

Trabajo completo

Efecto diferencial de la fuente de grasas dietarias sobre las alteraciones hepáticas inducidas por los conjugados del ácido linoleico en ratones

RECIBIDO: 04/08/2013

ACEPTADO: 13/09/2013

Scalerandi, M.V.¹ • González, M.A.¹ • Saín, J.¹ • Reus, V.² • Lavandera, J.¹ • Bernal, C.A.¹

¹ Cátedra de Bromatología y Nutrición. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

² Laboratorio de Investigación en Ciencias Biomédicas. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.

E-mail: cbernal@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: El objetivo fue investigar el efecto de diferentes fuentes de grasas dietarias sobre las alteraciones hepáticas inducidas por los Conjugados del Ácido Linoleico (CLA) comerciales en animales de experimentación. Para tal fin, en ratones CF1 macho alimentados (30 días) con dietas conteniendo aceite de oliva, maíz y canola, suplementadas o no con CLA, investigamos en hígado las posibles alteraciones en tamaño, acumulación lipídica, aspectos morfológicos y estado lipoperoxidativo. A nivel hepático, los CLA suplementados al aceite de oliva generaron la mayor acumulación lipídica, al aceite de maíz un notable estado pro-inflamatorio, mientras que al aceite de canola efectos deletéreos más atenuados. En virtud del empleo de CLA comerciales como

ayudas ergogénicas y antiobesogénicas en humanos, este trabajo podría contribuir al conocimiento de ciertos efectos que los mismos podrían tener en función de interacciones metabólicas con distintas grasas dietarias.

PALABRAS CLAVE: Conjugados del ácido linoleico, Grasas dietarias, Hígado graso, Estado lipoperoxidativo.

SUMMARY: *Differential effects of dietary fat sources on hepatic alterations induced by conjugated linoleic acid in mice*

The aim of this work was to investigate the effect of different dietary fat sources on hepatic alterations induced by a commercial mixture of conjugated linoleic acid in experimental animals. For this

purpose, male mice CF1 were fed during 30 days on diets containing olive, corn or canola oil supplemented or not with CLA. In the liver of these animals we examined hepatomegaly, lipid accumulation, histological changes and lipoperoxidative status. In liver, CLA added to olive oil led to a high lipid accumulation, to corn oil a proinflammatory tissular status, while to canola oil, the deleterious effects

were attenuated to some degree. Since commercial CLA are used in humans as ergogenic aids as well as antiobesity agents, this work might contribute to the knowledge of certain differential effects that these isomers could have depending on the CLA-fat metabolic interactions.

KEYWORDS: Conjugated linoleic acid, Dietary fats, Fatty liver, Lipoperoxidative status.

Introducción

Factores dietarios, y más específicamente grasas dietarias, cumplen un rol muy importante en el desarrollo y/o prevención de desórdenes crónicos como enfermedad cardiovascular, diabetes tipo 2, trastornos del metabolismo de lípidos, y enfermedad del hígado graso no alcohólico (1-3). Más aún, el hígado graso no alcohólico es actualmente considerado como la manifestación hepática del síndrome metabólico, caracterizado por una amplia variedad de condiciones clínicas, que van desde una simple esteatosis (hígado graso) sin signos de inflamación, hasta una actividad inflamatoria severa con necrosis y fibrosis, daño oxidativo, e incluso progresión a cirrosis (2). La enfermedad del hígado graso no alcohólico esta fuertemente asociada con la obesidad (3) y la nutrición, y en particular, con la cantidad y tipo de grasa ingerida que pueden ser claves en el desarrollo de esta enfermedad crónica (4-6). Así, algunos estudios sugieren que una alta ingesta de grasa total y de ácidos grasos (AG) poliinsaturados (AGPI) n-6 (6) resulta en alteraciones clínicas similares al hígado graso, mientras que, un incremento en la ingesta de AGPI n-3 (7, 8) ó de AG monoinsaturados (AGMI) (9), puede ser benéfico en el

tratamiento preventivo de dicha alteración.

Los conjugados del ácido linoleico (CLA) son un grupo de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico (AL) que han merecido un interés especial durante el último tiempo y han sido empleados para la producción de alimentos funcionales. Específicamente, el uso de los CLA comerciales conteniendo cantidades equimoleculares de los isómeros *cis*-9,*trans*-11-CLA (ácido ruménico) y *trans*-10,*cis*-12-CLA; como asimismo los CLA de origen natural, enriquecidos en ácido ruménico, se han extendido en forma notable dados sus potenciales efectos benéficos (10, 11). Según el origen de los CLA, los efectos benéficos y/o adversos son diferentes. A los CLA comerciales se les atribuye principalmente un potencial efecto benéfico en la reducción del peso y grasa corporal (12, 13), como así también en el incremento de masa magra (11); mientras que los CLA naturales podrían ser importantes en la prevención de cáncer y reducción de respuesta inflamatoria (14, 15), entre otros. No obstante, los CLA comerciales mostraron, en animales de experimentación, ciertos efectos negativos a nivel hepático (12, 16) los cuales dependieron de numerosos factores, entre ellos: especie animal, condición fisiológica,

niveles y tipo de CLA en la dieta, como así también de la duración de la alimentación (17). Entre las principales alteraciones en ratones se ha encontrado hepatomegalia, esteatosis y alteraciones en el metabolismo lipídico (12, 16). Al menos a nuestro conocimiento, no existen reportes bibliográficos que hayan estudiado en forma sistemática los efectos de estos isómeros sobre aspectos bioquímicos, metabólicos y fisiológicos, en hígado de animales alimentados con dietas conteniendo distintas fuentes de AG insaturados. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo, fue investigar el efecto de diferentes fuentes de grasas dietarias ricas en AG n-9, n-6 y n-3 sobre las alteraciones hepáticas en el tamaño, acumulación lipídica, posibles daños histológicos y cambios en el estado lipoperoxidativo, inducidas por una mezcla comercial de CLA en ratones. El modelo experimental empleado es sensible a alteraciones hepáticas frecuentemente encontradas en enfermedades crónicas prevenidas o promovidas por factores dietarios.

Materiales y métodos

• Materiales

Los nutrientes utilizados en la preparación de las dietas, incluyendo vitaminas y minerales, fueron al menos grado reactivo, a excepción del aceite de oliva (O) (Nucete, La Rioja, Argentina), aceite de maíz (M) (Arcor, Córdoba, Argentina), aceite de canola (C) (Krol, Entre Ríos, Argentina), sacarosa, celulosa y almidón de maíz, los cuales fueron de grado comestible y obtenidos de fuentes comerciales locales. El aceite CLA fue donado por Lipid Nutrition B.V. (Wormerveer, Países Bajos). Para el período de adaptación de los animales, se utilizó una comida estándar de laboratorio del Grupo Pilar® (Pilar, Córdoba,

Argentina). Los estándares fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Todos los solventes y reactivos utilizados para la cuantificación de AG fueron grado cromatográfico, y todos los otros productos químicos usados fueron al menos grado ACS.

• Dietas

La composición de las dietas se muestra en la Tabla 1. Las mismas estuvieron basadas en las recomendaciones del "American Institute of Nutrition" (AIN-93G dietas formuladas para las fases de crecimiento, preñez y lactación de roedores) (18). Las dietas fueron preparadas cada tres días durante el período experimental y almacenadas a 4 °C. Todas fueron isoenergéticas, conteniendo 16,5 MJ/kg, las cuales superaron las recomendaciones de AG esenciales y difirieron en: 1) fuente de grasa dietaria: aceites O, M ó C, y 2) ausencia ó presencia de 1g de aceite CLA/100g dieta. La combinación de estas dos variables permitió crear las siguientes dietas experimentales: O, O+CLA, M, M+CLA, C, C+CLA, conteniendo 7 g grasa total/100g dieta. Los aceites O, M y C fueron usados como fuente de AG insaturados *cis* conteniendo diferentes proporciones de ácido oleico (AO)/AL ácido α -linolénico (ALN), en una proporción: 55,2/17,2/0,7; 32,0/51,3/0,9 y 61,1/18,4/8,6 respectivamente, mientras que el aceite CLA contiene 39,0 % de *cis*-9,*trans*-11-CLA y 38,8 % de *trans*-10,*cis*-12-CLA. La composición de los AG de las grasas dietarias se muestra en la Tabla 2. Esta composición de AG fue determinada como metil ésteres por cromatografía gaseosa utilizando el equipamiento y las condiciones previamente reportadas (19).

Tablas 1. Composición de las dietas experimentales (g/Kg dieta seca)

	O	O+CLA	M	M+CLA	C	C+CLA
Almidón	529,5	529,5	529,5	529,5	529,5	529,5
Caseína	200	200	200	200	200	200
Sacarosa	100	100	100	100	100	100
Aceite de Oliva	70	60	-	-	-	-
Aceite de Maíz	-	-	70	60	-	-
Aceite de Canola	-	-	-	-	70	60
Aceite CLA	-	10	-	10	-	10
Fibra	50	50	50	50	50	50
Minerales*	35	35	35	35	35	35
Vitaminas*	10	10	10	10	10	10
L-Cisteína + L-Metionina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Energía (KJ/kg)	16569	16569	16569	16569	16569	16569

*Las mezclas de vitaminas y minerales fueron formuladas de acuerdo a Reeves y col. (18).

Tablas 2. Composición de ácidos grasos de los aceites utilizados (%)*

	Aceite de oliva	Aceite de maíz	Aceite de canola	Aceite CLA
14:0	0,0	0,0	0,1	0,0
16:0	17,1	12,2	4,0	5,9
<i>cis</i> -9-16:1	2,0	0,1	0,2	0,0
17:0	0,1	0,0	0,0	0,0
18:0	1,6	1,9	2,2	1,2
<i>cis</i> -9-18:1	55,2	32,0	61,1	9,1
<i>cis</i> -11-18:1	4,8	0,5	3,5	0,4
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12-18:2	17,2	51,3	18,4	1,1
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11-18:2	0,0	0,0	0,0	39,0
<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12-18:2	0,0	0,0	0,0	38,8
20:0	0,3	0,5	0,5	0,0
<i>cis</i> -11-20:1	0,2	0,3	0,9	0,0
<i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15-18:3	0,7	0,9	8,6	0,0
22:0	0,1	0,2	0,2	0,0
24:0	0,0	0,2	0,0	0,0
Otros	0,7	0,0	0,2	4,7

*Los valores indicados corresponden al promedio de la masa porcentual del total de los ésteres metílicos de los ácidos grasos.

• Animales y protocolo experimental

Se emplearon ratones macho de la cepa CF1 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. Los animales fueron aclimatados durante dos semanas luego del destete en un ambiente con luz-oscuridad de 12 hs, a temperatura controlada (23 ± 2 °C), con libre acceso al agua y a una dieta estándar de laboratorio. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 6 grupos experimentales y alimentados durante 30 días con alguna de las dietas anteriormente mencionadas. Así, los grupos dietarios utilizados fueron identificados, al igual que las dietas, como: O, O+CLA, M, M+CLA, C, C+CLA. Al finalizar el período de tratamiento dietario, los animales ($n=6$ por grupo) fueron anestesiados con una mezcla de acepromicina y ketamina (1mg + 100 mg /Kg peso, respectivamente) y sacrificados entre las 9.00 y 11.00 AM. Los hígados fueron inmediatamente removidos y pesados. Una porción de hígado fue escindida y congelada con una pinza enfriada en nieve carbónica, morterizada y conservada a -80°C para la cuantificación de los lípidos hepáticos; una segunda porción fue inmediatamente sometida a un proceso de fijación mediante la inmersión directa de la muestra en formaldehído al 4 % tamponado con buffer fosfato (PBS, pH 7,5) para estudios histológicos; y la porción restante de hígado fue lavada con solución salina, enfriada a 4 °C y conservada de la misma forma indicada anteriormente, para los análisis del estado lipoperoxidativo.

• Determinaciones realizadas

Contenido hepático de triglicéridos (TG), colesterol (Col) y fosfolípidos (FL) totales.

Una cantidad determinada de hígado sin lavar conservada a -80 °C se homogenizó con un volumen apropiado de solución salina fría (4 °C), para obtener una dilución 1/20 (hígados de animales alimentados con dietas controles) ó 1/40 (hígados de animales alimentados con dietas suplementadas con CLA) para la cuantificación de TG, y una dilución 1/2 para la cuantificación de Col y FL. El contenido de TG se determinó mediante el método espectrofotométrico propuesto por Laurell (20). Para la cuantificación de Col y FL se procedió de la siguiente forma: sobre alícuotas de los homogenatos diluidos se realizó la extracción lipídica según la técnica propuesta por Folch y col. (21). Una cantidad conocida del extracto lipídico obtenido fue transferida a un tubo de extracción y secada a 40 °C bajo corriente de $\text{N}_{2(g)}$. Sobre este extracto seco, se cuantificó el colesterol total según la técnica espectrofotométrica de Abell y col. (22). Una segunda alícuota del extracto lipídico original, fue transferida a un tubo de 20 ml con tapa a rosca y llevada a sequedad (40 °C, $\text{N}_{2(g)}$), para la posterior cuantificación del contenido de fósforo mediante el método estándar de reducción del complejo fosfomolibdato con ácido ascórbico (23).

Los resultados se expresaron como μmol de TG, Col ó FL/g tejido húmedo.

Parámetros relacionados al estado lipoperoxidativo

El grado de peroxidación lipídica, se evaluó en homogenados de hígado lavado, preparados al 10 % (p/v) con KCl 1,15 % de acuerdo al método de Ohkawa y col. (24),

basado en la reacción colorimétrica de los peróxidos lipídicos con ácido tiobarbitúrico para formar malondialdehído (MDA). Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol MDA/g}$ tejido húmedo.

El contenido de glutatión reducido (GSH) se cuantificó en homogenados hepáticos preparados en una proporción 4:1 con ácido tricloroacético al 5 %. En el sobrenadante obtenido por centrifugación, se determinó el contenido de GSH según la técnica de Ellman y Lysko (25). Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol GSH/g}$ tejido húmedo.

Se determinaron las actividades de las enzimas antioxidantes hepáticas Catalasa (CAT) y Glutathion Peroxidasa (GSH-Px). Para tal fin, se obtuvieron homogenados hepáticos al 10 % (p/v) con buffer fosfato 50 mM, pH 7,0, los cuales fueron luego centrifugados a 4 °C y 16.000 g durante 12 minutos. La actividad de las enzimas mencionadas se determinó en el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación. La concentración de proteínas en el sobrenadante fue determinada por el método de Lowry y col. (26). La actividad de la enzima CAT se determinó mediante la técnica de Beers y Sizer (27). Dicha técnica mide la cantidad de H_2O_2 degradada por la enzima en buffer fosfato 50 mM, pH 7,0, con Triton X-100 al 1 %. La actividad enzimática fue expresada como U/mg de proteína ($1\text{U} = 1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{minuto}$). La actividad de la enzima 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 glutatión reductasa según la técnica de Paglia y Valentine (28). La actividad de dicha enzima fue expresada como U/mg proteína ($1\text{U} = 1 \mu\text{mol NADPH/minuto}$).

Histología hepática

Se realizaron observaciones micro anatómicas utilizando cortes seriados de todos los hígados procesados. Cada corte fue de 5 micras de espesor, utilizando un microtomo tipo Minot y coloreados con Hematoxilina-Eosina (29). La observación se realizó a los aumentos de 4X, 10X y 40X con microscopio óptico equipado con cámara fotográfica.

• Análisis estadístico

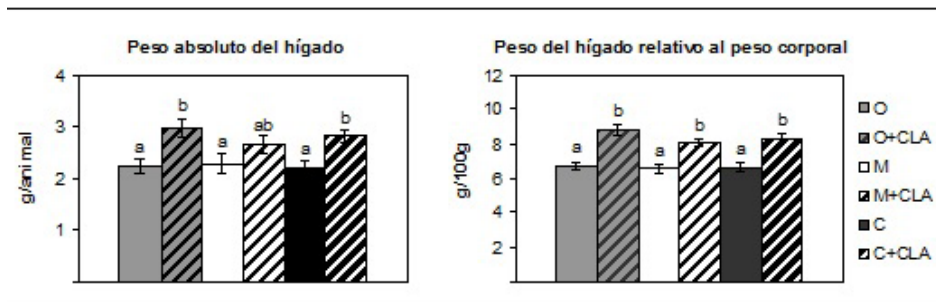
Los resultados se expresaron como media \pm SEM y fueron analizados mediante el método de ANOVA de 2 variables (3×2), utilizando la fuente de grasa dietaria (O, M y C) y la ausencia ó presencia de CLA como variables independientes. Las comparaciones post-hoc fueron realizadas utilizando el test de Tukey. En todos los casos, valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Durante los 30 días de alimentación, las dietas experimentales fueron perfectamente aceptadas por todos los animales, los cuales no manifestaron ningún tipo de alteración.

En la Figura 1 se muestra el peso absoluto y relativo del hígado total. El análisis estadístico evidencia que la presencia de CLA, y no la fuente de grasa dietaria, afectó el peso de dicho tejido. El efecto de la suplementación con CLA incrementó significativamente el peso del hígado en valor absoluto (g/animal), en los grupos O+CLA y C+CLA, mostrando sólo una tendencia en el grupo M+CLA. En cambio, analizando el peso relativo del hígado (g/100g peso corporal), se observó un aumento significativo de dicho tejido independientemente de la fuente de grasa dietaria considerada.

Figura 1. Efecto de la fuente de grasa dietaria y de la suplementación con CLA sobre el peso absoluto y relativo del hígado



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x2 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Los niveles de TG, Col y FL hepáticos no fueron afectados por la fuente de grasa dietaria en ausencia de CLA. Analizando el efecto de la suplementación con CLA sobre dichos parámetros, se pudo observar un efecto diferencial de estos isómeros dependiendo de la fuente de grasa dietaria considerada. Los niveles de TG hepáticos fueron incrementados por la suplementación con CLA. Específicamente los CLA incrementaron los TG hepáticos en los animales que

recibieron las dietas conteniendo aceites de oliva o de maíz, siendo más acentuado en el grupo O+CLA. Por otro lado, la suplementación con CLA, no modificó los niveles de Col y FL en animales que recibieron aceite de maíz o canola, mientras que un efecto diferencial se ha observado en el grupo O+CLA, donde los niveles de Col hepático incrementaron, mientras que los de FL disminuyeron por la presencia de CLA.

Tabla 3. Efecto de la fuente de grasa dietaria y de la suplementación con CLA sobre el contenido hepático de TG, Col y FL

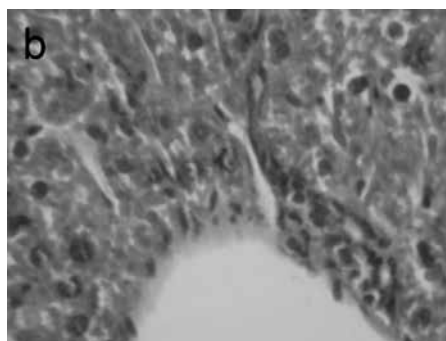
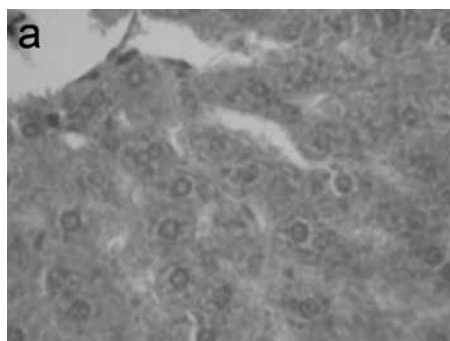
	O	O+CLA	M	M+CLA	C	C+CLA
TG ($\mu\text{mol/g}$)	32,5 \pm 1,6 ^a	55,5 \pm 3,4 ^b	32,7 \pm 2,2 ^a	43,6 \pm 2,7 ^c	34,0 \pm 1,9 ^{ac}	37,9 \pm 2,2 ^{ac}
Col ($\mu\text{mol/g}$)	7,0 \pm 0,4 ^a	10,0 \pm 0,9 ^b	6,3 \pm 0,4 ^a	6,3 \pm 0,3 ^a	5,8 \pm 0,3 ^a	7,7 \pm 0,8 ^{ab}
FL ($\mu\text{mol/g}$)	30,3 \pm 1,5 ^a	24,6 \pm 1,3 ^b	27,0 \pm 0,9 ^{ab}	26,0 \pm 1,1 ^{ab}	27,4 \pm 1,2 ^{ab}	25,5 \pm 1,1 ^{ab}

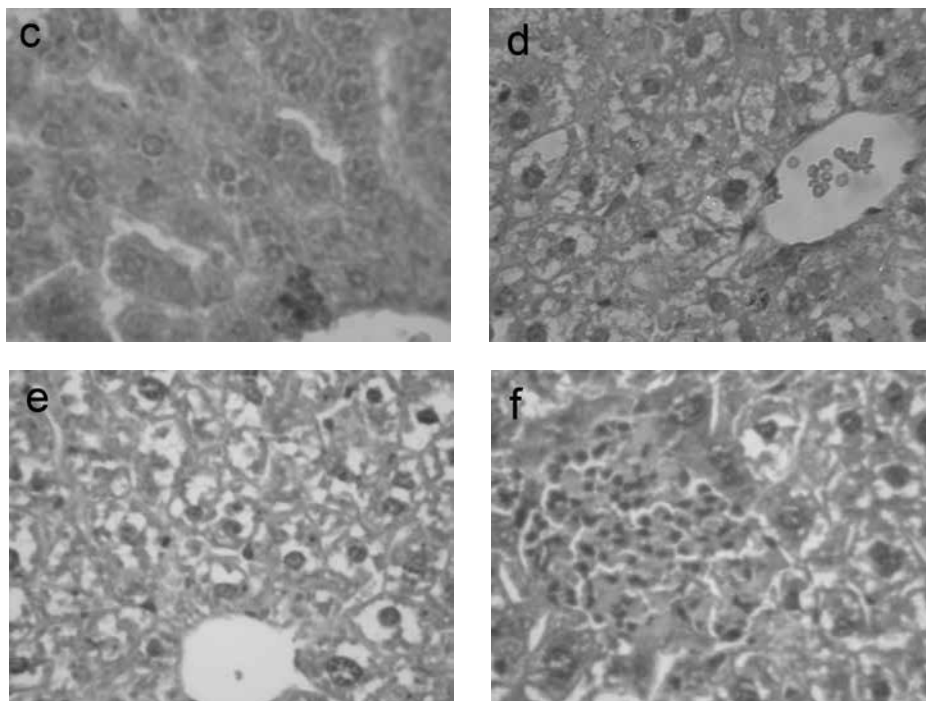
Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x2 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

El análisis histológico de cortes representativos de hígados correspondientes a los 6 grupos dietarios se muestra en la Figura 2. Todos los cortes de tejido hepático analizados a la luz del microscopio óptico, correspondientes a los grupos O (Figura 2.a) y C (Figura 2.c), exhibieron una morfología compatible con un patrón tisular normal, con área portal y lobular conservada, células hepáticas presentando un citoplasma hepatocítico con la acidofilia característica de los mismos, núcleos conservados con membrana nuclear con límites definidos y patrón de distribución cromatínico en oxi y basi cromatina. No se observó infiltrado inflamatorio, células apoptóticas, ni inclusiones lipídicas. Los cortes de hígados de los animales del grupo M (Figura 2.b), presentaron dilatación de la vena central, hepatocitos con ligera tumefacción citoplasmática y patrón nuclear conservado. Además, se observaron focos de inflamación con células apoptóticas en el parénquima e infiltrado leucocitario en el espacio portal. La suplementación con CLA generó profundas alteraciones en la morfología hepática, como así también necrosis celular, focos

inflamatorios e inclusión de microvacuolas lipídicas. El grado de dichas alteraciones fue dependiente de la fuente de grasa dietaria utilizada. Los hígados de los animales de los grupos O+CLA (Figura 2.d) y C+CLA (Figura 2.f) presentaron infiltrado leucocitario y microvacuolas de grasa, que en el grupo C+CLA se localizaron alrededor de la vena central, y a pesar de que en ambos casos se observaron células en mitosis, degeneración balonzante del hepatocito y tumefacción citoplasmática, estas alteraciones no fueron tan exacerbadas como en el grupo M+CLA. Así, en este grupo (Figura 2.e), se presentó dilatación de la vena central, numerosas células en mitosis con patrón nuclear conservado, degeneración balonzante del hepatocito y marcada tumefacción citoplasmática. Amerita destacar la presencia aislada de microvacuolas lipídicas dispersas en el parénquima hepático. Además se observó necrosis y apoptosis focal, con presencia de células apoptóticas y núcleos picnóticos, inflamación lobulillar y acúmulo de neutrófilos, patrón correspondiente a hepatitis.

Figura 2. Cortes histológicos hepáticos





a. O; b. M; c. C; d. O+CLA; e. M+CLA; f. C+CLA. Aumento 40X.

El grado de lipoperoxidación (LPO) hepática expresado como la cantidad de MDA formado, fue menor en los animales del grupo O que en los animales que consumieron dietas enriquecidas con grasas más insaturadas (M y C). La suplementación con CLA tuvo un efecto diferencial en los distintos grupos, donde se observó una reducción de la LPO hepática en los animales O+CLA. No obstante, es dable destacar que no se ha observado ningún incremento en la LPO por efecto de la suplementación con CLA, y cuando se observó un efecto, el mismo fue preventivo de la LPO (Tabla 4).

Los niveles de GSH (principal componente protector no enzimático del estado oxidativo) en ausencia de CLA, fueron

menores en los animales del grupo O que en los de los grupos M y C. La presencia de CLA aumentó el contenido de GSH sólo en los animales del grupo O+CLA. Dentro de los sistemas protectores enzimáticos, la actividad de la enzima CAT, en ausencia de CLA, fue mayor en los animales del grupo O frente a aquellos de los grupos M y C. La suplementación con CLA, redujo la actividad de dicha enzima en el grupo O+CLA frente a su respectivo control, y no mostró ningún efecto en los otros grupos dietarios. Otra enzima enmarcada en los sistemas protectores enzimáticos es la GSH-Px, la cual no fue afectada ni por la fuente de grasa dietaria, ni por la suplementación con CLA.

Tabla 4. Efecto de la fuente de grasa dietaria y de la suplementación con CLA sobre parámetros relacionados al estado lipoperoxidativo hepático

	O	O+CLA	M	M+CLA	C	C+CLA
LPO ($\mu\text{molMDA/g}$)	122,3 \pm 4,4 ^a	83,4 \pm 3,1 ^b	181,7 \pm 10,4 ^c	171,6 \pm 8,8 ^c	190,9 \pm 14,4 ^c	166,5 \pm 7,8 ^c
GSH ($\mu\text{molGSH/g}$)	4,6 \pm 0,3 ^a	5,7 \pm 0,2 ^b	5,8 \pm 0,5 ^b	5,7 \pm 0,6 ^b	5,7 \pm 0,4 ^b	6,7 \pm 0,3 ^b
CAT (U/mg prot)	149,7 \pm 7,8 ^a	93,6 \pm 7,6 ^b	112,5 \pm 10,0 ^b	111,5 \pm 5,3 ^b	109,9 \pm 6,5 ^b	99,6 \pm 7,8 ^b
GSH-Px (mU/mg prot)	199,3 \pm 16,6	183,6 \pm 10,9	172,6 \pm 18,3	166,8 \pm 17,2	175,8 \pm 14,9	164,8 \pm 16,2

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x2 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Discusión

Dado el conocimiento que los CLA a nivel hepático inducen hepatomegalia, esteatosis, y alteraciones en el metabolismo lipídico de ratones y que los mismos dependen de diversas variables, entre ellas el tipo de AG dietario, en este trabajo se investigaron algunos potenciales efectos de diferentes fuentes de grasas insaturadas dietarias sobre las alteraciones hepáticas inducidas por los CLA en hígado de animales de experimentación.

En ausencia de CLA, los ratones alimentados con dietas conteniendo diferentes fuentes de grasas dietarias, si bien no mostraron alteraciones en el tamaño, ni en el contenido de lípidos hepáticos, presentaron diferencias en el estado lipoperoxidativo y en su histología. Los animales del grupo O presentaron un bajo grado de LPO hepática sin alteraciones histológicas. El incremento de la LPO observado en los grupos M y C frente al O estuvo en concordancia con resultados de otros autores

(30, 31). Asimismo, este efecto estuvo asociado a una reducida actividad CAT que no fue compensada por el incremento de los niveles de GSH. Mientras que los hígados de los animales de los grupo O y C exhibieron una histología compatible con un patrón normal, los hígados del grupo M mostraron ciertas alteraciones morfológicas, acompañadas de células apoptóticas, focos inflamatorios e infiltrado leucocitario. Estas observaciones están en concordancia con los trabajos de Baumgardner y col. (6) y Ronis y col. (4), quienes observaron que ratas alimentadas mediante nutrición enteral con aceite de maíz, presentaron en una manera dosis-dependiente, un desarrollo progresivo de acumulación de lípidos hepáticos, infiltración de macrófagos, estrés oxidativo, acompañado de alteraciones en la expresión de marcadores inflamatorios, como el TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*). Otros autores propusieron que el incremento en el contenido de AL y ácido araquidónico (AA) en las fracciones de lípi-

dos hepáticos, favorece la producción de eicosanoides pro-inflamatorios, contribuyendo al desarrollo de esteatohepatitis (32), justificando de esta manera, la diferencia observada en nuestras experiencias con los animales alimentados con aceite de oliva y de canola.

La suplementación con CLA a las dietas en nuestro modelo experimental produjo acumulación de TG y aumento de peso en el hígado, asociado a alteraciones histológicas y cambios en el estado lipoperoxidativo dependiente de la fuente de grasa dietaria. La hepatomegalia y esteatosis han sido observadas por numerosos investigadores en ratones alimentados con una mezcla equimolecular de *cis*-9,*trans*-11-CLA y *trans*-10,*cis*-12-CLA (33, 34) o con el isómero individual *trans*-10,*cis*-12-CLA (16, 35, 36). Los mecanismos que conducen a estas alteraciones son de carácter multifactorial, involucrando, incremento en la captación y síntesis de AG, alteración en la oxidación de AG, y secreción insuficiente de TG como para prevenir la acumulación de lípidos (16, 35). Este fenómeno fue descrito por Poirier y col. (12) quienes sugirieron que el isómero *trans*-10,*cis*-12-CLA, pero no el *cis*-9,*trans*-11-CLA, conduce a un conjunto de alteraciones interconectadas denominadas "síndrome lipoatrófico".

Estos efectos reportados dependen de numerosos factores, y entre ellos la grasa dietaria. En este sentido, si bien es posible postular influencias metabólicas de los CLA sobre las diferentes familias de AG insaturados, existen sólo algunos estudios y no sistemáticos que abordaron la interacción de estas dos variables sobre la posible atenuación o exacerbación de los efectos inducidos por los CLA a nivel hepático. La suplementación de CLA en los anima-

les alimentados con aceite de oliva como fuente de grasa dietaria, produjo el mayor incremento en los niveles de TG y Col hepáticos, asociados a una hepatomegalia. En recientes trabajos de nuestro laboratorio (37), hemos demostrado que la suplementación con AG *trans* al aceite de oliva como fuente de grasa dietaria incrementó más los depósitos de TG hepáticos que al aceite de maíz en ratones macho. Los mecanismos involucrados que justificaron dichas diferencias se centraron en una incrementada actividad y expresión de enzimas lipogénicas, una elevada expresión de SREBP-1a (*Sterol Regulatory Element Binding Protein*), con una normal actividad y expresión de la enzima Carnitina Palmitoiltransferasa-1a. Estudios de Clement y col. (16), mostraron que la esteatosis hepática inducida por el *trans*-10,*cis*-12-CLA en ratones es secundaria a la hiperinsulinemia, que genera un aumento de la expresión del SREBP-1c y de la lipogénesis hepática. Así, es posible que el incremento en los niveles de TG y Col hepático exacerbado en este grupo, se relacione a un desequilibrio entre la lipogénesis/ β -oxidación hepática favorecida por la presencia de bajos niveles de AGPI. Pese a esta exacerbada acumulación de lípidos hepáticos en el grupo O+CLA, las alteraciones histológicas fueron mayores en animales cuyas fuentes de AG fueron más insaturadas. Esto pudo estar relacionado a un cierto efecto protector observado por los CLA en el balance entre los sistemas prooxidantes/ antioxidantes celulares del grupo O+CLA, debido al bajo grado de insaturación de los AG dietarios y al incremento de los niveles de GSH. Estos resultados están en conformidad con los reportados por estudios previos de nuestro laboratorio (33) y de otros investigadores (38).

La suplementación de CLA en los animales alimentados con aceite de maíz, si bien no causó desequilibrios en el estado oxidativo hepático, generó profundas alteraciones histológicas acompañadas de un incremento en los niveles de TG. Estos resultados parecieran estar en contradicción a los observados con otros AG de la familia n-6. En este sentido, ha sido demostrado que el ácido- γ -linolénico (39) y el AA (40) previnieron la acumulación de TG hepáticos observados en ratones alimentados con mezclas de CLA, a través de un incremento en los niveles de prostaglandina E_2 (PGE_2) y, probablemente, de otros prostanoides. Estas diferencias con nuestra dieta rica en AL podrían ser explicadas por la inhibición de los CLA sobre la actividad de la enzima $\Delta 6$ -Desaturasa (41), inhibiendo la metabolización de AL a ácido- γ -linolénico, y en consecuencia la formación de PGE_2 . Es dable mencionar que la PGE_2 suprime la expresión génica y la actividad de enzimas y proteínas asociadas a la lipogénesis. Asimismo, estos resultados no explican el mayor grado inflamatorio observado histológicamente en nuestra experiencia. Es posible prever que otros marcadores pro-inflamatorios a nivel hepático que son inducidos por el AL (42) serían los causales de la exacerbación por los CLA del grado de degeneración del hepatocito, tumefacción citoplasmática, apoptosis e inflamación observada histológicamente.

Finalmente, la combinación de CLA con aceite de canola atenuó el hígado graso inducido por el CLA en los ratones. Estos resultados están en acuerdo con otros trabajos que emplearon diferentes fuentes de AG de la familia n-3, como aceites de pescado (43), aceite de lino (44), ó DHA aislado (45). Este efecto protector no estuvo aso-

ciado a cambios en el estado lipoperoxidativo hepático y podría relacionarse a que el aceite de canola posee los beneficios de una alta relación AG n-3/ AG n-6, y de altos niveles de ácido oleico. Asimismo, comparado con el grupo M+CLA, se observa cierto grado de protección de los AG n-3 y n-9 sobre las alteraciones histológicas causadas por el CLA.

Conclusiones

Los CLA, independientemente de la grasa dietaria, producen alteraciones en el hígado de ratones, no obstante los efectos son diferentes en función de la fuente de AG considerada. Así, a nivel hepático, la suplementación con mezcla de CLA a aceite de oliva generó la mayor acumulación de lípidos, a aceite de maíz indujo un notable estado pro-inflamatorio, mientras que a aceite de canola los efectos deletéreos fueron más atenuados.

En virtud del empleo de la mezcla de CLA de síntesis como ayudas ergogénicas y para reducir la grasa corporal en humanos, este trabajo podría contribuir al conocimiento de ciertos efectos deletéreos que los mismos podrían tener en función de interacciones con otras grasas dietarias.

Agradecimientos

Los autores deseamos agradecer al Sr. Walter DaRú por su asistencia técnica con los animales de experimentación y al Sr. Wilver Herrera Villadare por su apoyo técnico histológico. Asimismo, agradecemos el financiamiento recibido de la UNL a través del subsidio CAI+D 2009 (PI-8-36) y del CONICET PIP n° 112-200801-02831.

Nota

¹ El presente trabajo ha sido parcialmente presentado y discutido en los Congresos: "9th. Euro Fed Lipid Congress Oils, Fats and Lipids for a Healthy and Sustainable World". Rotterdam, The Netherlands. Sept. 2011, y "XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición" SLAN. La Habana. Cuba. Nov. 2012. Asimismo, ha sido aceptado para su presentación en "IUNS 20th. International Congress of Nutrition". Granada. España. Sept., 2013.

Referencias bibliográficas

- Clarke, S.D., 2000. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br. J. Nutr.* **83** Suppl 1: S59–66.
- Mensink, R.P.; Plat, J. and Schrauwen, P., 2008. Diet and nonalcoholic fatty liver disease. *Curr. Opin. Lipidol.* **19**, 1: 25–29.
- Eguchi, Y.; Eguchi, T.; Mizuta, T.; Ide, Y.; Yasutake, T.; Iwakiri, R.; Hisatomi, A.; Ozaki, I.; Yamamoto, K.; Kitajima, Y.; Kawaguchi, Y.; Kuroki, S. and Ono, N., 2006. Visceral fat accumulation and insulin resistance are important factors in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Gastroenterol.* **41**, 5: 462–469.
- Ronis, M.J.; Baumgardner, J.N.; Sharma, N.; Vantrease, J.; Ferguson, M.; Tong, Y.; Wu, X.; Cleves, M.A. and Badger, T.M., 2013. Medium chain triglycerides dose-dependently prevent liver pathology in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). **238**, 2: 151–162.
- Machado, R.M.; Stefano, J.T.; Oliveira, C.P.; Mello, E.S.; Ferreira, F.D.; Nunes, V. S.; de Lima, V.M.; Quintao, E.C.; Catanozi, S.; Nakandakare, E.R. and Lottenberg, A. M., 2010. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. *J. Nutr.* **140**, 6: 1127–1132.
- Baumgardner January, N.; Hennings Leah, S.K.; Badger Thomas, M. and J., a. R. M.J., 2008. A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **294**, G27–G38.
- Pachikian, B.D.; Essaghir, A.; Demoulin, J.B.; Neyrinck, A.M.; Catry, E.; De Backer, F.C.; Dejeans, N.; Dewulf, E.M.; Sohet, F.M.; Portois, L.; Deldicque, L.; Molendi-Coste, O.; Leclercq, I.A.; Francaux, M.; Carpentier, Y.A.; Foufelle, F.; Muccioli, G.G.; Cani, P.D. and Delzenne, N.M., 2011. Hepatic n–3 polyunsaturated fatty acid depletion promotes steatosis and insulin resistance in mice: genomic analysis of cellular targets. *PLoS One.* **6**, 8: e23365.
- Capanni, M.; Calella, F.; Biagini, M.R.; Genise, S.; Raimondi, L.; Bedogni, G.; Svegliati-Baroni, G.; Sofi, F.; Milani, S.; Abbate, R.; Surrenti, C. and Casini, A., 2006. Prolonged n–3 polyunsaturated fatty acid supplementation ameliorates hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease: a pilot study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **23**, 8: 1143–1151.
- Assy, N.; Nassar, F.; Nasser, G. and Grosovski, M., 2009. Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **15**, 15: 1809–1815.
- Benjamin, S. and Spener, F., 2009. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutr. Metab. (Lond).* **6**: 36–48.
- Bhattacharya, A.; Banu, J.; Rahman, M.; Casey, J. and Fernandes, G., 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 12: 789–810.
- Poirier, H.; Niot, I.; Clément, L.; Guerre-Millo, M. and Besnard, P., 2005. Development of conjugated linoleic acid (CLA)-mediated lipotrophic syndrome in the mouse. *Biochimie.* **87**, 1: 73–79.
- Takahashi, Y.; Kushiro, M.; Shinohara, K. and Ide, T., 2002. Dietary conjugated linoleic acid

reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **133**, 3: 395–404.

14. Bialek, A.; Tokarz, A.; Dudek, A.; Kazimierska, W. and Bielecki, W., 2010. Influence of diet enriched with conjugated linoleic acids on their distribution in tissues of rats with DMBA induced tumors. *Lipids Health Dis.* **9**: 126.

15. Tholstrup, T.; Raff, M.; Straarup, E.M.; Lund, P.; Basu, S. and Bruun, J.M., 2008. An oil mixture with trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid increases markers of inflammation and in vivo lipid peroxidation compared with cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in postmenopausal women. *J. Nutr.* **138**, 8: 1445–1451.

16. Clément, L.; Poirier, H.; Niot, I.; Bocher, V.; Guerre-Millo, M.; Krief, S.; Staels, B. and Besnard, P., 2002. Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J. Lipid. Res.* **43**, 9: 1400–1409.

17. Vyas, D.; Kadegowda, A.K. and Erdman, R.A., 2012. Dietary conjugated linoleic Acid and hepatic steatosis: species-specific effects on liver and adipose lipid metabolism and gene expression. *J. Nutr. Metab.* 2012, 932928.

18. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H. and Fahey, G.C. Jr., 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 11: 1939–1951.

19. Andreoli, M.F.; Illesca, P.G.; González, M.A. and Bernal, C.A., 2010. Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis and restores liver triacylglycerol secretion and the fatty acid profile during protein repletion in rats. *Lipids.* **45**, 11: 1035–1045.

20. Laurell, S., 1966. A method for routine determination of plasma triglycerides. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation.* **18**, 6: 668–672.

21. Folch, J.; Lees, M. and Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**, 1: 497–509.

22. Abell, L.; Levy, B.; Brodie, B. and Kendall, F., 1952. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J. Biol. Chem.* **195**: 357–366.

23. Chen P.S., T.T.Y., and Warner, H., 1956. Microdetermination of Phosphorus. *Analytical Chemistry.* **28**, 11: 1756–1758.

24. Ohkawa, H.; Ohishi, N. and Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* **95**, 2: 351–358.

25. Ellman, G. and Lysko, H., 1979. A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem.* **93**, 1: 98–102.

26. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**: 265–275.

27. Beers, R.F. and Sizer, I.W., 1951. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**: 133–140.

28. Paglia, D.E. and Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab. Clin. Med.* **70**, 1: 158–169.

29. García del Moral, R., 1993. „Laboratorio de anatomía patológica“ McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid, 654.

30. Bello, R.I.; Gomez-Díaz, C.; Buron, M.I.; Navas, P. and Villalba, J.M., 2006. Differential regulation of hepatic apoptotic pathways by dietary olive and sunflower oils in the aging rat. *Exp. Gerontol.* **41**, 11: 1174–1184.

31. Mazière, C.; Conte, M.A.; Degonville, J.; Ali, D. and Mazière, J.C., 1999. Cellular Enrichment with Polyunsaturated Fatty Acids Induces an Oxidative Stress and Activates the Transcription Fac-

- tors AP1 and NFkB. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **265**, 116–122.
- 32.** Bagga, D.; Wang, L.; Farias-Eisner, R.; Glaspy, J. A. and Reddy, S. T., 2003. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 4: 1751–1756.
- 33.** Andreoli, M.F.; Gonzalez, M.A.; Martinelli, M.I.; Mocchiutti, N.O. and Bernal, C.A., 2009. Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice. *Nutrition*. **25**, 4: 445–452.
- 34.** Tsuboyama-Kasaoka, N.; Takahashi, M.; Tanemura, K.; Kim, H.J.; Tange, T.; Okuyama, H.; Kasai, M.; Ikemoto, S. and Ezaki, O., 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*. **49**, 9: 1534–1542.
- 35.** Rasooly, R.; Kelley, D.S.; Greg, J. and Mackey, B.E., 2007. Dietary trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid reduces the expression of fatty acid oxidation and drug detoxification enzymes in mouse liver. *Br. J. Nutr.* **97**, 1: 58–66.
- 36.** Degrace, P.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Chardigny, J.M.; Sebedio, J.L. and Clouet, P., 2004. Hepatic steatosis is not due to impaired fatty acid oxidation capacities in C57BL/6J mice fed the conjugated trans-10,cis-12-isomer of linoleic acid. *J. Nutr.* **134**, 4: 861–867.
- 37.** Sain, J.; Gonzalez, M.A.; Lasa, A.; Scalerandi, M.V.; Bernal, C.A. and Portillo, M. P., 2013. Effects of trans-fatty acids on liver lipid metabolism in mice fed on diets showing different fatty acid composition. *Ann. Nutr. Metab.* **62**, 3: 242–249.
- 38.** Arab, K.; Rossary, A.; Soulere, L. and Steghens, J.P., 2006. Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation. *Br. J. Nutr.* **96**, 5: 811–819.
- 39.** Nakanishi, T.; Oikawa, D.; Koutoku, T.; Hirakawa, H.; Kido, Y.; Tachibana, T. and Furuse, M., 2004. Gamma-linolenic acid prevents conjugated linoleic acid-induced fatty liver in mice. *Nutrition*. **20**, 4: 390–393.
- 40.** Oikawa, D.; Tsuyama, S.; Akimoto, Y.; Mizobe, Y. and Furuse, M., 2009. Arachidonic acid prevents fatty liver induced by conjugated linoleic acid in mice. *Br. J. Nutr.* **101**, 10: 1558–1563.
- 41.** Bretillon, L.; Chardigny, J.M.; Gregoire, S.; Berdeaux, O. and Sebedio, J.L., 1999. Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro. *Lipids*. **34**, 9: 965–969.
- 42.** Grimble, R.F., 1998. Nutritional modulation of cytokine biology. *Nutrition*. **14**, 7–8: 634–640.
- 43.** Ide, T., 2005. Interaction of fish oil and conjugated linoleic acid in affecting hepatic activity of lipogenic enzymes and gene expression in liver and adipose tissue. *Diabetes*. **54**, 2: 412–423.
- 44.** Kelley, D.S.; Vemuri, M.; Adkins, Y.; Gill, S.H.; Fedor, D. and Mackey, B.E., 2009. Flaxseed oil prevents trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid-induced insulin resistance in mice. *Br. J. Nutr.* **101**, 5: 701–708.
- 45.** Yanagita, T.; Wang, Y.M.; Nagao, K.; Ujino, Y. and Inoue, N., 2005. Conjugated linoleic acid-induced fatty liver can be attenuated by combination with docosahexaenoic acid in C57BL/6N mice. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 24: 9629–9633.