

Niveles moderados de aceite de pescado dietario disminuyen la adiposidad y revierten la resistencia insulínica en ratas dislipémicas

Soria, A.; Rossi, A.; Lombardo, Y.B.; Chicco, A.

Departamento de Ciencias Biológicas, Cátedra de Química Biológica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria Paraje El Pozo. CC 242. (3000) Santa Fe.

RESUMEN: El objetivo del presente trabajo fue evaluar los posibles efectos benéficos de los ácidos grasos polinsaturados n-3 de origen marino sobre el incremento en la adiposidad y la resistencia insulínica desarrollados en ratas por la ingesta crónica de dieta rica en sacarosa (DRS). Luego de consumir 7 meses esa dieta, los animales se dividieron en dos subgrupos, uno continuó con la DRS hasta los 9 meses y el otro consumió la DRS donde se substituyó la fuente de grasa (aceite de maíz por aceite de hígado de bacalao, rico en ácidos grasos n-3) (DRS+AHB) durante los dos meses siguientes. En cada grupo se estudió: 1- composición corporal; 2- características morfológicas (peso, distribución y tamaño de la población celular) del tejido adiposo epididimal; y 3- sensibilidad insulínica periférica. Los resultados fueron comparados con los de animales alimentados durante 9 meses con dieta control (DC). La administración de AHB disminuyó el contenido graso corporal, la adiposidad, mejorando los parámetros morfológicos alterados del tejido adiposo epididimal. La asociación de estos resultados con la normalización de la dislipemia presente en los animales alimentados con DRS, contribuiría en este modelo experimental, a la reversión de la resistencia insulínica.

Palabras clave: dieta rica en sacarosa, aceite de pescado, adiposidad, resistencia insulínica.

SUMMARY: Moderate levels of dietary fish oil decrease adiposity and reverse insulin resistance in dyslipemic rats. Soria A., Rossi A., Lombardo Y.B, Chicco A. The aim of the present work was to evaluate the potential beneficial effect of the fish oil n-3 polyunsaturated fatty acid on the adiposity and peripheral insulin resistance induced in rats by chronic administration of sucrose (SRD). To achieve this goal male Wistar rats were fed the SRD during 7 months. After that, one half continued on the SRD up to 9 months. The other half received an SRD in which the source of fat was substituted by cod liver oil (CLO, rich in n-3 fatty acids) for another 2 months. At the end of the experimental period we analyzed: carcass composition; 2- epididimal adipose tissue morphology (weight, cells size and distribution) and 3- peripheral insulin sensitivity. The results were compared with those of the control rats feeding with a standard semi-synthetic diet (CD) throughout the experimental period. The results show a normalization of the fat carcass, the adiposity, and the morphological aspects of the adipose tissue. It seems that these results associated with the amelioration of dislipidemia present in rats chronically fed a SRD could contribute to the reversion of the insulin resistance in this experimental animal model.

Key words: sucrose-rich diet; fish oil; adiposity; insulin resistance.

* **Correspondencia:**

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

Este trabajo fue realizado en el marco de un Proyecto de Investigación CAI+D 2002-2005, N° 17-112

Introducción

En las últimas décadas se ha desarrollado un creciente interés en el estudio de los ácidos grasos polinsaturados de origen marino (n-3) debido a que resultados de diferentes investigaciones demostraron, entre otras, una acción beneficiosa de los mismos en dislipidemias asociadas o no a intolerancia a la glucosa (1). Los ácidos grasos polinsaturados de la serie n-3 [ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 n-3) y docosahexaenoico (DHA, 22:6 n-3)] reducen significativamente los niveles plasmáticos de los triglicéridos y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en animales de experimentación y en humanos normo o hipertriglicéridémicos (1,2). Estos efectos se relacionarían tanto con la represión de la expresión génica de enzimas involucradas en la síntesis hepática de lípidos como con la inducción de aquellas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos, actuando posiblemente a través de receptores activados por proliferadores peroxisomales - PPARs-) (3). Estudios de Popp-Snijders y col. (4) y Storlien y col. (5) sugieren un efecto beneficioso del consumo de aceite de pescado (rico en n-3) sobre la resistencia insulínica en pacientes diabéticos tipo II y en animales de experimentación insulino-resistentes. Distintos trabajos experimentales han demostrado que la administración de este tipo de ácidos grasos conjuntamente con dietas ricas en grasa o sacarosa por períodos cortos de tiempo (3-6 semanas) previene el desarrollo de resistencia insulínica e hipertriglicéridemia (6-8).

Es bien aceptado que anomalías del metabolismo lipídico pueden alterar la acción insulínica. Al respecto, trabajos de nuestro grupo (9,10) demostraron que ratas normales alimentadas crónicamente (30-40 semanas) con una dieta rica en sacarosa (DRS) desarrollan dislipemia (niveles elevados de triglicéridos y AGNE plasmáticos), resistencia insulínica periférica global, moderada hiperglucemia y normoinsulinemia. Estas alteraciones se acompañan de un moderado incremento del peso corporal e hipertrofia del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal. En estos animales la administración de aceite de hígado de bacalao (AHB) como fuente de grasa dietaria durante las últimas 8 semanas de ingesta normalizó la homeostasis de la glucosa y la dislipidemia (11).

El tejido adiposo es un tejido clave a la acción insulínica, sin embargo actualmente, pocos estudios analizan en modelos experimentales de resistencia insulínica el efecto de los ácidos grasos n-3 dietarios sobre aspectos morfológicos y metabólicos del tejido adiposo y su posible contribución al mejoramiento y/o normalización de la homeostasis de la glucosa y la insensibilidad insulínica (2,8,12,13). El propósito del presente trabajo fue estudiar los efectos del aceite de hígado de bacalao sobre la adiposidad y la resistencia insulínica en ratas alimentadas crónicamente (9 meses) con DRS en las cuales se sustituyó parcial e isocalóricamente el tipo de grasa dietaria (aceite de maíz por AHB) durante los 2 últimos meses de ingesta. Para alcanzar este objetivo, se determinaron:

- 1- composición corporal;
- 2- características morfológicas del tejido adiposo epididimal;
- 3- sensibilidad insulínica periférica mediante estudio de la clamp euglucémica-hiperinsulinémica.

Materiales y métodos

Animales y dietas

Se utilizaron ratas Wistar machos provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Buenos Aires, Argentina, con un peso inicial de 180-200 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y humedad controladas, con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (7-19 h) y tuvieron libre acceso al agua y a una dieta estándar comercial de laboratorio (Ralston Purina, St. Louis, MO, USA). Luego de una semana de aclimatación, las ratas fueron divididas al azar en dos grupos. El grupo experimental recibió una dieta rica en sacarosa (fuente de hidratos de carbono: sacarosa 62,5 g/100g) (DRS) durante 7 meses, finalizado este período los animales se subdividieron en forma aleatoria en dos subgrupos. El primer subgrupo continuó con la DRS hasta completar los 9 meses de ingesta. El segundo subgrupo recibió a partir del séptimo y hasta el noveno mes una DRS en donde la fuente grasa (aceite de maíz 8g/100g) fue reemplazada por aceite de hígado de bacalao (AHB) (7g/100g) adicionado de aceite de maíz (1g/100g). El grupo control recibió una dieta control (fuente de hidrato de carbono: almidón 62,5 g/100g) (DC) a lo largo de

toda la experiencia. En las dietas DRS sin aceite de pescado y DC se equiparó el contenido de colesterol y vitaminas A y D presentes en el AHB (Tabla 1). Las dietas fueron isoenergéticas, proveyendo aproximadamente 16,3 kJ/g de comida y se administraron ad libitum. Las dietas se prepararon diariamente adicionando los aceites a una mezcla base que contenía los otros nutrientes. Los aceites y la mezcla base se almacenaron separadamente a 4°C hasta la preparación de las dietas. La composición de ácidos grasos de los aceites fue analizada por cromatografía gaseosa capilar como se describió previamente (2). El peso de cada animal fue registrado dos veces por semana durante el transcurso de la experiencia. Se determinaron las ingestas energéticas y las ganancias de peso individuales de las ratas pertenecientes a los distintos grupos dietarios.

Finalizados los 9 meses de experimentación, el alimento fue removido al finalizar el período de oscuridad (7 h) y los diferentes ensayos fueron llevados a cabo entre las 9 y las 12 h, exceptuando los casos en que se indique otra metodología.

Métodos analíticos

Seis ratas de cada grupo dietario fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso corporal). Las muestras de sangre obtenidas de la vena cava inferior fueron recolectadas en presencia o ausencia de anticoagulante, según el ensayo a realizar, y centrifugadas a 3500 x g durante 15 minutos a 4°C. El plasma o suero obtenido se procesó inmediatamente o fue almacenado a -20°C hasta su utilización dentro de los tres días posteriores a la toma de muestra. El hígado y los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal fueron completamente removidos y pesados. Los niveles plasmáticos de triglicéridos, ácidos grasos libres (AGNE) y glucosa fueron cuantificados por métodos espectrofotométricos. La insulina plasmática fue dosada mediante ensayo inmunorreactivo según se describió previamente (10) utilizando un estándar de insulina de rata (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca). El contenido de triglicérido hepático fue determinado en alícuotas de tejido hepático pulverizado, congelado y conservado a -80°C (2).

Composición de la carcasa

Seis ratas de cada grupo dietario, anestesiadas como se describió anteriormente, fueron rasuradas completamente. Luego se les practicó una incisión abdominal y se procedió a la remoción de las vísceras. Las carcasas fueron pesadas, colocadas en recipientes plásticos y congeladas a -20°C. Posteriormente fueron trituradas a la temperatura del nitrógeno líquido hasta obtener una mezcla homogénea. Las mismas fueron almacenadas a -20°C hasta la determinación de su composición. La determinación del contenido de agua se evaluó deshidratando aproximadamente 10 g de muestra en una estufa de secado a 75-80°C durante 24 horas, calculando por diferencia de peso el contenido acuoso de la muestra. La carcasa deshidratada fue utilizada para la determinación de la grasa extraíble con éter (14). El contenido de proteínas fue estimado realizando una cuantificación del nitrógeno contenido en 2 g de carcasa molida no deshidratada por el método de Kjeldahl (14). Las cenizas fueron determinadas incinerando en mufla alrededor de 1 g de carcasa molida deshidratada (14).

Clamp euglucémica-hiperinsulinémica

Se determinó la sensibilidad insulínica periférica global utilizando la técnica de la clamp euglucémica-hiperinsulinémica de acuerdo con la metodología previamente descrita (15). En síntesis, seis ratas ayunadas durante 5 horas de los distintos grupos dietarios fueron anestesiadas, extrayéndose muestras de sangre en las que se cuantificaron los niveles de glucosa e insulina. Luego se les administró insulina porcina neutra altamente purificada (Actrapid, Novo Nordisk) a velocidad constante (0,8 U/(kg.hora)) durante 2 horas. La glucemia fue mantenida en su nivel basal infundiendo una solución de glucosa (200 g/L) a velocidad variable. La concentración de glucosa en sangre se determinó en forma electrónica (Glucometer Analyser, Boehringer Mannheim, Indianápolis; IN, USA) dentro de los 2 minutos posteriores a la extracción de la muestra. Los niveles de insulina se evaluaron en alícuotas de sangre (0,3 mL) obtenidas a los 60, 90 y 120 minutos. La velocidad de infusión de la glucosa (VIG) en el estado estacionario (segunda hora de la clamp), considerada como la velocidad de captación

periférica global de la glucosa, se expresó como mg de glucosa/(kg.minuto).

Aislamiento de adipocitos

El tejido adiposo epididimal fue lavado con solución salina isotónica a 37°C: Los adipocitos fueron aislados de acuerdo con el método de Rodbell (16), utilizado con menores modificaciones por Soria y col (12). Brevemente, el tejido graso fue troceado e incubado en buffer Krebs-Henseleit fosfato (pH=7,4) adicionado de Ca^{+2} 1,25 mmol/L, glucosa 5,5 mmol/L, albúmina sérica bovina fracción V (esencialmente libre de ácidos grasos) 40 mg/mL y 1-2 mg/g de tejido de colagenasa cruda (*Clostridium histolyticum*) durante 1 hora a 37°C. Finalizada la incubación, los adipocitos fueron filtrados cuidadosamente a través de una malla de nylon de 200 mesh para remover el estroma y los vasos sanguíneos, lavados tres veces en buffer Krebs-Henseleit fosfato sin colagenasa, y separados de la solución de lavado infranadante mediante centrifugación a baja velocidad (1 minuto a 400xg). Finalmente, las células fueron resuspendidas en buffer Krebs-Henseleit fosfato libre de colagenasa y mantenidas a 37°C.

Determinación del tamaño y contenido de triglicéridos celular

Los diámetros celulares se midieron de acuerdo con el método propuesto por Di Girolamo y col. (17). La medición de 100 células obtenidas de cada tejido graso fue realizada por un único operador de acuerdo a Khan y col. (18). El diámetro y el volumen promedio correspondientes a una población celular individual fueron calculados en base a la distribución de los diámetros agrupados en intervalos de 2,5 μ m (17). La construcción del histograma de diámetros celulares que representa a cada grupo experimental se realizó tratando el número de individuos pertenecientes a cada intervalo de clase como única variable. El contenido lipídico del adipocito fue calculado a partir del volumen celular promedio asumiendo una densidad lipídica intracelular de 0,915 (densidad de la trioleína) (17).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \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 (19). Valores de $p < 0,05$ fueron consideradas estadísticamente significativos.

Resultados

Incremento de peso corporal e ingesta calórica:

La ingesta calórica y el peso corporal fueron cuidadosamente monitoreados en todos los grupos dietarios a lo largo del período experimental. Como hemos constatado en trabajos previos (10,15) en la Tabla 2 observamos un significativo aumento ($p < 0,05$) en el peso corporal (18%) y la ingesta calórica en los animales alimentados con DRS durante 9 meses cuando se los comparó con animales alimentados con DC. En el grupo de animales donde el aceite de hígado bacalao (AHB) reemplazó al aceite de maíz (AM) en la DRS desde los 7 hasta los 9 meses se observa una moderada reducción de la ganancia de peso comparado tanto con los animales alimentados con DRS o DC.

Composición de la carcasa

Los animales alimentados con DRS mostraron un significativo aumento en el peso de la carcasa cuando se compararon con los alimentados con DC (Tabla 3). Esto fue acompañado por un incremento en el contenido de grasa expresado tanto en forma absoluta como relativa, mientras que el contenido de agua de la carcasa sólo disminuye cuando es expresado como porcentaje del peso húmedo. En las ratas pertenecientes al grupo DRS+AHB, el peso de la carcasa se redujo ligeramente y el contenido de agua fue mayor, alcanzando valores similares a los observados en ratas alimentadas con DC, en tanto que la cantidad de grasa disminuyó significativamente ($p < 0,05$) aún cuando el contenido lipídico continuó siendo superior al observado en los controles alimentados con DC (Tabla 3). El contenido de proteínas y cenizas fue similar en todos los grupos dietarios.

Metabolitos plasmáticos, contenido hepático de triglicéridos y sensibilidad insulínica

En forma similar a lo constatado en trabajos previos (2,13), en la Tabla 4 observamos que al finalizar el período de ingesta los niveles plasmáticos de triglicéridos, glucosa y AGNE de las ratas alimenta-

das con DRS fueron significativamente más altos que los de los animales de igual sexo y edad alimentados con DC. La sustitución de la fuente grasa de la dieta (AM por AHB) durante 2 meses normalizó todos los metabolitos previamente descritos. La insulinemia no se modificó en ninguno de los lotes. La concentración de triglicéridos hepáticos en los diferentes grupos dietarios fue la siguiente ($\mu\text{mol/g}$, promedio \pm SEM, $n=6$): $12,0 \pm 0,7$ en DC; $23,2 \pm 2,2$ en DRS; $9,4 \pm 0,6$ en DRS+AHB ($p < 0,05$ DRS vs DC y DRS+AHB). Como indican estos resultados, el elevado contenido lipídico presente en las ratas alimentadas con DRS se normalizó completamente en los animales alimentados con DRS + AHB.

El efecto de la sustitución del tipo de ácidos grasos dietarios sobre la sensibilidad insulínica periférica fue analizado por medio de la clamp euglicémica hiperinsulinémica. La concentración de glucosa plasmática en los diferentes grupos dietarios al inicio de la clamp, luego de 5 horas de ayuno, fue la siguiente (promedio \pm SEM, $n=6$) (mmol/L): $5,30 \pm 0,08$ en DC; $7,85 \pm 0,15$ en DRS; $5,38 \pm 0,15$ en DRS+AHB. Los niveles de insulina fueron semejantes a los descritos al final del período de oscuridad (datos no mostrados). La velocidad de infusión de glucosa (VIG), que mide la acción insulínica "in vivo", fue significativamente menor ($p < 0,05$) en el grupo DRS cuando se comparó con sus respectivos controles etarios alimentados con DC. Cuando se sustituyó la grasa de la dieta (grupo DRS + AHB) se constató una completa normalización de este parámetro (Tabla 4). Los hematocritos realizados al iniciar y al finalizar la clamp no mostraron diferencias en ninguno de los animales estudiados.

Morfología del tejido adiposo y contenido de triglicéridos celular

En los animales alimentados con DRS se observó un incremento del peso tanto absoluto (g) como relativo (g/100 g rata) de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal (Tabla 5). Las células del tejido adiposo epididimal de las ratas alimentadas con DRS incrementaron su tamaño y contenido de triglicéridos significativamente ($p < 0,05$) alcanzando valores que duplicaron a los observados en el lote de ratas alimentadas con DC. La presencia del AHB en la dieta promovió una reducción en el peso de los tejidos adiposos estudiados, en tanto que se

observó una disminución en el volumen y contenido lipídico de los adipocitos aislados. Sin embargo, todos estos parámetros son aún significativamente mayores a los observados en el lote alimentado con DC.

Distribución del tamaño celular en el tejido adiposo epididimal

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 animales del grupo DRS se constató un claro desplazamiento de los diámetros celulares hacia la derecha, con un incremento significativo del diámetro celular medio comparado al de los animales controles. Por su parte la sustitución de AM por AHB (DRS + AHB) bajo nuestras condiciones experimentales condujo a una significativa reducción del diámetro celular medio, con un histograma de distribución que se aproxima al del grupo DC.

Discusión

El presente trabajo analiza el efecto de los ácidos grasos n-3 presentes en el aceite de hígado de bacalao sobre la reversión y/o mejoramiento de la adiposidad y la sensibilidad insulínica en ratas dislipémicas insulino-resistentes. Los resultados obtenidos indican que la administración de aceite de hígado de bacalao (AHB) induce: 1- disminución significativa en el contenido de grasa de la carcasa y en la adiposidad; y 2- reducción de la hipertrofia celular asociada a una mejora en la distribución alterada de los tamaños celulares en el tejido adiposo epididimal. Todos estos hallazgos se acompañan de una normalización en los niveles de lípidos circulantes (AGNE y triglicéridos), la homeostasis de la glucosa y la resistencia insulínica. Estos cambios fueron obtenidos sustituyendo durante los 2 últimos meses de ingesta la fuente de grasa dietaria (aceite de maíz por aceite e hígado de bacalao) en animales alimentados crónicamente (9 meses) con dieta rica en sacarosa (DRS).

Los cambios en la masa del tejido adiposo pueden ser atribuidos a la diferencia entre ingesta calórica y gasto energético. La administración de AHB condujo a una reducción significativa del peso de los

tejidos epididimal y retroperitoneal acompañado de una disminución en el contenido graso de la carcasa. La ganancia de peso en estos animales es menor que en el lote alimentado con DRS aún cuando la ingesta calórica fue similar. Al respecto, trabajos de Jandacek y col. (20) y Jones y col. (21) sugieren que la habilidad de los ácidos grasos n-3 de cadena larga en reducir la ganancia de peso y la masa del tejido adiposo estaría relacionada con su mayor propensión a ser oxidados. Más, aún Neschen y col. (22) demostraron en ratas alimentadas con aceite de pescado que la mayor capacidad oxidativa hepática de los ácidos grasos se relaciona con la posibilidad de los ácidos grasos n-3 de actuar como ligandos activadores de los PPAR α y de este modo inducir la transcripción de diferentes genes que codifican enzimas relacionadas a la oxidación de los ácidos grasos. En concordancia con esto, hemos observado un menor contenido de triglicéridos en el tejido hepático en los animales alimentados con DRS+AHB.

Es un hecho bien demostrado el incremento de la lipogénesis hepática en los animales alimentados con dieta rica en sacarosa. Los ácidos grasos n-3 polinosaturados inhiben la lipogénesis hepática actuando sobre los ARNm que codifican las enzimas involucradas en dicha vía metabólica así como también sobre algunas enzimas claves de la vía del metabolismo de la glucosa, tales como: acetil-CoA carboxilasa, FAS, G-6-PDH y LPK (3). Esta acción de los n-3 favorecería la reversión de la hipertriglicéridemia inducida por ingesta crónica de sacarosa en los animales alimentados con AHB. Este mecanismo, a su vez, podría estar involucrado en la reducción del contenido de triglicéridos en el tejido adiposo epididimal observado luego de la sustitución del tipo de ácidos grasos de la dieta. Más aún, en el grupo DRS+AHB el volumen de las células adiposas es menor que el observado en el grupo alimentado con DRS y la distribución del diámetro celular tiende ser similar a la del grupo DC. En el tejido adiposo los n-3 polinosaturados (20:5 y 22:6 n-3) se unen y activan la expresión de los PPAR γ los que actuando como factores de transcripción claves en la adipogénesis, inducen una continua remodelación de este tejido (23). Al respecto, Luo y col. (24) demostraron que los adipocitos de ratas alimentadas durante 3 semanas con DRS+AHB son

más pequeños y sensibles a la acción insulínica que los provenientes de animales alimentados con DRS durante el mismo período de tiempo.

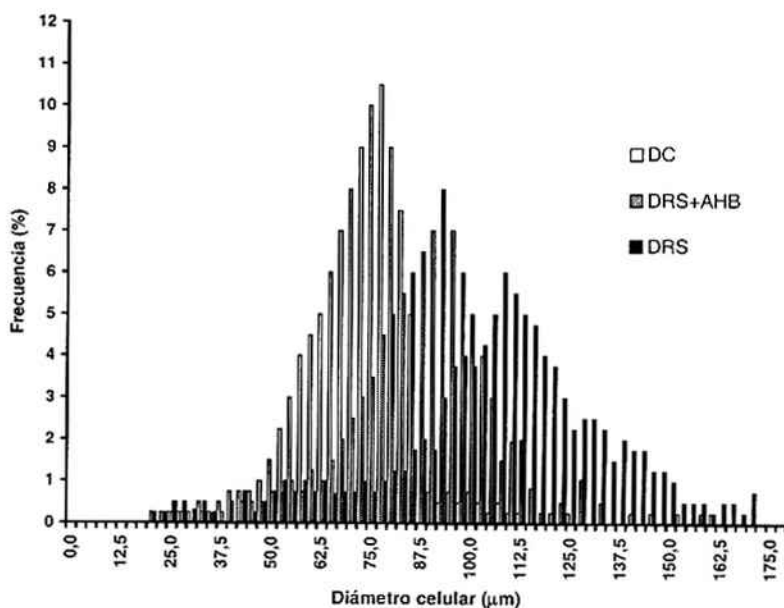
El tejido adiposo es un tejido clave en la provisión de ácidos grasos al resto de los tejidos corporales. Los ácidos grasos libres plasmáticos ejercen un importante efecto modulador sobre la acción insulínica (25). Los resultados del presente trabajo muestran una normalización de los niveles plasmáticos de AGNE que acompaña la reversión de la resistencia insulínica pre-existente en los animales alimentados crónicamente con DRS. La restauración a valores normales de la glucemia sin modificación de la insulinemia fue previamente observado en ratas alimentadas con DRS por períodos menores de tiempo (2). Por otro lado, Podolin y col (8) demostraron recientemente que usando aceite de lacha (*brevoortia tyrannus*) (6% de calorías) no se corrige la resistencia insulínica inducida por una dieta rica en la sacarosa. Las discrepancias entre el presente trabajo y lo observado por Podolin y col. se relacionarían con variaciones en la cantidad de aceite presente en la dieta (16 vs 6% calorías) y la relación entre ácidos grasos polinosaturados/saturados de ambos aceites (1,23 para el AHB vs 0,878 para el aceite de lacha), lo que podría determinar la diferente efectividad del aceite de pescado en el reestablecimiento de la sensibilidad periférica global de la insulina.

Los posibles mecanismos implicados en los efectos de los aceites de pescado sobre la acción insulínica no están aún completamente esclarecidos. Se sabe que los n-3 dietarios inducen en forma rápida cambios en los ácidos grasos constituyentes de los fosfolípidos de membrana en tejidos claves a la acción insulínica (músculo, tejido adiposo, etc). Esto conduciría a cambios en la secreción y acción biológica de la insulina, involucrando la fluidez de las membranas, a los diacilgliceroles en su función como segundos mensajeros (26), etc.. Si bien en el presente trabajo no fue analizado, es posible que cambios en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas del tejido adiposo, extensivos a las membranas de otros tejidos blancos a la acción de la insulina (músculo esquelético), puedan contribuir a restaurar la sensibilidad a esta hormona.

Finalmente los resultados del presente trabajo muestran claramente en este modelo experimental que la administración de aceite de pescado reduce

la adiposidad e hipertrofia celular y normaliza la dislipidemia contribuyendo a la reversión de la resistencia insulínica .

Figura 1. Histograma de la distribución promedio de los diámetros de adipocitos epididimales de ratas alimentadas con dieta control (DC) (0-9 meses), dieta rica en sacarosa (DRS) (0-9 meses) o DRS (0-9 meses) + aceite de hígado de bacalo (DRS+AHB) (7-9 meses).



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.

Tabla 1. Composición de las dietas experimentales¹

Ingredientes	Dieta Control		Dieta Rica en Sacarosa		Dieta Rica en Sacarosa + Aceite de Hígado de Bacalao	
	% en peso	% en calorías	% en peso	% en calorías	% en peso	% en calorías
Caseína libre de vitaminas	17.0	17.5	17.0	17.5	17.0	17.5
Mezcla de sales ²	3.5		3.5	1.0	3.5	
Mezcla de vitaminas ³	1.0		0.2		1.0	
Cloruro de colina	0.2		0.3		0.2	
Metionina	0.3		7.5		0.3	
Celulosa	7.5				7.5	
Almidón de maíz	62.5	64.0				
Sacarosa			62.5	64.0	62.5	64.0
Aceite de maíz	8.0	18.5	8.0	18.5	1.0	2.3
Aceite hígado bacalao					7.0	16.2

1- Las dietas se basan en la dieta AIN-93M.

2- Mezcla de sales basada en la mezcla AIN-93M-Mx (g/kg de dieta): carbonato de calcio 357,0; fosfato monobásico de potasio 250,0; cloruro de sodio 74,0; sulfato de potasio 46,6; citrato de potasio (monohidratado) 28,0; óxido de magnesio 24,0; citrato férrico 6,06; carbonato de zinc 1,65; carbonato de manganeso 0,63; carbonato cúprico 0,30; iodato de potasio 0,01; selenito de sodio 0,01025; p-molibdato de amonio 0,00795; sulfato crómico potásico 0,2174.

3- Mezcla de vitaminas basada en la mezcla AIN-93M-Vx (g/kg de dieta): niacina 3,000; pantotenato de calcio 1,600; clorhidrato de piridoxina 0,700; clorhidrato de tiamina 0,600; riboflavina 0,600; ácido fólico 0,200; d-biotina 0,020; vitamina B-12 2,500; vitamina E (500 IU/g) 15,00; vitamina A (500.000 IU/g) 0,800; vitamina D3 (400.000 IU) 0,250; vitamina K 0,075.

Tabla 2: Peso corporal, ganancia de peso e ingesta calórica de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS+AHB)

Periodo de ingesta: 0 a 7 meses				Periodo de ingesta: 7 a 9 meses			
Dieta	Peso corporal inicial	Peso corporal final	Ingesta calórica	Dieta	Peso corporal inicial	Peso corporal final	Ingesta calórica
	g	g	kJ/día		g	g	kJ/día
DC (n=8)	181.3 ± 5.7	407.0 ± 20.1 ^a	281.5 ± 20.4 ^a	DC (n=8)	407.0 ± 20.1 ^a	442.5 ± 10.0 ^a	278.6 ± 10.4 ^a
DRS (n=16)	190.3 ± 1.0	475.4 ± 9.8 ^b	351.2 ± 16.5 ^b	DRS (n=8)	482.1 ± 13.0 ^b	513.1 ± 19.0 ^b	345.2 ± 19.5 ^b
				DRS+AHB (n=8)	471.4 ± 11.2 ^b	487.3 ± 6.4 ^a	330.0 ± 11.3 ^b

Los valores se expresan como promedio ± SEM. (n) indica el número de animales utilizado en cada experiencia. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ($p < 0.05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

Tabla 3: Peso y composición de la carcasa de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS+AHB).

	DC (0-9 meses)	DRS (0-9 meses)	DRS (0-9 meses) + AHB (7-9 meses)
<i>Carcasa</i>			
(g)	339.1 ± 5.9 ^a	410.0 ± 19.9 ^b	368.1 ± 11.5 ^b
<i>Proteína</i>			
(% peso húmedo)	20.6 ± 0.3 ^a	19.2 ± 0.4 ^a	19.2 ± 0.5 ^a
(g)	69.9 ± 2.8 ^a	76.5 ± 3.4 ^a	70.2 ± 1.8 ^a
<i>Grasa</i>			
(% peso húmedo)	13.1 ± 0.5 ^a	24.6 ± 1.7 ^b	19.0 ± 1.4 ^c
(g)	44.5 ± 3.3 ^a	102.3 ± 9.9 ^b	69.8 ± 7.4 ^c
<i>Agua</i>			
(% peso húmedo)	60.2 ± 1.8 ^a	54.5 ± 1.4 ^b	58.4 ± 0.9 ^a
(g)	203 ± 5.6 ^a	214 ± 6.4 ^a	214 ± 4.4 ^a
<i>Cenizas</i>			
(% peso húmedo)	4.1 ± 0.2 ^a	3.5 ± 0.5 ^a	3.5 ± 0.2 ^a
(g)	14.7 ± 0.3 ^a	14.5 ± 1.4 ^a	13.4 ± 0.2 ^a

Los valores se expresan como promedio ± SEM. Seis animales fueron incluidos en cada grupo experimental. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ($p < 0.05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

Tabla 4: Niveles plasmáticos de metabolitos, insulinemia y velocidad de infusión de glucosa (VIG) en animales alimentado con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB).

Dieta	Triglicéridos	Acidos grasos libres	Glucosa	Insulina	VIG
	mmol/L	μmol/L	mmol/L	pmol/L	mg/(kg . min)
DC (0-9 meses)	0.51 ± 0.09 ^a	344.0 ± 31.2 ^a	6.50 ± 0.08 ^a	380.2 ± 26.8 ^a	10.8 ± 0.9 ^a
DRS (0-9 meses)	2.57 ± 0.04 ^b	884.5 ± 52.4 ^b	8.80 ± 0.15 ^b	368.0 ± 40.5 ^a	4.6 ± 0.5 ^b
DRS (0-9 meses) + AHB (7-9meses)	0.60 ± 0.03 ^a	330.0 ± 44.3 ^a	6.60 ± 0.20 ^a	375.0 ± 29 ^a	11.3 ± 0.8 ^a

Los valores se expresan como promedio ± SEM. Seis animales fueron incluidos en cada grupo experimental. Los valores en cada columna que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ($p < 0.05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

Tabla 5: Peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal, volumen celular y contenido de triglicéridos de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS + aceite de hígado de bacalao (DRS + AHB).

	DC (0-9 meses)	DRS (0-9 meses)	DRS (0-9 meses) + AHB (7-9 meses)
<i>Grasa epididimal</i>			
Peso total (g)	7.35 ± 0.79 ^a	14.40 ± 0.92 ^b	10.83 ± 0.44 ^c
Peso relativo (g/100g peso corporal)	1.67 ± 0.12 ^a	2.91 ± 0.19 ^b	2.15 ± 0.06 ^c
Volúmen celular (pl)	263.5 ± 16.6 ^a	497.2 ± 11.2 ^b	358.5 ± 20.3 ^c
Triglicéridos (nmol/célula)	0.30 ± 0.02 ^a	0.59 ± 0.04 ^b	0.44 ± 0.02 ^c
<i>Grasa retroperitoneal</i>			
Peso total (g)	6.17 ± 0.35 ^a	13.75 ± 1.03 ^b	10.01 ± 0.53 ^c
Peso relativo (g/100g peso corporal)	1.25 ± 0.15 ^a	2.77 ± 0.20 ^b	2.09 ± 0.07 ^c

Los valores se expresan como promedio ± SEM. Seis animales fueron incluidos en cada grupo experimental. Los valores en cada fila que no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferentes ($p < 0.05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

Bibliografía

1- Connor W.E., De Francesco C.A., Connor S.L. (1983) N-3 fatty acids from fish oil: effects on plasma lipoproteins and hypertriglyceridemic patients. In *Annals of the New York Academy of Sciences: Dietary Lipids and Insulin Action*. Second International Smolenice Insulin Symposium (Klimes I., Howard B.B., Storlien L.H. and Sebokova E., eds). Vol 683, pp 16-34, New York Academy of Sciences, New York, NY.

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

3- Jump D.B., Clarke S.D. (1999) Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.* **19**: 63-90.

4- Popp-Snijders C., Schouten J.A., Heine R.J., VanDer Veer J., VanDer MeeR E.A. (1987) Dietary supplementation of w-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Res.* **4**: 141-147.

5- Storlien L.H., Jenkins AB., Chisholm D.J., Pascoe W.S., Khouri S., Kraegen E.W. (1991) Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats:

relationship to muscle triglycerides and n-3 fatty acids in muscle phospholipids. *Diabetes* **40**: 280-289.

6- Storlien L.H., Kraegen E.W., Chisholm D.J., Ford G.L., Bruce D.G., Pascoe W.S. (1987) Fish oil prevents insulin resistance induced by high fat feeding in rats. *Science* **237** : 885-888.

7- Vrana A., Kazdova L. Effects of dietary sucrose or fructose on carbohydrate and lipid metabolism. (1986) *Prog. Biochem. Pharmacol.* **21**: 59-73.

8- Podolin D.A., Gayles E.C., Wei Y., Thresher J.S., Pagliassotti M.J. (1998) Menhaden oil prevents but not reverse sucrose-induced insulin resistance in rats. *Am. J. Physiol.* **274**: R840-R848.

9- Lombardo Y.B., Drago S., Chicco A., Fainstein-Day P., Gutman R., Gagliardino J.J., Gomez-Dumm C.L. (1996) Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism* **45**: 1527-1532.

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

11- Pighin D., Karabatas L., Rossi A., Chicco A., Basabe J.C.,

- Lombardo Y.B. (2003) Fish oil affects pancreatic fat storage, pyruvate dehydrogenase complex activity and insulin secretion in rats fed a sucrose-rich diet. *J. Nutr.* **133**: 4095-4101.
- 12- Soria A., Chicco A., D'Alessandro M.E., Rossi A., Lombardo Y.B. (2002) Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model. *J. of Nutritional Biochemistry* **13**: 209-218.
- 13- D'Alessandro M.E., Chicco A., Karabatas L., Lombardo Y.B. (2000) Role of skeletal muscle on impaired insulin sensitivity in rats fed a sucrose-rich diet: effect of moderate levels of dietary fish oil. *J. Nutr. Biochem.* **11**: 273-280.
- 14- Cunniff P. (1999) In official methods of analysis of Association of Official Agriculture chemists. 16th edn. Sturleon. Maryland USA: AOAC International.
- 15- Chicco A., Basabe J.C., Karabatas L., Ferraris N., Fortino A., Lombardo Y.B. (2000) Troglitazone (CS-045) normalize hipertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipemic rats. *Metabolism* **49**: 1346-1351.
- 16- Robdell M. (1964) Metabolism of isolated fat cells I. Effects of hormone on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* **239**: 375-380.
- 17- Di Girolamo N., 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.
- 18- Khan M.A., Ashman R.S., Heald F.P., Hubbard Jr T.B. (1974) Effects of methodology on estimation of adipose cell size and number in humans. *Nutr. Rep. Int.* **10**: 9-18.
- 19- Snedecor G.W.P., Cochran W.G. (1967) In Statistical methods. Iowa University Press, Ames, IA. Pp 339-350.
- 20- Jandacek R.J., Hollenback E.J., Holcomb B.J.C.M., Kuehlthau C.N., Peter J.C., Taulbee J.D. (1991) Reduced storage of dietary eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the weaning rat. *J. Nutr. Biochem.* **2**: 142-149.
- 21- Jones P.J.H., Schoeller D.A. (1988) Polyunsaturated:saturated ratio of diet fat influences energy substrates utilization in the humans. *Metabolism* **37**: 145-151.
- 22- Neschen S., Moore I., Regittng W., Yu C.L., Wang Y., Pypaer M., Petersen K.F. Shulman G.I. (2002) Contrasting effects of fish oil and sunflower oil on hepatic, peroxisomal and tissue lipid content. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**: E395-E401.
- 23- Auwers J. (1999) PPAR γ , the ultimate thrifty gene, Review *Diabetologia* **42**: 1033-1049.
- 24- Luo J., Rizkalla S.W., Boillot J., Alamowitch C., Chaib H., Bruzzo F., Desplanque N., Dalix A.M., Durand G., and 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.
- 25- Kraegen E.W., Cooney G.J. (1999). The role of free fatty acids in muscle insulin resistance. In SDM Marshall, P.D. Home, Riza R.A. (eds) p 141-159. *The Diabetes Annual/12 Elsevier Sciences BV.*
- 26- Storlien L.H., Jenkins W., Chisholm D.J., Pascoe W.S., Khouri S., Kraegen E.W. (1991) Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats. Relationship to muscle triglycerides and w-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* **40**: 280-289.