

Rol del tejido adiposo en la hipertrigliceridemia experimental: Efectos de los ácidos grasos polinsaturados de origen marino (n-3) *

Tron, Adriana; Soria, Ana; Chicco, Adriana; Lombardo, Yolanda B.

Dpto. Cs. Biológicas. FBCB. UNL. CC 530.(3000) Santa Fe. E-mail: ylombard@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) Investigar el rol del tejido adiposo en la hipertrigliceridemia, intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica inducida en ratas normales, por la administración crónica de una dieta rica en sacarosa (DRS) y 2) Estudiar el efecto beneficioso potencial de los aceites de origen marino sobre el tejido adiposo (aspectos morfológicos y metabólicos) de ratas alimentadas con DRS.

Para lograr estos objetivos, se suministró la DRS semi-sintética (p/p: sacarosa 62,5%, aceite de maíz -AM- 8% y proteínas 17%) por un plazo de 90 días, tiempo en el cual se desarrolla hipertrigliceridemia estable asociada a intolerancia a la glucosa. Al finalizar este período los animales se subdividieron al azar en dos subgrupos, uno continuó con la DRS por 30 días más y el otro recibió la DRS donde la fuente grasa fue sustituida por aceite de hígado de bacalao (AHB) (p/p: AHB 7% + AM 1%) durante el mismo espacio de tiempo (DRS + AHB). Las ratas controles recibieron una dieta control (DC) semi-sintética (p/p: almidón 62,5%, aceite de maíz 8%, proteínas 17%) durante todo el período experimental (120 días).

Los resultados muestran: incremento de peso del tejido adiposo, hipertrofia celular y mayor contenido de triglicéridos en las ratas alimentadas con DRS comparadas con las del lote DC. Esto se acompaña de un incremento significativo de la lipólisis basal y una disminución del efecto antilipolítico de la insulina (adipocitos aislados). Por otra parte, estas alteraciones fueron en su mayoría revertidas, sin que mediaran cambios en los niveles de insulina plasmática, cuando se sustituyó la fuente grasa de la dieta (AM por AHB) durante 30 días.

Estos estudios proveen nuevos datos sobre el rol del tejido adiposo y el efecto de los aceites dietarios de origen marino en este tejido en el modelo de dislipemia experimental y sugieren que la manipulación del tipo de grasa de la dieta podría jugar un rol importante en el manejo de los desórdenes lipídicos asociados a intolerancia a la glucosa y resistencia insulínica.

SUMMARY: The aim of this study was 1) To investigate the role of adipose tissue (epididymal fat pad) in the hypertriglyceridemia, glucose intolerance and insulin resistance induced by chronically (120 days) feeding normal rats with a sucrose rich diet (SRD) and 2) To study the potentially beneficial effect of dietary fish oil supplementation on adipose tissue (morphological and metabolic aspects) from rats fed a SRD.

To achieve this goal, male Wistar rats were fed a semi-synthetic SRD (w/w: 62.5% sucrose, 8% corn oil (CO), 17% protein) for 90 days. At the time, a well established and permanent hypertriglyceridemia accompanied by glucose intolerance was present. After that, one half received an SRD in which the source of fat was substituted by cod liver oil (CLO) (w/w 7% CLO plus 1% CO) from day 90 to 120 (SRD+CLO). Control rats were fed a semi-synthetic diet (CD) (w/w: 62.5% corn starch, 8% corn oil, 17% protein) throughout the 120 days experimental period. The results show an increased fat pad weight, cellular hypertrophy and triglyceride content in the groups of rats fed SRD as compared with rats fed CD. This was accompanied with a two fold increase of basal lipolysis and decreased antilipolytic effect of insulin (isolated adipocytes). On the other hand, all these changes were almost reversed by shifting the source of fat in the diet from corn oil to cod liver oil during 30 days. These changes were not mediated by changes in circulating insulin levels. These studies provided new data regarding the effect of dietary fish oil on adipose tissue in this experimental model of dyslipidemia and contribute to the suggestion that manipulation of dietary fats may play a role in the management of the lipid disorders associated with glucose intolerance and insulin resistance.

Introducción

La acción fisiológica de diferentes nutrientes (hidratos de carbono, ácidos grasos, etc) es tema de revisión permanente dada la influencia de la dieta en la patogenia y evolución de enfermedades metabólicas de alta incidencia en la población. Trabajos recientes de nuestro grupo demostraron que la administración, a ratas machos normales de la cepa Wistar, de una dieta rica en hidratos de carbono

simples (sacarosa 63% p/p) (DRS) durante 13-15 semanas, induce una hipertrigliceridemia estable e incremento de ácidos grasos libres plasmáticos (AGNE), asociados a una acentuada intolerancia a la glucosa con hiperglucemia basal y normoinsulinemia (basal y frente a estímulo de glucosa) (resistencia insulínica) (1). Por otra parte, desde hace algunos años se ha puesto especial atención en el consumo de aceites de pescado ricos en ácidos grasos polinsaturados n-3 debido a que estudios clínicos y experimentales han sugerido que la incorporación de estos ácidos grasos en las dietas pueden mejorar o prevenir ciertas situaciones patológicas que incluyen degeneración vascular ateroscle-

* Este trabajo fue realizado en el marco de un Proyecto de Investigación CAI+D 96-98 N° 12/3121. UNL

rótica (2), dislipemia, intolerancia a la glucosa e hipertensión (3,4). Recientemente demostramos que la hipertrigliceridemia, el incremento de los AGNE plasmáticos y la intolerancia a la glucosa producidas por la ingesta crónica de DRS pueden ser completamente revertidos sustituyendo durante 4 semanas la fuente de grasa de la dieta, aceite de maíz (AM), por aceite de hígado de bacalao (AHB), rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3 (5).

Los niveles de AGNE plasmáticos están determinados, en términos generales por las velocidades relativas de liberación de los depósitos grasos del tejido adiposo (lipólisis) y la captación y utilización de los mismos por el tejido hepático y los tejidos periféricos. Diferentes autores han demostrado que estos niveles de AGNE desempeñan un rol significativo tanto a nivel de síntesis hepática de triglicéridos y secreción de VLDL-Tg (6) como en la homeostasis de la glucosa modulando la acción insulínica en diferentes tejidos claves (ej. músculo esquelético) (7,8). Dada la importancia del rol metabólico y funcional del tejido adiposo sobre los niveles lipídicos plasmáticos, los objetivos de este trabajo fueron analizar: i) la posible participación del tejido adiposo en el desarrollo de la hipertrigliceridemia estable y resistencia insulínica observada en animales alimentados con una ingesta crónica de DRS (90-120 días) y ii) si una vez alcanzada la hipertrigliceridemia estable, la sustitución del tipo de grasa dietaria (AM por AHB) induce a modificaciones en el tejido adiposo que contribuyan a la normalización de los parámetros mencionados.

Materiales y Métodos

Animales y dietas

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar de aproximadamente 180-200 gramos de peso inicial. Luego de una semana de aclimatación en bioterio climatizado ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (7.00-19.00 hs), los animales fueron divididos al azar en dos grupos: experimental y control. El grupo experimental recibió una dieta semisintética rica en sacarosa (DRS) conteniendo por peso (g/100 g): sacarosa 62,5%, caseína libre de vitaminas 17%, aceite de maíz 8%, celulosa 7,5%, mezcla de sales 3,5% y de vitaminas 1% (AIN-76A) (9,10), clorhidrato de colina 0,2% y metionina 0,3%. El grupo control recibió una dieta semisintética (DC) similar a la del grupo experimental en donde la fuente de carbohidratos, sacarosa,

fue reemplazada por almidón de maíz. Ambas dietas son isoenergéticas y proveen aproximadamente 16,24 Kjoule/g de comida.

El grupo experimental recibió la DRS durante 90 días, al cabo del cual se subdividió al azar en dos subgrupos: uno prosiguió con la DRS hasta los 120 días y el otro recibió la misma DRS donde la fuente de grasa (aceite de maíz, AM, 8% p/p) fue reemplazada por aceite de hígado de bacalao (AHB) 7% p/p + AM 1% p/p (DRS+AHB) hasta finalizar el período de experimentación (120 días). El grupo control ingirió durante los 120 días la DC. Tanto la DC como la DRS fueron adicionadas (desde los 90 a los 120 días) de colesterol, vitaminas A y D para alcanzar los niveles presentes en la DRS+AHB provistos por el AHB. Detalles sobre la composición y metodología de preparación de las dietas han sido descriptos previamente (5).

En experiencias en paralelo se constató la variación de peso e ingesta calórica dos veces por semana. Finalizado el período experimental, la comida fue removida a las 7.00 hs. y los experimentos que se detallan a continuación llevados a cabo entre 8-11 hs.

Aislamiento de adipocitos

Los adipocitos fueron preparados a partir del tejido adiposo epididimal de acuerdo al método descripto por Robdell (11). La preparación celular, lavados e incubaciones se llevaron a cabo en buffer Krebs-Henseleit fosfato (pH=7,4), conteniendo Ca^{+2} 1,25 mM, glucosa 5,5 mM y albúmina sérica bovina (fracción V, esencialmente libre de ácidos grasos) 40 mg/ml. Al medio de incubación se le adicionó 1 mg/g de tejido de colagenasa cruda (*Clostridium histolyticum*) (11) realizándose la digestión del tejido en un agitador metabólico tipo Dubnoff a 37°C durante 1 hora, (agitación de 60-80 giros/minuto). Las células grasas obtenidas fueron utilizadas en los diferentes ensayos que se describen a continuación.

Estudios morfológicos

El tamaño celular fue medido microscópicamente de acuerdo a los métodos de Di Girolamo y col. (12) y Khan y col. (13). El número de células grasas en cada intervalo de clase fue tratado como una única variable, utilizándose el valor promedio obtenido para cada grupo experimental a los fines

de construir el histograma representativo del grupo. A partir de este histograma, se calculó el diámetro y el volumen celular promedio de las poblaciones (12), realizando cuando fue necesario una transformación logarítmica a fin de obtener una distribución normal de las variables.

Alicuotas de tejido epididimal fueron utilizadas para determinar el contenido de triglicéridos por el método de Folch y col. (14). El número total de células en el tejido fue obtenido dividiendo el contenido de lípidos del depósito graso por el contenido de lípidos celular. El contenido lipídico celular promedio fue calculado a partir del volumen celular promedio asumiendo una densidad del lípido intracelular de 0,915 (densidad de la trioleína) (12, 15).

Lipólisis basal y acción antilipolítica de la insulina en adipocitos aislados

La lipólisis basal del tejido adiposo fue estudiada en alicuotas de adipocitos (aproximadamente 1×10^6 células/ml) resuspendidas en buffer Krebs-Henseleit fosfato (pH=7,4), adicionado de Ca^{+2} 1,25 mM, glucosa 5,5 mM y albúmina sérica bovina (fracción V, esencialmente libre de ácidos grasos) 40 mg/ml e incubadas por duplicado en ausencia de efectores (lipólisis basal). Para el estudio de la acción antilipolítica de la insulina los adipocitos fueron incubados con el medio previamente descrito adicionado de isoproterenol 10^{-7} M, adenosina deaminasa 1U/ml en presencia o ausencia de insulina en dosis crecientes (0,5 a 5 nM) (16, 17). Todas las incubaciones se desarrollaron en un agitador metabólico tipo Dubnoff a 37°C durante 1 hora, (agitación de 60-80 giros/minuto) bajo una atmósfera de O_2 (95%): CO_2 (5%). Al final del período de incubación una alicuota del infranadante (0,2 ml) de cada mezcla de incubación fue removida y procesada analizándose la concentración de glicérol -índice de lipólisis (18)- por el método espectrofotométrico de Wieland (19).

Métodos analíticos

Las muestras de sangre obtenidas a partir de la vena yugular de los animales previamente anestesiados con pentobarbital (60 mg/Kg de peso corporal) fueron centrifugadas inmediatamente a 4 °C y el suero utilizado el mismo día o conservado a -20°C hasta su ensayo. Los contenidos plasmáticos de triglicéridos (14), ácidos grasos libres

(AGNE)(20), y glucosa (21) fueron determinados por métodos espectrofotométricos convencionales. Los niveles de insulina inmunoreactiva fueron determinados por el método de Herbert y col. (22), utilizándose la insulina de rata como standard.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm SEM. El estudio estadístico entre grupos se realizó por análisis de varianza de un factor y posterior test de Newman-Keuls para examinar las diferencias entre pares de medias (23). Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Reactivos

Enzimas, sustratos y coenzimas fueron obtenidos en SIGMA Chemical Co. (St Louis, MO). El resto de los reactivos químicos utilizados fueron de grado analítico. El aceite de hígado de bacalao (AHB) fue obtenido en ICI Biomedical, Inc. (Costa Mesa CA).

Resultados

En la tabla 1 se observa que el peso alcanzado por los animales al final de los 90 ó 120 días de experimentación es similar en todos los grupos analizados. La ingesta calórica (kcal/g día) también fue similar, no observándose diferencias significativas entre los grupos, lo que indica que las dietas en estudio fueron bien aceptadas.

En la tabla 2 observamos que al finalizar el período de ingesta, los niveles plasmáticos de triglicéridos, glucosa y AGNE de las ratas alimentadas con DRS fueron significativamente más altos que los de los animales de igual sexo y edad alimentados con dieta DC. La sustitución de la fuente grasa de la dieta (AM 8% por AHB 7% + AM 1% durante 30 días normaliza todos los metabolitos previamente descritos. La insulinemia no se modificó en ninguno de los lotes analizados.

En la tabla 3 se observa en los animales alimentados con DRS un incremento del peso del tejido adiposo epididimal tanto absoluto (g) como relativo (g/100 g rata). Esto se asocia a un mayor volumen y contenido de triglicéridos celulares en los adipocitos y a una menor celularidad por unidad de

Tabla 1. Peso corporal e ingesta calórica en ratas alimentadas con las diferentes dietas experimentales.

Dieta	Tiempo ingesta (días)	Peso corporal (g)	Ingesta calórica (KJ/día)
DC	1-90	367,0 ± 9,5 ¹	282,0 ± 25,4
DRS	1-90	368,0 ± 9,6	279,0 ± 23,0
DC	91-120	412,0 ± 9,8	271,0 ± 16,5
DRS	91-120	419,0 ± 9,4	269,0 ± 19,9
DRS + AHB	91-120	411,0 ± 6,8	270,0 ± 15,7

DC: Dieta control; DRS: Dieta rica en sacarosa; DRS+AHB: Dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao.

¹: Los valores son expresados como media ± SEM.

Se utilizaron al menos 6 animales en cada lote.

Tabla 2. Niveles plasmáticos de triglicéridos, ácidos grasos libres (AGNE), glucosa e insulina en ratas alimentadas con las diferentes dietas experimentales.

Dieta	Triglicéridos (mM)	AGNE (μM)	Glucosa (mM)	Insulina (μU/ml)
DC (1-120 días)(4)	0,60 ± 0,05 ^{1,a}	278 ± 20 ^a	6,3 ± 0,2 ^a	35,3 ± 2,5 ^a
DRS (1-120 días)(4)	2,19 ± 0,17 ^b	716 ± 48 ^b	7,9 ± 0,3 ^b	38,0 ± 3,3 ^a
DRS (1-90 días) + AHB (91-120 días)(4)	0,53 ± 0,06 ^a	294 ± 35 ^a	6,8 ± 0,1 ^a	32,3 ± 4,3 ^a

DC: Dieta control; DRS: Dieta rica en sacarosa; DRS+AHB: Dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao.

¹: Los valores son expresados como media ± SEM.

(): Número de animales en cada grupo.

Los valores en cada columna que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ($p < 0,05$), cuando cada una de las variables es analizada por el test de Newman-Keuls.

peso (n° de células adiposas/g tejido). Cuando se sustituye la fuente de ácidos grasos de la dieta (AM por AHB), se observa una disminución significativa tanto en el peso absoluto como relativo del tejido adiposo epididimal sin que se alcancen los valores del lote DC. Estos cambios se acompañan de una disminución del volumen y contenido de triglicéridos celulares y un incremento del número de células por gramo aún sin llegar a los niveles normales. El número total de células adiposas epididimales referidas al órgano total es similar en todos los lotes.

Analizando los histogramas de frecuencia de los diámetros celulares se observaron poblaciones diferentes para cada uno de los grupos dietarios estudiados (Figura 1). En los grupos DRS y DRS+AHB se constató un desplazamiento de los

diámetros celulares hacia la derecha respecto del grupo DC. Los diámetros celulares medios y los intervalos de variación de las poblaciones fueron los siguientes: (micras): DC = 78,0 [25 - 157,5]; DRS = 89,8 [20 - 287,5]; DRS+AHB = 88,7 [35 - 172,5]. De acuerdo a estos datos podemos inferir que la población de células epididimales en los animales alimentados con DRS cuya fuente grasa fue sustituida por AHB presenta una tendencia central similar a la población DRS, aunque debemos remarcar que su dispersión fue comparable con la población de células epididimales de animales de igual sexo y edad alimentados con DC.

El incremento de AGNE plasmáticos observado "in vivo" en los animales alimentados con DRS se asocia a una mayor lipólisis basal de los adipo-

Tabla 3. Peso y peso relativo, volumen celular, contenido de triglicéridos y celularidad del tejido adiposo epididimal de ratas alimentadas con las diferentes dietas experimentales.

Dieta	Peso (g)	Peso relativo (g/ 100g rata)	Volumen celular (μ l)	Triglicéridos (nmol/ célula)	Nº de células ($\times 10^6$ /g de tejido)	Nº de células ($\times 10^6$ /órgano total)
DC (1-120 días) (4)	5,80 \pm 0,35 ^{1,a}	1,41 \pm 0,10 ^a	254,0 \pm 13,0 ^a	0,26 \pm 0,032 ^a	4,34 \pm 0,24 ^a	25,25 \pm 2,52 ^a
DRS (1-120 días) (4)	9,29 \pm 0,54 ^b	2,22 \pm 0,11 ^b	405,0 \pm 16,0 ^b	0,42 \pm 0,016 ^b	2,71 \pm 0,11 ^b	25,31 \pm 2,39 ^a
DRS (1-90 días) + AHB (91-120 días) (4)	7,16 \pm 0,58 ^c	1,76 \pm 0,04 ^c	349,0 \pm 29,0 ^b	0,36 \pm 0,02 ^b	3,29 \pm 0,13 ^b	23,52 \pm 3,41 ^a

DC: Dieta control; DRS: Dieta rica en sacarosa; DRS + AHB: Dieta rica en sacarosa + aceite de hígado de bacalao.

¹: Los valores se expresan como media \pm SEM.

(): Número de animales en cada lote.

Los valores en cada columna que no presentan el mismo superescrito son significativamente diferentes ($p < 0,05$), cuando cada una de las variables es analizada por el test de Newman-Keuls.

citós aislados que se normaliza por la simple sustitución del tipo de ácidos grasos dietarios. Los resultados obtenidos fueron: Media \pm SEM ($n=4$): Lipólisis basal (nmol glicerol liberado / 10^5 células) $72,8 \pm 13,6$ en DC; $331,6 \pm 52,0$ en DRS(p) y $74,0 \pm 10,4$ en DRS + AHB. La Figura 2 muestra el efecto inhibitorio de dosis crecientes de insulina sobre la lipólisis estimulada por isoproterenol 10^{-7} M. En los animales alimentados con DC se observa una máxima inhibición (40%) de la lipólisis con dosis de insulina de 1,7 nM. Este % de inhibición se mantiene constante con dosis crecientes de la hormona. Los animales alimentados con DRS muestran solo una ligera disminución de la lipólisis (8%) que alcanza un plateau máximo a niveles de insulina de 0,5 nM. Cuando se sustituye la grasa dietaria (AM por AHB) la acción antilipolítica de la insulina es similar a la del lote DC.

Discusión

Nuestros resultados indican que la hipertrigliceridemia y la resistencia insulínica global "in toto" inducidas por una ingesta crónica (120 días) de dieta rica en sacarosa (DRS) a ratas machos normales se acompaña, a nivel del tejido adiposo epididimal, de alteraciones morfológicas (peso, volumen celular, aumento de triglicéridos) y funcionales (mayor lipólisis basal y menor acción antilipolítica de la insulina). El cambio de ácidos grasos de la dieta (aceite de maíz -AM- por aceite de hígado de bacalao -AHB-) tiende a mejorar los cambios morfológicos y revierte las alteraciones funcionales antes mencionadas.

El incremento de peso y la hipertrofia del tejido adiposo epididimal de las ratas alimentadas con DRS se asocia a una mayor heterogeneidad de la población celular, que no es atribuible a hiperplasia celular (el número de células/ órgano total es similar al de las ratas alimentadas con DC). Al respecto es importante destacar que la administración de DRS se inicia cuando las ratas han alcanzado su madurez sexual, período en que finaliza la etapa de multiplicación de los adipocitos en ratas normales (24).

En relación al aumento de masa del tejido adiposo epididimal sin cambios en el peso corporal esto también fue observado por Reiser y col. (25) en ratas alimentadas con (54% p/p) de una dieta rica en sacarosa durante 11 semanas, y por Rizkalla y col. (26) en ratas que ingirieron durante un período similar una dieta con 57 % de fructosa.

El mayor diámetro celular observado en las

ratas con DRS se correlaciona con un significativo incremento de: contenido de triglicéridos celulares, lipólisis basal (en adipocitos aislados) y niveles de ácidos grasos libres plasmáticos. Una relación entre hipertrofia celular y mayor lipólisis basal o estimulada (isoproterenol) del tejido adiposo epididimal fue también descrita por Herberg y col. (27) en ratones genéticamente obesos (New Zealand). Shafrir y col. (28) observaron mayor actividad lipolítica basal e incremento de AGNE plasmáticos en ratones spiny (*Acomys cahirinus*) alimentados con dieta rica en sacarosa durante tres meses.

Cuando la fuente grasa de la DRS (AM) es reemplazada por AHB, se observa una completa normalización de la lipólisis basal que se correlaciona con los menores niveles de AGNE plasmáticos. Dentro de este contexto, el peso del tejido adiposo epididimal y la heterogeneidad celular (observada en el histograma de frecuencia de diámetros celulares) tiende a normalizarse, sin alcanzar aún los valores constatados en el lote DC. Similarmente, el elevado contenido de triglicéridos celulares también decrece bajo la administración del AHB. El efecto del AHB parece restringir la hipertrofia celular limitando el contenido de triglicéridos en el adipocito sin afectar la celularidad. Trabajos de Hill y col. (29) sugieren que los ácidos grasos n-3 son preferencialmente oxidados y no acumulados, lo que permitiría explicar el menor peso y contenido lipídico en el tejido adiposo de los animales alimentados con DRS donde se sustituyó la fuente grasa de origen vegetal por marino (n-3). Luo y col. (30) observaron un decrecimiento del peso del tejido adiposo epididimal en ratas alimentadas durante 5 semanas con DRS (50% de las calorías totales) cuando se sustituyó isocalóricamente una mezcla (30% de las calorías totales) de aceite vegetal y animal por aceite de pescados (ricos en n-3).

La reducida actividad antilipolítica de la insulina en los adipocitos aislados de los animales alimentados con DRS observada en el presente trabajo, refuerza resultados previos de nuestro grupo donde demostramos una resistencia insulínica en el animal "in toto", en general (1), y a nivel del músculo cardíaco, en particular (31). Sin embargo la insulínemia basal y frente a estímulo (prueba de sobrecarga i.v. de glucosa (1) no difiere de la observada en los animales alimentados con DC de igual sexo y edad, lo que sugiere una alteración de la sensibilidad de los tejidos blancos a la acción hormonal. Similar a nuestros hallazgos, estudios de Smith y col. (32) indicaron que el consumo de sacarosa en humanos determina una incrementada movilización

Figura 1. Histogramas de la distribución promedio de los diámetros de adipocitos epididimales aislados de ratas alimentadas con DC: Dieta control (1-120 días); DRS: Dieta rica en sacarosa (1-120 días) y DRS + AHB: Dieta rica en sacarosa (1-120 días) + aceite de hígado de bacalao (91-120 días). Las columnas representan el porcentaje promedio de células medidas que corresponden al intervalo de clase indicado. Se procesaron al menos 4 animales en cada uno de los grupos.

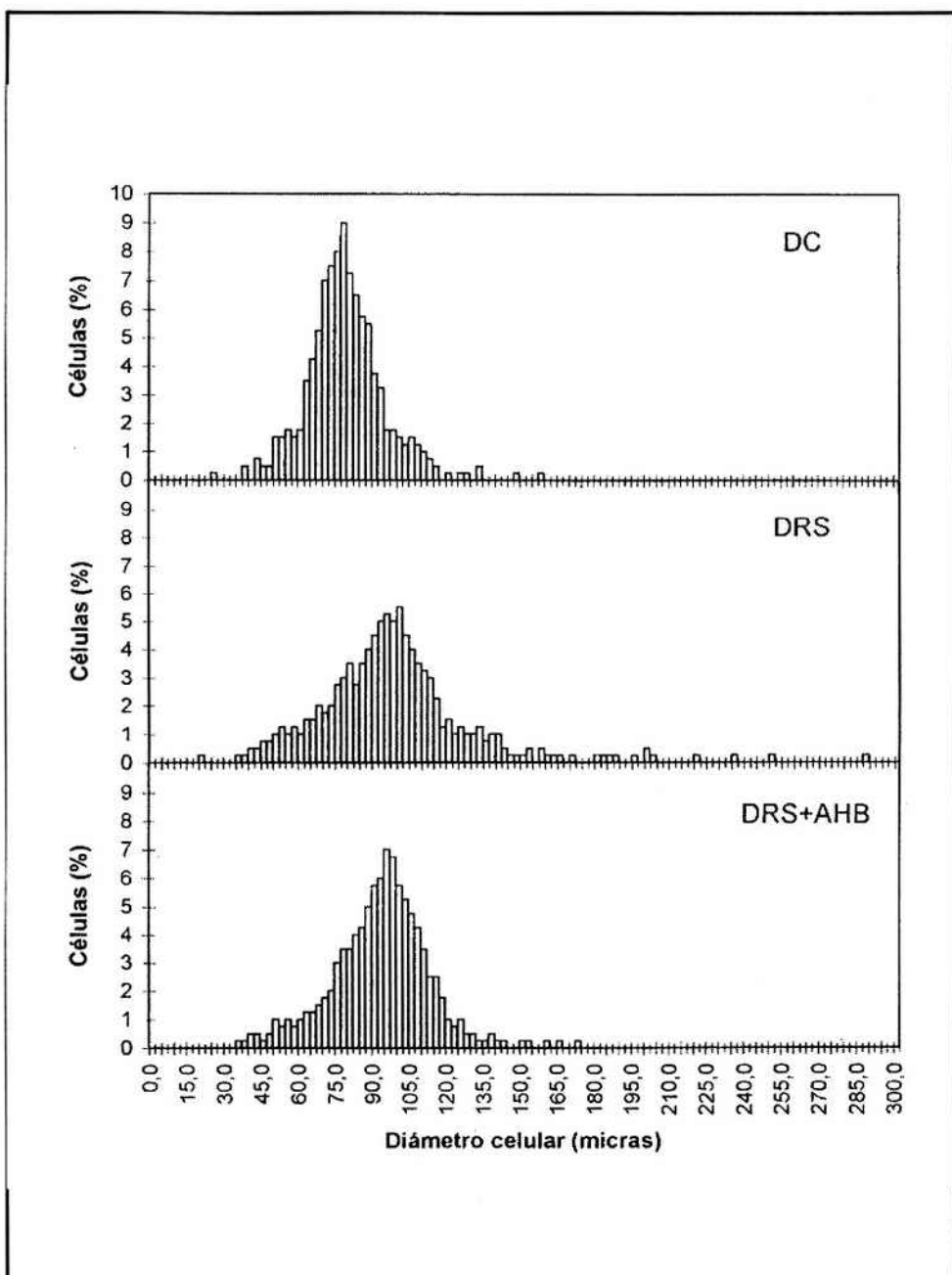
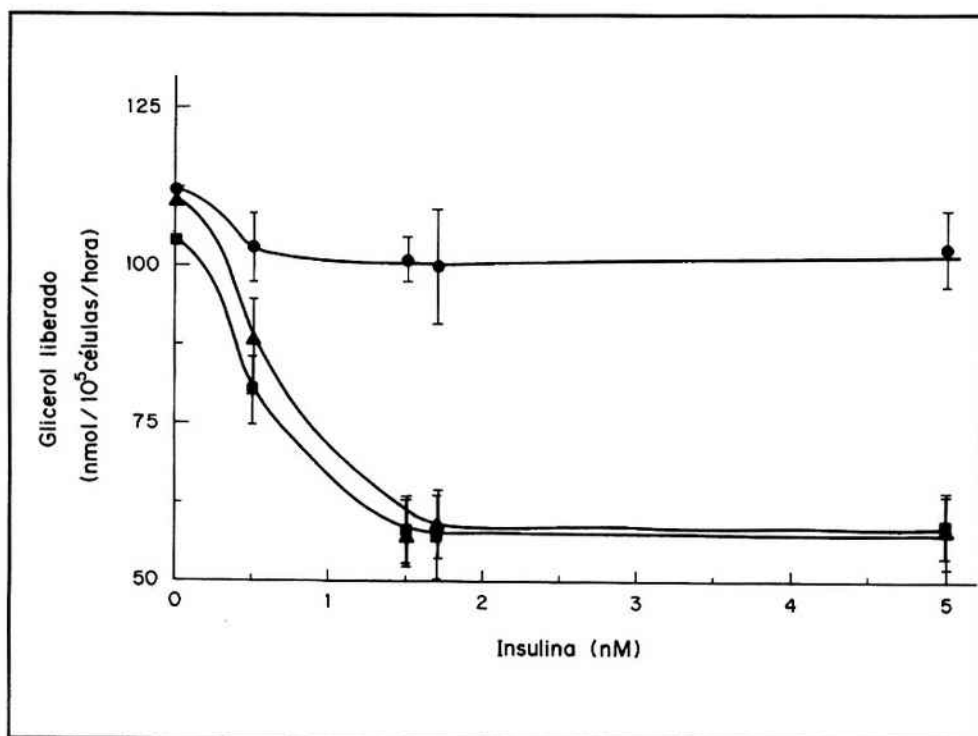


Figura 2. Efecto del incremento en la concentración de insulina sobre la inhibición de la lipólisis estimulada por el isoproterenol en adipocitos aislados de: ■--- DC, ●--- DRS y ▲--- DRS+AHB. Las incubaciones fueron realizadas en presencia de adenosina deaminasa (1U/ml) y representan la media \pm SEM de 4 ratas en cada grupo dietario.



de lípidos del tejido adiposo relacionada con una pérdida completa de la acción antilipolítica de la insulina.

La insulina, a nivel de tejido adiposo juega un rol primordial tanto en la inhibición de la lipólisis como en la conversión de glucosa a lípidos (lipogénesis). Sin embargo diferentes autores han demostrado una disociación de la sensibilidad insulínica "in vitro" sobre ambos efectos, postulando que los mismos estarían regulados por diferentes mecanismos de traducción de señales (33,34).

A pesar de una manifiesta lipólisis basal y reducida actividad antilipolítica de la insulina, las ratas alimentadas con DRS presentan un mayor contenido de triglicéridos en el tejido epididimal al final del período experimental. Una fuente importante de ácidos grasos del tejido adiposo es la que proviene de la hidrólisis de las VLDL-Tg. Hemos demostrado previamente (35) que la hipertrigliceridemia presente en las ratas con DRS no se asocia

con una disminución de la actividad lipoproteínalipasa (LPL) del tejido adiposo (por el contrario es mayor cuando se la expresa por órgano total). Esto nos induce a pensar que la gran disponibilidad de VLDL-Tg en presencia de una actividad LPL normal conduciría -por acción de masas- a una mayor captación de ácidos grasos preformados disponibles para la síntesis de triglicéridos endógenos. En relación a lo expuesto Vrána y col. (36) observaron una mayor incorporación del glicerol -proveniente del metabolismo de la glucosa- a triglicéridos en el tejido adiposo de ratas alimentadas durante cuatro semanas con fructosa. Sin embargo no conocemos al presente información sobre la captación y el metabolismo de la glucosa en el tejido epididimal cuando las ratas son alimentadas por largos períodos de tiempo con DRS (4 o más meses).

Por otro lado, si bien no hemos analizado en este trabajo el comportamiento de las enzimas lipogénicas no podemos descartar su contribución

como otra fuente de ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos endógenos. Al respecto trabajos de Blakely y col. (37) y Cohen y col. (38) demostraron un incremento del contenido de triglicéridos con mayor actividad de las enzimas lipogénicas en este tejido en animales que consumieron DRS por un período de hasta 12 meses.

La mayor sensibilidad insulínica del tejido adiposo "in vitro" en los animales alimentados con AHB se acompaña de una normalización de la glucemia sin modificación de la insulinemia "in vivo". Esto refuerza hallazgos previos (5) donde demostramos una normalización de la resistencia insulínica global "in toto". En relación a estos hallazgos, Vrána y col. (39) mostraron un incremento de la sensibilidad insulínica en adipocitos de ratas alimentadas durante 4 semanas con DRS conteniendo ácidos grasos n-3 y Luo y col. (30) han constatado un incremento tanto en el transporte, la oxidación como en la incorporación de glucosa a lípidos en presencia de insulina en adipocitos de ratas alimentadas por un período corto de tiempo con DRS adicionada de ácidos grasos de origen marino. La mayor sensibilidad insulínica ejercida por los ácidos grasos poliinsaturados n-3 podría explicarse por la incorporación de los mismos en los fosfolípidos de membrana, lo que aumentaría su fluidez y podría conducir a un mejoramiento de la acción insulínica a nivel post-receptor (40).

En conclusión, la administración de dosis relativamente bajas de ácidos grasos poliinsaturados (n-3) (18% de las calorías totales) como fuente de grasa mejora la sensibilidad insulínica a nivel del tejido adiposo epididimal y la homeostasis de la glucosa en este modelo experimental de hipertriglicéridemia y resistencia insulínica.

Agradecimientos

Agradecemos a la Prof. Elena Carreras y al Dpto. de Matemática de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas su valiosa colaboración en el análisis de las poblaciones celulares.

Este trabajo fue realizado en el marco de un Proyecto de Investigación CAI+D 96-98 N° 12/B121. UNL.

Bibliografía

1- Gutman R., Basilio M.Z., Bernal C., Chicco A., Lombardo Y.B. (1987) Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in

rats fed chronically and isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolism* **36**, 11: 1013-1020.

2- Kinsella J.E., Lokesh B., Stone R.A. (1990) Dietary n-3 PUFA and amelioration of cardiovascular disease: Possible mechanisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **52**: 1-28.

3- Leaf A., Weber P.C. (1988) Cardiovascular effect of n-3 fatty acids. *N. Engl. J. Med.* **318**: 549-557.

4- Malasanos T.H., Stacpoole P.W. (1991) Biological effects of w-3 fatty acids in Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* **14**: 1160-1179.

5- Lombardo Y.B., Chicco A., DAlessandro M.E., Martinelli M., Soria A., Gutman R. (1996) Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. *Biochim. Biophys. Acta* **1299**: 175-182.

6- Gibbons G.F. (1990) Assembly and secretion of hepatic very-low-density lipoprotein. *Biochem J.* **268**: 1-13.

7- Randle P.J., Newsholme E.A., 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 muscle. *Biochem J* **93**: 652-665

8- Jenkins A.B., Storlien L.H., Chisholm D.J., Kraegen E.W. (1988) Effects of nonesterified fatty acid availability on tissue specific glucose utilization in rats in vivo. *J.Clin.Invest.* **82**: 293-299.

9- Report of the American Institute of Nutrition ad-hoc Committee on Standards for Nutritional Studies (1977).

10- Second Report of the ad-hoc Committee on Standards for Nutritional Studies (1980).

11- Rodbell M. (1964) Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* **239**, 2: 375-380.

12- Di Girolamo M., Mendlinger S., Fertig J. W. (1971) A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am. J. Physiol.* **221**: 850-858.

13- Khan M.A., Ashman R.S., Heald F.P., Hubbard T.B.Jr (1974) Effects of methodology on estimation of adipose cell size and number in humans. *Nutr. Rep. Int.* **10**: 9-18.

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

15- Sinnott-Smith P. A. and Waddington D. (1992) Size distribution of adipocytes and variation in adipocyte number in lines of mice selected for high or low body fat. *Comp. Biochem. Physiol.* **102A**, 3: 573-578.

16- Reaven G. M., Chang H., Hoffman B.B. (1989) Impaired insulin-mediated inhibition of lipolysis and glucose transport with aging. *Horm. Metabol. Res.* **21**: 168-171.

17- Hoffman B.B., Chang H., Farahbakhsh Z.T., Reaven G.M. (1981) Inhibition of lipolysis by adenosine is potentiated with age. *J. Clin. Invest.* **74** 1750-1755.

18- Reshef J., Shapiro B. (1970) The physiological function and regulation of glycerogenesis in adipose tissue. *Adipose Tissue*

Regulation and Metabolic Functions (Jeanrenaud B. & Hepp D. eds.) G. Thieme Verlag, Stuttgart, Germany: 136-142.

- 19-** Wieland O.: Glycerol - UV Method. (1974) Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer H. U. ed. Verlag Chemie International, Deerfield Beach FL, 3: 1404-1409.
- 20-** Duncombe W.B. (1963) The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids. *Biochem. J.* **88**: 7-10.
- 21-** Bergmeyer H.U. (1974) Methods of enzymatic analysis. 2nd English edn, section D. Methods for determination of metabolites (de) New York, Academic Press, vol I-IV.
- 22-** Herbert V., Lau K.S., Gottlieb C.H., Bleicker S. (1965) Coated charcoal immunoassay of insulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **25**: 1375-1384.
- 23-** Snedecor G.W.P., Cochran W.G. (1967) Statistical Methods Applied to Experimental in Agriculture and Biology. The Iowa State University Press, Ames, I.A.: 339-380.
- 24-** Greedwood M.R.C., Hirsh J. (1974) Postnatal development of adipocyte cellularity in the normal rat. *J. Lip Res* **15**: 474-482.
- 25-** Reiser S., Hallfrish J. (1977) Insulin sensitivity and adipose tissue weight of rats fed starch or sucrose diet ad libitum or in meals. *J. Nutr.* **107**, 147-155.
- 26-** Rizkalla S.W., Helaf Y., Boillot J., Fontvieille A.M., Laromiguere M., Desplanque N., Bruzzo F., Tchobroutsky G., Slama G. (1990). Comparative metabolic effects of 10 weeks feeding of starch, glucose, fructose in normal rats. In: Insulin and the Cell Membrane. Y Klimes, B.V. Howard and CR Kahn (eds) Gordon and Breach Science Publishers, New York pp 432-450.
- 27-** Herberg L., Gries F.A., Hesse-Wortmann C.H. (1970) Effects of weight and cell size on hormone-induced lipolysis in New Zealand obese mice and American obese hyperglycemic mice. *Diabetologia* **6**, 300-305.
- 28-** Shafir E., Trostler N. (1984) Sucrose diet induced enzymatic and hormonal responses affecting carbohydrate, lipid and energy metabolism in two species differing in insulin availability: spiny and ob/ob mice. *Int. J. Biochem.* **16**: 375-382
- 29-** Hill J.O., Peters J.C., Lin D., Yajubu F., Freene H., Swift L. (1993) Lipid accumulation and body fat distribution is influenced by type of dietary fat fed to rats. *Int. J. Obesity* **17**: 223-236.
- 30-** Luo J., Rizkalla S.W., Boillot J., Alamowitch C., Chaib H., Bruzzo F., Desplanque N., Dalix A.M., Durand G., Slama G. (1996) Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids improve adipocyte insulin action and glucose metabolism in insulin-resistant rats: relation to membrane fatty acids. *J. Nutr.* **126**: 1951-1958.
- 31-** Chicco A., Soria A., Lombardo Y.B. (1994) "in vitro" insulin fails to normalize the low activity of PDH complex in perfused heart of rats fed a sucrose-rich diet. International Society for heart research. XV European Section Meeting SH HaunH and K. Kjeldsen (ed) Monduzzi Editore 605-609.
- 32-** Smith U., Cahlin E. and Scherstén T. (1973) Sucrose feeding in man. Effects of lipolysis and antilipolytic action of insulin in the adipose tissue. *Acta Med. Scand.* **194**, 147-150.
- 33-** Rizkalla S.W., Luo J., Guilhem I., Boillot J., Bruzzo F., Chevalier A., Slama G. (1992) Comparative effects of 6 week fructose, dextrose and starch feeding on fat-cell lipolysis in normal rats: effects of isoproterenol, theophylline and insulin. *Mol. Cell. Biochem.* **109**: 127-132.
- 34-** Yki-Järvinen H., Kubo K., Zawadzki J., Lillioja G., Young A., Abbott W., Foley J.E. (1987) Dissociation of in vitro sensitivities of glucose transport and antilipolysis to insulin in NIDDM. *Am. J. Physiol.* **253**: E 300-E 304.
- 35-** Soria A., Chicco A., Lombardo Y.B. (1996) Effects of a sucrose-rich diet on morphological and functional aspects of rat adipose tissue. VIII PABMB Congress (The Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology) **4**: pp. 334.
- 36-** Vrána A., Fabry P., Kazdova L. (1973) Effect of dietary fructose on fatty acid synthesis in adipose tissue and on triglyceride concentration in blood in the rat. *Nutr. Metab.* **15**: 305-313.
- 37-** Blakely S.H., Hallfrish Y., Reiser S. (1982) Long-term effects of moderate fructose feeding on lipogenic parameters in Wistar rats. *Nutr. Rep. Int.* **25**: 675-685.
- 38-** Cohen A.M., Briller S., Shafir E. (1972) Effect of long-term sucrose feeding on the activity of some enzymes regulating glycolysis, lipogenesis and gluconeogenesis in rat liver and adipose tissue. **279**: 129-138.
- 39-** Vrana A., Zak A., Kazdova L. (1988) Inhibition of sucrose induced hypertriglyceridemia and increase of the adipose tissue insulin response by dietary n-3 fatty acids in the rat. *Nutr. Rep. Int.* **38**: 687-690.
- 40-** Popp-Snijders C., Schouten J.A., Heine R.J., Van der Meer E. A. (1987) Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Res* **4**:141-147.