

METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATAS ALIMENTADAS CON UNA DIETA RICA EN GRASA LÁCTEA FUNCIONAL

Ignacio, Scanarotti*

Cátedra de Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL

Área: Ciencias Biológicas

Sub-área: Bioquímica

Grupo: X

Palabras clave: músculo esquelético, glucosa, ácido ruménico

INTRODUCCIÓN

La Diabetes mellitus es una causa importante de mortalidad y morbilidad en el mundo entero (Danaei y col. 2011). De acuerdo con la Organización Internacional de la Salud, la diabetes tipo II compromete al 90% del total de la población con diabetes mellitus en todo el mundo. Este tipo de diabetes se caracteriza por un uso ineficiente de la insulina, y si bien existe cierta predisposición genética, la principal causa de este trastorno es la mala alimentación. La mayor parte de los estudios observacionales sugieren que determinados ácidos grasos (AG) promueven la insulino-resistencia, mientras que otros pueden proteger contra la misma (Marshall y col. 1997, Soriguer y col. 2004). Estudios previos han demostrado que uno de los AG con efectos antidiabetogénicos es el ácido ruménico (AR), un conjugado del ácido linoleico (CLA) (Halade y col. 2010). La principal fuente de AR en la dieta del hombre es la grasa de origen rumiante (Lawson y col. 2001). El AR es sintetizado en el rumen como un intermediario de la biohidrogenación del ácido linoleico (c9,c12-18:2) a ácido esteárico (18:0), por acción de la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* (Chin y col. 1992). Además, el AR puede ser sintetizado endógenamente a partir del ácido vaccénico t11-18:1 (AV), por acción de la enzima esteroil-CoA desaturasa (también conocida como Δ -9 desaturasa). La síntesis endógena de AR a partir de AV también se ha observado en humanos (Turpeinen y col. 2002) y otras especies en diferentes tejidos (Corl y col. 2001, Santora y col. 2000), por lo que los alimentos ricos en AV también son fuente de AR (Lock y col. 2005).

El músculo esquelético se ha identificado como el principal tejido involucrado en el metabolismo de la glucosa, representando el 75% de la captación total de glucosa estimulada por la insulina en todo el cuerpo (DeFronzo y col. 1981, Shulman y col. 1990). A su vez, la acumulación de grasa dentro de la célula muscular (Kraegen y col. 1991, Pan y col. 1997, Phillips y col. 1996, Russell y col. 1998) está asociada al desarrollo de insulino-resistencia, por lo que dietas ricas en grasas, al favorecer la acumulación de triglicéridos (TG) en músculo, conducen a una alteración de la respuesta a la insulina y, por lo tanto, a una deficiente utilización de la glucosa. En función de esto es esperable que dietas ricas en grasa conteniendo una grasa láctea funcional (GLF), enriquecida naturalmente en AR y AV, prevengan la acumulación de TG y favorezcan la utilización de la glucosa.

OBJETIVO

Evaluar parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa en músculo gastrocnemio de ratas alimentadas con grasa láctea funcional enriquecida naturalmente en AR y AV a altos niveles de grasas.

METODOLOGÍA

** Proyecto: Formación extracurricular en investigación y desarrollo. Proyecto CAI+D 2011 "Efectos bioquímicos y nutricionales de los isómeros de ácidos grasos en animales deficientes de ácidos grasos esenciales"

Director del proyecto: Dr. Claudio A. Bernal

Director del pasante: Dra. Juliana Saín

Se conformaron al azar 5 lotes (n=6/lote) de ratas Wistar macho (80 g), que recibieron durante 60 días las siguientes dietas experimentales: S7 (Aceite de soja al 7%), S30 (Aceite de soja al 30%, GL30 (Grasa láctea al 30%), GLF30 (Grasa láctea funcional al 30%), GLE30 (Grasa láctea estandarizada al 30%). La composición de las dietas se muestra en la Tabla 1. Al final del período experimental, las ratas fueron anestesiadas con una mezcla ketamina-acepromacina (100 – 1 mg/Kg) para la toma de muestras de sangre y músculo gastrocnemio los cuales fueron almacenados a -80°C hasta su utilización.

En suero de ratas ayunadas, se determinaron los niveles de glucosa (kits comercial SB, Sociedad de Bioquímicos) e insulina (derivado a un laboratorio externo).

En músculo de ratas sacrificadas en condiciones post-prandiales se cuantificaron las concentraciones de: glucosa, glucosa-6 fosfato (Glu-6-P), fructosa-6 fosfato (Fru-6-P), fructosa-1,6 bifosfato (Fru-1,6-biP), citrato y piruvato por técnicas fluorimétricas (Adamo y col. 1998, Bernal y col. 2006, Cadefau y col. 1990) y de TG (Laurell 1966). Además, se determinó la actividad de la fosfofructoquinasa-1 α (PFK-1) y el flujo a través de las enzimas PFK-1 y hexoquinasa (HK), mediante la relación producto/sustrato.

Tabla 1: Composición de las dietas experimentales (g/100g):

	S7*	S30	GLF30	GL30	GLE30
Aceite de soja	7	30	3	3	3
GLF**	-	-	27	-	-
GL	-	-	-	27	-
GLE***	-	-	-	-	27
Proteínas	20	20	20	20	20
Almidón	52,95	29,95	29,95	29,95	29,95
Sacarosa	10	10	10	10	10
Fibras	5	5	5	5	5
Vitaminas	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Minerales	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Cist/Met/Colina	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Energía (Kj/g)	16,52	21,33	21,33	21,33	21,33

*dieta control según las recomendaciones por el "American Institute of Nutrition" (Reeves y col. 1993) para roedores en crecimiento.

**La GLF fue obtenida a partir de leche de vacas lecheras en pastoreo, y suplemento lipídico conteniendo aceites ricos en ácido α -linolénico y DHA. Tanto la GLF como la GL fueron obtenidas en las instalaciones de la Estación Experimental Balcarce del INTA.

*** La GLE se preparó antes de cada experiencia por mezclado de GL con aceite de oliva, soja y maíz para obtener niveles equivalentes de ácidos grasos saturados, AG insaturados totales y la misma relación de PUFA n-3/n-6 que la GLF.

Los resultados se muestran en la Tabla 2 y fueron expresados como promedios \pm SEM, se compararon mediante un Student T test (S30 vs. S7 (las diferencias significativas se marcan con un *) y un Análisis de Variancia (ANOVA), seguido del test de Tukey para las dietas al 30% (diferencias significativas se marcan con distinta letra). Se considerará diferencia significativa a un $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En comparación con S7, los animales alimentados con S30 incrementaron los niveles séricos de insulina, en paralelo a un incremento de la glucosa intramuscular, sin cambios en los niveles de glucosa plasmática. Estos resultados podrían indicar una menor utilización de glucosa muscular consecuente de una elevada disponibilidad de TG y AG para su oxidación. Con el fin de estudiar el flujo a través de enzimas claves de la regulación de la glucólisis, se determinó la actividad de la enzima PFK-1, donde se observó una disminución de la actividad enzimática en los animales alimentados con S30 vs. S7; y una disminución del flujo a través de la HK, estimado mediante la relación Glu-6-P/Glucosa. Esto reafirmaría que la menor utilización de la glucosa podría deberse, al menos en parte, a una mayor utilización de los AG como sustratos energéticos. Esto se sustenta, además, por elevadas

concentraciones de citrato proveniente de la oxidación de AG en los animales alimentados con S30, respecto a S7.

Respecto a los animales que consumieron las dietas conteniendo grasas lácteas, se observó que los niveles séricos de glucosa basal fueron significativamente mayores, respecto a S30. Esto podría responder a los menores niveles de insulina sérica en los animales que consumieron estas dietas. En músculo, los niveles de TG fueron significativamente menores en GLF30 y GLE30, respecto a GL30 y S30. Esto, junto a los menores niveles de citrato cuantificados, sugiere que la menor acumulación de grasa, resultaría favorable hacia una mayor utilización de la glucosa tanto en los animales alimentados con GLF30 como con GLE30. Asimismo, si bien la actividad de la PFK-1 se vio incrementada en las tres dietas lácteas, al analizar el flujo a través de esta enzima, se observa una mayor relación producto/sustrato en GLF30. Estos resultados, en adición a los niveles bajos de piruvato en las dietas GLF30 y GLE30 respecto a S30, podrían indicar un mayor flujo de la vía glucolítica.

Tabla 2: Resultados de las determinaciones analíticas.

	S7	S30	GL30	GLF30	GLE30
Parámetros en suero de ratas ayunadas					
Insulina (ng/ml)	1,07±0,09	1,59±0,12 ^a	1,09±0,09 ^b	1,23±0,12 ^{ab}	1,01±0,11 ^b
Glucosa (mg/dl)	116,9±2,5	121,1±3,2 ^a	146,3±4,8 ^b	146,8±4,9 ^b	152,1±3,3 ^b
Parámetros en músculo gastrocnemio en condiciones post-prandiales					
TAG(umol/g)	5,60±0,62	9,03±0,78 ^{*a}	8,61±0,34 ^a	4,63±0,37 ^b	3,67±0,47 ^b
Glu (mg/dl)	1,43±0,17	3,02±0,33 [*]	2,20±0,26	2,22±0,20	2,40±0,24
Glu-6-P (mg/dl)	2,43±0,20	1,78±0,17 [*]	2,33±0,33	1,81±0,24	2,17±0,12
Fru-6-P (umol/g)	1,77±0,12	1,59±0,12	1,79±0,11	1,55±0,07	1,54±0,07
Fru-1,6-biP (umol/g)	0,94±0,12	0,61±0,09 [*]	0,50±0,09	0,76±0,15	0,56±0,09
Citrato (umol/g)	0,82±0,17	1,46±0,13 ^a	1,29±0,25 ^a	0,76±0,17 ^{ab}	0,50±0,15 ^b
Piruvato (umol/g)	55,15±2,94	32,55±1,93 ^a	31,09±1,82 ^a	15,08±1,83 ^b	11,16±3,14 ^b
Fru-1,6-biP/Fru-6-P (umol/g)	0,72±0,07	0,37±0,05 ^{*a}	0,29±0,06 ^a	0,79±0,18 ^b	0,39±0,02 ^a
Activ PFK-1 (U/ugprot)	203,2±13,8	97,1±23,4 ^{*a}	303,3±11,3 ^b	241,0±33,1 ^b	273,9±51,9 ^b
G 6-P/Glc	1,50±0,29	0,70±0,12 [*]	0,96±0,09	0,86±0,09	0,98±0,09

CONCLUSIÓN

En ratas alimentadas con dietas ricas en grasas se observó una menor utilización de la glucosa por parte del músculo, relacionada a una acumulación de TG. El consumo de una grasa láctea funcional previno la acumulación de TG intramusculares, en relación al consumo de una grasa láctea estándar, favoreciendo la metabolización de la glucosa.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Adamo K.B. y Graham T.E.**, 1998. Comparison of traditional measurements with macroglycogen and maroglycogen analysis of muscle glycogen. *J Appl Physiol*, 84, 908-913.
- Bernal C.A., Rovira J., Colandre M.E., Cusso R. y Cadefau J.A.**, 2006. Effects of dietary cis and trans unsaturated and saturated fatty acids on the glucose metabolites and enzymes of rats. *Br J Nutr*, 95, 947-54.
- Cadefau J., Casademont J., Grau J.M., Fernandez J., Balaguer A. y col.**, 1990. Biochemical and histochemical adaptation to sprint training in young athletes. *Acta Physiol Scand*, 140, 341-51.

- Corl B.A., Baumgard L.H., Dwyer D.A., Griinari J.M., Phillips B.S. y col.**, 2001. The role of Delta(9)-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *J Nutr Biochem*, 12, 622-630.
- Chin S.F., Liu W., Storkson J.M., Ha Y.L. y Pariza M.**, 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *Journal of Food Composition and Analysis*, 5, 185-197.
- Danaei G., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J. y col.**, 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, 378, 31-40.
- DeFronzo R.A., Jacot E., Jequier E., Maeder E., Wahren J. y col.**, 1981. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*, 30, 1000-7.
- Halade G.V., Rahman M.M. y Fernandes G.**, 2010. Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57Bl/6J mice. *J Nutr Biochem*, 21, 332-7.
- Kraegen E.W., Clark P.W., Jenkins A.B., Daley E.A., Chisholm D.J. y col.**, 1991. Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats. *Diabetes*, 40, 1397-403.
- Laurell S.**, 1966. A method for routine determination of plasma triglycerides. *Scand J Clin Lab Invest*, 18, 668-72.
- Lawson R.E., Moss A.R. y Givens D.I.**, 2001. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. *Nutr Res Rev*, 14, 153-72.
- Lock A.L., Horne C.A., Bauman D.E. y Salter A.M.**, 2005. Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *J Nutr*, 135, 1934-9.
- Marshall J.A., Bessesen D.H. y Hamman R.F.**, 1997. High saturated fat and low starch and fibre are associated with hyperinsulinaemia in a non-diabetic population: the San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetologia*, 40, 430-8.
- Pan D.A., Lillioja S., Kriketos A.D., Milner M.R., Baur L.A. y col.**, 1997. Skeletal muscle triglyceride levels are inversely related to insulin action. *Diabetes*, 46, 983-8.
- Phillips D.I., Caddy S., Ilic V., Fielding B.A., Frayn K.N. y col.**, 1996. Intramuscular triglyceride and muscle insulin sensitivity: evidence for a relationship in nondiabetic subjects. *Metabolism*, 45, 947-50.
- Reeves P.G., Nielsen F.H. y Fahey G.C., Jr.**, 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 123, 1939-51.
- Russell J.C., Shillabeer G., Bar-Tana J., Lau D.C., Richardson M. y col.**, 1998. Development of insulin resistance in the JCR:LA-cp rat: role of triacylglycerols and effects of MEDICA 16. *Diabetes*, 47, 770-8.
- Santora J.E., Palmquist D.L. y Roehrig K.L.**, 2000. Trans-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. *J Nutr*, 130, 208-15.
- Shulman G.I., Rothman D.L., Jue T., Stein P., DeFronzo R.A. y col.**, 1990. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *N Engl J Med*, 322, 223-8.
- Soriguer F., Esteva I., Rojo-Martinez G., Ruiz de Adana M.S., Dobarganes M.C. y col.**, 2004. Oleic acid from cooking oils is associated with lower insulin resistance in the general population (Pizarra study). *Eur J Endocrinol*, 150, 33-9.
- Turpeinen A.M., Mutanen M., Aro A., Salminen I., Basu S. y col.**, 2002. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am J Clin Nutr*, 76, 504-10.