

## **SECCIÓN II**

# **ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CLA SOBRE RECUPERACIÓN POST DEPLECIÓN PROTEICA LEVE EN RATAS**

En esta parte del estudio trabajó con ratas de la cepa Wistar y para minimizar el efecto de las variaciones hormonales se utilizaron animales machos. La edad elegida tuvo en cuenta que los animales se encuentren en pleno desarrollo para así evaluar el potencial impacto del tratamiento en un período etario de alta demanda nutricional. Las condiciones generales de laboratorio se mantuvieron según las recomendaciones estándares establecidas para animales de laboratorio detalladas en “Materiales y Métodos”. Además, se acotaron las variables dosis/tiempo en virtud de citas bibliográficas consultadas y resultados preliminares. Para cumplir con el segundo objetivo general de este trabajo de tesis, las ratas fueron alimentadas primeramente con una dieta restringida en proteínas, y luego recuperadas utilizando dietas con dos niveles de grasa, incluyendo o no CLA. Así, los grupos utilizados fueron identificados como Cb (Control basal), RP (Restricción Proteica), C (Control con niveles normales de grasa dietaria), C+CLA (Control con CLA), API (20% de AG poli-insaturados, con alto contenido en ácido linoleico), y API+CLA, (API conteniendo CLA).

En los animales no se observaron signos toxicológicos ni alteraciones en la funcionalidad hepática evaluada a través de algunos parámetros indicativos como las actividades de las enzimas ASAT y ALAT (UI/l; ASAT, Cb:  $44,14 \pm 5,89$ ; RP:  $45,67 \pm 1,33$ ; C:  $54,20 \pm 1,22$ ; C+CLA:  $51,01 \pm 2,10$ ; API:  $44,58 \pm 2,80$ ; API+CLA:  $37,04 \pm 2,64$ ; ALAT, Cb:  $15,5 \pm 4,29$ ; RP:  $17,14 \pm 0,02$ ; C:  $18,38 \pm 1,40$ ; C+CLA:  $20,17 \pm 1,53$ ; API:  $19,53 \pm 1,79$ ; API+CLA:  $15,40 \pm 1,57$ ).

## 1.- EFECTO DE LOS CLA SOBRE EL PESO CORPORAL E INGESTA DE ALIMENTO

Durante la depleción proteica leve se observó una ingesta energética significativamente menor que durante el período de repleción proteica (Tabla 8). Sin embargo, al normalizar los valores afectándolos por el peso metabólico ( $P^{0,75}$ ), los animales alimentados con las diferentes dietas de repleción proteica mostraron una menor ingesta energética que las ratas con restricción proteica (vs RP: C: -8.2%; C+CLA: -8.9%, API: -16.6% y API+CLA: -28.7%). La ingesta de dietas con elevados niveles de grasa dietaria disminuyó el consumo de alimento, sin afectar la ingesta energética, mientras que la suplementación con CLA no tuvo efecto sobre ninguno de estos dos parámetros.

	RP	C	C+CLA	API	API+CLA
Consumo de Alimento (g/día)	11,6±0,5	15,5±0,3 <sup>#,a</sup>	15,3±0,2 <sup>a</sup>	12,1±0,4 <sup>b</sup>	11,3±0,3 <sup>b</sup>
Ingesta Energética (KJ/día)	194,2±7,5	259,9±8,4 <sup>#</sup>	257,9±3,4	236,8±8,9	221,0±6,4
Ganancia de Peso (g/día)	1,12±0,09	5,02±0,30 <sup>#</sup>	4,69±0,52	5,27±0,32	5,14±0,30

Tabla 8: consumo de alimento, ingesta energética y ganancia de peso. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. RP: n=22, C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6. # indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos RP y C, evaluada a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

La evolución de los pesos corporales se muestra en la figura 27. Como se esperaba, se observó un aumento de peso corporal muy bajo durante los 14 días de depleción proteica leve. La normalización de los niveles de proteína dietaria incrementó significativamente la ganancia de peso corporal, siendo ligeramente mayor en animales alimentados con dietas conteniendo un 20% de grasa dietaria. La ingesta de CLA no modificó la ganancia de peso corporal (Tabla 8).

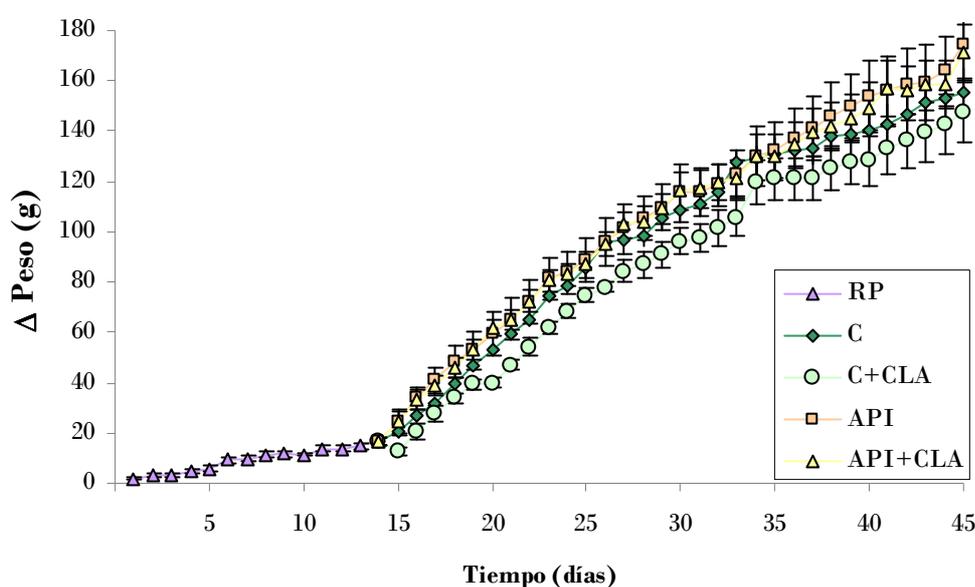


Figura 27: ganancia de peso en los diferentes grupos dietarios. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. RP: n=22, C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6.

## 2.- EFECTO DE LOS CLA SOBRE EL PESO DE HÍGADO, MÚSCULO GASTROCNEMIUS Y TEJIDO ADIPOSO

En los animales sometidos a depleción proteica se observó un aumento del peso relativo del hígado (Tabla 9), lo que confirma el efecto hepatomegálico de las dietas bajas en proteínas. El resto de los órganos y tejidos evaluados presentaron valores absolutos menores al grupo control, pero sin embargo, los pesos relativos no fueron diferentes. La repleción proteica no mostró efecto diferencial por el nivel de grasa dietaria ni por la presencia de CLA en los pesos de hígado y músculo gastrocnemius. Sin embargo, la ingesta de elevados niveles de grasa indujo un aumento en el peso del tejido adiposo epididimal, que fue prevenido por la ingesta de CLA (API+CLA: -28% vs. API), pero este efecto no se observó a niveles normales (7%) de grasa dietaria.

	RP	C	C+CLA	API	API+CLA
<b>Hígado</b>					
g/rata	4,19±0,29	8,92±0,56 <sup>#</sup>	8,61±0,11	8,74±0,52	8,87±0,56
g/100 g rata	3,67±0,23	3,21±0,18 <sup>#</sup>	3,19±0,10	3,02±0,14	3,30±0,11
<b>M. Gastrocnemius</b>					
g/rata	1,07±0,06	2,71±0,09 <sup>#</sup>	2,85±0,04	2,72±0,01	2,61±0,09
g/100 g rata	0,93±0,02	0,98±0,03	1,06±0,02	0,94±0,01	0,97±0,03
<b>TA epididimal</b>					
g/rata	0,68±0,14	1,93±0,18 <sup>#a</sup>	1,93±0,15 <sup>a</sup>	3,02±0,29 <sup>b</sup>	2,18±0,10 <sup>a</sup>
g/100 g rata	0,60±0,13	0,70±0,07 <sup>a</sup>	0,71±0,05 <sup>a</sup>	1,01±0,06 <sup>b</sup>	0,82±0,06 <sup>a,b</sup>

Tabla 9: pesos de diferentes órganos y tejidos. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. RP: n=6, C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6. # indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos RP y C, evaluada a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

### 3.- EFECTO DE LOS CLA SOBRE EL BALANCE NITROGENADO

Como se puede ver en la figura 28, todos los grupos dietarios a lo largo del período experimental mostraron un balance nitrogenado positivo. Durante el período de depleción proteica el balance nitrogenado diario fue cercano a cero. En esta etapa la ingesta de nitrógeno superó ligeramente (11%) las excreciones obligatorias del mismo. Cuando manteniendo los demás componente dietarios, los niveles de proteínas se normalizaron, el balance nitrogenado incrementó significativamente, aproximadamente unas 10 veces.

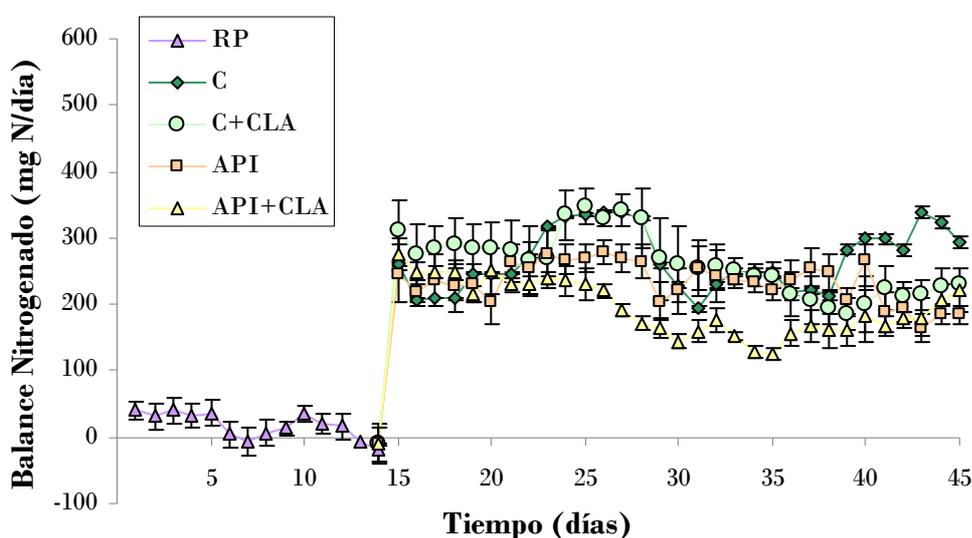


Figura 28: balance nitrogenado diario. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. RP: n=22, C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6.

Al comparar los distintos grupos de recuperación proteica, con distintos niveles de grasa dietaria (y por consiguiente, diferentes densidades energéticas), y con presencia o no de CLA, se pudo observar que a niveles recomendados de grasa dietaria el balance nitrogenado fue mayor. Este efecto pudo ser debido a que la ingesta de nitrógeno en los grupos alimentados con dietas ricas en grasa fue menor (Tabla 10), y sólo parcialmente compensado por una disminución en las excretas. La mayor reducción de la excreción nitrogenada pudo verse en orina, alcanzando

mas de un 40% de disminución, mientras que en materia fecal rondó el 35%. Los CLA no mostraron ningún efecto diferencial sobre el balance nitrogenado.

	RP	C	C+CLA	API	API+CLA
Ingesta de N (mg/día)	92,3±3,6	493,9±15,9 <sup>#,a</sup>	484,7±7,8 <sup>a</sup>	366,8±13,8 <sup>b</sup>	343,1±9,9 <sup>b</sup>
N Urinario (mg/día)	55,2±9,2	200,6±7,5 <sup>#,a</sup>	189,8±3,8 <sup>a</sup>	114,3±7,9 <sup>b</sup>	100,5±2,6 <sup>b</sup>
N Fecal (mg/día)	27,7±1,9	40,4±2,4 <sup>#,a</sup>	42,0±2,8 <sup>a</sup>	28,8±2,0 <sup>b</sup>	26,4±1,7 <sup>b</sup>
BN Diario (mg/día)	9,4±4,9	260,6±11,2 <sup>#,a</sup>	258,5±9,1 <sup>a</sup>	223,8±13,3 <sup>b</sup>	216,2±10,5 <sup>b</sup>

Tabla 10: parámetros relacionados a la utilización de nitrógeno. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. RP: n=22, C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6. # indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos DRP y DC, evaluada a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

Los niveles séricos de diferentes parámetros relacionados al metabolismo del nitrógeno, como proteínas totales, albúmina y urea se muestran en la tabla 11. Las ratas sometidas a depleción proteica leve presentaron bajos niveles de proteínas totales y albúmina en suero. Durante la repleción de proteínas estos parámetros no se vieron afectados por los tratamientos dietarios, excepto por una leve tendencia hacia valores mayores de albúmina como consecuencia de la ingesta de elevados niveles de grasa dietaria. Los niveles séricos de urea se correlacionaron con las diferencias observadas en la ingesta y excreción urinaria de nitrógeno: durante la repleción proteica, los niveles más bajos se encontraron en los grupos API y API+CLA.

	RP	C	C+CLA	API	API+CLA
Proteínas (g/dl)	5,22±0,36	6,34±0,37 <sup>#</sup>	5,56±0,46	7,88±0,61	6,69±0,97
Albúmina (g/dl)	3,71±0,24	4,77±0,43 <sup>#</sup>	4,17±0,37	5,76±0,49	5,19±0,48
Urea (g/l)	0,33±0,04	0,43±0,03 <sup>a</sup>	0,38±0,03 <sup>a,b</sup>	0,36±0,02 <sup>a,b</sup>	0,29±0,02 <sup>b</sup>

Tabla 11: niveles plasmáticos de proteínas totales, albúmina y urea. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. RP: n=6, C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6. # indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos RP y C, evaluada a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

#### 4.- RETENCIÓN ENERGÉTICA CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA

La retención energética se estimó a partir de la composición corporal centesimal y de la ganancia diaria de peso, tanto en el período de depleción como de repleción proteica. No se la expresó como la diferencia entre el contenido energético corporal al final y al inicio de cada etapa de la experiencia a causa de la diferente duración de cada una de ellas.

Como se muestra en la tabla 12, la normalización de las proteínas dietarias incrementó la retención de energía total, a expensas de una mayor retención de energía como grasas y como proteínas. Con respecto a la repleción proteica, la retención de energía como proteínas no mostró variaciones entre los grupos. La retención energética como grasa fue superior en los animales alimentados con elevados niveles de grasa dietaria. Esto se debió al leve pero no significativo aumento en la grasa corporal observado en ambos grupos dietarios. Esto dio como resultado un aumento en la energía retenida total de los animales alimentados con

dietas ricas en grasas. No se observaron cambios en la retención energética corporal como consecuencia de la ingesta de CLA.

La repleción proteica aumentó significativamente (250%) la eficiencia energética (Tabla 12). Este resultado fue más pronunciado en los animales alimentados con dietas con un 20% de grasa dietaria: el grupo API presentó una eficiencia un 29% mayor que el grupo C, y los animales alimentados con dieta API+CLA un 83% superior que el grupo C+CLA. Sin embargo, la eficiencia energética no fue alterada por el consumo de CLA, como pudo observarse en la ausencia de diferencias entre los grupos C y C+CLA y entre los grupos API y API+CLA.

	RP	C	C+CLA	API	API+CLA
<b>Retención Energética en Carcasa (kJ/día)</b>					
<b>Total</b>	7,80±0,61	38,75±2,00 <sup>#,a</sup>	31,59±3,11 <sup>a</sup>	43,27±2,69 <sup>b</sup>	41,86±1,75 <sup>b</sup>
<b>Proteica</b>	3,93±0,31	16,64±0,75 <sup>#</sup>	14,20±1,01	16,83±1,10	17,52±0,90
<b>Grasa</b>	3,87±0,30	22,11±1,51 <sup>#,a</sup>	17,40±2,32 <sup>a</sup>	26,43±1,80 <sup>b</sup>	24,34±0,95 <sup>b</sup>
<b>Eficiencia Energética (%)</b>					
<b>Eficiencia</b>	4,19±0,40	14,95±0,80 <sup>#,a</sup>	12,24±1,17 <sup>a</sup>	18,20±0,59 <sup>b</sup>	18,96±0,66 <sup>b</sup>

Tabla 12: retención energética en carcasa y eficiencia energética. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. RP: n=6, C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6. # indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos RP y C, evaluada a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

## 5.- COMPOSICIÓN CORPORAL

Para evaluar los posibles cambios en la composición corporal inducidos por el período de restricción proteica, se analizaron las carcasas correspondientes a los animales del grupo basal Cb. No se encontraron diferencias entre ambos grupos, aunque se pudo observar una tendencia hacia un mayor contenido de grasa corporal en los animales sometidos a restricción proteica (Tabla 13). Estos resultados son compatibles con el hecho de que el bajo balance nitrogenado en el grupo RP afectó el crecimiento sin alterar significativamente la composición corporal.

El restablecimiento de los niveles normales de proteínas dietarias no modificó el contenido de proteínas y agua corporal pero se pudo observar que el aumento en el peso fue acompañado por un mayor contenido de grasa corporal. Este parámetro también se vio levemente incrementado como consecuencia de la ingesta de elevados niveles de grasa dietaria. La ingesta de CLA no modificó en forma estadísticamente significativa la composición corporal a ninguno de los niveles de grasa dietaria utilizados.

	Cb	RP	C	C+CLA	API	API+CLA
Prot (%)	20,18±0,37	20,71±0,35	19,96±0,63	19,84±0,77	19,28±0,78	19,37±0,31
Grasa (%)	7,50±0,82	9,21±0,33	11,72±0,4 <sup>#</sup>	11,05±1,03	13,40±0,28	12,09±0,32
Agua (%)	68,54±0,86	66,53±0,54	65,25±0,31	65,62±1,00	62,95±0,25	64,69±0,59

Tabla 13: composición corporal. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. RP: n=6, C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6. <sup>#</sup> indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos RP y C, evaluada a través de test de Student.

## 6.- ABSORCIÓN APARENTE DE LÍPIDOS DIETARIOS

En la repleción proteica, al ser mayor el contenido graso de las dietas API y API+CLA, la ingesta y la excreción fecal de grasa se vieron incrementadas en estos grupos (Tabla 14). Sin embargo, a pesar de las diferencias en el contenido de proteínas, grasas o CLA en las diferentes dietas utilizadas, la absorción aparente de las diferentes grasas dietarias no se vio modificada (Fig. 29).

	C	C+CLA	API	API+CLA
Ingesta de Grasa (g/día)	1,08±0,03 <sup>a</sup>	1,06±0,02 <sup>a</sup>	2,42±0,09 <sup>b</sup>	2,26±0,07 <sup>b</sup>
Grasa Fecal (mg/día)	27,82±1,35 <sup>a</sup>	24,61±1,31 <sup>a</sup>	56,92±3,81 <sup>b</sup>	56,16±2,87 <sup>b</sup>

Tabla 14: ingesta y excreción de grasa. Valores expresados como media ± SEM. C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

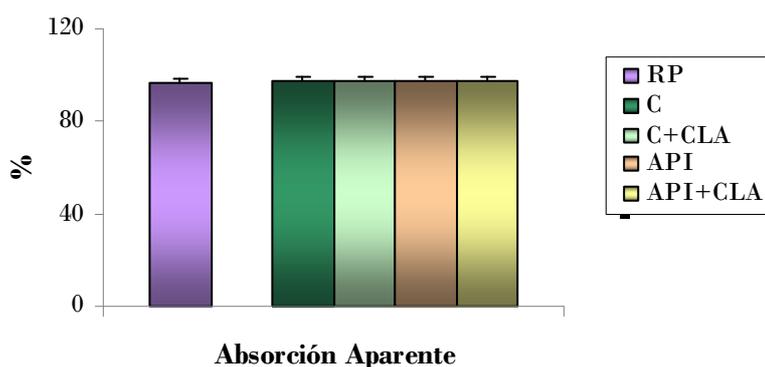


Figura 29: absorción aparente de las grasas dietarias. Valores expresados como media ± SEM. RP: n=6, C y API: n=5, C+CLA y API+CLA: n=6.

## 7.- EFECTO DE LOS CLA SOBRE NIVELES PLASMÁTICOS Y TISULARES DE LÍPIDOS

Los animales sometidos a depleción proteica presentaron, en condiciones alimentados, niveles disminuidos de TG y colesterol en suero respecto al grupo Cb. La restitución de los niveles normales de proteínas dietarias incrementó los niveles de ambos lípidos plasmáticos. La ingesta de dietas con un 20% de grasa disminuyó los niveles plasmáticos de TG e incrementó los de colesterol. La suplementación con CLA no tuvo ningún efecto diferencial sobre los lípidos circulantes (Fig. 30).

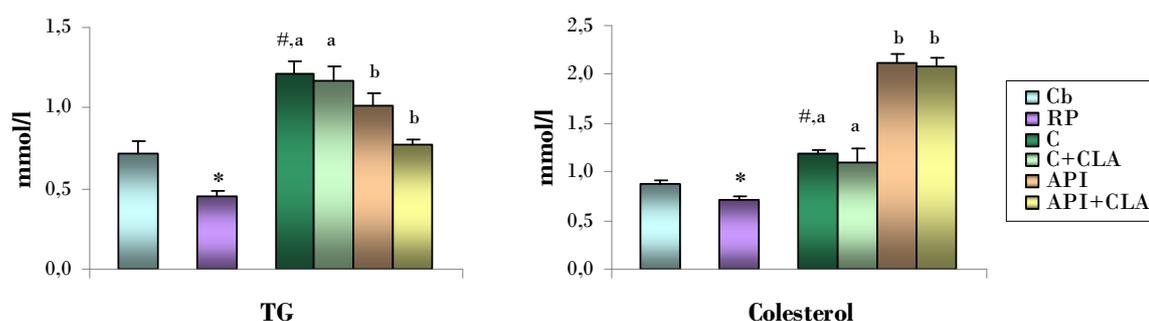


Figura 30: niveles de lípidos plasmáticos. Valores expresados como media  $\pm$  SEM de 6 animales por grupo. \* y # indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP y entre los grupos RP y C respectivamente, evaluadas a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

La depleción de proteínas de la dieta incrementó el contenido hepático de TG. Cuando las ratas fueron sometidas a repleción proteica estos niveles disminuyeron ostensiblemente. Este efecto mostró diferencias por los niveles de grasa dietaria, observándose una disminución hasta valores basales cuando los animales fueron alimentados con niveles normales de grasa dietaria. Es notable destacar que a elevados niveles de grasa dietaria, la disminución de los niveles de TG hepáticos fue significativamente mayor en presencia de CLA (Fig 31).

La restricción proteica disminuyó el contenido de TG en músculo gastrocnemius. La repleción de proteínas con un 7% de grasa dietaria no produjo alteraciones, pero se observó un aumento significativo de este parámetro como consecuencia de la ingesta de dietas ricas en grasa. La presencia de CLA no produjo alteraciones estadísticamente significativas, no obstante se observó una tendencia hacia valores levemente menores en los grupos que ingirieron CLA a ambos niveles de grasa dietaria (Fig 31).

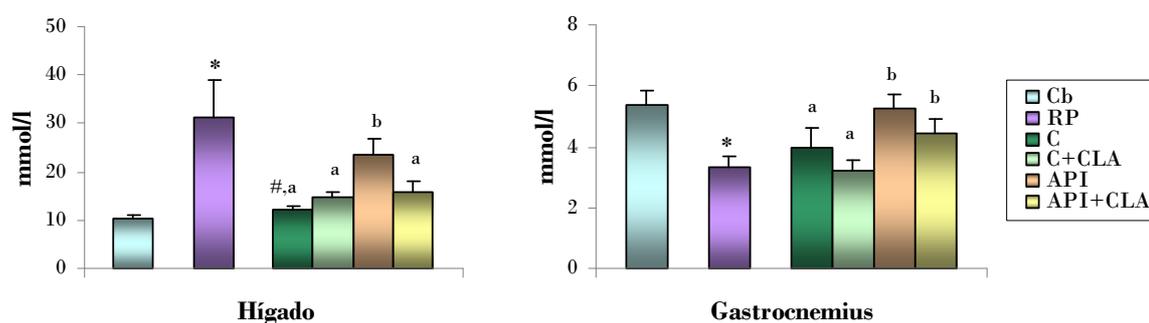


Figura 31: niveles de lípidos tisulares. Valores expresados como media  $\pm$  SEM de 6 animales por grupo. \* y # indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP y entre los grupos RP y C respectivamente, evaluadas a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

## 8.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO LIPÍDICO

Dada la capacidad de los CLA para modificar el metabolismo lipídico, y las marcadas alteraciones observadas en el hígado de las ratas alimentadas con dieta restringida en proteínas, se estudiaron algunos parámetros fundamentales asociados a la regulación de los lípidos para evaluar el potencial efecto benéfico de la ingesta de CLA y/o altos niveles de grasa dietaria en la etapa de recuperación proteica.

## 8.A.- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LIPOPROTEÍNA LIPASA (LPL)

Para evaluar la contribución de la remoción periférica de TG sobre el *status* metabólico se cuantificaron las actividades de las enzimas lipoproteínas lipasa (LPL) en músculo gastrocnemius y tejido adiposo epididimal, tejidos que contribuyen mayoritariamente a la remoción de los TG plasmáticos.

### 8.A.1- Actividad LPL en músculo gastrocnemius

La depleción de las proteínas de la dieta disminuyó la actividad de la enzima LPL con respecto al grupo Cb (Fig. 32), correlacionándose este hallazgo con la disminución observada en los niveles de TG musculares (Fig. 31). La repleción de proteínas dietarias no modificó la actividad LPL muscular, independientemente de los niveles de grasa dietaria y de la presencia de CLA.

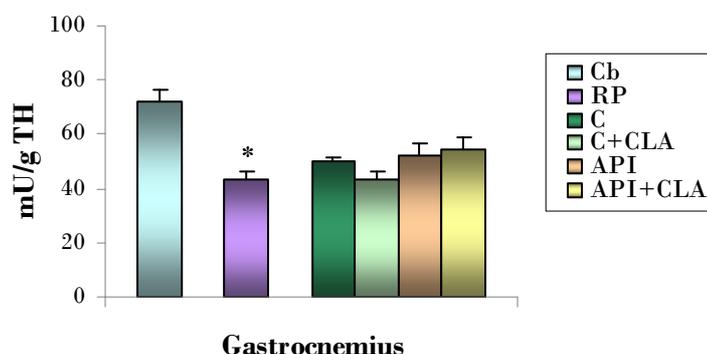


Figura 32: actividad LPL en músculo gastrocnemius. Valores expresados como media  $\pm$  SEM de 6 animales por grupo. \* indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP, evaluada a través de test de Student.

### 8.A.2.- Actividad LPL en tejido adiposo epididimal

La actividad de la enzima LPL, expresada en mU/g TH en el tejido adiposo epididimal de animales sometidos a dieta de restricción proteica no presentó diferencias con el grupo Cb, como se muestra en la figura 33. Sin embargo, al expresarla por órgano total, lo cual refleja la contribución del tejido adiposo epididimal a la remoción de los TG circulantes, se observó un aumento estadísticamente significativo, que podría contribuir a los bajos valores observados de TG plasmáticos. La repleción proteica disminuyó la actividad LPL, independientemente de los niveles de grasa dietaria y de la presencia de CLA. Sin embargo, al observar los resultados expresados por órgano total, no se hallaron diferencias entre los grupos RP y C, y los valores más altos se encontraron en ambos grupos de recuperación proteica con elevado contenido de grasa dietaria, sin presentarse cambios por efecto de la incorporación dietaria de CLA.

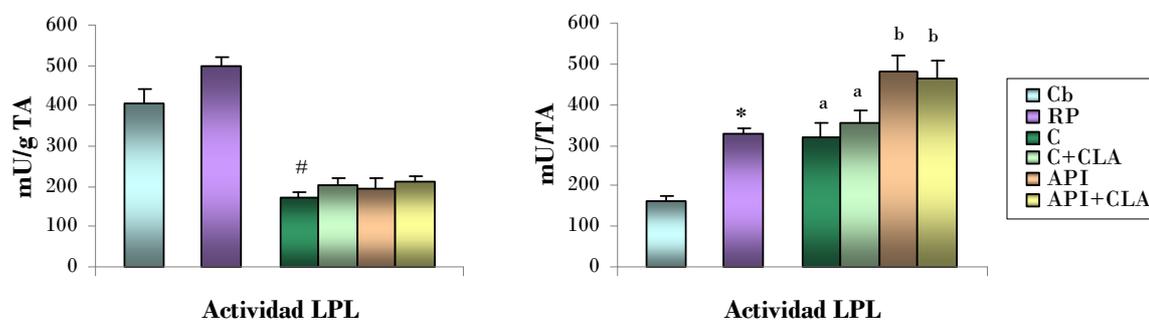


Figura 33: actividad de LPL en tejido adiposo epididimal. Valores expresados como media  $\pm$  SEM de 6 animales en cada grupo. \* y # indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP y entre los grupos RP y C respectivamente, evaluadas a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

## 8.B.- SECRECIÓN HEPÁTICA “*in vivo*” DE TG-PRE- $\beta$ LIPOPROTEÍNAS (VSTG)

La restricción de proteínas dietarias disminuyó la velocidad de secreción hepática de TG (Fig. 34). La repleción proteica no modificó la VSTG, no obstante, elevados niveles de grasa dietaria la disminuyeron, mientras que la misma fue normalizada por la adición de CLA.

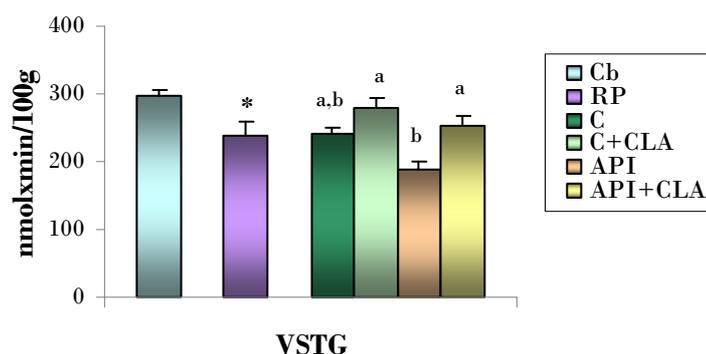


Figura 34: velocidad de secreción de TG. Valores expresados como media  $\pm$  SEM de 6 animales por grupo. \* indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP, evaluada a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

## 9.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL STRESS OXIDATIVO HEPÁTICO

En la Figura 35 se muestran los resultados obtenidos de las determinaciones de parámetros relacionados al stress oxidativo hepático.

La depleción de proteínas dietarias produjo un aumento en los niveles de lipoperoxidación (LPO) hepática, acompañado por una elevación del contenido de glutathion y una disminución de la actividad de catalasa, sin cambio en la actividad de glutathion peroxidasa (GSH-Px). La repleción proteica normalizó los niveles de LPO a expensas de una normalización de la actividad catalasa. La ingesta de altos

niveles de grasa dietaria, así como la presencia de CLA, no generaron modificaciones en los parámetros relacionados al stress oxidativo hepáticos.

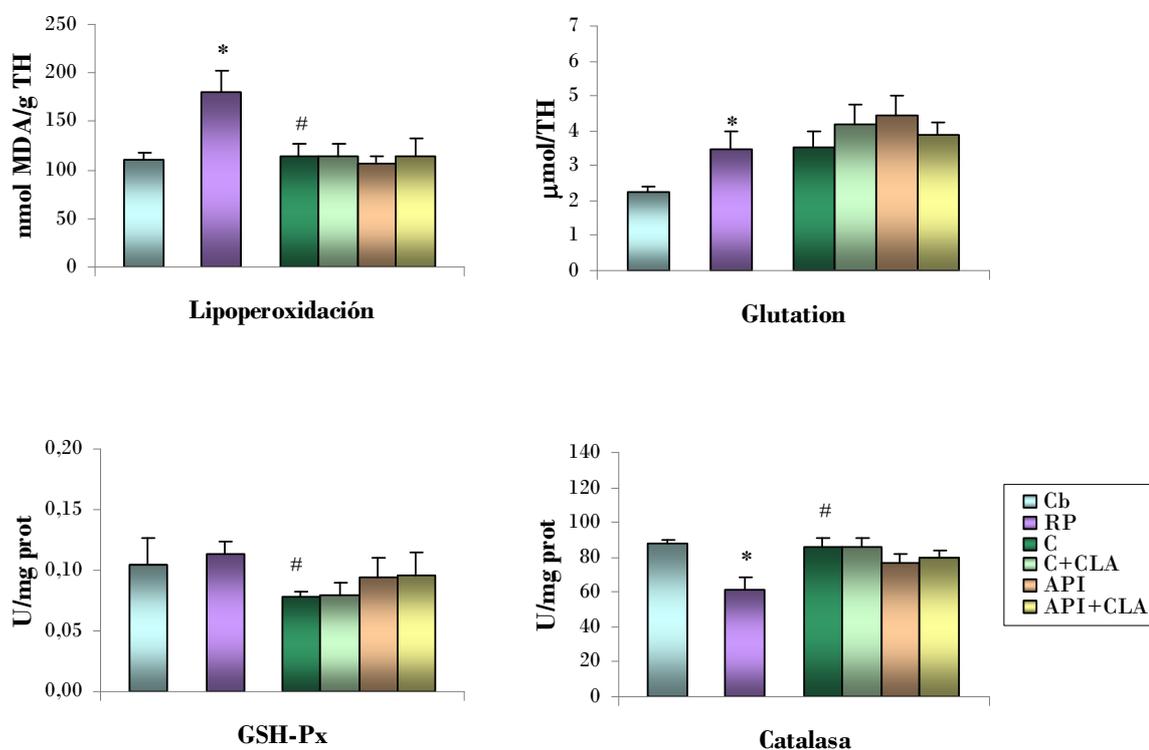


Figura 35: parámetros relacionados al stress oxidativo hepático. Valores expresados como media  $\pm$  SEM de 6 animales por grupo. \* y # indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP y entre los grupos RP y C respectivamente, evaluadas a través de test de Student.

## 10.- CONTENIDO DE METABOLITOS ENERGÉTICOS.

Se evaluó el efecto de la recuperación nutricional a normales y elevados niveles de grasa dietaria, en presencia y en ausencia de CLA sobre ciertos metabolitos energéticos: ATP, creatina-P y creatina en músculo, y ATP en hígado. Como puede observarse en la tabla 15, los niveles de ATP en hígado no se vieron alterados por ninguno de los tratamientos dietarios. La restricción proteica aumentó los niveles de creatina-P muscular con respecto al grupo Cb. La recuperación nutricional disminuyó estos niveles en forma independiente del tratamiento dietario. Los niveles musculares de creatina total y ATP no sufrieron cambios a lo largo de todo el tratamiento.

	Cb	RP	C	C+CLA	API	API+CLA
<b>Hígado (<math>\mu\text{mol/g TH}</math>)</b>						
ATP	0,92 $\pm$ 0,02	1,13 $\pm$ 0,08	0,77 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,07	0,95 $\pm$ 0,14	0,81 $\pm$ 0,07
<b>Músculo Gastrocnemius (<math>\mu\text{mol/g TH}</math>)</b>						
ATP	6,92 $\pm$ 0,61	7,07 $\pm$ 0,80	6,67 $\pm$ 0,44	6,66 $\pm$ 0,51	6,22 $\pm$ 0,25	6,80 $\pm$ 0,19
Creatina	14,71 $\pm$ 1,46	15,14 $\pm$ 1,48	13,41 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup>	15,57 $\pm$ 0,37 <sup>a,b</sup>	15,35 $\pm$ 0,94 <sup>a,b</sup>	16,70 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>
Creatina-P	10,10 $\pm$ 0,87	16,48 $\pm$ 1,42*	13,03 $\pm$ 0,99	12,38 $\pm$ 0,49	12,72 $\pm$ 0,95	11,45 $\pm$ 0,89
Creatina Total	24,80 $\pm$ 1,55	31,62 $\pm$ 2,72	26,45 $\pm$ 1,08	27,96 $\pm$ 0,82	28,06 $\pm$ 0,81	28,15 $\pm$ 0,85

Tabla 15: metabolitos energéticos en hígado y músculo gastrocnemius. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. Cb: n=6, RP: n=5, C: n=6, C+CLA: n=7, API: n=5, y API+CLA: n=7. \* indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP evaluada a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

## 11.-TEST DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA (TTOG)

La depleción de proteínas dietarias disminuyó ligeramente la concentración de glucosa en ayuno con respecto al grupo Cb, sin alcanzar significancia estadística. Cuando se analizó el perfil luego de la sobrecarga de glucosa (Figura 36), se observaron niveles menores de glucemia a lo largo de la prueba, siendo las diferencias estadísticamente significativas en todos los tiempos evaluados. Esta alterada utilización periférica de la glucosa determinó que el área integrada bajo la curva (AIC) para la respuesta a la glucosa durante el TTOG fuera un 26% menor en las ratas sometidas a restricción proteica (Tabla 16). Sin embargo se pudo observar que la glucemia al final del test (180 minutos), alcanzó valores muy semejantes a los correspondientes a condiciones de ayuno. La repleción proteica con niveles normales de grasa dietaria mostró una utilización de la glucosa semejante a la observada en el grupo Cb. Esto es reflejado por la normalización de los valores de glucemia en ayunas, perfil de glucemia a lo largo del test y valor del AIC.

	Cb	RP	C	C+CLA	API	API+CLA
AIC (g/l/min)	223±12	165±7*	223±23 <sup>#,a</sup>	220±19 <sup>a</sup>	270±16 <sup>b</sup>	252±7 <sup>a,b</sup>

Tabla 16: área integrada bajo la curva (AIC). Valores expresados como media  $\pm$  SEM. Cb: n=6, RP: n=9, C: n=5, C+CLA: n=7, API: n=6, y API+CLA: n=5. \* y # indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP y entre los grupos RP y C respectivamente, evaluadas a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

La ingesta de cantidades elevadas de grasa dietaria no alteró la glucemia en ayunas, pero se observaron niveles más elevados de glucemia a lo largo del test, siendo las diferencias estadísticamente significativas a los 60, 90 y 120 minutos. Las

alteraciones observadas determinaron que el AIC fuera un 20% superior en el grupo API con respecto al C.

La ingesta de CLA a bajos niveles de grasa dietaria no produjo cambios significativos, hallándose valores de AIC y glucemia en ayunas similares a los observados en el grupo C. El perfil luego de la sobrecarga de glucosa tampoco presentó diferencias, como se observa en la figura 36. Sin embargo, el consumo de CLA a elevados niveles de grasa dietaria impidió parcialmente que los valores de glucemia a lo largo del test incrementen en la magnitud observada en el grupo API. Así, el grupo API mostró un incremento del 40% con respecto al grupo C en los niveles de glucosa a los 60 y 90 minutos de la prueba, mientras que en el grupo API+CLA el aumento fue solo del 25%. Con respecto al AIC, éste incrementó un 20% en el grupo API y solo un 13% en el grupo API+CLA, con respecto al grupo C. Las diferencias en ambos parámetros fueron significativas según 2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé. De esta manera, la ingesta de CLA podría prevenir una alteración en la utilización periférica de la glucosa inducida por elevados niveles de grasa dietaria.

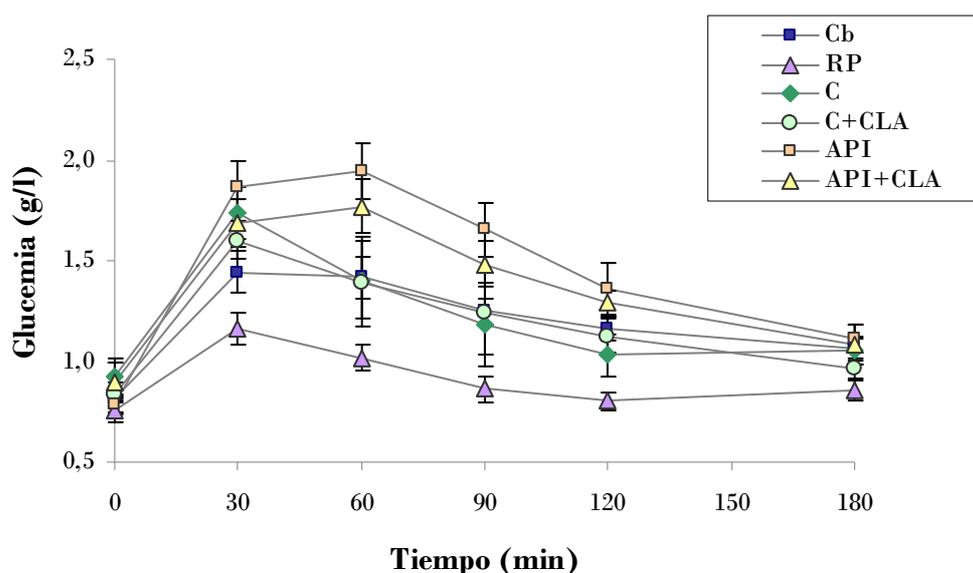


Figura 36: test de tolerancia oral a la glucosa. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. Cb: n=6, RP: n=9, C: n=5, C+CLA: n=7, API: n=6, y API+CLA: n=5.

## **12.-PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO DE LA GLUCOSA**

Con el fin de evaluar la influencia de los CLA en nuestro modelo de recuperación nutricional sobre el metabolismo de los carbohidratos estimamos el contenido de distintos intermediarios relacionados a la utilización y metabolización de la glucosa en hígado y músculo gastrocnemius.

### **12.A.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN HÍGADO**

Durante el período de depleción proteica se observó una disminución estadísticamente significativa del contenido hepático de glucosa (Fig. 37), acompañada de un aumento muy marcado en los niveles de citrato (Fig. 38). Este compuesto podría ejercer cierta inhibición sobre la enzima FosfoFructo-Kinasa-1 $\alpha$  (PFK-1 $\alpha$ ), que en este caso no se ve reflejado por la relación F-1,6P<sub>2</sub>/F-6-P.

La repleción proteica normalizó el contenido de glucosa hepática. Independientemente de la presencia de CLA, la ingesta de dietas ricas en grasa generó una leve disminución en este parámetro. Las concentraciones hepáticas de otros metabolitos como G-6-P, F-6-P y F-1,6-P<sub>2</sub> no se vieron alteradas por los niveles de grasa dietaria ni por efecto de los CLA. El ligero incremento de piruvato y el notable aumento del citrato en el hígado inducido por la restricción proteica mostraron una normalización de sus valores, independiente del nivel de grasa dietaria y de la presencia de CLA (Fig. 37).

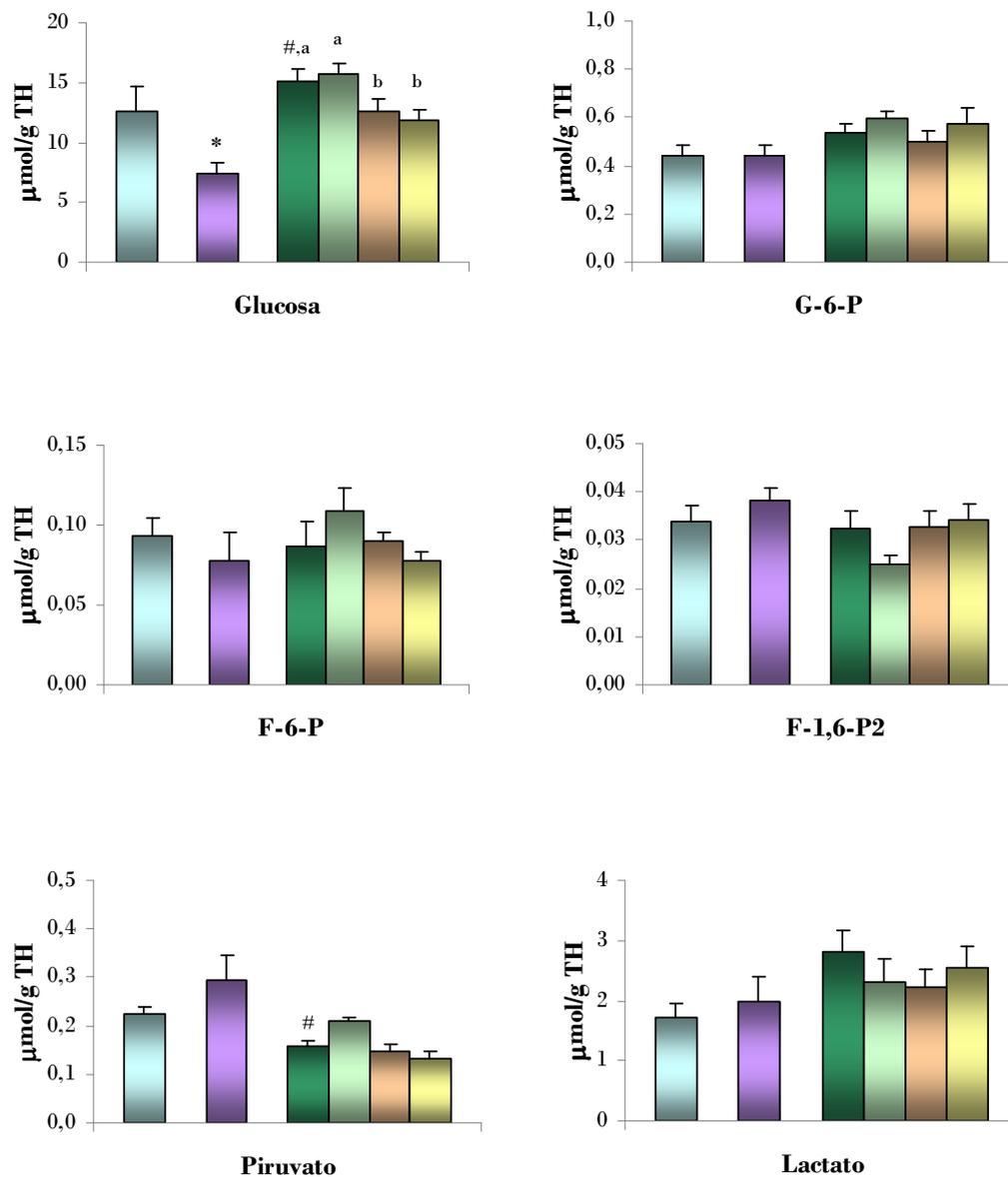


Figura 37: parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa en hígado. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. Cb: n=6, RP: n=5, C: n=6, C+CLA: n=7, API: n=5, y API+CLA: n=7. \* y # indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP, y entre los grupos RP y C, evaluadas a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

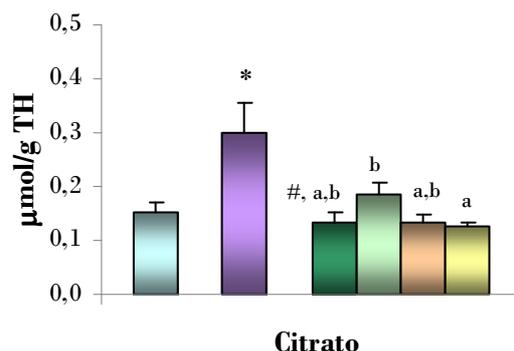


Figura 38: contenido de citrato en hígado. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. Cb: n=6, RP: n=5, C: n=6, C+CLA: n=7, API: n=5, y API+CLA: n=7. \* y # indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP, y entre los grupos RP y C, evaluadas a través de test de Student. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación proteica (2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé).

El contenido de glucógeno y los niveles de G-1-P en hígado, metabolito a partir del cual se lleva a cabo la síntesis del mismo, no mostraron diferencias por efecto de la depleción ni de la repleción proteica (Fig. 39).

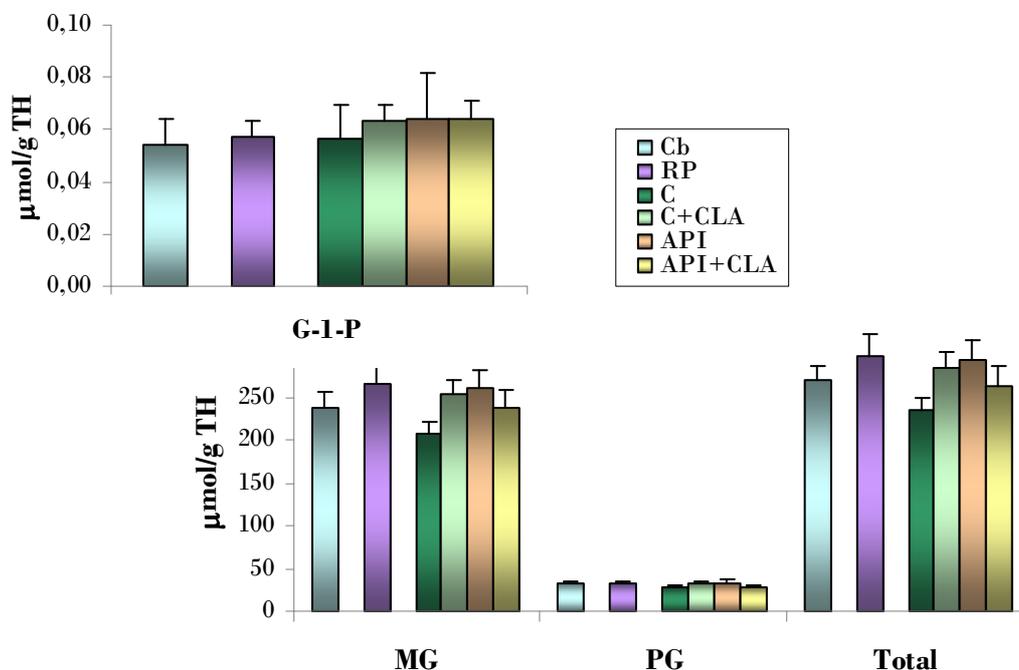


Figura 39: contenido de G-1-P, glucógeno y sus fracciones en hígado. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. Cb: n=6, RP: n=5, C: n=6, C+CLA: n=7, API: n=5, y API+CLA: n=7.

## **12.B.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO DE LA GLUCOSA EN MÚSCULO GASTROCNEMIUS**

Se observó una disminución transiente en las concentraciones de glucosa y G-6-P (Fig. 40) en músculo gastrocnemius por efecto de la depleción proteica, la que se normalizó al restituir el nivel de proteínas dietarias. Al mismo tiempo, un transitorio incremento en el contenido de glucógeno (Fig. 41) fue observado en el músculo de animales sometidos a depleción proteica, que igualmente se normalizó independientemente del nivel de grasa dietaria y de la presencia de CLA. Sorprendentemente, los niveles de F-1,6-P<sub>2</sub> que no se vieron modificados por la restricción proteica, incrementaron significativamente en forma independiente del contenido de grasa dietaria y de la presencia de CLA.

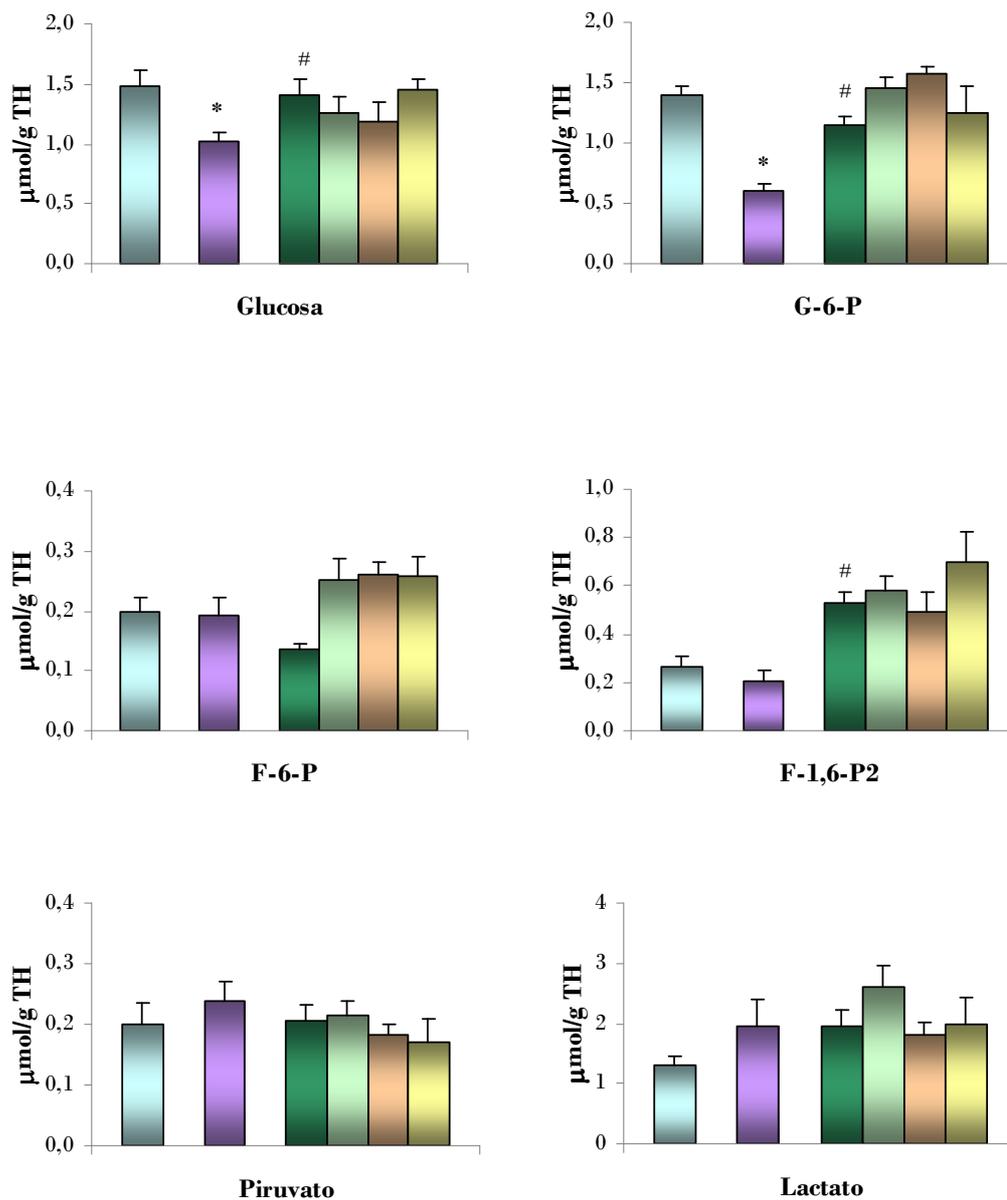


Figura 40: parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa en músculo gastrocnemius. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. Cb: n=6, RP: n=5, C: n=6, C+CLA: n=7, API: n=5, y API+CLA: n=7. \* y # indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP y entre los grupos RP y C respectivamente, evaluadas a través de test de Student.

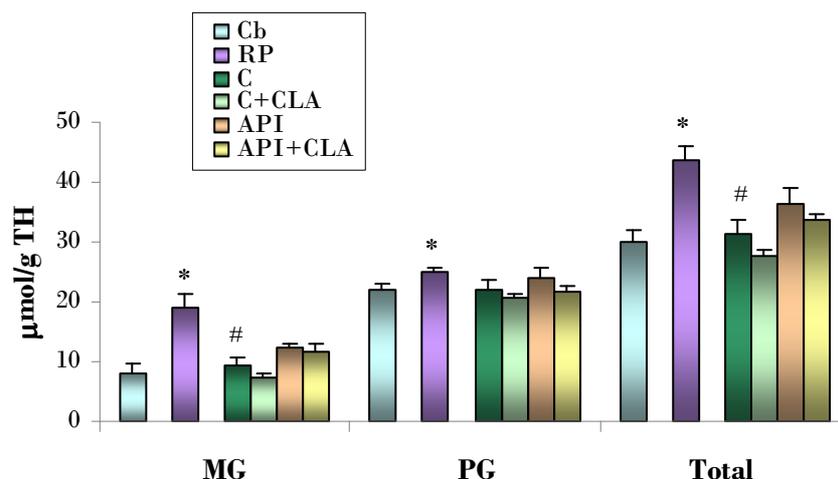


Figura 41: contenido de glucógeno y sus fracciones en músculo gastrocnemius. Valores expresados como media  $\pm$  SEM. Cb: n=6, RP: n=5, C: n=6, C+CLA: n=7, API: n=5, y API+CLA: n=7. \* y # indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos Cb y RP y entre los grupos RP y C, respectivamente, evaluadas a través de test de Student.

Con respecto al contenido muscular de citrato (Fig. 42), no se observaron cambios por efecto de la depleción ni repleción proteica, aunque la ingesta de CLA incrementó levemente este parámetro. Sin embargo este hallazgo no se correlacionó con otra alteración.

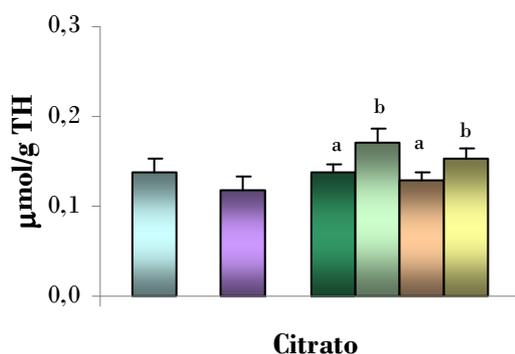


Figura 42: contenido de citrato en músculo gastrocnemius. Valores expresados como media  $\pm$  SEM de al menos 5 animales en cada grupo. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa entre los distintos grupos de recuperación (ANOVA seguido del test de Scheffé).

Evidentemente, en nuestro modelo de ratas sometidas a depleción de proteínas dietarias y posteriormente recuperadas, las alteraciones más notables a nivel del metabolismo de los hidratos de carbono son producidas por la depleción de las proteínas de la dieta; la repleción proteica normaliza los parámetros afectados sin observarse cambios de importancia por efecto de los distintos niveles de grasa ni por la presencia o no de CLA.