

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



**Tesis para la obtención del grado académico de
Doctor en Ciencias Biológicas**

**“Efectos de la semilla de *Salvia hispánica* L. (chia)
dietaria -rica en ácido α linolénico- sobre las
alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo
cardíaco en un modelo de dislipemia y resistencia
insulínica experimental”**

Lic. Agustina Creus

Director de tesis: Dra. Yolanda Bolzón de Lombardo
Co-director de tesis: Dra. Adriana G. Chicco

Laboratorio de estudio de enfermedades metabólicas relacionadas con la nutrición. Cátedra de Química Biológica. Dpto. de Cs. Biológicas. FBCB. UNL.

- 2018 -

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a quienes han colaborado en la realización de este trabajo de tesis:

A la Dra. Yolanda B. de Lombardo y a la Dra. Adriana Chicco, quienes ejercieron la dirección y co-dirección respectivamente, con absoluta responsabilidad y dedicación.

A la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por permitirme realizar mi formación de posgrado en esta casa de estudios.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la Beca Interna de Posgrado que me permitió realizar la carrera de Doctorado en Ciencias Biológicas.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) (PICT 945 BID OC/AR 2011) y a la Universidad Nacional del Litoral (CAI+D 0058 LI-2012) por el otorgamiento de los subsidios para realizar el presente trabajo de investigación.

A mis compañeros del Dpto. de Cs. Biológicas, quienes me han brindado su apoyo y motivación durante estos años de trabajo.

A mi familia y amigos por su amor incondicional.

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	8
1. Metabolismo del músculo cardíaco	9
1.1 Metabolismo de los ácidos grasos	12
1.2 Metabolismo de la glucosa	17
1.3 Interrelación del metabolismo de los lípidos y la glucosa.....	19
1.4 Alteraciones del metabolismo del músculo cardíaco	27
2. Modelo experimental nutricional de dislipemia y resistencia insulínica: modelo de dieta rica en sacarosa (DRS).....	31
3. Estrategias nutricionales para prevenir/revertir la dislipemia y resistencia insulínica.....	37
3.1 Metabolismo del ácido α -linolénico (ALA)	38
3.2 Efectos del ALA sobre la dislipemia y la resistencia insulínica en modelos experimentales	41
3.3 La semilla de <i>Salvia hispánica</i> L. (chia) como fuente de ALA	44
3.4 Efectos de la semilla de <i>Salvia hispánica</i> L. (chia) sobre aspectos bioquímicos y metabólicos en modelos experimentales	48
OBJETIVOS	50
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. Animales de experimentación.....	53
2. Diseño experimental	53
Seguimiento de los animales: determinación del peso corporal e ingesta energética ..	57
3. Obtención de muestras de sangre y tejidos	57
4. Procedimientos experimentales: métodos analíticos	58

4.1 Determinación de la presión sanguínea y el ritmo cardíaco	58
4.2 Determinación de la sensibilidad insulínica periférica global (clamp euglucémica hiperinsulinémica)	58
4.3 Determinaciones plasmáticas	59
4.3.1 Metabolitos e insulina.....	59
4.3.2 Marcadores de la peroxidación lipídica (TBARs) y proteica (grupos carbonilos) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF α e IL-6).....	59
4.4 Determinaciones en músculo cardíaco	60
4.4.1 Determinación del contenido de metabolitos	60
4.4.2 Determinación de los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS)....	62
4.4.3 Determinación del contenido proteico total.....	62
4.4.4 Determinación de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos.....	62
4.4.5 Determinación de actividades enzimáticas.....	63
4.4.6 Determinación de los niveles de masa proteica (Western Blot).....	68
4.4.7 Determinación de los niveles de mRNA (RT-PCR).....	70
4.4.8 Determinación del contenido de hidroxiprolina	71
4.4.9 Análisis histológico del colágeno intersticial	72
5. Reactivos.....	72
6. Análisis estadístico.....	73
<i>CAPITULO I.....</i>	75
Características generales, presión sanguínea, ritmo cardíaco y aspectos generales del corazón de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados crónicamente con una DRS: efectos de la semilla de chia dietaria.....	75
RESULTADOS.....	76
1. Peso corporal, ingesta energética y adiposidad visceral.....	76
2. Niveles plasmáticos de metabolitos e insulina y sensibilidad insulínica periférica global	78
3. Presión sanguínea, ritmo cardíaco, pesos del corazón y del ventrículo izquierdo ...	80
DISCUSIÓN.....	83

CAPÍTULO II 85

Parte I: Metabolismo lipídico del músculo cardíaco de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados crónicamente con una DRS: efectos de la semilla de chia dietaria 85

RESULTADOS 86

1. Contenido de lípidos 86
2. Niveles de la masa proteica del transportador de ácidos grasos FAT/CD36. Actividad enzimática y nivel de la masa proteica de la proteína mitocondrial M-CPT1 86
3. Nivel de la masa proteica del receptor nuclear PPAR α 91
4. Nivel de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP2 91

DISCUSIÓN 94

Parte II: Metabolismo de la glucosa del músculo cardíaco de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados crónicamente con una DRS: efectos de la semilla de chia dietaria 102

RESULTADOS 103

1. Niveles de glucosa-6P y glucógeno y actividad de la enzima hexoquinasa (HQ) . 103
2. Actividad del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDHc) 103
3. Niveles de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT4 105
4. Nivel de la masa proteica del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) 107
5. Niveles de la masa proteica de la AMPK y de su forma activa (pAMPK) 109
6. Composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos 111

DISCUSIÓN 113

CAPITULO III 120

Estrés oxidativo sistémico y del músculo cardíaco en los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados crónicamente con una DRS: efectos de la semilla de chia dietaria 120

RESULTADOS 121

1. Niveles plasmáticos de TBARs, grupos carbonilos, TNF α e IL-6 121

2. Niveles de las especies reactivas al oxígeno (ROS) y expresión génica de la subunidad p47 de la NAD(P)H oxidasa (p47NOX)	123
3. Actividades enzimáticas y expresión génica de enzimas antioxidantes	125
4. Expresión génica del factor de transcripción Nrf2	127
5. Contenido de colágeno e hidroxiprolina en ventrículo izquierdo.....	129
DISCUSIÓN	131
CONCLUSIONES	136
BIBLIOGRAFÍA	140
PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS	168

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Enzimas y proteínas transportadoras involucradas en el metabolismo cardíaco cuyos genes son regulados transcripcionalmente por el PPAR α	22
Tabla 2 Alteraciones del metabolismo del músculo cardíaco en modelos animales experimentales	29
Tabla 3 Efectos de la administración crónica de una DRS a ratas normales.....	36
Tabla 4 Intervenciones nutricionales experimentales: efectos del ALA dietario	43
Tabla 5 Composición de las dietas experimentales	55
Tabla 6 Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales	56
Tabla 7 Secuencia de los oligonucleótidos específicos empleados en la RT-PCR y tamaño de los fragmentos generados.....	71
Tabla 8 Incremento del peso corporal, ingesta energética y adiposidad visceral de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia.....	77
Tabla 9 Niveles plasmáticos de metabolitos e insulina y sensibilidad insulínica periférica global (VIG) de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia.....	79
Tabla 10 Pesos totales y relativos del corazón y del ventrículo izquierdo de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental	82
Tabla 11 Contenido de lípidos en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental	86
Tabla 12 Contenido de glucosa-6P y glucógeno y actividad enzimática de la HQ en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental	103
Tabla 13 Composición de ácidos grasos de los fosfolípidos del músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental.....	112

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Generalidades del metabolismo del músculo cardíaco	11
Figura 2 Interrelación del metabolismo de los lípidos y de la glucosa en el músculo cardíaco	26
Figura 3 Evolución de los niveles plasmáticos de metabolitos e insulina de los animales alimentados con una dieta rica en sacarosa (DRS).....	35
Figura 4 Metabolismo del ALA	40
Figura 5 Características morfo-anatómicas de la planta <i>Salvia hispánica</i> L. (chia)	45
Figura 6 Composición de la semilla de <i>Salvia hispánica</i> L. (chia).....	47
Figura 7 Diagrama del diseño experimental.....	55
Figura 8 Incremento del peso corporal de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia durante el período experimental	77
Figura 9 Presión sanguínea sistólica y diastólica y ritmo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia durante el período experimental	81
Figura 10 Niveles de la masa proteica del FAT/CD36 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia en condiciones previas y posteriores al estímulo con insulina (tiempo 0 y 120 min de la clamp) al final del período experimental	88
Figura 11 Actividad y nivel de la masa proteica de la M-CPT1 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental.....	90
Figura 12 Nivel de la masa proteica del PPAR α en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental.....	92
Figura 13 Nivel de la masa proteica de la UCP2 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental.....	93
Figura 14 Actividad enzimática del PDHc en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental.....	104
Figura 15 Niveles de la masa proteica del GLUT4 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia en condiciones previas y posteriores al estímulo con insulina (tiempo 0 y 120 min de la clamp) al final del período experimental.....	106
Figura 16 Nivel de la masa proteica del IRS1 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental.....	108

Figura 17 Niveles de la masa proteica de la AMPK y la pAMPK (Thr172) y relación pAMPK/AMPK en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental	110
Figura 18 Niveles plasmáticos de TBARs, grupos carbonilos, TNF α e IL-6 de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental	122
Figura 19 Niveles de las ROS y expresión génica de la p47NOX en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental ...	124
Figura 20 Expresión génica y actividades enzimáticas de las enzimas GPx y SOD en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental	126
Figura 21 Expresión génica del factor de transcripción Nrf2 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental.....	128
Figura 22 Contenido de colágeno y de hidroxiprolina en el ventrículo izquierdo de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental.....	130
Figura 23 Alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco en un modelo experimental nutricional de dislipemia y resistencia insulínica: mecanismos subyacentes y efectos de la semilla de <i>Salvia hispánica</i> L. (chia).....	139

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

ACC: acetil-CoA carboxilasa

ACO: acil-CoA oxidasa

ACS: acil-CoA sintetasa

AGL: ácidos grasos libres

ALA: ácido α -linolénico

AMPK: quinasa activada por AMP

AMP: adenosina monofosfato

ADP: adenosina difosfato

ATP: adenosina trifosfato

CAT: catalasa

CoA: coenzima A

CPT 1 y 2: carnitina palmitoiltransferasa 1 y 2

Creatina-P: creatina fosfato

DAG: diacilglicerol

DC: dieta control

DHA: ácido docosahexaenoico

DPA: ácido docosapentaenoico

DRS: dieta rica en sacarosa

DRS+chia: dieta rica en sacarosa + semilla de chia

ECV: enfermedades cardiovasculares

EPA: ácido eicosapentaenoico

FABP: proteína de unión a ácidos grasos

FADH₂: flavina adenina dinucleótido

FAT/CD36: translocasa de ácidos grasos CD36

FATP 1 y 6: proteína transportadora de ácidos grasos 1 y 6

FAO: oxidasa de ácidos grasos

FAS: sintasa de ácidos grasos

Fructosa-6P: fructosa-6 fosfato

Fructosa-2,6biP: fructosa-2,6 bifosfato

GLUT 1 y 4: transportador de glucosa 1 y 4

Glucosa-6P: glucosa-6 fosfato

GPx: glutatión peroxidasa

GS: glucógeno sintasa

HQ: hexoquinasa

HDL: lipoproteína de alta densidad

IL-6: interleuquina 6

IR: receptor de insulina

IRS1: sustrato del receptor de insulina 1

LA: ácido linoléico

LC-acil-CoA: acil-CoA de cadena larga

LDL: lipoproteína de baja densidad

LCAD: deshidrogenasa de acil-CoA de cadena larga

LPL: lipoproteína lipasa

MCD: malonil-CoA decarboxilasa

MCAD: deshidrogenasa de acil-CoA de cadena media

M-CPT1: carnitina palmitoiltransferasa tipo muscular 1

NADH: nicotinamida adenina dinucleótido

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NOX: NADPH oxidasa

Nrf2: factor de transcripción relacionado con el factor nuclear eritroide 2 NF-E2

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas kappa de las células B activadas

PDHc: complejo piruvato deshidrogenasa

PDK: PDH quinasa

PFK 1 y 2: fosfofructoquinasa 1 y 2

PGC-1 α : co-activador 1 α del receptor activado por proliferadores peroxisomales γ

PI3K: fosfatidilinositol-3 quinasa

PK B y C: proteína quinasa B y C

p47NOX: subunidad p47 de la NAD(P)H oxidasa

PPAR α : receptor activado por proliferadores peroxisomales α

PUFAs: ácidos grasos poliinsaturados

ROS: sustancias reactivas del oxígeno

SHR: ratas espontáneamente hipertensas

SM: síndrome metabólico

SOD: superóxido dismutasa

SREBP: proteína de unión a elementos reguladores de esteroides

STZ: estreptozotocina

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

TG: triglicéridos

TNF α : factor de necrosis tumoral α

UCP 2 y 3: proteína desacoplante 2 y 3

VLCAD: deshidrogenasa de acil-CoA de cadena muy larga

VIG: velocidad de infusión de glucosa

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

ZDF: rata Zucker diabética y obesa

RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de muerte en todo el mundo. El incremento de la incidencia de las ECV durante las últimas décadas se encuentra en estrecha asociación con cambios en el estilo de vida de los individuos, entre ellos, cambios en los hábitos dietarios. La presencia del denominado síndrome metabólico (SM) es un factor de riesgo multifactorial de ECV. Este síndrome, comprende un conjunto de signos y síntomas que incluyen obesidad, adiposidad visceral, hipertensión, dislipemia, resistencia insulínica, entre otros. Además, se ha demostrado que, en este contexto, se producen profundas alteraciones del metabolismo cardíaco (cambios en la utilización de los sustratos energéticos y lipotoxicidad), las cuales tiene un rol causal sobre el daño y la disfunción cardíaca. Sin embargo, los mecanismos íntimos implicados en estos procesos no están aún completamente dilucidados.

Modelos experimentales nutricionales que asemejan varias de las alteraciones observadas en el SM humano sirven para estudiar en profundidad las alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco desarrolladas en este contexto. En el presente trabajo de tesis se utilizó un modelo de dislipemia y resistencia insulínica, inducido en ratas normales por la administración crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS).

El modelo de DRS además resulta útil para la búsqueda de intervenciones nutricionales que atenuen o retrasen los efectos adversos del SM. Al respecto, estudios epidemiológicos han reportado que la ingesta adecuada del ácido graso poliinsaturado 18:3, n-3 ácido α -linolénico (ALA) se correlaciona con un menor riesgo de padecer ECV. Además, algunos estudios a nivel experimental han demostrado el impacto positivo de la administración dietaria de este ácido graso sobre los niveles de lípidos plasmáticos y la sensibilidad insulínica. El ALA es un ácido graso esencial que se encuentra en semilla de distintos vegetales, siendo la semilla de *Salvia hispánica* L., comunmente denominada chia, una de las principales fuentes.

De lo expuesto, el *primer objetivo general* del presente trabajo de tesis fue evaluar algunos de los mecanismos subyacentes a las alteraciones bioquímicas-metabólicas presentes en el músculo cardíaco de ratas alimentadas crónicamente con una DRS. El *segundo objetivo general* fue determinar si la administración de semilla de chia (variedad Salba) -rica en ALA-

como fuente de grasa dietaria en sustitución del aceite de maíz en la DRS mejora o revierte las alteraciones del corazón analizando algunos de los mecanismos implicados.

Para llevar a cabo estos objetivos ratas machos Wistar recibieron una DRS (60% energía) por 3 meses, período donde se establece de manera permanente dislipemia, insulino resistencia, alterada homeostasis de la glucosa, una moderada hiperglucemia y normoinsulinemia. En este contexto se observa un incremento del contenido de lípidos en tejidos no adiposos, incluido el corazón. Al cabo de este período las ratas que recibieron la DRS se subdividieron en 2 grupos: un grupo continuó con la DRS mientras que el otro grupo recibió una DRS conteniendo semilla de chia como fuente de grasa dietaria en reemplazo del aceite de maíz por 3 meses adicionales. En el músculo cardíaco se determinaron: a) Niveles de la masa proteica del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 -en condiciones basales y frente al estímulo de la insulina-; actividad enzimática y nivel de la masa proteica de la enzima M-CPT1 -clave en la vía de oxidación de los ácidos grasos-. Nivel de la masa proteica del factor de transcripción PPAR α -regulador del metabolismo de los ácidos grasos en tejidos oxidativos- y nivel de la proteína mitocondrial desacoplante UCP2. b) Niveles de metabolitos -glucosa-6P y glucógeno-, fosforilación y oxidación de la glucosa -estimadas mediante la actividad de las enzimas HQ y PDHc respectivamente-. Niveles de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT4 -en condiciones basales y frente al estímulo de la insulina- del sustrato del receptor de insulina IRS1 -clave en la vía de señalización de la hormona- y de la AMPK y su forma activa (pAMPK) -quinasa con un rol central en la regulación de la utilización de los sustratos energéticos en el corazón-. c) Niveles plasmáticos de marcadores de la peroxidación lipídica y proteica (TBARs y grupos carbonilos) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF α e IL-6). En músculo cardíaco: niveles de ROS y expresión génica de la p47NOX; actividad enzimática y expresión génica de enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante (GPx, SOD y CAT); expresión génica del factor de transcripción Nrf2 -clave en la respuesta antioxidante celular-. d) Contenido de hidroxiprolina y colágeno intersticial en ventrículo izquierdo, presión sanguínea, ritmo cardíaco y composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos del músculo cardíaco.

La dislipemia y resistencia insulínica inducida por la administración de una DRS produce lipotoxicidad cardíaca y un deterioro de la utilización de los sustratos energéticos (lípidos vs.

glucosa) por el músculo cardíaco. El presente trabajo demuestra algunos mecanismos subyacentes implicados en estas alteraciones. La mayor disponibilidad plasmática de ácidos grasos, junto con el aumento de la masa proteica del FAT/CD36 en el sarcolema, posibilitarían una mayor captación de los mismos. Simultáneamente, su elevada oxidación mitocondrial (M-CPT1) sería aún insuficiente para impedir el acúmulo de lípidos intracelulares (TG, LC-acil-CoA, DAG), induciendo lipotoxicidad cardíaca. La activación del PPAR α y de la AMPK jugarían un rol importante en el desarrollo de estas alteraciones. En este contexto, la captación (GLUT4) y el metabolismo oxidativo y no oxidativo de la glucosa, así como la vía de señalización de la insulina (IRS1) se encuentran comprometidos. Además, la hipertensión y el estrés oxidativo sistémico se acompañan de un incremento del contenido de colágeno en el ventrículo izquierdo. Estas alteraciones se presentan frente a aumentados niveles de ROS en el músculo cardíaco, resultado, al menos en parte, del deteriorado estado de las defensas enzimáticas antioxidantes, y posiblemente, del incremento de su producción.

Por otra parte, la administración de semilla de *Salvia hispánica* L. (chia) impacta positivamente sobre las alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco presentes en este modelo experimental nutricional. La reversión de la dislipemia y la resistencia insulínica inducida por la semilla de chia dietaria junto con la disminución del transporte de los ácidos grasos al cardiomiocito (FAT/CD36) contribuirían, al menos en parte, a la reversión de la lipotoxicidad cardíaca. Esto se acompaña de la normalización de la captación y metabolismo global de la glucosa en el músculo cardíaco. El mejoramiento de la actividad de la M-CPT1 y de la AMPK; así como los cambios en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas podrían contribuir a estos efectos. Además, esta intervención dietaria fue capaz de revertir la hipertensión, el alterado ritmo cardíaco y el contenido de colágeno en ventrículo izquierdo, mejorando el estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo sistémico. En este contenido se observó un mejoramiento del estado oxidativo del músculo cardíaco, asociado a la inducción del factor de transcripción Nrf2 -clave en la respuesta antioxidante celular- y posiblemente a una menor producción de ROS.

Si bien los hallazgos obtenidos a nivel experimental no pueden ser directamente extrapolados hacia el humano, en base a los resultados alcanzados en el presente trabajo de tesis, es posible

sugerir que la ingesta dietaria de semilla de *Salvia hispánica* L., comúnmente denominada chia, puede ser una alternativa nutricional que colaboraría a contrarrestar las complicaciones cardiovasculares asociadas al SM humano.

SUMMARY

Cardiovascular diseases (CVD) are the main cause of death in the world. The increase of the prevalence of CVD over last decades is associated with changes in the lifestyle, among them changes in dietary habits. The metabolic syndrome (MS) is a multifactorial risk of CVD. This syndrome, is a set of signs and symptoms that includes obesity, visceral adiposity, hypertension, dyslipemia and insulin resistance, among others. In addition, in this context, it has been shown that profound alterations of cardiac metabolism occur (lipotoxicity and a switch in the cardiac fuels), which has a causal role in the development of cardiac injury and cardiac dysfunction. However, the underlying mechanisms involved in these processes are not fully understood.

Nutritional experimental models that mimic several aspects of the MS in humans are useful to study the biochemical and metabolic alterations of cardiac muscle developed in this context. In this study we used an experimental model of dyslipemia and insulin resistance induced in normal rats by the chronic administration of a sucrose-rich diet (DRS).

The experimental model of DRS is also useful for the search of potentially beneficial interventions on the attenuation or delay of the adverse effects of MS. In this regard, epidemiological studies have reported that the adequate intake of 18:3 n-3 α -linolenic acid (ALA) decreased the incidence of CVD. Besides, experimental studies have demonstrated the positive effect of dietary ALA upon the dyslipemia and insulin resistance. ALA is a polyunsaturated and essential fatty acid found in seeds of several vegetables, being the seed of *Salvia hispanica* L., commonly known as chia, one of the main sources of ALA.

From the above, the first objective of this study was to study some mechanisms underlying the biochemical and metabolic alterations present in the heart of dyslipemic insulin resistant rats fed with a DRS. The second objective was to investigate if the administration of chia seed (Salba) -rich in ALA- as source of fat instead of corn oil in the DRS, could improve or even revert the alterations of heart muscle analyzing some mechanisms involved.

For this propose, Wistar male rats fed with a DRS (60% energy) for 3 months, period to develop a permanent dyslipemia, insulin resistance, abnormal glucose homeostasis,

hyperglycemia and normoinsulinemia. In this context, an increase of lipid content in non-adipose tissues, included the heart, was observed. After 3 months, the rats fed with DRS diets were divided into 2 subgroups: the rats in the first subgroup continued with the DRS for up to 6 months of feeding. The other subgroup received a chia seed as source of fat instead of corn oil in the DRS for the next 3 months. In the heart muscle of rats fed with experimental diets were analyzed: a) protein mass levels of fatty acid transporter FAT/CD36 -both at basal conditions and under insulin stimulation-; enzyme activity of M-CPT1 -a key enzyme involved in fatty acid oxidation-. Protein mass level of PPAR α -a master regulator of fatty acids metabolism- and protein mass level of mitochondrial uncoupling protein UCP2. b) Metabolites (glucose-6P and glycogen) and enzymes activities involved in the glucose phosphorylation and oxidative glucose disposal (H₂O₂ and PDHc). Protein mass levels of glucose transporter GLUT4 -both at basal conditions and under insulin stimulation-, the protein mass level of insulin receptor substrate IRS1 -a key protein involved in the insulin signaling- and the protein mass level of AMPK and active AMPK (pAMPK) -a master regulator of fuel utilization in the heart-. c) Plasma levels of TBARs and protein carbonyl groups -an estimation of lipid and protein peroxidation- and plasma levels of pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-6. In the heart muscle: ROS levels and gene expression of p47NOX; activities and gene expressions of enzymes of antioxidant system (GPx, SOD and CAT); gene expression of Nrf2 -a key transcription factor involved in the antioxidant responses-. d) Hydroxyproline content and collagen distribution in left ventricle. Besides, blood pressure, heart rate and fatty acid composition of heart phospholipids were assessed.

The dyslipemia and insulin resistance induced by chronic administration of a DRS lead to cardiac lipotoxicity and an impaired substrates utilization (lipids vs. glucose) in the heart. The present study demonstrates some underlying mechanisms implicated in these alterations. The major availability of fatty acids and the increased of FAT/CD36 in the sarcolemma could elicit an increased influx of fatty acids into the cardiomyocytes. Moreover, despite the increase in fatty acid oxidation (M-CPT1), lipids (TG, LC-acil-CoA, DAG) accumulate in the heart. It is possible that the augmented flux of fatty acids exceeds the mitochondrial oxidative capacity. The activation of PPAR α and AMPK would play an important role in these alterations. In this context, the uptake (GLUT4), the oxidative and non-oxidative glucose metabolism and the insulin signaling (IRS1) are impaired. Besides, the hypertension

and the systemic oxidative stress are associated with an increment of left ventricle collagen deposition. These alterations are present with increased ROS levels in the cardiac muscle, this is the result, at least partly, of the deteriorated state of antioxidant defense enzymes, and likely, of a rise of their production.

On the other hand, the *Salvia hispanica* L. (Salba) seed have a positive effect upon the biochemical and metabolic alterations present in the heart of dyslipemic insulin resistant rats. The reversion of dyslipemia and insulin resistance induced by the dietary chia seed and the normalization of fatty acid uptake (FAT/CD36) would revert the cardiac lipotoxicity. In this context, normalization of glucose uptake and glucose metabolism was observed. The improvement of M-CPT1 and AMPK and changes in membrane fatty acid composition could contribute to these effects. Moreover, this dietary manipulation was able to revert the hypertension and to improve the heart rate and left ventricle collagen content, improving the pro-inflammatory and pro-oxidative systemic state. In these conditions, an improvement of heart oxidative estate was observed. This is associated with an induction of Nrf2 and possibly with a decline of ROS production.

Although the findings obtained at the experimental level can not be directly extrapolated to the human, based on the results achieved in the present thesis work, it is possible to suggests that dietary *Salvia hispanica* L. seed, commonly known as chia, can be a beneficial nutritional alternative in order to counteract the cardiovascular complications associated to human MS.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen la principal causa de muerte en todo el mundo, incluido nuestro país, según un reciente informe de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2015). La alta prevalencia de las ECV se encuentra estrechamente asociada a cambios en el estilo de vida de la población mundial durante los últimos años, donde se destacan el sedentarismo, el tabaquismo, el incremento del consumo de alcohol y los cambios en los hábitos dietarios (Mendis y col., 2011). Reportes de la *American Heart Association* basados en los estudios clínicos y epidemiológicos más relevantes de los últimos años advierten sobre la incidencia de la elevada ingesta de carbohidratos simples y grasas, particularmente grasas saturadas, sobre el desarrollo de las ECV y sus factores de riesgo (Johnson y col., 2009; Sacks y col., 2017). Al respecto, dos meta-análisis de 43 y 87 estudios observacionales demuestran que la presencia del denominado síndrome metabólico (SM) incrementa 2 veces el riesgo de padecer ECV (Gami y col., 2007; Mottillo y col., 2010) y en términos generales, aproximadamente el 20-30% de la población mundial cumple criterios de diagnóstico de SM (Grundy, 2008).

El SM es un conjunto interrelacionado de anomalías de etiología multifactorial que incluyen, entre otras, hipertensión, obesidad, dislipemia e hiperglucemia. Si bien existen distintos criterios para su diagnóstico clínico, los cuales incluyen el adoptado por la Organización Mundial de la Salud, el de la *International Diabetes Federation* y el adoptado en el *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III report (NCEP-ATP III)*, existe un amplio consenso respecto al rol clave de la dislipemia y la resistencia insulínica sobre la fisiopatología del SM (Bruce y Hanson, 2010; O'Neill y O'Driscoll 2015).

Las alteraciones presentes en el SM mencionadas se encuentran estrechamente correlacionadas con la presencia de alteraciones del metabolismo y de la función cardíaca, sin embargo, muchos de los mecanismos implicados aún restan conocerse (Tune y col., 2017). Además, como se expuso anteriormente, los hábitos dietarios juegan un papel importante en el desarrollo del SM, por lo tanto, cambios estratégicos en la composición nutricional de la dieta pueden resultar eficaces a fin de contrarrestar los efectos adversos de este síndrome y consecuentemente la prevalencia de las ECV (Abete y col. 2010).

Metabolismo del músculo cardíaco

El corazón es el órgano encargado de bombear sangre a través del sistema vascular a todo el organismo, realizando ciclos de contracción (sístole) y relajación (diástole) coordinados. En mamíferos, está constituido por estructuras anatómicas discretas, dos aurículas y dos ventrículos, las cuales están conformadas principalmente por tejido muscular cardíaco.

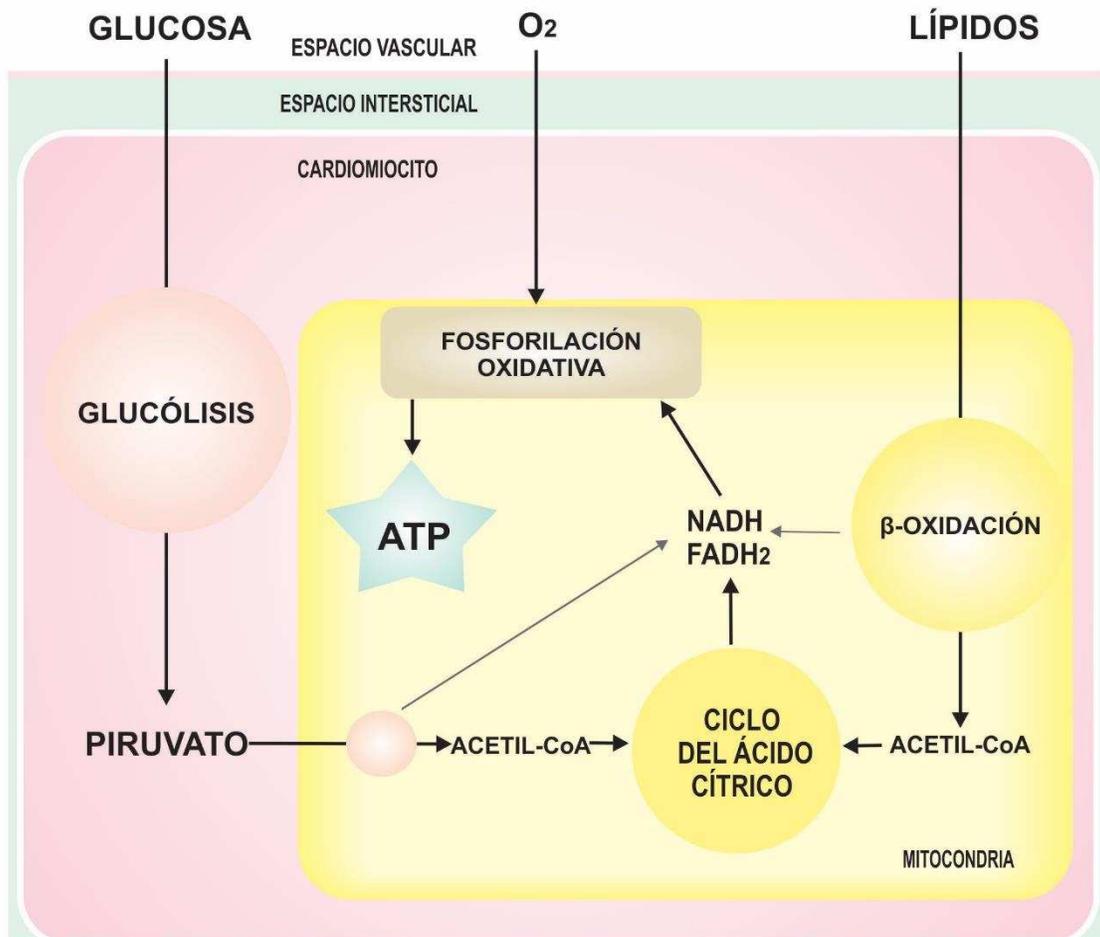
Las células musculares cardíacas (cardiomiocitos), en respuesta al estímulo nervioso, abren los canales de calcio (Ca^{+2}) tipo-L dependientes de voltaje de la membrana plasmática, permitiendo el ingreso de Ca^{+2} , el cual se une a receptores del retículo sarcoplasmático resultando en un incremento significativo de los niveles de Ca^{+2} intracelulares. En el citoplasma, el Ca^{+2} se une a la troponina C induciendo cambios conformacionales de proteínas contráctiles reguladoras permitiendo el desplazamiento de los filamentos de miosina a través de los filamentos de actina. La disociación de la interacción actina-miosina necesaria para una nueva contracción y la recaptación del Ca^{+2} citoplasmático por el retículo sarcoplasmático (mediante una proteína ATPasa- Ca^{+2} , SERCA2a) requiere la hidrólisis de grupos fosfatos de alta energía de las moléculas de adenosina trifosfato (ATP) (Guyton y Hall, 2006; Pappano y Weir, 2013). Por lo tanto, para realizar su función contráctil, el músculo cardíaco requiere grandes cantidades de ATP.

En condiciones fisiológicas normales, la energía para la síntesis de ATP se obtiene principalmente del catabolismo de los ácidos grasos y el piruvato, este último deriva de la oxidación de la glucosa, y en ciertas condiciones en menor medida, puede utilizar cuerpos cetónicos y algunos aminoácidos. La oxidación de los ácidos grasos (β -oxidación mitocondrial) y de la glucosa resultan en la formación de acetil-coenzima A (acetil-CoA), el cual ingresa al ciclo del ácido cítrico (ciclo de Krebs) generando 2 moléculas de dióxido de carbono (CO_2), 3 moléculas de nicotina adenina dinucleótido reducida (NADH) y 1 molécula de flavina adenina dinucleótido reducida (FADH_2) por cada ciclo. Estos últimos son oxidados a través de la cadena de transporte de electrones localizada en la membrana mitocondrial interna, reduciendo el oxígeno molecular (O_2) a agua (H_2O) y produciendo un gradiente electroquímico de protones (H^+) entre el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. Finalmente, el complejo sintasa de ATP (F_1F_0 ATPasa) convierte el gradiente electroquímico en fuerza protón motriz generando ATP, proceso conocido como fosforilación oxidativa

(Figura 1). En la mitocondria, el ATP es desfosforilado mediante la enzima creatina quinasa transfiriendo el grupo fosfato de alta energía a la creatina, formando creatina fosfato (creatina-P), la cual difunde fácilmente hacia el citosol, donde la creatina quinasa citosólica produce ATP a partir de creatina-P y adenosina difosfato (ADP).

El músculo cardíaco adapta su metabolismo en función de la demanda energética. En condiciones donde el trabajo cardíaco es mínimo (reposo), opera a aproximadamente un 15-25 % de su capacidad oxidativa máxima. Frente al aumento del trabajo cardíaco, incrementan todos los componentes del sistema, la oxidación de sustratos carbonados, la producción de NADH y FADH₂, el flujo a través de la cadena de transporte de electrones, el consumo de oxígeno y finalmente la fosforilación oxidativa, lo que garantiza niveles de ATP, ADP y creatina-P constantes (Stanley y col., 2005).

Figura 1 Generalidades del metabolismo del músculo cardíaco



Metabolismo de los ácidos grasos

Los ácidos grasos son un importante sustrato energético para el corazón, y debido a que los cardiomiocitos no poseen la capacidad de sintetizar ácidos grasos *de novo*, éstos son obtenidos de la circulación sanguínea coronaria, donde se encuentran en forma de ácidos grasos libres (AGL) -provenientes de la lipólisis del tejido adiposo- unidos a la albumina o esterificados en triglicéridos (TG) en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones -provenientes de la secreción hepática o absorción intestinal respectivamente-. Los TG contenidos en las lipoproteínas, son hidrolizados por la lipoproteína lipasa (LPL) endotelial en el espacio vascular coronario liberando los ácidos grasos que son transportados al interior del cardiomiocito (van der Vusse y col., 1992; van der Vusse y col., 2000).

En el músculo cardíaco *in vivo*, el nivel de captación de los ácidos grasos depende principalmente de su concentración plasmática y de su posibilidad de transporte al interior celular. La mayor proporción de los ácidos grasos que ingresan al cardiomiocito (aproximadamente el 70%) requiere de la acción de proteínas transportadoras. Al presente se demostró que los cardiomiocitos expresan la proteína transportadora de ácidos grasos FATP (isoformas 1 y 6) y la proteína translocasa de ácidos grasos FAT/CD36. Además, una proteína de unión a ácidos grasos asociada a la membrana plasmática (FABPpm) facilita este proceso (van der Vusse y col., 1992; van der Vusse y col., 2000; Glatz, 2016).

El transportador FAT/CD36 juega un papel clave en la entrada de los ácidos grasos a la célula cardíaca ya que es el principal actor en la captación total de los ácidos grasos (aproximadamente del 70%). Esta proteína está constituida por 472 aminoácidos y presenta un dominio altamente glicosilado, resultando en un peso molecular aparente de aproximadamente 88 kDa. El principal mecanismo regulatorio del grado de captación de los ácidos grasos mediado por el FAT/CD36 involucra cambios a nivel de la localización celular del transportador (Lopaschuk y col., 2010; Glatz y col., 2016). Estudios *in vitro* demostraron que la insulina y la contracción inducen la translocación del FAT/CD36 contenido en endosomas intracelulares hacia la membrana sarcoplasmática (Luiken y col., 2002; van Oort y col., 2008). Además, el FAT/CD36 presenta 2 sitios de fosforilación, 4 sitios de palmitoilación y 2 sitios de ubiquitinación, indicando la existencia de posibles mecanismos de regulación post traduccional de la proteína (Chanda y col., 2016).

Una vez en el interior celular, los ácidos grasos unidos a una pequeña proteína (15 kDa) citoplasmática de unión a ácidos grasos (FABPc), son esterificados con la CoA formando acil-CoA por acción de la enzima acil-CoA sintetasa (ACS), cuya actividad enzimática requiere la energía de activación de la hidrólisis de ATP. Los acil-CoA de cadena hidrocarbonada de longitud mayor a 12 carbonos (acil-CoA de cadena larga, LC-acil-CoA) inmediatamente se unen a una proteína de unión específica (*acil-CoA binding protein*, ACBP) (Chabowski y col., 2008).

Posteriormente, los LC-acil-CoA ingresan a la mitocondria mediante un sistema de transporte de ácidos grasos dependiente de carnitina. Este sistema está compuesto por la proteína carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) localizada en la membrana mitocondrial externa, la proteína translocasa de carnitina-acilcarnitina presente en el espacio intermembrana, y la proteína carnitina palmitoiltransferasa 2 (CPT2) ubicada en la membrana mitocondrial interna. El primer paso consiste en la formación de acil-carnitina en el compartimento intermembrana, reacción catalizada por la CPT1. Luego la aciltranslocasa transporta la acilcarnitina a través de la membrana mitocondrial interna y finalmente la CPT2 convierte la acilcarnitina a acil-CoA y carnitina libre en la matriz mitocondrial (Lopaschuk y col., 1994; Lopaschuk y col., 2010).

El paso limitante de la velocidad de transporte de los LC-acil-CoA hacia la mitocondria es catalizado por la CPT1. La isoforma CPT1 tipo muscular (M-CPT1) se expresa predominantemente en los cardiomiocitos adultos y está constituida por una única cadena polipeptídica de aproximadamente 770 aa (McGarry y Brown, 1997). La actividad enzimática de la M-CPT1 es inhibida por la unión reversible de malonil-CoA en su lado citoplasmático, cuya concentración neta es producto del balance entre su formación (carboxilación del acetil-CoA por la enzima acetil-CoA carboxilasa, ACC) y degradación (descarboxilación del malonil-CoA por la enzima malonil-CoA descarboxilasa, MCD), constituyendo un mecanismo clave de regulación de la entrada de los LC-acil-CoA a la mitocondria (Lopaschuk y col., 1994; Lopaschuk y col., 2010). Además, estudios en otros tejidos demuestran que cambios en la composición de los fosfolípidos de la membrana externa mitocondrial regulan el efecto inhibitorio del malonil-CoA sobre la actividad de la

CPT1, sin embargo, este mecanismo no ha sido aún bien demostrado en corazón (Kerner y Hoppel, 2000).

Alcanzada la matriz mitocondrial los acil-CoA son oxidados mediante varios ciclos de 4 reacciones enzimáticas sucesivas catalizadas por las enzimas acil-CoA deshidrogenasa, Δ^2 -enol-CoA hidratasa, L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y tiolasa, proceso conocido como β -oxidación. Por cada ciclo, los acil-CoA son acortados en 2 carbonos resultando en 1 molécula de acetil-CoA, 1 molécula de NADH, 1 molécula de FADH₂ y 1 molécula de acil-CoA con 2 carbonos menos, el cual reingresa a otro ciclo de β -oxidación. La oxidación de los ácidos grasos insaturados requiere enzimas mitocondriales auxiliares (isomerasas y reductasas) y los ácidos grasos de cadena muy larga (de 20 a 22 carbonos) sufren β -oxidación peroxisomal, acortándose hasta 8 átomos de carbono e ingresando posteriormente a la vía de oxidación mitocondrial. Finalmente, el acetil-CoA formado entra en el ciclo del ácido cítrico, resultando en la producción de cofactores reducidos (NADH y FADH₂) y ATP (Lopaschuk y col., 1994; Lopaschuk y col., 2010).

Los cofactores reducidos, NADH y FADH₂, formados en la β -oxidación pueden reaccionar con el O₂, generando especies reactivas del oxígeno (ROS). Algunos estudios demostraron que el anión superóxido (O₂⁻) es capaz de activar proteínas desacoplantes mitocondriales (UCPs) (Lopaschuk y col., 2010; Fillmore y Lopaschuk, 2011). Estas UCPs desacoplan el metabolismo oxidativo a la generación de ATP, por extrusión de los protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz mitocondrial. En el músculo cardíaco, se expresan las isoformas UCP2 y UCP3. La UCP2 está conformada por 309 aminoácidos y presenta dominios de anclaje a membrana (Yonezawa y col., 2009). Sin embargo, el rol de las UCP 2/3 y su asociación con la β -oxidación y la generación de ROS en el músculo cardíaco aún resta esclarecerse.

Los acil-CoA que no son oxidados son esterificados con glicerol-3 fosfato (glicerol-3P), metabolito intermediario de la glucólisis, formando gotas citoplasmáticas de TG de 0,5 a 1,0 μ m de diámetro. Esta es la principal forma de reserva de ácidos grasos y, además, este constituye un mecanismo de lipoprotección, disminuyendo la concentración intracelular de acil-CoA libre y sus efectos nocivos (Guzzardi y Iozzo, 2011). Estas gotas lipídicas están constituidas por un núcleo de lípidos neutros (TG y ésteres de colesterol) rodeado de una

monocapa de fosfolípidos y colesterol junto con proteínas de la familia de las perilipinas 2, 3, 4 y 5, las cuales estabilizan las gotas y regulan la hidrólisis de los TG. Las gotas de TG se encuentran en un estado dinámico sintetizándose e hidrolizándose constantemente. La síntesis de TG ocurre mediante enzimas localizadas en la mitocondria y el retículo sarcoplasmático. El glicerol-3P, es esterificado con acil-CoA, formando ácido fosfatídico, diacilglicerol (DAG) y en última instancia TG por medio de la acción secuencial de las enzimas glicerol-3P deshidrogenasa, glicerol-3P aciltransferasa, acilglicerol-P aciltransferasa, fosfatasa de ácido fosfatídico y DAG aciltransferasa. Por otra parte, los TG son hidrolizados en tres pasos enzimáticos sucesivos llevados a cabo por lipasas (la triacilglicerol lipasa ATGL y su proteína coactivadora CGI-58, la lipasa sensible a hormona HSL y la monoacilglicerol lipasa completando la cascada lipolítica por hidrólisis del DAG y el monoacilglicerol respectivamente). La síntesis de TG incrementa frente al aumento de la disponibilidad de sustratos (acil-CoA y glicerol-3P) y el incremento de su hidrólisis ocurre frente a la disminución de la disponibilidad de éstos y al estímulo hormonal (estimulación β -adrenérgica) (van der Vusse y col., 1992; Kienesberger y col., 2013).

Además, los metabolitos intermediarios de la síntesis y degradación de los TG son sustratos para la formación de fosfolípidos y otros lípidos complejos como el DAG y fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PI2P), componentes de las membranas celulares involucrados en vías intracelulares de transducción de señales. La composición de ácidos grasos de los fosfolípidos del tejido cardíaco (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y cardiolipina) -principales constituyentes de las membranas del cardiomicito- en mamíferos, presenta variaciones tanto en la longitud de la cadena hidrocarbonada (14 a 24 carbonos), así como también en el grado de insaturación de los ácidos grasos, dependiendo, entre otros factores, de la composición de la dieta (van der Vusse y col., 1992).

Además, el DAG no solo es un intermediario de la síntesis e hidrólisis de los TG, sino que también es sintetizado como producto de la hidrólisis de fosfolípidos frente a estímulos extracelulares, cumpliendo un importante rol en la mediación de señales celulares. La estimulación de la enzima fosfolipasa C (PLC) en la membrana celular, resulta en la formación de DAG, el cual se une activando a proteínas quinasas C (PKC), siendo las

isoformas β II y ϵ las quinasas mejor caracterizadas en músculo cardíaco (Ferreira y col., 2011).

Además, una parte cuantitativamente menor de los acil-CoA son utilizados para la síntesis de derivados lipídicos bioactivos del tipo eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos) y esfingolípidos (ej. ceramidas) (van der Vusse y col., 1992).

Metabolismo de la glucosa

La glucosa constituye otro importante sustrato energético para el músculo cardíaco. El primer paso de su metabolización es el ingreso del monosacárido al cardiomiocito por transporte facilitado mediado por los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4. En el corazón *in vivo* a concentraciones fisiológicas de glucosa, el GLUT4 es el principal determinante del grado de captación de glucosa, ya que, en comparación con el GLUT1, se expresa en una proporción 4 veces mayor y posee una mayor constante de afinidad por la glucosa (Stanley y col., 1997a; Stanley y col., 2005).

El GLUT4 es una proteína integral de membrana de 509 aminoácidos y presenta un sitio de *N*-glicosilación. La cantidad de transportadores GLUT4 en la membrana sarcoplasmática está regulada principalmente por inducción de la fusión de los endosomas intracelulares conteniendo GLUT4 con la membrana plasmática. Fisiológicamente, la insulina y la contracción son los estímulos más relevantes (Stanley y col., 1997a; Montessuit y Lerch, 2013; Mueckler y Thorens, 2013).

Una vez en el interior celular, la glucosa es fosforilada a glucosa-6 fosfato (glucosa-6P), reacción catalizada por una quinasa de hexosas (hexoquinasa, HQ) utilizando ATP. En el cardiomiocito se expresan las isoformas 1 y 2, cuya actividad depende de la concentración de sustratos (glucosa y ATP). La glucosa-6P resultante ingresa a la vía de la glucólisis. El catabolismo de 1 molécula de glucosa, llevado a cabo por enzimas citosólicas, culmina en la formación de 2 moléculas de piruvato y 2 moléculas de ATP. El paso limitante del flujo de glucosa a través de la vía glucolítica está constituido por la enzima fosfofructoquinasa 1 (PFK-1) la cual cataliza la conversión de fructosa-6P a fructosa-1,6biP. El principal regulador positivo de la actividad PFK-1 es la concentración de fructosa-2,6biP. Este metabolito se forma por fosforilación en la posición 2 de la fructosa-6P por la enzima bifuncional fosfofructoquinasa 2/fructosa-2,6 bifosfatasa (PFK-2). A su vez, la PFK-2 es regulada covalentemente frente al estímulo de la insulina, lo cual induce su fosforilación, incrementando los niveles de fructosa-2,6biP, estimulando la glucólisis. Además, la PFK-1 es regulada negativamente por el citrato (Stanley y col., 1997a; Stanley y col., 2005).

El piruvato resultante de la vía glucolítica ingresa a la mitocondria, transporte facilitado por la proteína transportadora de piruvato (*mitochondrial carrier piruvate*, MCP) localizada en la membrana mitocondrial interna. Una vez en la matriz mitocondrial, el piruvato es descarboxilado a acetil-CoA mediante el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa (PDHc). Este complejo está conformado por múltiples copias de 3 componentes enzimáticos, el E1 (piruvato deshidrogenasa), el E2 (dihidrolipoamida acetiltransferasa) y el E3 (dihidrolipoamida deshidrogenasa). La actividad del PDHc requiere de la presencia de CoA, NAD⁺, FAD⁺, ácido lipoico y tiamina pirofosfato. Finalmente, el acetil-CoA formado ingresa al ciclo del ácido cítrico.

La descarboxilación oxidativa del piruvato a acetil-CoA es un paso enzimático altamente regulado. Mientras que el flujo neto a través del PDHc *in vivo* está determinado por la concentración de sustratos y productos de la reacción en la matriz mitocondrial, su máxima actividad está dada por la cantidad neta de la forma activa de la enzima, lo cual es resultado del balance entre su fosforilación (inactivación) y desfosforilación (activación). El PDHc es fosforilado en 3 residuos de serina mediante la enzima PDH quinasa (PDK) asociada al complejo, y desfosforilado por una proteína fosfatasa específica (PDH fosfatasa). En músculo cardíaco, se expresa predominantemente la isoforma 4 de la PDK (PDK4). El incremento de las relaciones NADH/NAD⁺ y acetil-CoA/CoA en la matriz mitocondrial inducen la actividad de la PDK4 promoviendo la inactivación del PDHc. Además, la expresión de la PDK4 es regulada a nivel transcripcional (Stanley y col., 1997a; Stanley y col., 2005; Sugden y Holness, 2006; Sun y col., 2015).

La glucosa-6P que no ingresa a la vía glucolítica puede almacenarse bajo la forma de glucógeno (vía no oxidativa de la glucosa) en reservas citoplasmáticas. Además, una parte cuantitativamente menor de la glucosa-6P ingresa a la vía de síntesis de pentosas fosfato y hexosaminas. En comparación con el músculo esquelético, las reservas de glucógeno del cardiomiocito presentan un tamaño relativamente pequeño. La concentración de glucógeno incrementa cuando el suministro de glucosa es elevado, ya que la glucosa-6P induce la síntesis de glucógeno por activación alostérica de la glucógeno sintasa (GS) (Mora y col., 2005; Stanley y col., 2005).

Interrelación del metabolismo de los lípidos y la glucosa

El corazón adulto, en condiciones fisiológicas normales, adapta su metabolismo en función del estado nutricional (alimentación, ayuno). En este proceso adaptativo, los principales moduladores del metabolismo cardíaco son **(1)** la disponibilidad de ácidos grasos y **(2)** los niveles de insulina.

Durante el estado de alimentación (estado post prandial) la secreción de insulina por el páncreas estimula la captación y utilización de glucosa por el corazón. En estas condiciones, la oxidación de glucosa provee la mayor proporción de energía para la síntesis de ATP (60-70%). En condiciones de ayuno moderado (estado basal) la disminución de los niveles plasmáticos de insulina incrementa la lipólisis del tejido adiposo y consecuentemente los niveles de ácidos grasos circulantes. En estas condiciones, los ácidos grasos constituyen el principal combustible energético para el corazón (60-70% del ATP). La adaptación del músculo cardíaco a este cambio en la utilización de los sustratos energéticos (lípidos-glucosa) involucra la regulación a nivel de la localización subcelular, alostérica, covalente y/o de la expresión génica de proteínas transportadoras y enzimas claves del metabolismo (Stanley y col., 1997b; Opie, 2014; van Bilsen, 2015; DeFronzo y Ferrannini, 2016).

(1) Frente al aumento de la disponibilidad de ácidos grasos, aumenta la utilización de este sustrato por el músculo cardíaco, inhibiéndose la utilización de glucosa, lo cual fue originalmente descrito por Randle y col. (Garland y col., 1962; Randle y col., 1963; Randle y col., 1964; Randle y col., 1988). El mecanismo regulatorio más relevante involucrado en este proceso, ocurre a nivel de la inhibición de la oxidación del piruvato producto de la glucólisis mediante inactivación (fosforilación) del PDHc. El incremento de la β -oxidación de los ácidos grasos resulta en un aumento de la relación acetil-CoA/CoA y NADH/NAD⁺ en la matriz mitocondrial, lo cual mediante regulación alostérica promueve la activación de la PDK4 y subsiguiente fosforilación e inhibición del PDHc. Esto fue originalmente demostrado en ensayos *in vitro* con el PDHc purificado y en corazón aislado de roedores en condiciones de ayuno (Garland y col. 1962; Randle y col. 1988), y posteriormente confirmado por numerosos estudios (Hue y Taegtmeyer, 2009). De manera inversa, seguidamente se demostró que la disminución de la β -oxidación de los ácidos grasos resulta en un incremento de la oxidación de la glucosa. Esto fue demostrado en corazón *ex vivo*

mediante distintas estrategias, por ejemplo, mediante la inhibición directa de las enzimas de la β -oxidación (Kantor y col., 2000) y por inhibición de la MCD, lo cual conlleva a un incremento de los niveles de malonil-CoA e inhibición de la CPT1 (Dyck y col., 2004). En la misma línea, un trabajo previo de Chicco y col. (Chicco y col., 1991) en corazón aislado perfundido demostró que la adición del inhibidor de la CPT1 (POCA II, Etomoxir, etil 2-[6-(4-clorofenoxi) hexil] oxirano 2-carboxilato) al medio de perfusión disminuye la relación acetyl-CoA/CoA, incrementando la actividad del PDHc.

Otro paso regulatorio involucrado en la inhibición de la utilización de glucosa por los ácidos grasos es a nivel de la inhibición de la vía glucolítica. El incremento de la concentración de acetyl-CoA resultante de la β -oxidación mitocondrial genera citrato, el cual en el citosol (transportado por el transportador de tricarboxilato) tiene efectos inhibitorios sobre la actividad de la PFK-1, como se describió anteriormente. Además, frente a altas concentraciones de AGL plasmáticos, la captación de glucosa se encuentra disminuída (Garland y col., 1963; Randle y col., 1964; Hue y Taegtmeyer, 2009).

Además de los mecanismos descriptos, en tejidos con un alto grado de oxidación mitocondrial como el músculo cardíaco, los ácidos grasos regulan su metabolismo a nivel transcripcional induciendo su catabolismo y almacenamiento mediante la activación de la isoforma α del factor de transcripción nuclear denominado receptor activado por proliferadores peroxisomales α (PPAR α). Ensayos *in vitro* demostraron que los ácidos grasos saturados (mirístico 14:0, palmítico 16:0, esteárico 18:0), monoinsaturados (oleico 18:1) y poliinsaturados (linoleico 18:2, linolenico 18:3, araquidónico 20:4 y docosahexaenoico 22:6) se unen al PPAR α activándolo, siendo los poliinsaturados los de mayor potencia (Barger y Kelly, 2000). Las moléculas derivadas del metabolismo de los ácidos grasos también actúan como ligandos naturales (Chinetti y col., 2000). La unión del ligando al PPAR α impide su degradación proteolítica dependiente de ubiquitinación, estabilizándolo (Blanquart y col., 2002). Una vez activado, el PPAR α heterodimeriza con el receptor nuclear hormonal activado por ácido 9-cis retinoico (RXR) uniéndose a elementos de respuesta al PPAR (PPRE) en la región promotora de los genes blanco, reclutando acetiltransferasas de histonas e incrementando su transcripción génica. El PPAR α interacciona con proteínas co-activadoras entre las que se encuentran el SRC-1 (*steroid receptor co-activator*), la

CBP/p300 (*PPAR-interacting protein*) y el co-activador 1 α del PPAR γ (PGC-1 α). El PGC-1 α es el mejor caracterizado en músculo cardíaco y su expresión es controlada por estímulos que promueven el metabolismo oxidativo (ej.: ayuno, ejercicio) (Finck, 2007).

La **Tabla 1** resume los genes cuya expresión se encuentra regulada por el PPAR α en cardiomiocitos. En resumen, el PPAR α regula positivamente la transcripción génica de proteínas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos: captación, transporte y activación (LPL, FAT/CD36, ACS1); oxidación mitocondrial (M-CPT1, deshidrogenasa de acil-CoA de cadena media -MCAD-, larga -LCAD- y muy larga -VLCAD-, y tiolasa), y peroxisomal (acil-CoA oxidasa, ACO); proteínas mitocondriales desacoplantes (UCP2, UCP3) y de esterificación (glicerol-3P aciltransferasa, acilglicerol-3P aciltransferasa, DAG aciltransferasa). Además, el PPAR α regula la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa, induciendo la expresión de la PDK4 y regulando negativamente la expresión del GLUT4 y de la PFK-1 (Huss y Kelly, 2004; Yang y Li, 2007; Lopaschuk y col., 2010).

Estudios utilizando ratones genéticamente modificados con pérdida de la función del PPAR α (PPAR $\alpha^{-/-}$) han contribuido a esclarecer el rol clave de este receptor nuclear en la modulación del metabolismo del músculo cardíaco. El corazón de ratones PPAR $\alpha^{-/-}$ presenta una muy significativa reducción de la oxidación de ácidos grasos y un incremento significativo de la glucólisis y de la oxidación de la glucosa en comparación con ratones controles de la misma edad (Watanabe y col., 2000; Campbell y col., 2002). En concordancia, Leone y col. (Leone y col., 1999) demostraron el rol clave del PPAR α en la adaptación del metabolismo cardíaco en respuesta a períodos cortos de ayuno. Mientras que la expresión génica de enzimas de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos incrementa frente a períodos cortos de ayuno en el músculo cardíaco de ratones normales, los ratones PPAR $\alpha^{-/-}$ no exhiben este comportamiento.

Tabla 1 Enzimas y proteínas transportadoras involucradas en el metabolismo cardíaco cuyos genes son regulados transcripcionalmente por el PPAR α

VÍA METABÓLICA	PROTEÍNA
CAPTACIÓN/TRANSPORTE Y ACTIVACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS	LPL ^(a)
	FAT/CD36 ^(a; b)
	FATP1 ^(a; b; c)
	FABP ^(a; b)
	ACS1 ^(a; c)
OXIDACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS	M-CPT1 ^(a; b; c)
	MCD ^(a; b; c)
	MCAD ^(a; b; c)
	LCAD ^(a; c)
	VLCAD ^(a; c)
	L-3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa ^(b)
	Tiolasa ^(b; c)
	UCP2 ^(a; b; c)
UCP3 ^(a; b; c)	
ESTERIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS	Glicerol-3P aciltransferasa ^(b; c)
	Acilglicerol-3P aciltransferasa ^(c)
	DAG aciltransferasa ^(b; c)
TRANSPORTE/OXIDACIÓN DE LA GLUCOSA	PDK4 ^(a; b)
	GLUT4 ^(a)
	PFK-1 ^(a; c)

^(a) Huss y Kelly, 2004

^(b) Lopaschuk y col., 2010

^(c) Yang y Li, 2007

(2) Otro de los moduladores del metabolismo del músculo cardíaco es la insulina. En situaciones en que el nivel de insulina plasmática es elevado, la hormona actúa directamente sobre el músculo cardíaco induciendo la utilización de la glucosa.

El principal efecto de la hormona sobre el metabolismo del músculo cardíaco, demostrado tanto por estudios realizados *in vivo* así como también por ensayos en corazón *ex vivo* e *in vitro*, es la estimulación de la captación de glucosa. La insulina induce la translocación de las vesículas intracelulares conteniendo transportadores GLUT4 hacia la membrana plasmática. Además, la insulina estimula la glucólisis (Brownsey y col., 1997; Stanley y col., 1997a; Bertrand y col., 2008). Los mecanismos moleculares involucrados en la vía de transducción de señales de la insulina en cardiomiocitos y sus efectos sobre la captación de glucosa y la glucólisis se describen a continuación.

Los cardiomiocitos expresan la isoforma β del receptor de insulina (IR). Este receptor pertenece a la superfamilia de receptores transmembrana con actividad tirosina quinasa intrínseca. La unión de la insulina al receptor produce la autofosforilación en residuos tirosina en los dominios intracelulares β del IR. Una vez activado el IR, fosforila sustratos intracelulares activándolos, entre los que se encuentran la proteína Shc, la cual activa la vía de transducción de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) -principal vía de regulación del crecimiento celular y diferenciación-; y la familia de proteínas sustratos del receptor de insulina (IRS), la cual activa la vía de transducción de señales de la fosfoinositol-3 quinasa (PI3K) -principal vía de regulación del metabolismo-. Esta última vía de señalización comienza con la fosforilación de la isoforma IRS1 (proteína de 185 kDa) en múltiples residuos de tirosina, resultando en dominios proteicos de reconocimiento para proteínas con homología a la proteína Src del tipo 2 (SH2), uniéndose a la subunidad reguladora p85 de la PI3K (serina/treonina quinasa), activando alostericamente a la subunidad catalítica p110 de la quinasa, la cual fosforila al PI2P generando fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfato (PI3P). Posteriormente, el PI3P se une a una proteína quinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos (PDK1) activándola. En cardiomiocitos, la activación de la PDK1 resulta en:

- 1- Fosforilación y activación de la proteína serina/treonina quinasa B (PKB) también denominada akt. Una de las proteínas blanco de akt/PKB es la proteína AS160 (sustrato

de Akt de 160 kDa), lo cual directamente posibilita la fusión de las vesículas de GLUT4 con la membrana plasmática (Brownsey y col., 1997; Bertrand y col. 2008).

- 2- Fosforilación y activación de la PFK-2, lo cual induce un incremento de los niveles de fructosa-2,6biP y activación alostérica de la PFK-1, estimulando el flujo a través de la vía glucolítica (Brownsey y col., 1997; Bertrand y col., 2008).

La insulina además tiene efectos sobre el metabolismo de los lípidos en el músculo cardíaco. Indirectamente, actúa inhibiendo la lipólisis y la liberación de ácidos grasos por los adipocitos, disminuyendo la disponibilidad de este sustrato para el músculo cardíaco. Además, estudios *in vitro* demostraron que la insulina induce la translocación de los endosomas intracelulares conteniendo FAT/CD36 hacia la membrana sarcoplasmática en un proceso reversible que involucra la activación de la proteína activadora de AS160 dependiente de la cascada de señalización de akt/PKB (Luiken y col., 2002; van Oort y col., 2008). Sin embargo, la relevancia de este mecanismo *in vivo* aún resta esclarecerse.

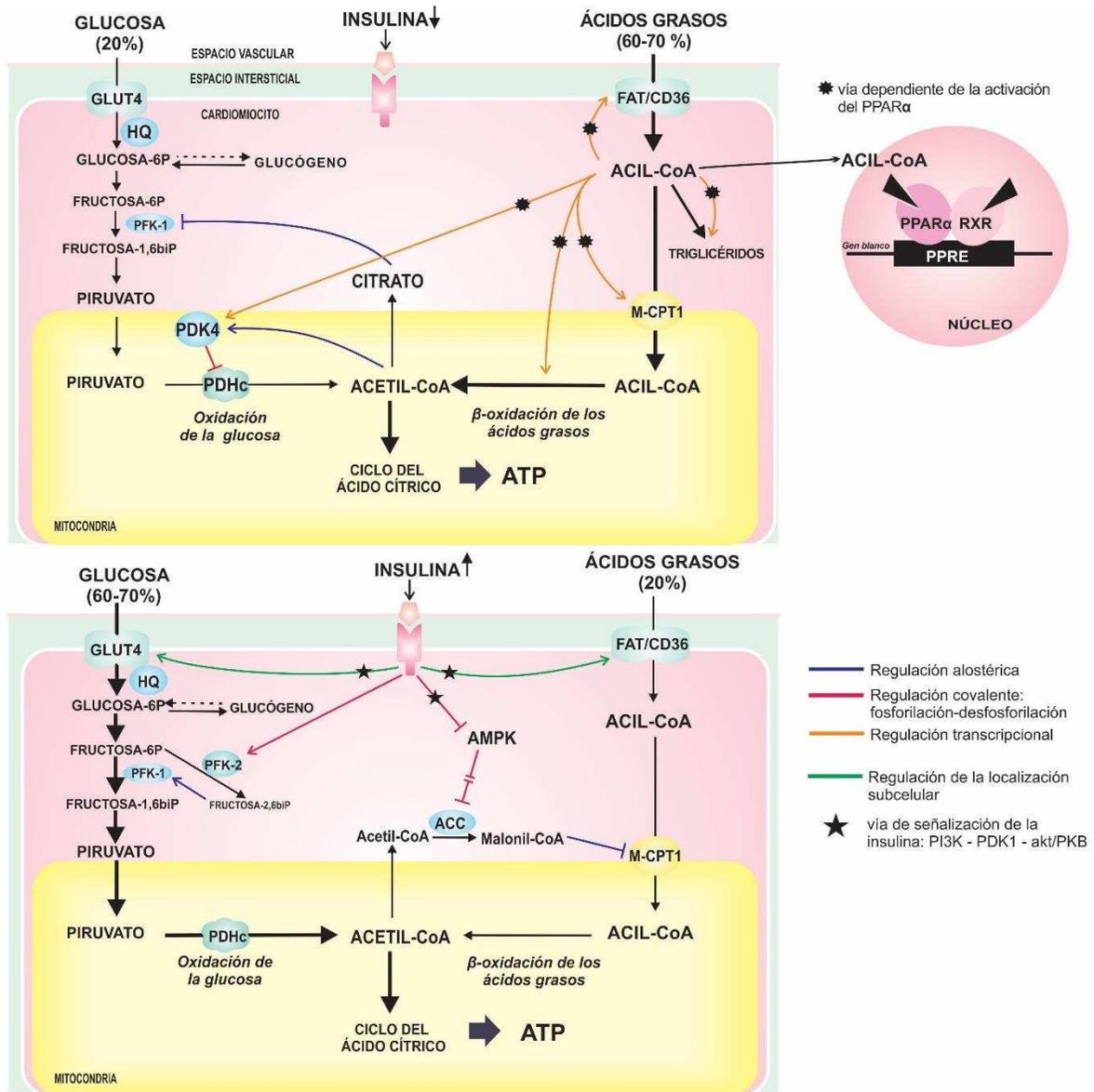
Además de los efectos moduladores de los ácidos grasos y de la insulina sobre el metabolismo cardíaco, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) tiene un rol fundamental al respecto. La AMPK es una proteína quinasa conformada por una subunidad catalítica α y dos subunidades regulatorias β y γ . Su actividad quinasa depende de su activación por fosforilación en el residuo treonina 172 (Thr172) de la subunidad α , lo cual depende de la acción de proteínas quinasas de la AMPK (AMPKK) y del efecto inhibitorio de la unión del AMP en la subunidad γ . La función principal de la AMPK es de sensor del estado energético celular, encontrándose inactiva en condiciones fisiológicas normales, y activándose frente a la disminución del estado energético celular (aumento de la relación entre los niveles de AMP/ATP y creatina/creatina-P). La AMPK activa actúa fosforilando proteínas involucradas en la captación y el catabolismo de los sustratos energéticos (lípidos-glucosa). La activación de la AMPK estimula el transporte de la glucosa -induciendo la translocación del GLUT4 al sarcolema- y la glucólisis -por activación de la PFK-2-. Además, la activación de la AMPK estimula la captación de los ácidos grasos -induciendo la translocación del FAT/CD36 al sarcolema- y su oxidación -regulando los niveles de malonil-CoA, inhibidor alosterico de la M-CPT1-. Respecto a esto último, la AMPK fosforila inhibiendo a la acetil-CoA carboxilasa (ACC), quien carboxila al acetil-CoA produciendo malonil-CoA. De esta manera la

activación de la AMPK resulta en una disminución de los niveles de malonil-CoA induciendo la oxidación de los ácidos grasos en la mitocondria (Dyck y Lopaschuk, 2006; Young y Zaha, 2012).

Si bien el principal inductor de la activación de la AMPK es la disminución de los niveles de ATP, se ha reportado que otros estímulos inhiben/inducen su activación en el músculo cardíaco, entre ellos la insulina. Ensayos en corazón *ex vivo* demostraron los efectos inhibitorios de la insulina sobre la activación de la AMPK en condiciones normales de AMP/ATP y creatina/creatina-P, en un proceso dependiente de la activación de akt/PKB. Akt/PKB fosforila a la AMPK en residuos de serina 485 y 491 impidiendo la fosforilación del residuo Thr172 inhibiendo su activación. En estas circunstancias se impide el efecto inhibitorio de la AMPK sobre su enzima blanco ACC, incrementándose los niveles de malonil-CoA e inhibiendo la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria (Gamble y Lopaschuk, 1997; Beauloye y col., 2001; Kovacic y col., 2003). Estos ensayos sugieren un posible mecanismo por el cual la insulina, la cual promueve la utilización de la glucosa por el músculo cardíaco, disminuye la oxidación de los ácidos grasos.

El conjunto de los mecanismos descriptos se esquematiza en la **Figura 2**

Figura 2 Interrelación del metabolismo de los lípidos y de la glucosa en el músculo cardíaco



Alteraciones del metabolismo del músculo cardíaco

Como se describió anteriormente, el músculo cardíaco adapta su metabolismo en función de la disponibilidad de sustratos (lípidos, glucosa) y del nivel de insulina en el plasma. La exposición crónica del corazón a elevados niveles de lípidos plasmáticos, dislipemia, y/o niveles alterados de insulina o insulino resistencia resulta en un proceso maladaptativo evidenciado por daño y/o disfunción cardíaca. El desarrollo de estas alteraciones y la relación entre ellas han sido estudiadas utilizando modelos animales genéticos de diabetes y obesidad y ratones con modificaciones genéticas específicas de proteínas con funciones claves en el metabolismo cardíaco (**Tabla 2**).

Al respecto, Zhou y col. (Zhou y col., 2000) demostraron que en ratas Zucker diabéticas y obesas (ZDF), la dislipemia y resistencia insulínica se encuentran asociadas a un incremento del contenido de TG y ceramidas en el corazón y una disminución significativa de la función contráctil. Más aún, estos investigadores demostraron que la normalización de la dislipemia por la administración de troglitazona, disminuye el contenido de lípidos restaurando la función contráctil.

Otros autores (Belke y col., 2000; Buchanan y col. 2005; How y col., 2006; How y col., 2007) utilizando un modelo murino de diabetes tipo 2 (db/db) caracterizado por la presencia de dislipemia y resistencia insulínica observaron que el corazón aislado perfundido de estos animales presenta un incremento de la oxidación de los ácidos grasos y una disminución de la oxidación de la glucosa. Esto se acompaña de un incremento del consumo de oxígeno, de una disminución de la eficiencia cardíaca y de disfunción contráctil. Además, las alteraciones metabólicas preceden a la disfunción ventricular contráctil (Buchanan y col., 2005). El estudio realizado por Belke y col. (Belke y col., 2000) contribuyó a esclarecer el rol causal de las alteraciones metabólicas sobre el daño y la disfunción cardíaca. Utilizando ratones db/db y con sobre-expresión del transportador de glucosa GLUT4, observaron que el corazón aislado de estos ratones presenta una restauración de la alterada utilización de la glucosa y del palmitato mejorando la función contráctil, en comparación con los animales controles.

En la misma línea, los corazones aislados de ratones obesos (ob/ob) dislipémicos insulino resistentes presentan un incremento de la oxidación de los ácidos grasos a expensas de la

oxidación de la glucosa. Esto se acompaña del incremento del consumo de oxígeno, la disminución de la eficiencia cardíaca y disfunción cardíaca (Mazumder y col., 2004; Buchanan y col., 2005). Mas aún, el estudio realizado por Mazumder y col. (Mazumder y col., 2004) demostró que este comportamiento resulta independiente de la administración de insulina al medio de perfusión, indicando la incapacidad del músculo cardíaco de modular la utilización de sustratos en respuesta al estímulo de la hormona.

Otros estudios utilizando animales genéticamente modificados con sobre-expresión cardíaca de proteínas involucradas en la hidrólisis de lipoproteínas (LPL), transporte (FATP1) y activación (ACS1) de los ácidos grasos, contribuyeron a esclarecer los efectos del incremento de estas vías metabólicas sobre el músculo cardíaco y su función. El aumento de la LPL, la FATP1 y la ACS1 resulta en fenotipos cardíacos caracterizados por un incremento de la acumulación (TG, ácidos grasos y/o ceramidas) y oxidación de lípidos. Esto se asocia con hipertrofia, apoptosis y fibrosis del ventrículo izquierdo con alteración y/o deterioro de la función contráctil (Chiu y col., 2001; Chiu y col., 2005; Yagyu y col. 2003).

Fink y col. (Fink y col., 2002) desarrollaron un modelo murino con sobre-expresión del PPAR α del músculo cardíaco (C57BL/6 MHC-PPAR α). El corazón de estos animales presenta un incremento de la oxidación de los ácidos grasos, una disminución de la utilización de la glucosa y acumulación de TG, asociado a hipertrofia del ventrículo izquierdo y disfunción sistólica. Autores del mismo grupo utilizando el mismo modelo experimental pero adicionado a una deficiencia del FAT/CD36 (C57BL/6 MHC-PPAR α /CD36 $^{-/-}$) observaron una restauración del alterado metabolismo de los sustratos y de la función cardíaca en el corazón perfundido (Yang y col., 2007).

En conjunto, estos estudios demuestran que las condiciones de dislipemia y resistencia insulínica se asocian estrechamente con el incremento intracelular de lípidos y la alteración en la utilización de sustratos (lípidos-glucosa) por el músculo cardíaco. Además, la mejora de las alteraciones metabólicas impide o revierte el daño y/o la disfunción cardíaca, demostrando el rol causal de estas alteraciones sobre ellos.

Tabla 2 Alteraciones del metabolismo del músculo cardíaco en modelos animales experimentales

MODELO EXPERIMENTAL	CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS GENERALES	ALTERACIONES DEL METABOLISMO CARDÍACO	DAÑO/DISFUNCIÓN CARDÍACA	REFERENCIAS
Ratas ZDF	↑ Glucemia ↑ Insulinemia ↑ Lípidos plasmáticos	↑ TG ↑ Ceramidas	↓ Función contráctil cardíaca	Zhou y col., 1999
Ratas ZDF+Troglitazona	↔ Glucemia ↔ Insulinemia ↔ Lípidos plasmáticos	↓ TG ↔ Ceramidas	↔ Función contráctil cardíaca	
Ratones db/db	↑ Glucemia ↑ Insulinemia ↑ Lípidos plasmáticos	↑ Oxidación de AG ↓ Oxidación de glucosa	↓ Función contractil y de relajación cardíaca	Belke y col., 2000
Ratones db/db+GLUT4	↑ Glucemia ↑ Insulinemia ↑ Lípidos plasmáticos	↔ Oxidación de AG ↔ Oxidación de glucosa	↔ Función contráctil y de relajación cardíaca	
Ratones db/db	↑ Glucemia ↑ Insulinemia ↑ Lípidos plasmáticos	↑ Oxidación de AG ↓ Oxidación de glucosa	↓ Función contráctil cardíaca	Buchanan y col., 2005
Ratones db/db	↑ Glucemia ↑ Insulinemia ↑ Lípidos plasmáticos	↑ Oxidación de AG ↓ Oxidación de glucosa	↓ Eficiencia cardíaca	How y col., 2006 How y col., 2007
Ratones ob/ob	↑ Glucemia ↑ Insulinemia ↑ Lípidos plasmáticos	↑ TG ↑ Oxidación de AG ↓ Oxidación de glucosa ↓ Sensibilidad insulínica	↓ Eficiencia cardíaca	Mazumder y col., 2004
Ratones ob/ob	↑ Glucemia ↑ Insulinemia ↑ Lípidos plasmáticos	↑ Oxidación de AG ↓ Oxidación de glucosa	↓ Función contráctil cardíaca	Buchanan y col., 2005

<i>Continuación de la Tabla 2</i>			
Ratones MHC-ACS1	↑ Oxidación de AG ↑ TG ↑ Ceramidas	Hipertrofia y fibrosis del ventrículo izquierdo ↓ Función contráctil cardíaca Alteración de la estructura de los cardiomiocitos ↓ Función contráctil cardíaca	Chiu y col., 2001
Ratones MHC-LPL	↑ Captación de TG	Hipertrofia de los cardiomiocitos	Yagyu y col., 2003
Ratones MHC-FATP1	↑ Captación de AG ↑ Oxidación de AG ↑ AG	↑ Masa del ventrículo izquierdo ↓ Función de relajación cardíaca	Chiu y col., 2005
Ratones MHC-PPAR α	↑ Oxidación de AG ↓ Oxidación de glucosa ↑ TG	Hipertrofia ventricular ↓ Función contráctil cardíaca	Fink y col., 2002
Ratones MHC-PPAR α +FAT/CD36 $^{-/-}$	↔ Oxidación de AG ↔ Oxidación de glucosa ↔ TG	↔ Hipertrofia ventricular ↔ Función contráctil cardíaca	Yang y col., 2007

↑ Aumento, ↓ Disminución, ↔ Normalización; AG, ácidos grasos; TG, triglicéridos

Modelo experimental nutricional de dislipemia y resistencia insulínica: modelo de dieta rica en sacarosa (DRS)

Como se expuso previamente, el cambio de los hábitos dietarios durante los últimos años han tenido un rol preponderante sobre la alta incidencia de las ECV. En particular, el efecto nocivo de regímenes dietarios ricos en carbohidratos simples (incorporados a la dieta principalmente en forma de sacarosa y jarabe de alta concentración de fructosa) y grasas saturadas sobre el desarrollo de las anormalidades metabólicas presentes en el SM, factor de riesgo multifactorial de ECV, fue reportado por numerosos estudios clínicos y epidemiológicos (Johnson y col., 2009; Hu y Malik, 2012; Kelishadi y col., 2014; Sacks y col., 2017).

De modo similar, muchas de las alteraciones bioquímicas-metabólicas presentes en el SM en humanos pueden inducirse nutricionalmente en ratas/ratones normales mediante la administración de dietas ricas en carbohidratos simples (fructosa/sacarosa) y/o grasa. Estos constituyen modelos experimentales útiles para el estudio de las alteraciones-bioquímicas metabólicas del músculo cardíaco desarrolladas en este contexto.

Numerosos estudios a nivel experimental demostraron que la administración de una dieta rica en sacarosa (DRS) induce dislipidemia (aumento de TG y AGL) y alteración en la homeostasis de la glucosa. Esto se acompaña de lipotoxicidad (acumulación de lípidos en tejidos no adiposos) y disminución de la sensibilidad insulínica en hígado y tejidos periféricos (ej. músculo esquelético, tejido adiposo). Además, se observa hipertensión y un estado pro-oxidativo sistémico (Cohen y col., 1972; Reaven y col., 1979; Storlien y col., 1988; Reaven y Ho, 1991; Vrana y col., 1993; Pagliassotti y col., 1994; Pagliassotti y col., 1996, Busserolles y col., 2002a).

Más aún, estudios realizados por nuestro grupo demostraron que la presencia y/o magnitud de las alteraciones mencionadas varían en función del tiempo de administración de la dieta. Como se observa en la **Figura 3**, el perfil metabólico-hormonal plasmático de ratas machos Wistar (adultos jóvenes) alimentadas con una DRS (sacarosa: 60% de energía), está constituido por 3 períodos bien definidos, identificados como período de inducción (3 a 5 semanas de ingesta); período de adaptación (6 a 8 semanas de ingesta); y período de

recurrencia (12 a 15 semanas), esté período continúa al menos hasta las 40 semanas de ingesta. La dislipemia e hiperinsulinemia presentes en el período de inducción se normalizan en el período de adaptación sin cambios en los niveles de glucemia. Sin embargo, cuando la administración de la DRS se prolonga por un período de 12 a 15 semanas se constata un incremento de los niveles de TG y AGL plasmáticos, a valores incluso superiores a los observados en el período de inducción, acompañado de una moderada hiperglucemia y normoinsulinemia. Un estado estacionario de los parámetros anteriormente mencionados se observa cuando la ingesta se prolonga hasta las 40 semanas, asociado a un ligero incremento del peso corporal (~15-20%) y adiposidad visceral. Los cambios en el perfil metabólico-hormonal se encuentran además acompañados de una disminución de la sensibilidad insulínica periférica global luego de 3 a 5 semanas de ingesta de la DRS y continúa deteriorándose con la cronicidad de la ingesta (Gutman y col., 1987; Chicco y col., 1994; Bernal y col., 1995; Lombardo y col., 1996; Chicco y col., 1999; Chicco y col., 2000; Chicco y col., 2003).

Los cambios descriptos se acompañan de alteraciones metabólicas y funcionales en tejidos claves (hígado, tejido adiposo, páncreas y músculo esquelético) involucrados en la homeostasis de los lípidos y de la glucosa. En la **Tabla 3**, extraída y modificada de Lombardo y Chicco, 2006, se resumen las alteraciones metabólicas y/o funcionales observadas en los distintos tejidos durante el período de recurrencia. Resultados similares fueron alcanzados por otros investigadores cuando se administraron dietas ricas en sacarosa crónicamente (Cohen 1972; Reaven y col., 1979; Storlien y col., 1988; Vrana y col., 1993; Pagliassotti y col., 1994; Pagliassotti y col., 1996).

Los primeros hallazgos reportaron la asociación entre el aumento del nivel de TG plasmáticos, una mayor secreción de VLDL y una menor remoción por los tejidos periféricos (Lombardo y col., 1983; Gutman y col., 1987; Chicco y col. 1991; Bernal y col., 1995; Chicco y col., 1999; Chicco y col., 2000; Oliva y col., 2009). Esto se acompaña de esteatosis hepática, resultado del aumento de la síntesis de TG debido al incremento de las actividades de enzimas lipogénicas (ACC, sintasa de ácidos grasos FAS, glucosa-6P deshidrogenasa y enzima málica) y de los niveles de la masa proteica de factores de transcripción asociados a su expresión (elemento regulador de esteroides 1 -SREBP-1- y receptor hepático X -LXR-).

Además, la acumulación de TG hepáticos se ve favorecida por la disminución de la actividad de enzimas y factores de transcripción asociados a la oxidación de ácidos grasos (ej. actividades de las enzimas CPT1 y oxidasa de ácidos grasos -FAO-, y masa proteica del PPAR α) (Hein y col., 2010; Rossi y col., 2013; Oliva y col., 2015). Este incremento del nivel de lípidos en tejido hepático induce un deterioro en metabolismo de la glucosa y en la vía de señalización de la insulina (Hein y col., 2012).

El tejido adiposo visceral es clave en el desarrollo de las alteraciones presentes en este modelo experimental. La hipertrofia de los adipocitos del tejido adiposo epididimal es la consecuencia de una mayor actividad de las enzimas lipogénicas y de la LPL, lo que conduce a un incremento del contenido intracelular de TG. En este contexto, los adipocitos aislados presentan aumento de la lipólisis basal y estimulada por el isoprotenerol y una disminución de la sensibilidad a la acción de la insulina. Esto explicaría la disminución de la captación de glucosa estimulada por la hormona observada en este tejido y la mayor disponibilidad de AGL plasmáticos característica del modelo (Soria y col., 2002; Rossi y col., 2005; Rossi y col., 2010). Además, la disfunción del tejido adiposo epididimal se acompaña de alteraciones de los niveles plasmáticos de adipocitoquinas (leptina y adiponectina) (Rossi y col., 2005; Selenscig y col., 2010; D`Alessandro y col., 2015) y de estrés oxidativo (D`Alessandro y col., 2015).

En este contexto, la acumulación de TG en el músculo esquelético, principal tejido blanco a la acción insulínica, induce un deterioro del metabolismo de la glucosa basal y estimulado por la hormona (D`Alessandro y col., 2000; Chicco y col., 2003; Oliva y col. 2009; Oliva y col., 2015) explicando la resistencia insulínica periférica global observada en este modelo. De modo similar, la exposición del páncreas a altos niveles de lípidos plasmáticos conlleva a un incremento del contenido de TG, lo cual se haya estrechamente asociado al deterioro de la funcionalidad de la célula β , evidenciada por la alteración en el patrón bifásico de secreción de insulina estimulada por la glucosa (Chicco y col., 2003; Pighin y col., 2003; Ferreira y col., 2010).

De modo similar a los cambios que sufren otros tejidos, el músculo cardiaco es afectado por el contexto metabólico-hormonal inducido por la ingesta crónica de una DRS previamente descrito. Los primeros hallazgos reportaron la acumulación de lípidos (en forma de TG) en

el músculo cardíaco (Lombardo y col., 1983; Costamagna y col., 1998). Chicco y col. (Chicco y col., 1994) observaron que el aumento del contenido de TG se acompaña de un incremento de la relación acetil-CoA/CoA y del contenido de citrato y de la disminución de la forma activa del complejo PDH (PDHa). La perfusión del corazón aislado de estos animales con un medio conteniendo glucosa y un inhibidor de la enzima CPT1 (POCA II) demostró que la disminución de la oxidación de la glucosa es el resultado del incremento de la utilización de ácidos grasos, manteniéndose normales los niveles de ATP, AMP, ADP, creatina y creatina-P (Chicco y col., 1991). En otro estudio, con un medio de perfusión conteniendo glucosa en concentraciones similares a las fisiológicas Montes y col. (Montes y col., 2000) demostraron que el corazón de los animales alimentados con DRS presenta una disminución de la captación de glucosa, que no se restablece por la adición de insulina al medio de perfusión, sugiriendo un estado de resistencia insulínica del músculo cardíaco.

En la misma línea, Dutta y col. (Dutta y col., 2001) utilizando ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en sacarosa (68% de energía) durante 7 semanas, demostraron que los cardiomiocitos de estos animales presentan un deterioro de la contracción y relajación *in vitro*. En un grupo paralelo de animales, la administración de metformina (500 mg/kg x día), la cual previene el desarrollo de insulino resistencia inducida por la DRS, previno la alteración de la función contráctil de las células musculares cardíacas.

De lo expuesto, las ratas alimentadas con una DRS por un período prolongado de tiempo, representan un excelente modelo experimental nutricional que se asemeja en aspectos bioquímicos-metabólicos al SM del humano. El mismo posibilita analizar y desglosar los mecanismos íntimos relacionados con las anomalías metabólicas antes descriptas y, además, evaluar los posibles efectos beneficiosos de cambios de diferentes nutrientes sobre estas alteraciones.

Figura 3 Evolución de los niveles plasmáticos de metabolitos e insulina de los animales alimentados con una dieta rica en sacarosa (DRS)

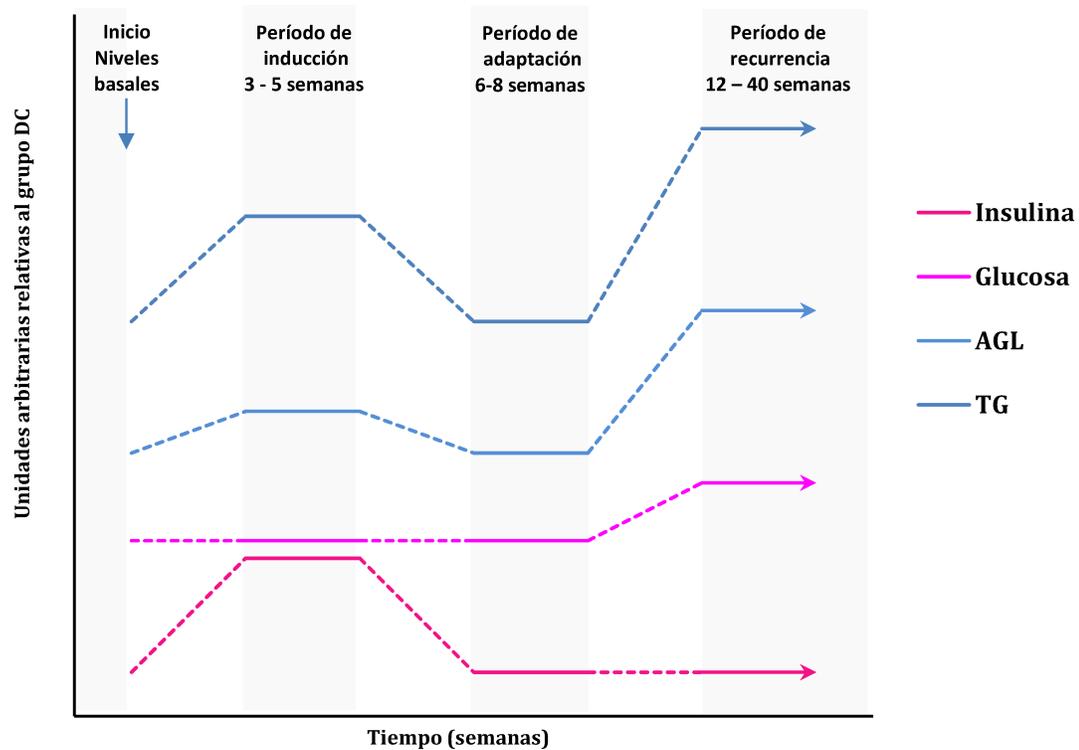


Tabla 3 Efectos de la administración crónica (3 a 6 meses) de una DRS a ratas normales*

TEJIDO	CARACTERÍSTICA	
HÍGADO	Contenido de TG	↑
	Lipogénesis	↑
	Secreción VLDL	↑
	Oxidación de ácidos grasos	↓
	Señalización de la insulina	Alterada
	Metabolismo de la glucosa	Alterado
TEJIDO ADIPOSEO	Adiposidad visceral	↑
	Tamaño celular adipocito	↑
	Contenido de TG	↑
	Lipogénesis	↑
	Lipólisis	↑
	Sensibilidad insulínica	↓
	Metabolismo de la glucosa estimulado por la insulina	↓
	Estrés oxidativo ⁽ⁱ⁾	↓
MUSCULO ESQUELÉTICO	Contenido de TG	↑
	Sensibilidad insulínica	↓
	Señalización de la insulina	↓
	Metabolismo de la glucosa basal y estimulado por la insulina	↓
PÁNCREAS	Contenido de TG	↑ (a; b; c)
	Secreción de insulina estimulada por la glucosa	Alterada (a; b; c)
MÚSCULO CARDÍACO	Lípidos	↑ (d; e; f)
	Utilización de lípidos	↑ (g)
	Captación y oxidación de la glucosa	↓ (f; g; h)
	Sensibilidad insulínica	↓ (h)

*Tabla extraída y modificada de Lombardo y Chicco, 2006

^(a)Chicco y col., 2003; ^(b)Pighin y col., 2003; ^(c)Ferreira y col., 2010; ^(d)Lombardo y col., 1983; ^(e)Costamagna y col., 1998; ^(f)Chicco y col., 1994; ^(g)Chicco y col., 1991; ^(h)Montes y col., 2000; ⁽ⁱ⁾D'Alessandro y col., 2015.

↑ Aumento, ↓ disminución respecto al grupo control

Estrategias nutricionales para prevenir/revertir la dislipemia y resistencia insulínica

Existe un amplio consenso, basado en numerosas evidencias epidemiológicas, clínicas y experimentales, respecto al efecto beneficioso de la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) del tipo n-3, ácido eicosapentaenoico 20:5, n-3 (EPA) y docosahexaenoico 22:6, n-3 (DHA) sobre los desórdenes del SM. Al respecto, se demostró que los ácidos grasos EPA y DHA impactan positivamente sobre los niveles de lípidos plasmáticos y la sensibilidad insulínica. Además, se han reportado efectos antitrombóticos, antiinflamatorios, antiarrítmicos y vasodilatadores (Kris-Etherton y col., 2002; Mozaffarian y Wu, 2011).

Los mecanismos implicados en los efectos hipolipemiantes del EPA y DHA han sido revisados y discutidos extensamente. Estudios de numerosos grupos de investigación, incluido el nuestro, basados en la administración de dietas ricas en EPA y DHA a animales de experimentación, dislipémicos insulino resistentes, indican que estos ácidos grasos actúan a nivel hepático, uniéndose y activando al PPAR α induciendo la expresión de enzimas involucradas en la oxidación mitocondrial -CPT1- y peroxisomal -FAO- de los ácidos grasos. Además, estos ácidos grasos actúan suprimiendo la expresión del SREBP-1c, factor de transcripción involucrado en la regulación de la expresión de enzimas lipogénicas. Estos mecanismos incluyen la supresión de la expresión génica y del procesamiento proteolítico del SREBP-1c. Como resultado de estos procesos, el EPA y el DHA favorecen la oxidación en detrimento de la síntesis *de novo* de los ácidos grasos y su reesterificación a TG, decreciendo el contenido de TG hepáticos y su secreción en VLDL, disminuyendo la trigliceridemia.

Por otra parte, el efecto de los ácidos grasos EPA y DHA sobre la mejora de la sensibilidad insulínica se correlaciona con la disminución de los niveles de TG en plasma y su contenido en tejido muscular esquelético ya que éstos, y sus metabolitos, interfieren en la vía de transducción de señales de la insulina en este tejido. Además, la ingesta de EPA y DHA se asocia con un incremento de PUFAs n-3 en las membranas celulares de tejidos blancos a la acción de la insulina (hígado, tejido adiposo, músculo esquelético), afectando directamente su vía de transducción de señales (Clarke, 2001; Lombardo y Chicco, 2006; Hein y col., 2012; D`Alessandro y col., 2013).

Sin embargo, la incorporación directa de EPA y DHA a la dieta implica la ingesta de peces marinos y mariscos, principales fuentes de estos ácidos grasos, lo cual constituye una importante limitación para poblaciones con limitado o escaso acceso al consumo de estos productos. Además, el consumo de peces marinos está asociado a problemas de salud a causa de la presencia de contaminantes como dioxinas, metil mercurio, bifenoles policlorados (PBC) y contaminantes orgánicos persistentes (Kris-Etherton y col. 2002). Por lo tanto, más recientemente se ha focalizado el interés en la búsqueda de fuentes dietarias alternativas de n-3 PUFAs. Al respecto, existen estudios observacionales realizados en distintas poblaciones que indican que la elevada ingesta del precursor metabólico de EPA y DHA de origen vegetal, el ácido α -linolénico (ALA) 18:3 n-3 (el cual se encuentra principalmente en granos de distintos vegetales), se haya asociado a un menor riesgo de padecer ECV (Pan y col., 2012).

Metabolismo del ácido α -linolénico (ALA)

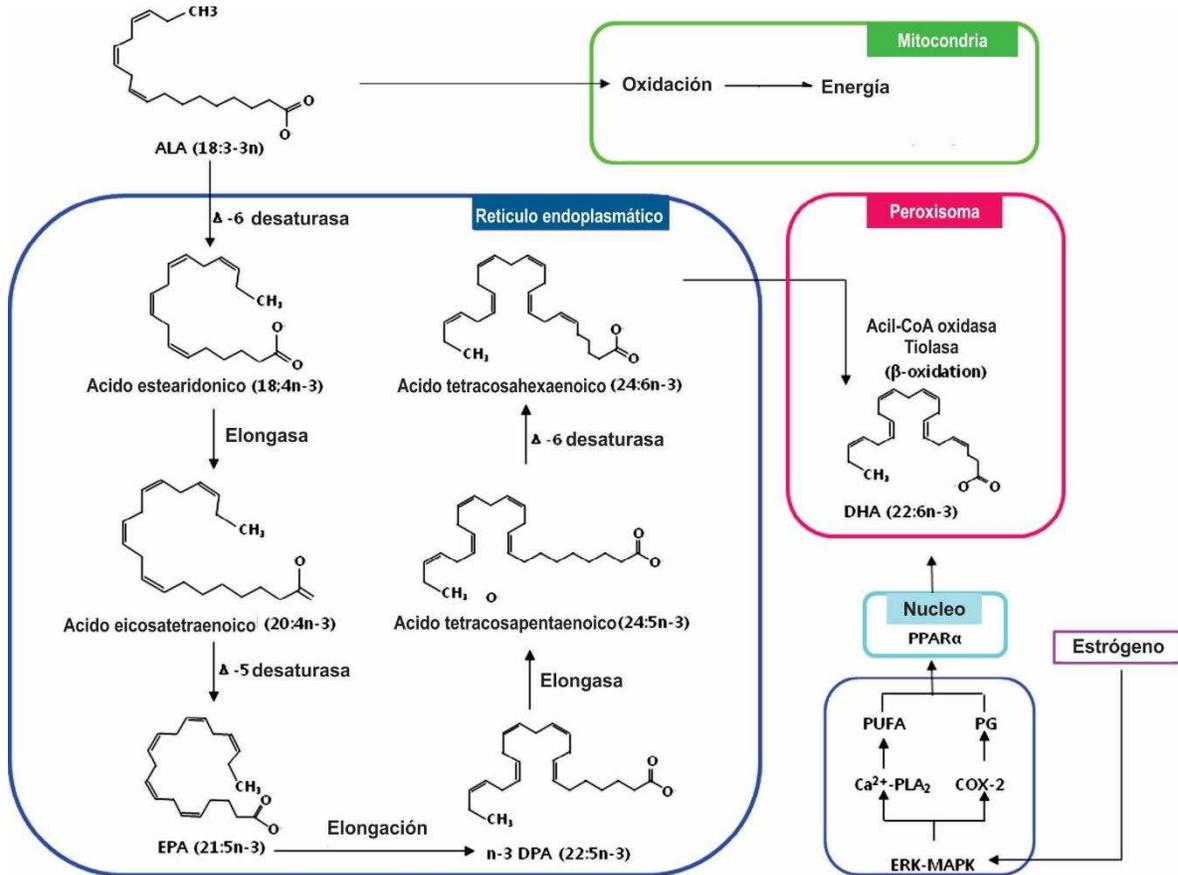
Desde el punto de vista nutricional, el ALA es un ácido graso esencial que debe incorporarse mediante la dieta, ya que el organismo humano no puede sintetizarlo. Una vez absorbido, el ALA puede almacenarse en tejido adiposo o metabolizarse en tejido hepático. En este tejido el ALA puede sufrir β -oxidación o convertirse mediante una serie de desaturaciones y elongaciones en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, principalmente EPA, ácido docosapentaenoico (DPA) 22:5 n-3 y DHA. Las reacciones ocurren en el retículo endoplasmático, a excepción del último paso, que ocurre en los peroxisomas (Barceló-Coblijn y Murphy, 2009; Kim y col., 2014). Las vías enzimáticas involucradas en el metabolismo del ALA se esquematizan en la **Figura 4**.

Tanto en humanos (individuos adultos) como en animales (ratas, hamsters, cerdos, conejos, entre otros), la administración de dietas enriquecidas con ALA produce un incremento de las concentraciones plasmáticas de ALA, EPA, DPA y en menor medida de DHA de manera dosis-dependiente. Estudios *in vivo* basados en la administración de isotopos estables del ALA (^{13}C o deuterio) demuestran que, en humanos, aproximadamente el 8% del ALA ingerido es convertido en EPA y en menor medida (6%-4%) en DPA y DHA. Además, el grado de bioconversión del ALA es mayor en mujeres que en hombres ya que los estrógenos aumentan la actividad de enzimas desaturasas y elongasas mediante la activación del PPAR α .

(Burdge y Calder, 2006; Brenna y col., 2009; Kim y col., 2014). En ratas, cuando se administra el ALA deuterado por vía oral, el 16-18 % se acumula como ALA en tejido adiposo y aproximadamente el 6% aparece como EPA y DHA en tejido hepático (Lin y Salem, 2007).

Es importante destacar que otro ácido graso poliinsaturado nutricionalmente esencial, de origen vegetal, el ácido linoléico 18:2 n-6 (LA), es convertido en ácidos grasos de cadena larga de esta familia n-6, mediante el mismo sistema enzimático de desaturación y elongación que el ALA, compitiendo por su bioconversión (Barceló-Coblijn y Murphy, 2009). Por lo tanto, la bioconversión del ALA a EPA y DHA no sólo depende de la cantidad absoluta de ALA, sino también de la relación ALA/LA.

Figura 4 Metabolismo del ALA*



*Figura extraída y modificada de Kim y col. (Kim y col., 2014)

Efectos del ALA sobre la dislipemia y la resistencia insulínica en modelos experimentales

Distintos investigadores analizaron los efectos de la administración dietaria de ALA a animales de experimentación (ratas). En la **Tabla 4** se resumen las principales características de estas intervenciones nutricionales y los resultados arrojados. Los diseños experimentales de los estudios realizados se basaron en la administración de aceites vegetales con alto contenido de ALA (aceite de lino, perrilla o chia) en reemplazo total o parcial de aceites con alto contenido de LA (girasol o maíz).

Todos los estudios son congruentes respecto a la disminución de los lípidos plasmáticos (TG, AG y/o colesterol total) cuando se incrementa el contenido de ALA en sustitución del LA, tanto en dietas controles como en dietas altas en grasa. El máximo efecto hipotrigliceridémico e hipocolesterolémico ocurre cuando se administra una relación n-6/n-3 de 0,33. Además, el efecto hipolipidémico del ALA se acompaña del incremento de PUFAs n-3 (ALA, EPA, DPA y/o DHA) en plasma y tejido hepático (Ide y col., 1996; Jeffery y col., 1996; Ihara y col., 1998; Ide y col., 2000; Kim y col., 2004; Ayerza y Coates, 2005).

Se ha demostrado que los efectos hipolipidémicos del ALA resultan de la disminución de la síntesis y el contenido de TG en hígado y su secreción. El ALA actúa aumentando la oxidación de los ácidos grasos -vía activación del PPAR α e inducción de la expresión de enzimas de la vía de oxidación de los ácidos grasos- y disminuyendo la actividad de enzimas lipogénicas -mediante la modulación del SREBP-1c- (Ide y col., 1996; Ide y col., 2000; Kim y col., 2004; Rincón-Cervera y col., 2016).

Además de los efectos del ALA sobre los niveles de lípidos plasmáticos, los hallazgos de Ghaffoorunissa y col. (Ghaffoorunissa y col., 2005) sugieren que cuando se incrementa la proporción de ALA en una dieta rica en sacarosa (54% p/p) administrada a ratas normales, la mejora de la sensibilidad insulínica se debe al incremento de la proporción de ALA, EPA, DPA y DHA en los fosfolípidos de membrana y a la disminución del contenido de TG en músculo esquelético.

En su conjunto, estos resultados sugieren que los efectos del ALA sobre el metabolismo hepático lipídico y los niveles de lípidos plasmáticos, así como sobre la sensibilidad

insulínica son similares a los del EPA y DHA, y al menos en parte, los mecanismos implicados son semejantes.

Tabla 4 Intervenciones nutricionales experimentales: efectos del ALA dietario

MODELO EXPERIMENTAL	INTERVENCIÓN	RELACIÓN n-6/n-3	DURACIÓN DE LA INTERVENCIÓN	EFFECTOS	REFERENCIAS
Ratas Sprague-Dawley 10 % p/p de grasa	aceite de maíz vs. aceite de perrilla	61,60 vs. 0,26	4 semanas	↓TG plasmáticos ↓TG hepáticos ↓enzimas lipogénicas hepáticas ↑ ALA, EPA y DHA en FL hepáticos	Kim y col., 2004
Ratas Wistar 7 % p/p de grasa	aceite de maíz vs. aceite de chia	66,5 vs. 0,60	4 semanas	↓TG y HDL colesterol plasmáticos ↑ALA, EPA, DHA plasmáticos	Ayerza y Coates, 2005
Ratas Sprague-Dawley 15 % p/p de grasa	aceite de girasol vs. aceite de perrilla	52,15 vs. 0,23	2 semanas	↓TG, AGL y colesterol plasmáticos ↓TG hepáticos ↑enzimas de oxidación de AG hepáticas ↓enzimas lipogénicas hepáticas ↑ALA, EPA, DHA en TG hepáticos	Ide y col., 1996 Ide y col., 2000
Ratas Lewis 20% p/p de grasa	aceite de girasol vs. aceite de lino	112,1 a 0,33	6 semanas	↓TG, AGL y colesterol plasmáticos ↑ALA, EPA y DHA plasmáticos	Jeffery y col., 1996
Ratas Wistar 20 % p/p de grasa	Aceite de girasol vs. aceite de perrilla	200 vs. 0,26	50 días	↓TG y colesterol plasmáticos ↓TG y colesterol hepáticos ↑ALA y EPA en FL hepáticos	Ihara y col., 1998

↑ Aumento, ↓ Disminución

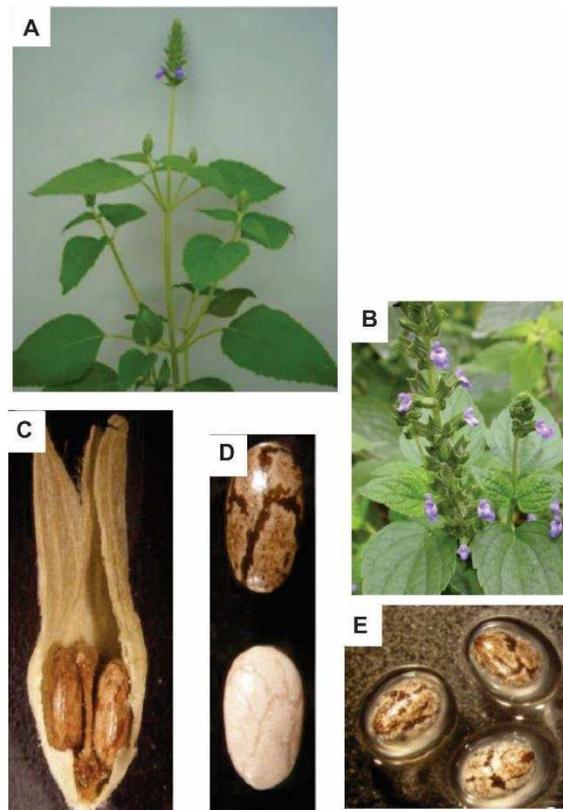
TG: triglicéridos, AG: ácidos grasos, FL: fosfolípidos

La semilla de Salvia hispánica L. (chia) como fuente de ácido α -linolénico (ALA)

Las mayores fuentes vegetales de ALA incluyen al *Linum usitatissimum* (lino), la *Perilla frutescens* (perrilla) y la *Salvia hispánica* L., comúnmente denominada chia. La *Salvia hispánica* L. (chia), es una planta herbácea anual perteneciente a la familia Lamiaceae. Alcanza una altura máxima de 1 m y presenta hojas de 4-8 cm de largo y 3-6 cm de ancho. Las flores son blancas o violetas y dan lugar a semillas marrones, grises, negras o blancas. La **Figura 5** muestra las características morfo-anatómicas de las hojas, tallo, flores y semillas de la planta (di Sapio y col., 2008; di Sapio y col., 2012).

La clasificación botánica de la *Salvia hispánica* L. (chia) fue realizada en el año 1753 por el botánico sueco Carl Von Linneo (1707-1778), cuyo nombre del latín se traduce en “planta hispánica para curar o sanar”. Sin embargo, esta planta no es nativa de España, es originaria de las regiones centro-sur de México y norte de Guatemala y fue introducida en España luego de la conquista de América. En tiempos pre-colombinos, la semilla de chia era consumida por los aztecas constituyendo junto con el maíz, el poroto y el amaranto la dieta típica de la población. Luego de la colonización de América, el cultivo de chia fue drásticamente suprimido quedando prácticamente en desuso. Hacia 1990, investigadores de Argentina y Estados Unidos redescubrieron el valor nutricional de la semilla de chia y llevaron a cabo un proyecto de investigación sobre las características, el cultivo y su adaptación a condiciones de cultivo en distintas zonas de Argentina, Perú, Colombia y Ecuador. Debido a este gran incentivo hoy la chia se cultiva alrededor del mundo (Sosa y col., 2016).

Figura 5 Características morfo-anatómicas de la planta *Salvia hispánica* L. (chia)*



*Fotografías extraídas y adaptadas de di Sapiro y col., 2008; di Sapiro y col., 2012. **A:** aspecto general de la planta; **B:** inflorescencias; **C:** semillas incluidas en el cáliz, **D:** semillas marrones y blancas; **E:** semillas hidratadas con formación de mucílago.

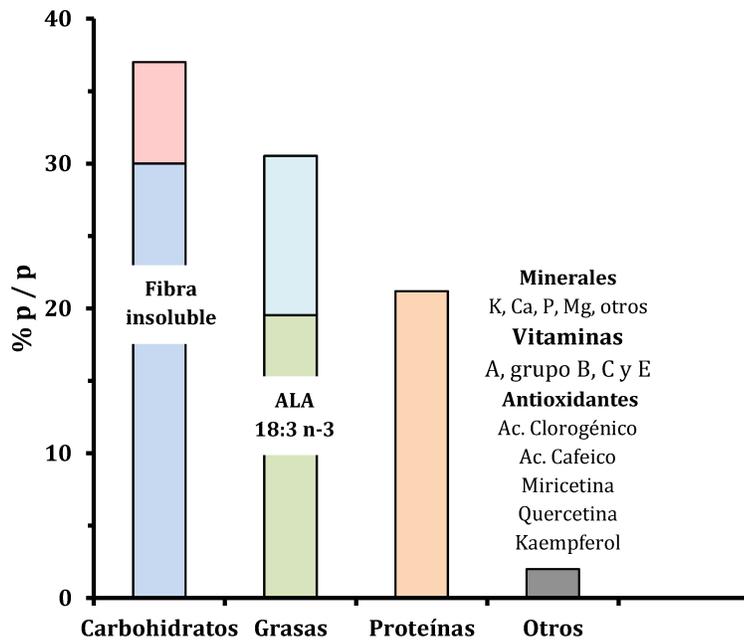
En la **Figura 6** se muestra la composición de la semilla de la *Salvia hispánica* L. (chia), variedad Salba. Aproximadamente, los hidratos de carbono constituyen el 37% p/p, las grasas el 30% p/p y las proteínas el 20 % p/p de la semilla. Además, contiene minerales (K, Ca, P, Mg, entre otros), vitaminas (vitaminas A, del grupo B, C y E) y compuestos fenólicos con capacidad antioxidante. La composición de la semilla de chia varía en función del genotipo y las condiciones de cultivo (Ayerza y Coates, 2004; Ayerza, 2009; Ayerza, 2013; Muñoz y col., 2013).

Una de las características más atractiva de la semilla de chia es su alto contenido de ALA, el cual representa la mayor proporción del total de ácidos grasos (aproximadamente el 64 % de los lípidos totales). Además del buen perfil lipídico, la semilla contiene componentes que ofrecen ciertas ventajas sobre otras fuentes vegetales de ALA. Una de ellas es su capacidad antioxidante. En su composición se encuentran polifenoles: ácido clorogénico, ácido cafeico, miricetina, quercetina y kaempferol. La presencia de estas sustancias proporciona una alta estabilidad al aceite cuando es extraído de la semilla (Ayerza y Coates, 2004; Ayerza, 2009; Ayerza, 2013; Muñoz y col., 2013).

Otra propiedad importante de la semilla de chia es el tipo y cantidad de fibra alimentaria, la cual constituye la mayor proporción de los hidratos de carbono. En su composición se encuentra fibra insoluble (celulosa, hemicelulosa y lignina) y soluble (pectinas, gomas y mucílagos). Dentro de la fibra soluble, la semilla contiene cantidades significativas de mucílagos los cuales en contacto con agua forman geles de alta viscosidad (**Figura 5 E**) (Vázquez-Ovando y col., 2009; Capitani y col., 2012).

Tanto los antioxidantes como la fibra soluble están asociados con efectos beneficiosos sobre las anormalidades metabólicas presentes en el SM (Galisteo y col., 2008). Además, la semilla de chia no contiene gluten y se desconoce la existencia de componentes tóxicos en ella. Por lo tanto, el perfil lipídico, la presencia de antioxidantes y fibra soluble, la convierte en un suplemento nutricional completo y saludable.

Figura 6 Composición de la semilla de *Salvia hispánica* L. (chia)*



*Variedad Salba. La composición puede variar en función del genotipo y de las condiciones de cultivo (Ayerza, 2013; Muñoz y col., 2013).

Efectos de la semilla de Salvia hispánica L. (chia) sobre aspectos bioquímicos y metabólicos en modelos experimentales

Algunos estudios a nivel experimental analizaron los efectos de la administración de semilla de chia a ratas normales y a ratas dislipémicas insulino resistentes. Por un lado, Ayerza y col. (Ayerza y Coates, 2005; Ayerza y Coates, 2007) analizaron los efectos de la semilla de chia dietaria cuando se administró a ratas normales como fuente grasa (7% p/p) en reemplazo del aceite de maíz por 4 semanas. En estos animales se observó una disminución de los TG plasmáticos junto con un incremento del colesterol HDL con respecto al grupo que recibe aceite de maíz, sin cambios en el colesterol LDL. Esto se acompañó de un incremento en el contenido de ALA, EPA y DHA plasmáticos. Resultados similares se obtuvieron cuando se administró aceite de chia o semilla de chia molida.

Por otra parte, Poudyal y col. (Poudyal y col., 2012a; Poudyal y col., 2012b) evaluaron los efectos de la semilla de chia sobre la dislipemia, la resistencia a la insulina y la adiposidad visceral inducidas en ratas por la administración de una dieta rica en grasa saturada y fructosa durante 8 semanas. La suplementación de esta dieta con semilla de chia (5% p/p), por 8 y 24 semanas adicionales, mejoró la incrementada adiposidad visceral, la intolerancia a la glucosa y la esteatosis hepática. Esto se acompañó de la mejora en la estructura y función hepática y cardiovascular.

Un estudio realizado por investigadores de nuestro grupo evaluó los efectos de la semilla de chia sobre la prevención de la dislipemia y la resistencia insulínica inducidas por la administración de una DRS. Para tal fin, la semilla de chia dietaria se administró como fuente de grasa en reemplazo del aceite de maíz (rico en LA) en los animales alimentados con DRS (grupo DRS+chia) (proporción de ácidos grasos n-6/n-3 0,287 en la dieta DRS+chia vs. 67,80 en las dietas DC y DRS) utilizando un diseño experimental donde la chia se administró durante 3 semanas desde el inicio de la ingesta de DRS. El cambio del tipo de ácidos grasos dietarios previno el desarrollo de la dislipemia y resistencia insulínica periférica global. Se observó además un incremento en los niveles plasmáticos de ALA, EPA, DPA y DHA en comparación con el plasma de los animales alimentados con DRS y con una dieta control de laboratorio (Chicco y col., 2009; Rossi y col. 2013).

Otros estudios de nuestro laboratorio consistieron en administrar la semilla de chia por un período de 2-3 meses en reemplazo del aceite de maíz a partir del momento en que los animales alimentados con DRS alcanzan una dislipemia y resistencia insulínica estable (3 meses de ingesta). La semilla de chia redujo la acumulación de TG en hígado y la secreción de VLDL. Esto se asoció al incremento de la actividad de enzimas hepáticas claves de la oxidación de ácidos grasos (CPT1 y FAO) y al aumento de la masa proteica del PPAR α , junto con la disminución de enzimas involucradas en la síntesis *de novo* de ácidos grasos (ACC, FAS, glucosa-6P deshidrogenasa, enzima málica) y el nivel de la masa proteica de la forma madura del factor de transcripción SREBP-1 (Chicco y col., 2009; Rossi y col., 2013). También se constató que la semilla de chia disminuye el peso del tejido adiposo visceral epididimal acompañado de una reducción de la hipertrofia adipocitaria, normalizando la incrementada lipólisis basal y restaurando la sensibilidad a la acción antilipolítica de la insulina (Oliva y col., 2013). Estos mecanismos permiten explicar, al menos en parte, la normalización de la dislipemia observada en los animales alimentados con DRS+chia. Más aún, los efectos descriptos se acompañaron de la normalización del contenido intracelular de lípidos en el músculo esquelético (TG, LC-acil-CoA, DAG). Por lo tanto, la reversión de la dislipemia y la disminución de la disponibilidad de los AGL plasmáticos podría ser uno de los mecanismos involucrados en la normalización de la sensibilidad insulínica periférica global y la homeostasis de la glucosa.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

De acuerdo a lo expuesto previamente, la dislipemia y la resistencia insulínica, inducidas por dietas ricas en carbohidratos simples, promueven alteraciones bioquímicas-metabólicas en el músculo cardíaco. Además, en este modelo experimental se observa estrés oxidativo sistémico. Los mecanismos íntimos de estas alteraciones no están aún bien dilucidados. Tampoco se conoce si la administración de la semilla de chia –que es capaz de revertir la dislipemia y la insulino resistencia- podría ser una interesante estrategia nutricional para mejorar o revertir estas alteraciones. Por lo tanto, los **OBJETIVOS GENERALES** del presente trabajo son:

- I. Explorar los mecanismos subyacentes involucrados en las alteraciones bioquímicas-metabólicas presentes en el músculo cardíaco de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados crónicamente con una DRS.
- II. Evaluar si la semilla de chia como intervención dietaria mejora o revierte el deteriorado metabolismo lipídico-hidrocarbonado del músculo cardíaco presente en los animales alimentados con la DRS. Además, analizar si estos cambios involucran un mejoramiento del estado oxidativo.

Para lograr este objetivo general se alimentaron ratas machos Wistar con una DRS durante tres meses -etapa metabólica caracterizada por una estable dislipemia, moderada hiperglucemia, resistencia insulínica, alteraciones-bioquímicas metabólicas del músculo cardíaco y lipotoxicidad-. A partir de este momento los animales se dividieron al azar en dos grupos: uno continuo con la misma dieta hasta los 6 meses de ingesta y en el otro grupo se sustituyó isoenergéticamente el aceite de maíz por semilla de chia como fuente de grasa dietaria hasta el final del período experimental. Bajo estas condiciones experimentales se desarrollaron los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**:

Determinar en el **músculo cardíaco** los siguientes parámetros relacionados con el metabolismo lipídico e hidrocarbonado y su relación con el desarrollo del estrés oxidativo:

- I. El contenido de lípidos: TG, LC-acil-CoA y DAG.

- II. Los niveles de la masa proteica del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 en condiciones basales y bajo el estímulo de la insulina. La oxidación de los LC-acil-CoA mediante la determinación de la actividad y el nivel de la masa proteica de la M-CPT1, siendo que el contenido intracelular de lípidos es el resultado del balance entre la captación, transporte, oxidación y destino metabólico de los ácidos grasos.
- III. Los niveles de la masa proteica del receptor nuclear PPAR α , ya que los ácidos grasos y sus derivados pueden modular el metabolismo energético de los cardimiocitos mediante la activación de este factor nuclear.
- IV. Los niveles de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP2, considerando que niveles elevados de ácidos grasos y de ROS y el PPAR α son algunos de los reguladores de esta proteína.
- V. Los niveles de metabolitos (glucosa-6P y glucógeno) y la actividad de enzimas claves de la vía no oxidativa (HQ) y oxidativa (PDHc) de la glucosa.
- VI. Los niveles de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT4 en condiciones basales y posteriores al estímulo con insulina. Niveles de la masa proteica del sustrato del receptor de insulina IRS1.
- VII. Los niveles de la masa proteica de la AMPK y de su forma activa (fosforilada en el residuo Thr172), regulador clave del metabolismo de los lípidos y la glucosa.
- VIII. Los niveles de las ROS y la actividad de enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD). Expresión génica de la GPx, la SOD y la subunidad p47 de la NAD(P)H oxidasa (p47NOX).
- IX. La expresión del factor de transcripción relacionado al factor nuclear eritroide 2 (NF-E2) Nrf2, clave en la activación de la defensa antioxidante celular.
- X. El contenido de colágeno y los niveles de hidroxiprolina en el ventrículo izquierdo como estimación de la fibrosis del tejido cardíaco.
- XI. Determinar la presión arterial, el ritmo cardíaco y la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos del músculo cardíaco.

XII. Adicionalmente, evaluar los niveles plasmáticos de lípidos, glucosa, ácido úrico, insulina, marcadores del estado oxidativo: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) y grupos carbonilos y citoquinas pro-inflamatorias: factor de necrosis tumoral α (TNF α) e interleuquina 6 (IL-6). Determinar la sensibilidad insulínica periférica global.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar provenientes del Instituto Nacional de Farmacología (Buenos Aires, Argentina). Los animales se mantuvieron en un bioterio bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad y aireación con un ciclo de luz-oscuridad fijo de 12 horas (luz de 7:00 a 19:00 hs). Durante todo el período experimental los animales tuvieron libre acceso al agua y a la comida. Se adoptaron todas las medidas necesarias para evitar el estrés y malestar de los animales y se utilizó el menor número de animales posible, siguiendo el protocolo experimental evaluado y aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Diseño experimental

Las ratas con un peso inicial de 180-200 g (adultos jóvenes) recibieron durante una semana una dieta comercial para roedores de laboratorio (Ralston Purina, St. Louis, USA). Luego del período de adaptación a las condiciones de alojamiento, los animales se dividieron al azar en 2 grupos: grupo de referencia y grupo experimental. El grupo de referencia recibió durante todo el período experimental (6 meses) una dieta semi-sintética (Dieta Control, DC) compuesta por (% energía): carbohidratos (almidón, 60), grasas (aceite de maíz, 23) y proteínas (caseína, 17) (grupo DC). El grupo experimental recibió durante 3 meses la misma dieta semi-sintética donde la sacarosa reemplazó isoenergéticamente al almidón (Dieta Rica en Sacarosa, DRS). Luego de 3 meses los animales del grupo DRS fueron divididos al azar en 2 sub-grupos: un subgrupo continuó con la DRS hasta el final del período experimental (6 meses) (grupo DRS) mientras que el otro subgrupo recibió una DRS donde la semilla de chia (*Salvia hispánica* L., variedad Salba) se administró como fuente de grasa dietaria sustituyendo isoenergéticamente al aceite de maíz (DRS+chia) hasta el final del período experimental (6 meses) (grupo DRS+chia) (**Figura 7**). En la dieta DRS+chia, se utilizó la variedad comercial de semilla de chia Salba y se administró como semilla entera. La cantidad de carbohidratos, proteínas, fibra y sales minerales en esta dieta experimental se balanceo de

acuerdo a la cantidad de cada uno de estos componentes presentes en la semilla, según la composición descrita por el proveedor (Agrisalba S.A., Buenos Aires, Argentina). La semilla de Salba contiene un perfil nutritivo aproximadamente 20% superior a la chia regular y es producida bajo estrictas condiciones de cultivo lo cual garantiza la calidad y reproducibilidad de su composición (Vuksan y col., 2010).

Las dietas son isoenergéticas y proveen aproximadamente 17 kJ/g comida. Su formulación se basó en las recomendaciones dietarias para la manutención de roedores adultos realizadas por el Instituto Americano de Nutrición (Reeves y col., 1993), fueron preparadas semanalmente y se conservaron a 4°C hasta su consumo. La composición de las dietas experimentales y su composición en ácidos grasos se detallan en las **Tablas 5** y **6** respectivamente. La composición de ácidos grasos del aceite de maíz y de la semilla de chia se realizó por cromatografía gas-líquido previa derivatización de los ácidos grasos en el instituto INIBIOLP, Facultad de Cs. Médicas, La Plata.

Figura 7 Diagrama del diseño experimental

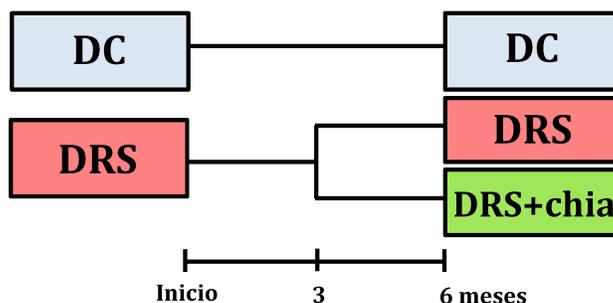


Tabla 5 Composición de las dietas experimentales

COMPONENTES ¹	DC		DRS		DRS+chia	
	% p/p	% energía	% p/p	% energía	% p/p	% energía
CARBOHIDRATOS						
Almidón	58,0	60,0	2,5	2,6	--	--
Sacarosa	--	--	55,5	57,4	55,5	57,4
Semilla de chia*	--	--	--	--	2,5	2,6
GRASAS						
Aceite de maíz	10,5	23,0	10,5	23,0	0,1	0,2
Semilla de chia*	--	--	--	--	10,4	22,8
PROTEÍNAS						
Caseína (libre de vitaminas)	16,3	17,0	16,3	17,0	8,6	9,0
Semilla de chia*	--	--	--	--	7,7	8,0

¹La formulación de las dietas se basa en las recomendaciones dietarias para la manutención de roedores adultos de laboratorio realizadas por el Instituto Americano de Nutrición (AIN-93M). Todas las dietas contienen (%p/p): 3,5 de mezcla de sales minerales (AIN-93M-Mx); 1 de mezcla de vitaminas (AIN-93M-Vx); 0,2 de cloruro de colina; 0,3 de metionina; 10-11 de fibra.

* Semilla de chia (*Salvia hispánica* L., variedad Salba): 362 g/kg de dieta. Composición de la semilla (g/100 g semilla): carbohidratos, 37,45; fibra insoluble, 81% del total de carbohidratos; grasa, 30,23; proteína, 21,19. Minerales (mg/100 g semilla): Na 103,15; K 826,15; Ca 589,60; Fe 11,90; Mg 77,0; P 604,0; Zn 5,32; Cu 1,66; Mn 1,36.

Tabla 6 Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales

ÁCIDOS GRASOS*	DC y DRS	DRS+chia
	g / kg de dieta	
16:0	10,92	6,96
18:0	2,73	2,42
18:1 n-9	33,71	7,39
18:2 n-6	54,10	19,85
18:3 n-3	0,80	67,26
20:1 n-9	0,47	0,36
Total saturados	13,65	9,38
Total monoinsaturados	34,18	7,75
Total Poliinsaturados		
n-6	54,10	19,85
n-3	0,80	67,26
n-6/n-3	67,62	0,295

*Otros ácidos grasos menores se han excluido

Seguimiento de los animales: determinación del peso corporal e ingesta energética

El peso corporal de cada animal se determinó dos veces por semana. En un experimento en paralelo, utilizando un número adecuado de animales se determinó dos veces por semana la ingesta energética y la ganancia de peso individual a lo largo de todo el periodo experimental.

Obtención de muestras de sangre y tejidos

Al finalizar el período de experimentación los animales se anestesiaron por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico en una dosis de 60 mg/kg de peso corporal. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena yugular e inmediatamente se centrifugaron en tubos conteniendo EDTA como anticoagulante a 4°C. El plasma obtenido se conservó a -20°C hasta su procesamiento. Inmediatamente se extrajo el corazón, se lavó en solución fisiológica y se congeló a -80°C hasta su procesamiento para la determinación de metabolitos, composición de ácidos grasos de los fosfolípidos, ROS, actividades enzimáticas, niveles de masa proteica (Western Blot) y niveles de mRNA (RT-PCR). En un grupo separado de animales, el corazón se pesó, el ventrículo izquierdo se diseccionó del corazón y se pesó. Adicionalmente, se extrajo la tibia y se midió. El peso del corazón y del ventrículo izquierdo se expresan como peso total, peso relativo a 100 g de peso corporal o peso relativo a la longitud de la tibia. La porción media de la pared del ventrículo izquierdo se conservó a -80°C para la determinación del contenido de hidroxiprolina y otra porción se fijó en buffer formaldehído para su análisis histológico.

Además, se extrajeron y pesaron los tejidos adiposos viscerales (epididimal, omental y retroperitoneal). El índice de adiposidad visceral se expresó como la relación entre la suma del peso de los tejidos adiposos respecto al peso corporal expresado en porcentaje (Rossi y col., 2013).

Estos procedimientos se realizaron entre 7:00 y 9:00 hs. (estado basal) con excepción de la determinación de la sensibilidad insulínica periférica global (clamp euglucémica hiperinsulinémica) como se detalla posteriormente.

Procedimientos experimentales: métodos analíticos

Determinación de la presión sanguínea y el ritmo cardíaco

Una vez por semana durante todo el período experimental se determinó la presión arterial sanguínea sistólica y diastólica y el ritmo cardíaco mediante el sistema computarizado no invasivo CODA™ Monitor (Kent Scientific Corporation, USA). Este sistema utiliza el método no invasivo tail-cuff, basado en el registro de las variaciones del volumen sanguíneo en la cola del animal utilizando un puño de oclusión (tail-cuff) y un sensor VPR (registrator de la presión de volumen). Este método está validado y presenta un 99% de correlación con los sistemas directos de medición de la presión sanguínea (Feng y col., 2008).

La técnica operatoria consistió en colocar a cada animal en estado consciente en un soporte con control térmico, el cual restringe su movimiento, minimizando su estrés y manteniendo su temperatura corporal. En la cola del animal se colocaron el puño de oclusión (tail-cuff) y el sensor VPR. Se registraron la presión sistólica, presión diastólica y ritmo cardíaco. Previo a las mediciones los animales fueron entrenados a fin de acostumbrarlos a las condiciones experimentales, para lo cual se los colocó en los soportes durante 3 días previo a la medición en sesiones de 15 minutos.

Determinación de la sensibilidad insulínica periférica global (clamp euglucémica hiperinsulinémica)

En un grupo de animales se realizó la determinación de la sensibilidad insulínica periférica global mediante la técnica clamp euglucémica hiperinsulinémica propuesta por deFronzo (DeFronzo y col., 1979), considerada el método estándar por excelencia para la determinación de este parámetro. Esta metodología consiste en infundir a los animales *in vivo* insulina a una velocidad fija y glucosa a velocidad variable (velocidad de infusión de glucosa, VIG) con el fin de mantener fija (clamp) la concentración de glucosa en el nivel euglucémico.

Luego de 5 hs de ayuno, animales de cada grupo experimental fueron anestesiados y mediante canulación de la vena yugular derecha se extrajeron muestras de sangre donde se cuantificaron los niveles de glucosa e insulina. Inmediatamente se extrajo en algunos animales de cada grupo el músculo cardíaco y se conservó a -80°C hasta su procesamiento

(tiempo 0 de la clamp). La vena yugular izquierda del resto de los animales de cada grupo se canularon en con una cánula de doble entrada por donde se administró durante 2 horas insulina porcina neutra altamente purificada (0,8 unidades/kg x h) utilizando una jeringa de infusión. La glucemia se mantuvo a nivel euglicémico (5,5-6,0 mM) durante toda la experiencia por infusión de glucosa (200 g/L) a velocidad variable utilizando una bomba peristáltica conectada a la segunda entrada de la cánula. Los niveles de glucosa se determinaron realizando extracciones de muestras de sangre a intervalos de 5 minutos durante la primera hora y entre 5-7 minutos en la segunda hora de experiencia utilizando el equipo Accu-Chek Sensor Confort (Roche, Argentina). La VIG durante el estado estacionario (segunda hora de la clamp) fue considerada como la velocidad de captación periférica global de glucosa y se expresó como mmol de glucosa/kg de peso corporal x min. Finalizadas las 2 hs de estudio, los animales se sacrificaron, se extrajo el músculo cardíaco y se conservó a -80°C hasta su procesamiento (tiempo 120 min de la clamp). En el músculo cardíaco de los animales previo y posterior a la clamp (tiempo 0 y 120 min respectivamente) se determinaron los niveles de la masa proteica del GLUT4 y del FAT/CD36.

Determinaciones plasmáticas

Metabolitos e insulina

Las determinaciones de los niveles plasmáticos de glucosa, triglicéridos, ácidos grasos libres (AGL), colesterol total y ácido úrico se realizaron mediante métodos espectrofotométricos utilizando kits enzimáticos comerciales de acuerdo a los protocolos experimentales proporcionados por los fabricantes. Los niveles de insulina se determinaron de acuerdo al ensayo inmunoreactivo descrito por Herbert y col. (Herbert y col., 1965) utilizando una curva estándar de insulina de rata para su calibración. Los resultados se expresan en $\mu\text{U/mL}$.

Marcadores de la peroxidación lipídica (TBARs) y protéica (grupos carbonilos) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF α e IL-6)

La peroxidación lipídica se estimó mediante la determinación de la concentración de TBARs de acuerdo al método de Lee y Csanalli (Lee y Csanalli, 1987). Los resultados se expresan como nmol/ml. Como marcador del daño oxidativo de las proteínas, se determinó la concentración plasmática de grupos carbonilos utilizando el método descrito por Reznick y Packer (Reznick y Packer, 1994). Los grupos carbonilos se determinaron

espectrofotométricamente a 370 nm. Los resultados se calcularon como nmol/mL utilizando el coeficiente de absorción (ϵ) ($\epsilon=22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para hidrazonas alifáticas.

Las concentraciones plasmáticas de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α e IL-6 se determinaron empleando el método de ELISA utilizando kits comerciales. Para el TNF α el límite mínimo detectado fue 4,2 pg/mL con un CV intra e inter ensayo menor al 8,3 % y 10,5 % respectivamente. Para la IL-6 el límite mínimo detectable fue 16 pg/mL con un CV intra e inter ensayo menor al 6,8 y 14,9 % respectivamente. Los resultados se expresan como pg/mL.

Determinaciones en músculo cardíaco

Determinación del contenido de metabolitos

I. Contenido de triglicéridos (TG)

Los lípidos totales del tejido cardíaco se extrajeron con una solución de éter isopropílico/etanol (proporción 95/5) y, luego de la remoción de los fosfolípidos por adsorción con ácido silícico, los TG se saponificaron mediante hidrólisis con KOH (Laurell, 1966). El glicerol resultante se cuantificó mediante su oxidación con IO_4^- y posterior reacción del formaldehído con ácido cromotrópico, resultando en un producto violeta con un máximo de absorción a 570 nm. La concentración de TG se calculó utilizando una curva estándar de trioleína (Lambert y Neish, 1950). Los resultados se expresan como $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo.

II. Contenido de acil-CoA de cadena larga (LC-acil-CoA)

El tejido cardíaco se sometió a una extracción ácida con HClO_4 (8%v/v en solución 40% etanol) y posterior hidrólisis del producto insoluble resultante con KOH (1N, 10 minutos, 55°C) obteniéndose como producto final CoA.

El principio de la determinación de la concentración de la CoA obtenida se basa en la decarboxilación del α -cetoglutarato en presencia de NAD^+ y CoA a succinil-CoA y NADH mediante la α -cetoglutarato deshidrogenasa, cuantificándose el NADH formado. Para ello, una alícuota de extracto se adicionó a un medio de reacción compuesto por buffer fosfato de

potasio 50mM; α -cetoglutarato 0,1 M; NAD⁺ 120 mM; DTT 100 mM (pH 7,2). La reacción se inició con el agregado de α -cetoglutarato deshidrogenasa (concentración final de 0,06 U/mL). La fluorescencia emitida por el NADH formado al final de la reacción se detectó a 465 nm (espectrómetro de fluorescencia LS55, Perkin Elmer, Argentina) (Williamson y Corkey, 1969). La concentración de CoA se cuantificó utilizando una solución estándar de sal disódica de CoA. Los resultados se expresan como nmol/g de tejido húmedo.

III. Contenido de diacilglicerol (DAG)

La concentración de DAG se determinó mediante el método descrito por Schmitz-Peiffer (Schmitz-Peiffer y col., 1997) el cual consiste en la extracción de los lípidos totales (Folch y col., 1957) y posterior separación en sus componentes lipídicos por cromatografía en capa fina, utilizando una capa de gel de sílice y una corriente ascendente de una mezcla de n-hexano/dietiléter/ácido acético en proporciones (v/v) de 82/18/4 respectivamente.

Finalizada la corrida cromatográfica, las placas se colorearon con una solución de coomasie azul brillante R-250 (0,03% p/v en solución de 20% metanol), decoloraron en solución de metanol (20%) y secaron. El contenido de DAG en cada muestra se cuantificó mediante el análisis densitométrico de las placas utilizando el programa NIH image software (USA) utilizando como referencia un estándar de dipalmitina (Nakamura y Handa, 1984). Los resultados se expresan como nmol/g de tejido húmedo.

IV. Contenido de glucosa 6-fosfato (glucosa-6P)

El tejido cardíaco se sometió a una extracción ácida con HClO₄ (8% v/v en solución 40% etanol). El producto soluble resultante se adicionó a un medio de reacción conteniendo buffer trietanolamina 0,4 M; NADP⁺ 20 mM; MgCl₂ 0,5 M (pH 7,6). La reacción se inició con el agregado de glucosa-6P deshidrogenasa (concentración final de 0,25 U/mL). La concentración de glucosa-6P se determinó en base a la absorbancia a 340 nm del NADPH formado al final de la reacción y el coeficiente de extinción molar (ϵ) del NADPH a 340 nm ($\epsilon=6,22$ mM) (Bermeyer, 1974). Los resultados se expresan como μ mol/g de tejido húmedo.

V. Contenido de glucógeno

El tejido cardíaco se sometió a hidrólisis con HCl 2 M durante 2 hs a 90°C. La glucosa resultante se cuantificó utilizando un método de reacciones enzimáticas acopladas (glucosa

oxidasa/peroxidasa). La absorbancia del producto formado al final de la reacción (quinoneimina) se midió a 505 nm. La concentración de glucógeno se determinó utilizando una curva estándar de glucosa (Bermeyer, 1974). Los resultados se expresan como $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo.

Determinación de los niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS)

El tejido cardíaco se homogenizó a 4°C en buffer fosfato de sodio 0,1 M (pH 7,4) y centrifugó a 1000 x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de los niveles de ROS y en una alícuota del mismo se determinó el contenido de proteínas totales (método de Bradford).

Los niveles de las ROS se determinaron de acuerdo al método de la diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂DA), el cual consiste en incubar los extractos celulares con DCFH₂DA, la cual es oxidada por las ROS a diclorofluoresceína (DCF), una molécula que emite una señal fluorescente a 538 nm cuando es excitada con una longitud de onda de 485 nm (Wang y col., 2013). Para ello, una alícuota de muestra se incubó durante 30 min a 37 °C en oscuridad en presencia de 10 μM de DCFH₂DA. La intensidad de fluorescencia emitida se detectó en un espectrofotómetro de fluorescencia. Se realizó un blanco de muestra incubando una alícuota de muestra en las mismas condiciones sin el agregado de DCFH₂DA. Los resultados se normalizaron en relación al contenido proteico y se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia respecto al grupo control.

Determinación del contenido proteico total

La concentración de proteínas en los extractos celulares se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) en micro placas utilizando un reactivo comercial de Bradford (solución conteniendo coomasie azul brillante) siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. La concentración de proteínas se cuantificó de acuerdo a la absorbancia del producto resultante a 595 nm (Lector de microplacas EZ Read 400, Biochrom, Reino Unido) utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina.

Determinación de la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos

Se extrajeron los lípidos totales del tejido cardíaco (Folch y col., 1957) y los fosfolípidos se separaron mediante cromatografía en capa fina. Las fracciones de fosfolípidos obtenidas se

metilaron utilizando como catalizador BF_3 a 64°C durante 3 hs y la composición de ácidos grasos fueron determinados como ésteres metílicos por cromatografía gas-líquido. Los ácidos grasos se identificaron en base al tiempo de retención de cada uno de ellos en comparación con estándares conocidos y cuantificaron según el área bajo la curva de los picos resultantes del cromatograma. Los resultados se expresan como % de cada ácido graso respecto al total de ácidos grasos. Detalles de la metodología empleada fue descripta previamente (Montanaro y col., 2005). Esta determinación se realizó en conjunto con el instituto INIBIOLP, La Plata, Argentina.

Determinación de actividades enzimáticas

I. Actividad enzimática de la carnitina palmitoiltransferasa 1 (M-CPT1)

Para la determinación de la actividad enzimática de la M-CPT1, se prepararon extractos mitocondriales homogenizando el tejido cardíaco a 4°C en un buffer compuesto por HEPES 20 mM; KCl 140 mM; EDTA 10 mM; MgCl_2 5 mM (pH 7,4). Los homogenatos se centrifugaron a $500 \times g$ por 10 min a 4°C y los sobrenadantes obtenidos se centrifugaron nuevamente a $9000 \times g$ por 45 min a 4°C . Seguidamente, los pellets mitocondriales resultantes se resuspendieron en buffer de homogenización, los cuales se utilizaron para la determinación de la actividad enzimática y en una alícuota de los mismos se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

El ensayo de medición de la actividad enzimática se realizó según el método descrito por Ling y col. (Ling y col., 2012) el cual consiste en monitorear la liberación de CoA-SH del palmitoil-CoA producto de la actividad CPT, el cual en presencia de ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) forma un compuesto estable con un máximo de absorción a 412 nm. La actividad de la M-CPT1 se calculó como la diferencia entre la actividad CPT (CPT total) y la actividad CPT2, la cual se determina en las mismas condiciones de ensayo que para la CPT total pero en presencia de concentraciones adecuadas de malonil-CoA, el cual específicamente inhibe a la M-CPT1.

Para determinar la actividad de la CPT total una alícuota de muestra se adicionó a un medio de reacción compuesto por buffer HEPES 20 mM; EGTA 1 mM; sacarosa 220 mM; KCl 40 mM; DTNB 0,1 mM; BSA 1,3 mM en presencia de $40 \mu\text{M}$ de palmitoil-CoA (pH 7,4). La

reacción se inició con el agregado de L-carnitina (concentración final de 1 mM). La formación de CoASH-DTNB se monitoreó continuamente a 412 nm durante 5 minutos a 37°C. La actividad de la CPT2 se determinó en las mismas condiciones de ensayo, en presencia de 10 μ M de malonil-CoA en el medio de reacción. La actividad CPT se calculó en base a la variación de la absorbancia por minuto y al coeficiente de extinción molar del DTNB ($\epsilon=13,6$ mM). Los resultados se expresan como nmol/min x mg de proteína. La formación de producto medido es función lineal de la concentración de proteínas en las condiciones de ensayo (previamente determinado).

II. Actividad enzimática de la hexoquinasa (HQ)

El tejido cardíaco se homogenizó a 4°C en un buffer fosfato de potasio 10 mM conteniendo glucosa 10 mM; EDTA 5 mM y β -mercaptoetanol 5mM (pH 7,0) y se centrifugó a 1300 x g. El sobrenadante obtenido se utilizó para la determinación de la actividad enzimática y en una alícuota del mismo se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

El ensayo de la medición de la actividad enzimática consiste en acoplar la formación de glucosa-6P, producto de la actividad de la HQ, a la formación de 6P-gluconato mediante la glucosa-6P deshidrogenasa de manera tal de monitorear la formación de NADPH. Una alícuota del sobrenadante obtenido se adicionó a un medio de reacción compuesto por buffer Tris 70 mM, glucosa 10 mM y β -mercaptoetanol 5mM en presencia de ATP 4 mM, MgCl₂ 7 mM y NADP⁺ 0,60 mM. La reacción se inició con el agregado de la enzima glucosa-6P deshidrogenasa (concentración final de 0,03 U/mL). La formación de NADPH se monitoreó continuamente a 340 nm durante 5 minutos a 37°C. La actividad de la enzima HQ se calculó en base a la variación de la absorbancia por minuto y al coeficiente de extinción molar del NADPH ($\epsilon=6,22$ mM) (Bernstein y Kipnis, 1973; Thompson y Cooney, 2000). Los resultados se expresan como mU/mg de proteína. La formación del producto medido es función lineal de la concentración de proteínas en las condiciones de ensayo (previamente determinado).

III. Actividad enzimática del complejo piruvato dehidrogenasa (PDHc)

La determinación de la actividad del PDHc se realizó de acuerdo al método propuesto por Wieland y col. (Wieland y col., 1972). Para cuantificar la actividad de la forma activa del complejo PDH (PDHa), el tejido cardíaco se homogenizó a 0-2°C en un buffer de fosfato de

potasio 20 mM (pH 7,0) en presencia de 40% v/v de glicerol y 20 mM de NaF con el fin de inhibir la defosforilación del PDHc y mantener el estado del PDHc en la misma forma que *in situ*. Posteriormente los homogenatos se sonicaron (disruptor celular Sonifier, heat systems, Ultrasonic, Inc.) 4 veces durante 15 seg con intervalos de 30 seg. Para determinar la actividad total del PDHc (PDHt), se prepararon homogenatos en las mismas condiciones, en ausencia de NaF, e incubaron a 25°C durante 60 min en presencia de 20 mM de MgCl₂ y 0,5 mM de CaCl₂ con el fin de promover la activación de las PDH fosfatas y defosforilación de PDHc inactivo, lo cual resulta en la activación total del PDHc. Los homogenatos obtenidos se utilizaron para la determinación de la actividad PDHt o de la PDHa, según corresponda, y de la actividad enzimática de la enzima citrato sintasa, como enzima de referencia de la matriz mitocondrial, y en una alícuota de los mismos se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

El ensayo para la cuantificación de la actividad enzimática consiste en acoplar la formación de acetil-CoA a partir de piruvato, producto de la actividad del PDHc, a la formación de acetil-P mediante las enzimas fosfotransacetilasa y lactato deshidrogenasa, el cual en presencia de hidroxilamina y Fe⁺³ forma un complejo coloreado estable con un máximo de absorción a 546 nm. Por cada muestra se ensayó la actividad PDHt y PDHa y para la determinación de ambas se realizó una serie de reacciones a los tiempos 0, 5, 10, 20, 25 y 30 min. Para ello, una alícuota de muestra se adicionó a un medio de reacción compuesto por buffer fosfato de potasio 100 mM, MgCl₂ 2 mM; mercaptoetanol 10 mM en presencia de 6 mM de NAD⁺, 2 mM de tiaminapirifosfato, 40 mM de piruvato de sodio, lactico deshidrogenasa (32 U/mL) y fosfotransacetilasa (32 U/mL). La reacción se inició con el agregado de CoA-SH (concentración final 1 mM) y finalizó con el agregado de una solución de NaOH 3,5 N/hidroxilamina 2M, a lo cual finalmente se le agregó una solución de reactivo color conteniendo Fe⁺³. La actividad de PDHt y PDHa se calculó en base a una curva estándar de acetilcolina (0,3–1,0 mM) teniendo en cuenta que 1 unidad de actividad corresponde a la formación de 1 μmol de acetilhidroxamato por minuto a 37°C. La actividad de la PDHa se expresa como porcentaje respecto a la PDHt. La formación del producto medido es función lineal de la concentración de proteínas en las condiciones de ensayo (previamente determinado).

IV. Actividad enzimática de la catalasa (CAT)

La actividad de la enzima CAT se determinó según el procedimiento descrito por Aebi (Aebi, 1984). El tejido cardíaco se homogenizó a 4°C en un buffer fosfato de sodio y potasio 5 mM en presencia de 0,5% de tritón (pH 7,0) y centrifugó a 600 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se recogió e incubó durante 30 minutos a 4°C con etanol (proporción 1/100), el cual se utilizó para la determinación de la actividad enzimática y en una alícuota del mismo se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

El ensayo de la actividad enzimática consistió en adicionar una alícuota del extracto a un medio de reacción compuesto por buffer fosfato de sodio y potasio 50 mM (pH 7,0). La reacción se inició con el agregado de H₂O₂ en una concentración final de 0,0125 M. La descomposición de H₂O₂ se monitoreó continuamente a 240 nm durante 3 minutos a 21°C y se determinó la variación de la absorbancia por minuto (k). Los resultados se expresan como k (1/min x mg de proteína).

V. Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx)

Para la determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, el tejido cardíaco se homogenizó a 4°C en buffer fosfato de potasio 5 mM en presencia de tritón 0,5% (pH 7,0), se centrifugó a 600 x g por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 184000 x g por 1 hora a 4°C. El sobrenadante resultante se utilizó para el ensayo enzimático y en una fracción del mismo se determinó la concentración proteica total (método de Bradford).

La actividad enzimática de la GPx se determinó según el procedimiento propuesto por Paglia y Valentine (Paglia y Valentine, 1967). El método consiste en acoplar la actividad de la GPx, que produce glutatión oxidado (GSSG), a la actividad de de la glutatión reductasa (GR) la cual convierte el GSSG a glutatión reducido (GSH) utilizando NADPH, monitoreando su descomposición a 340 nm. Una alícuota de muestra se adicionó al medio de reacción compuesto por buffer fosfato 50 mM; EDTA 5 mM y azida sódica 3 mM en presencia de 0,33 U/ml de glutatión reductasa; 5 mM de GSH y 0,3 mM de NADPH. La reacción se inició con el agregado de H₂O₂ (concentración final de 0,07 mM). La descomposición del NADPH se monitoreó continuamente a 340 nm durante 5 minutos a 20°C. La actividad enzimática se

calculó en base a la variación de la absorbancia por minuto y al coeficiente de extinción molar del NADPH ($\epsilon=6,22 \text{ mM}$). Los resultados se expresan como U/mg de proteína. La formación del producto medido es función lineal de la concentración de proteínas en las condiciones de ensayo (ensayos previos).

VI. Actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD)

La determinación de la actividad total de la SOD se realizó de acuerdo al método espectrofotométrico propuesto por Kakkar y col. (Kakkar y col., 1984). El tejido cardíaco se homogenizó a 4°C en buffer fosfato salino (PBS) y centrifugó a 1500 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad enzimática y en una fracción del mismo se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

La determinación de la actividad enzimática consiste en cuantificar la capacidad de la enzima SOD de inhibir la formación de formazán (NADH-fenazina metosulfato-tetrazolium) producto de la reacción del NADH con nitroblue tetrazolium (NTB) y fenazina metosulfato (PMS). El formazán resultante forma un complejo coloreado estable con un máximo de absorción a 560 nm. Para ello, por cada muestra se ensayó una serie de reacciones con cantidades crecientes de muestra (0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 μg). Por cada ensayo, una alícuota de extracto se adicionó a un medio de reacción compuesto por buffer pirofosfato de sodio 20 mM (pH 8,3) en presencia de 40 μM de NTB y 10 μM de PMS. La reacción se inició con el agregado de NADH (concentración final de 0,15 mM) y finalizó luego de 3 minutos de reacción a 30°C con ácido acético glacial. La actividad del SOD se calculó definiendo 1 unidad de actividad como la cantidad de enzima capaz de inhibir el 50% de la formación del producto (formazán) por minuto a 30°C. Los resultados se expresan como U/mg de proteína. Las condiciones de máxima formación de producto se determinaron en ensayos previos.

Determinación de los niveles de masa proteica (Western Blot)

I. Preparación de los extractos proteicos

1. Carnitina palmitoiltransferasa 1 (M-CPT1) y receptor activado por proliferadores peroxisomales α (PPAR α)

El tejido cardíaco se homogenizó en buffer Tris-HCl 10 mM en presencia de 150 mM de NaCl; 1% de tritón X-100 y coctel inhibidor de proteasas comercial (compuesto por AEBSF; aprotinina; bestatina; E-64; leupeptina; pepstatina) (pH 7,4) y centrifugó a 9000 x g por 45 minutos a 4°C (Bogazzi y col., 2009). El sobrenadante resultante se utilizó para su ensayo por Western blot y en una alícuota del mismo se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

2. Sustrato del receptor de insulina (IRS1), quinasa activada por AMP (AMPK) y AMPK fosforilada en el residuo Thr172 (pAMPK)

Los extractos proteicos se prepararon homogenizando el tejido cardíaco en buffer compuesto por tris-HCl 100 mM en presencia de 100 mM de pirofosfato de sodio; 100 mM de fluoruro de sodio; 10 mM de vanadato de sodio; 10 mM de EDTA y coctel inhibidor de proteasas (pH 7,4) (Bezerra y col., 2000). Los homogenatos se centrifugaron a 16000 x g 20 minutos a 4°C. El sobrenadante resultante se utilizó para su ensayo por Western blot y en una alícuota del mismo se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

3. Proteína desacoplante UCP2

Se prepararon extractos proteicos mitocondriales homogenizando el tejido cardíaco en un buffer compuesto por 10 mM de tris-HCl; 250 mM de sacarosa; 1 mM de EDTA y coctel inhibidor de proteasas (pH 7,5). El homogenato se centrifugó a 600 x g y el sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 10000 x g por 20 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en buffer de homogenización y se utilizó para su ensayo por Western blot (Pecqueur y col., 2001). En una alícuota del mismo se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

4. Transportador de ácidos grasos FAT/CD36 y transportador de glucosa GLUT4

Los niveles de la masa proteica del FAT/CD36 y del GLUT4 en músculo cardíaco se determinaron en condiciones previas y posteriores al estímulo con insulina (tiempo 0 y 120

min de la clamp euglucémica hiperinsulinémica, respectivamente). Los extractos proteicos se prepararon de acuerdo al procedimiento descrito por Rodnick y col. (Rodnick y col., 1992). El tejido cardíaco se homogenizó en buffer compuesto por HEPES 20 mM, sacarosa 250 mM; EDTA 1 mM y coctel inhibidor de proteasas (pH 7,4) y se centrifugó a 3000 x g 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se centrifugó nuevamente a 184000 x g durante 2 horas a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en buffer de homogenización y se utilizó para su ensayo por Western blot. En una alícuota del mismo se determinó la concentración de proteínas totales (método de Bradford).

II. Determinación por Western Blot

Los extractos proteicos se sometieron a separación electroforética en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), para lo cual los mismos se desnaturalizaron por calentamiento a ebullición durante 3 minutos en buffer Laemmli (tris-HCl 60 mM; glicerol 10%; SDS 2%; β -mercaptoetanol 1,25%; azul de bromofenol 0,01%). Los extractos se sembraron en una cantidad de (μ g/calle): 40 UCP2, 50 GLUT4, FAT/CD36, AMPK y pAMPK; 75 IRS1; 100 PPAR α y M-CPT1) y corrieron electroforéticamente en geles de poliacrilamida (% p/v acrilamida-bisacrilamida: 8,0% IRS1; 10% M-CPT1, FAT/CD36, AMPK y pAMPK; 12% GLUT4 y UCP2) en presencia de buffer de corrida (tris-HCl 25 mM; glicina 190 mM; SDS 0,1%; pH 8,3) en una cuba vertical (Bio-Rad, USA) a 120 mV. En cada uno de los geles se sembraron 2 calles con marcadores de peso molecular comerciales.

Finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana de polifluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizando una cuba de transferencia (Bio-Rad, USA) en presencia de buffer compuesto por tris-HCl 25 mM; glicina 190 mM; metanol 20% y SDS 0,01%. Las condiciones de transferencia fueron de 50 V, 4°C durante 16 hs. La eficiencia de la transferencia se evaluó mediante tinción de la membrana con una solución de colorante rojo ponceau.

Seguidamente, las membranas de PVDF se bloquearon durante 6 horas a 4°C con agitación con una solución de bloqueo compuesta por 5% p/v de leche descremada o de albumina sérica bovina en buffer TBS-tween al 0,1%. Finalizado el bloqueo, las membranas se incubaron a 4°C bajo agitación durante 8 horas con los anticuerpos primarios policlonales específicos obtenidos en conejo anti-PPAR α , anti-M-CPT1, anti-FAT/CD36, anti-subunidad catalítica α

de la AMPK, anti-pAMPK (Thr172), anti-IRS1 y obtenidos en cabra anti-UCP2 y anti-GLUT4 según corresponda. Posteriormente, las membranas se incubaron a 25°C bajo agitación por 2 hs con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a la peroxidasa de rábano picante (HRP), anti-IgG de conejo o anti-IgG de cabra. Como control interno se detectó la proteína constitutiva actina utilizando el anticuerpo primario monoclonal (ratón) anti- β actina y el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón.

Finalmente, las membranas de PVDF se incubaron con sustrato quimioluminiscente según las instrucciones provistas por el fabricante y la señal luminiscente emitida se detectó en placas radiográficas. Las placas radiográficas se escanearon y la intensidad de las bandas se analizó utilizando el programa NIH image software (USA). Las unidades arbitrarias de densidad óptica de las proteínas blanco se normalizaron respecto a las unidades ópticas de proteína control (actina). Los resultados se expresan como porcentaje respecto al grupo control (DC).

La relación entre la cantidad de proteína y la intensidad de la señal obtenida fue lineal bajo las condiciones del ensayo para las proteínas blanco y la proteína control (determinado en ensayos previos).

Determinación de los niveles de mRNA (RT-PCR)

La semi-cuantificación de los niveles de mRNA de la SOD, la GPx, la p47NOX y el Nrf2 se realizaron por RT-PCR de acuerdo a la metodología descrita por Alvarez y col. (Alvarez y col., 2004) y empleada por nuestro grupo recientemente (Ferreira y col., 2016). Las determinaciones se realizaron en conjunto con el Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad de San Luis, San Luis, Argentina.

I. Extracción del RNA y obtención del cDNA

El RNA total se aisló del músculo cardíaco utilizando el reactivo trizol siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. La retro transcripción del RNA obtenido se realizó utilizando 1 μ g de RNA total extraído, oligonucleótidos de secuencia al azar (*random primers*) y transcriptasa reversa MMLV (RT-PCR). La reacción se llevó a cabo a 37°C por 1 h. Una alícuota del cDNA producto de la RT-PCR se amplificó utilizando oligonucleótidos

específicos para la SOD, GPx, p47NOX y el Nrf2 (**Tabla 7**) y una *master mix* compuesta por buffer, MgCl₂, dNTPs y Taq polimerasa.

Tabla 7 Secuencia de los oligonucleótidos específicos empleados en la RT-PCR y tamaño de los fragmentos generados

GEN	Secuencia del F (5'-3')	Secuencia del R (5'-3')	Tamaño (pb)
GPx	CCACCGTGTATGCCTTCTCC	ACCGGGGACCAAATGATGTA	424
SOD	AGCTGCACCACAGCAAGCAC	TCCACCACCCTTAGGGCTCA	191
Nrf2	CGGCATTTCACTGAACACAAGT	TGGCTGTGCTTTAGGTCCATT	160
p47NOX	AGGGAACGCTCACCGAGTACT	TCTTTGGCCGTCAGGTATGTC	160
28S rRNA	GTGAAAGCGGGCCTCACGATCC	TACTGAGCAGGATTACCATGGC	200

II. Semi-cuantificación del producto de PCR

Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa (2%) conteniendo GelRed. Las bandas resultantes se visualizaron por transiluminación UV de los geles y fotografía de los mismos. Las intensidades de las bandas se analizaron mediante el programa NIH image software. La cantidad relativa de mRNA se expresó como la relación entre la intensidad de la banda de interés y la intensidad de la banda correspondiente al RNA ribosomal de la subunidad 28S (rRNA 28S).

Determinación del contenido de hidroxiprolina

La cuantificación del contenido de hidroxiprolina en ventrículo izquierdo se realizó como una estimación del contenido de colágeno total (Neuman y Logan, 1950). La hidroxiprolina contenida en el colágeno se liberó completamente por hidrólisis del tejido con HCl 6N a 120°C. La hidroxiprolina resultante se detectó por oxidación con H₂O₂ 6% v/v y posterior reacción con p-dimetilamiobenzaldehído. El producto resultante presenta un máximo de absorbancia 540 nm. La concentración de hidroxiprolina se cuantificó en base a una curva estándar de hidroxiprolina. Los resultados se expresan como µg/g de tejido húmedo.

Análisis histológico del colágeno intersticial

I. Preparación y tinción de los cortes histológicos

El ventrículo izquierdo se diseccionó del corazón, se lavó en solución fisiológica y se sumergió en formol bufferado (4% v/v) durante 24 horas. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas por inmersión en soluciones graduales crecientes de alcohol etílico, aclaradas en xilol y finalmente se embebieron en parafina. Se realizaron cortes transversales seriados de 5µm de espesor de la porción media de la pared ventricular y se montaron. Los cortes histológicos se colorearon utilizando el método tricrómico de Masson, el cual consiste en colorear los cortes en forma sucesiva con distintas soluciones (hematoxilina férrica de Weigert, fucsina ácida-escarlata de Biebrich, solución de ácido fosfotungsténico/fosfomolibdico y solución de azul de anilina) resultando en la tinción selectiva del núcleo (marrón), citoplasma (rojo) y colágeno (azul). Finalmente, los preparados fueron lavados, deshidratados, clarificados y montados (Garvey, 1984).

II. Análisis digital de los preparados histológicos

Los preparados histológicos se examinaron con una magnificación total de 400X con microscopio y 3 imágenes de campos no superpuestos de cada preparado histológico se digitalizaron (LEICA ICC50 E, Bio-Optic SRL). Las áreas perivasculares se excluyeron del análisis. La evaluación de las imágenes se efectuó utilizando el programa ImageJ 1.49v (NIH, USA). El área correspondiente al colágeno intersticial fue calculada como un porcentaje del área total evaluada a través de la segmentación de colores localizando todos los objetos de color específico (azul). Los resultados se expresan % del área correspondiente a colágeno respecto al área total.

Reactivos

Los kits enzimáticos para las determinaciones de glucosa (*Glicemia enzimática*), triglicéridos (*TG color GPO/PAP AA*), colesterol total (*Colestat enzimático*) y ácido urico (*Uricostat*) fueron provistos por laboratorio Wiener Lab. (Argentina). El kit enzimático para la determinación de AGL (*NEFA*) fue provisto por Randox Laboratories Limited (United Kindom). Los kits para la determinación de TNF α e IL-6, *Thermo Scientific rat TNF α ELISA kit* y *Legend MaxTM ELISA Kit*, fueron provistos por Termo Scientific (USA) y Biolegend

Inc. respectivamente. La insulina porcina y de rata son productos de Novo Nordisk (Dinamarca). El reactivo de Bradford *Protein kit 1.10306.0500* fue provisto por MERK (Alemania). La membrana de PVDF *AmeshamTM HybondTM P0.45* es un producto de GE Healthcare Life science (Alemania). Los marcadores de peso molecular *PageRuler Prestained Protein Ladder #26616* y *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder #26634* y sustratos quimioluminiscentes *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 34077* fueron suministrados por Thermo Fisher Scientific (USA). El reactivo de trizol, la *master mix* y la taq polimerasa son un producto de Invitrogen (USA), los *random primers* y GelRed son de Genbiotech (Argentina) y la transcriptasa reversa MMLV es de Promega Inc. (USA).

Los anticuerpos primarios PPAR α (H98) sc-9000, CPT1-M (H120) sc-20670, CD36 (H-300) sc-9154, AMPK α 1/2 (H-300) sc-25792, pAMPK (Thr172) sc-33524, IRS-1 (C-20) sc-559, UCP2 (N19) sc-6526, GLUT4 (C20) sc-1608, β actina (C4) sc-47778 y secundarios anti-IgG de conejo (sc-2004), anti-IgG de cabra (sc-2354) y anti-IgG de ratón (sc-2005) son productos de Santa Cruz Biotechnology (USA).

Los siguientes reactivos fueron provistos por Sigma-aldrich Inc. (USA): clorhidrato de colina, DL-metionina, trioleína, dipalmitina, hidroxiprolina, albúmina sérica bovina (BSA), α -cetoglutarato, piruvato, palmitoil-CoA, malonil-CoA, L-carnitina, CoA, NAD⁺, NADP⁺, NADH, NADPH, ATP, tiamina pirofosfato (TPP), ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol, α -cetoglutarato deshidrogenasa, glucosa-6P deshidrogenasa, glucosa oxidasa, peroxidasa, lactato deshidrogenasa, fosfoacetilasa, glutation reductasa, DTNB, NTB, p-dimetilaminobenzaldehido, PMS, azul de bromofenol, coomasie azul brillante R-250, ponceau S, HEPES, tris, tritón X-100, tween 20, coctel inhibidor de proteasas P8340, acrilamida, bis-acrilamida, glicina.

Los demás reactivos químicos utilizados son de grado analítico.

Análisis estadístico

El tamaño muestral se calculó teniendo en cuenta determinaciones previas realizadas por nuestro grupo o mediante ensayos preliminares, utilizando el programa G*Power 3.1.9.2 (Universität Düsseldorf, Alemania) considerando el 80% de potencia. La distribución de los

datos se analizó mediante el test de Levene. Los conjuntos de datos que no se distribuyen normalmente se transformaron utilizando la función log 10 previo al análisis estadístico. Las diferencias estadísticas entre los grupos DC y DRS se evaluaron utilizando el test *t* y entre los grupos DC, DRS y DRS+chia se analizaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (dieta) seguido del post test de Newman-Keul para el análisis entre pares de medias. La homogeneidad de las varianzas se analizó mediante el test de Shapiro–Wilk. Los resultados se expresan como la media con su desviación estándar (media ± SEM). Valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software Inc., USA).

CAPÍTULO I

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO I

Características generales, presión sanguínea, ritmo cardíaco y aspectos generales del corazón, de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados crónicamente con una DRS: efectos de la semilla de chia dietaria

Como se describió previamente, la administración crónica de una DRS induce dislipemia, anormal homeostasis de la glucosa e insulino resistencia (Chicco y col., 1994; Lombardo y col., 1996; Chicco y col., 1999; Chicco y col., 2000). De manera similar, hemos demostrado en trabajos previos que, cuando la semilla de chia reemplaza al aceite de maíz como principal fuente de grasa dietaria a partir de los 3 meses de ingesta de DRS, mejora la sensibilidad insulínica normalizando el nivel de lípidos plasmáticos y la glucemia basal (Chicco y col., 2009; Oliva y col., 2013; Rossi y col., 2013). En una primera etapa de este trabajo analizamos algunos aspectos generales que caracterizan al modelo DRS y los efectos de la chia dietaria sobre los parámetros plasmáticos, el incremento del peso corporal, la adiposidad visceral y la sensibilidad insulínica periférica global con el fin de corroborar los resultados previamente demostrados.

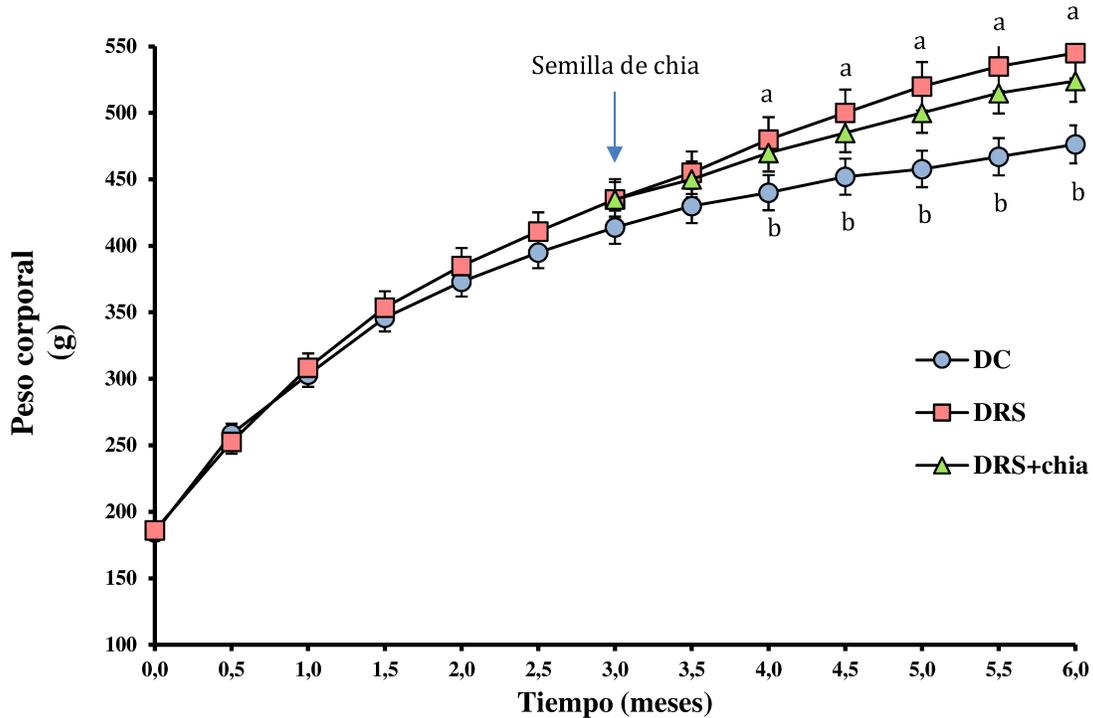
Además, algunos investigadores demostraron que la administración de sacarosa dietaria a animales de experimentación induce hipertensión (Reaven y Ho, 1991; Vrana y col., 1993), sin embargo, los efectos de la administración prolongada de una DRS y los posibles efectos beneficiosos de la semilla de chia dietaria sobre este aspecto no han sido evaluados en este modelo experimental. A fin de analizar estos parámetros realizamos la medición de la presión sanguínea y el ritmo cardíaco durante todo el período experimental. Adicionalmente se determinó el peso del corazón y del ventrículo izquierdo en los animales que recibieron las distintas dietas de acuerdo al protocolo experimental descrito en Materiales y Métodos.

RESULTADOS

Peso corporal, ingesta energética y adiposidad visceral

El peso corporal y la ingesta energética fueron cuidadosamente monitoreados en los tres grupos de animales durante todo el período experimental de 6 meses. En concordancia con resultados previos (Oliva y col., 2013), el grupo DRS presenta un incremento en el peso corporal y en la ingesta energética durante los últimos 3 meses del período de administración de las dietas, en comparación con el grupo DC. Mientras que la ingesta energética fue similar en los grupos DRS y DRS+chia durante este período, el grupo DRS+chia presentó una disminución leve, aunque sin diferencias significativas, en el peso corporal hacia el final del período experimental. Además, como se reportó previamente (Rossi y col., 2013), en el grupo DRS se observa un aumento en el índice de la adiposidad visceral en comparación con el grupo DC. La administración de semilla de chia redujo significativamente el índice mencionado alcanzando valores similares a los del grupo DC (**Figura 8** y **Tabla 8**).

Figura 8 Incremento del peso corporal de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia durante el período experimental



Los valores se expresan como media \pm SEM. Se utilizaron al menos 6 animales en cada grupo experimental. Los valores a cada punto de tiempo que no comparten la misma letra superescrita son significativamente distintos ($P < 0,05$).

Tabla 8 Incremento del peso corporal, ingesta energética y adiposidad visceral de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia

	Tiempo (meses)	Incremento del peso corporal (g)	Ingesta energética (kJ / d)	IAV* (%)
DC	Inicio - 3	230,2 \pm 6,1	294,5 \pm 12,5	
DRS	Inicio - 3	234,3 \pm 6,5	292,0 \pm 7,2	
DC	3 - 6	61,8 \pm 9,4 ^b	291,8 \pm 7,2 ^b	4,1 \pm 0,3 ^b
DRS	3 - 6	117,0 \pm 11,7 ^a	374,0 \pm 9,5 ^a	6,2 \pm 0,4 ^a
DRS+chia**	3 - 6	96,0 \pm 9,4 ^a	356,5 \pm 13,0 ^a	4,5 \pm 0,2 ^b

*IAV: índice de adiposidad visceral

** Cuando la semilla de chia reemplazó al aceite de maíz en la DRS, las ratas consumieron DRS por 3 meses y DRS+chia durante los 3 meses adicionales. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

Los valores se expresan como media \pm SEM. Se utilizaron al menos 6 animales en cada grupo experimental. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra superescrita son significativamente distintos ($P < 0,05$).

Niveles plasmáticos de metabolitos e insulina y sensibilidad insulínica periférica global

Corroborando los resultados obtenidos en trabajos previos (Chicco y col., 2009; Oliva y col., 2013; Rossi y col., 2013), los animales alimentados con DRS presentan un significativo incremento en los niveles plasmáticos de TG, AGL y colesterol total al cabo de los 3 primeros meses de iniciado el período experimental. Esto se acompaña de una moderada hiperglucemia basal sin cambios en los niveles plasmáticos de insulina, pero con una significativa disminución de la sensibilidad insulínica periférica global. Las alteraciones mencionadas se mantienen cuando se prolonga el tiempo de administración de la dieta hasta los 6 meses. La sustitución del aceite de maíz por semilla de chia como fuente de grasa dietaria en la DRS revirtió las anormalidades descriptas sin producir cambios en los niveles de insulina (**Tabla 9**).

Además, los animales alimentados con la DRS durante 6 meses presentan un significativo aumento del nivel plasmático de ácido úrico. La semilla de chia dietaria normalizó este parámetro. Los valores obtenidos fueron: (μM , media \pm SEM, n=6) DC $212,7 \pm 22,3$; DRS $403,7 \pm 29,4$; DRS+chia $201,0 \pm 40,4$. $P < 0,05$ DRS vs. DC y DRS+chia.

Tabla 9 Niveles plasmáticos de metabolitos e insulina y sensibilidad insulínica periférica global (VIG) de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia

	Tiempo (meses)	TG (mM)	AGL (μM)	Colesterol total (mM)	Glucosa (mM)	Insulina (μU/mL)	VIG (μmol/min x kg)
DC	3	0,69 \pm 0,04 ^b	300,1 \pm 16,0 ^b	1,85 \pm 0,10 ^b	6,5 \pm 0,2 ^b	64,1 \pm 3,2	64,7 \pm 2,5 ^a
DRS	3	1,98 \pm 0,08 ^a	716,0 \pm 8,1 ^a	3,21 \pm 0,14 ^a	7,9 \pm 0,1 ^a	62,0 \pm 2,9	37,4 \pm 4,2 ^b
DC	6	0,72 \pm 0,03 ^b	335,0 \pm 13,0 ^b	1,92 \pm 0,11 ^b	6,6 \pm 0,1 ^b	62,0 \pm 2,9	53,0 \pm 2,9 ^a
DRS	6	2,06 \pm 0,17 ^a	760,4 \pm 16,3 ^a	3,60 \pm 0,04 ^a	8,3 \pm 0,1 ^a	65,0 \pm 3,2	31,4 \pm 1,6 ^b
DRS+chia*	6	0,79 \pm 0,08 ^b	363,0 \pm 35,4 ^b	1,75 \pm 0,21 ^b	6,9 \pm 0,1 ^b	67,4 \pm 6,5	50,6 \pm 2,8 ^a

*Cuando la semilla de chia reemplazó al aceite de maíz en la DRS, las ratas consumieron DRS por 3 meses y DRS+chia durante los 3 meses adicionales. Para mas detalles ver Materiales y Métodos.

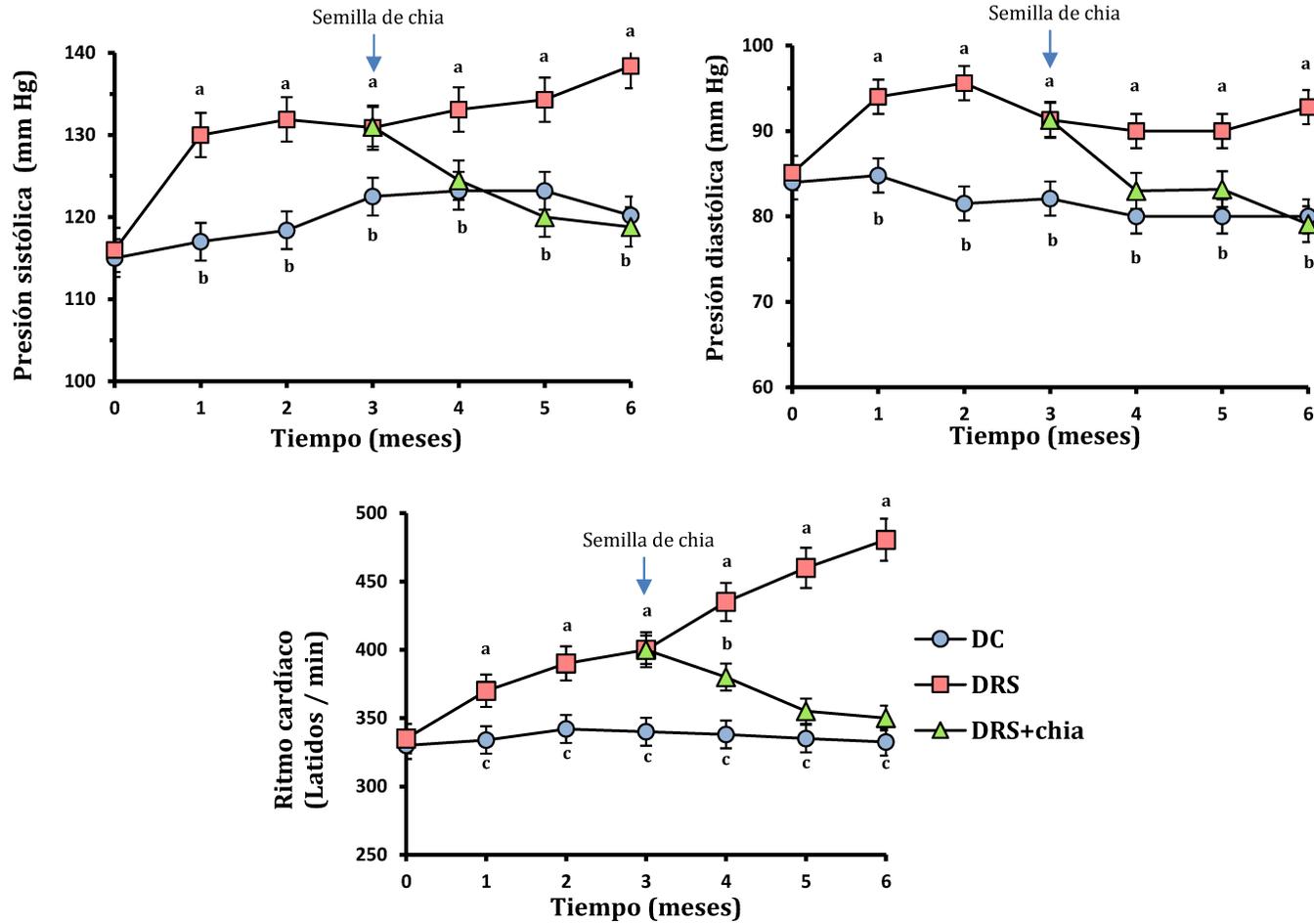
Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra superescrita son significativamente distintos ($P < 0,05$).

Presión sanguínea, ritmo cardíaco, pesos del corazón y del ventrículo izquierdo

En la **Figura 9** se representan la presión sanguínea sistólica y diastólica y el ritmo cardíaco de los animales pertenecientes a los distintos grupos experimentales durante los 6 meses de administración de las dietas. El grupo DRS exhibe un significativo incremento tanto en la presión sistólica como en la diastólica a partir del primer mes de ingesta, acompañado de un aumento significativo del ritmo cardíaco (latidos/min). Este último incrementa aún más en el período de 4 a 6 meses. La semilla de chia incorporada en la DRS en reemplazo del aceite de maíz logra normalizar la presión sanguínea sistólica y diastólica, así como también el ritmo cardíaco a partir de las 4 semanas de ingesta (1 meses de ingesta de chia). Estos valores se mantienen hasta el final del período experimental.

En la **Tabla 10** podemos observar los pesos totales y relativos del corazón y del ventrículo izquierdo de los animales pertenecientes a los distintos grupos dietarios al final del periodo experimental (6 meses). Los animales alimentados con DRS y DRS+chia exhiben un incremento del peso total del corazón y del ventrículo izquierdo respecto al grupo DC, en concordancia con el incremento del peso corporal total. Sin embargo, no se observan diferencias significativas entre los 3 grupos experimentales cuando ambos parámetros se expresan en relación a 100 g de peso corporal o a la longitud de la tibia.

Figura 9 Presión sanguínea sistólica y diastólica y ritmo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia durante el período experimental



Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores a cada punto de tiempo que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Tabla 10 Pesos totales y relativos del corazón y del ventrículo izquierdo de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental

	DC	DRS	DRS+chia
CORAZÓN			
Peso total (g)	1,24 ± 0,01 ^b	1,31 ± 0,03 ^a	1,28 ± 0,02 ^a
Peso total (g)/100 g peso corporal	0,260 ± 0,003	0,250 ± 0,004	0,250 ± 0,005
Peso total (mg)/mm longitud tibia	27,20 ± 1,00	30,10 ± 1,30	28,30 ± 1,00
VENTRÍCULO IZQUIERDO			
Peso total (g)	0,873 ± 0,02 ^b	0,940 ± 0,01 ^a	0,972 ± 0,01 ^a
Peso total (g)/100 g peso corporal	0,189 ± 0,007	0,179 ± 0,003	0,192 ± 0,006
Peso total (g)/mm longitud tibia	19,19 ± 1,20	21,61 ± 1,36	21,49 ± 1,09

Los valores se expresan como media ± SEM, n=6. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Corroborando trabajos previos (Chicco y col., 2009; Rossi y col., 2013; Oliva y col., 2013) en el presente trabajo de tesis constatamos que la sustitución de la fuente de grasa dietaria (aceite de maíz por semilla de chia) en las ratas alimentadas crónicamente con DRS normaliza la adiposidad visceral, la dislipemia, la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad insulínica periférica global.

Por otra parte, los resultados alcanzados demuestran que la administración de una DRS a ratas normales induce hipertensión, así como también un aumento del ritmo cardíaco a partir de las 4 semanas de ingesta de la dieta, en concordancia con resultados alcanzados por otros investigadores (Hwang y col., 1988; Reaven y Ho, 1991; Vrana y col., 1993; Tran y col., 2009). Además, la ingesta de la DRS indujo un aumento del nivel plasmático de ácido úrico y en este sentido, es sabido que la hiperuricemia tiene un importante rol sobre el desarrollo de hipertensión (Mazzali y col., 2001). La administración de febuxostat y allopurinol -inhibidores de la enzima productora de ácido úrico (xantino oxidasa)- en roedores alimentados con dietas ricas en fructosa normaliza los elevados niveles de ácido úrico plasmático previniendo el desarrollo de la hipertensión (Nakagawa y col., 2005; Sánchez-Lozada y col., 2008). Se ha postulado que el ácido úrico actúa inhibiendo la biodisponibilidad de óxido nítrico endotelial (vasodilatador) (Khosla y col., 2005) e incrementando los niveles de la proteína C reactiva (mediador inflamatorio) en las células musculares vasculares (Kang y col., 2005). Otros estudios sugieren que la fructosa induce el desarrollo de hipertensión incrementando la concentración de moléculas con acción vasoconstrictora (endotelina-1, angiotensina II), regulando la absorción salina a nivel del intestino delgado y del riñón y estimulando el sistema nervioso simpático (Tran y col., 2009; Klein y Kiat 2015). Si bien en el presente trabajo de tesis no fueron analizados los mecanismos involucrados en el desarrollo de la hipertensión y en el aumento del ritmo cardíaco observados en el grupo de animales alimentados con la DRS, es posible que la hiperuricemia y el conjunto de los mecanismos mencionados contribuyan al desarrollo de estas alteraciones.

Además, los resultados alcanzados demuestran que la administración de la semilla de chia revirtió la hipertensión, así como también el aumentado ritmo cardíaco presente en las ratas

alimentadas con DRS. Esto se acompañó de la normalización de los niveles plasmáticos de ácido úrico. En concordancia con estos resultados, Poudyal y col. (Poudyal y col., 2012a; Poudyal y col., 2013) observaron que la suplementación de una dieta rica en grasa saturada y fructosa con aceite o semilla de chia, administradas durante 8 y 24 semanas, respectivamente a ratas macho Wistar, revierte la hipertensión mejorando la deteriorada función cardíaca.

Los mecanismos por los cuales la semilla de chia, el ALA u otros componentes de la semilla (ej. antioxidantes como la quercetina, fibra) mejora la presión sanguínea no han sido aún completamente analizados. Sin embargo, algunos trabajos nos dan algunas pistas. La sustitución de aceite de girasol por aceite rico en ALA en una dieta control administrada por 6 semanas a ratas Wistar-Kyoto con hipertensión espontánea (SHR) redujo la presión sistólica como consecuencia de la disminución de la expresión y la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en aorta (Ogawa y col., 2009). Además, la administración de ALA en una dieta control a ratas Zucker obesas redujo la hipertensión mejorando la función cardíaca (Barbeau y col., 2017).

Por otra parte, Yan y col. (Yan y col., 2013) demostraron que la administración de quercetina a ratas SHR disminuye la hipertensión de manera dosis dependiente. En concordancia, la suplementación con quercetina de una dieta rica en grasa saturada y fructosa por 8 semanas disminuye la hipertensión sanguínea (Panchal y col., 2012).

** De lo expuesto, es posible que la reversión de la hipertensión presente en los animales alimentados con la DRS+chia sea, al menos en parte, resultado de la normalización del nivel plasmático de ácido úrico. Sin embargo, no podemos descartar que efectos cooperativos del ALA, la quercetina, otros antioxidantes, la fibra y demás componentes de la semilla de chia contribuyan con nuestros hallazgos.*

CAPÍTULO II

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO II

Parte I: Metabolismo lipídico del músculo cardíaco de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados crónicamente con una DRS: efectos de la semilla de chia dietaria

Como se describió previamente, la dislipemia y resistencia insulínica inducidas nutricionalmente por la administración de una DRS a ratas macho Wistar normales induce un incremento intracelular del contenido de lípidos en el músculo cardíaco (Chicco y col., 1991; Chicco y col., 1994; Montes y col., 2000; D`Alessandro y col., 2008).

En función de estos hallazgos, consideramos importante como primer objetivo analizar: i- algunos mecanismos subyacentes claves implicados en el metabolismo de los lípidos en el corazón de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados con DRS; ii- investigar si una intervención nutricional: el reemplazo del aceite de maíz por semilla de chia como fuente de grasa dietaria puede mejorar y/o revertir la lipotoxicidad, analizando algunos de los mecanismos involucrados en estas anomalías bioquímicas-metabólicas. Para lograr estos objetivos determinamos: el contenido de TG, LC-acil-CoA y DAG; la actividad enzimática de la M-CPT1; los niveles de la masa proteica del FAT/CD36, el PPAR α , la M-CPT1 y la UCP2 en los tres grupos de animales que recibieron las dietas de acuerdo al protocolo experimental descrito en Materiales y Métodos.

RESULTADOS

Contenido de lípidos

La **Tabla 11** muestra un significativo incremento en el contenido de lípidos (TG, LC-acil-CoA y DAG) en el músculo cardíaco de los animales pertenecientes al grupo DRS. La sustitución de la fuente de grasa dietaria (aceite de maíz por semilla de chia) en la DRS decreció significativamente los niveles lipídicos alcanzando valores semejantes al grupo DC.

Tabla 11 Contenido de lípidos en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental

	DC	DRS	DRS+chia
LÍPIDOS			
TG ($\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo)	$3,60 \pm 0,22^b$	$6,03 \pm 0,34^a$	$4,44 \pm 0,60^b$
LC-acil-CoA (nmol/g tejido húmedo)	$31,4 \pm 5,5^b$	$68,0 \pm 4,0^a$	$45,8 \pm 5,5^b$
DAG (nmol/g tejido húmedo)	$250,8 \pm 19,5^b$	$355,3 \pm 15,4^a$	$276,6 \pm 24,0^b$

Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores de cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Niveles de la masa proteica del transportador de ácidos grasos FAT/CD36. Actividad enzimática y nivel de la masa proteica de la proteína mitocondrial M-CPT1

El acúmulo intracelular de lípidos en el músculo cardíaco depende de la captación de ácidos grasos desde el plasma y de su metabolización. El transportador de ácidos grasos FAT/CD36 y la enzima M-CPT1 cumplen un rol clave en estos procesos. Además, estudios *in vitro* señalan que la insulina regula positivamente los niveles del FAT/CD36 en la membrana plasmática induciendo su translocación desde el sarcoplasma hacia el sarcolema de la célula muscular cardíaca.

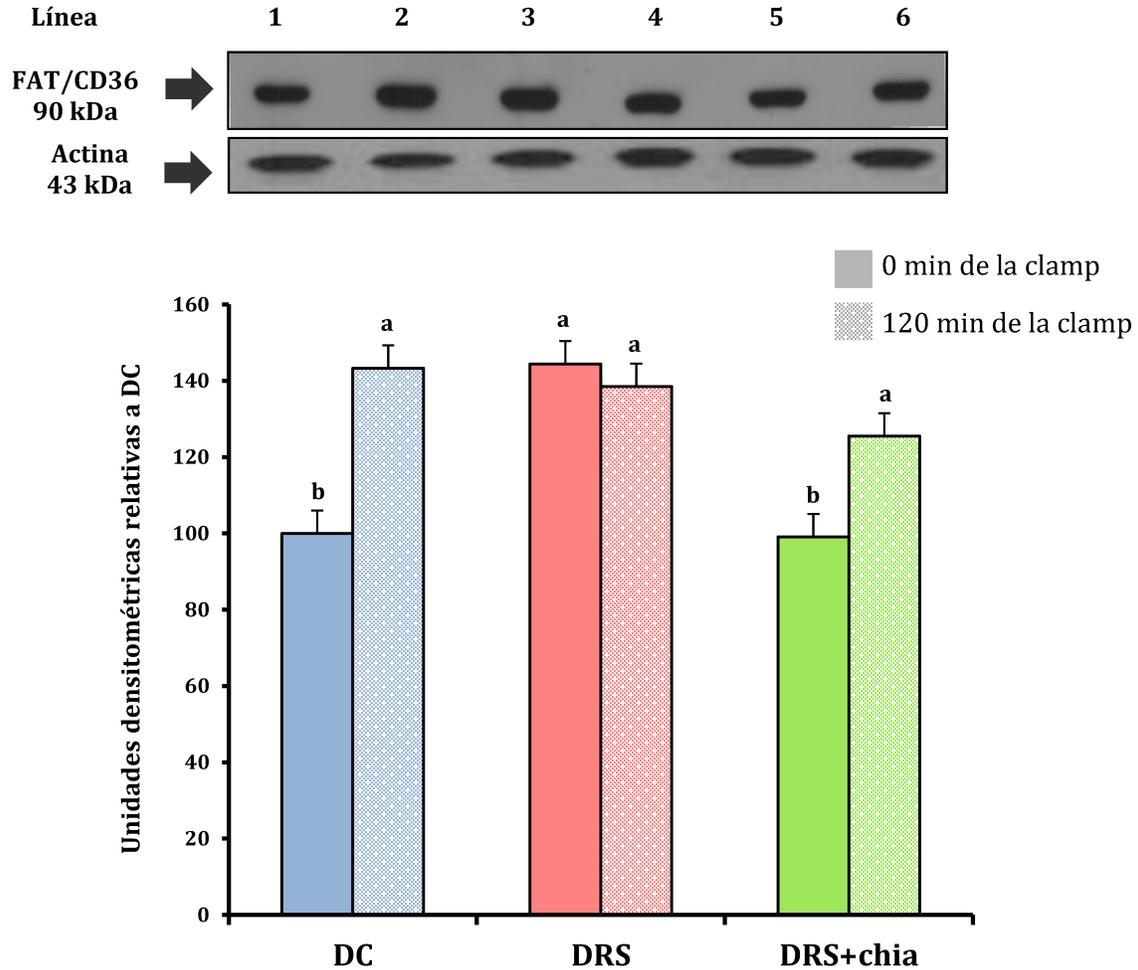
De lo expuesto y en el contexto de los resultados obtenidos evaluamos los niveles de masa proteica del FAT/CD36 en condiciones basales (previas) y posteriores al estímulo de la

insulina (inicio y final de la clamp euglucémica hiperinsulinémica) en el músculo cardíaco de los animales de los distintos grupos de experimentación.

La **Figura 10** muestra los niveles de la masa proteica del FAT/CD36 al inicio y final (tiempo 0 y 120 min) de la clamp euglucémica hiperinsulinémica. El inmunoblot del tejido cardíaco reveló una sola banda de 90 kDa consistente con el FAT/CD36. Luego de la densitometría de los inmunoblots, el nivel de la masa proteica del FAT/CD36 del grupo DC al tiempo 0 min de la clamp se normalizó al 100% y los niveles de la masa proteica del FAT/CD36 de los grupos DRS y DRS+chia al tiempo 0 min así como de los 3 grupos experimentales al tiempo 120 min de la clamp se expresaron como porcentaje relativo al grupo DC al tiempo 0 min de la clamp.

En condiciones basales (tiempo 0 min de la clamp), el análisis cualitativo y cuantitativo de los western blot muestran un incremento significativo en la abundancia relativa del FAT/CD36 en el grupo DRS en comparación con los grupos DC y DRS+chia, este último alcanzó valores similares a los del grupo DC. Al final de la clamp (tiempo 120 min) se observa un estímulo de la acción insulínica sobre el FAT/CD36 en el sarcolema en el grupo DC (DC 0 min vs 120 min de la clamp) mientras que, notablemente, la insulina no fue capaz de incrementar el nivel del FAT/CD36 en el sarcolema en el grupo DRS (DRS 0 min vs 120 min de la clamp). Finalmente, las alteraciones en los niveles del FAT/CD36 inducidos por la DRS se revirtieron en el grupo DRS+chia, observándose un comportamiento similar al grupo DC.

Figura 10 Niveles de la masa proteica del FAT/CD36 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia en condiciones previas y posteriores al estímulo con insulina (tiempo 0 y 120 min de la clamp) al final del período experimental



Parte superior: inmunoblot representativo del FAT/CD36 y de la proteína de referencia (actina) del músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. El peso molecular se muestra a la izquierda. Línea 1, DC 0 min; línea 2, DC 120 min; línea 3, DRS 0 min; línea 4, DRS 120 min; línea 5, DRS+chia 0 min; línea 6, DRS+chia 120 min.

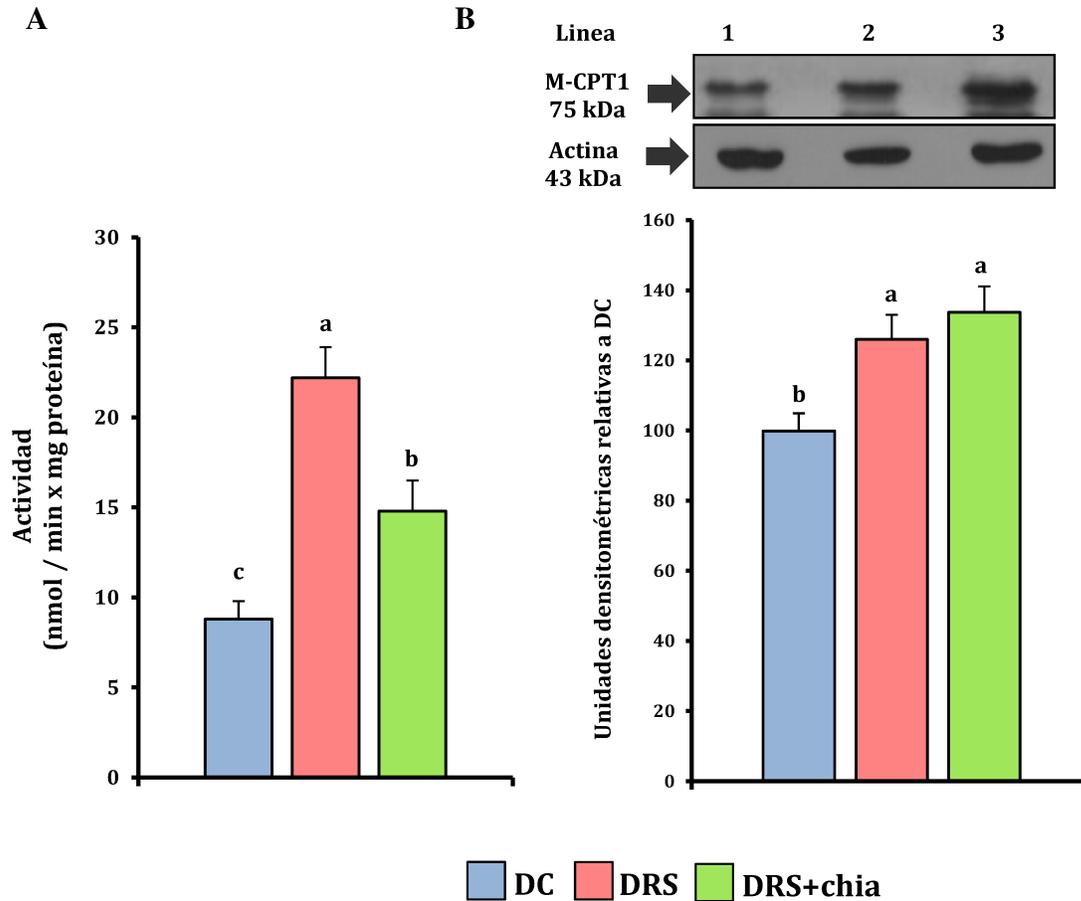
Parte inferior: análisis densitométrico del inmunoblot del FAT/CD36 en músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se corrigieron respecto a los niveles de actina y se representan como porcentaje relativo a DC al tiempo 0 min de la clamp. Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Como mencionamos anteriormente, el incremento intracelular de lípidos es resultado de la mayor disponibilidad y captación de ácidos grasos desde el plasma, así como de su metabolización (oxidación, reesterificación, entre otras vías). La actividad de la M-CPT1 es clave en la vía de oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, por lo que evaluamos la actividad enzimática de la M-CPT1 y el nivel de su masa proteica.

En comparación con el grupo DC, se observó un significativo incremento de la actividad enzimática de la M-CPT1 en el corazón de las ratas alimentadas con la DRS. La administración de semilla de chia redujo significativamente la actividad de esta enzima en el grupo DRS, aunque sin alcanzar los niveles normales (**Figura 11 A**). No se observaron diferencias significativas en la actividad enzimática de la CPT2 entre los 3 grupos experimentales, los valores obtenidos fueron: (nmol/min x mg proteína; media \pm SEM, n=6): DC $11,3 \pm 1,0$; DRS $12,8 \pm 1,0$; DRS+chia $11,0 \pm 1,0$.

El inmunoblot del tejido cardíaco reveló una sola banda de 75 kDa consistente con la M-CPT1. Luego del análisis densitométrico de los inmunoblots, el nivel de la masa proteica de la M-CPT1 del grupo DC se normalizó al 100% y los niveles de la masa proteica de la M-CPT1 de los grupos DRS y DRS+chia se expresaron como porcentaje relativo al grupo DC. Cuantitativa y cualitativamente, el análisis del western blot mostró que la abundancia relativa de la M-CPT1 es significativamente mayor en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DRS comparados con sus controles etarios. Por otra parte, la administración de la chia dietaria no modificó los elevados niveles observados en el grupo DRS (**Figura 11 B**).

Figura 11 Actividad enzimática y nivel de la masa proteica de la M-CPT1 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



A: Actividad enzimática de la M-CPT1 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

B: *Parte superior:* inmunoblot representativo de la M-CPT1 y de la proteína de referencia (actina) del músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. El peso molecular se muestra a la izquierda. Línea 1, DC; línea 2, DRS; línea 3, DRS+chia. *Parte inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de la M-CPT1 en músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se corrigieron respecto a los niveles de actina y se representan como porcentaje relativo al grupo DC. Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Nivel de la masa proteica del receptor nuclear PPAR α

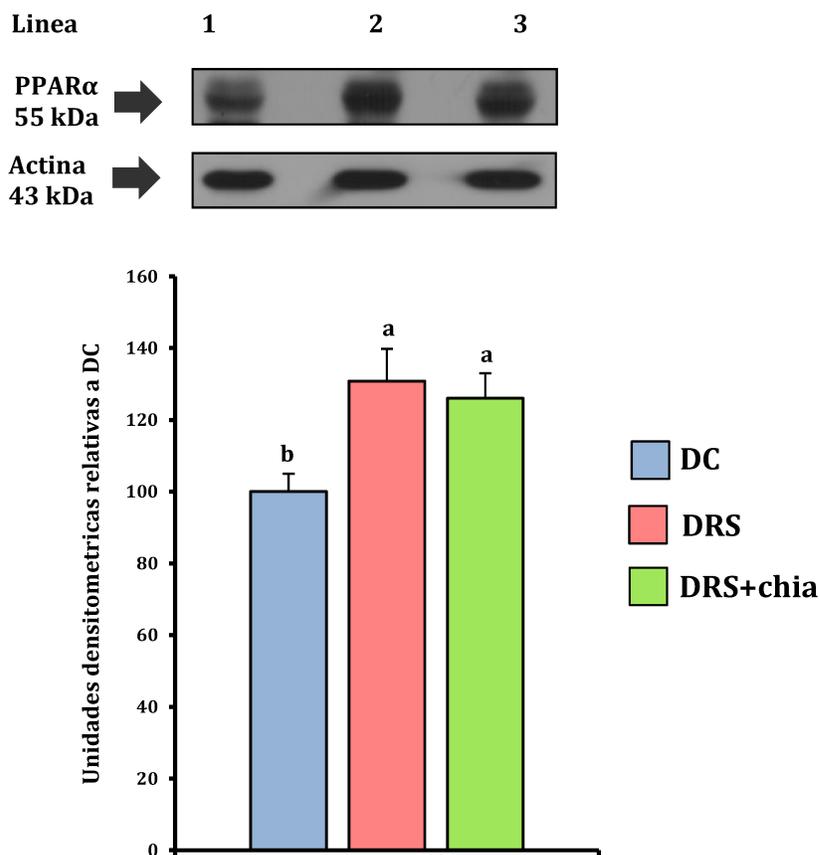
El receptor nuclear PPAR α , es un regulador central del metabolismo de los ácidos grasos por lo que resulta oportuno evaluar sus niveles de masa proteica en el músculo cardíaco de los animales alimentados con las distintas dietas experimentales.

En la **Figura 12** podemos observar el inmunoblot del tejido cardíaco, el cual reveló una sola banda de 55 kDa consistente con el PPAR α . Luego del análisis densitométrico de los inmunoblots, el nivel de la masa proteica del PPAR α del grupo DC se normalizó al 100% y los niveles de la masa proteica del PPAR α de los grupos DRS y DRS+chia se expresaron como porcentaje relativo al grupo DC. El análisis cualitativo y cuantitativo mostró un incremento significativo en la abundancia relativa del PPAR α en el grupo DRS respecto al grupo DC. Así mismo, en el grupo DRS+chia los niveles del PPAR α se mantuvieron elevados siendo similares a los observados en el grupo DRS.

Nivel de la masa proteica de la proteína desacoplante UCP2

El incremento en la concentración de ácidos grasos y el PPAR α puede inducir la expresión de la UCP2, por lo que en base a los resultados obtenidos es interesante analizar los niveles de su masa proteica en el músculo cardíaco de las ratas pertenecientes a los distintos grupos dietarios. El inmunoblot de la UCP2 del tejido cardíaco reveló una sola banda de 33 kDa consistente con la UCP2. Luego del análisis densitométrico de los inmunoblots, el nivel de la masa proteica de la UCP2 del grupo DC se normalizó al 100% y los niveles de la masa proteica de la UCP2 de los grupos DRS y DRS+chia se expresaron como porcentaje relativo al grupo DC. El análisis cualitativo y cuantitativo demostró niveles similares de la masa proteica de la UCP2 en los 3 grupos experimentales (**Figura 13**).

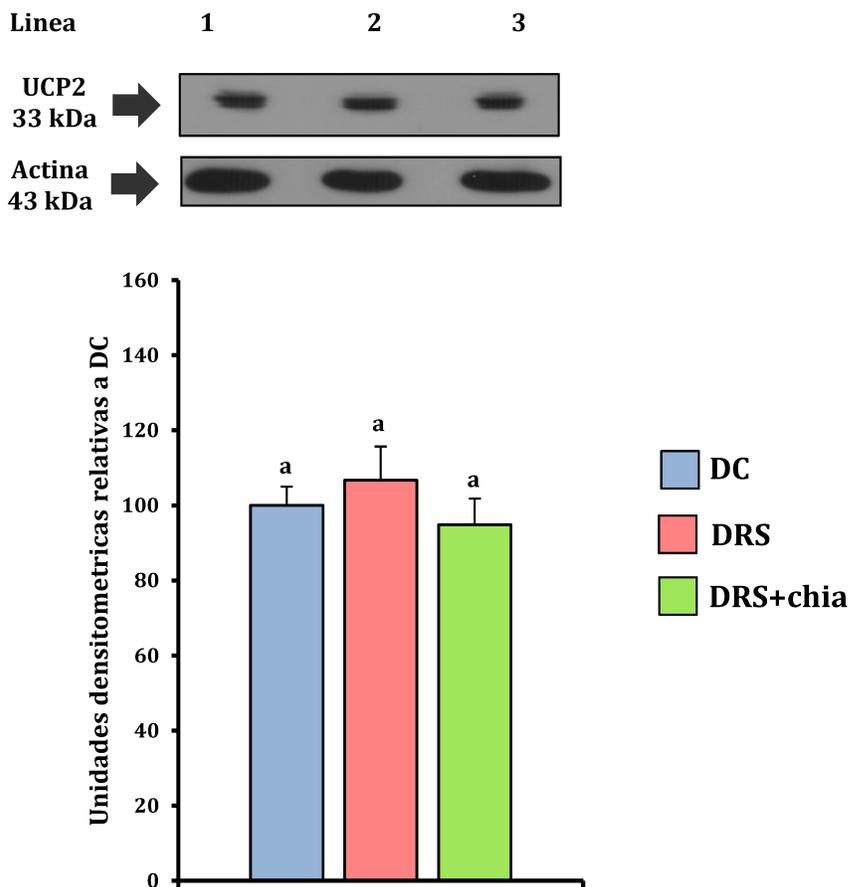
Figura 12 Nivel de la masa proteica del PPAR α en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



Parte superior: inmunoblot representativo del PPAR α y de la proteína de referencia (actina) en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. El peso molecular se muestra a la izquierda. Línea 1, DC; línea 2, DRS; línea 3, DRS+chia.

Parte inferior: análisis densitométrico del inmunoblot del PPAR α en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se corrigieron respecto a los niveles de actina y se representan como porcentaje relativo al grupo DC. Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Figura 13 Nivel de la masa proteica de la UCP2 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



Parte superior: inmunoblot representativo de la UCP2 y de la proteína de referencia (actina) en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. El peso molecular se muestra a la izquierda. Línea 1, DC; línea 2, DRS; línea 3, DRS+chia.

Parte inferior: análisis densitométrico del inmunoblot de la UCP2 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se corrigieron respecto a los niveles de actina y se representan como porcentaje relativo al grupo DC. Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

El presente estudio provee nueva información sobre los mecanismos involucrados en la lipotoxicidad del músculo cardíaco en los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados con una DRS. Además, explora los posibles efectos beneficiosos de la administración de semilla de chia dietaria sobre el mejoramiento/reversión de las anormalidades bioquímicas-metabólicas del metabolismo lipídico cardíaco pre-existentes en este modelo experimental.

Como se expuso previamente, la exposición crónica del músculo cardíaco a elevados niveles de lípidos plasmáticos y/o la disrupción del balance del metabolismo de los lípidos que conllevan a un incremento del contenido de lípidos intracelulares y metabolitos de los ácidos grasos, se asocian estrechamente con el desarrollo del daño y la disfunción cardíaca (Belke y col., 2000; Zhou y col., 2000; Chiu y col., 2001; Finck y col., 2002; Yagyu y col., 2003; Mazumder y col., 2004; Buchanan y col., 2005; Chiu y col., 2005; How y col., 2006; Yang y col., 2007).

El transportador de ácidos grasos FAT/CD36 tiene una función clave en la captación de los ácidos grasos por el músculo cardíaco. En el presente trabajo demostramos que el incremento del contenido intracelular LC-acil-CoA y TG en el corazón de los animales alimentados con DRS se acompaña de un significativo aumento del nivel de la masa proteica del FAT/CD36 en la membrana plasmática, sugiriendo que el incremento del FAT/CD36 induce un aumento de la captación de ácidos grasos por el cardiomiocito. Al respecto, una mayor disponibilidad de AGL y TG plasmáticos se observa en este grupo.

En concordancia con estos resultados, Ouwens y col. (Ouwens y col., 2007) demostraron que la disfunción contráctil cardíaca observada en ratas Wistar insulino resistentes alimentadas con una dieta alta en grasa, se acompaña de un incremento de la presencia del FAT/CD36 en el sarcolema, incrementando la captación de los ácidos grasos y su esterificación en TG en los cardiomiocitos aislados. Más aún, el mismo grupo de investigadores demostró que la inhibición química e inmunoquímica del FAT/CD36 *in vitro* previene la lipotoxicidad en los cardiomiocitos de estos animales (Glatz y col., 2013).

Por otra parte, la insulina incrementa la presencia del FAT/CD36 en el sarcolema del músculo cardíaco de los animales del grupo DC. Sin embargo, la hormona fue incapaz de incrementar la abundancia relativa del transportador en el sarcolema en el corazón de los animales del grupo DRS. El corazón de estos animales es completamente insensible al estímulo de la hormona. De manera similar, el aumento de la captación de ácidos grasos y del contenido de TG en cardiomiocitos aislados de ratas Zucker obesas, en comparación con las ratas normales, se asocia con un incremento de la abundancia del FAT/CD36 en el sarcolema, en condiciones basales, a expensas de una disminución en los endosomas intracelulares. Mientras que la adición de insulina al medio de cultivo indujo la translocación de FAT/CD36 desde los endosomas intracelulares hacia el sarcolema en los cardiomiocitos de las ratas normales, este comportamiento estuvo ausente en los miocitos aislados del músculo cardíaco de las ratas obesas (Coort y col., 2004).

El incremento de acil-CoA y su esterificación en TG no solo resulta del grado de captación de ácidos grasos, sino también de su metabolismo. Se ha demostrado que el corazón aislado perfundido con C¹⁴-glucosa y H³-palmitato de ratones con obesidad y diabetes genéticas (ob/ob y db/db respectivamente), donde están presentes la dislipemia e insulino resistencia, la acumulación intracelular de lípidos se acompaña de un aumento de la oxidación de palmitato en detrimento de la oxidación de glucosa (Belke y col., 2000; Mazumder y col., 2004; Buchanan y col., 2005; How y col., 2006). Alteraciones similares encontraron en el corazón de animales alimentados con una dieta alta en grasa (Wilson y col., 2007).

Los resultados alcanzados en el presente trabajo demuestran que la lipotoxicidad del músculo cardíaco de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados con una DRS se acompaña de un significativo aumento de la actividad enzimática y del nivel de la masa proteica de la M-CPT1. Si bien no evaluamos directamente la oxidación de los ácidos grasos en el presente modelo experimental, un ensayo previo de nuestro grupo basado en la perfusión del corazón aislado con un medio conteniendo glucosa y un inhibidor específico de la M-CPT1 (Etomoxir, POCAII), sugiere que el corazón de los animales que reciben una DRS crónicamente presenta un aumento en la utilización de los ácidos grasos a expensas de la utilización de glucosa (Chicco y col., 1991).

En concordancia, utilizando un modelo experimental de diabetes tipo 2, inducido por la administración de una dieta alta en grasa y fructosa y una dosis de streptozotocina (STZ) (25 mg/kg), Ménard y col. (Ménard y col., 2010) demostraron *in vivo* que el corazón de estos animales presenta un marcado incremento de la captación de los ácidos grasos. Esto se encuentra asociado a un incremento de la actividad de la M-CPT1. Además, Neves y col. (Neves y col., 2014) observaron que el incremento del contenido intracelular de lípidos y el aumento del nivel de la masa proteica de la M-CPT1 en el músculo cardíaco de ratones alimentados con una dieta occidental (rica en grasas saturadas y carbohidratos simples) se acompaña de una disminución de la función mitocondrial.

De lo expuesto los resultados alcanzados sugieren que, no solo la mayor disponibilidad de lípidos induce la lipotoxicidad en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DRS, sino que el incremento del FAT/CD36 en la membrana sarcoplasmática es clave en este proceso. Además, el aumento del nivel de la masa proteica de M-CPT1 y su actividad es en parte un mecanismo responsable de la mayor oxidación de los ácidos grasos observada en el músculo cardíaco de estos animales. Es posible que el aumentado flujo de ácidos grasos al cardiomiocito exceda su capacidad oxidativa mitocondrial acumulándose en el interior celular.

Algunas líneas de evidencia basadas en ensayos *in vitro* con cardiomiocitos aislados, sugieren que los ácidos grasos de cadena larga, inducen la expresión génica de la M-CPT1, la cual está bajo el control transcripcional del PPAR α , mediante la activación de este receptor nuclear (Brandt y col., 1998; van der Lee y col., 2000). En este contexto, en el presente estudio demostramos que el significativo incremento de la abundancia relativa de la masa proteica y de la actividad de la M-CPT1 se acompaña de un aumento significativo del nivel de la masa proteica del PPAR α en el músculo cardíaco de los animales dislipémicos insulino resistentes (grupo DRS).

En esta línea, Georgiadi y col. (Geordiadi y col., 2012) realizaron un detallado análisis transcriptómico del músculo cardíaco intacto de ratones normales y con delección del PPAR α ^{-/-} a los cuales se les administró oralmente una dosis de ácidos grasos insaturados de cadena larga (oleico 18:1 n-9, LA 18:2 n-6, ALA 18:3 n-3 y DHA 22:6 n-3). Los resultados

demonstraron que la ingesta de estos ácidos grasos causa una marcada inducción de genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos mediante la activación del PPAR α .

Buchanan y col. (Buchanan y col., 2005) evaluaron la progresión del desarrollo de la alteración de la oxidación de sustratos (lípidos-glucosa) del músculo cardíaco utilizando modelos murinos de obesidad y diabetes (ob/ob y db/db respectivamente). En concordancia con nuestros resultados, estos autores observaron un incremento en la expresión del PPAR α y algunos de sus genes blanco (MCAD, LCAD y VLCAD; PDK4; UCP2 y UCP3) a partir del comienzo de la dislipemia (aumento de AGL y TG plasmáticos).

El rol crítico del PPAR α sobre la regulación de la utilización de lípidos ha sido también estudiado utilizando modelos murinos de sobre-expresión cardíaca y pérdida de función del PPAR α (ratones MHC-PPAR α y PPAR $\alpha^{-/-}$, respectivamente). Ratones MHC-PPAR α exhiben una aumentada captación de palmitato *in vivo* y una incrementada oxidación de palmitato (64%) en corazón aislado, debido al aumento de la expresión génica y de la actividad enzimática de la M-CPT1, además del aumento de la expresión de otros genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos (ej. CD36, ACO, UCP3), lo cual se acompaña de disfunción cardíaca. El fenotipo cardíaco de estos ratones es similar al de ratones diabéticos db/db o con diabetes inducida con STZ (Fick y col., 2002). Más aún, estas características se exacerban cuando los animales son alimentados con dietas altas en grasa o presentan disminución de los niveles de insulina plasmática, ambas situaciones incrementan los niveles de los ácidos los grasos circulantes (Fink y col., 2003). Además, el corazón de ratones PPAR $\alpha^{-/-}$ presenta una marcada reducción de la utilización de palmitato (~60%). Esto se asocia con una disminución de la actividad de la enzima MCD y consecuentemente con un aumento de los niveles de malonil-CoA, sugiriendo otro mecanismo por el cual el PPAR α podría regular la oxidación de los ácidos grasos. Esto implicaría la inducción de la expresión de la MCD mediante el PPAR α , lo cual resulta en una disminución de los niveles de malonil-CoA incrementando la actividad de la M-CPT1 (Campbell y col., 2002).

Por otra parte, es sabido que el PPAR α regula la expresión génica del FAT/CD36 (Huss y Kelly, 2004). Ménard y col. (Ménard y col., 2010) y Finck y col. (Finck y col., 2002) observaron un aumento de la expresión del mRNA del FAT/CD36 en ratas con diabetes tipo 2 y en ratones MHC-PPAR α respectivamente. En el presente trabajo no evaluamos los

niveles de la masa proteica del transportador en los endosomas. Los resultados presentados corresponden a la fracción de la membrana plasmática del músculo cardíaco, por lo cual no podemos descartar que nuestros hallazgos sean no solo el resultado de cambios en la localización subcelular del FAT/CD36, sino, además de la inducción de su expresión mediante el PPAR α .

Por lo tanto, los resultados alcanzados en el presente trabajo sugieren que la activación del PPAR α -frente al aumento en la disponibilidad de lípidos plasmáticos- es clave en la incrementada captación y oxidación de los ácidos grasos observados en el modelo de dislipemia e insulino resistencia inducida por la DRS.

Li y col. (Li y col., 2010) demostraron que el PPAR α regula, en cardiomiocitos de rata adulta, la expresión de la UCP2. Por otro lado, en el corazón de ratones obesos ob/ob y diabéticos db/db se demostró que el incremento de la oxidación de ácidos grasos se asocia con un mayor consumo de oxígeno (MVO $_2$) y una disminución de la eficiencia cardíaca, sugiriendo la presencia de desacople mitocondrial. Más aún, el incremento del MVO $_2$ y la disminución de la eficiencia cardíaca en el corazón de estos animales se asocian con un incremento de los niveles de mRNA de la UCP2, la UCP3 y del PPAR α (Mazumder y col., 2004; Buchanan y col., 2005). En concordancia, la lipotoxicidad del músculo cardíaco de ratones obesos -alimentados con una dieta rica en carbohidratos simples y grasa saturada- se asocia con una disminución de la capacidad oxidativa mitocondrial y un déficit energético acompañado por un aumento del nivel de la masa proteica de la UCP2 (Neves y col., 2014).

Por otro lado, Young y col. (Young y col., 2001) y Murray y col. (Murray y col., 2005) evaluaron el rol de los ácidos grasos plasmáticos y la activación del PPAR α sobre la inducción de las proteínas desacoplantes UCP2 y UCP3 en el músculo cardíaco utilizando un modelo murino con pérdida de función del PPAR α (PPAR $\alpha^{-/-}$), un modelo de diabetes tipo 1 -inducida por STZ- y ratones con diabetes tipo 2 (db/db). Los resultados demostraron que los niveles de masa proteica de la UCP2 y la UCP3 son sensibles al incremento de los ácidos grasos plasmáticos y están bajo el control del PPAR α . Sin embargo, la expresión de la UCP2 parece estar controlada por mecanismos independientes del PPAR α .

Nuestros resultados no muestran cambios en la abundancia relativa de la UCP2 en el corazón de los animales alimentados con DRS aún cuando se observa un incremento significativo de la masa proteica del PPAR α . Los estudios de Young y col. (Young y col., 2001) y Murray y col. (Murray y col., 2005) podrían explicar en parte nuestros hallazgos.



En conclusión, la disrupción del balance entre la captación-oxidación-acúmulo de lípidos, como consecuencia de una mayor disponibilidad de los mismos en el plasma y la presencia de resistencia insulínica, conduciría a favorecer la lipotoxicidad y la posible disfunción del músculo cardíaco en los animales alimentados con DRS. El FAT/CD36, la M-CPT 1 y el PPAR α jugarían un rol clave en los mecanismos subyacentes a estas anomalías.

Por otra parte, como se expuso previamente, dietas ricas en ALA ejercen un efecto protector sobre las ECV (Pan y col., 2012). El presente trabajo demuestra que la reversión de la dislipemia y la resistencia insulínica periférica global en los animales que recibieron la DRS con semilla de chia se acompañó de la normalización del contenido intracelular de lípidos en el músculo cardíaco. Resultados similares fueron observados por Oliva y col. (Oliva y col., 2013) en músculo gastronemio de ratas alimentadas crónicamente con DRS en presencia de chia.

En el sarcolema del músculo cardíaco de los animales alimentados con DRS, cuando la chia reemplazó al aceite de maíz como fuente grasa dietaria, se observó una disminución de la abundancia relativa de la masa proteica del FAT/CD36 en condiciones basales. A diferencia de lo observado en el corazón de los animales alimentados con la DRS, la insulina indujo un aumento del FAT/CD36 al sarcolema de manera similar a lo observado en los animales controles.

Al presente son escasos los estudios (Pudyal y col., 2012b) que evalúan los efectos de la administración dietaria por períodos prolongados de chia o ALA sobre el metabolismo lipídico del músculo cardíaco. Nuestros hallazgos sugieren que la disminución de la disponibilidad de lípidos plasmáticos y los niveles normales de la masa proteica del FAT/CD36 en el sarcolema de los animales alimentados con una DRS con semilla de chia,

en condiciones basales, conduce a un menor flujo de ácidos grasos al interior del cardiomiocito disminuyendo el contenido lipídico intracelular.

Por otro lado, en comparación con el grupo DC, los niveles de la masa proteica del PPAR α y de su enzima blanco, M-CPT1, se mantuvieron aún elevados en el grupo DRS+chia, los valores obtenidos fueron similares al grupo DRS. Sin embargo, la actividad enzimática de la M-CPT1 disminuyó significativamente pero aún sin alcanzar los valores normales.

Nuestros resultados no proveen información sobre los mecanismos subyacentes del efecto de la semilla de chia sobre el receptor nuclear PPAR α o sobre otros receptores nucleares relacionados con el PPAR α , involucrados en la regulación del metabolismo cardíaco (ej: PGC-1 α). Existen algunas claves que nos ayudan a interpretar estos fenómenos. Se ha demostrado que la administración de ALA a ratones normales induce la expresión de genes involucrados en el metabolismo de los ácidos grasos mediante la activación del PPAR α , y sus efectos son más potentes en comparación con los efectos del LA (Georgiadi y col., 2012). Por lo tanto, es plausible que, aunque la disponibilidad de lípidos plasmáticos se normalice, el cambio en el perfil de los ácidos grasos plasmáticos (incremento de ALA, EPA, DHA y DPA, así como la relación n-3/n-6) inducido por la administración de la chia (demostrado previamente por Chicco y col., 2009) mantenga elevados los niveles de la masa proteica del PPAR α y de su proteína blanco M-CPT1. En esta línea, utilizando un diseño experimental similar al del presente trabajo, la administración de chia indujo un incremento del nivel de la masa proteica del PPAR α incrementado la actividad CPT1 en hígado de ratas alimentadas crónicamente con DRS (Rossi y col., 2013).



Finalmente, los resultados alcanzados sugieren que la reversión de la elevada disponibilidad de lípidos plasmáticos y la normalización del FAT/CD36 en el músculo cardíaco inducida por la semilla de chia, disminuye el flujo intracelular de los ácidos grasos y normaliza la lipotoxicidad mejorando la oxidación de los ácidos grasos. Los mecanismos que regulan este proceso podrían ser, entre otros: i) independientes del PPAR α ; ii) dependiente del cambio de otros factores involucrados en la regulación del PPAR α ; iii) dependientes del tiempo de administración de la semilla de chia. La reducción de la lipotoxicidad podría implicar una mejor

oxidación de la glucosa en el músculo cardíaco en los corazones de los animales alimentados con DRS+chia. Este aspecto es analizado en la próxima sección.

Parte II: Metabolismo de la glucosa del músculo cardíaco de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados crónicamente con DRS: efectos de la semilla de chia dietaria

Trabajos de investigación previos de nuestro grupo utilizando un modelo experimental nutricional similar al del presente estudio demostraron que el incremento del contenido de TG en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DRS se acompaña de un deterioro de la utilización de la glucosa (Chicco y col., 1991; Chicco y col., 1994; Montes y col., 2000; D`Alessandro y col., 2008).

Considerando estos antecedentes y los resultados obtenidos previamente, el siguiente objetivo fue evaluar: i- algunos mecanismos claves implicados en el metabolismo de la glucosa en el corazón de los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados con DRS; ii- investigar si una intervención nutricional: el reemplazo del aceite de maíz por semilla de chia como fuente de grasa dietaria puede mejorar y/o revertir las alteraciones del metabolismo de la glucosa en el músculo cardíaco de estos animales. Para lograr estos objetivos analizamos: i- niveles de metabolitos (glucosa-6P, glucógeno) y actividad de las enzimas HQ y el PDHc; ii- niveles de la masa proteica del GLUT4 en condiciones basales y frente al estímulo de la insulina; iii- niveles de la masa proteica del IRS1, la AMPK y la pAMPK; iv- además determinamos la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos. Las determinaciones se realizaron en el músculo cardíaco en los tres grupos de animales que recibieron las dietas de acuerdo al protocolo experimental descrito en Materiales y Métodos.

RESULTADOS

Niveles de glucosa-6P y glucógeno y actividad de la enzima hexoquinasa (HQ)

En la **Tabla 12** podemos observar los niveles de metabolitos de la glucosa, glucosa-6P y glucógeno, y la actividad de la enzima involucrada en la fosforilación de la glucosa (HQ). El músculo cardíaco de los animales alimentados crónicamente con DRS presenta una disminución significativa tanto de la actividad de la HQ, así como de los niveles de glucosa-6P y glucógeno en comparación con el grupo DC. Los presentes datos muestran que la semilla de chia fue capaz de revertir todos estos parámetros alcanzando valores similares a los del grupo DC.

Tabla 12 Contenido de glucosa-6P y glucógeno y actividad enzimática de la HQ, en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental

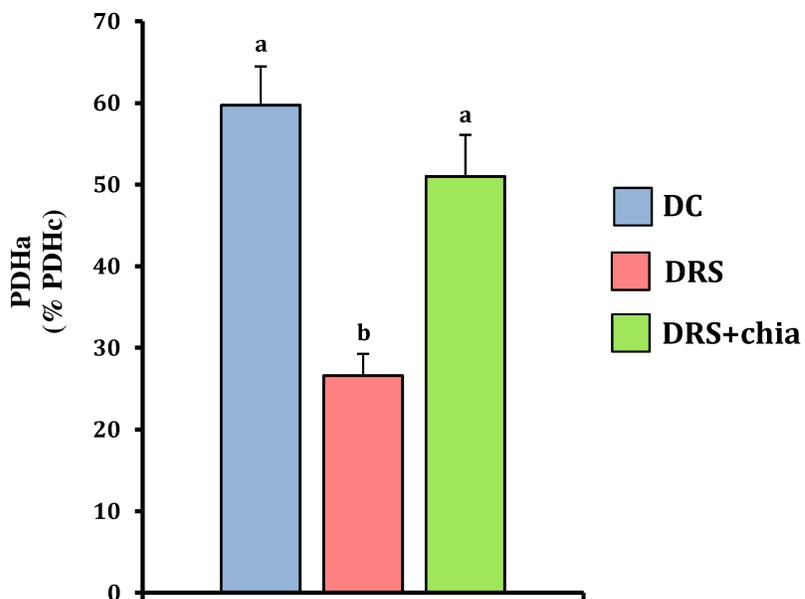
	DC	DRS	DRS+chia
METABOLITOS			
Glucosa-6P ($\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo)	$0,69 \pm 0,08^a$	$0,49 \pm 0,03^b$	$0,64 \pm 0,03^a$
Glucógeno ($\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo)	$16,16 \pm 0,8^a$	$12,3 \pm 0,6^b$	$14,89 \pm 0,47^a$
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA			
HQ (mU/g tejido húmedo)	$70,0 \pm 4,7^a$	$40,4 \pm 3,1^b$	$61,3 \pm 2,0^a$

Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores de cada fila que no comparten la misma letra superescrita son significativamente distintos ($P < 0,05$)

Actividad del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa (PDHc)

El incremento de la oxidación de los ácidos grasos se relaciona estrechamente con la disminución de la oxidación de la glucosa, donde el PDHc cumple un rol fundamental. La **Figura 14** muestra una disminución significativa de la actividad del PDHc en el grupo DRS en comparación con el grupo DC. La semilla de chia en la DRS restaura la actividad del PDHc. Es importante destacar que los niveles de la actividad total del complejo PDH es similar en los 3 grupos dietarios (datos no mostrados).

Figura 14 Actividad enzimática del PDHc en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

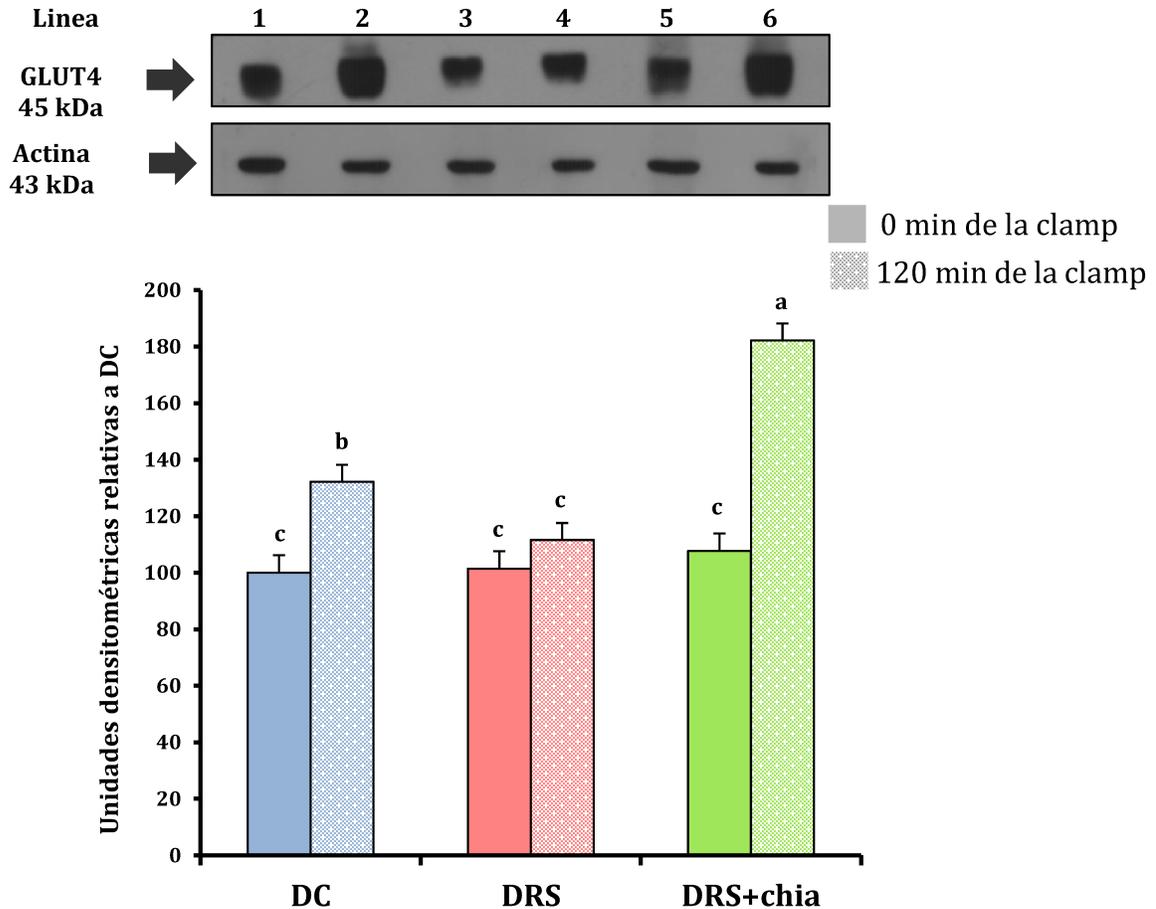
Niveles de la masa proteica del transportador de glucosa GLUT4

En el músculo cardíaco, el ingreso de glucosa al cardiomiocito está principalmente regulado por el transportador GLUT4, siendo la insulina el mayor regulador positivo en condiciones fisiológicas, la cual vía cascada de señalización dependiente de PI3K-akt/PKB induce la fusión de las vesículas intracelulares con el sarcolema.

En la **Figura 15** se presentan los resultados obtenidos de la determinación de los niveles de la masa proteica del GLUT4 al inicio (tiempo 0 min) y final (tiempo 120 min) de la clamp euglicémica hiperinsulinémica en el músculo cardíaco de los animales pertenecientes a los diferentes grupos de experimentación. El inmunoblot del tejido cardíaco reveló una sola banda de 45 kDa consistente con el GLUT4. Luego de la densitometría de los inmunoblots, el nivel de la masa proteica del GLUT4 del grupo DC al tiempo 0 min de la clamp se normalizó al 100% y los niveles de la masa proteica de GLUT4 de los grupos DRS y DRS+chia al tiempo 0 min así como de los 3 grupos al tiempo 120 min de la clamp se expresaron como porcentaje relativo al grupo DC al tiempo 0 min de la clamp.

El análisis cualitativo y cuantitativo del inmunoblot no arrojó diferencias en la abundancia relativa del GLUT4 en condiciones basales (0 min de la clamp) entre los 3 grupos experimentales. Bajo el estímulo de la hormona, la translocación del GLUT4 a la membrana plasmática incrementó significativamente en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, sin embargo, este incremento fue muy bajo (11%) en el grupo DRS. La administración de la semilla de chia aumentó significativamente (72%, $P < 0,05$) los niveles de la masa proteica del GLUT4 alcanzando valores aún mayores a los observados en el grupo DC. Es importante puntualizar que bajo estas condiciones experimentales la sensibilidad insulínica periférica global alcanzó valores normales en el grupo DRS+chia.

Figura 15 Niveles de la masa proteica del GLUT4 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia en condiciones previas y posteriores al estímulo con insulina (tiempo 0 y 120 min de la clamp) al final del período experimental



Parte superior: inmunoblot representativo del GLUT4 y de la proteína de referencia (actina) del músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. El peso molecular se muestra a la izquierda. Línea 1, DC 0 min; línea 2, DC 120 min; línea 3, DRS 0 min; línea 4, DRS 120 min; línea 5, DRS+chia 0 min; línea 6, DRS+chia 120 min.

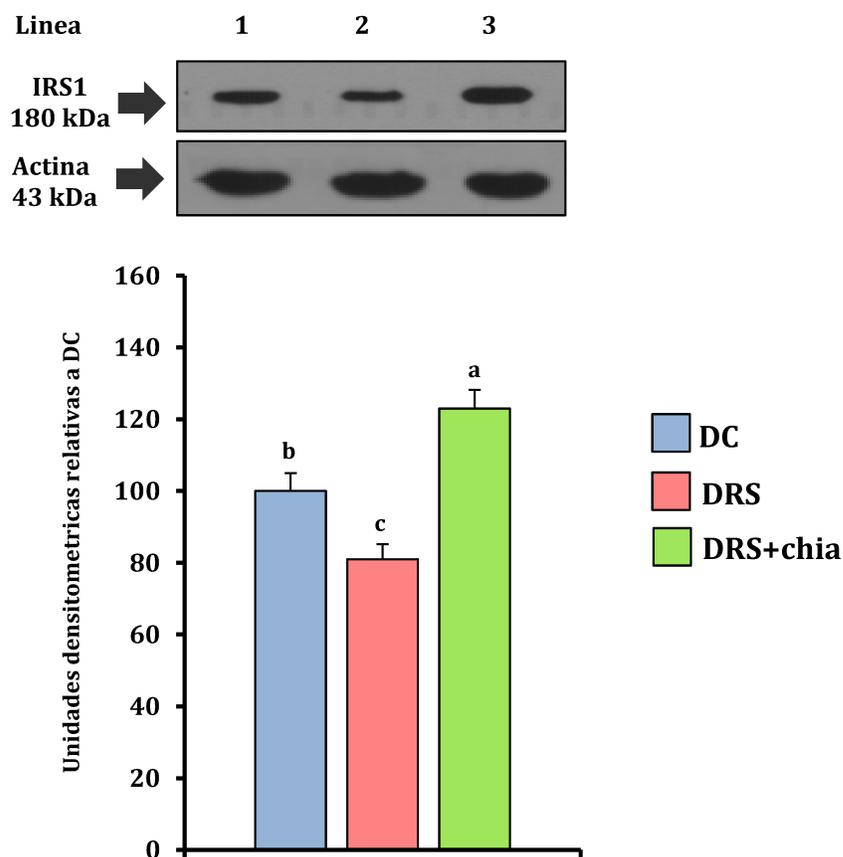
Parte inferior: análisis densitométrico del inmunoblot del GLUT4 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se corrigieron respecto a los niveles de actina y se representan como porcentaje relativo a DC al tiempo 0 min de la clamp. Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Nivel de la masa proteica del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1)

Como se demostró anteriormente, la insulina fue incapaz de incrementar la translocación del GLUT4 en el grupo de animales alimentados con DRS, mientras que la semilla de chia en la DRS revierte este comportamiento. Estos resultados sugieren una posible alteración a nivel de la cascada de señalización de la insulina. Con el fin de analizar este aspecto cuantificamos los niveles de la masa proteica del IRS1, proteína involucrada en la etapa temprana de la vía de señalización de la insulina.

El inmunoblot del tejido cardíaco reveló una sola banda de 180 kDa consistente con el IRS1. Luego de la densitometría de los inmunoblots, el nivel de la masa proteica del IRS1 del grupo DC se normalizó al 100% y los niveles de la masa proteica del IRS1 de los grupos DRS y DRS+chia se expresaron como porcentaje relativo al grupo DC. El análisis cualitativo y cuantitativo del inmunoblot demostró que la abundancia relativa del IRS1 en condiciones basales fue significativamente menor en el músculo cardíaco de los animales del grupo DRS en comparación con el grupo DC. La administración de semilla de chia en la DRS incrementó significativamente la abundancia relativa del IRS1, alcanzando valores aún mayores a los observados en el grupo DC (**Figura 16**).

Figura 16 Nivel de la masa proteica del IRS1 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



Parte superior: inmunoblot representativo del IRS1 y de la proteína de referencia (actina) del músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. El peso molecular se muestra a la izquierda. Línea 1, DC; línea 2, DRS; línea 3, DRS+chia.

Parte inferior: análisis densitométrico del inmunoblot del IRS1 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se corrigieron respecto a los niveles de actina y se representan como porcentaje relativo al grupo DC. Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

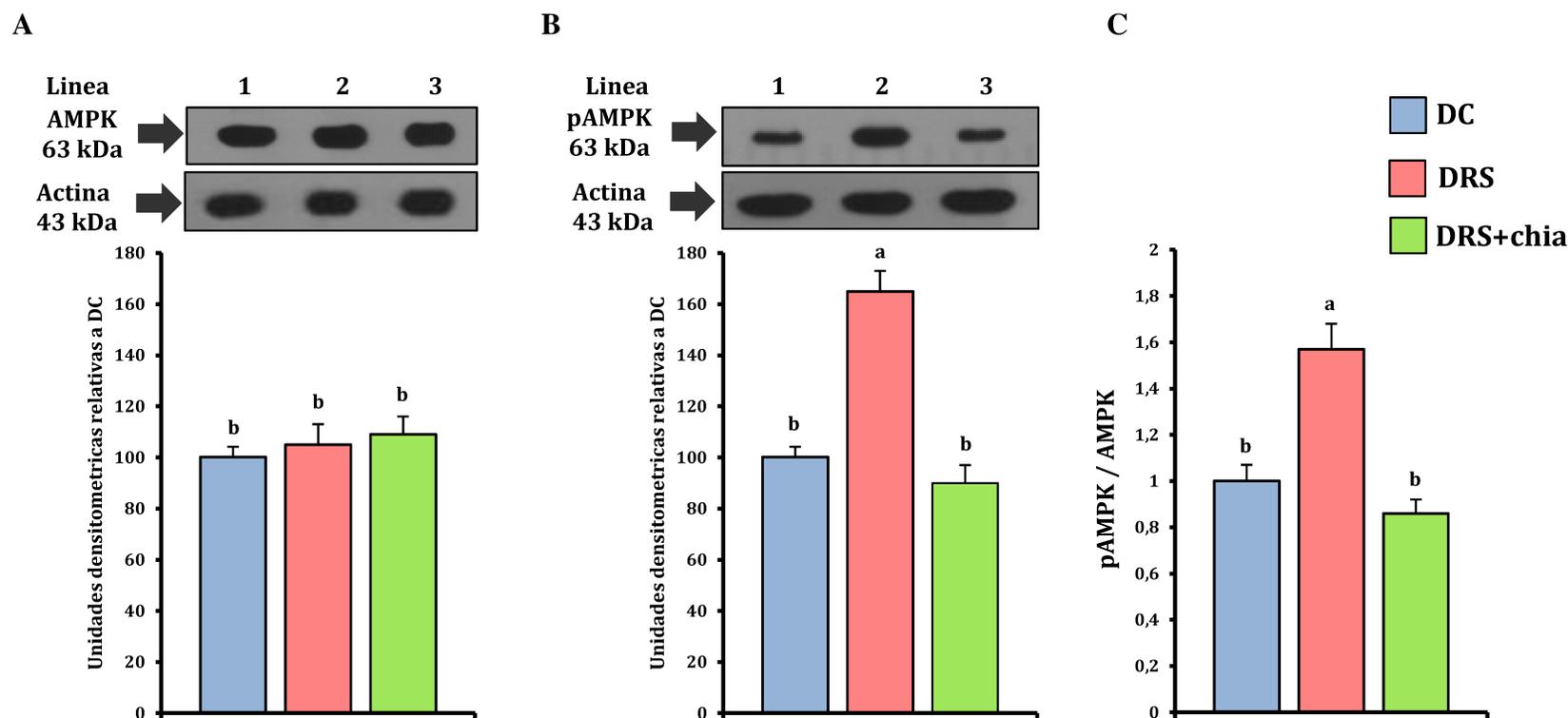
Niveles de la masa proteica de la AMPK y de su forma activa (pAMPK)

La AMPK modula el estado energético celular, activándose (por fosforilación en el residuo Thr172) frente a la disminución de la energía celular. Además, algunos estudios sugieren que aún en estados energéticos normales, la insulina inhibe su activación regulando negativamente la oxidación de los ácidos grasos. Teniendo en cuenta los resultados alcanzados, analizamos los niveles de la masa proteica de la AMPK y de su forma activa pAMPK (Thr172).

Los inmunoblots del tejido cardíaco revelaron una sola banda de 63 kDa consistente con la AMPK y la pAMPK. Luego de la densitometría de los inmunoblots, los niveles de la masa proteica de la AMPK y la pAMPK del grupo DC se normalizaron al 100% y los niveles de la masa proteica de la AMPK y pAMPK de los grupos DRS y DRS+chia se expresaron como porcentaje relativo al grupo DC.

La **Figura 17** muestra los western blots de la AMPK, pAMPK y la relación entre la pAMPK y la AMPK (pAMPK/AMPK). El análisis cualitativo y cuantitativo de los western blots demuestra que no existen diferencias significativas en la abundancia relativa de la AMPK entre los 3 grupos dietarios (**Figura 17 A**), mientras que un significativo incremento de la pAMPK se observa en el músculo cardíaco de los animales del grupo DRS. El reemplazo del aceite de maíz por semilla de chia en la DRS redujo significativamente el nivel de la masa proteica de la pAMPK observándose valores similares a los del grupo DC (**Figura 17 B**), resultando en la normalización de la relación pAMPK/AMPK (**Figura 17 C**).

Figura 17 Niveles de la masa proteica de la AMPK y la pAMPK (Thr172) y relación pAMPK/AMPK en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



A. *Parte superior:* inmunoblot representativo de la AMPK y de la proteína de referencia (actina) del músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. El peso molecular se muestra a la izquierda. Línea 1, DC; línea 2, DRS; línea 3, DRS+chia. *Parte inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de la AMPK en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se corrigieron respecto a los niveles de actina y se representan como porcentaje relativo al grupo DC.

B. *Parte superior:* inmunoblot representativo de la pAMPK(Thr172) y de la proteína de referencia (actina) del músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. El peso molecular se muestra a la izquierda. Línea 1, DC; línea 2, DRS; línea 3, DRS+chia. *Parte inferior:* análisis densitométrico del inmunoblot de la pAMPK en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se corrigieron respecto a los niveles de actina y se representan como porcentaje relativo al grupo DC.

C. Relación pAMPK/AMPK en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia.

Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos

Cambios en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas y el grado de insaturación de éstas se encuentran asociados con cambios en la captación de la glucosa estimulada por la insulina, y debido a que la administración de la semilla de chia induce cambios en la composición de lípidos plasmáticos, decidimos evaluar la composición de los ácidos grasos en los fosfolípidos del tejido cardíaco.

La **Tabla 13** muestra la composición de los ácidos grasos y las relaciones n-3 PUFAs respecto al total de los ácidos grasos, ácidos grasos n-3 respecto a los ácidos grasos n-6, y ácidos grasos n-3 respecto al total de los ácidos grasos saturados, de los fosfolípidos del músculo cardíaco de los animales pertenecientes a los 3 grupos experimentales.

En comparación con los animales que recibieron la DC, un significativo incremento del contenido de los ácidos grasos saturados se observa en el grupo DRS, mientras que el total de los PUFAs y la relación n-3 PUFAs/total de los ácidos grasos saturados disminuyeron significativamente en este grupo. La relación n-3/n-6 fue similar en ambos grupos. La semilla de chia disminuyó el contenido de los ácidos grasos saturados en comparación con el grupo DRS, mientras que se observó un incremento de los PUFAs n-3 y n-6 debido al aumento de ALA (18:3 n-3), DHA (22:6 n-3) y AA (20:4 n-6). Además, la relación n-3/total de los ácidos grasos saturados incremento en el grupo DRS+chia alcanzando valores similares a los del grupo DC.

Tabla 13 Composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos del músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental

ÁCIDOS GRASOS*	DC	DRS	DRS+chia
16:0	20,5 ± 1,1 ^b	29,7 ± 2,0 ^a	16,1 ± 0,8 ^c
16:1 n-9	0,8 ± 0,1 ^a	0,2 ± 0,02 ^c	0,5 ± 0,03 ^b
18:0	31,0 ± 2,3 ^b	39,9 ± 3,0 ^a	33,6 ± 2,2 ^{a, b}
18:1 n-9	6,2 ± 0,4	5,3 ± 0,3	5,8 ± 0,3
18:2 n-6	10,2 ± 0,5 ^a	6,6 ± 0,2 ^b	11,4 ± 0,7 ^a
18:3 n-3	Tr	Tr	3,1 ± 0,2
20:3 n-6	4,0 ± 0,2 ^a	2,2 ± 0,1 ^b	4,1 ± 0,1 ^a
20:4 n-6	11,3 ± 0,7 ^a	6,2 ± 0,2 ^b	11,9 ± 0,6 ^a
20:5 n-3	0,9 ± 0,05	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2
22:5 n-3	5,0 ± 0,1	4,1 ± 0,3	4,0 ± 0,3
22:6 n-3	9,6 ± 0,4 ^a	4,3 ± 0,1 ^b	8,2 ± 0,5 ^a
Total saturados	51,50 ± 2,5 ^b	69,60 ± 3,6 ^a	49,70 ± 2,3 ^b
Total monoinsaturados	7,0 ± 0,4 ^a	5,5 ± 0,3 ^b	6,3 ± 0,3 ^a
Total poliinsaturados	41,0 ± 1,0 ^a	24,0 ± 0,4 ^b	43,9 ± 1,1 ^a
Total n-6	25,5 ± 0,9 ^a	14,8 ± 0,3 ^b	27,4 ± 0,9 ^a
Total n-3	15,5 ± 0,4 ^a	9,2 ± 0,3 ^b	16,2 ± 0,7 ^a
n-3/n-6	0,61 ± 0,03	0,62 ± 0,02	0,59 ± 0,03
n-3/total saturados	0,30 ± 0,02 ^a	0,13 ± 0,01 ^b	0,33 ± 0,02 ^a

*Otros ácidos grasos menores se han excluido

Tr: trazas

Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$)

DISCUSIÓN

Los resultados alcanzados proveen nueva información sobre los mecanismos involucrados en el alterado destino metabólico de la glucosa en el músculo cardíaco de animales alimentados crónicamente con DRS analizando el posible efecto beneficioso de la semilla de chia dietaria sobre dichas vías metabólicas.

El incremento del contenido intracelular y/o de la oxidación de los lípidos en el músculo cardíaco presente en situaciones de dislipemia y resistencia insulínica se asocian con una disminución de la utilización de la glucosa (Belke y col., 2000; Mazumder y col., 2004; Buchanan y col., 2005; How y col., 2006; Chicco y col., 1991; Chicco y col., 1994; Montes y col., 2000; D'Alessandro y col., 2008). En la presente tesis demostramos algunos mecanismos claves que, en presencia de lipotoxicidad, participan en el deteriorado metabolismo de la glucosa en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DRS y el efecto de la semilla de chia dietaria sobre estos mecanismos.

La lipotoxicidad del músculo cardíaco de las ratas que recibieron la DRS fue revertida cuando se administró semilla de chia dietaria. Esto se acompañó de la normalización del nivel de la glucosa-6P, del glucógeno y de la actividad de la enzima HQ. Debido a que el incremento intracelular de LC-acil-CoA puede interferir con la actividad de la enzima HQ (Thompson y Cooney, 2000), es posible que la normalización de los elevados niveles de LC-acil-CoA contribuya a restablecer estos parámetros. Sin embargo, los efectos beneficiosos de la semilla de chia dietaria no implican cambios en el nivel basal de GLUT4 en el sarcolema del músculo cardíaco. En concordancia con nuestros hallazgos, D'Alessandro y col. (D'Alessandro y col., 2008) utilizando el mismo modelo experimental demostraron efectos similares con la administración de aceite de pescado -rico en EPA y DHA- utilizado como fuente de grasa dietaria en la DRS.

Además de la reversión de la lipotoxicidad y de la mejora del deteriorado metabolismo no oxidativo de la glucosa, la administración de semilla de chia normalizó la disminuída oxidación de este sustrato. En este contexto, la normalización de la actividad del PDHc se acompañó de una menor disponibilidad de ácidos grasos, su ingreso al cardiomiocito y de la actividad de la M-CPT1. Uno de los posibles mecanismos involucrados en la normalización

de la actividad del PDHc es la disminución de la actividad de la PDK, resultado de la disminución de la oxidación de los ácidos grasos. Este mecanismo fue demostrado por D' Alessandro y col. (D' Alessandro y col., 2008) en el músculo cardíaco de animales con DRS y que recibieron aceite de pescado en reemplazo isocalórico del aceite de maíz en su dieta.

Por otro lado, el músculo cardíaco de los animales alimentados con DRS, presentó un aumento de la abundancia relativa del PPAR α . Este factor nuclear regula transcripcionalmente la expresión de la PDK4 -una de las isoenzimas más importantes en la regulación del PDHc en cardiomiocitos- (Huss y Kelly, 2004). Buchanan y col. (Buchanan y col., 2005) y Ussher y col. (Ussher y col., 2012) demostraron en el corazón de ratones diabéticos (db/db) y de ratones obesos insulino resistentes (alimentados con una dieta alta en grasa) respectivamente, que la disminución de la oxidación de la glucosa se acompaña de un aumento de la expresión y del nivel de la masa proteica de la PDK4 y el PPAR α , respectivamente. Más aún, Wu y col. (Wu y col., 1998) trabajando con ratas normales en condiciones de ayuno y con ratas con diabetes inducida por STZ, sugieren que la regulación transcripcional de la PDK4 es un mecanismo de regulación de la actividad del PDHc a largo plazo. Si bien en esta tesis no evaluamos los niveles de la masa proteica de la PDK4, este podría ser uno de los mecanismos involucrados en el deterioro de la vía oxidativa de la glucosa en el corazón de las ratas alimentadas con DRS. Sin embargo, en los animales donde la semilla de chia fue la fuente de grasa dietaria, la normalización del metabolismo de la glucosa en el músculo cardíaco no se acompañó de mejoras en los niveles de masa proteica del PPAR α . Es posible que otros mecanismos estén involucrados en este proceso.

** Los resultados alcanzados demuestran que la semilla de chia dietaria revierte el deteriorado metabolismo no oxidativo y oxidativo de la glucosa del músculo cardíaco de ratas alimentadas crónicamente con una DRS. La mejora del metabolismo lipídico del músculo cardíaco como resultado de la normalización de la dislipidemia y la insulino resistencia contribuyen a estos hallazgos. Más aún, no podemos descartar que los efectos de la semilla chia dietaria sobre la mejora de la oxidación de los ácidos grasos y la restauración del metabolismo de la glucosa en el músculo cardíaco sean, entre otros: i) independientes del PPAR α ; ii) dependientes del cambio de otros*

factores involucrados en la regulación del PPAR α ; iii) dependiente del tiempo de administración de la semilla de chia.

El incremento del contenido intracelular de lípidos, TG y sus metabolitos (DAG y ceramidas) en el músculo cardíaco y esquelético, se encuentran estrechamente asociados con el desarrollo de la insulino resistencia, afectando la utilización de la glucosa frente al estímulo hormonal mediante la interrupción de la inducción de la localización del GLUT4 a la membrana sarcoplasmática dependiente de la activación de la vía de transducción de señales IRS1 - PI3K - akt/PKB (Mazumder y col., 2004; Ouwens y col., 2005; Zhang y col., 2010). Al respecto, el incremento del contenido de TG en el corazón de las ratas alimentadas con DRS, se acompaña de una disminución de la captación de la glucosa estimulada por la insulina en el corazón aislado perfundido (Montes y col., 2000). En el presente trabajo demostramos la disminución del efecto de la insulina sobre la inducción de la translocación del GLUT4.

El efecto hipolipemiante de la semilla de chia dietaria, fue capaz de restaurar la translocación del GLUT4 al sarcolema en respuesta al estímulo de la insulina. Resultados similares se observaron previamente en músculo gastronemio (Oliva y col., 2013). Del mismo modo, se observó una restauración de la inducción de la localización del FAT/CD36 en el sarcolema frente al estímulo con la hormona. Al respecto, Bonen y col. (Bonen y col., 2009) observaron una correlación inversa entre el nivel de la masa proteica del GLUT4 y del FAT/CD36 en el músculo cardíaco de ratas normales y de ratas ZDF sugiriendo la existencia de una posible relación entre la disminución del GLUT4 en la membrana plasmática y el incremento del FAT/CD36, el transporte de los ácidos grasos y la acumulación de lípidos. Este mecanismo podría favorecer la utilización de la glucosa en el corazón de los animales que reciben la DRS+chia.

El deterioro de la captación de glucosa estimulada por la insulina del músculo cardíaco de los animales del grupo DRS, se acompañó de la disminución de la masa proteica del IRS1, lo cual fue también demostrado por otros autores en el corazón de ratas Goto-kakuzaki, un modelo de diabetes tipo 2 (Desrois y col., 2004). La semilla de chia indujo un incremento de los disminuídos niveles de la masa proteica del IRS1. Resultados similares se observaron en

el músculo esquelético cuando se administró una DRS suplementada con aceite de pescado bajo las mismas condiciones experimentales (D'Alessandro y col., 2013).

Nuestros resultados no proveen información sobre todos los mecanismos implicados en la mejora de la sensibilidad insulínica del músculo cardíaco inducida por la semilla de chia dietaria. Sin embargo, otros estudios indican que la semilla de chia normaliza la dislipemia por mecanismos que incluyen la activación del PPAR α y sus enzimas hepáticas blanco (CPT1 y FAO) reduciendo la lipogénesis de novo (Rossi y col., 2013). Un incremento significativo de la abundancia relativa del PPAR α , la CPT1 y la expresión de la ACO se observó en ratas normales alimentadas con aceite de chia (González-Mañán y col., 2012). La semilla de chia además normalizó la lipotoxicidad y la insulino resistencia periférica global mejorando el deteriorado metabolismo de la glucosa del músculo esquelético (Oliva y col., 2013). El conjunto de estos hallazgos podría incluir no solo los efectos del ALA sino también de los otros componentes de la semilla.

** En base a estos resultados podemos sugerir que la reversión de la dislipemia, la insulino resistencia y la lipotoxicidad del músculo cardíaco inducidas por la semilla de chia dietaria conllevan a la mejora de los niveles de la masa proteica del IRS1 y del GLUT4 en el sarcolema frente a la acción insulina. Esto podría contribuir, en parte, a la normalización del metabolismo no oxidativo y oxidativo de la glucosa y al balance de la utilización de sustratos (lípidos-glucosa) por el músculo cardíaco.*

Los resultados demuestran que el reemplazo del aceite de maíz, rico en LA, por semilla de chia, rica en ALA, incrementó la incorporación de ALA y DHA en los fosfolípidos del músculo cardíaco de las ratas alimentadas con DRS, aumentando el grado de insaturación de las membranas (la relación PUFAs/ácidos grasos saturados es mayor en el grupo DRS+chia en comparación con el grupo DRS: 0,88 vs. 0,34 respectivamente).

En concordancia con nuestros resultados, Poudyal y col. (Pudyal y col., 2012a; Poudyal y col., 2012b) demostraron un aumento del contenido de ALA, DPA y DHA en el músculo cardíaco de ratas alimentadas con una dieta rica en grasa saturada y fructosa suplementada con chia (5% p/p), en comparación con los animales que recibieron la dieta sin este suplemento. Además, Valenzuela y col. (Valenzuela y col., 2014) observaron un incremento

de ALA y EPA en los fosfolípidos del músculo cardíaco de ratas alimentadas durante 3 semanas con aceite de chia (10% p/p) en comparación con aquellas que recibieron aceite de girasol como fuente de grasa dietaria.

Cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de tejidos blanco a la insulina inducidos por los n-3 PUFAs dietarios se asocian con una mejor sensibilidad a la hormona (Lombardo y Chicco, 2006). Liu y col. (Liu y col., 1994) mostraron que cambios en la composición de los fosfolípidos del sarcolema, inducido por los n-3 PUFAs dietarios incrementa la unión de la insulina a su receptor. En ratas alimentadas con una dieta alta en grasa se observó una estrecha asociación entre el incremento del contenido de n-3 PUFAs en los fosfolípidos y la mejora del metabolismo de la glucosa estimulado por la insulina en músculo esquelético (Storlien y col., 1991).

** ✨ Es posible que los cambios en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos, induciendo una mayor fluidez de la membrana, contribuyan a normalizar la respuesta a la insulina en los animales alimentados con semilla de chia dietaria.*

Además, el incremento del contenido de n-3 PUFAs en las membranas celulares del tejido cardíaco, se encuentra asociado con una mejora de la hipertensión y el ritmo cardíaco (Watanabe y col., 1987). En el presente trabajo demostramos que el incremento de ALA y DHA en los fosfolípidos del músculo cardíaco inducido por la semilla de chia dietaria se acompañó de la normalización de la presión sanguínea y el ritmo cardíaco (capítulo I). En concordancia, Poudyal y col. (Poudyal y col., 2013) trabajando con ratas que presentan alteraciones semejantes al SM humano por administración de una dieta alta en grasa saturada y fructosa (entre ellas dislipemia, hipertensión, adiposidad visceral e insulino resistencia) observaron que el incremento del contenido de DPA y DHA en los fosfolípidos del corazón se acompañó de normalización de la presión sistólica. Rousseau y col. (Rousseau y col., 2003) mostraron una disminución de la hipertensión -inducida por la administración de una dieta rica en fructosa- cuando se suplementó la dieta con EPA o DHA, junto con un incremento del contenido de EPA y DHA en los fosfolípidos cardíacos.

* ✨ *Es posible que los cambios en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos inducidos por la semilla de chia dietaria contribuyan a normalizar la presión sanguínea y ritmo cardíaco en los animales alimentados con la DRS.*

La AMPK es clave en la regulación del metabolismo cardíaco. El incremento de la demanda energética (disminución de la relación ATP/AMP) induce la activación de la AMPK, la cual fosforila enzimas -regulando su actividad- involucradas en el metabolismo tanto de los ácidos grasos como de la glucosa. Sin embargo, el rol de la AMPK en ausencia de cambios en el estado energético es poco claro (Dyck y Lopaschuk, 2006; Lopaschuk y col., 2010).

En el presente trabajo observamos un significativo incremento de los niveles de la AMPK activa (fosforilada) en el músculo cardíaco de los animales del grupo DRS, sin cambios en el nivel total de la AMPK. Bajo condiciones experimentales semejantes a las del presente trabajo, los niveles de ATP, AMP, creatina y creatina-P en el músculo cardíaco de los animales pertenecientes a este grupo experimental, no difieren de los observados en el grupo DC (Chicco y col., 1991; Chicco y col., 1994; Montes y col., 2000). La semilla de chia dietaria normalizó la incrementada activación de la AMPK.

Recientemente, Samoski y col. (Samovski y col., 2015) mostraron una estrecha vinculación entre la actividad de la AMPK y el nivel de la masa proteica del FAT/CD36 en la regulación del metabolismo de los ácidos grasos. En miocitos y otros tipos celulares, estos autores demostraron que el FAT/CD36 mantiene inactiva a la AMPK en presencia de bajos niveles de ácidos grasos. Con el incremento de la disponibilidad de ácidos grasos, la AMPK se disocia del FAT/CD36, activándose, inhibiendo a la ACC e induciendo el ingreso de los ácidos grasos a la mitocondria y, por otro lado, induciendo la translocación del FAT/CD36 al sarcolema.

Además, ensayos en corazón *ex vivo*, demostraron que la insulina inhibe la activación de la AMPK, en un proceso dependiente de la activación de la akt/PKB en condiciones normales de AMP/ATP y creatina/creatina-P (Saddik y col., 1993; Gamble y Lopaschuk, 1997). La reducción de la actividad de la AMPK aumenta la actividad de la ACC β , incrementando los niveles de malonil-CoA, principal regulador (inhibidor alostérico) de la actividad de la CPT1. En concordancia, Kewalramani y col. (Kewalramani y col., 2007) observaron en el músculo

cardíaco de animales diabéticos, que la disminución de la oxidación de la glucosa y el incremento de la oxidación de los ácidos grasos se acompaña de un incremento de la fosforilación de la AMPK e inactivación de la ACC, previo a la inducción del PPAR α . Esto demuestra que la activación de la AMPK y consecuente disminución de malonil-CoA es un mecanismo involucrado en la incrementada oxidación de ácidos grasos. Los autores sugieren que la activación de la AMPK es un mecanismo de adaptación del cardiomiocito cuando la utilización de glucosa se encuentra comprometida. Sin embargo, la activación de la AMPK se atenúa conforme incrementa el deterioro de la diabetes.

* *Es posible que tanto la irrupción del efecto inhibitorio de la insulina sobre la AMPK, así como el incremento de los ácidos grasos plasmáticos, mediante un mecanismo dependiente del FAT/CD36, induzcan la activación de la AMPK en el músculo cardíaco de las ratas dislipémicas insulino resistentes alimentadas crónicamente con una DRS. La reversión de la dislipemia y la normalización de los niveles del FAT/CD36 en el sarcolema y del IRS1 inducidos por la semilla de chia pueden contribuir a restaurar los niveles de la pAMPK. Esto además podría contribuir a incrementar los niveles de malonil-CoA lo que regularía negativamente a CPT-1, reforzando el efecto sobre la restauración de la actividad del PDHc.*

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPITULO III

Estrés oxidativo sistémico y del músculo cardíaco en los animales dislipémicos insulino resistentes alimentados crónicamente con DRS: efectos de la semilla de chia dietaria

El estrés oxidativo sistémico involucrando tejidos (adiposo, hepático, cardíaco, entre otros) es también una anomalía metabólica presente en situaciones de dislipemia e insulino resistencia, tales como las inducidas por dietas ricas en fructosa/sacarosa (Busserolles y col., 2002a; Busserolles y col., 2002b; Delbosc y col., 2005).

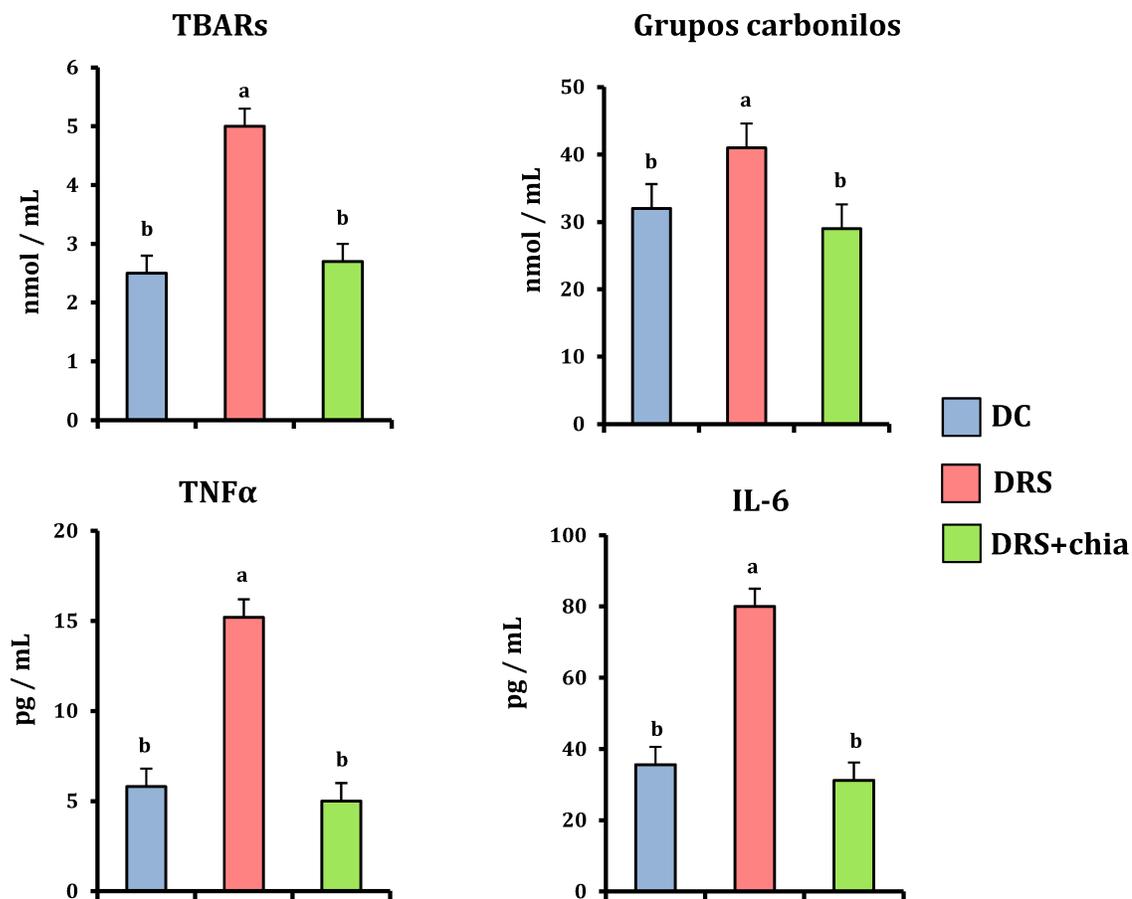
Los resultados alcanzados en el presente trabajo nos inducen a analizar si las alteraciones observadas en el músculo cardíaco de las ratas dislipémicas insulino resistentes se relacionan con cambios en el estado oxidativo; y si los efectos beneficiosos de la semilla de chia involucran mecanismos a nivel del estado oxidativo y de las defensas antioxidantes. En función a lo expuesto analizamos: a) niveles plasmáticos de los marcadores del estado oxidativo (TBARs y grupos carbonilos) y citoquinas pro-inflamatorias (TNF α e IL-6); en músculo cardíaco: b) niveles de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y expresión génica de la subunidad p47 de la NA(P)H oxidasa (p47NOX); c) actividad y expresión génica de enzimas antioxidantes; d) expresión génica del factor de transcripción Nrf2.

RESULTADOS

Niveles plasmáticos de TBARs, grupos carbonilos, TNF α e IL-6

Como una estimación de la peroxidación lipídica y de la oxidación de proteínas se determinaron los niveles plasmáticos de las TBARs y de los grupos carbonilos respectivamente. Además, se evaluaron los niveles plasmáticos de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α e IL-6. Como se observa en la **Figura 18**, los animales alimentados con la DRS presentan un incremento significativo de todos los parámetros mencionados, mientras que la administración de semilla de chia en la DRS revirtió estas alteraciones.

Figura 18 Niveles plasmáticos de TBARs, grupos carbonilos, TNF α e IL-6 de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



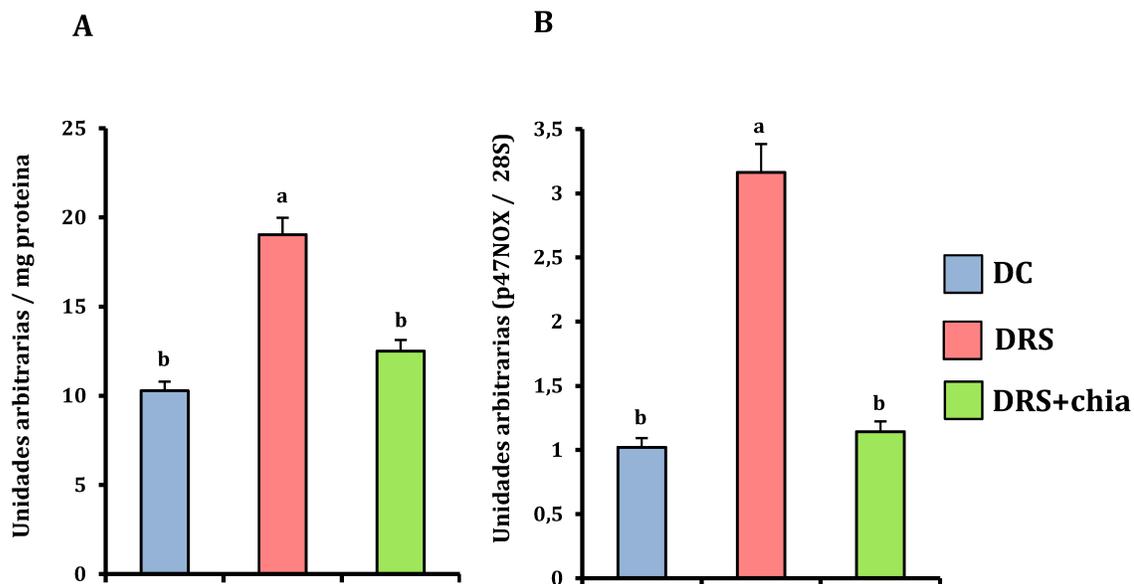
Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Niveles de las especies reactivas al oxígeno (ROS) y expresión génica de la subunidad p47 de la NAD(P)H oxidasa (p47NOX)

El balance de los niveles intracelulares de las ROS depende de su generación mitocondrial y extramitocondrial, siendo esta última principalmente resultado de la acción de la enzima NAD(P)H oxidasa, y su degradación, dependiente de los sistemas de defensa antioxidante (Evans y col., 2002; Burgoyne y col., 2012).

En la **Figura 19** se muestran los niveles de ROS y la expresión génica de la p47NOX en el músculo cardíaco de los animales pertenecientes a los distintos grupos dietarios. El grupo DRS presenta un significativo incremento en ambos parámetros mientras que la administración de semilla de chia disminuye los niveles de las ROS y la expresión génica de la p47NOX alcanzando valores similares a los del grupo control.

Figura 19 Niveles de las ROS y expresión génica de la p47NOX en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



A: Los valores se expresan como unidades arbitrarias de fluorescencia por mg de proteína.

B: Los valores de mRNA de la p47NOX se corrigieron respecto a los niveles de rRNA 28S y se expresan como unidades arbitrarias relativas al grupo DC.

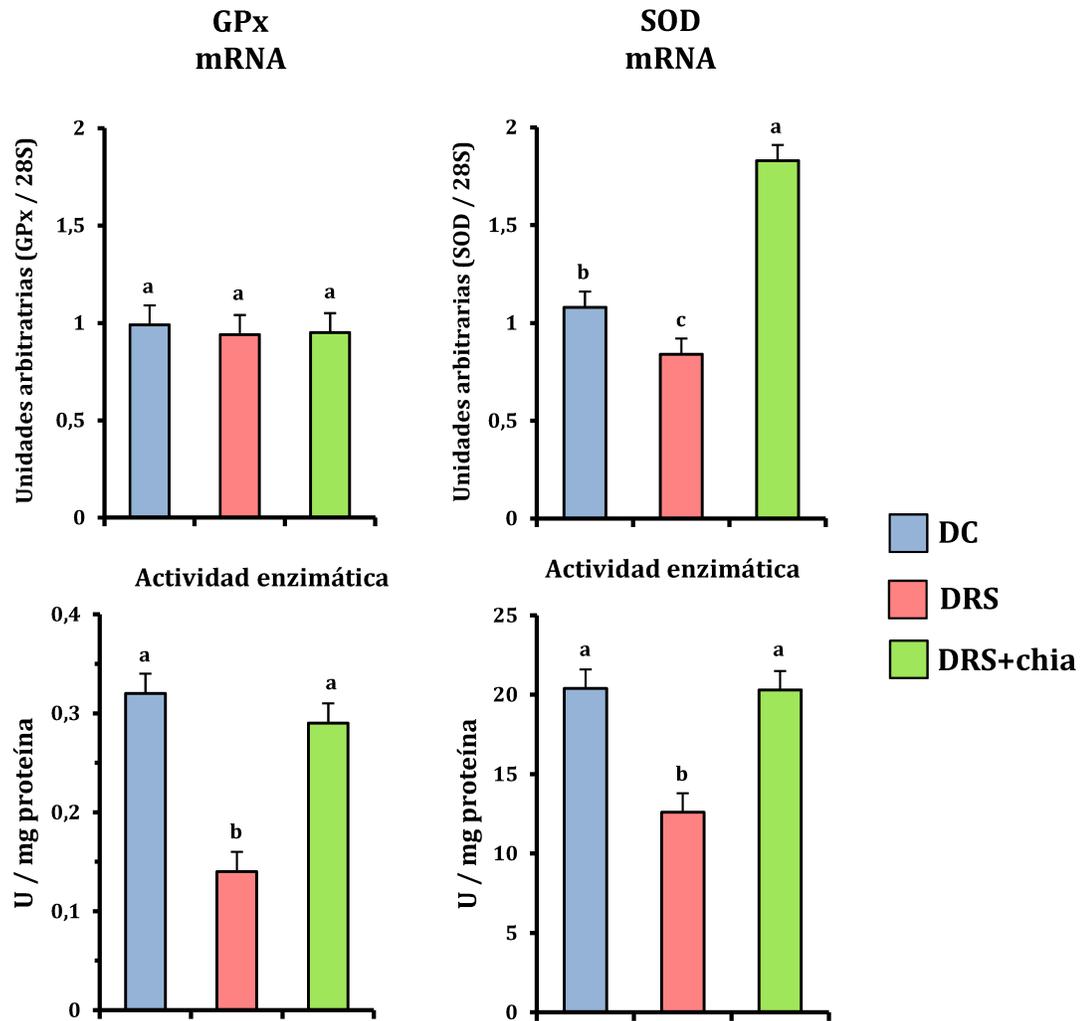
Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Actividades enzimáticas y expresión génica de enzimas antioxidantes

Las enzimas glutatión peroxidasa (GPx), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa tienen un importante rol en la defensa antioxidante celular (Evans y col., 2002; Burgoyne y col., 2012). La **Figura 20** muestra los niveles de la expresión génica y la actividad enzimática de las enzimas GPx y SOD en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia.

Respecto a la GPx, mientras que no se observan diferencias en las cantidades relativas de mRNA entre los 3 grupos dietarios, la actividad enzimática es significativamente menor en el grupo DRS respecto a los animales alimentados con DC. La sustitución de aceite de maíz por semilla de chia en la DRS normalizó este parámetro alcanzando valores similares a los del grupo DC. Por otra parte, los niveles de mRNA de la enzima MnSOD y la actividad enzimática SOD total son significativamente menores en el grupo DRS respecto al grupo DC. La semilla de chia fue capaz de incrementar la expresión génica a valores aún más elevados que los del grupo DC normalizando la actividad enzimática. Además, la semilla de chia mejora la disminuída actividad enzimática de la catalasa presente en el grupo DRS. Los valores obtenidos fueron (k, 1/min x mg de proteína; media \pm SEM, n=6): DC $0,364 \pm 0,036$; DRS $0,179 \pm 0,030$; DRS+chia $0,270 \pm 0,018$. $P < 0,05$ DRS vs. DC y DRS+chia; $P < 0,05$ DRS+chia vs. DC.

Figura 20 Expresión génica y actividades enzimáticas de las enzimas GPx y SOD en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



Parte superior: Niveles de mRNA de la GPx y la SOD en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores de mRNA se corrigieron respecto a los niveles de rRNA 28S y se expresan como unidades arbitrarias relativas al grupo DC.

Parte inferior: actividades enzimáticas de la GPx y la SOD en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia.

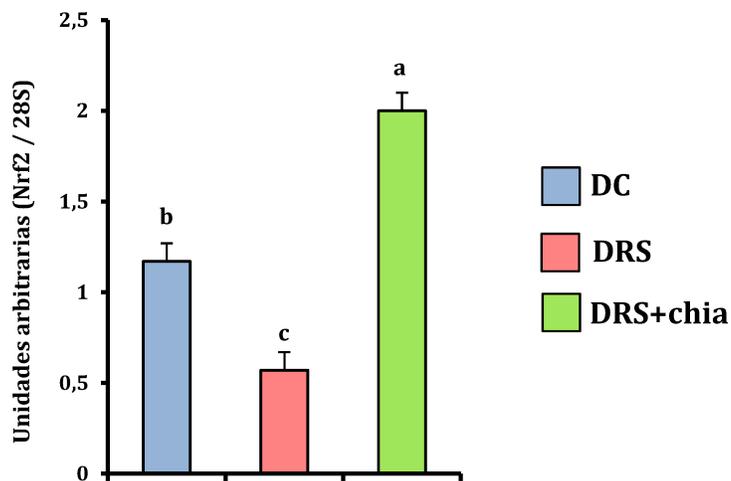
Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Niveles de la expresión génica del factor de transcripción Nrf2

A partir de los resultados obtenidos, analizamos la expresión génica del Nrf2 -factor de transcripción clave en la respuesta antioxidante celular- (Chen y Maltagliati, 2018) en el músculo cardíaco de las ratas alimentadas con DRS y el efecto de la semilla de chia sobre este factor de transcripción.

Como se observa en la **Figura 21**, el nivel de la expresión génica del Nrf2 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DRS fue significativamente menor respecto al observado en el grupo DC. La semilla de chia administrada en la DRS incrementó este parámetro alcanzando niveles incluso superiores a los obtenidos en el grupo DC.

Figura 21 Expresión génica del factor de transcripción Nrf2 en el músculo cardíaco de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



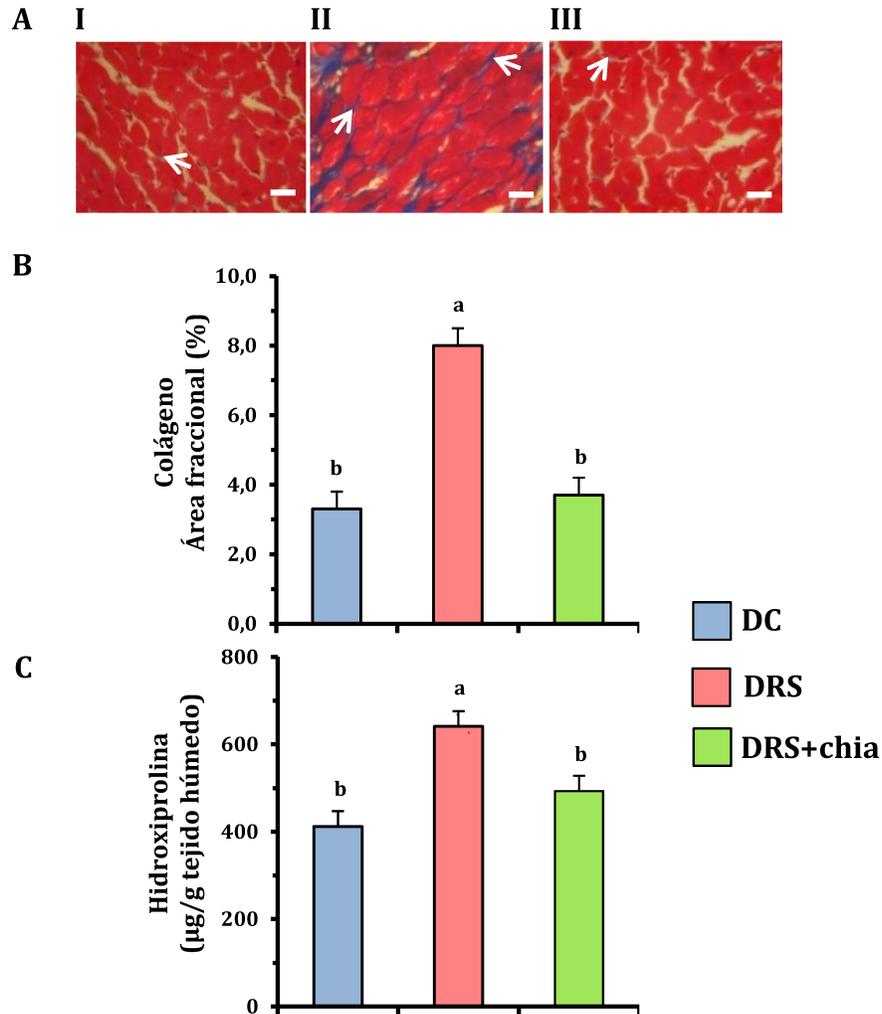
Los valores de mRNA del Nrf2 se corrigieron respecto a los niveles de rRNA 28S y se expresan como unidades arbitrarias relativas al grupo DC. Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

Contenido de colágeno e hidroxiprolina en ventrículo izquierdo

Los resultados alcanzados demuestran que la semilla de chia administrada en una DRS -la cual revierte la dislipemia e insulino resistencia- mejora las alteraciones bioquímicas-metabólicas y el estrés oxidativo del músculo cardíaco presente en los animales alimentados crónicamente con una DRS. Además, la semilla de chia dietaria mejoró la hipertensión normalizando el ritmo cardíaco. Considerando estos hallazgos evaluamos el depósito de colágeno intersticial y cuantificamos en contenido de hidroxiprolina -como una estimación del contenido de colágeno total- en el ventrículo izquierdo de las ratas pertenecientes a los distintos grupos experimentales.

El análisis histológico del ventrículo izquierdo de las ratas alimentadas con DRS muestran un significativo aumento del depósito de colágeno intersticial (**Figura 22 A I y II y Figura 22 B**). Además, se observó un aumento de la concentración de hidroxiprolina al final del período experimental en este grupo dietario (**Figura 22 C**). Este parámetro también se encontró elevado a los 3 meses de administrada la DRS. Los valores fueron ($\mu\text{g/g}$ de tejido húmedo; media \pm SEM, n=6): DC $426,4 \pm 9,0$; DRS $595,7 \pm 27,0$ ($P < 0,05$ DRS vs. DC). Tanto el depósito de colágeno intersticial (**Figura 22 A III y Figura 22 B**) así como también el nivel de hidroxiprolina (**Figura 22 C**) se normalizaron cuando se administró la semilla de chia como grasa dietaria en la DRS.

Figura 22 Contenido de colágeno y de hidroxiprolina en el ventrículo izquierdo de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia al final del período experimental



A: Secciones histológicas (magnificación total de 400X) del ventrículo izquierdo de los animales alimentados con DC (I), DRS (II) y DRS+chia (III) coloreadas con tinción de Masson. Las flechas señalan las fibras de colágeno. Las barras representan 20 µm.

B: Análisis cuantitativo del contenido de colágeno en las secciones histológicas de ventrículo izquierdo de los animales alimentados con DC (I), DRS (II) y DRS+chia (III) coloreadas con tinción de Masson.

C: Contenido de hidroxiprolina en ventrículo izquierdo de los animales alimentados con DC, DRS y DRS+chia. Los valores se expresan como media ± SEM, n=6. Los valores que no comparten la misma letra superescrita son estadísticamente distintos ($P < 0,05$).

DISCUSIÓN

Diferentes estudios, incluidos los nuestros, han demostrado un estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo sistémico y el estrés oxidativo en tejidos, tales como adiposo, hígado, músculo cardíaco y aorta inducido por la administración crónica de sacarosa o fructosa a ratas normales (Busserolles y col., 2002a; Busserolles y col., 2002b; Delbosc y col., 2005; Castro y col., 2014; Castro y col., 2015; D`Alessandro y col., 2015; Calabró y col., 2016; Ferreira y col., 2016).

El estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad del sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante utilizando la red de defensas antioxidantes (Evans y col., 2002; Burgoyne y col., 2012). Al respecto, el aumento de los niveles de ROS en el músculo cardíaco de los animales alimentados con una DRS, se acompañó del incremento de la expresión de la subunidad p47 del complejo multienzimático NAD(P)H oxidasa, principal fuente extramitocondrial de generación de ROS es este tejido. En concordancia con nuestros hallazgos, Calabró y col. (Calabró y col., 2016) observaron un incremento de la producción del anión superóxido dependiente de la NOX junto con un aumento del nivel de la masa proteica de la subunidad p47 en el músculo cardíaco de ratas que recibieron fructosa en el agua de bebida (10% p/v). Mellor y col. (Mellor y col., 2010) demostraron un aumento de la producción del anión superóxido dependiente de la actividad NOX en músculo cardíaco de ratones alimentados con una dieta rica en fructosa.

Además, el músculo cardíaco de las ratas que reciben la DRS presentan un incremento en la oxidación de ácidos grasos e insulino resistencia. En este sentido, es sabido que el incremento de la oxidación de los ácidos grasos en el músculo cardíaco, aumenta la producción de ROS mitocondrial, ya que los cofactores reducidos formados en el proceso de β -oxidación pueden reaccionar directamente con el O₂ (Lopaschuk y col., 2010; Lorenzo y col., 2013). Además, Boudina y col. (Boudina y col., 2010) utilizando un modelo con delección de los receptores de insulina de los cardiomiocitos (CIRKO) demostraron que la insulino resistencia incrementa la generación de ROS independientemente de la presencia de dislipemia e hiperglucemia.

Los resultados alcanzados demuestran que la semilla de chia dietaria normalizó los niveles de ROS y la expresión de la p47NOX en los animales alimentados con DRS. El silenciamiento del transportador de ácidos grasos FAT/CD36 en el corazón de ratones ob/ob resulta en una reducción de la alta actividad de la NOX, atenuando el estrés oxidativo (Gharib y col., 2016). Como se expuso anteriormente, la semilla de chia redujo los aumentados niveles de la masa proteica del FAT/CD36 en el sarcolema y la incrementada oxidación de los ácidos grasos, mejorando la alterada sensibilidad insulínica presente en el corazón de las ratas alimentadas con DRS. El conjunto de estos mecanismos podría contribuir a mejorar el estrés oxidativo del músculo cardíaco presente en estos animales.

Además, la administración crónica de la DRS indujo un significativo deterioro de las defensas antioxidantes. Al respecto, Calabro y col. (Calabro y col., 2016) demostraron que la dislipemia inducida por la administración de fructosa (10% p/v en el agua de bebida) durante 8 semanas se asocia con una depleción de las enzimas antioxidantes -disminución de la actividad enzimática de la SOD, la GPx y la catalasa- en el músculo cardíaco. Busserolles y col. (Busserolles y col., 2002b) observaron una reducción de la actividad de la SOD sin diferencias en la actividad enzimática de la GPx en el corazón de ratas dislipémicas alimentadas durante 2 semanas con una dieta rica en sacarosa, en comparación con los animales que recibieron una dieta control. Resultados similares se observaron cuando se administró una dieta alta en grasa (Ballal y col., 2010).

En el presente trabajo demostramos que la normalización del nivel de ROS en el músculo cardíaco de los animales alimentados con semilla de chia se acompañó de una restauración de las disminuídas actividades de las enzimas antioxidantes GPx, SOD total y catalasa y de la expresión génica de la MnSOD. Resultados similares se observaron en el tejido adiposo epididimal de las ratas alimentadas con DRS y semilla de chia (Ferreira y col., 2016).

da Silva Marineli y col. (da Silva Marineli y col., 2015) demostraron recientemente que la administración a ratas Wistar de semilla o aceite de chia en una dieta rica en grasa saturada y fructosa -que induce obesidad- fue capaz de aumentar la capacidad antioxidante del tejido hepático y del plasma reduciendo la peroxidación lipídica y promoviendo un efecto protector

sobre el estrés oxidativo inducido por dicha dieta. Similarmente, nuestros resultados demuestran que los niveles plasmáticos de TBARs y de los grupos carbonilos alcanzaron valores semejantes a los del grupo control cuando la semilla de chia reemplazó al aceite de maíz como fuente de grasa dietaria en los animales alimentados con DRS. Más aún, los elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias $TNF\alpha$ e IL-6 decrecieron significativamente.

Como mencionamos anteriormente, la semilla de chia contiene un alto porcentaje de ALA. Al respecto, Xie y col. (Xie y col., 2011) demostraron en ratas diabéticas -por administración de STZ- y alimentadas con una dieta rica en grasa, que la administración de ALA redujo los niveles de $TNF\alpha$, IL-6, la producción de superóxido y de malonaldehído enfatizando al mismo tiempo la capacidad antioxidante del corazón diabético.

El factor de transcripción Nrf2, es un regulador clave del balance redox dentro de las células, induciendo la transcripción de genes que codifican enzimas antioxidantes frente a un incremento de las ROS. En su estado inactivo Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a una proteína represora Keap1, y bajo estrés electrofílico, los residuos de cisteínas de Keap1 se modifican induciendo su disociación del Nrf2, el cual se transloca al núcleo activando la transcripción de sus genes blanco (Zhou y col., 2014).

Los resultados alcanzados demuestran que la normalización de las defensas antioxidantes y del contenido de ROS en el músculo cardíaco inducido por la semilla de chia se acompañó de un significativo incremento de la expresión génica del Nrf2. Es interesante destacar que la expresión génica de la GPx, una de las enzimas antioxidantes blanco del Nrf2, no presentó cambios significativos bajo la administración de la chia.

En el presente trabajo no evaluamos los posibles mecanismos subyacentes involucrados en el efecto de la chia sobre el incremento de la expresión del Nrf2 en el corazón de las ratas alimentadas con DRS, especialmente considerando que además de ALA, la semilla de chia contiene actividad antioxidante debido a la presencia de compuestos fenólicos (ej: quercetina, entre otros). Al respecto, Panchal y col. (Panchal y col., 2012) demostraron en ratas alimentadas con una dieta rica en carbohidratos simples (fructosa/sacarosa) y grasa, que la suplementación de esta dieta con quercetina durante 8 semanas mejora la inflamación y el

estrés oxidativo del músculo cardíaco estimulando la expresión del Nrf2. Por otro lado, Gao y col. (Gao y col., 2007) demostraron que los productos de oxidación de los ácidos grasos n-3 reaccionan directamente con el regulador negativo del Nrf2, Keap1, desestabilizando la asociación con Cullin 3 (proteína adaptadora de la ubiquitina ligasa), induciendo la expresión de los genes blanco de este factor de transcripción. La semilla de chia es una fuente muy importante de ALA y este puede ser, en cierta medida, convertido en EPA y DHA; lo que no descarta la posibilidad de que EPA, DHA o sus productos podrían activar los caminos del Nrf2. Además, Gonzalez-Mañán y col. (González-Mañán y col., 2017) observaron en ratones alimentados durante 12 semanas con una dieta alta en grasa, que la suplementación con aceite de rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*), el cual contiene 30% p/p de ALA del total de ácidos grasos, así como también sustancias antioxidantes (entre ellos tocoferoles), mejora la esteatosis hepática y el estado pro-oxidativo incrementado las defensas antioxidantes en hígado, músculo y tejido adiposo. Estos autores sugieren que el aceite de rosa mosqueta podría actuar directamente disminuyendo los niveles de ROS y/o indirectamente activando el Nrf2. La estimulación del Nrf2 inhibe la expresión de moléculas pro-inflamatorias tales como citoquinas, ciclooxigenasas, entre otras inhibiendo la vía del NFkB y modulando la cascada de inflamación.

Un incremento de colágeno fibrilar en el ventrículo izquierdo se observa en humanos y en animales de experimentación con hipertensión (Weber, 2000). Como mencionáramos en el capítulo I, la hipertensión arterial es otra de las alteraciones metabólicas presentes en las ratas alimentados crónicamente con DRS. Esta se acompaña de un significativo incremento del contenido de colágeno intersticial y de hidroxiprolina en el ventrículo izquierdo, sugiriendo que los corazones de estos animales desarrollan fibrosis. La administración de semilla de chia normalizó la hipertensión arterial reduciendo marcadamente la deposición de colágeno intersticial y el contenido de hidroxiprolina. Similarmente, Poudyal y col. (Poudyal y col., 2012a) demostraron que ratas que presentan muchas de las alteraciones presentes el SM humano -por administración de una dieta rica en grasa y fructosa- que la suplementación con semilla de chia (5% p/p) revirtió la hipertensión arterial a partir de las 16 semanas de ingesta. Esto se acompañó de un mejoramiento de las dimensiones del ventrículo izquierdo y la contractilidad, reduciendo significativamente la inflamación y la deposición de colágeno. Resultados similares se observaron cuando se administró aceite de chia por 8 semanas

utilizando el mismo modelo experimental (Poudyal y col., 2013). Más aún, el mismo grupo de investigación utilizando este modelo experimental (Panchal y col., 2012) demostró que la suplementación de la dieta rica en grasa y fructosa con quercetina (0,8 g/kg de dieta), disminuye la hipertensión arterial atenuando las alteraciones en la estructura y función del corazón, en comparación con los animales que no recibieron la quercetina. Estos hallazgos sugieren mecanismos que involucran una reducción del estrés oxidativo. Además, la administración de quercetina (dosis dependiente) en ratas SHR, también mejoró la hipertrofia cardíaca y la deposición de colágeno, decreciendo la hipertensión arterial (Yan y col., 2013).

Por otro lado, Zhao y col. (Zhao y col., 2008) demostraron en ratas Sprague-Dawley con hipertensión inducida por la administración de angiotensina II (Ang II) durante 4 semanas, una enfatización del estrés oxidativo y de la expresión del factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) acompañada de una mayor síntesis y menor degradación del colágeno que conduce a fibrosis cardíaca. La co-administración de la Ang II con antioxidantes (apocinina y tempol) atenuó significativamente la expresión del TGF- $\beta 1$ y la respuesta fibrogénica del corazón, reduciendo la población de miofibroblastos, el volumen del colágeno, y suprimiendo parcialmente la hipertensión.

Otra investigación demostró que la administración de ALA a ratas diabéticas mejora el estado oxidativo e inflamatorio del corazón atenuando el daño por isquemia y reperfusión (Xie y col., 2011). Además, se observó que el ALA previene el daño cardíaco producido por sobre estimulación β -adrenérgica (Folino y col., 2015).

** * De lo expuesto podemos sugerir que la administración de semilla de chia y/o algunos de sus componentes (ALA, quercetina u otros antioxidantes) revierten el estrés oxidativo del músculo cardíaco de los animales dislipémicos insulino resistentes vía diferentes mecanismos (la reversión de la dislipemia, la disminución de la aumentada oxidación de los ácidos grasos y de la expresión de la p47NOX; y la normalización de las deterioradas defensas antioxidantes) que podrían, revirtiendo la hipertensión, contribuir cooperativamente a la reducción de la deposición del colágeno intersticial y el contenido de hidroxiprolina.*

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Numerosas evidencias han demostrado que cambios en los hábitos dietarios durante las últimas décadas se asocian con el incremento del desarrollo de anomalías metabólicas incluídas en el SM y consecuentemente con el aumento de la prevalencia de las ECV. El conocimiento de las alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco relacionadas a la nutrición, es clave a fin de evidenciar sus efectos sobre el desarrollo del daño/disfunción cardíaca asociadas al SM.

El modelo experimental nutricional de dislipemia y resistencia insulínica -inducido en ratas normales por la administración crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS)- utilizado en el presente trabajo, presenta, entre otras alteraciones bioquímicas-metabólicas: adiposidad visceral, hipertensión, anormal homeostasis de la glucosa, un estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo sistémico, asemejandose al SM del humano. Este estudio aporta nuevos conocimientos sobre los mecanismos implicados en la anormal utilización del combustible energético (lípidos vs. glucosa) del corazón de estos animales. En estas condiciones experimentales, la mayor disponibilidad plasmática de ácidos grasos, como consecuencia de una lipólisis exagerada y de la resistencia insulínica periférica global, junto con el aumento de la masa proteica del FAT/CD36 en el sarcolema, conducirían a una mayor captación de los ácidos grasos. Simultáneamente, su elevada oxidación mitocondrial (M-CPT1) sería aún insuficiente para impedir el acúmulo de lípidos intracelulares (TG, LC-acil-CoA, DAG), induciendo lipotoxicidad cardíaca. La activación del PPAR α y de la AMPK jugarían un rol importante en el desarrollo de estas alteraciones. En este contexto, la captación (GLUT4) y el metabolismo oxidativo y no oxidativo de la glucosa, así como la vía de señalización de la insulina (IRS1) se encuentran comprometidos. Además, por primera vez demostramos que la hipertensión y el estado pro-oxidativo sistémico se acompañan de un incremento del contenido de colágeno en el ventrículo izquierdo. Estas alteraciones se presentan frente a aumentados niveles de ROS en el músculo cardíaco, resultado, al menos en parte, del deteriorado estado de las defensas enzimáticas antioxidantes, y posiblemente del incremento de su producción (**Figura 23 A**).

Teniendo en cuenta la relevancia de la composición de los macronutrientes de la dieta sobre el desarrollo del SM, en la actualidad es de gran importancia encontrar intervenciones nutricionales que contribuyan a atenuar o retrasar las complicaciones cardiovasculares asociadas.

El presente trabajo de tesis aporta nuevos conocimientos en lo que respecta al efecto de la semilla de *Salvia hispánica* L. (chia) sobre los mecanismos involucrados en las alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco presentes en este modelo experimental nutricional. La reversión de la dislipemia y la resistencia insulínica inducida por la semilla de chia dietaria resulta en una significativa disminución de la disponibilidad de lípidos y su ingreso al cardiomiocito disminuyendo la lipotoxicidad. Esto conduce, al menos en parte, a la normalización de la captación y del metabolismo global de la glucosa en el músculo cardíaco. La normalización del FAT/CD36 y de la pAMPK, el mejoramiento de la actividad de la M-CPT1, así como los cambios en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana podrían contribuir a estos efectos.

Además, esta intervención dietaria fue capaz de revertir la hipertensión, el alterado ritmo cardíaco y la fibrosis ventricular, mejorando el estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo sistémico. En este contexto observamos un mejoramiento del estado oxidativo del músculo cardíaco, asociado a la inducción del factor de transcripción Nrf2 -clave en la respuesta antioxidante- y posiblemente a una menor producción de ROS (**Figura 23 B**).

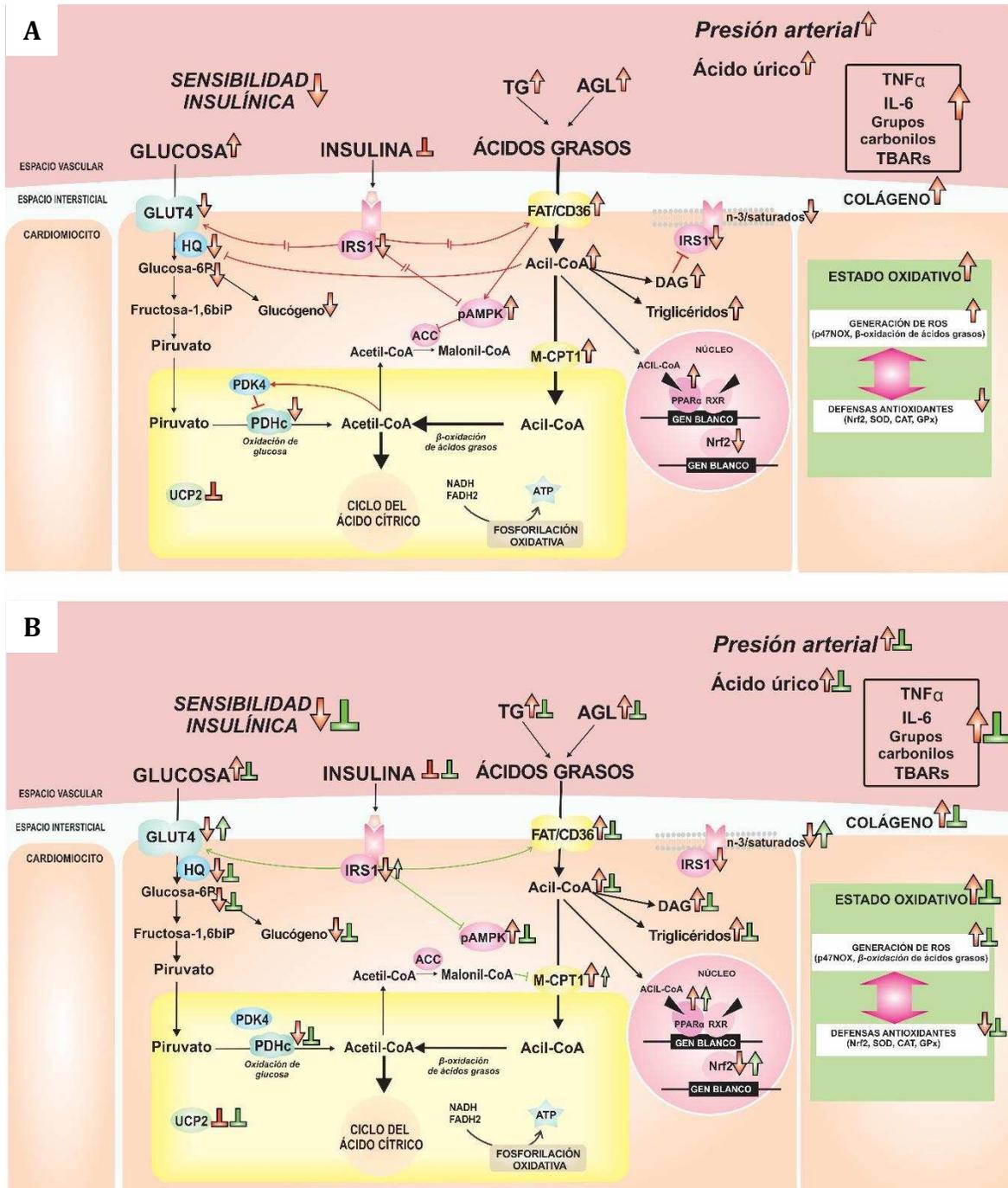
Es importante considerar que la intervención nutricional realizada en el presente protocolo experimental se basa en la utilización de semilla de chia -rica en ALA- en reemplazo del aceite de maíz -rico en LA- como fuente de grasa dietaria. Sin embargo, la semilla de chia contiene numerosos nutrientes, compuestos bioactivos y un alto contenido en fibra que pueden tener -individual o cooperativamente- múltiples mecanismos de acción. Por lo tanto, nuestros hallazgos podrían involucrar no solo el efecto de la sustitución del tipo de grasa dietaria, sino el efecto de la semilla de chia en su totalidad.

Otro aspecto a contemplar es que la extrapolación de los resultados obtenidos en investigaciones utilizando modelos nutricionales experimentales hacia los humanos debe ser muy cuidadosa, especialmente teniendo en cuenta las diferencias entre las cantidades de chia

dietaria administrada en los protocolos experimentales y los estudios clínicos realizados en individuos normales, en pacientes con diabetes tipo 2 y en pacientes diabéticos con sobrepeso u obesidad (Vuksan y col., 2007; Ho y col., 2013; Jenkins y col., 2016; Vuksan y col., 2017a; Vuksan y col., 2017b).

Finalmente, en base a los resultados alcanzados en el presente trabajo de tesis, aún teniendo en cuenta las consideraciones realizadas, es posible que la ingesta dietaria de semilla de *Salvia hispánica* L., comúnmente denominada chia, sea una alternativa nutricional útil a fin de contrarrestar las complicaciones cardiovasculares asociadas al SM humano.

Figura 23 Alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco en un modelo experimental nutricional de dislipemia y resistencia insulínica: mecanismos subyacentes y efectos de la semilla de *Salvia hispánica* L. (chia)



A: Alteraciones bioquímicas-metabólicas del músculo cardíaco de los animales alimentados crónicamente con una DRS (rojo). **B:** Efectos de la semilla de chia dietaria sobre las alteraciones presentes en el músculo cardíaco de las ratas alimentadas con una DRS (verde). ↑ Aumento; ↓ disminución; ⊥ sin cambios con respecto al grupo control.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abete, I.; Astrup, A.; Martínez, A.J.; Thorsdottir, I. y Zulet, M.A. (2010) *Obesity and the metabolic syndrome: role of different dietary macronutrient distribution patterns and specific nutritional components on weight loss and maintenance*. Nutr. Rev. 68:214–231.
- Aebi, H. (1984) *Oxygen radicals in biological systems*. En: Methods in enzymology (Ed: Packer, L.) Academic Press, New York, USA, p. 121-126.
- Alvarez, S.M.; Gómez, N.N.; Scardapane, L.; Zirulnik, F.; Martínez, D. y Giménez, M.S. (2004) *Morphological changes and oxidative stress in rat prostate exposed to a non-carcinogenic dose of cadmium*. Toxicol. Lett. 153: 365–376.
- Ayerza, R. y Coates, W. (2004) *Composition of chia (Salvia hispanica) grown in six tropical and subtropical ecosystems of South America*. Tropical Sci. 44: 131–135.
- Ayerza, R. y Coates, W. (2005) *Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat*. Nutr. Res. 25: 995–1003.
- Ayerza, R. y Coates, W. (2007) *Effect of dietary α -linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma*. Ann. Nutr. Metab. 51: 27–34.
- Ayerza, R. (2009) *The seed's protein and oil content, fatty acid composition, and growing cycle length of a single genotype of chia (Salvia hispanica L.) as affected by environmental factors*. J. Oleo Sci. 58: 347–354.
- Ayerza, R. (2013) *Contenido de aceite y composición de ácidos grasos de semillas de chía (Salvia Hispanica L.) cultivadas en tres ecosistemas tropicales de América del Sur*. A&G 3: 402–407.
- Ballal, K.; Wilson, C.R.; Harmancey, R. y Taegtmeier, H. (2010) *Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart*. Mol. Cell. Biochem. 344: 221–230.

- Barbeau, P.A.; Holloway, T.M.; Whitfield, J.; Baechler, B.L.; Quadrilatero, J.; van Loon, L.J.C.; Chabowski, A. y Holloway, G.P. (2017) *α -Linolenic acid and exercise training independently, and additively, decrease blood pressure and prevent diastolic dysfunction in obese Zucker rats*. J. Physiol. 595: 4351–4364.
- Barceló-Coblijn, G. y Murphy, E.J. (2009) *Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels*. Prog. Lipid Res. 48: 355-374.
- Barger, P.M. y Kelly, D.P. (2000) *PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism*. Trends Cardiovasc. Med. 10: 238–245.
- Beauloye, C.; Marsin, A.S.; Bertrand, L.; Krause, U.; Hardie, D.G.; Vanoverschelde, J.L. y Hue, L. (2001) *Insulin antagonizes AMP-activated protein kinase activation by ischemia or anoxia in rat hearts, without affecting total adenine nucleotides*. FEBS Lett. 505: 348–352.
- Belke, D.D., Larsen, T.S.; Gibbs, E.M. y Severson, D.L. (2000) *Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279: E1104–E1113.
- Bermeyer, H.U. (1974) *Methods for determination of metabolites*. En: *Methods of enzymatic analysis*. 2^{da} Edición. (Ed: Bermeyer, H.U.) Academic Press, New York, USA, p. 1100-2110.
- Bernal, C.A.; Gutman, R.A. y Lombardo, Y.B. (1995) *The duration of feeding on a sucrose-rich diet determines variable in vitro effects of insulin and fructose on rat liver triglyceride metabolism*. J. Nutr. Biochem. 6: 422–430.
- Bernstein, R.S. y Kipnis, D.M. (1973) *Regulation of rat hexokinase isozymes. I. Assay and effect of age, fasting, and refeeding*. Diabetes 22: 913–922.
- Bertrand, L.; Horman, S.; Beauloye, C. y Vanoverschelde, J.L. (2008) *Insulin signalling in the heart*. Cardiovasc. Res. 79: 238–248.
- Bezerra, R.M.N.; Ueno, M.; Silva, M.S.; Tavares, D.Q.; Carvalho, C.R.O. y Saad, M.J.A.

- (2000) *A high fructose diet affects the early steps of insulin action in muscle and liver of rats*. J. Nutr. 130: 1531–1535.
- Blanquart, C.; Barbier, O.; Fruchart, J.C.; Staels, B. y Glineur, C. (2002) *Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes*. J. Biol. Chem. 277: 37254–37259.
- Bogazzi, F.; Raggi, F.; Ultimieri, F.; Russo, D.; D'Alessio, A.; Manariti, A.; Brogioni, S.; Manetti, L. y Martino, E. (2009) *Regulation of cardiac fatty acids metabolism in transgenic mice overexpressing bovine GH*. J. Endocrinol. 201: 419–427.
- Bonen, A.; Holloway, G.P.; Tandon, N.N.; Han, X.; McFarlan, J.; Glatz, J.F.C. y Luiken, J.J.F.P. (2009) *Cardiac and skeletal muscle fatty acid transport and transporters and triacylglycerol and fatty acid oxidation in lean and Zucker diabetic fatty rats*. Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol. 297: R1202–R1212.
- Boudina, S.; Bugger, H.; Sena, S.; O'Neill, B.; Zaha, V.G.; Ilkun, O.; Wright, J.J.; Mazumder, P.K.; Palfreyman, E.; Tidwell, T.J.; Theobald, H.; Khalimonchuk, O.; Wayment, B.; Sheng X.; Rodnick, K.J.; Centini, R.; Chen, D.; Litwin, S.E., Weimer, B.E.; Abel, E.D. y Phil, D. (2010). *Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart*. Circulation 119: 1272–1283.
- Bradford, M.M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72: 248–254.
- Brandt, J.M.; Djouadi, F. y Kelly, D.P. (1998) *Fatty acids activate transcription of the muscle carnitine palmitoyltransferase I gene in cardiac myocytes via the peroxisome proliferator-activated receptor α* . J. Biol. Chem. 273: 23786–23792.
- Brenna, J.T.; Salem, N.; Sinclair, A.J. y Cunnane, S.C. (2009) *α -Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans*. PLEFA 80: 85–91.

- Brownsey, R.W.; Boone, A.N. y Allard, M.F. (1997) *Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms*. Cardiovasc. Res. 34: 3–24.
- Bruce, K.D. y Hanson, M.A. (2010) *The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome*. J. Nutr. 140: 648–652.
- Buchanan, J.; Mazumder, P.K.; Hu, P.; Chakrabarti, G.; Roberts, M.W.; Yun, U.J.; Cooksey, R.C.; Litwin, S.E. y Abel, E.D. (2005) *Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity*. Endocrinology 146: 5341–5349.
- Burdge, G.C. y Calder, P.C. (2006) *Dietary α -linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective*. Nutr. Res. Rev. 19: 26-52.
- Burgoyne, J.R.; Monque-Din, H.; Eaton, P. y Shah, A.J. (2012) *Redox signaling in cardiac physiology and pathology*. Circ. Res. 111: 1091-1106.
- Busserolles, J.; Rock, E.; Gueux, E.; Mazur, A.; Grolier, P. y Rayssiguier, Y. (2002a) *Short-term consumption of a high-sucrose diet has a pro-oxidant effect in rats*. Br. J. Nutr. 87: 337–342.
- Busserolles, J.; Zimowska, W.; Rock, E.; Rayssiguier, Y. y Mazur, A. (2002b) *Rats fed a high sucrose diet have altered heart antioxidant enzyme activity and gene expression*. Life Sci. 71: 1303–1312.
- Calabró, V.; Piotrkowski, B.; Fischerman, L.; Vazquez-Prieto, M.A.; Galleano, M. y Fraga, C.G. (2016) *Modifications in nitric oxide and superoxide anion metabolism induced by fructose overload in the heart are prevented by (-)-epicatechin*. Food Funct. 7: 1876–1883.
- Campbell, F.M.; Kozak, R.; Wagner, A.; Altarejos, J.Y.; Dyck, J.R.B.; Belke, D.D.; Severson, D.L.; Kelly, D.P. y Lopaschuk, G.D. (2002) *A role for peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in the control of cardiac malonyl-CoA levels*. Biochemistry 277: 4098–4103.
- Capitani, M.I.; Spotorno, V.; Nolasco, S.M. y Tomás, M.C. (2012) *Physicochemical and*

-
- functional characterization of by-products from chia (Salvia hispanica L.) seeds of Argentina. LWT-Food Sci. Tech. 45: 94–102.*
- Castro, M.C.; Francini, F.; Gagliardino, J.J. y Massa, M.L. (2014) *Lipoic acid prevents fructose-induced changes in liver carbohydrate metabolism: role of oxidative stress. Biochim. Biophys. Acta 1840: 1145–1151.*
- Castro, M.C.; Massa, M.L.; González Arbeláez, L.; Schinella, G.; Gagliardino, J.J. y Francini, F. (2015) *Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: a liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. Life Sci. 137: 1–6.*
- Chabowski, A.; Gorski, J.; Glatz, J.F.C.; Luiken, J.J.F.P. y Bonen, A. (2008) *Protein-mediated fatty acid uptake in the heart. Curr. Cardiol. Rev. 4: 12–21.*
- Chanda, D.; Luiken, J.J.F.P. y Glatz, J.F.C. (2016) *Signaling pathways involved in cardiac energy metabolism. FEBS Lett. 590: 2364–2374.*
- Chen, Q.M. y Maltagliati, A.J. (2018) *Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. Physiol. Genomics 50: 77-97.*
- Chicco, A.G.; Gutman, R. y Lombardo, Y.B. (1991) *Biochemical abnormalities in the heart of rats fed a sucrose-rich diet: is the low activity of the pyruvate dehydrogenase complex a result of increased fatty acid oxidation? Metabolism 40: 15–21.*
- Chicco, A.G.; Soria, A.; Fainstein-Day, P.; Gutman, R. y Lombardo, Y.B. (1994) *Multiphasic metabolic changes in the heart of rats fed a sucrose-rich diet. Horm. Metab. Res. 26: 397–403.*
- Chicco, A.G.; Bernal, C.; Soria, A.; Giangrossi, G. y Lombardo, Y.B. (1999) *Dietary effects of partial or total substitution of sucrose for starch on glucose and lipid metabolism in dyslipidemic rats. Nutr. Res. 19: 281–293.*
- Chicco, A.G.; Basabe, J.C.; Karabatas, L.; Ferraris, N.; Fortino, A. y Lombardo, Y.B. (2000) *Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipidemic rats. Metabolism 49: 1346–1351.*

Chicco, A.G.; D'Alessandro, M.E.; Karabatas, L.; Pastorale, C.; Basabe, J.C. y Lombardo, Y.B. (2003) *Muscle lipid metabolism and insulin secretion are altered in insulin-resistant rats fed a high sucrose diet*. J. Nutr. 133: 127–133.

Chicco, A.G.; D'Alessandro, M.E.; Hein, G.J.; Oliva, M.E. y Lombardo, Y.B. (2009) *Dietary chia seed (Salvia hispanica L.) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats*. Br. J. Nutr. 101: 41–50.

Chinetti, G.; Fruchart, J.C. y Staels, B. (2000) *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation*. Inflamm. Res. 49: 497-505.

Chiu, H.C.; Kovacs, A.; Ford, D.A.; Hsu, F.F.; Garcia, R.; Herrero, P.; Saffitz, J.E. y Schaffer, J.E. (2001) *A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy*. J. Clin. Invest. 107: 813–822.

Chiu, H.C.; Kovacs, A.; Blanton, R.M.; Han, X.; Courtois, M.; Weinheimer, C.J.; Yamada, K.A.; Brunet, S.; Xu, H.; Nerbonne, J.M.; Welch, M.J.; Fettig, N.M.; Sharp, T.L.; Sambandam, N.; Olson, K.M.; Ory, D.S. y Schaffer, J.E. (2005) *Transgenic expression of fatty acid transport protein 1 in the heart causes lipotoxic cardiomyopathy*. Circ. Res. 96: 225–233.

Clarke, S.D. (2001) *Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome*. J. Nutr. 131: 1129–1132.

Cohen, A.M.; Briller, S.A. y Shafir, E. (1972) *Effect of longterm sucrose feeding on the activity of some enzymes regulating glycolysis, lipogenesis and gluconeogenesis in rat liver and adipose tissue*. Biochim. Biophys. Acta 279: 129–138.

Coort, S.L.M.; Hasselbaink, D.M.; Koonen, D.P.Y.; Willems, J.; Coumans, W.A.; Chabowski, A.; van der Vusse, G.J.; Bonen, A.; Glatz, J.F.C. y Luiken, J.J.F.P. (2004) *Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats*. Diabetes 53: 1655–1663.

Costamagna, A.; Minella, K. y Fuentes, M. (1998) *Estudios morfológicos en el corazón de ratas alimentadas con dieta rica en azúcares refinados (DRS)*. FABICIB 2: 49–54.

D'Alessandro, M.E.; Chicco, A.G.; Karabatas, L. y Lombardo, Y.B. (2000) *Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil*. J. Nutr. Biochem. 11: 273–280.

D'Alessandro, M.E.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2008) *Dietary fish oil reverses lipotoxicity, altered glucose metabolism, and nPKC ϵ translocation in the heart of dyslipemic insulin-resistant rats*. Metabolism 57: 911–919.

D'Alessandro, M.E.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2013) *Fish oil reverses the altered glucose transporter, phosphorylation, insulin receptor substrate-1 protein level and lipid contents in the skeletal muscle of sucrose-rich diet fed rats*. PLEFA 88: 171–177.

D'Alessandro, M.E.; Selenscig, D.; Illesca, P.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2015) *Time course of adipose tissue dysfunction associated with antioxidant defense, inflammatory cytokines and oxidative stress in dyslipemic insulin resistant rats*. Food Funct. 6: 1299–1309.

da Silva Marineli, R.; Alves Lenquiste, S.; Aguiar Moraes, E. y Maróstica, M.R. (2015) *Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (Salvia hispanica L.) in diet-induced obese rats*. Food Res. Int. 76: 666–674.

DeFronzo, R.A.; Tobin, J.D. y Andres, R. (1979) *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. Am. J. Physiol. 237: E214–E223.

DeFronzo, R.A. y Ferrannini, E. (2016) *Regulation of intermediary metabolism during fasting and feeding*. En: Endocrinology: adult and pediatric. 7^{ma} Edición. (Eds: De Groot, L.J.; de Kretser, D.M.; Grossman, A.B.; Guidice, L.C.; Jameson, J.L; Melwed, S.; Potts, J.T. y Weir, W.C.) Elsevier Inc., Philadelphia, USA, p. 598–626.e3.

Delbosc, S.; Paizanis, E.; Magous, R.; Araiz, C.; Dimo, T.; Cristol, J.P.; Cros, G. y Azay, J. (2005) *Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the*

fructose-fed rat. Atherosclerosis 179: 43–49.

Desrois, M.; Sidell, R.J.; Gauguier, D.; King, L.M.; Radda, G.K. y Clarke, K. (2004) *Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. Cardiovasc. Res.* 61: 288–296.

di Sapio, O.; Bueno, M.; Busilacchi, H. y Severin, C. (2008) *Chía: importante antioxidante vegetal. Agromensajes* 24.

di Sapio, O.; Bueno, M.; Busilacchi, H.; Quiroga, M. y Severin, C. (2012) *Caracterización morfoanatómica de hoja, tallo, fruto y semilla de Salvia hispanica L. (Lamiaceae). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11: 249–268.

Dutta, K.; Podolin, D.A.; Davidson, M.B. y Davidoff, A.J. (2001) *Cardiomyocyte dysfunction in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. Diabetes* 50: 1186–1192.

Dyck, J.R.B.; Stanley, W.C.; Barr, R.; Chandler, M.P.; Brown, S.; Wallace, D.; Arrhenius, T.; C. Harmon; Yang, G.; Nadzan, A.M. y Lopaschuk, G.D. (2004) *Malonyl coenzyme A decarboxylase inhibition protects the ischemic heart by inhibiting fatty acid oxidation and stimulating glucose oxidation. Circ. Res.* 94: e78–e84.

Dyck, J.R.B. y Lopaschuk, G.D. (2006) *AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? J. Physiol.* 574: 95–112.

Evans, J.L.; Goldfine, I.D.; Maddux, B.A. y Grodsky, G.M. (2002) *Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocr. Rev.* 23: 599–622.

Feng, M.; Whitesall, S.; Zhang, Y.; Beibel, M.; Alecy, L.D. y Dipetrillo, K. (2008) *Validation of volume–pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. Am. J. Hypertens.* 21: 1288–1291.

Ferreira, J.C.B.; Chakur Brum, P. y Mochly-Rosen, D. (2011) *β IIPKC and ϵ PKC isozymes as potential pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure. J. Mol.*

Cell. Cardiol. 51: 479-484.

Ferreira, M.R.; Lombardo, Y.B. y Chicco, A.G. (2010) *β -cell adaptation/dysfunction in an animal model of dyslipidemia and insulin resistance induced by the chronic administration of a sucrose-rich diet*. Islets 2: 367–373.

Ferreira, M.R.; Alvarez, S.M.; Illesca, P.; Giménez, M.S. y Lombardo, Y.B. (2016) *Dietary Salba (Salvia hispanica L.) ameliorates the adipose tissue dysfunction of dyslipemic insulin-resistant rats through mechanisms involving oxidative stress, inflammatory cytokines and peroxisome proliferator-activated receptor γ* . Eur. J. Nutr. 53: 87–94.

Fillmore, N. y Lopaschuk, G.D. (2011) *Impact of fatty acid oxidation on cardiac efficiency*. Heart Metab. 53: 33–37.

Finck, B.N.; Lehman, J.L.; Leone, T.C.; Welch, M.J.; Bennett, M.J.; Kovacs, A.; Han, X.; Gross, R.W.; Kozak, R.; Lopaschuk, G.D. y Kelly, D.P. (2002) *The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus*. J. Clin. Invest. 109: 121–130.

Finck, B.N.; Han, X.; Courtois, M.; Aimond, F.; Nerbonne, J.M.; Kovacs, A.; Gross, R.W. Kelly, D.P. (2003) *A critical role for PPAR α -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 1226–1231.

Finck, B.N. (2007) *The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease*. Cardiovasc. Res. 73: 269–277.

Folch, J.; Lees, M. y Stanley, G.H.S. (1957) *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. J. Biol. Chem. 226: 497–509.

Folino, A.; Sprio, A.E.; Di Scipio, F.; Berta, G.N. y Rastaldo, R. (2015) *Alpha-linolenic acid protects against cardiac injury and remodelling induced by beta-adrenergic overstimulation*. Food Func. 6: 2231–2239.

Galisteo, M.; Duarte, J. y Zarzuelo, A. (2008) *Effects of dietary fibers on disturbances clustered in the metabolic syndrome*. J. Nutr. Biochem. 19: 71–84.

-
- Gamble, J. y Lopaschuk, G.D. (1997) *Insulin inhibition of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase in the heart results in activation of acetyl coenzyme A carboxylase and inhibition of fatty acid oxidation*. *Metabolism* 46: 1270–1274.
- Gami, A.S.; Witt, B.J.; Howard, D.E.; Erwin, P.J.; Gami, L.A.; Somers, V.K. y Montori, V.M. (2007) *Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies*. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49: 403–414.
- Gao, L.; Wang, J.; Sekhar, K.R.; Yin, H.; Yared, N.F.; Schneider, S.N.; Sasi, S.; Dalton, T.P.; Anderson, M.E.; Chan, J.Y.; Morrow, J.D. y Freeman, M.L. (2007) *Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between keap1 and cullin3*. *J. Biol. Chem.* 282: 2529–2537.
- Garland, P.B.; Newsholme, E.A. y Randle, P.J. (1962) *Effect of fatty acids, ketone bodies, diabetes and starvation on pyruvate metabolism in rat heart and diaphragm muscle*. *Nature*, 4839: 381–383.
- Garland, P.B.; Randle, P.J. y Newsholme, E.A. (1963) *Citrate as an intermediary in the inhibition of phosphofructokinase in rat heart muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation*. *Nature* 200: 169–170.
- Garvey, W. (1984) *Modified elastic tissue-Masson trichrome stain*. *Stain Tech.* 59: 213–216.
- Georgiadi, A.; Boekschoten, M.V.; Muller, M. y Kersten, S. (2012) *Detailed transcriptomics analysis of the effect of dietary fatty acids on gene expression in the heart*. *Physiol. Genomics* 44: 352–361.
- Ghafoorunissa, A.I. y Natarajan, S. (2005) *Substituting dietary linoleic acid with α -linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats*. *Biochim. Biophys. Acta* 1733: 67–75.
- Gharib, M.; Tao, H.; Fungwe, T.V. y Hajri, T. (2016) *Cluster differentiating 36 (CD36) deficiency attenuates obesity-associated oxidative stress in the heart*. *PLoS ONE* 11: e0155611.

- Glatz, J.F.C.; Angin, Y.; Steinbusch, L.K.M.; Schwenk, R.W. y Luiken, J.J.F.P. (2013) *CD36 as a target to prevent cardiac lipotoxicity and insulin resistance*. PLEFA 88: 71-77.
- Glatz, J.F.C.; Nabben, M.; Heather, L.C.; Bonen, A. y Luiken, J.J.F.P. (2016) *Regulation of the subcellular trafficking of CD36, a major determinant of cardiac fatty acid utilization*. Biochim. Biophys. Acta 1861: 1461–1471.
- González-Mañán, D.; Tapia, G.; Gormaz, J.G.; D'Espessailles, A.; Espinosa, A.; Masson, L.; Varela, P.; Valenzuela, A. y Valenzuela, R. (2012) *Bioconversion of α -linolenic acid to n-3 LCPUFA and expression of PPAR- α , acyl coenzyme A oxidase 1 and carnitine acyl transferase 1 are incremented after feeding rats with α -linolenic acid-rich oils*. Food Func. 3: 765–772.
- González-Mañán, D.; D'Espessailles, A.; Dossi, C.G.; San Martin, M.; Mancilla, R.A. y Tapia, G.S. (2017) *Rosa mosqueta oil prevents oxidative stress and inflammation through the upregulation of PPAR- α and NRF2 in C57BL/6J mice fed a high-fat diet*. J. Nutr. 147: 579–588.
- Grundy, S.M. (2008) *Metabolic syndrome pandemic*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28: 629–636.
- Gutman, R.A.; Basílico, M.Z.; Bernal, C.A.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (1987) *Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet*. Metabolism 36: 1013–1020.
- Guyton, A.C. y Hall, J.E. (2006) *Textbook of Medical Physiology*. 9^{na} edición. Elsevier Inc., Philadelphia, USA.
- Guzzardi, M.A. y Iozzo, P. (2011) *Fatty heart, cardiac damage, and inflammation*. Rev. Diab. Stud. 8: 403–417.
- Hein, G.J.; Bernasconi, A.M.; Montanaro, M.A.; Pellon-Maison, M.; Finarelli, G.; Chicco, A.G.; Lombardo, Y.B. y Brenner, R.R. (2010) *Nuclear receptors and hepatic lipidogenic enzyme response to a dyslipidemic sucrose-rich diet and its reversal by fish*

-
- oil n-3 polyunsaturated fatty acids*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 298: E429–E439.
- Hein, G.J.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2012) *Fish oil normalizes plasma glucose levels and improves liver carbohydrate metabolism in rats fed a sucrose-rich diet*. Lipids 47: 141–150.
- Herbert, V.; Lau, K.S.; Gottlieb, C.W. y Bleicher, S.J. (1965) *Coated charcoal immunoassay of insulin*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 25: 1375–1384.
- Ho, H.; Lee, A.S.; Jovanovski, E.; Jenkins, A.L.; Desouza, R. y Vuksan, V. (2013) *Effect of whole and ground Salba seeds (Salvia hispanica L.) on postprandial glycemia in healthy volunteers: a randomized controlled, dose-response trial*. Eur. J. Clin. Nutr. 67: 786–788.
- How, O.J.; Aasum, E.; Severson, D.L.; Chan, W.Y.A.; Essop, M.F. y Larsen, T.S. (2006) *Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice*. Diabetes 55: 466–473.
- How, O.J.; Larsen, T.S.; Hafstad, A.D.; Khalid, A.; Myhre, E.S.P.; Murray, A.J.; Boardman, N.T.; Cole, M.; Clarke, K.; Severson, D. L. y Aasum, E. (2007) *Rosiglitazone treatment improves cardiac efficiency in hearts from diabetic mice*. Arch. Physiol. Biochem. 113: 211–220.
- Hu, F.B. y Malik, V.S. (2010) *Sugar-sweetened beverages and risk of obesity and type 2 diabetes: epidemiologic evidence*. Physiol. Behav. 100: 47–54.
- Hue, L. y Taegtmeier, H. (2009) *The Randle cycle revisited: a new head for an old hat*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 297: E578–E591.
- Huss, J.M. y Kelly, D.P. (2004) *Nuclear receptor signaling and cardiac energetics*. Circ. Res. 95: 568–578.
- Hwang, I.S.; Ho, H.; Hoffman, B.B. y Reaven, G.M. (1988) *Fructose induced insulin resistance and hypertension in rats*. Hypertension 10: 512–516.

- Ide, T.; Murata, M. y Sugano, M. (1996) *Stimulation of the activities of hepatic fatty acid oxidation enzymes by dietary fat rich in α -linolenic acid in rats*. J. Lipid Res. 37: 448–463.
- Ide, T.; Kobayashi, H.; Ashakumary, L.; Rouyer, I.A.; Takahashi, Y.; Aoyama, T.; Hashimoto, T. y Mizugaki, M. (2000) *Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver*. Biochim. Biophys. Acta 1485: 23–35.
- Ihara, M.; Umekawa, H.; Takahashi, T. y Furuichi, Y. (1998) *Comparative effects of short- and long-term feeding of safflower oil and perilla oil on lipid metabolism in rats*. Comp. Biochem. Physiol. 121: 223–231.
- Jeffery, N.M.; Sanderson, P.; Sherrington, E.J.; Newsholme, E.A. y Calder, P.C. (1996) *Level of polyunsaturated fatty acids and the n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acid ratio in the rat diet alter serum lipid levels and lymphocyte functions*. Lipids 31: 737–745.
- Jenkins, A.L.; Brissette, C.; Jovanovski, E.; Au-Yeung, F.; Ho, T.V.T.; Zurbau, A.; Sievenpiper, J. y Vuksan, V. (2016) *Effects of Salba-chia (Salvia hispanica L), an ancient seed, in the treatment of overweight and obese patients with type 2 diabetes: a double-blind, parallel, randomized controlled trial*. FASEB J. 30.
- Johnson, R.K.; Appel, L.J.; Brands, M.; Howard, B.V.; Lefevre, M.; Lustig, R.H.; Sacks, F.; Steffen, L.M. y Wylie-Rosett, J. (2009) *Dietary sugars intake and cardiovascular health. A scientific statement from the American Heart Association*. Circulation 120: 1011–1020.
- Kakkar, P.; Das, B. y Viswanathan, P.N. (1984) *A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase*. Indian J. Biochem. Biophys. 21: 130–132.
- Kang, D.H.; Park, S.; Lee, I. y Johnson, R.J. (2005) *Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells*. J. Am. Soc. Nephrol. 16: 3553–3562.
- Kantor, P.F.; Lucien, A.; Kozak, R. y Lopaschuck, G.D. (2000) *The antianginal drug*

trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. Circ. Res. 86: 580–588.

Kelishadi, R.; Mansourian, M. y Heidari-Beni, M. (2014) *Association of fructose consumption and components of metabolic syndrome in human studies: a systematic review and meta-analysis.* Nutrition 30: 503–510.

Kerner, J. y Hoppel, C. (2000) *Fatty acid import into mitochondria.* Biochim. Biophys. Acta 1486: 1–17.

Kewalramani, G.; An, D.; Kim, M.S.; Ghosh, S.; Qi, D.; Abrahani, A.; Pulinilkunnil, V.; Sharma, V.; Wambolt, R.B.; Allard, M.F.; Innis, S.M. y Rodrigues, B. (2007) *AMPK control of myocardial fatty acid metabolism fluctuates with the intensity of insulin-deficient diabetes.* J. Mol. Cell. Cardiol. 42: 333–342.

Khosla, U.M.; Zharikov, S.; Finch, J.L.; Nakagawa, T.; Roncal, C.; Mu, W.; Krotova, K.; Block, E.R.; Prabhakar, S. y Johnson, R.J. (2005) *Hyperuricemia induces endothelial dysfunction.* Kidney Int. 67: 1739–1742.

Kienesberger, P.C.; Pulinilkunnil, T.; Nagendran, J. y Dyck, J.R.B. (2013) *Myocardial triacylglycerol metabolism.* J. Mol. Cell. Cardiol. 55: 101–110.

Kim, H.K.; Choi, S. y Choi, H. (2004) *Suppression of hepatic fatty acid synthase by feeding α -linolenic acid rich perilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats.* J. Nutr. Biochem. 15: 485–492.

Kim, K.; Nam, Y.A.; Kim, H.S.; Hayes, A.W. y Lee, B.M. (2014) *α -Linolenic acid: nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation.* Food Chem. Toxicol. 70: 163–178.

Klein, A.V. y Kiat, H. (2015) *The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: a review.* J. Hypertens. 33: 912–920.

Kovacic, S.; Soltys, C.L.M.; Barr, A.J.; Shiojima, I.; Walsh, K. y Dyck, J.R.B. (2003) *Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the*

heart. J. Biol. Chem. 278: 39422–39427.

Kris-Etherton, P.M.; Harris, W.S. y Appel, L.J. (2002) *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. Circulation 106: 2747–2757.

Lambert, M. y Neish, A.C. (1950) Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions. Can. J. Res. 28: 83–89.

Laurell, S. (1966) *A method for routine determination of plasma triglycerides*. Scan. J. Clin. Lab. Invest. 18: 668–672.

Lee, H.S. y Csallany, S.A. (1987) *Measurement of free and bound malondialdehyde in vitamin E-deficient and -supplemented rat liver tissues*. Lipids 22: 104–107.

Leone, T.C.; Weinheimer, C.J. y Kelly, D.P. (1999) *A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in the cellular fasting response: the PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 7473–7478.

Li, N.; Wang, J.; Gao, F.; Tian, Y.; Song, R. y Zhu, S.J. (2010) *The role of uncoupling protein 2 in the apoptosis induced by free fatty acid in rat cardiomyocytes*. J. Cardiovasc. Pharm. 55: 161–167.

Lin, Y.H. y Salem, N. (2007) Whole body distribution of deuterated linoleic and α -linolenic acids and their metabolites in the rat. J. Lipid Res. 48: 2709–2724.

Ling, B.; Aziz, C. y Alcorn, J. (2012) Systematic evaluation of key L-carnitine homeostasis mechanisms during postnatal development in rat. Nutr. Metab. 9: 66.

Liu, S.; Baracos, V.E.; Quinney, H.A. y Clandinin, M.T. (1994) *Dietary omega-3 and polyunsaturated fatty acids modify fatty acyl composition and insulin binding in skeletal-muscle sarcolemma*. Biochem. J. 299: 831–837.

Lombardo, Y.B.; Chicco, A.G.; Mocchiutti, N.; Rodi, M.A.; Nusimovich, B. y Gutman, R. (1983) *Effect of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro and on triglyceride storage and mobilisation of the heart of rats*. Horm. Metab. Res. 15: 69–76.

- Lombardo, Y.B.; Drago, S.; Chicco, A.G.; Fainstein-Day, P.; Gutman, R.; Gagliardino, J.J. y Gomez Dumm, C.L. (1996) *Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas*. *Metabolism* 45: 1527–1532.
- Lombardo, Y.B. y Chicco, A.G. (2006) *Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. A Review*. *J. Nutr. Biochem.* 17: 1–13.
- Lopaschuk, G.D.; Belke, D.D.; Gamble, J.; Itoi, T. y Schönekeess, B.O. (1994) *Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease*. *Biochim. Biophys. Acta* 1213: 263–276.
- Lopaschuk, G.D.; Ussher, J.R.; Folmes, C.D.L.; Jaswal, J.S. y Stanley, W.C. (2010) *Myocardial fatty acid metabolism in health and disease*. *Physiol. Rev.* 90: 207–258.
- Lorenzo, O.; Ramírez, E.; Picatoste, B.; Egido, J. y Tuñón, J. (2013) *Alteration of energy substrates and ROS production in diabetic cardiomyopathy*. *Mediators Inflamm.* 2013: 1–11.
- Luiken, J.J.F.P.; Koonen, D.P.Y.; Willems, J.; Zorzano, A.; Becker, C.; Fischer, Y.; Tandon, N.N.; van der Vusse, G.J.; Bonen, A. y Glatz, J.F.C (2002) *Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36*. *Diabetes* 51: 3113–3119.
- Mazumder, P.K.; O'Neill, B.T.; Roberts, M.W.; Buchanan, J.; Yun, U.J.; Cooksey, R.C.; Boudina, S. y Abel, E.D. (2004) *Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts*. *Diabetes* 53: 2366–2374.
- Mazzali, M.; Hughes, J.; Kim, Y.; Jefferson, J.A.; Kang, D.H.; Gordon, K.L.; Lan, H.Y.; Kivlighn, S. y Johnson, R.J. (2001) *Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism*. *Hypertension* 38: 1101–1106.
- McGarry, D.J. y Brown, N.F. (1997) *The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis*. *Eur. J. Biochem.* 244: 1–14.

Mellor, K.; Ritchie, R.H.; Meredith, G.; Woodman, O.L.; Morris, M.J. y Delbridge, L.M.D.

(2010) *High-fructose diet elevates myocardial superoxide generation in mice in the absence of cardiac hypertrophy*. Nutrition 26: 842–848.

Ménard, S.L.; Croteau, E.; Sarrhini, O.; Gélinas, R.; Brassard, P.; Ouellet, R.; Bentourkia, M.; van Lier, J.E.; Des Rosiers, C.; Lecomte, R. y Carpentier, A.C. (2010) *Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 298: E1049–E1057.

Mendis, S.; Pekka, P. y Norrving, B. (2011). *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. (Ed: Mendis, S.; Puska, P y Norrving, B.) World Health Organization, Genova, Italia.

Montanaro, M.A.; Lombardo, Y.B.; González, M.S.; Bernasconi, A.M.; Chicco, A.G.; Rimoldi, O.J.; Basabe, J.C. y Brenner, R.R. (2005). *Effect of troglitazone on the desaturases in a rat model of insulin-resistance induced by a sucrose-rich diet*. PLEFA 72: 241–250.

Montes, M.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2000) *The effect of insulin on the uptake and metabolic fate of glucose in isolated perfused hearts of dyslipemic rats*. J. Nutr. Biochem. 11: 30–37.

Montessuit, C. y Lerch, R. (2013) *Regulation and dysregulation of glucose transport in cardiomyocytes*. Biochim. Biophys. Acta 1833: 848–856.

Mora, A.; Sakamoto, K.; McManus, E.J. y Alessi, D.R. (2005) *Role of the PDK1-PKB-GSK3 pathway in regulating glycogen synthase and glucose uptake in the heart*. FEBS Lett. 579: 3632–3638.

Mottillo, S.; Filion, K.B.; Genest, J.; Joseph, L.; Pilote, L.; Poirier, P.; Rinfret, S.; Schiffrin, E.L. y Eisenberg, M.J. (2010) *The metabolic syndrome and cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis*. J. Am. Coll. Cardiol. 56: 1113–1132.

Mozaffarian, D. y Wu, J.H.Y. (2011) *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events*. J. Am. Coll. Cardiol.

58: 2047–2067.

Mueckler, M. y Thorens, B. (2013) *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. Mol. Aspects Med. 34: 121–138.

Muñoz, L.A.; Cobos, A.; Diaz, O. y Aguilera, J.M. (2013) *Chia seed (Salvia hispanica): an ancient grain and a new functional food*. Food Rev. Int. 29: 394–408.

Murray, A.J.; Panagia, M.; Hauton, D.; Gibbons, G.F. y Clarke, K. (2005) *Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor α in the control of myocardial uncoupling protein levels*. Diabetes 54: 3496–3502.

Nakagawa, T.; Hu, H.; Zharikov, S.; Tuttle, R.; Short, R.A.; Glushakova, O.; Patel, J.M. y Johanson, R.J. (2005) *A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome*. Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 290: F625–F631.

Nakamura, K. y Handa, S. (1984) *Coomassie brilliant blue staining of lipids on thin-layer plates*. Anal. Biochem. 142: 406–410.

Neuman, R.E. y Logan, M.A. (1950) *The determination of hydroxyproline*. J. Biol. Chem. 184: 299–306.

Neves, F.A.; Cortez, E.; Bernardo, A.F.; Mattos, A.B.M.; Vieira, A.K.; Malafaia, T.O.; Thole, A.A.; Rodrigues-Cunha, A.C.S; Garcia-Souza, E.P.; Sichieric, R. y Moura, A.S (2014) *Heart energy metabolism impairment in western-diet induced obese mice*. J. Nutr. Biochem. 25: 50–57.

O'Neill, S. y O'Driscoll, L. (2015) *Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies*. Obes. Rev. 16: 1–12.

Ogawa, A.; Suzuki, Y.; Aoyama, T. y Takeuchi, H. (2009) *Dietary alpha-linolenic acid inhibits angiotensin-converting enzyme activity and mRNA expression levels in the aorta of spontaneously hypertensive rats*. J. Oleo Sci. 58: 355–360.

Oliva, M.E.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2009) *Soya protein reverses dyslipidaemia and the altered capacity of insulin-stimulated glucose utilization in the skeletal muscle*

of sucrose-rich diet-fed rats. Br. J. Nutr. 102: 60-68.

Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2013) *Dietary Salba (Salvia hispanica L) seed rich in α -linolenic acid improves adipose tissue dysfunction and the altered skeletal muscle glucose and lipid metabolism in dyslipidemic insulin-resistant rats. PLEFA 89: 279-289.*

Oliva, M.E.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2015) *Mechanisms underlying the beneficial effect of soy protein in improving the metabolic abnormalities in the liver and skeletal muscle of dyslipidemic insulin resistant rats. Eur. J. Nutr. 54: 407-419.*

Organización Mundial de la Salud (2015) *Enfermedades cardiovasculares*. Centro de prensa OMS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es>.

Opie, L.H. (2014) *Cardiac metabolism in health and disease*. En: *Cellular and molecular pathobiology of cardiovascular disease* (Eds: Willis, M.; Homeister, J. y Stone, J.) Elsevier Inc., Boston, USA, p. 23-36.

Ouwens, D.M.; Boer, C.; Fodor, M.; de Galan, P.; Heine, R.J.; Maassen, A.J. y Diamant, M. (2005) *Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. Diabetologia 48: 1229-1237.*

Ouwens, D.M.; Diamant, M.; Fodor, M.; Habets, D.D.J.; Pelters, M.M.A.L.; El Hasnaoui, M.; Dang, Z.C.; van den Brom, C.E.; Vlasblom, R.; Rietdijk, A.; Boer, C.; Coort, S.L.M.; Glatz, J.F.C. y Luiken, J.J.F.P (2007) *Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. Diabetologia 50: 1938-1948.*

Paglia, D. y Valentine, W. (1967) *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70: 158-169.*

Pagliassotti, M.J.; Shahrokhi, K.A. y Moscarello, M. (1994) *Involvement of liver and skeletal muscle in sucrose-induced insulin resistance: dose-response studies. Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol. 266: R1637-R1644.*

Pagliassotti, M.J.; Prach, P.A.; Koppenhafer, T.A. y Pan, D.A. (1996) *Changes in insulin*

- action, triglycerides and lipid composition during sucrose feeding in rats.* Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol. 271: R1319–R1326.
- Pan, A.; Chen, M.; Chowdhury, R.; Wu, J.H.Y.; Sun, Q.; Campos, H.; Mozaffarian, D. y Hu, F.B. (2012) *α -Linolenic acid and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis.* Am. J. Clin. Nutr. 96: 1262–1273.
- Panchal, S.K.; Poudyal, H. y Brown, L. (2012) *Quercetin ameliorates cardiovascular, hepatic, and metabolic changes in diet-induced metabolic syndrome in rats.* J. Nutr. 142: 1026–1032.
- Pappano, A.J. y Wier, W.G. (2013) *The cardiac pump.* En: Cardiovascular physiology. 10^{ma} edición. (Eds: Pappano, A.J. y Wier, W.G.) Elsevier Inc., Philadelphia, USA, p. 55-90.
- Pecqueur, C.; Alves-Guerra, M.C.; Gelly, C.; Lévi-Meyrueis, C.; Couplan, E.; Collins, S.; Ricquier, D.; Bouillaud, F. y Miroux, B. (2001) *Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation.* J. Biol. Chem. 276: 8705–8712.
- Pighin, D.; Karabatas, L.; Rossi, A.; Chicco, A.G.; Basabe, J.C. y Lombardo, Y.B. (2003) *Fish oil affects pancreatic fat storage, pyruvate dehydrogenase complex activity and insulin secretion in rats fed a sucrose-rich diet.* J. Nutr. 133: 4095–4101.
- Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Ward, L.C.; Waanders, J. y Brown, L. (2012a) *Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 302: E1472–E1482.
- Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Waanders, J.; Ward, L.C. y Brown, L. (2012b) *Lipid redistribution by α -linolenic acid-rich chia seed inhibits stearoyl-CoA desaturase-1 and induces cardiac and hepatic protection in diet-induced obese rats.* J. Nutr. Biochem. 23: 153–162.
- Poudyal, H.; Panchal, S.K.; Ward, L.C. y Brown, L. (2013) *Effects of ALA, EPA and DHA in high-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome in rats.* J. Nutr. Biochem. 24: 1041–1052.

Randle, P.J.; Garland, P.B.; Hales, C.N. y Newsholme, E.A. (1963) *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus.* Lancet 281: 785–789.

Randle, P.J.; Newsholme, E.A. y Garland, P.B. (1964) *Regulation of glucose uptake by muscle. 8. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes and starvation, on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles.* Biochem. J. 93: 652–665.

Randle, P.J.; Kerbey, A.L. y Espinalt, J. (1988) *Mechanisms decreasing glucose oxidation in diabetes and starvation: role of lipid fuels and hormones.* Diabetes Metab. Rev. 4: 623–638.

Reaven, G.M.; Risser, T.R.; Chen, I.Y.D. y Reaven, E.P. (1979) *Characterization of a model of dietary-induced hypertriglyceridemia in young, nonobese rats.* J. Lipid Res. 20: 371–378.

Reaven, G.M. y Ho, H. (1991) *Sugar-induced hypertension in Sprague-Dawley rats.* Am. J. Hypertens. 4: 610–614.

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H. y Fahey, G.C. (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: 1939–1951.

Reznick, A.Z. y Packer, L. (1994) *Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay.* Methods Enzymol. 233: 357–363.

Rincón-Cervera, M.A.; Valenzuela, R.; Hernandez-Rodas, M.C.; Barrera, C.; Espinosa, A.; Marambio, M. y Valenzuela, A. (2016) *Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats.* PLEFA 111: 25–35.

Rodnick, K.J.; Slot, J.W.; Studelska, D.R.; Hanpeter, D.E.; Robinson, L.J.; Geuze, H.J. y James, D.E. (1992) *Immunocytochemical and biochemical studies of GLUT4 in rat skeletal muscle.* J. Biol. Chem. 267: 6278–6285.

Rossi, A.S.; Lombardo, Y.B.; Lacorte, J.C.; Chicco, A.G.; Rouaultt, C.; Slama, G. y Rizkalla, S.W. (2005) *Dietary fish oil positively regulates plasma leptin and adiponectin levels in sucrose-fed, insulin-resistant rats*. Am. J. Physiol. Reg. Integr. Comp. Physiol. 289: R486–R494.

Rossi, A.S.; Lombardo, Y.B. y Chicco, A.G. (2010) *Lipogenic enzyme activities and glucose uptake in fat tissue of dyslipemic, insulin-resistant rats: effects of fish oil*. Nutr. 26: 209–217.

Rossi, A.S.; Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2013) *Dietary chia seed induced changes in hepatic transcription factors and their target lipogenic and oxidative enzyme activities in dyslipidaemic insulin-resistant rats*. Br. J. Nutr. 109: 1617–1627.

Rousseau, D.; Héliers-Toussaint, C.; Moreau, D.; Raederstorff, D. y Grynberg, A. (2003) *Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 285: H1294–H1302.

Sacks, F.M.; Lichtenstein, A.H.; Wu, J.H.Y.; Appel, L.J.; Creager, M.A.; Kris-Etherton, P.M.; Miller, M.; Rimm, E.B.; Rudel, L.L.; Robinson, J.G.; Stone, N.J. y Van Horn, L.V. (2017) *Dietary fats and cardiovascular disease: a presidential advisory from the American Heart Association*. Circulation 136: e1–e23.

Saddik, M.; Gamble, J.; Witters, L.A. y Lopaschuk, G.D. (1993) *Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart*. J. Biol. Chem. 268: 25836–25845.

Samovski, D.; Sun, J.; Pietka, T.; Gross, R.W.; Eckel, R.H.; Su, X.; Stahl, P.D. y Abumrad, N.A. (2015) *Regulation of AMPK activation by CD36 links fatty acid uptake to β -oxidation*. Diabetes 64: 353–359.

Sánchez-Lozada, L.G.; Tapia, E.; Bautista-García, P.; Soto, V.; Avila-Casado, C.; Vega-Campos, I.P.; Nakagawa, T.; Zhao, L.; Franco, M. y Johnson, R.J. (2008) *Effects of febuxostat on metabolic and renal alterations in rats with fructose-induced metabolic syndrome*. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 294: F710–F718.

Schmitz-Peiffer, C.; Browne, C.L.; Oakes, N.D.; Watkinson, A.; Chisholm, D.J.; Kraegen, E.W. y Biden, T.J. (1997) *Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C isozymes ϵ and σ are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat.* Diabetes 46: 169–178.

Selenscig, D.; Rossi, A.S.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2010) *Increased leptin storage with altered leptin secretion from adipocytes of rats with sucrose-induced dyslipidemia and insulin resistance: effect of dietary fish oil.* Metabolism 59: 787–795.

Soria, A.; Chicco, A.G.; D'Alessandro, M.E.; Rossi, A.S. y Lombardo, Y.B. (2002) *Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model.* J. Nutr. Biochem. 13: 209–218.

Sosa, A.; Ruiz, G.; Rana, J.; Gordillo, G.; West, H.; Sharma, M.; Liu, X. y Robles de la Torre, R.R. (2016) *Chia crop (Salvia hispanica L.): its history and importance as a source of polyunsaturated fatty acids omega-3 around the world: a review.* J. Crop Res. Fert. 1: 1–9.

Stanley, W.C.; Lopaschuk, G.D.; Hall, J.L. y McCormack, J.G. (1997a) *Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions.* Cardiovasc. Res. 33: 243–257.

Stanley, W.C.; Lopaschuk, G.D. y McCormack, J.G. (1997b) *Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart.* Cardiovasc. Res. 34: 25–33.

Stanley, W.C.; Recchia, F.A. y Lopaschuk, G.D. (2005) *Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart.* Physiol. Rev. 85: 1093–1129.

Storlien, L.H.; Kraegen, E.W.; Jenkins, A.B. y Chisholm, D.J. (1988) *Effects of sucrose vs starch diets on in vivo insulin action, thermogenesis, and obesity in rats.* Am. J. Clin. Nutr. 47: 420–427.

Storlien, L.H.; Jenkins, A.B.; Chisholm, D.J.; Pascoe, W.S.; Khouri, S. y Kraegen, E.W. (1991) *Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid.*

Diabetes 40: 280–289.

Sugden, M.C. y Holness, M.J. (2006) *Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases*. Arch. Physiol. Biochem. 112: 139–149.

Sun, W.; Liu, Q.; Leng, J.; Zheng, Y. y Li, J. (2015) *The role of pyruvate dehydrogenase complex in cardiovascular diseases*. Life Sci. 121: 97–103.

Thompson, A.J. y Cooney, G.J. (2000) *Acyl-CoA inhibition of hexokinase in rat and human skeletal muscle is a potential mechanism of lipid-induced insulin resistance*. Diabetes 49: 1761–1765.

Tran, L.T.; Yuen, V.G. y McNeill, J.H. (2009) *The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension*. Mol. Cell. Biochem. 332: 145–159.

Tune, J.D.; Goodwill, A.G.; Sassoon, D.J. y Mather, K.J. (2017) *Cardiovascular consequences of metabolic syndrome*. Transl. Res. 183: 57–70.

Ussher, J.R.; Folmes, C.D.L.; Keung, W.; Fillmore, N.; Jaswal, J.S.; Cadete, V.J.; Beker, D.L.; Lam, V.H.; Zhang, L. y Lopaschuk, G.D. (2012) *Inhibition of serine palmitoyl transferase I reduces cardiac ceramide levels and increases glycolysis rates following diet-induced insulin resistance*. PLoS ONE 7: e37703.

Valenzuela B.R.; Barrera R.C.; González-Astorga, M.; Sanhueza C.J. y Valenzuela B.A. (2014) *Alpha linolenic acid (ALA) from Rosa canina, Sacha inchi and chia oils may increase ALA accretion and its conversion into n-3 LCPUFA in diverse tissues of the rat*. Food Func. 5: 356–367.

van Bilsen, M. (2015) *Nutritional and environmental influences on cardiac metabolism and performance*. En: The scientist's guide to cardiac metabolism (Eds: Schwarzer, M. y Doenst, T.) Elsevier Inc., Philadelphia, USA, p. 139–53.

van der Lee, K.A.M.J.; Vork, M.M.; De Vries, J.E.; Willemsen, P.H.M.; Glatz, J.F.C.; Reneman, R.S.; van der Vusse, G.J. y van Bilsen, M. (2000) *Long-chain fatty acid-*

induced changes in gene expression in neonatal cardiac myocytes. J. Lipid Res. 41: 41–47.

van der Vusse, G.J.; Glatz, J.F.C.; Stam, H.C. y Reneman, R.S. (1992) *Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart.* Physiol. Rev. 72: 881–940.

van der Vusse, G.J.; van Bilsen, M. y Glatz, J.F.C. (2000) *Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease.* Cardiovasc. Res. 45: 279–293.

van Oort, M.M.; van Doorn, J.M.; Bonen, A.; Glatz, J.F.C.; van der Horst, D.J.; Rodenburg, K.W. y Luiken, J.J.F.P. (2008) *Insulin-induced translocation of CD36 to the plasma membrane is reversible and shows similarity to that of GLUT4.* Biochim. Biophys. Acta 1781: 61–71.

Vázquez-Ovando, A.; Rosado-Rubio, G.; Chel-Guerrero, L. y Betancur-Ancona, D. (2009) *Physicochemical properties of a fibrous fraction from chia (Salvia hispanica L.).* LWT-Food Sci. Tech. 42: 168–173.

Vrana, A.; Kazdova, L.; Dobesova, Z.; Kunes, J.; Kren, V.; Bila, V.; Stolba, P. y Klimes, I. (1993) *Triglyceridemia, glucoregulation, and blood pressure in various rat strains. Effects of dietary carbohydrates.* Ann. N. Y. Acad. Sci. 683: 57–68.

Vuksan, V.; Whitham, D.; Sievenpiper, J.L.; Jenkins, A.L.; Rogovik, A.L.; Bazinet, R.P.; Vidgen, E. y Hanna, A. (2007) *Supplementation of conventional therapy with the novel grain Salba (Salvia hispanica L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes.* Diabetes Care 30: 2804–2810.

Vuksan, V.; Jenkins, A.L.; Dias, A.G.; Lee, A.S.; Jovanovski, E.; Rogovik, A.L. y Hanna, A. (2010) *Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: possible explanation of the long-term effects of whole grain Salba (Salvia hispanica L.).* Eur. J. Clin. Nutr. 64: 436–438.

Vuksan, V.; Jenkins, A.L.; Brissette, C.; Choleva, L.; Jovanovski, E.; Gibbs, A.L.; Bazinet, R.P.; Au-Yeung, F.; Zurbau, A.; Ho, H.V.T.; Duvnjak, L.; Sievenpiper, J.L.; Josse, R.G. y Hanna, A. (2017a) *Salba-chia (Salvia hispanica L.) in the treatment of overweight and*

obese patients with type 2 diabetes: a double-blind randomized controlled trial. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 27: 138–146.

Vuksan, V.; Choleva, L.; Jovanovski, E.; Jenkins, A.L.; Au-Yeung, F.; Dias, A.G.; Ho, H.V.T.; Zurbau, A. y Duvnjak, L. (2017b) *Comparison of flax (Linum usitatissimum) and Salba-chia (Salvia hispanica L.) seeds on postprandial glycemia and satiety in healthy individuals: a randomized, controlled, crossover study.* Eur. J. Clin. Nutr. 71: 234–238.

Wang, X.; Fang, H.; Huang, Z.; Shang, W.; Hou, T.; Cheng, A. y Cheng, H. (2013) *Imaging ROS signaling in cells and animals.* J. Mol. Med. 91: 917–927.

Watanabe, Y.; Huang, Y.S.; Simmons, V.A.; Horrobin, D.F. (1987) *The effect of dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure and tissue fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats.* Lipids 24: 638-644.

Watanabe, K.; Fujii, H.; Takahashi, T.; Kodama, M.; Aizawa, Y.; Ohta, Y.; Ono, T.; Hasegawa, G.; Naito, M.; Nakajima, T.; Kamijo, Y.; Gonzalez, F.J. y Aoyama, T. (2000) *Constitutive regulation of cardiac fatty acid metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor α associated with age-dependent cardiac toxicity.* J. Biol. Chem. 275: 22293–22299.

Weber, K.T. (2000) *Fibrosis and hypertensive heart disease.* Curr. Opin. Cardiol. 15: 264–272.

Wieland, O.H.; Patzelt, C. y Löffler, G. (1972) *Active and inactive forms of pyruvate dehydrogenase in rat liver. Effect of starvation and refeeding and of insulin treatment on pyruvate-dehydrogenase interconversion.* Eur. J. Biochem. 26: 426–433.

Williamson, J.R. y Corkey, B. (1969) *Assays of intermediates of the citric acid cycle and related compounds by fluorometric enzyme methods.* En: *Methods in Enzymology* (Ed: Lowenstein, J.M.) Academic Press, New York, USA, p. 434–513.

Wilson, C.R.; Tran, M.K.; Salazar, K.L.; Young, M.E. y Taegtmeier, H. (2007) *Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile*

dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem. J.* 406: 457–467.

Wu, P.; Sato, J.; Zhao, Y.; Jaskiewicz, J.; Popov, K.M. y Harris, R.A. (1998) *Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart*. *Biochem. J.* 329: 197–201.

Xie, N.; Zhang, W.; Li, J.; Liang, H.; Zhou, H.; Duan, W.; Xu, X.; Yu, S.; Zhang, H. y Yi, D. (2011) *α -Linolenic acid intake attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects in diabetic but not normal rats*. *Arch. Med. Res.* 42: 171–181.

Yagyu, H.; Chen, G.; Yokoyama, M.; Hirata, K.; Augustus, A.; Kako, Y.; Seo, T.; Hu, Y.; Lutz, E.P.; Merkel, M.; Bensadoun, A.; Homma, S. y Goldberg, I.J. (2003) *Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy*. *J. Clin. Invest.* 111: 419–426.

Yan, L.; Zhang, D.J.; Wang, B.; Lv, Y.J.; Jiang, H.; Liu, G.L.; Qiao, Y.; Ren, M. y Guo, X.F. (2013) *Quercetin inhibits left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats and inhibits angiotensin II-induced H9C2 cells hypertrophy by enhancing PPAR- γ expression and suppressing AP-1 activity*. *PLoS ONE* 8: e72548.

Yang, J.; Sambandam, N.; Han, X.; Gross, R.W.; Courtois, M.; Kovacs, A.; Febbraio, M.; Finck, B.N. y Kelly, D.P. (2007) *CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy*. *Circ. Res.* 100: 1208–1217.

Yang, Q. y Li, Y. (2007) *Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis*. *J. Mol. Med.* 85: 697–706.

Yonezawa, T.; Kurata, R.; Hosomichi, K.; Kono, A.; Kimura, K. y Inoko, H. (2009) *Nutritional and hormonal regulation of uncoupling protein 2*. *IUBMB Life* 61: 1123–1131.

Young, M.E.; Patil, S.; Ying, J.; Depre, C.; Ahuja, H.S.; Shipley, G.L.; Stepkowski, S.M.; Davies, P.J.A. y Taegtmeyer, H. (2001) *Uncoupling protein 3 transcription is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor α in the adult rodent heart*. *FASEB J.* 15:

833–845.

Young, L.H. y Zaha, V.G. (2012) *AMP-activated protein kinase regulation and biological actions in the heart*. *Circ. Res.* 111: 800-814.

Zhang, L.; Keung, W.; Samokhvalov, V.; Wang, W. y Lopaschuk, G.D. (2010) *Role of fatty acid uptake and fatty acid β -oxidation in mediating insulin resistance in heart and skeletal muscle*. *Biochim. Biophys. Acta* 1801: 1–22.

Zhao, W.; Zhao, T.; Chen, Y.; Ahokas, R.A. y Sun, Y. (2008) *Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats*. *Mol. Cell. Biochem.* 317: 43–50.

Zhou, Y.T.; Grayburn, P.; Karim, A.; Shimabukuro, M.; Higa, M.; Baetens, D.; Orci, L. y Unger, R.H. (2000) *Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 1784–1789.

Zhou, S.; Sun, W.; Zhang, Z. y Zheng, Y. (2014) *The role of Nrf2-mediated pathway in cardiac remodeling and heart failure*. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014: 260429.

**PUBLICACIONES, PRESENTACIONES
A CONGRESOS Y REUNIONES
CIENTÍFICAS**

PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

PUBLICACIONES

a. Artículos

Creus, A.; Chicco, A.G.; Alfaro, N. y Lombardo, Y.B. (2014) *La semilla de Salvia hispánica L. (rica en ácido α -linolénico) redujo la hipertensión y el contenido de lípidos en el músculo cardíaco de ratas dislipémicas insulino resistentes*. FABICIB 18: 49-61.

Creus, A.; Ferreira, M.R.; Oliva, M.E. y Lombardo, Y.B. (2016) *Mechanisms involved in the improvement of lipotoxicity and the impaired lipid metabolism by dietary α -linolenic acid rich Salvia hispánica L. (Salba) seed in the heart of dyslipemic insulin-resistant rats*. J. Clin. Med. 28: E18.

Creus, A.; Benmelej, A.; Villafañe, N. y Lombardo, Y.B. (2017) *Dietary Salba (Salvia hispánica L.) improves the altered metabolic fate of glucose and reduces increased collagen deposition in the heart of insulin-resistant rats*. PLEFA 121: 30-39.

Oliva, M.E.; Creus, A.; Lombardo, Y.B. y Chicco, A.G. (2017) *Comportamiento de enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa (GPx) y superóxido dismutasa (SOD) en el músculo cardíaco de ratas dislipémicas insulino resistentes*. FABICIB 21: 65-75.

Oliva, M.E.; Creus, A.; Ferreira, M.R.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. (2018) *Dietary soya protein improves intra-myocardial lipid deposition and altered glucose metabolism in a hypertensive, dyslipidaemic, insulin-resistant rat model*. Br. J. Nutr. 119:131:142.

b. Capítulos de libros

Lombardo, Y.B.; Creus, A.; Oliva, M.E. y Chicco, A.G. (en prensa, 2018). *Effects of dietary Salba on glucose metabolism in an experimental model of dyslipidemia and insulin resistance*. En: *Molecular nutrition Carbohydrates* (Eds: Preedy, V. y Patel, V.B.). Londres.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

a. Internacionales

34th International Symposium on Diabetes and Nutrition. Praga, República Checa. 29 de junio al 1 de julio de 2016. *Effects of Dietary Salba (Salvia hispanica L) on the metabolic fate of glucose in the heart muscle of dyslipemic insulin resistant rat model.* Lombardo, Y.B.; Chicco, A.G. y Creus, A.

35th International Symposium on Diabetes and Nutrition. Skagen, Dinamarca. 19 al 22 de junio de 2017. *Dietary Salba (Salvia hispánica L) improves myocardial oxidative stress in a rat model of visceral adiposity, dyslipidemia and insulin resistance by modulating antioxidant defenses and proinflammatory cytokines.* Lombardo, Y.B.; Alvarez, S.M.; Giménez, M.S. y Creus, A.

b. Nacionales

VI jornadas de Bioquímica y Biología molecular de lípidos y lipoproteínas. Santa Fe, Argentina. 31 de julio al 1 de agosto de 2014. *Efectos de la semilla de Salvia hispánica L. (chia) sobre alteraciones bioquímicas metabólicas del músculo cardíaco en un modelo de dislipemia y resistencia insulínica.* Creus, A.; Chicco, A.G., Alfaro, N. y Lombardo, Y.B. Publicado en: FABICIB (2014) vol. 18 pp: 217-218.

XIX Congreso Argentino de Diabetes. Buenos Aires, Argentina. 6 al 8 de noviembre de 2014. *La semilla de Salvia hispánica L. (rica en ácido α -linolénico) dietaria redujo la hipertensión y el contenido de lípidos en el músculo cardíaco de ratas dislipémicas insulino resistentes.* Creus, A.; Chicco, A.G.; Alfaro, N. y Lombardo, Y.B. Publicado en: Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes (2014) vol. 48 pp: 58-59.

LX Reunion científica anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Reunion anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Mar del Plata, Argentina. 18 al 21 de noviembre de 2015. *Mecanismos involucrados en el efecto de la semilla de Salvia hispánica L. (rica en ácido α -linolénico) dietaria sobre la lipotoxicidad y el alterado*

metabolismo de lípidos en el músculo cardíaco de ratas dislipémicas insulino resistentes.

Creus, A.; Ferreira, M.R.; Oliva, M.E. y Lombardo, Y.B. Publicado en: Medicina (2015) vol: 75 pp: 147.

XX Congreso Argentino de Diabetes. Buenos Aires, Argentina. 9 al 11 de noviembre de 2016. *La semilla de Salba (Salvia hispánica L.) dietaria revirtió el alterado metabolismo de la glucosa y la fibrosis del músculo cardíaco en un modelo experimental de dislipemia e insulino-resistencia.* Creus, A.; Benmelej, A.; Villafañe, N.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. Publicado en: Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes (2016) vol: 50 pp: 61

VII Jornadas de Bioquímica y Biología molecular de lípidos y lipoproteínas. San Luis, Argentina. 17 al 18 de agosto de 2017. *Efectos de la Salvia hispánica L. dietaria (rica en ácido α -linolénico) sobre el estrés oxidativo del corazón en un modelo experimental de dislipemia y resistencia insulínica.* Creus, A.; Alvarez, S.M.; Giménez, M.S. y Lombardo, Y.B.

OTRAS PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

PUBLICACIONES

Chicco, A.G.; Creus, A.; Illesca, P.; Hein, G.J.; Rodriguez, S. y Fortino, A. (2016) *Effects of post-suckling n-3 polyunsaturated fatty acids: prevention of dyslipidemia and liver steatosis induced in rats by a sucrose-rich diet during pre- and post-natal life.* Food Funct. 47:445-454.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

a. Internacionales

VI SLIMP / V LASRI Maternal-Fetal Interaction: From Fertilization to the Next Generation. Mar del Plata, Argentina. 13 al 16 de abril de 2015. *Postnatal dietary omega-3 fatty acid effects on lipid metabolism programming induced by maternal sucrose-rich diet.* Chicco, A.G.; Creus, A.; Illesca, P.; Rodriguez, S. y Fortino, A. Publicado en: Placenta (2015) vol: 36 pp: 486.

SLIMP / SCHCF Joint Meeting. Puerto Varas, Chile. 11 al 13 de abril de 2017. *Can weaning dietary manipulation counteract the effect of poor nutrition during pregnancy and lactation?* Chicco, A.G.; D'Alessandro, M.E.; Creus, A.; Oliva, M.E.; Ferreira, M.R., Lombardo, Y.B. y Fortino, A. Publicado en: *Placenta* vol: 51 pp: 103.

Reunión conjunta de sociedades de biociencias. Buenos Aires, Argentina. 13 al 17 de noviembre de 2017. *Dietary soy protein improves the altered intra-myocardial glucose metabolism in a hypertensive, dyslipemic, insulin resistant rat model.* Oliva, M.E.; Ferreira, M.R.; Creus, A.; Chicco, A.G. y Lombardo, Y.B. Publicado en: *Medicina* vol: 77 pp: 582.

b. Nacionales

XVI Congreso y XXXIV Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Rosario, Argentina. 4 y 5 de diciembre de 2014. *Estrategias dietarias para mejorar o prevenir la dislipemia y resistencia insulínica.* Chicco, A.G.; Oliva, M.E.; D'Alessandro, M.E.; Ferreira, M.R.; Creus, A. y Lombardo, Y.B.