

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

SECCIÓN I

CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES PRODUCIDAS POR DIETAS RICAS EN CLA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATÓN

1.- ANIMALES

Para profundizar la caracterización metabólica de alteraciones producidas por dietas con elevado contenido lipídico y ricas en CLA, y para realizar estudios relacionados a la reproducción se emplearon ratones recién destetados de la cepa CF-1 provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, o propios reproducidos en las instalaciones de nuestro Bioterio. Durante el período experimental fueron mantenidos en condiciones controladas ($23 \pm 2^\circ$ C y ciclo luz-oscuridad de 12 horas). Todos los estudios fueron programados según normas internacionales para el uso de animales de laboratorio (Guide to the Care and Use of Experimental Animals of Laboratory).

2.-DIETAS

- C (Dieta Control): basada en las recomendaciones emanadas del Comité *ad hoc* del “American Institute of Nutrition” para roedores en crecimiento – (AIN-93G, Reeves, 1993), conteniendo un 7% de grasa dietaria, aportada por aceite de maíz.
- API: Dieta Control con alto contenido (20%) de aceite de maíz (Aceite rico en AG poli-insaturados -API-). Para lograr una dieta de elevado contenido graso y consecuentemente hipercalórica, se sustituyó parte de los hidratos de carbono por grasas, reemplazando 13 g% de almidón por 13 g% de aceite de maíz.
- API+CLA: se sustituyó 3 % de aceite de maíz de la dieta API por 3 % de aceite rico en Ácido Linoleico Conjugado (CLA).

La composición de las dietas se muestra en la tabla 2.

	C	API	API+CLA
Almidón	529.5	399.5	399.5
Caseína	200	200	200
Sacarosa	100	100	100
Aceite de Maíz	70	200	170
Aceite rico en CLA	-	-	30
Fibras	50	50	50
Minerales	35	35	35
Vitaminas	10	10	10
L-Cistina	3.0	3.0	3.0
Colina	2.5	2.5	2.5
Energía (KJ/100 g)	16.569	19.288	19.288

Tabla 2.: Composición de las dietas utilizadas

El aceite de maíz fue utilizado como fuente de AG poliinsaturados, por su alto contenido en ácido linoleico no conjugado. Se utilizó una mezcla comercial de CLA gentilmente provista por Lipid Nutrition B.V., conformada por cantidades equimoleculares de *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA como fuentes principales de AG isoméricos. Todas las dietas excedieron las recomendaciones de AG esenciales, para así asegurar que las posibles alteraciones observadas no sean consecuencia de un déficit dietario de los mismos. La composición de AG de los aceites utilizados, como metil ésteres, fue determinada por cromatografía gaseosa con un cromatógrafo Shimadzu 2014 equipado con detector de ionización de llama. Los metil ésteres de AG fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de los estándares comerciales. La composición de AG de los aceites utilizados se muestra en la tabla 3. Cada dieta fue ofrecida diariamente durante todo el período experimental.

Ácido Graso	Aceite de Maíz	Aceite rico en CLA
14:0	Nd	nd
16:0	10.78	0.84
<i>c</i> -16:1	0.20	nd
17:0	Nd	nd
18:0	2.24	2.67
<i>t</i> -18:1	Nd	0.09
<i>c</i> -18:1	31.36	14.94
<i>c,c</i> -18:2	52.85	0.53
<i>c9,t11</i> -18:2	0.24	34.64
<i>T10,c12</i> -18:2	0.24	34.93
<i>T,c,c</i> -18:3	0.06	nd
<i>c,c,c</i> -18:3	0.75	nd
20:0	0.52	nd
<i>t</i> -20:1	0.12	nd
<i>c</i> -20:1	0.24	nd
22:0	0.20	nd
24:0	0.20	nd

nd: no detectable

Tabla 3: Composición de ácidos grasos de los aceites utilizados

En las dos dietas experimentales con elevados niveles de grasa dietaria (API y API+CLA), las grasas aportaron un 38.5% de las calorías totales, superando así las recomendaciones emanadas de normas alimentarias específicas de diferentes sociedades, pero basadas en el elevado consumo observado frecuentemente en nuestra población. Como el nivel de grasa dietaria puede alterar algunos de los parámetros evaluados, se incluyó un grupo control (C) con niveles de grasa (7% p/p) recomendados por el American Institute of Nutrition (Reeves, 1993).

3.- ESTUDIO DEL STATUS METABÓLICO

3.A.- GRUPOS EXPERIMENTALES Y PROTOCOLO DE TRABAJO

Ratones macho recién destetados fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos y alimentados durante 30 días con las dietas antes mencionadas. Durante todo el tratamiento dietario se realizó el seguimiento del peso de los ratones. Al finalizar, los animales fueron sacrificados (9.00 – 11.00 AM) bajo anestesia (1 mg acepromacina + 100 mg ketamina / kg peso). Se extrajeron muestras de sangre de vena cava con y/o sin anticoagulante según corresponda y las mismas se centrifugaron a 4°C. Alícuotas de plasma y/o suero obtenidos fueron congeladas a -20°C hasta el momento de su valoración. Hígado, tejido adiposo (TA) epididimal y músculo gastrocnemius fueron extraídos en forma completa, pesados, y muestras de cada uno fueron congeladas con una pinza enfriada en nieve carbónica, pesadas, morterizadas y conservadas en ultrafreezer (-80°C) hasta su procesamiento.

3.B.- DETERMINACIONES REALIZADAS

3.B.1- Cuantificaciones en suero/plasma

En las muestras de suero o plasma se cuantificaron:

- Las concentraciones de TG, colesterol y glucosa.
- Las actividades de las enzimas: Aspartato Amino Transferasa (ASAT), Alanina AminoTransferasa (ALAT), Fosfatasa Alcalina (FAL)

3.B.1.1.- Cuantificación de metabolitos circulantes

3.B.1.1.1.- Triglicéridos

La concentración de TG en suero se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). La técnica se basa en la hidrólisis de los TG por medio de lipasas dando lugar a la formación de glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado a glicerol-fosfato en presencia de glicerokinasa y ATP, luego este derivado fosforilado es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de glicerol fosfato oxidasa. El producto final de color es una quinoneimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La quinoneimina posee un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de TG presentes en la muestra. Los resultados se expresaron en mmol/l.

3.B.1.1.2- Colesterol

La concentración de colesterol total en suero se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). La técnica se basa en la hidrólisis de los ésteres de colesterol por medio de colesterol esterasa, liberando colesterol y ácidos grasos. El colesterol es oxidado mediante colesterol oxidasa, generándose una colest-3-ona y peróxido de hidrógeno. El indicador final de color es una quinoneimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La quinoneimina posee un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra. Los resultados se expresaron en mmol/l.

3.B.1.1.3.- Glucosa.

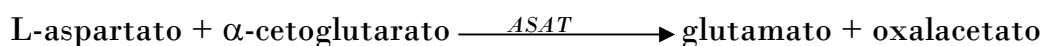
Los niveles de glucosa en plasma se cuantificaron mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). La

glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Éste último en presencia de peroxidasa oxida al cromógeno 4-aminofenazona/fenol a una quinoneimina de color rojo cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a 505 nm y es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra. Los resultados se expresaron en g/l.

3.B.1.2.- Cuantificación de actividades enzimáticas

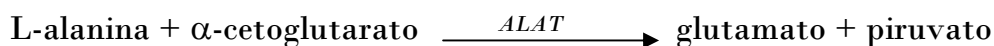
En muestras de suero se determinaron las actividades de enzimas marcadoras de daño hepático: Aspartato Amino Transferasa, Alanina Amino Transferasa, y Fosfatasa Alcalina utilizando kits comerciales (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

3.B.1.2.1.- La Aspartato Amino Transferasa (ASAT) cataliza la siguiente reacción:



El oxalacetato formado es inestable y se transforma en piruvato, el cual reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505 nm. La intensidad de color obtenida es proporcional a la actividad ASAT. Los resultados se expresaron en UI/l.

3.B.1.2.2.- La Alanina Amino Transferasa (ALAT) cataliza la siguiente reacción:



El piruvato formado reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505 nm. La intensidad de color obtenida es proporcional a la actividad ALAT. Los resultados se expresaron en UI/l.

3.B.1.2.3.- La Fosfatasa Alcalina (FAL) desdobla al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol. El fenol liberado se determina por reacción con 4-amino-antipirina y ferricianuro como agente oxidante. El color

desarrollado es directamente proporcional a la actividad enzimática y se mide a 520 nm. Los resultados se expresaron en UI/l.

3.B.2.- Cuantificaciones tisulares

Para cuantificar los niveles de triglicéridos tisulares una cantidad determinada del tejido conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se homogeneizó con un volumen apropiado de solución fisiológica fría ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) para obtener una dilución 1:10.

Cuando fue necesario se prepararon extractos tisulares libres de proteínas mediante desproteinización con ácido perclórico (HClO_4). El sobrenadante obtenido luego de una centrifugación a 15000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos se neutralizó con KHCO_3 . Cuando la mayor parte del CO_2 ha sido liberado, el precipitado de KClO_4 se removió por centrifugación a 15000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. El sobrenadante se fraccionó en distintas alícuotas para la cuantificación de diversos metabolitos.

Seleccionamos para las cuantificaciones musculares el músculo gastrocnemius, el que por su constitución en tipos de fibras, es representativo del tejido muscular total, el cual posee una elevada capacidad oxidativa y utilización de AG, como así también representa aproximadamente el 45 % del peso corporal.

3.B.2.1.- Contenido de triglicéridos

Se determinó el contenido de TG mediante la técnica propuesta por Laurell (1966). Los TG se extrajeron utilizando una mezcla éter isopropílico:etanol (95:5; v/v) y luego fueron saponificados con una solución KOH 6N:etanol (0,5:9,5; v/v). El glicerol liberado fue cuantificado mediante el ensayo de Lambert y Neish que consiste en la oxidación del glicerol con peryodato generando un mol de ácido fórmico y dos moles de formaldehído por cada mol de sustrato. El formaldehído

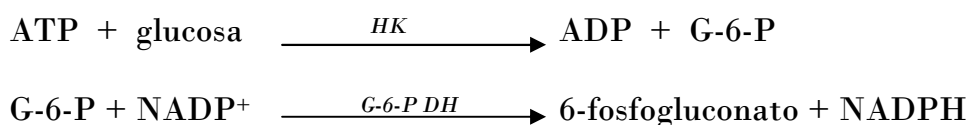
reacciona a 100°C con ácido cromotrópico para dar un compuesto violeta, cuya intensidad de color se mide a 570 nm y es proporcional a la cantidad de TG presentes en la muestra. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.

3.B.2.2.- Contenido de metabolitos energéticos.

En extractos tisulares de músculo obtenidos mediante desproteinización con HClO_4 (ítem 3.B.2) se cuantificaron por métodos enzimáticos fluorimétricos las concentraciones de ATP, creatina fosfato y creatina (Lowry y Passonneau, 1972). En extractos de hígado obtenidos de la misma forma se cuantificó la concentración de ATP por el mismo método. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.

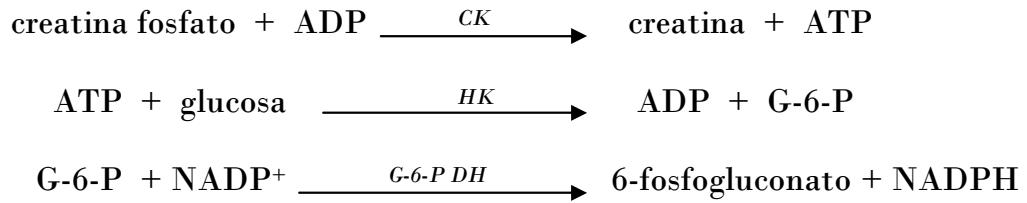
3.B.2.2.1.- ATP

El ATP presente en la muestra se defosforila en presencia de glucosa por acción de la enzima hexoquinasa (HK). La glucosa-6-fosfato (G-6-P) generada en esta reacción es oxidada a 6-fosfogluconato en presencia de NADP y la enzima G-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH). El aumento de la fluorescencia debido a la formación de NADPH es proporcional a la concentración de ATP en la muestra.



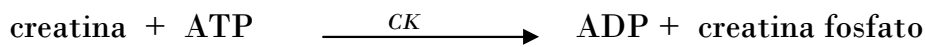
3.B.2.2.2.- Creatina fosfato

La creatina fosfato en presencia de ADP y creatina kinasa (CK) genera ATP. Este último es posteriormente cuantificado siguiendo la secuencia de reacciones descritas anteriormente (ítem 3.B.2.2.1). El aumento de la fluorescencia debido a la formación de NADPH es proporcional a la concentración de creatina fosfato.



3.B.2.2.3.- Creatina

La CK cataliza la fosforilación de la creatina en presencia de ATP mediante la siguiente reacción:



El ADP formado es fosforilado nuevamente en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP) y la enzima Piruvato Kinasa (PK):



El piruvato producido es reducido por la enzima Lactato Dehidrogenasa (LDH) utilizando NADH como cofactor:



La disminución de la fluorescencia debido a la oxidación del NADH es proporcional a la concentración de creatina presente en la muestra.

3.B.3.- Parámetros relacionados al metabolismo lipídico

3.B.3.1.- Actividad de la enzima Lipoproteína Lipasa (LPL)

3.B.3.1.1- Actividad de LPL en músculo gastrocnemius

La actividad de LPL en músculo se determinó empleando la técnica de Nilsson-Ehle y Schotz (1976) adaptada por nuestro grupo. El músculo gastrocnemius conservado a -80°C fue homogeneizado (dil 1:10) en una solución buffer NH₄Cl/NH₄OH - Heparina (50mM, pH 8.6, conteniendo 4 UI/ml de heparina). Luego de reposar 15 min a 4°C los homogenizados fueron centrifugados a 6500 rpm a 4°C durante 15 min obteniéndose los extractos crudos frescos tisulares, que fueron incubados durante 30 min. en un medio conteniendo [³H]-Trioleína como sustrato. Los ácidos grasos liberados durante la incubación fueron extraídos con un sistema de partición líquido-líquido. La reacción fue detenida mediante la adición de una mezcla metanol-cloroformo-heptano (1,41:1,25:1) seguida de la adición de buffer carbonato-borato 0,1 M pH 10,5. Luego de centrifugar, se tomó 1 ml de la capa superior, al que se adicionaron 10 ml de líquido de centelleo Opti Phase “Hi-Safe 3” Perkin Elmer y los [³H]-AG fueron cuantificados con un contador de centelleo líquido Winspectral 1414 Perkin Elmer.

La actividad de la LPL en tejidos musculares se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Actividad} = \frac{\text{nmol AG}}{\text{g tejido} \times \text{min}}$$

Los resultados de la actividad de la enzima LPL muscular se expresaron como mU/ g tejido.

3.B.3.1.2.- Actividad de LPL en tejido adiposo epididimal

A pesar de que el tejido adiposo de la rata representa sólo un 7-10% de su peso corporal y que recibe menos del 5% del flujo sanguíneo, se ha demostrado que es el principal tejido responsable de la remoción de las lipoproteínas ricas en triglicéridos presentes en circulación. La actividad de la LPL en tejido adiposo se determinó empleando la técnica descrita por Lutz y col (1989). Una cantidad de tejido adiposo se homogeneizó con buffer Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl) 0.2 M pH 8.2 a 4°C, en una proporción de 0,2 g de tejido/ml de buffer y se homogeneizó en frío. Una alícuota del homogeneizado fue utilizada para la preparación del extracto enzimático “polvo de acetona”. Esta preparación consiste en una doble extracción con acetona fría (1:4) (-20°C) seguida de una doble extracción con éter dietílico frío (1:4) (-20 °C). El polvo de acetona obtenido se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno (1 hora a 4°C) y se resuspendió en buffer NH₄OH-NH₄Cl 0,05 M pH 8,1, en ausencia y en presencia de NaCl 2M. Alícuotas de dicha suspensión se incubaron a 37°C, en un baño termostatzado con agitación en un medio conteniendo [³H]-Trioleína como sustrato. Luego de media hora de incubación la reacción fue detenida, los AG liberados fueron extraídos por medio de un sistema bifásico y posteriormente los [³H]-AG se cuantificaron con un contador de centelleo líquido tal como se describió en el ítem 3.B.3.1.1. La actividad LPL en tejido adiposo se determinó sustrayendo la actividad lipolítica no específica (determinada en presencia de NaCl 2M) de la actividad lipolítica total (determinada en ausencia de NaCl 2M). Los resultados se expresaron como mU/g tejido y como mU/TA, afectada por el peso del tejido adiposo.

3.B.3.2.- Secreción hepática “*in vivo*” de TG-pre-β lipoproteínas

Se determinó la velocidad de secreción de TG-pre-β lipoproteínas “*in vivo*” (VSTG) utilizando para tal fin la metodología propuesta por Otway y col (1967) modificada (Bernal y col, 1989). La misma se fundamenta en la inhibición de la remoción intravascular de las lipoproteínas de $\delta < 1,006$ g/ml por la administración

de Triton WR 1339, de modo que los TG se acumulan en el tiempo en el sistema vascular en forma proporcional a la velocidad con la que son secretados por el hígado.

En lotes de animales en los cuales se siguieron los mismos tratamientos dietarios, ayunados 12-18 hs y bajo anestesia, se administró vía endovenosa una solución de Triton WR 1339 al 10 % (v/v) en cloruro de sodio 0,9 % (dosis: 600 mg/kg peso). Se tomaron muestras de sangre para el dosaje de TG a tiempo 0 y 120 minutos (previo y dos horas posteriores a la administración de la droga). El volumen plasmático (Vp) se determinó en una experiencia paralela mediante la técnica de dilución del Azul de Evans (Wang y col, 1949).

La velocidad de secreción de triglicéridos fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{VSTG (nmol/100g/min)} = \frac{([\text{TG}_{120}] - [\text{TG}_0]) \times \text{Vp}}{\text{P} \times \text{t}}$$

Siendo [TG₁₂₀] y [TG₀] las concentraciones de TG a tiempo 120 y 0 min. de la administración del Triton WR 1339 y expresadas en μmol/ml, P: el peso en gramos del animal, Vp en ml y t en minutos.

En trabajos previos (Bernal y col, 1989) ha sido demostrado que en ratas la dosis elegida es la que provee la máxima inhibición de la clarificación de VLDL-TGy que bajo esas condiciones el acúmulo de TG en el plasma es lineal hasta los 150 min, razón por la que sólo se cuantificaran los niveles de TG a los tiempos 0 y 120 min. Estas condiciones fueron corroboradas para asegurar que fueran las adecuadas tanto para las experiencias en ratas como en ratones.

Además se calculó el pool de TG circulantes en ayunas mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Pool de TG (}\mu\text{mol/100g)} = \frac{[\text{TG}_0] \times \text{Vp}}{\text{P}}$$

Siendo $[TG_0]$ la concentración de TG a tiempo 0 min, expresada en $\mu\text{mol/ml}$, P, el peso en gramos del animal, V_p en ml y t en minutos.

3.B.4.- Parámetros relacionados al stress oxidativo hepático

3.B.4.1.- Determinación del grado de lipoperoxidación

El daño peroxidativo a nivel hepático fue evaluado a través del grado de lipoperoxidación (LPO), analizado mediante las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Para tal fin, los hígados fueron rápidamente removidos y lavados en solución salina enfriada a 4°C y secados. La determinación se realizó en homogenados hepáticos preparados en una proporción de 1 g de tejido húmedo con 9 ml KCl 1,15% de acuerdo al método de Ohkawa y col (1979). El método consiste en la reacción del ácido tiobarbitúrico con un producto secundario de la peroxidación lipídica, identificado como malondialdehído (MDA), formado durante la incubación de homogenados tisulares bajo condiciones aeróbicas, para producir en medio acético y en caliente, un cromógeno rojo con un pico de absorción espectrofotométrica a 532 nm . Los resultados se expresaron en $\eta\text{mol MDA/g}$ tejido húmedo.

3.B.4.2.- Medida de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas

La actividad enzimática catalasa fue determinada por el método de Aebi (1984) y glutation peroxidasa (GSH-Px) por el de Paglia y Valentine (1967).

Para sus determinaciones se obtuvieron homogenados hepáticos con buffer fosfato 50 mM pH 7, en una relación de 1 g por 9 ml, los cuales fueron luego centrifugados a 10000 g durante 20 minutos.

La determinación de la actividad catalasa se fundamenta en la cantidad de H_2O_2 degradada por la enzima, medida en buffer fosfato 50 mM pH 7,0 con Triton

X 100 al 1%. La disminución en el contenido de H_2O_2 fue medida espectrofotométricamente a 240 nm durante 30 segundos. La actividad enzimática fue expresada como U/mg de proteína, siendo una U la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un μmol de sustrato por minuto.

La actividad GSH-Px fue determinada utilizando H_2O_2 como sustrato y la reacción fue seguida espectrofotométricamente mediante el consumo de NADPH por acción de la enzima glutathion reductasa. La reacción fue llevada a cabo en buffer fosfato 50 mM pH 7,0, con GSH 0,15 M, NADPH 8,4 mM y 0,46 U/ml de glutathion reductasa. Los cambios en la absorbancia fueron medidos durante 2 minutos a 340 nm. La actividad de GSH-Px fue expresada como U/mg prot.

Para ambas enzimas, la concentración de proteínas en los homogenados fue determinada por el método de Lowry y col (1951).

3.B.4.3.- Determinación del contenido de glutathion reducido

La determinación de glutathion reducido (GSH) se realizó en homogenados hepáticos obtenidos en una proporción 4:1 con ácido tricloroacético al 5%. Se obtuvo el sobrenadante por centrifugación y se determinó GSH según la técnica de Ellman (1979) utilizando como reactivo el ácido 5,5'- ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB). Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.

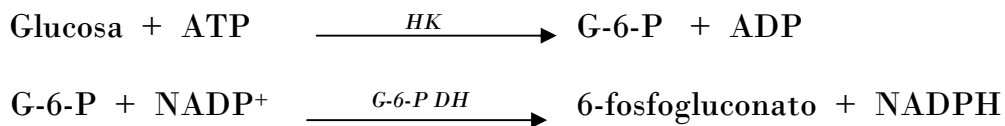
3.B.5.-Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa

En extractos tisulares de hígado y músculo gastrocnemius obtenidos mediante desproteinización con $HClO_4$ (ítem 3.B.2) se cuantificaron por métodos enzimáticos fluorimétricos las concentraciones de los principales intermediarios que participan en el metabolismo de la glucosa, a saber: glucosa, glucosa-6-fosfato (G-6-P), glucosa-1-fosfato (G-1-P), fructosa-6-fosfato (F-6-P), fructosa-1,6-difosfato (F-

1,6-P₂), piruvato y lactato (Lowry y Passonneau, 1972), así como también las concentraciones de glucógeno total y fracciones pro-glucógeno (PG) y macro-glucógeno (MG) (Adamo y Graham, 1998) y citrato (Lowry y Passonneau, 1972). Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.

3.B.5.1.-Glucosa

En el primer paso, la adición de la enzima HK fosforila la glucosa a G-6-P en presencia de ATP. Luego, la G-6-P es oxidada con formación de 6-fosfogluconato en presencia de G-6-PDH que utiliza NADP como cofactor. El aumento de la fluorescencia debido a la reducción del NADP es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.



3.B.5.2.- Glucosa-6-fosfato

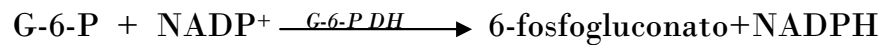
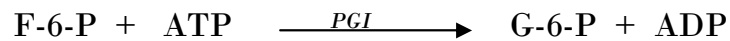
La G-6-P presente en la muestra es oxidada por acción de la enzima G-6-PDH, que en presencia de NADP como cofactor conduce a la formación de 6-fosfogluconato y NADPH. El incremento de la fluorescencia debido a la formación de éste último compuesto es proporcional a la concentración de G-6-P presente en la muestra.



3.B.5.3.- Fructosa-6-fosfato (F-6-P)

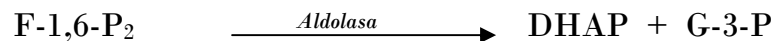
La F-6-P es convertida en G-6-P por acción de la enzima Fosfo-Glucosa Isomerasa (PGI) en presencia de ATP. La G-6-P en presencia de NADP como cofactor es oxidada mediante la enzima la G-6-PDH generando 6-fosfogluconato y NADPH. El incremento de la fluorescencia debido a la formación de éste último

compuesto es proporcional a la concentración de F-6-P.



3.B.5.4.- Fructosa-1,6-difosfato (F-1,6-P₂)

La enzima aldolasa escinde la F-1,6-P₂ en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P). Este último en presencia de la enzima Gliceraldehído-3-Fosfato Dehidrogenasa (G-3-PDH), que utiliza NAD como cofactor, es oxidado a 1,3-difosfoglicerato con formación de NADH. El incremento de la fluorescencia debido a la formación de éste último compuesto es proporcional a la concentración de F-1,6-P₂.



3.B.5.5.- Piruvato

La enzima LDH cataliza la reducción del piruvato utilizando NADPH como cofactor:



El equilibrio de la reacción está desplazado hacia la formación de lactato, por lo que la disminución de la fluorescencia debida a la oxidación del NADPH es proporcional a la concentración de piruvato.

3.B.5.6.- Lactato

La enzima LDH cataliza la oxidación del L-lactato utilizando NAD como cofactor:



Para obtener una oxidación cuantitativa del L-lactato los productos de reacción se removieron del medio a través de la adición de hidracina que es convertida en hidrazona. El incremento de la fluorescencia debido a la formación del NADH es proporcional a la concentración de L-lactato.

3.B.5.7.- Glucosa-1-fosfato (G-1-P)

La G-1-P es convertida en G-6-P en presencia de ATP por acción de enzima Fosfo-Gluco Mutasa (PGM). Luego la enzima G-6-P DH en presencia de NADP como cofactor oxida la G-6-P generando 6-fosfogluconato y NADPH. El incremento de la fluorescencia debido a la formación de éste último compuesto es proporcional a la concentración de G-1-P.



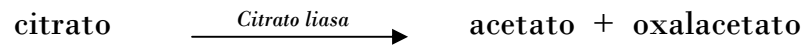
3.B.5.8.- Glucógeno total y sus fracciones pro- y macro-glucógeno

Para realizar la separación de las fracciones PG y MG, muestras de tejido hepático y/o muscular se desproteinizaron mediante la adición de HClO₄ 1.5 M. Luego en el sobrenadante se procedió a determinar el contenido de MG mientras que en el precipitado se cuantificaron los niveles de PG. Para tal fin, ambas fracciones se mantuvieron 2 hs a 100°C con HCl 2M para hidrolizar el glucógeno a glucosa. El contenido de glucosa se cuantificó en ambas fracciones mediante la técnica enzimática fluorimétrica descrita en el ítem 3.B.6.1. Los resultados de MG y PG se expresaron en μmol de glucosa/ g tejido húmedo.

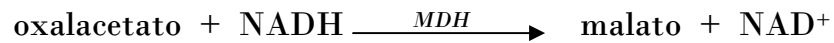
3.B.5.9.- Citrato

El citrato es degradado a oxalacetato y acetato por acción de la enzima

Citrato Liasa, según la siguiente reacción:



La reacción es reversible por lo que la ruptura del citrato es cuantitativa si se remueve completamente el oxalacetato del sistema. Para tal fin se adicionó la enzima Malato Dehidrogenasa (MDH) que permitió la reducción del oxalacetato a malato con la oxidación del NADH.



La disminución de la fluorescencia debido a la desaparición del NADH es proporcional a la concentración de citrato presente en la muestra.

4- ESTUDIO DE LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA

4.A.- GRUPOS EXPERIMENTALES Y PROTOCOLO DE TRABAJO

Se realizaron dos experiencias: estudios en primera generación y estudios en segunda generación

4.A.1.- Estudios de primera generación

Ratones machos y hembras recién destetados fueron distribuidos aleatoriamente en tres grupos y alimentados durante 30 días con las dietas anteriormente mencionadas. Luego del período de alimentación, los ratones fueron apareados a razón de dos hembras por macho. La presencia de tapón vaginal fue tomada como indicativo de apareo y considerada día 0 de preñez. Además se realizó el seguimiento del ciclo estral diariamente a través de exudados vaginales. A medida que se observó tapón vaginal, las hembras fueron separadas de los machos. Al día 18 de preñez, las hembras se sacrificaron como se indicó en el ítem 3.A, las placentas fueron removidas, se examinaron los fetos resorbidos y se contó el número de fetos. Luego del apareo, ratones macho de cada grupo fueron sacrificados, previa toma de muestras del cauda epididimal. El diseño del estudio se puede ver en la figura 7.

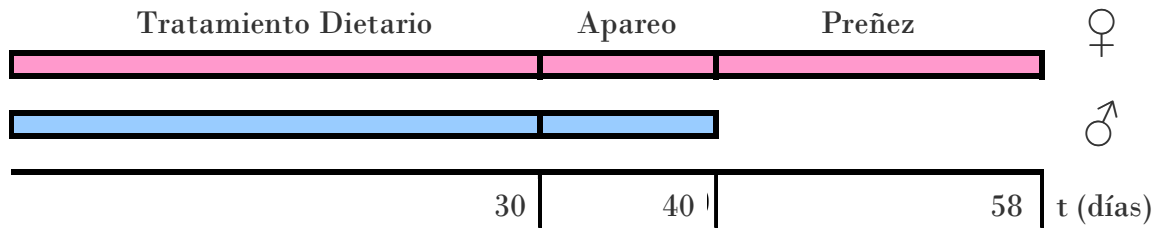


Figura 7: representación esquemática del diseño experimental del estudio de los efectos de los CLA sobre la reproducción (primera generación).

4.A.2.- Estudios de segunda generación

Después de 30 días de alimentación con las distintas dietas, los ratones fueron apareados como se describió anteriormente, permitiendo el nacimiento de las crías. Luego del destete estas últimas fueron alimentadas con las mismas dietas que las madres por 30 días, al final de los cuales fueron puestas a aparear y sacrificadas al día 18 de preñez, obteniéndose placentas, examinándose las resorciones y contando el número de fetos. Luego del apareo se sacrificaron ratones macho de cada grupo dietario como fue descrito anteriormente. El diseño del estudio se puede ver en la figura 8.

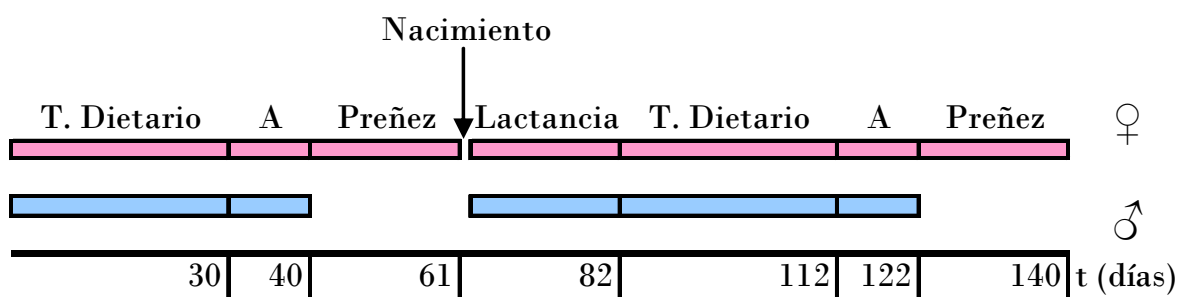


Figura 8: representación esquemática del diseño experimental del estudio de los efectos de los CLA sobre la reproducción (segunda generación). A: período de apareo.

4.B.- DETERMINACIONES REALIZADAS

4.B.1- Determinación de expresión de IL-4, TNF- α y TGF- β en placenta mediante inmunohistoquímica

Se eligió evaluar la expresión de estas tres citoquinas en placenta por diversos motivos. La IL-4, como representante del grupo de citoquinas Th2, es importante para una gestación exitosa. Por otro lado, una elevada expresión de TNF- α , citoquina del grupo Th1, podría conducir a la muerte fetal, y el TGF- β estaría involucrado en la tolerancia inmunológica materna hacia el feto.

Las placentas recolectadas fueron fijadas en formol bufferado al 10% e incluidas en parafina para luego obtener secciones de 5 μ . Estos cortes fueron desparafinizados y se realizó una recuperación antigénica calentando las secciones en buffer citrato 0,1 M, pH 6,0 en horno de microondas. La actividad peroxidasa endógena fue inhibida incubando las secciones por 30 min a temperatura ambiente con H₂O₂ 0,3% en metanol. Se bloquearon los sitios de unión inespecífica incubando por 30 min a temperatura ambiente con suero de la misma especie que el anticuerpo secundario diluido al 5% en buffer PBS/1,5% de leche descremada. Los cortes fueron incubados durante toda la noche a 4°C con anticuerpo anti TGF- β de ratón obtenido en conejo (diluido 1/100), o con anticuerpo anti IL-4 de ratón obtenido en rata (diluido 1/50), o con anticuerpo anti TNF- α de ratón obtenido en rata (diluido 1/50) en buffer PBS con 1% de albúmina sérica bovina. Posteriormente, los cortes fueron lavados con buffer PBS e incubados por 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente: anticuerpo anti inmunoglobulina (Ig) G de conejo obtenido en cabra (diluido 1/200) o anticuerpo anti IgG de rata obtenido en ratón (diluido 1/100), seguido por una incubación con el sistema avidina-biotina-peroxidasa según las instrucciones del fabricante. La reacción se desarrolló con diaminobencidina 0,7 mg/ml en buffer Tris-HCl 50 mM,

pH 7,5 con 0,3% H₂O₂. Se detectaron las células marcadas utilizando microscopía óptica. La expresión de las distintas citoquinas se expresó como número de células marcadas positivamente por campo de 400x.

4.B.2- Recolección de espermatozoides, recuento y motilidad

Antes del sacrificio de los ratones macho de la primera y segunda generación se extrajeron los cauda epididimales, que fueron rápidamente sumergidos en 0,5 ml de medio Whittingham (solución Tyrode/0,5 mM piruvato/3 mg/ml albúmina sérica bovina). Cada epidídimo fue cortado y se dejó difundir el espermatozoides al medio durante 10 min a 37°C, y alícuotas de la suspensión fueron utilizadas para recuento en cámara de Neubauer. También se determinó la motilidad espermática contando el número de espermatozoides que mostraban movilidad en la cola, expresándolo como porcentaje del total.

4.B.3- Reacción acrosomal

Los espermatozoides fueron aislados como se indica en el ítem 4.B.2. e incubados por una hora a 37°C en atmósfera conteniendo 5% de CO₂. La capacidad de sufrir reacción acrosomal inducida por el ionóforo de calcio A23187 se evaluó según Jeffs y col (2001). Brevemente, los espermatozoides capacitados fueron contados y ajustados a aproximadamente 1 x 10⁶ espermatozoides/ml. Alícuotas fueron agregadas al medio conteniendo o no ionóforo de calcio. A tiempo 0, 30, 60 y 90 min, se fijaron alícuotas con formaldehído al 2% por 10 min a temperatura ambiente. Luego de centrifugar, los espermatozoides fueron resuspendidos en buffer PBS y alícuotas fueron secadas y teñidas con Coomassie Blue (0,22%). Los acrosomas reaccionados fueron distinguidos por la pérdida del color intenso en la parte anterior de la cabeza espermática y expresados como porcentaje.

5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media \pm SEM y el número de muestras fue indicado en cada caso, siendo siempre igual o mayor a 5.

Diferencias estadísticas entre las medias de los grupos C y API fueron establecidas mediante test de Student (*). Diferencias estadísticas entre las medias de los grupos API+CLA y API fueron establecidas mediante test de Student (#).

En todos los casos, valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.