78 ± 0,63
18:3 n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18:4 n-3	0,14 ± 0,13	0,22 ± 0,18	0,63 ± 0,63	0,36 ± 0,36	0,46 ± 0,33	0,33 ± 0,28
20:3 n-3	0,12 ± 0,21	0,14 ± 0,10	0,12 ± 0,23	0,12 ± 0,21	0,04 ± 0,08	0,00 ± 0,00
20:4 n-3	0,06 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,22 ± 0,44	0,07 ± 0,12	0,14 ± 0,18	0,00 ± 0,00
20:5 n-3	0,23 ± 0,07	0,19 ± 0,26	0,00 ± 0,00	0,15 ± 0,13	0,51 ± 0,35	0,05 ± 0,09
22:5 n-3	0,59 ± 0,13	0,45 ± 0,02	0,20 ± 0,13	0,17 ± 0,15	0,35 ± 0,04	0,17 ± 0,20
22:6 n-3	10,87 ± 3,17	8,61 ± 0,50	4,86 ± 1,03	5,18 ± 0,77	5,61 ± 0,74	5,23 ± 0,49
<i>DMAs</i>	0,74 ± 0,17	0,73 ± 0,39	0,64 ± 0,30	0,73 ± 0,21	0,67 ± 0,17	0,44 ± 0,26
16:0 DMA	0,28 ± 0,09	0,26 ± 0,22	0,32 ± 0,25	0,19 ± 0,17	0,19 ± 0,13	0,29 ± 0,27
18:0 DMA	0,20 ± 0,05	0,24 ± 0,11	0,11 ± 0,13	0,22 ± 0,23	0,31 ± 0,11	0,09 ± 0,12
18:1 n-9 DMA	0,26 ± 0,08	0,23 ± 0,08	0,20 ± 0,14	0,32 ± 0,12	0,16 ± 0,13	0,06 ± 0,12
18:1 n-7 DMA	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>n-3 LC-PUFA</i>	11,86 ± 3,03	9,39 ± 0,27	5,40 ± 0,57	5,79 ± 1,29	6,65 ± 0,70	5,45 ± 0,70
<i>n-6 LC-PUFA</i>	33,94 ± 1,98	29,39 ± 3,85	31,15 ± 5,98	32,01 ± 4,75	34,21 ± 3,67	33,38 ± 4,54
<i>n-6/n-3</i>	3,25 ± 0,64	3,66 ± 0,46	5,82 ± 1,04	5,85 ± 0,35	5,31 ± 0,86	6,53 ± 0,43
<i>ARA/DHA</i>	2,72 ± 0,74	3,06 ± 0,55	5,78 ± 0,19	5,66 ± 0,19	5,79 ± 0,74	5,98 ± 0,66
<i>18:1 n-9 / 18:0</i>	0,10 ± 0,01	0,16 ± 0,06	0,17 ± 0,09	0,13 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,16 ± 0,09
<i>MUFAs / SFAs</i>	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,07	0,18 ± 0,08	0,15 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,18 ± 0,10
<i>PUFAs / MUFAs</i>	10,07 ± 2,32	6,63 ± 3,17	5,68 ± 2,19	6,39 ± 1,94	8,01 ± 2,18	6,69 ± 3,96
<i>PUFAs / SFAs</i>	1,22 ± 0,23	1,03 ± 0,09	0,91 ± 0,11	0,92 ± 0,11	0,98 ± 0,10	0,97 ± 0,11

Medias ± desviación estándar. * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001). **a** = HFD-OVX y HFD vs SD-OVX y vs SD: p < 0,05; **b** = HFD vs HFD-OVX y vs SD-OVX y vs SD: p < 0,05.

Si comparamos las hembras SD-OVX con los dos grupos anteriores (SD y HFD), se observa que el grupo SD-OVX también posee niveles más altos de ambos ácidos grasos

que los otros dos. Finalmente, comparando el grupo HFD-OVX con los otros 3 grupos, podemos observar que SD y SD-OVX poseen mayores niveles de 20:3 n-6 con respecto a HFD-OVX y que este último tenía cantidades superiores de 22:5 n-6 en comparación con el grupo HFD.

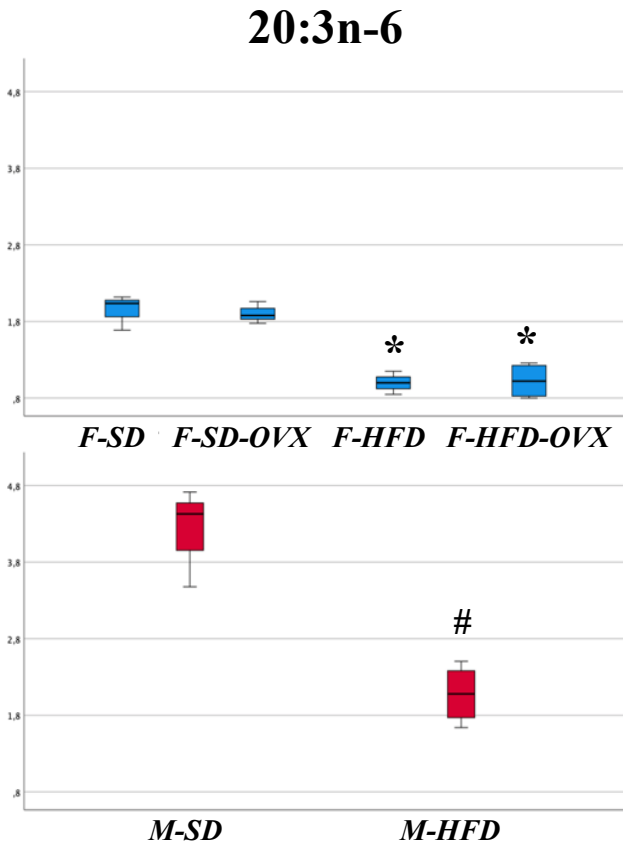


Gráfico 7. Ácido dihomo-gammalinolénico (20:3 n-6) esterificado en fosfatidilinositol. # = $p < 0,05$; * = HFD-OVX y HFD vs SD y vs SD-OVX: $p <$

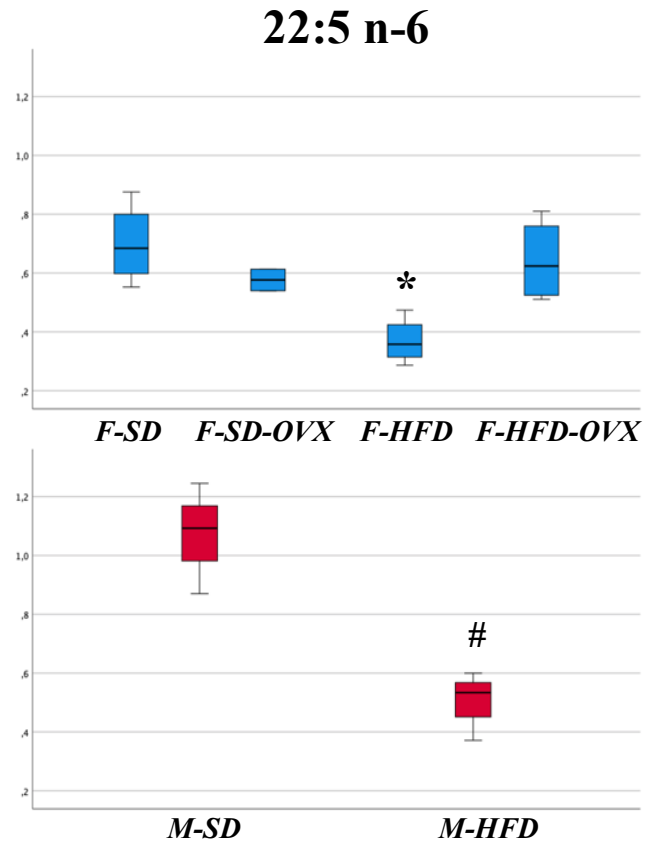


Gráfico 8. Ácido n-6 docosapentanoico (22:5 n-6) esterificado en fosfatidilinositol. # $p < 0,05$; * =HFD vs HFD-OVX y vs SD y vs SD-OVX: $p <$

7.5.4 Triglicéridos

En los machos, se observa que el grupo SD posee niveles mayores de SFAs totales, y de 16:0, 20:0, 16:1 n-7, 18:1 n-7, 20:1 n-9 y 22:5 n-6, mientras que el grupo HFD tiene un índice de MUFAs/SFAs mayor y proporciones más elevadas de MUFAs totales, y de 16:1 n-9, 18:1 n-9 y 20:2 n-6. Contrastando ahora el grupo HFD con el SD en las hembras, observamos cantidades más altas de 16:0 y 16:1 n-7 en SD con respecto a HFD y proporciones mayores de 17:0 y 20:2 n-6 en HFD. Si comparamos el grupo SD-OVX con los dos anteriores, apreciamos un aumento de 18:1 n-7 con respecto a HFD y de 20:1 n-9 con respecto a HFD y SD, no obstante, se observan niveles mayores de 20:2 n-6 en HFD con respecto a SD-OVX.

Tabla 8. Perfil de los diferentes ácidos grasos esterificados en TRIGLICERIDOS, medidos en % de área, de los tejidos renales de machos y hembras a los que se les ha aplicado los diferentes tratamientos.

Ácidos grasos	MACHOS		HEMBRAS			
	SD	HFD	SD	SD-OVX	HFD	HFD-OVX
<i>SFAs</i>	29,72 ± 2,87	24,00 ± 0,62**	30,07 ± 3,94	27,42 ± 2,68	26,46 ± 1,00	27,18 ± 1,80
14:0	1,51 ± 0,42	0,80 ± 0,06	1,37 ± 0,06	0,97 ± 0,65	0,87 ± 0,03	0,86 ± 0,11
15:0	0,18 ± 0,11	0,09 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,08 ± 0,06
16:0	23,36 ± 1,95	18,59 ± 0,60**	22,32 ± 1,88	20,40 ± 1,88	18,74 ± 0,23 a	17,17 ± 0,31b
17:0	0,17 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,16 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,27 ± 0,08 a	0,30 ± 0,04 b
18:0	4,11 ± 1,50	4,14 ± 0,78	5,78 ± 1,17	5,42 ± 1,17	6,11 ± 0,81	8,40 ± 1,59 c
20:0	0,35 ± 0,15	0,11 ± 0,04**	0,25 ± 0,06	0,24 ± 0,06	0,20 ± 0,05	0,27 ± 0,05
<i>MUFAs</i>	45,49 ± 3,61	53,37 ± 1,20**	47,37 ± 3,18	48,98 ± 1,71	50,00 ± 3,03	50,87 ± 1,79
16:1 n-9	0,59 ± 0,09	0,88 ± 0,08*	0,65 ± 0,13	0,82 ± 0,12	0,66 ± 0,07	0,75 ± 0,07
16:1 n-7	6,23 ± 1,90	3,43 ± 0,36*	5,06 ± 1,01	4,15 ± 0,82	2,94 ± 0,37 a	1,83 ± 0,54 b
18:1 n-9	32,67 ± 3,18	45,35 ± 1,23***	37,64 ± 2,80	38,81 ± 1,96	42,13 ± 2,53	43,36 ± 1,82 d
18:1 n-7	3,36 ± 0,49	2,58 ± 0,07*	2,75 ± 0,52	3,52 ± 0,30 e	3,00 ± 0,14	3,09 ± 0,19
20:1 n-9	1,67 ± 0,90	0,61 ± 0,09**	0,75 ± 0,10	1,00 ± 0,14 f	0,63 ± 0,04	1,16 ± 0,32
<i>n-6 PUFAs</i>	22,22 ± 4,73	20,46 ± 0,57	20,62 ± 1,71	21,18 ± 2,35	19,63 ± 0,50	19,82 ± 0,56
18:2 n-6	21,13 ± 4,53	18,99 ± 0,51	19,54 ± 1,50	20,14 ± 2,29	17,72 ± 0,42	18,16 ± 0,66
18:3 n-6	0,07 ± 0,05	0,11 ± 0,02	0,08 ± 0,06	0,02 ± 0,04	0,10 ± 0,15	0,08 ± 0,06
20:2 n-6	0,17 ± 0,02	0,46 ± 0,05***	0,16 ± 0,03	0,14 ± 0,02	0,48 ± 0,01 h	0,58 ± 0,01 g
20:3 n-6	0,19 ± 0,04	0,22 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,22 ± 0,07	0,20 ± 0,02
20:4 n-6	0,41 ± 0,09	0,50 ± 0,07	0,45 ± 0,10	0,48 ± 0,12	0,78 ± 0,43	0,49 ± 0,06
22:4 n-6	0,11 ± 0,09	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,14 ± 0,05	0,20 ± 0,10	0,20 ± 0,04
22:5 n-6	0,14 ± 0,03	0,06 ± 0,04*	0,13 ± 0,05	0,09 ± 0,06	0,13 ± 0,04	0,10 ± 0,07
<i>n-3 PUFAs</i>	1,20 ± 0,48	1,24 ± 0,21	1,02 ± 0,42	1,12 ± 0,66	2,05 ± 1,64	0,97 ± 0,09
18:3 n-3	0,70 ± 0,12	0,74 ± 0,05	0,56 ± 0,08	0,50 ± 0,14	0,74 ± 0,07 g	0,55 ± 0,05
18:4 n-3	0,07 ± 0,08	0,11 ± 0,09	0,12 ± 0,03	0,14 ± 0,04	0,14 ± 0,17	0,00 ± 0,00 c
20:3 n-3	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:4 n-3	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
20:5 n-3	0,11 ± 0,22	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,12	0,10 ± 0,21	0,47 ± 0,93	0,00 ± 0,00
22:5 n-3	0,04 ± 0,07	0,08 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,05	0,12 ± 0,16	0,11 ± 0,02
22:6 n-3	0,29 ± 0,15	0,30 ± 0,12	0,28 ± 0,25	0,35 ± 0,26	0,58 ± 0,41	0,32 ± 0,07
<i>DMAs</i>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
16:0 DMA	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18:0 DMA	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18:1 n-9 DMA	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18:1 n-7 DMA	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>n-3 LC-PUFA</i>	0,43 ± 0,43	0,39 ± 0,16	0,34 ± 0,37	0,48 ± 0,52	1,16 ± 1,49	0,42 ± 0,08
<i>n-6 LC-PUFA</i>	0,86 ± 0,22	0,90 ± 0,17	0,84 ± 0,20	0,88 ± 0,20	1,33 ± 0,63	0,99 ± 0,11
<i>n-6/n-3</i>	19,84 ± 6,29	16,84 ± 2,67	21,98 ± 5,63	22,90 ± 9,99	13,33 ± 6,69	20,52 ± 2,19
<i>ARA/DHA</i>	1,58 ± 0,53	1,79 ± 0,46	2,29 ± 1,06	1,85 ± 0,88	1,43 ± 0,26	1,58 ± 0,20
<i>18:1 n-9 / 18:0</i>	8,85 ± 3,61	11,27 ± 2,27	6,83 ± 1,77	7,39 ± 1,46	7,03 ± 1,31	5,33 ± 1,17
<i>MUFAs / SFAs</i>	1,54 ± 0,14	2,23 ± 0,11***	1,60 ± 0,27	1,80 ± 0,23	1,89 ± 0,18	1,88 ± 0,18
<i>PUFAs / MUFAs</i>	0,52 ± 0,14	0,41 ± 0,02	0,46 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,44 ± 0,07	0,41 ± 0,02
<i>PUFAs / SFAs</i>	0,81 ± 0,25	0,90 ± 0,02	0,73 ± 0,14	0,82 ± 0,15	0,82 ± 0,05	0,77 ± 0,06

Medias ± desviación estándar. *(p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001). **a** = HFD y HFD-OVX vs SD: p < 0,05; **b** = HFD-OVX vs SD-OVX: p < 0,05; **c** = HFD-OVX vs SD y vs SD-OVX: p < 0,05; **d** = HFD-OVX vs SD: p < 0,05; **e** = SD-OVX vs SD: p < 0,05; **f** = SD-OVX vs SD y vs HFD: p < 0,05; **g**: HFD-OVX vs HFD: p < 0,05; **h**: HFD y HFD-OVX y vs SD-OVX y vs SD: p < 0,05.

Finalmente, si comparamos el grupo HFD-OVX con los otros 3, observamos que este último posee niveles mayores de 17:0 y 18:0 con respecto a SD y SD-OVX y niveles superiores de 20:2: n-6 en comparación con el resto de grupos, no obstante, el grupo SD y SD-OVX posee cantidades superiores de 16:0, 16:1 n-7 y 18:4 n-3 que el grupo HFD-OVX y el grupo HFD posee niveles más altos de 18:3 n-3 que HFD-OVX.

18:0

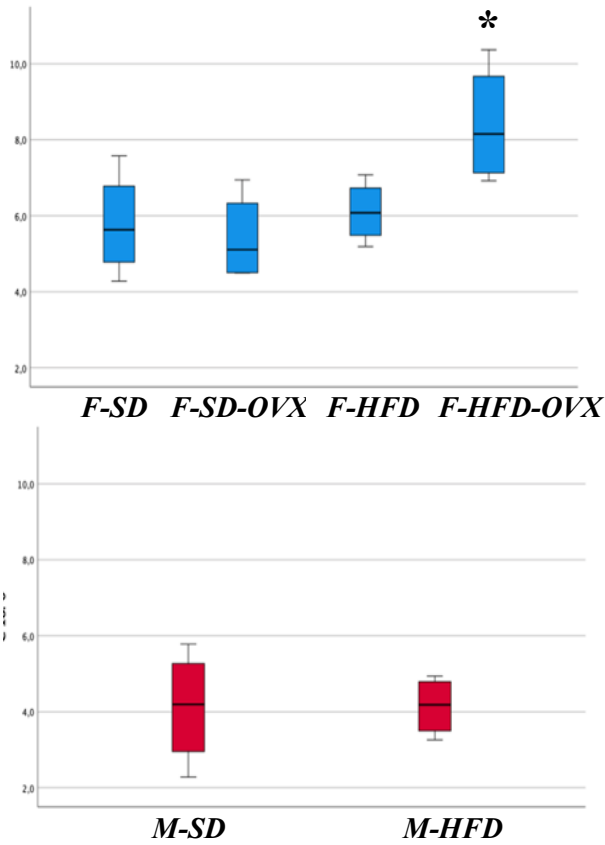


Gráfico 9. Ácido esteárico (18:0) esterificado en triglicéridos. * = HFD-OVX vs HFD y vs SD y vs SD-OVX: $p < 0,05$.

18:1 n-9

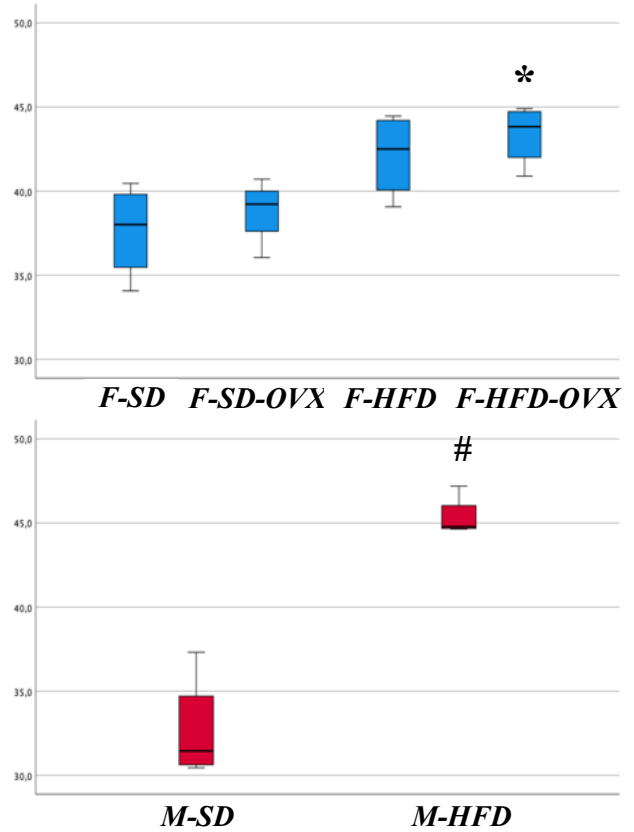


Gráfico 10. Ácido oleico (18:1 n-9) esterificado en triglicéridos. # = $p < 0,05$; * = HFD-OVX vs SD y vs SD-OVX: $p < 0,05$.

16:0

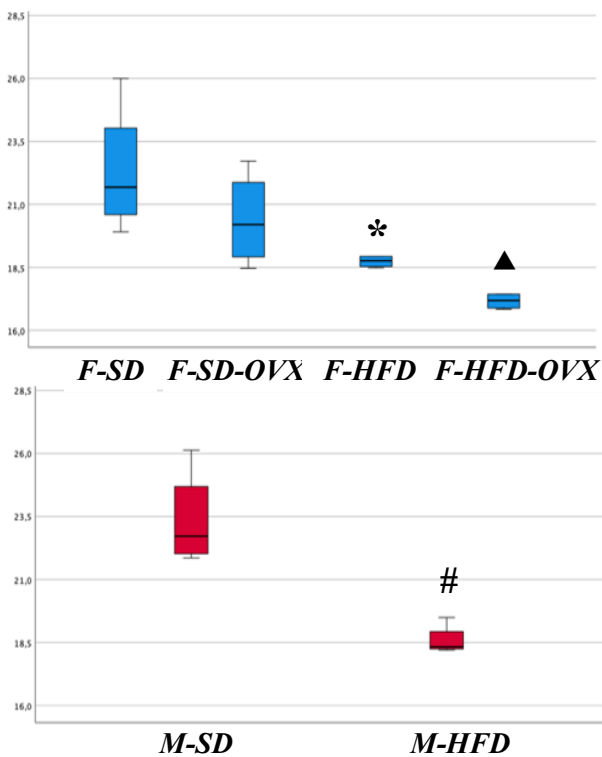


Gráfico 11. Ácido palmítico (16:0) esterificado en triglicéridos. # = $p < 0,05$; * = HFD vs SD: $p < 0,05$; ▲ = HFD-OVX vs SD-OVX y vs SD: $p < 0,05$

16:1 n-7

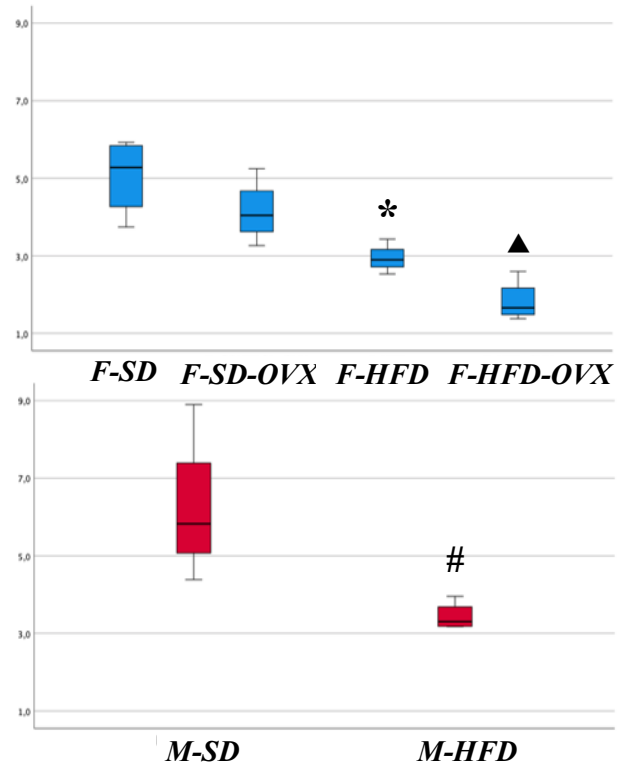


Gráfico 12. Ácido palmitoleico (16:1 n-7) esterificado en triglicéridos. # = $p < 0,05$; * = HFD vs SD: $p < 0,05$; ▲ = HFD-OVX vs SD-OVX y vs SD: $p < 0,05$

20:2 n-6

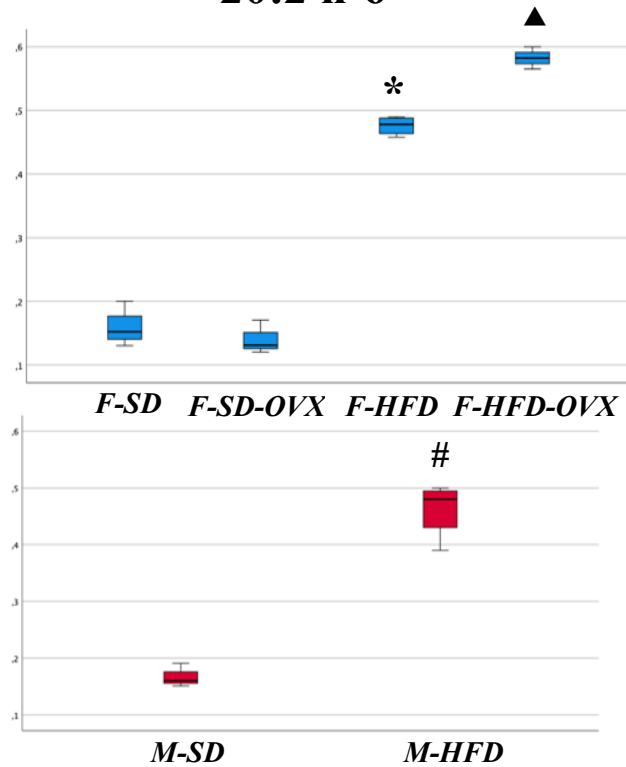


Gráfico 13. Ácido eicosadienoico (20:2 n-6) esterificado en triglicéridos. # = $p < 0,05$; * = HFD-OVX y HFD vs SD y vs SD-OVX: $p < 0,05$; ▲ = HFD-OVX vs HFD: $p < 0,05$

7.6 Reducción de dimensiones de las variables y caracterización de los individuos en las componentes (PCA).

En las variables tratadas en este trabajo, el número de componentes principales (CPs, nuevas variables) seleccionadas fue de 3. Se ha comprobado mediante comunalidad (porcentaje de información acumulada de cada variable), que el porcentaje era lo suficientemente elevado y que las variables originales quedan explicadas con estas tres componentes, lo que justifica la aplicación de la técnica.

Se ha enfrentado a la componente 1 (eje X) con la componente 2 (eje Y), puesto que son las que más información acumulan en los individuos dentro de cada grupo. Se ha eliminado del modelo a los individuos que poseían valores de 0 en alguno de sus ácidos grasos y a los ácidos grasos que se encontraban ausentes. Se ha caracterizado a cada individuo dentro de las nuevas variables, representándose como grupo control a los que han recibido la dieta estándar (SD).

7.6.1 Reducción de dimensiones y caracterización en machos

En el PCA del perfil de ácidos grasos de los machos, para PC, las componentes acumularon el 74,47 % de la varianza; para PE, se acumuló el 87,49%; para PI se acumuló el 81,80%; y para TAG se acumuló el 81%.

Gráfico de dispersión 1. Caracterización de los machos control y HFD a partir de la FOSFATIDILCOLINA en la componente 1 y 2.

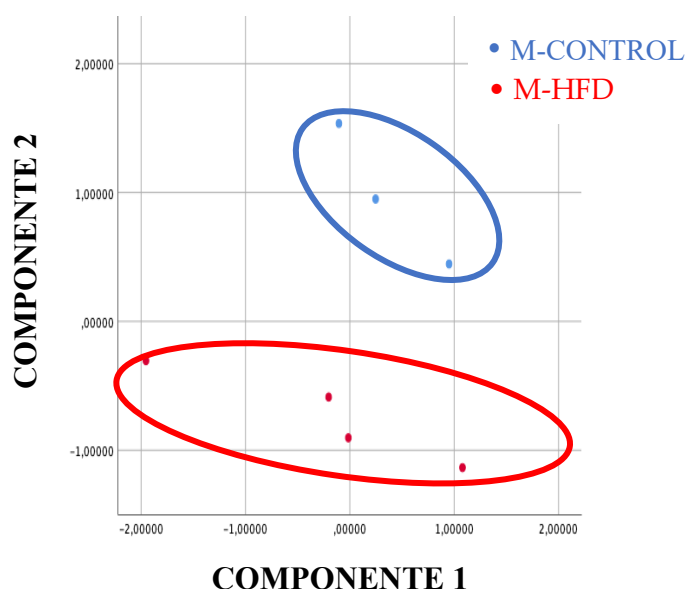


Gráfico de dispersión 2. Caracterización de los machos control y HFD a partir de la FOSFATIDILETANOLAMINA en la componente 1 y 2.

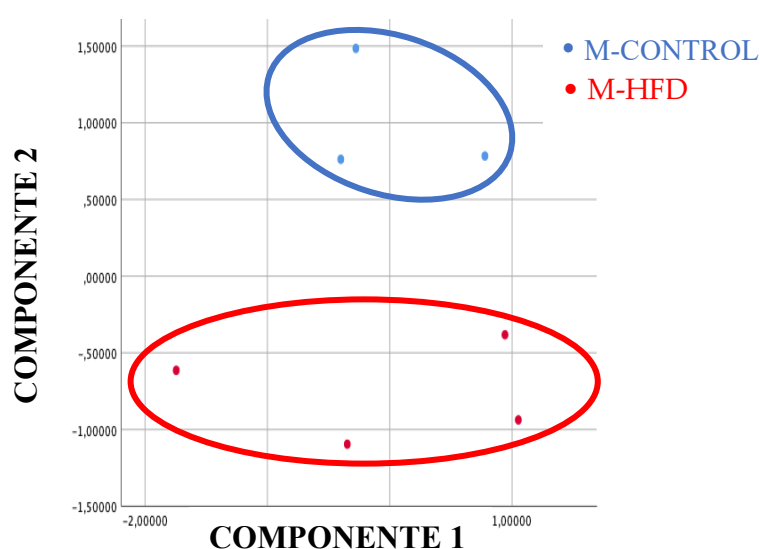


Gráfico de dispersión 3. Caracterización de los machos control y HFD a partir del FOSFATIDILINOSITOL en la componente 1 y 2.

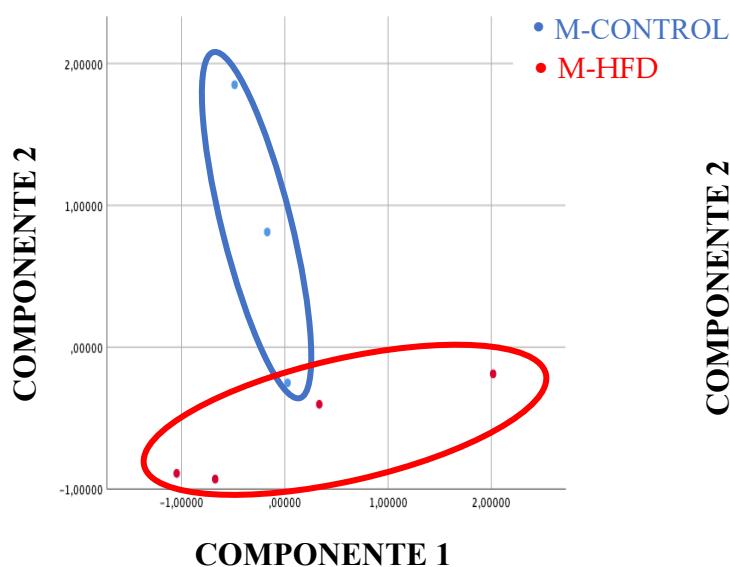
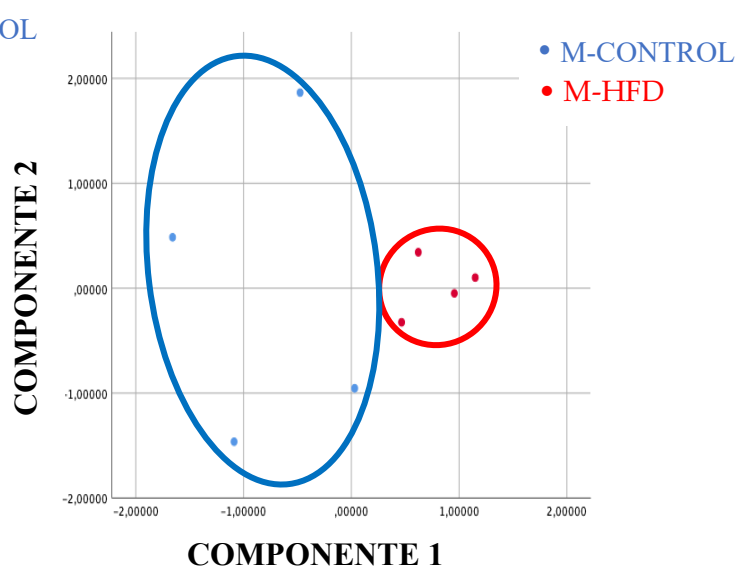


Gráfico de dispersión 4. Caracterización de los machos control y HFD a partir de los TRIGLICÉRIDOS en la componente 1 y 2.



Se observa que tanto en PC como en PE, las componentes nos separan a los individuos de cada tratamiento en dos grupos bien diferenciados. En PI, se observa también una separación de ambos grupos con una ligera intersección. En TAG, se observa una mayor dispersión de los datos que en PC, PE y PI en el grupo CONTROL con respecto al HFD, aunque también se produce una separación entre los individuos.

7.6.2 Reducción de dimensiones y caracterización en hembras

En el PCA de los ácidos grasos de las hembras: para PC, las componentes acumularon el 70,5 % de la varianza; para PE, se acumuló el 79,65%; para PI se acumuló el 73,6%; y para TAG se acumuló el 67,34%.

En el caso de las hembras, en PC, se produce una separación de los grupos de individuos que han recibido la dieta HFD con respecto a los que han recibido la dieta SD y una substratificación dentro de los que han recibido solamente la dieta (HFD) y los que han recibido la misma dieta y la castración (HFD-OVX), que quedan ligeramente separados.

Observamos en PE que las componentes nos caracterizan sin distinción a los individuos que han recibido la dieta CONTROL y HFD independientemente de la castración.

En el perfil de PI, no se observa separación de los individuos en las componentes por acción de ninguno de los dos factores (dieta y castración).

En los TAG observamos una separación de las componentes en 3 grupos bien diferenciados: CONTROL y CONTROL-OVX en un grupo, HFD en otro grupo y HFD-OVX en otro grupo.

Los ácidos grasos más influyentes en el comportamiento de las componentes 1, 2 y 3 (correlaciones) y las comunalidades para cada clase lipídica dentro de cada sexo, se muestran en las tablas complementarias 2 y 3 del anexo 3.

Gráfico de dispersión 5. Caracterización de los 4 grupos de hembras a partir de la FOSFATIDILCOLINA en la componente 1 y 2.

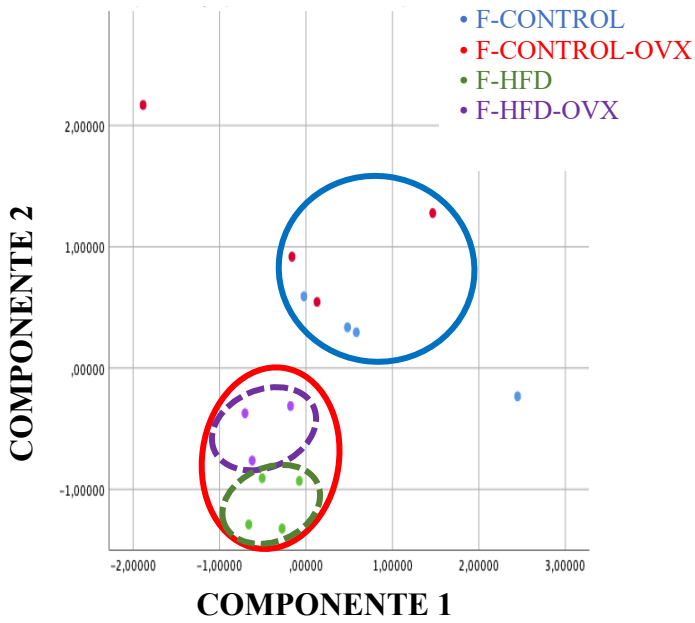


Gráfico de dispersión 6. Caracterización de los 4 grupos de hembras a partir de la FOSFATIDILETANOLAMINA en la componente 1 y 2.

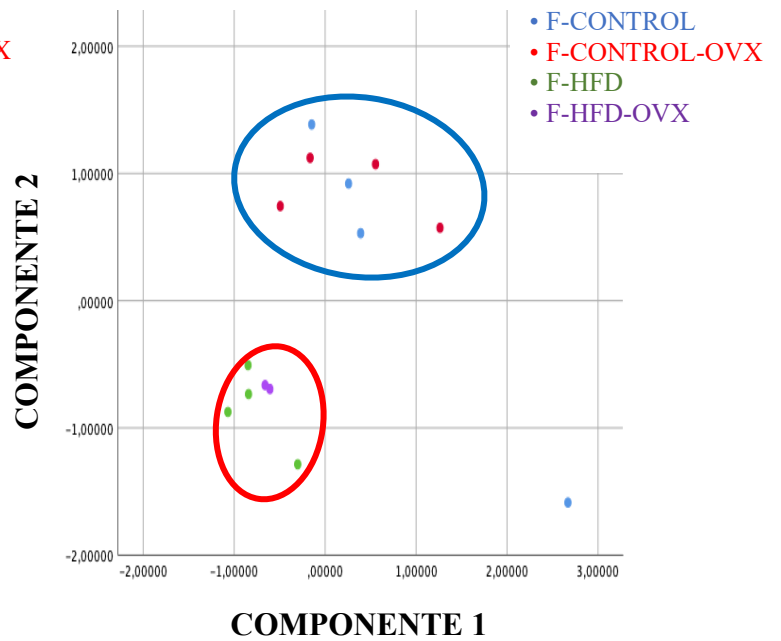


Gráfico de dispersión 7. Caracterización de los 4 grupos de hembras a partir del FOSFATIDILINOSITOL en la componente 1 y 2.

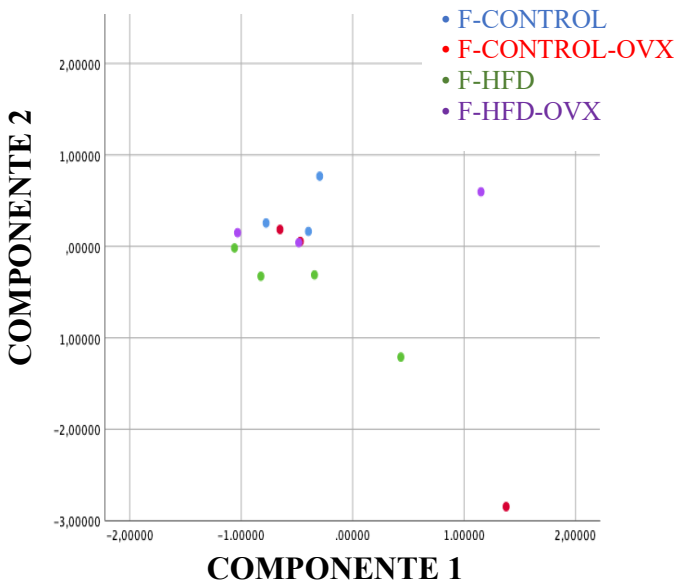
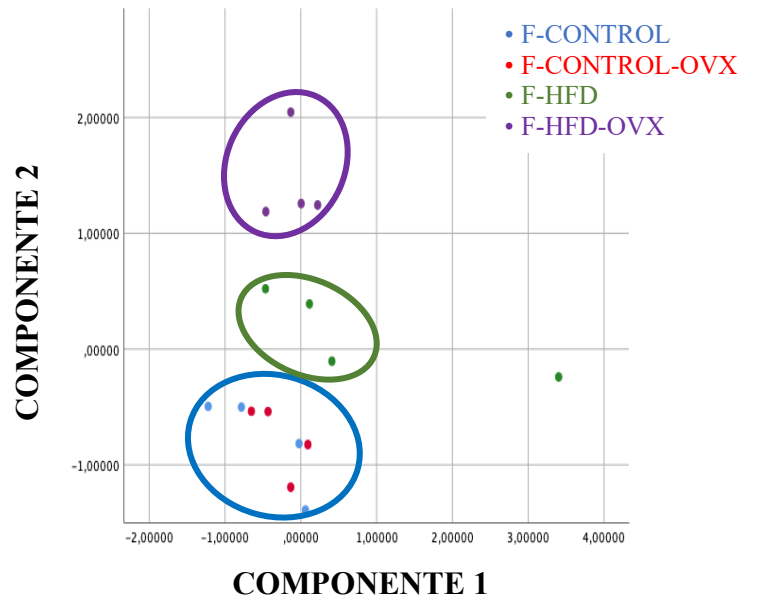


Gráfico de dispersión 8. Caracterización de los 4 grupos de hembras a partir de los TRIGLICERIDOS en la componente 1 y 2.



8. DISCUSIÓN

8.1 Principales hallazgos del estudio.

8.1.1. Entre sexos control.

La comparación de contenidos lipídicos y de los perfiles de las clases lipídicas entre los grupos control, reveló que los machos en condiciones basales, poseen más cantidad de lípido renal que las hembras y que el perfil de lípidos neutros varía entre sexos, observándose una mayor cantidad de TAG y SE y una menor proporción de MAG+DAG en machos con respecto a las hembras. Precisamente, la mayor presencia grasa en los tejidos, suele ir asociada a una mayor presencia de lípidos de reserva, principalmente TAG. Si complementamos los datos obtenidos en los TAG con los niveles de MAG y DAG, podemos hacernos una idea de la actividad metabólica del tejido, que es mediada, en gran medida, por la acción de glicerolipasas, enzimas encargadas de romper los ácidos grasos esterificados en TAG para convertirlos en MAG, DAG y FFA. Estos procesos, tienen lugar, bien sea para la incorporación de los ácidos grasos liberados en otras clases lipídicas estructurales del propio tejido, su movilización a otros tejidos o la incorporación a la mitocondria (o peroxisoma) para la β -oxidación (Bestard-Escalas et al., 2019). En cualquier caso, en virtud de lo observado, se podría sugerir que la situación metabólica podría manifestar una mayor actividad de las glicerolipasas en el tejido renal de las hembras que en el de los machos.

El perfil de ácidos grasos en condiciones control en ambos sexos cambia ligeramente, aunque revela una esterificación preferente del 18:0 y el ARA (20:4 n-6) en PI y PE; del 16:0 y DHA en PC y del 18:1 n-9, 18:2 n-6 y 16:0 en TAG. Los resultados también mostraron cantidades altas de DMAs en PE en comparación con las otras clases, sobretodo de 16:0 DMA y 18:0 DMA, tanto en machos como en hembras. Se observó también que a pesar del poco aporte dietario de DHA y ALA, los animales poseen cantidades notables del primero, por lo que podría estarse dando simultáneamente un proceso de bioacumulación y retención selectiva de DHA (Afonso, 2019; Diaz-López, 2010), acompañado de la actividad elongasa-desaturasa que transforma el ALA en DHA, siendo estas actividades aparentemente mucho más eficientes en machos que en hembras.

Este perfil también mostró que el ARA se encuentra en cantidades notablemente más altas en PC y PE del tejido renal de las hembras y que los niveles de DHA se encuentran en cantidades superiores en machos en todas las clases lipídicas de membrana, hecho que se repite en los niveles de n-3 DPA (22:5n-3), que aunque ha sido menos estudiado que

el DHA, también sirve como sustrato para la síntesis de mediadores pro-resolutivos antiinflamatorios (como MaR_{n-3} DPA, PD_{n-3} DPA y RV_{Sn-3} DPA) (Dalli & Serhan, 2013), por lo que se puede sugerir que el perfil en condiciones basales manifiesta que la lipidómica de las hembras podría ser menos eficaz a la hora de amortiguar los daños inflamatorios mediante el uso de mediadores eicosanoides y docosanoides pro-resolutivos, aunque no se descarta la posibilidad de que existan otros mecanismos que permitan a las hembras gozar de una salud plena a pesar de tener un perfil más insalubre. Se observó también que el EPA se encuentra ausente en ambos sexos o en cantidades muy bajas en todas las clases lipídicas, un hecho ya reportado previamente en ratones (Chen et al., 2013; Fabelo, 2013).

8.1.2 Tras la aplicación de HFD, castración y HFD + castración.

Los datos del perfil de clases lipídicas sugiere que tanto en machos como en hembras, la proporción de lípidos polares estructurales de membrana son capaces de mantenerse constantes a pesar de la administración de la dieta HFD y de la castración, probablemente debido a la necesidad intrínseca del riñón a preservar sus fenotipos funcionales (Levental et al., 2020), hecho que no ocurrió en los lípidos neutros, donde se produjo un aumento de los TAG y una disminución de los MAG+DAG y FFA en machos HFD. Se observó, además que el aumento significativo del CHO en hembras HFD-OVX con respecto al grupo SD, podría evidenciar una posible sinergia entre las hormonas femeninas y el riñón, lo que sugiere que los estrógenos podrían estar teniendo un efecto protector ante el acúmulo de CHO en las células renales.

El análisis de componentes principales nos caracterizó de una manera consistente los perfiles en cada tratamiento. Los resultados observados en ambos análisis dilucidaron que las clases lipídicas que más alteraciones poseen en sus ácidos grasos esterificados tras la aplicación de HFD y de la castración son TAG y PC, seguidos de PE y finalmente de PI, que es la que menos cambios sufre, por lo que se podría sugerir que esta última clase lipídica posee una fuerte necesidad estructural de mantener su patrón de esterificación a pesar de las perturbaciones inducidas por la dieta y la castración. En cualquier caso, no se observó que la dieta HFD ni la castración afectase a los niveles de ARA y DHA esterificados en las clases lipídicas de ninguno de los dos sexos.

Es importante destacar que la mayoría de los PUFAs se encuentran esterificados en la membrana plasmática, el aparato de Golgi, la mitocondria y el retículo endoplásmico (Bestard-Escalas et al., 2019), por lo que los cambios enunciados en estos perfiles

estructurales pueden desembocar potencialmente en cambios en los receptores acoplados a las membranas, que pueden interferir en la actividad metabólica y vías de señalización celular (Declèves, et al., 2019; Chen et al., 2013; Fabelo, 2013). Sin embargo, los TAG entre los lípidos neutros y la PC entre los polares, son considerados reservorios de ácidos grasos a los que el tejido puede recurrir para su metabolismo energético y/o turnover de fosfolípidos de membrana, siendo TAG y PC, más susceptibles de ver modificado su perfil ante los cambios dietarios. PE y PI, juegan papeles fisiológicos y estructurales clave y que dependen del muy específico perfil de sus ácidos grasos (Reis et al., 2016).

8.1.3 Ácidos grasos candidatos

De todos los ácidos grasos analizados en las diferentes clases lipídicas, se podrían sugerir 9 biomarcadores potenciales: en primer lugar el **16:0** y **16:1 n-7**, que disminuyeron en los TAG de ambos sexos en el grupo HFD y cuya caída fue aún mayor en el grupo HFD-OVX de las hembras; el **18:0**, que aumentó de manera considerable en PC y TAG en el grupo HFD-OVX de las hembras en comparación con el resto de grupos, lo que podría evidenciar un efecto de la castración sobre la obesidad, al igual que se observó con el colesterol; el **18:1 n-9**, que aumentó también en el grupo HFD-OVX de las hembras y en el grupo HFD de los machos; el **18:0 DMA** de la PE, debido a su aumento significativo en los grupos HFD de ambos sexos y su aumento aún mayor en el grupo HFD-OVX de las hembras; el **18:2 n-6**, que disminuyó en los grupos HFD de ambos sexos en PC y PE; el **20:2 n-6**, que aumentó significativamente en los TAG de los grupos HFD en ambos sexos y cuyo aumento fue aún mayor en el grupo HFD-OVX de las hembras; el **20:3 n-6**, que disminuyó en todas las clases lipídicas de membrana en los grupos HFD de ambos sexos y en el grupo HFD-OVX de las hembras; y finalmente, el **22:5 n-6**, que disminuyó en todas las clases lipídicas de los machos HFD y en el PI de las hembras HFD. Aunque algunos de estos cambios como el aumento de 18:0 y 18:1n-9, podrían ser el resultado de la inclusión de una dieta más grasa y particularmente rica en estos ácidos grasos, otros, sin embargo, no parecen obedecer de manera directa a estos cambios dietarios inducidos. El caso más evidente es la caída del 16:0 en los tratamientos HFD a pesar de su mayor aporte en la dieta.

8.2 Comparación con otros estudios y fisiopatología asociada a los perfiles.

El aumento significativo del colesterol en las hembras HFD-OVX coincide con lo descrito en estudios anteriores (Rodríguez et al., 2021; Wahba & Mak 2007), donde parece ser que los individuos del sexo femenino, tanto en este modelo animal como en otros modelos

murinos, y de grandes animales (cerdo y cabra) y en el humano, poseen mayor tendencia a acumular colesterol en el riñón que los machos, lo que podría manifestar un perfil más aterogénico (Viktorinova et al., 2021).

El empaquetamiento de los ácidos grasos en diferentes clases lipídicas obedece a lo dicho en el apartado 3.2 y a la literatura consultada, que manifiesta que los LC-PUFA se esterifican preferentemente como fosfolípidos de membrana, mientras que los que contienen un número menor a 18 átomos de carbono se esterifican tanto en la membrana como en TAG (Chen et al., 2020; Bestard-Escalas et al., 2019), además, los MUFAs son los principales componentes básicos para la síntesis de TAG (Pakiet et al., 2020; Duarte et al., 2014), lo que justifica su mayor presencia en esta clase lipídica.

La ausencia de EPA en todas las clases manifiesta lo expuesto en dos estudios realizados en 2013, ya que, a diferencia de los humanos, en el modelo murino, este ácido graso no se bioacumula en los tejidos, sino que es degradado por la mitocondria (o el peroxisoma) o transformado directamente hacia n-3 DPA o DHA, por lo que su presencia en algunos casos podría estar dando de manera transitoria (Chen et al., 2013; Fabelo, 2013).

El mantenimiento de los niveles de ARA no coincide con lo descrito en otros estudios, donde la dieta HFD causa un aumento de este ácido graso en modelo animal murino, probablemente debido a una activación al alza de la maquinaria elongasa-desaturasa inducida por HFD (Declèves et al., 2019). Cabe destacar que ARA, además de relacionarse con una regulación al alza de eicosanoides proinflamatorios, puede incentivar la síntesis de citoquinas como TNF α , IL1B, IL6 e IL8 mediante la interacción con receptores nucleares del sistema NFkB (Dasilva & Medina, 2019), por lo que, en virtud de lo observado, y teniendo en cuenta que el perfil ARA/DHA y ARA/EPA es el que se relaciona de una manera consistente con una predisposición inflamatoria, se proponen 3 escenarios posibles:

1. Que aún no ha transcurrido el tiempo suficiente para notar este aumento de ARA y que las células son capaces, tras 6 meses de administración de esta dieta insalubre, de mantener la homeostasis de sus precursores inflamatorios, pudiéndose dar la posibilidad de ver estos cambios si se continuase la dieta HFD durante un periodo más prolongado de tiempo.
2. Que se esté dando una situación proinflamatoria al alza mediante la síntesis de prostanooides y citoquinas, pero el mantenimiento de las propiedades físicas de la membrana obliga a que el perfil ARA/DHA permanezca constante en este tejido.

3. Que la dieta HFD no induzca un efecto proinflamatorio en este tejido.

En cualquier caso, para obtener conclusiones más robustas, estos datos deben ser complementados con un estudio de citoquinas y oxilipinas que manifieste la presencia directa de moléculas inflamatorias. Por otro lado, sería interesante analizar el perfil de ácidos grasos de la dieta de estos estudios previos, ya que, en el presente trabajo, la HFD aportaba una menor proporción del 18:2n-6, o principal precursor del ARA.

Partiendo de los hechos señalados anteriormente, nos centramos ahora en la búsqueda del sentido biológico de los candidatos a biomarcadores encontrados. En primer lugar, cabe destacar que, aunque ARA, EPA y DHA son los que mayor implicación fisiopatológica poseen en los procesos inflamatorios, no son los únicos. Después de una ardua búsqueda en la literatura, se ha encontrado una relación estrecha entre algunos de los lípidos propuestos y la patogénesis inflamatoria renal. Uno de estos ácidos grasos es el DGLA (20:3 n-6, ácido dihomo- γ linolénico), que a pesar de ser el precursor directo de ARA, tiene la capacidad de producir su propia cascada de eicosanoides con propiedades antiinflamatorias (Novichkova et al., 2020). Además, los compuestos producidos a partir de éste son (entre otros) las prostaglandinas de la serie 1 (PG₁), que además de tener menor actividad biológica inflamatoria que las PG₂, compiten en su síntesis con los prostanooides producidos a partir de ARA por la vía COX 1/2, dando lugar a una disminución de eicosanoides proinflamatorios con alta actividad biológica (Novichkova et al., 2020; Wang et al., 2012; Horrobin, 1980). Cabe señalar que la regulación a la baja de DGLA en ambos sexos en todas las clases lipídicas estructurales tras la administración de HFD, coincide a su vez, con lo observado en un estudio reciente, donde se dilucidó que los niveles plasmáticos del mismo también disminuían tras la aplicación de una dieta similar (Declèves et al., 2019), no obstante, las cantidades significativamente menores de este ácido graso en el tejido renal de hembras control con respecto a los machos control y su caída aún más pronunciada tras la aplicación de HFD, podría evidenciar un aumento de la susceptibilidad de las mismas hacia una situación proinflamatoria y protrómbica, lo que apoyaría el supuesto 2.

Otro de los biomarcadores propuestos fue el n-6 DPA (22:5 n-6), que de manera similar al DHA y n-3 DPA (22:5 n-3), es también precursor de oxilipinas funcionales antintrómbicas, como 11-HpDPA n-6 y 14-HpDPA n-6, producidas mediante la ruta 12-LOX, que son además inhibitorias de la actividad del TXA₂ derivado del ARA (Yeung et al., 2020). En nuestros resultados, vemos que las hembras poseen menor cantidad de n-6

DPA en condiciones control que los machos, no obstante, sorprendió ver que el contenido de éste cayó en todas las clases lipídicas de los machos y solo disminuyó en PI de las hembras tras la aplicación de HFD. A pesar de que se ha realizado una búsqueda en la literatura sobre estudios que avalen la influencia del n-6 DPA en la patogénesis renal influenciada por HFD, solamente se han encontrado resultados de la influencia del n-3 DPA, dado que las funciones derivadas del n-6 DPA como potentes oxilipinas funcionales influyentes en la reactividad plaquetaria y trombótica se descubrieron por primera vez en el año 2020 (Yeung et al., 2020), lo que evidencia la necesidad de estudiar mejor este ácido graso y su dinámica en ambos sexos.

Centrándonos ahora en el posible biomarcador 18:0 DMA de la etanolamina (PlsEtn), vemos que la regulación al alza en todos los individuos HFD y aún más en hembras HFD-OVX sugiere que se produce cierta interacción entre la obesidad inducida por la dieta y la castración. En la bibliografía vista en los últimos años, se observó que niveles reducidos de plasmalógenos pueden contribuir al desarrollo de patologías cardiometabólicas y hepáticas (Dorninger et al., 2020; Ding et al., 2020; Paul & Meikle, 2019) y que el aumento de PlsEtn en el riñón se relaciona con un aumento de los niveles de HDL para frenar los efectos nocivos de la acumulación de CHO y TAG (Maeba et al., 2018), por lo que se podría sugerir que la regulación al alza del mismo en el tejido renal se está dando como un factor de protección de las células en un intento de disminuir los efectos de la dislipemia renal y acumulación de colesterol inducida por HFD y potenciada tras la castración, hecho que también se ha observado en pacientes con osteoporosis postmenopáusica (Lee et al., 2020).

A pesar de que se ha visto que el aumento del 20:2 n-6 en los TAG de los grupos HFD y su cantidad aún más elevada en hembras HFD-OVX, sigue la misma tendencia que lo dicho con el 18:0 DMA, este ácido graso es uno de los menos estudiados hasta ahora, y aunque es un precursor de la ruta de síntesis hacia ARA, no se ha encontrado literatura que avale una regulación al alza del 20:2 n-6 directamente asociada a procesos inflamatorios o factores de protección. No obstante, sí que se ha visto que su aumento podría deberse a una actividad elongasa estimulada en el tejido por influencia de la dieta (Huang et al., 2019), que se potencia tras la castración. Aunque hay que tener en cuenta que la HFD aporta cantidades ligeramente mayores de 20:2 n-6 que SD y que los niveles más altos del mismo en los grupos HFD y aún mayores en HFD-OVX podrían deberse a aportaciones mayores en la dieta, resulta interesante ver que las diferencias se producen

en los TAG en lugar de en los lípidos estructurales, que es donde suele esterificarse este ácido graso en mayor proporción (Pakiet et al; 2020; Chen et al., 2020), por lo que esta dinámica atípica podría tener cierto rol en la progresión del daño renal.

Haciendo hincapié en que la dieta aporta cantidades mayores tanto de palmítico (16:0) como de esteárico (18:0), podemos concluir que las asociaciones y los resultados vistos en estos dos ácidos grasos junto oleico (18:1 n-9) y el palmitoleico (16:1n-7) concuerdan con las evidencias emergentes en estudios celulares y animales, que sugieren mecanismos biológicos donde los SFAs, pero no los MUFAs, pueden inducir a la resistencia a la insulina y a la inflamación al interactuar con factores nucleares que aumentan la producción de IL-6 y expresión de TNF- α (Norde et al., 2018). Los ensayos consultados demuestran que el ácido palmítico, y en menor medida el esteárico, son importantes protagonistas en los efectos nocivos derivados de la obesidad. También se relaciona la presencia de ácido oleico como un factor protector contra la resistencia a la insulina y como un inductor potente de la beta-oxidación del ácido palmítico (Norde et al., 2018; Mu et al., 2014), por lo que en condiciones fisiológicas, uno de los mecanismos celulares para frenar la acumulación de palmítico es mediante su desaturación a ácido palmitoleico y luego su elongación hacia ácido oleico (Norde et al., 2018; Mu et al., 2014), no obstante, este último, en cantidades altas, también puede resultar perjudicial, ya que estimula una regulación al alza muy potente de la actividad elongasa-desaturasa y de la beta oxidación, que puede contribuir a la liberación de especies reactivas de oxígeno (Arany et al., 2013), produciendo una respuesta inflamatoria como consecuencia de la alteración del ambiente redox y una disfunción mitocondrial en el riñón (Dasilva & Medina, 2019).

Los mecanismos expuestos anteriormente coinciden con los resultados vistos en este estudio, donde la disminución de palmítico y el aumento de oleico en machos HFD y su disminución aún mayor en hembras HFD-OVX evidencian una actividad metabólica compensatoria al alza. Resultados similares también se han visto en otros estudios de plasma sanguíneo y músculo en modelo animal murino, porcino y en humanos, donde además, se ha relacionado la ausencia de estrógenos femeninos con una deposición al alza de palmítico, obligando a las células a activar su maquinaria mitocondrial para la beta oxidación y a estimular la actividad elongasa-desaturasa del retículo endoplásmico hacia la síntesis de oleico (Heras-Molina et al., 2020; Cybulska et al., 2019).

En conclusión, los resultados expuestos y su relación con los estudios recientes demuestran, por un lado, que la lipidómica entre sexos cambia significativamente en

condiciones basales, y por otro lado, que la aplicación de una dieta insalubre como la HFD produce cambios importantes en los lípidos estructurales y de reserva, donde en algunos casos, la pérdida de estrógenos femeninos en hembras puede empeorar la fisiopatología de este perfil. Por todo ello, en virtud de lo observado, se propone al índice **16:0/18:1n-9** como un posible biomarcador ante la acción nociva de la obesidad (potenciada por la menopausia), así como al **18:0 DMA** como un factor de protección sintetizado para paliar el estrés oxidativo y los efectos inflamatorios de la beta-oxidación relacionados con el exceso de ácido oleico y palmítico. También se propone el índice **ARA/DGLA** como indicador de susceptibilidad inflamatoria inducida por la dieta y en menor medida al **18:0** y al **20:2 n-6** por su aumento considerable en los TAG de las hembras HFD-OVX en comparación con el grupo HFD.

8.3 Limitaciones del estudio

Se reconocen dentro de las limitaciones de este estudio la falta de complementación con análisis bioquímicos y metabólicos, si bien algunos de ellos fueron recogidos en el contexto del proyecto. También es limitante el pequeño tamaño muestral ($n = 4$), debido al elevado número de clases lipídicas analizadas por tratamiento. Además, para detectar estos biomarcadores lipídicos antes mencionados, sería necesaria una biopsia, ya que las muestras se han obtenido directamente del riñón, por lo que se necesita la optimización de un protocolo que nos permita correlacionar estos datos con análisis plasmáticos o en orina, para ser lo menos invasivo posible a la hora de examinar la lipidómica renal. Otra limitación es la dieta, no todas tienen esta composición y puede que el perfil cambie si se aplica otra dieta insalubre. En este caso, se administró poco 18:2 n-6 en HFD, pero se sabe que este ácido graso está presente en nuestra dieta en grandes cantidades debido al alto consumo de derivados de semillas oleaginosas en la población occidental, además, el órgano lipogénico por excelencia es el hígado, por lo que no se puede asegurar esta actividad metabólica elongasa-desaturasa en el riñón sin un estudio de seguimiento metabólico con ácidos grasos trazadores y de expresión génica. Por último, una posible limitación es que este modelo animal no posee EPA o se encuentre en muy baja cantidad, hecho que no ocurre en el ser humano, donde este ácido graso está presente en multitud de tejidos, lo que podría resultar en un sesgo del modelaje experimental.

No se pretende ser pretenciosos ni afirmar con rotundidad hechos que pueden conllevar sesgos debido a las limitaciones antes mencionadas, no obstante, se espera que estos resultados puedan dar una visión positiva y sirvan como modelo para otros posteriores en

una mejora en el pronóstico y terapia, que redunde en una mayor longevidad y calidad de la vida de los pacientes susceptibles a desarrollar ERC.

9. CONCLUSIONES

1. Una dieta alta en grasas produce modificaciones en los ácidos grasos esterificados tanto en los lípidos estructurales como en lípidos de reserva del tejido renal, lo que podría suponer un factor de riesgo en la alteración de vías de señalización celular de las proteínas integrales transmembrana y factores de transcripción inflamatorios.
2. Se observa un perfil diferente en el tejido renal de machos y hembras en condiciones basales, siendo los machos los que poseen más cantidad de DHA y las hembras poseen más cantidad de ARA, y que se mantienen constantes tras la aplicación de HFD y la castración.
3. Los índices ARA/DGLA, 18:0 DMA de etanolamina y 16:0/18:1n-9 de los triglicéridos del tejido renal, podrían servir como posibles indicadores de progresión hacia el daño renal, la inflamación y estrés oxidativo.

10. AGRADECIMIENTOS.

Durante la realización de mi Trabajo de Fin de Máster, he comprendido que la actividad científica es mucho más que el mero análisis sistemático de unos resultados, es una satisfacción intrínseca por lo que se hace, es preguntarte constantemente por todo, es superarte a ti mismo, es fallar y seguir intentándolo, es sacrificado, pero maravilloso. Cova, durante mi Trabajo de Fin de Grado me contagiaste tu pasión por la lipidómica y me abriste las puertas a un mundo que para mí era totalmente desconocido, ahora, durante mi trabajo de Fin de Máster y este enfoque biomédico, te has convertido en mi mayor referente en el área de la investigación, me has hecho crecer, evolucionar y superarme a mí mismo, este trabajo ha sido escrito por mí, pero lleva tu esencia. Jose, me has hecho sentir como parte del equipo desde el primer minuto, me has ofrecido mucho apoyo en este TFM y me he sentido amparado con tus palabras en mis peores momentos, muchísimas gracias de corazón. Lupe, mi mayor consejera, mi aliada, una gran amiga y sobretodo una gran profesional, has sido mi mayor pilar en este trabajo, me has contagiado tu empeño y me has demostrado el sacrificio y la perseverancia de la lipidómica desde sus entrañas, me has dado la oportunidad de conocerte como profesional y como persona, me has enseñado lo que es trabajar en un entorno agradable, y gracias a tí, sé lo que se siente al despertarse por las mañanas con ganas de ir a al laboratorio,

muchas gracias por tu implicación desde el minuto uno, por tu confianza, por tu carisma y por tranquilizarme en los peores momentos, ojalá en mi vida me encuentre con más personas con una calidad humana como la tuya. Agradecerle también a mi tutor académico Esteban (Dr. Esteban Porrini), su cercanía y su humildad, por confiar en mí para realizar este trabajo, por asesorarme y enriquecer mi actividad científica, sin duda me siento muy afortunado de haber tenido la oportunidad de trabajar en este campo asesorado por un profesional como tú. A los miembros del equipo de mi tutor académico, Ana y Sergio, por su colaboración, predisposición y cesión de los datos de las clases lipídicas y ácidos grasos del lípido total. A Margarita, Ana Bolaños, Diego, Ana Galindo, Manuel y Diana, gracias por sacarme una sonrisa cada vez que entraba por la puerta del departamento, por ayudarme cada vez que tenía dudas y por darme la oportunidad de conocerlos un poquito más. A mis amigos, Omar, Sergio, Estefi, David y Samuel, por aguantar mis frustraciones y bombardeos cada vez que me leía una publicación sobre lípidos. A mis compi Elena Mesa por ayudarme con las clases lipídicas de los piensos y por su carisma, humildad y compañerismo. A mis hermanas, Peña y Alejandra, por aguantarme (que no es fácil) cada vez que algo me salía mal y por mostrar interés en lo que hago. A mi Madre, por escucharme hablar durante horas sobre lípidos sin enterarse de nada y aún así seguir preguntándome. Me faltan páginas para mostrar lo agradecido que me siento a todas las personas que han participado de una manera activa o pasiva en este trabajo, y de que este equipo haya contado conmigo una vez más para la realización del mismo, muchas gracias por esta oportunidad y por haber participado en esta etapa de mi vida.

11. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- AbuMweis, S., Omran, D. A., Al-Shami, I., & Jew, S. (2021). The ratio of eicosapentaenoic acid to docosahexaenoic acid as a modulator for the cardio-metabolic effects of omega-3 supplements: A meta-regression of randomized clinical trials. *Complementary Therapies in Medicine*, 57, 102662.
- Afonso Ali, A. (2019). Análisis de datos del perfil y metabolismo lipídico de hepatocitos y enterocitos aislados de lubinas (*Dicentrarchus labrax*) alimentadas con una dieta comercial y una dieta sustituida al 50% con aceite de *Echium plantagineum*. Trabajo de fin de grado, repositorio ULL.
- Afshinnia, F., Rajendiran, T. M., Wernisch, S., Soni, T., Jadoon, A., Karnovsky, A., ... & Pennathur, S. (2018, March). Lipidomics and biomarker discovery in kidney disease. In *Seminars in nephrology* (Vol. 38, No. 2, pp. 127-141). WB Saunders.
- Ahmed, S. B. (2017). Menopause and Chronic Kidney Disease. *Seminars in Nephrology*, 37(4), 404–411. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2017.05.013>
- Arany, I., Clark, J. S., Reed, D. K., Juncos, L. A., & Dixit, M. (2013). Role of p66shc in renal toxicity of oleic acid. *American journal of nephrology*, 38(3), 226-232.
- Bestard-Escalas, J., Maimó-Barceló, A., Pérez-Romero, K., Lopez, D. H., & Barceló-Coblijn, G. (2019). Ins and outs of interpreting lipidomic results. *Journal of molecular biology*, 431(24), 5039-5062.

- Braverman, N. E., & Moser, A. B. (2012). Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1822(9), 1442-1452.
- Brenna, J.T. 2002. Efficiency of conversion alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 5: 127-132.
- Burdge, G.C. & Calder, P.C. 2005. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.*, 45: 581-597.
- Bulbul, M. C., Dagele, T., Afsar, B., Ulusu, N. N., Kuwabara, M., Covic, A., & Kanbay, M. (2018). Disorders of lipid metabolism in chronic kidney disease. *Blood purification*, 46(2), 144-152.
- Cantu, M., Lee, J., Donoso, A., Puyó, A., & Peredo, H. (2017). El Acido araquidonico y sus derivados: Generalidades de los prostanoides en relacion con procesos inflamatorios. *Ciencia e investigacion*, 6-12.
- Chang, J. P. C., Pariante, C. M., & Su, K. P. (2020). Omega-3 fatty acids in the psychological and physiological resilience against COVID-19. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 161, 102177.
- Chen, C. T., Domenichiello, A. F., Trépanier, M. O., Liu, Z., Masoodi, M., & Bazinet, R. P. (2013). The low levels of eicosapentaenoic acid in rat brain phospholipids are maintained via multiple redundant mechanisms. *Journal of lipid research*, 54(9), 2410-2422.
- Chen, Y. J., Zhou, X. H., Han, B., Li, S. M., Xu, T., Yi, H. X., ... & Wang, B. C. (2020). Composition analysis of fatty acids and stereo-distribution of triglycerides in human milk from three regions of China. *Food Research International*, 133, 109196
- Christie, W.W., 2003. *Lipid Analysis*. Third ed. The Oily Press, Bridgewater, UK, pp. 205-224.
- Cybulska, A. M., Skonieczna-Żydecka, K., Drozd, A., Rachubińska, K., Pawlik, J., Stachowska, E., ... & Grochans, E. (2019). Fatty acid profile of postmenopausal women receiving, and not receiving, hormone replacement therapy. *International journal of environmental research and public health*, 16(21), 4273.
- Dalli, J., Colas, R. A., & Serhan, C. N. (2013). Novel n-3 immunoresolvents: structures and actions. *Scientific reports*, 3(1), 1-15.
- Dasilva, G., & Medina, I. (2019). Lipidomic methodologies for biomarkers of chronic inflammation in nutritional research: ω -3 and ω -6 lipid mediators. *Free Radical Biology and Medicine*, 144, 90-109.
- Declèves, A. E., Mathew, A. V., Armando, A. M., Han, X., Dennis, E. A., Quehenberger, O., & Sharma, K. (2019). AMP-activated protein kinase activation ameliorates eicosanoid dysregulation in high-fat-induced kidney disease in mice. *Journal of lipid research*, 60(5), 937-952.
- Diaz-López, M. (2010). Sustitución parcial de aceite de pescado por aceite de *Echium plantagineum* L. en la dieta de doradas de cultivo, *Sparus aurata* L. influencia sobre el crecimiento, estado de salud y metabolismo lipídico. Tesis doctoral
- Ding, L., Zhang, L., Shi, H., Xue, C., Yanagita, T., Zhang, T., & Wang, Y. (2020). EPA-enriched ethanolamine plasmalogen alleviates atherosclerosis via mediating bile acids metabolism. *Journal of Functional Foods*, 66, 103824.
- Dorninger, F., Forss-Petter, S., Wimmer, I., & Berger, J. (2020). Plasmalogens, platelet-activating factor and beyond—Ether lipids in signaling and neurodegeneration. *Neurobiology of disease*, 105061.
- Duarte, J. A., Carvalho, F., Pearson, M., Horton, J. D., Browning, J. D., Jones, J. G., & Burgess, S. C. (2014). A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice [S]. *Journal of lipid research*, 55(12), 2541-2553.
- Ertunc, M. E., & Hotamisligil, G. S. (2016). Lipid signaling and lipotoxicity in metaflammation: indications for metabolic disease pathogenesis and treatment. *Journal of lipid research*, 57(12), 2099-2114.
- Fabelo, N. (2013). Alteraciones en la composición lipídica de la membrana neuronal y de los microdominios de membrana tipo "lipid rafts" de la corteza cerebral en enfermedades neurodegenerativas (Doctoral dissertation, Universidad de La Laguna).
- Francisco, A. L. M., Gayoso, P., & López, F. G. (2018). Obesity and renal function. Data from the epidemiological study: Prevalence of chronic renal disease in Spain. EPIRCE Study. *Nefrología: Publicacion Oficial de la Sociedad Espanola Nefrología*, 38(1), 107-108.

- Gai, Z., Wang, T., Visentin, M., Kullak-Ublick, G. A., Fu, X., & Wang, Z. (2019). Lipid accumulation and chronic kidney disease. *Nutrients*, 11(4), 722.
- Gluba, A., Mikhailidis, D. P., Lip, G. Y., Hannam, S., Rysz, J., & Banach, M. (2013). Metabolic syndrome and renal disease. *International journal of cardiology*, 164(2), 141-150.
- Henry, B. M., Szergyuk, I., de Oliveira, M. H. S., Abosamak, M. F., Benoit, S. W., Benoit, J. L., & Lippi, G. (2021). Alterations in the lipid profile associate with a dysregulated inflammatory, prothrombotic, anti-fibrinolytic state and development of severe acute kidney injury in coronavirus disease 2019 (COVID-19): A study from Cincinnati, USA. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*.
- Heras-Molina, A., Pesantez-Pacheco, J. L., Vazquez-Gomez, M., Garcia-Contreras, C., Astiz, S., Isabel, B., & Gonzalez-Bulnes, A. (2020). Short-Term Effects of Early Menopause on Adiposity, Fatty Acids Profile and Insulin Sensitivity of a Swine Model of Female Obesity. *Biology*, 9(9), 284.
- Horrobin, D. F. (1980). The regulation of prostaglandin biosynthesis: negative feedback mechanisms and the selective control of formation of 1 and 2 series prostaglandins: relevance to inflammation and immunity. *Medical hypotheses*, 6(7), 687-709.
- Huang, F., Wang, S., Zhao, A., Zheng, X., Zhang, Y., Lei, S., ... & Jia, W. (2019). Pu-erh tea regulates fatty acid metabolism in mice under high-fat diet. *Frontiers in pharmacology*, 10, 63.
- Imig, J. D. (2006). Eicosanoids and renal vascular function in diseases. *Clinical science*, 111(1), 21-34.
- Jang, H., & Park, K. (2020). Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids and metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 39(3), 765-773.
- Khan, S. U., Lone, A. N., Khan, M. S., Virani, S. S., Blumenthal, R. S., Nasir, K., ... & Bhatt, D. L. (2021). Effect of omega-3 fatty acids on cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*, 100997.
- Lee, J., Lee, H., Kang, S., & Park, W. (2016). Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1), 23.
- Lee, K. G., Lee, G. B., Yang, J. S., & Moon, M. H. (2020). Perturbations of lipids and oxidized phospholipids in lipoproteins of patients with postmenopausal osteoporosis evaluated by asymmetrical flow field-flow fractionation and nanoflow UHPLC-ESI-MS/MS. *Antioxidants*, 9(1), 46.
- Levental, K. R., Malmberg, E., Symons, J. L., Fan, Y. Y., Chapkin, R. S., Ernst, R., & Levental, I. (2020). Lipidomic and biophysical homeostasis of mammalian membranes counteracts dietary lipid perturbations to maintain cellular fitness. *Nature communications*, 11(1), 1-13.
- Maeba, R., Kojima, K. I., Nagura, M., Komori, A., Nishimukai, M., Okazaki, T., & Uchida, S. (2018). Association of cholesterol efflux capacity with plasmalogen levels of high-density lipoprotein: A cross-sectional study in chronic kidney disease patients. *Atherosclerosis*, 270, 102-109.
- Mecatti, G. C., Messias, M. C. F., & de Oliveira Carvalho, P. (2020). Lipidomic profile and candidate biomarkers in septic patients. *Lipids in health and disease*, 19, 1-9.
- Miyamoto, S., Hsu, C. C., Hamm, G., Darshi, M., Diamond-Stanic, M., Declèves, A. E., ... & Sharma, K. (2016). Mass spectrometry imaging reveals elevated glomerular ATP/AMP in diabetes/obesity and identifies sphingomyelin as a possible mediator. *EBioMedicine*, 7, 121-134.
- Mu, L., Mukamal, K. J., & Naqvi, A. Z. (2014). Erythrocyte saturated fatty acids and systemic inflammation in adults. *Nutrition*, 30(11-12), 1404-1408.
- Norde, M. M., Oki, E., Carioca, A. A. F., Damasceno, N. R. T., Fisberg, R. M., Marchioni, D. M. L., & Rogero, M. M. (2018). Influence of IL1B, IL6 and IL10 gene variants and plasma fatty acid interaction on metabolic syndrome risk in a cross-sectional population-based study. *Clinical Nutrition*, 37(2), 659-666.
- Novichkova, E., Chumin, K., Eretz-Kdosha, N., Boussiba, S., Gopas, J., Cohen, G., & Khozin-Goldberg, I. (2020). DGLA from the Microalga *Lobosphaera Incsa P127* Modulates Inflammatory Response, Inhibits iNOS Expression and Alleviates NO Secretion in RAW264. 7 Murine Macrophages. *Nutrients*, 12(9), 2892.
- Olsen, R. E., & Henderson, R. J. (1989). The rapid analysis of neutral and polar marine lipids using double-development HPTLC and scanning densitometry. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129(2), 189-197.

- Pakiet, A., Jakubiak, A., Mierzejewska, P., Zwara, A., Liakh, I., Sledzinski, T., & Mika, A. (2020). The effect of a high-fat diet on the fatty acid composition in the hearts of mice. *Nutrients*, 12(3), 824.
- Praga M, Morales E. Obesity, proteinuria and progression of renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006; 15:481–6.
- Paul, S., Lancaster, G. I., & Meikle, P. J. (2019). Plasmalogens: A potential therapeutic target for neurodegenerative and cardiometabolic disease. *Progress in lipid research*, 74, 186-195
- Reis, D. B., Acosta, N. G., Almansa, E., Tocher, D. R., Andrade, J. P., Sykes, A. V., & Rodríguez, C. (2016). Composition and metabolism of phospholipids in Octopus vulgaris and Sepia officinalis hatchlings Part B Biochemistry & molecular biology.
- Rodríguez, A. E., Donate, J., Lima, S.L., Díaz, L., Rodríguez, C., Pérez, J. A., Acosta, N. G., Fumero, C., Navarro, M., López, D., Villacampa, J., Navarro, J.A., Ortiz, A., Porrini, E. (2021). Interaction between metabolic syndrome, obesity and menopause in the induction of renal disease in a murine model of obesity.
- Serhan, C. N., & Levy, B. D. (2018). Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *The Journal of clinical investigation*, 128(7), 2657-2669.
- Sigruener, A., Kleber, M. E., Heimerl, S., Liebisch, G., Schmitz, G., & Maerz, W. (2014). Glycerophospholipid and sphingolipid species and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study. *PLoS one*, 9(1), e85724.
- Vries, A. P., Ruggerenti, P., Ruan, X. Z., Praga, M., Cruzado, J. M., Bajema, I. M., ... & Porrini, E. (2014). Fatty kidney: emerging role of ectopic lipid in obesity-related renal disease. *The lancet Diabetes & endocrinology*, 2(5), 417-426.
- Viktorinova, A., Malickova, D., Svitekova, K., Choudhury, S., & Krizko, M. (2021). Low-density lipoprotein cholesterol-to-apolipoprotein B ratio as a potential indicator of LDL particle size and plasma atherogenicity in type 2 diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 176, 108858.
- Wahba, I. M., & Mak, R. H. (2007). Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 2(3), 550-562.
- Wang, X., Lin, H., & Gu, Y. (2012). Multiple roles of dihomo- γ -linolenic acid against proliferation diseases. *Lipids in health and disease*, 11(1), 1-9.
- Yang, Y., Lee, M., & Fair G. D. (2018). Phospholipid subcellular localization and dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 293(17), 6230-6240.
- Yeung, J., Adili, R., Yamaguchi, A., Freedman, C. J., Chen, A., Shami, R., ... & Holinstat, M. (2020). Omega-6 DPA and its 12-lipoxygenase-oxidized lipids regulate platelet reactivity in a nongenomic PPAR α -dependent manner. *Blood advances*, 4(18), 4522-4537.
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, 6(1), 1-19.

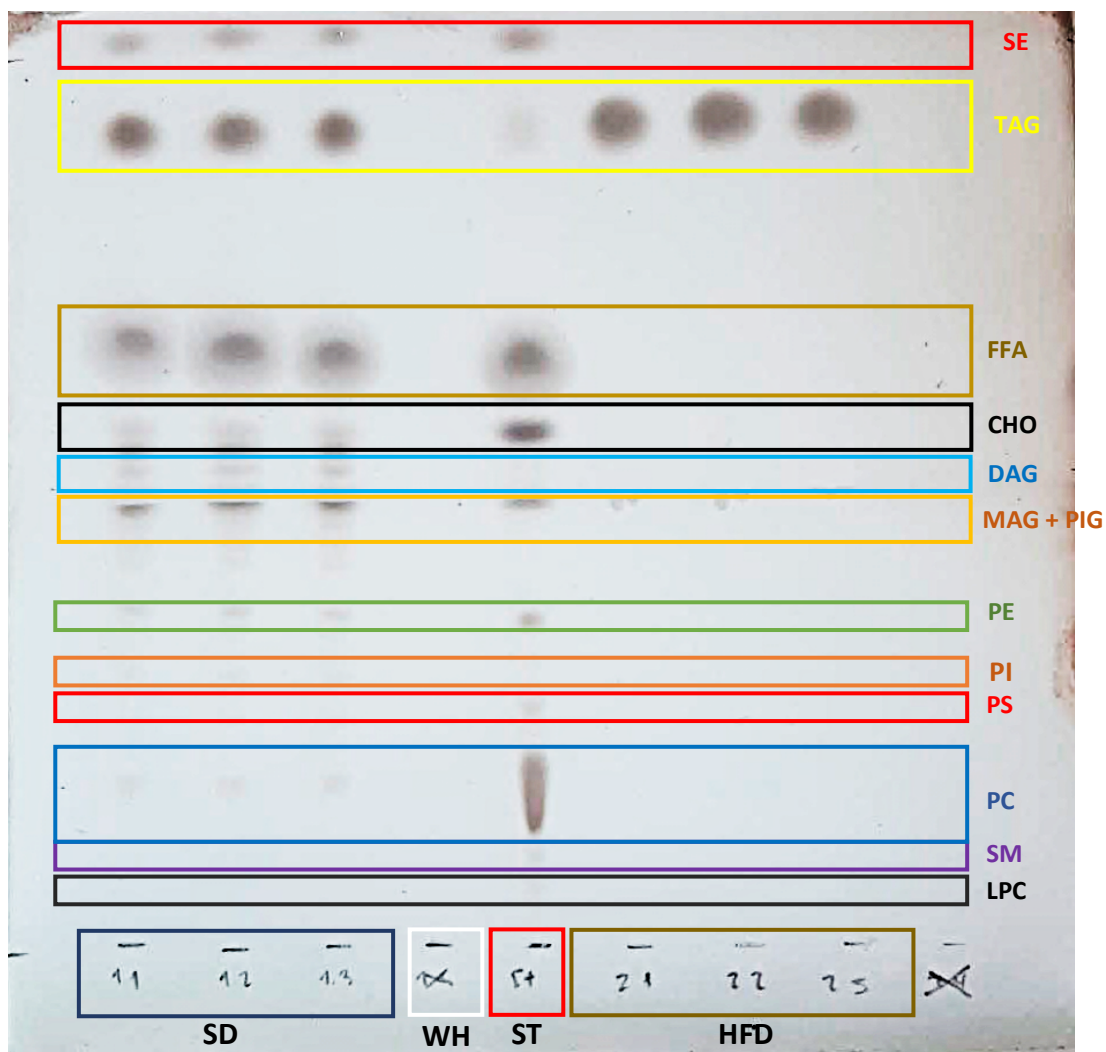
Bibliografía web:

- Carrero, I., Herráez, A. (s. f.). Plasmalógenos. El mundo de los lípidos. Recuperado 16 de agosto de 2021, de <http://biomodel.uah.es/model2/lip/plasmalogenos.htm>
- The Jackson Laboratory. (s. f.). 000664 - C57BL/6J. Recuperado 21 de junio de 2021, de <https://www.jax.org/strain/000664>

12. ANEXOS

8.1 Anexo 1

Figura complementaria 1. Placa HPTLC de doble desarrollo unidimensional con las principales clases lipídicas presentes en la dieta SD y HFD.



SD, pienso estándar; WH, blanco; ST, estándar de identificación; HFD, pienso alto en grasas. LPC, lisofosfatidilcolina; SM, esfingomielinea; PC, fosfatidilcolina; PS, fosfatidilserina; PI, fosfatidilinositol; PE, fosfatidiletanolamina; MAG + PIG, monoglicéridos y pigmentos; DAG, diglicéridos; CHO, colesterol; FFA, ácidos grasos libres; TAG, triacilglicéridos; SE, ésteres de ceras y colesterol.

8.2 Anexo 2

Tabla complementaria 1. Perfil general de ácidos grasos del lípido TOTAL, medidos en % de área, de los tejidos renales de machos y hembras a los que se les ha aplicado los diferentes tratamientos.

Ácidos grasos	MACHOS		HEMBRAS			
	SD	HFD	SD	SD-OVX	HFD	HFD-OVX
<i>SFAs</i>	31,71 ± 3,57	28,37 ± 0,77	34,09 ± 1,85 a	25,10 ± 4,57	25,41 ± 5,89	25,08 ± 3,15
14:0	0,78 ± 0,45	0,88 ± 0,24	0,75 ± 0,10	0,62 ± 0,47	0,26 ± 0,16	0,29 ± 0,07
16:0	19,39 ± 4,73	17,68 ± 0,39	20,10 ± 0,11	11,95 ± 0,45	16,12 ± 0,49 b	12,41 ± 0,92 c
18:0	11,13 ± 1,14	8,98 ± 1,57	12,88 ± 1,88	9,77 ± 2,89	13,53 ± 4,11	12,03 ± 4,29
20:0	0,40 ± 0,13	0,84 ± 0,27	0,35 ± 0,06	0,41 ± 0,27	0,35 ± 0,11	0,35 ± 0,18
<i>MUFAs</i>	18,86 ± 3,90	30,88 ± 5,32*	23,77 ± 5,84	23,81 ± 10,76	15,75 ± 4,35	19,05 ± 5,44
16:1 n-7	3,70 ± 2,54	3,90 ± 1,37	3,24 ± 0,87	2,39 ± 1,89	0,83 ± 0,45 d	1,12 ± 0,67
18:1 n-9	14,45 ± 1,74	26,46 ± 3,76	20,07 ± 4,94	20,86 ± 8,88	14,62 ± 4,44	17,32 ± 4,99
20:1 n-9	0,72 ± 0,36	0,52 ± 0,50	0,45 ± 0,04	0,56 ± 0,25	0,31 ± 0,22	0,61 ± 0,21
<i>n-6 PUFAs</i>	31,92 ± 1,64	28,99 ± 0,95*	33,74 ± 2,65	41,27 ± 8,01	32,88 ± 15,38	40,26 ± 3,22
18:2 n-6	15,44 ± 2,39	18,40 ± 2,42	16,08 ± 0,96	20,48 ± 2,14	12,45 ± 2,73 e	17,79 ± 2,16
20:2 n-6	0,42 ± 0,12	0,69 ± 0,04**	0,50 ± 0,12	0,23 ± 0,16 f	0,78 ± 0,21	0,85 ± 0,27
20:3 n-6	1,32 ± 0,17	0,59 ± 0,10***	0,69 ± 0,08	0,72 ± 0,29	0,61 ± 0,16	0,89 ± 0,19
20:4 n-6	14,73 ± 2,05	9,30 ± 3,23	16,48 ± 3,11	22,52 ± 13,10	19,03 ± 12,63	20,74 ± 2,83
<i>n-3 PUFAs</i>	17,23 ± 2,60	11,75 ± 3,93*	8,41 ± 1,63	9,82 ± 5,09	17,93 ± 4,09	15,61 ± 4,87
18:3 n-3	0,49 ± 0,23	0,08 ± 0,01*	0,15 ± 0,05	0,27 ± 0,22	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,06
22:6 n-3	16,73 ± 2,47	11,67 ± 3,92*	8,25 ± 1,95	9,55 ± 5,21	17,77 ± 4,07 d	15,46 ± 4,85
<i>n-6 LC-PUFA</i>	16,48 ± 1,96	10,59 ± 3,33*	17,66 ± 3,30	23,46 ± 13,37	20,43 ± 12,99	22,47 ± 2,75
<i>n-6/n-3</i>	1,90 ± 0,42	2,68 ± 0,95	4,08 ± 0,51	5,10 ± 2,36	2,01 ± 1,07	2,79 ± 0,93
<i>ARA/DHA</i>	0,89 ± 0,16	0,80 ± 0,07	2,00 ± 0,04	2,33 ± 0,32 g	1,20 ± 0,80	1,43 ± 0,39
<i>18:1 n-9 / 18:0</i>	1,30 ± 0,05	3,04 ± 0,86**	1,61 ± 0,60	2,47 ± 1,56	1,22 ± 0,63	1,61 ± 0,87
<i>MUFAs / SFAs</i>	0,61 ± 0,18	1,09 ± 0,20*	0,70 ± 0,20	0,96 ± 0,45	0,67 ± 0,28	0,79 ± 0,32
<i>PUFAs / MUFAs</i>	2,71 ± 0,69	1,36 ± 0,38*	1,88 ± 0,63	2,78 ± 1,91	3,60 ± 1,97	3,13 ± 0,98
<i>PUFAs / SFAs</i>	1,56 ± 0,17	1,44 ± 0,16	1,24 ± 0,09	2,12 ± 0,69	2,00 ± 0,04 b	2,25 ± 0,25 c

Medias ± desviación estándar, n = 4. * (p < 0,05); ** (p < 0,01); *** (p < 0,001). **a** = SD vs SD-OVX y vs HD-OVX: p < 0,05. **b** = HFD vs HFD-OVX y vs SD-OVX y vs SD: p < 0,05. **c** = HFD-OVX y SD-OVX vs SD: p < 0,05. **d** = HFD vs SD: p < 0,05. **e** = HFD vs SD-OVX: p < 0,05. **f** = SD-OVX vs SD y vs HFD y vs HFD-OVX: p < 0,05. **g** = SD-OVX vs HFD y vs HFD-OVX: p < 0,05.

8.3 Anexo 3

Tabla complementaria 2. Correlaciones de las componentes principales y comunalidades extraídas de los ácidos grasos esterificados en cada clase lipídica en machos.

Ácidos grasos	PC				PE				PI				TAG			
	CP1	CP2	CP3	COM	CP1	CP2	CP3	COM	CP1	CP2	CP3	COM	CP1	CP2	CP3	COM
14:0	0,943	-0,088	-0,043	0,900	-0,910	0,039	-0,044	0,831	0,679	-0,421	0,481	0,870	-0,877	-0,381	0,100	0,924
15:0	0,747	0,205	-0,319	0,702									-0,137	-0,033	0,910	0,848
16:0 DMA	-0,087	-0,003	0,633	0,409	0,867	-0,414	-0,093	0,932	0,913	0,079	0,057	0,843				
16:0	0,877	-0,055	0,050	0,775	-0,936	0,204	-0,081	0,924	0,900	-0,303	0,023	0,902	-0,961	0,042	0,143	0,946
16:1 n-9	0,438	-0,784	-0,040	0,807					-0,002	-0,368	0,917	0,976	0,908	0,129	-0,248	0,902
16:1 n-7	0,269	0,648	0,359	0,621	-0,700	0,536	0,010	0,777	0,976	-0,200	-0,010	0,993	-0,949	0,194	-0,074	0,943
17:0	0,849	-0,081	0,151	0,750	-0,095	0,692	-0,657	0,920	0,531	0,265	0,671	0,803	0,646	0,541	-0,110	0,723
18:0 DMA	0,116	-0,829	0,276	0,776	0,528	-0,816	-0,137	0,965	0,949	-0,151	-0,182	0,956				
18:1 n-9 DMA	-0,875	-0,230	0,333	0,930	0,699	-0,672	-0,144	0,962	0,689	0,191	0,032	0,513				
18:1 n-7 DMA					0,897	0,230	0,124	0,872								
18:0	0,637	-0,480	-0,332	0,746	-0,819	0,479	-0,106	0,910	0,004	-0,722	-0,605	0,887	0,073	-0,883	-0,001	0,786
18:1 n-9	0,468	-0,492	0,379	0,604	-0,909	0,022	0,165	0,854	0,684	-0,477	0,540	0,987	0,759	-0,133	-0,599	0,954
18:1 n-7	0,448	0,828	0,082	0,893	0,603	0,642	0,409	0,943	0,247	-0,104	0,914	0,907	-0,621	0,558	0,488	0,935
18:2 n-6	0,531	0,683	0,453	0,954	0,089	0,944	0,191	0,935	0,112	-0,289	0,910	0,925	0,004	0,578	0,758	0,909
18:3 n-6	0,289	0,775	0,208	0,727					0,247	-0,327	-0,602	0,531	0,214	0,569	-0,677	0,828
18:3 n-3													0,082	0,912	-0,154	0,862
18:4 n-3									0,688	-0,124	0,159	0,514	0,061	-0,242	-0,624	0,451
20:0	0,563	0,245	0,229	0,429	0,213	-0,104	0,827	0,740	-0,749	0,055	0,561	0,878	-0,562	-0,593	0,527	0,945
20:1 n-9	0,305	0,508	0,579	0,686	0,454	0,873	0,123	0,983	-0,214	0,816	0,035	0,713	-0,525	-0,653	0,414	0,873
20:2 n-6	0,027	-0,363	0,085	0,139	-0,654	-0,264	0,636	0,902	0,062	-0,452	0,867	0,960	0,889	0,002	-0,409	0,957
20:3 n-6	0,282	0,923	0,110	0,943	0,308	0,887	0,310	0,976	-0,428	0,819	-0,171	0,884	0,659	0,436	0,293	0,711
20:4 n-6	-0,644	-0,213	0,208	0,503	0,185	0,138	0,714	0,563	-0,904	0,183	-0,344	0,969	0,783	0,444	0,304	0,904
20:3 n-3	-0,864	-0,137	-0,030	0,766	0,356	0,123	0,754	0,711	-0,229	-0,571	0,219	0,427	0,251	0,138	-0,154	0,106
20:4 n-3																
20:5 n-3	-0,490	0,373	0,773	0,976	0,656	0,346	-0,503	0,803	-0,726	-0,232	-0,605	0,946	-0,192	0,753	0,390	0,756
22:4 n-6	-0,143	0,397	-0,828	0,863	0,331	-0,022	-0,872	0,871	0,199	0,885	-0,137	0,841	0,581	-0,095	0,790	0,971
22:5 n-6	-0,011	0,920	-0,239	0,904	0,616	0,761	-0,022	0,958	-0,087	0,642	-0,144	0,441	-0,392	-0,076	0,831	0,849
22:5 n-3	-0,675	0,520	-0,417	0,899	0,865	0,385	-0,050	0,899	-0,272	0,911	-0,093	0,912	0,497	0,705	0,126	0,760
22:6 n-3	-0,940	-0,097	-0,146	0,915	0,317	-0,783	0,425	0,894	-0,097	0,929	0,006	0,872	0,328	0,598	0,360	0,595

CP1, componente principal 1; CP2, componente principal 2; CP3, componente principal 3; COM, comunalidades. Los recuadros sombreados indican que ese ácido graso estaba ausente en al menos dos o más individuos y no se ha tenido en cuenta a la hora de hacer las componentes, los valores destacados en negrita se consideran los ácidos grasos más influyentes en el modelo de componentes, con una correlación, tanto negativa como positiva, mayor o igual 70% ($> \pm 0,70$).

Tabla complementaria 3. Correlaciones de las componentes principales y comunalidades extraídas de los ácidos grasos esterificados en cada clase lipídica en hembras.

Ácidos grasos	PC				PE				PI				TAG			
	CP1	CP2	CP3	COM	CP1	CP2	CP3	COM	CP1	CP2	CP3	COM	CP1	CP2	CP3	COM
14:0	0,779	-0,120	0,460	0,833	0,249	0,912	-0,150	0,917	0,795	0,190	-0,495	0,914	-0,142	-0,382	-0,491	0,407
15:0	-0,584	0,281	0,417	0,594									0,207	-0,725	0,126	0,584
16:0 DMA	0,771	0,144	-0,161	0,641	-0,858	0,465	-0,063	0,956	0,482	0,553	0,116	0,552				
16:0	0,041	-0,570	0,020	0,327	0,555	-0,102	0,632	0,718	0,891	0,043	0,184	0,829	-0,323	-0,666	-0,525	0,824
16:1 n-9	-0,667	0,129	0,056	0,465					0,839	0,280	0,030	0,784	-0,172	0,047	0,926	0,889
16:1 n-7	0,720	0,355	0,185	0,679	0,815	0,107	0,461	0,889	0,277	0,460	-0,037	0,289	-0,361	-0,832	-0,324	0,928
17:0	0,098	-0,482	0,756	0,813	0,599	-0,560	0,081	0,679	-0,166	-0,849	0,256	0,814	0,684	0,674	-0,023	0,922
18:0 DMA	-0,584	-0,174	-0,569	0,696	-0,889	-0,133	-0,159	0,834	-0,292	-0,526	-0,643	0,775				
18:1 n-9 DMA	-0,663	0,338	-0,558	0,865	-0,875	0,294	-0,149	0,875	0,482	0,553	0,116	0,552				
18:1 n-7 DMA	0,070	-0,417	0,766	0,766	-0,447	0,863	-0,086	0,951								
18:0	-0,116	0,182	0,814	0,710	0,866	-0,358	0,242	0,938	-0,846	-0,225	-0,162	0,792	0,152	0,764	-0,093	0,616
18:1 n-9	-0,045	0,938	0,158	0,908	0,869	0,179	-0,006	0,787	0,941	0,268	-0,068	0,962	-0,038	0,720	0,269	0,592
18:1 n-7	0,253	0,793	-0,162	0,719	0,455	0,810	0,265	0,934	0,845	0,237	0,221	0,820	0,042	-0,060	0,921	0,853
18:2 n-6	0,894	0,106	-0,044	0,812	0,885	0,077	0,114	0,802	0,803	0,401	-0,004	0,806	-0,237	-0,513	0,512	0,581
18:3 n-6	0,779	-0,120	0,460	0,833	0,472	-0,404	0,243	0,444	0,859	0,146	0,201	0,799	0,703	0,045	-0,237	0,552
18:3 n-3													0,565	0,009	-0,585	0,662
18:4 n-3					0,016	-0,536	0,362	0,419	0,649	-0,114	0,154	0,458	0,477	-0,637	-0,072	0,638
20:0	0,384	-0,488	0,361	0,515	0,876	0,179	-0,167	0,828	-0,625	-0,191	0,459	0,638	0,121	0,113	0,030	0,028
20:1 n-9	-0,639	0,643	-0,058	0,824	0,773	0,286	0,060	0,682					-0,124	0,447	0,439	0,408
20:2 n-6	0,489	-0,618	-0,004	0,620	-0,031	-0,023	-0,860	0,741	0,135	-0,796	-0,021	0,652	0,327	0,883	-0,088	0,894
20:3 n-6	0,336	0,774	-0,270	0,785	0,850	0,357	0,077	0,855	-0,258	-0,106	-0,605	0,444	0,883	0,237	0,139	0,856
20:4 n-6	-0,092	-0,001	-0,840	0,714	-0,042	0,264	-0,923	0,923	-0,921	0,017	0,054	0,851	0,961	-0,026	-0,031	0,925
20:3 n-3																
20:4 n-3																
20:5 n-3	-0,676	0,010	-0,395	0,614	-0,863	-0,078	0,025	0,751	-0,245	-0,335	0,842	0,882				
22:4 n-6	-0,239	0,665	0,549	0,801	0,284	0,873	-0,053	0,846	-0,545	0,617	0,326	0,783	0,804	0,421	0,198	0,863
22:5 n-6	0,758	0,085	0,190	0,618	0,728	-0,150	0,406	0,717	0,202	0,921	0,010	0,888	0,418	-0,048	-0,009	0,177
22:5 n-3	-0,252	-0,795	-0,147	0,718	-0,861	0,089	-0,153	0,773	-0,885	-0,099	0,314	0,892	0,825	0,336	-0,141	0,813
22:6 n-3	-0,450	-0,319	-0,758	0,879	-0,915	-0,089	-0,102	0,856	-0,724	0,015	0,209	0,568	0,862	-0,168	-0,178	0,802

PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PI, fosfatidilinositol; TAG, triacilglicéridos. CP1, componente principal 1; CP2, componente principal 2; CP3, componente principal 3; COM, comunalidades. Los recuadros sombreados indican que ese ácido graso estaba ausente en al menos dos o más individuos y no se ha tenido en cuenta a la hora de hacer las componentes, los valores destacados en negrita se consideran los ácidos grasos más influyentes en el modelo de componentes, con una correlación mayor o igual 70% ($> \pm 0,70$).