

RESUMEN

RESUMEN

Los Conjugados del Ácido Linoleico (CLA) son AG dienoicos derivados del ácido linoleico, que se caracterizan por modificaciones isoméricas posicionales (9,11 ó 10,12) y geométricas (*cis/trans*) de sus dobles enlaces. Los mismos son generados por isomerización bacteriana en el rumen de animales poligástricos y por síntesis química. Se han reportado numerosos efectos benéficos y deletéreos, mediados por modulación del metabolismo intermedio, atribuidos a los dos isómeros principales: *t10,c12*-CLA y *c9,t11*-CLA. Entre las propiedades bioactivas se destacan la capacidad de reducir depósitos grasos y aumentar la masa corporal magra, prevenir la carcinogénesis, modular la respuesta inmune, revertir cuadros de intolerancia a la glucosa y mejorar el perfil lipídico, previniendo así cuadros de alteraciones crónicas inducidas nutricionalmente.

Si bien existen numerosos estudios acerca de los CLA, en este trabajo de tesis evaluamos los efectos de una mezcla de isómeros en dos modelos experimentales que representan cuadros metabólicos característicos de enfermedades de elevada incidencia en la población humana. El tema objeto de la primera parte del presente trabajo tiene un alto impacto, dada su relación con el desarrollo de anormalidades compartidas por enfermedades crónicas inducidas nutricionalmente, caracterizadas por hipertrigliceridemia, esteatosis hepática, arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares. En estas alteraciones el empleo de los isómeros CLA podría ser de gran utilidad dada la elevada morbi-mortalidad en la población en general. De esta manera, nuestro primer objetivo general fue investigar los potenciales efectos de los CLA a elevados niveles de grasa dietaria en un modelo animal de ratón. Se pudo observar que la ingesta de CLA produjo ciertos cambios característicos como hepatomegalia, disminución de la masa del tejido adiposo y reducción de la concentración de TG circulantes. La marcada hepatomegalia se asoció a un incremento en el contenido de TG hepáticos ocasionado por un moderado descenso de la velocidad de secreción de TG, que también contribuyó a la disminución de los

TG plasmáticos. Alteraciones en la actividad lipoproteína lipasa muscular estuvieron asociadas a modificaciones en los lípidos tisulares. La adición de CLA a la dieta rica en grasa previno la aparición de lipoperoxidación hepática, siendo probablemente el incremento del contenido de glutathion reducido el mecanismo compensador implicado. Las alteraciones lipídicas en hígado y músculo estuvieron relacionadas a cambios en el metabolismo de la glucosa principalmente a nivel hepático. En este caso, un incremento en el contenido de citrato, afectando la enzima PFK-1 α , podría estar implicado en las alteraciones de la vía glucolítica.

Los parámetros relacionados a la performance reproductiva mostraron en ratones hembra, que el nivel de grasa dietaria y la presencia de CLA, así como el momento en que estos parámetros fueron evaluados (primera o segunda generación) influenciaron el número de fetos, la tasa de resorción y la expresión placentaria de diferentes citoquinas. La presencia de CLA redujo la expresión placentaria de citoquinas beneficiosas para la preñez, como IL-4 y TGF- β , en ambas generaciones estudiadas, correlacionándose con la aparición de resorciones, mientras que previno el incremento de la expresión de una citoquina proinflamatoria como es el TNF- α , pero sólo en la segunda generación.

El segundo modelo utilizado en este trabajo de tesis estuvo relacionado a otro cuadro metabólico, como es el inducido por una leve depleción proteica. Dada la capacidad que se le atribuye a los CLA de afectar la composición corporal, aumentando la masa magra, nuestro segundo objetivo general fue investigar los potenciales beneficios de la suplementación con CLA sobre la capacidad de recuperación nutricional post depleción proteica en un modelo experimental de ratas, utilizando dos niveles de grasa dietaria: normal y elevado. Como esperábamos, la restricción de proteínas dietarias indujo un estado catabólico leve y deterioró el estado nutricional general de los animales, que fue mejorado por la restauración de las proteínas. Al considerar el nivel de grasa dietaria en la recuperación de este estado, las dietas grasas aumentaron la retención energética como grasa. No se observaron efectos diferenciales de la suplementación con CLA

sobre la ganancia de peso, composición corporal y peso de tejidos u órganos, con excepción del tejido adiposo epididimal, en el cual los CLA previnieron el incremento de peso causado por la ingesta de elevada cantidad de grasa. El status proteico, la retención de energía en carcasa y la eficiencia energética no fueron diferencialmente afectados por la adición de CLA.

La depleción de proteínas dietarias disminuyó la concentración de TG circulantes. La recuperación nutricional a ambos niveles de grasa dietaria indujo un incremento de dicha concentración, no siendo afectada en forma diferencial por la presencia de CLA. Los animales sometidos a depleción proteica presentaron esteatosis hepática, que fue revertida por la repleción de proteínas. Sin embargo, el nivel de grasa dietaria y la presencia de CLA generaron diferentes efectos: las dietas con niveles recomendados de grasa normalizaron el contenido de TG, mientras que con niveles elevados, la normalización fue parcial en ausencia de CLA y total en presencia del mismo. Además, la depleción de proteínas dietarias indujo lipoperoxidación hepática, que fue normalizada por la repleción proteica, independientemente del nivel de grasa dietaria y de la presencia o no de CLA. Los mecanismos compensatorios involucrados mostraron un efecto diferencial por los CLA.

Los animales sometidos a depleción proteica presentaron una rápida utilización de la glucosa luego de una sobrecarga oral, que no fue acompañada por importantes cambios en los niveles de metabolitos glucolíticos en hígado y músculo. La repleción proteica, según el nivel de grasa dietaria y la ingesta de CLA, tuvo efectos diferentes sobre la utilización periférica de la glucosa: elevados niveles de grasa dietaria disminuyeron la tolerancia a la glucosa, lo cual fue prevenido por la suplementación con CLA. Estas alteraciones no se vieron reflejadas por cambios en los metabolitos glucolíticos determinados en hígado y músculo gastrocnemius.

Dada la importancia nutricional que se le ha dado en los últimos años a los CLA por sus propiedades bioactivas, como ayudas ergogénicas y/o para bajar de peso, como así también para revertir otras alteraciones metabólicas, este trabajo de

tesis hace un aporte bioquímico-nutricional a los conocimientos vigentes sobre los efectos de los CLA. Particularmente se hizo énfasis en la aplicación de los CLA para el estudio de dos cuadros metabólicos que caracterizan a muchas enfermedades de elevada incidencia en la población humana. Los CLA revirtieron algunas alteraciones metabólicas, como asimismo indujeron efectos deletéreos en los modelos experimentales utilizados, dependiendo de la especie, nivel de grasa y parámetros bioquímicos evaluados. Investigaciones adicionales son requeridas para esclarecer los efectos específicos y la aplicación de los mismos, no obstante se recomienda limitar su utilización indiscriminada en humanos hasta el esclarecimiento de los mecanismos específicos de acción.

ABSTRACT

Conjugated Linoleic Acids (CLA) are dienoic fatty acids derived from linoleic acid, characterized by positional (9,11 ó 10,12) and geometric (*cis/trans*) modifications of the double bonds. They are formed by rumen bacteria and by chemical synthesis. Many beneficial and deleterious effects have been reported, which are mediated by modulation of intermediate metabolism, and depend on the main isomers: *t10,c12*-CLA and *c9,t11*-CLA. The ability to reduce fat deposition and increase lean body mass, prevent carcinogenesis, modulate immune response, improve glucose tolerance and ameliorate altered lipid profiles, preventing nutritionally induced alterations, are the relevant bioactive properties reported.

Although there are many studies about CLA, in this doctoral thesis we evaluated the effects of a mixture of isomers in two experimental models. They represent different metabolic situations, characteristic of several diseases in the human population. The high impact-topic of the first part of this work is related to the development of different abnormalities shared by nutritionally induced chronic diseases, characterized by hipertrygliceridaemia, hepatic steatosis, atherosclerosis and cardiovascular heart disease. Given the high rate of mortality in the population by these diseases, the use of CLA could be highly relevant. In this way, our first objective was to investigate the potential alterations induced by high fat diets containing CLA in a mice model. It was observed that CLA intake at high dietary fat levels produced several characteristic changes such as hepatomegaly, decreased fat mass and lower serum TG. Hepatomegaly was associated to an increase in TG hepatic content, generated by a low TG secretion rate, which also contributed to the plasma TG decrease. An altered muscle lipoprotein lipase activity was associated to changes in the lipid content of this tissue. It was also observed that CLA addition to a high fat diet prevented hepatic lipid peroxidation, an increase in glutathione content being the compensatory mechanism involved. Muscle and liver lipid alterations were related to glucose metabolism changes,

mainly in the liver. In this case, an increase in citrate content, by affecting PFK-1 α activity, could be related to alterations in the glycolytic pathway.

The reproductive performance in female mice showed that not only fat content, but also CLA intake, and the time when the different parameters were evaluated (first or second generation), influenced the number of fetuses, rate of resorptions and the expression of different placental cytokines. The presence of CLA reduced the placental expression of cytokines beneficial to pregnancy, such as IL-4 and TGF- β , in both generations studied, showing correlation with the presence of resorptions, while preventing an increase in the expression of TNF- α , a pro-inflammatory cytokine, but only in the second generation.

The second experimental model used in this thesis was related to another metabolic situation: depletion of dietary proteins. Given the ability of CLA to increase lean body mass and affect body composition, our second objective was to investigate the potential benefits of CLA supplementation on nutritional recovery after protein depletion in a rat model, at two dietary fat levels (high or recommended). As we expected, protein depletion induced a catabolic state and impaired the general nutritional status of the animals, which was improved by protein repletion. When considering fat levels, high fat diets increased fat energy retention in carcass. No differential effects of CLA were observed on body weight gain, body composition or tissue/organ weights, with the exception of epididymal adipose tissue, in which CLA prevented weight increase caused by high fat consumption. Protein status, energy carcass retention and energy efficiency were not affected by CLA.

Dietary protein depletion decreased plasma TG content. Nutritional recovery, at both dietary fat levels, increased this parameter, not being affected by the presence of CLA. The animals subjected to protein depletion showed hepatic steatosis, which was reverted by protein repletion. However, dietary fat levels and CLA intake caused different effects: recommended-fat diets normalized TG content, while high fat diets normalized this parameter partially in the absence of CLA and

totally in its presence. Besides, dietary protein depletion caused hepatic lipid peroxidation, which was normalized by protein repletion, irrespective of CLA consumption. The compensatory mechanisms involved showed a differential effect of CLA.

Protein depleted animals showed fast glucose utilization after an oral overload, which was not followed by important changes in hepatic and muscular glycolytic metabolites. Protein repletion had different effects on peripheral glucose use depending on fat level and CLA consumption: high fat diets decreased glucose tolerance, and this was prevented by CLA supplementation. These effects were not reflected by changes in hepatic and muscular glycolytic metabolites.

In the last few years, CLA has received much attention because of its bioactive properties; it is used as an ergogenic aid, in weight loss and to revert metabolic alterations. This thesis makes a biochemical and nutritional contribution to the actual knowledge on CLA effects. Particularly, the usefulness of CLA in two different metabolic situations characteristic of many high-incidence diseases was emphasized. CLA reverted some metabolic alterations, but also induced deleterious effects in the experimental models used, depending on the species, fat level and biochemical parameters evaluated. Additional research is needed to elucidate its specific effects and potential uses, although its consumption should be limited in humans until the specific mechanisms of action are revealed.