

Trabajos

Efectos de los n-3 pufas de origen marino sobre algunas enzimas hepáticas claves involucradas en el metabolismo lipídico en ratas dislipémicas

RECIBIDO: 17/6/08

ACEPTADO: 15/8/08

Hein, G.J. • Lombardo, Y.B. • Chicco, A.G.

Laboratorio de Estudio de Enfermedades Metabólicas
Relacionadas con la Nutrición. Departamento de Química
Biológica. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas. Universidad
Nacional del Litoral. Ciudad universitaria. Paraje "El Pozo".
S3000ZAA. Santa Fe. Argentina. Tel.: 0342-4575211.
Email: ghein@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: El objetivo de este trabajo fue estudiar en animales alimentados con dieta rica en sacarosa (DRS) durante 8 meses: i) a nivel hepático algunas enzimas involucradas en la lipogénesis y oxidación de ácidos grasos; ii) analizar el efecto de los n-3 PUFAs sobre los parámetros antes mencionados. Los resultados obtenidos muestran que la sustitución de la fuente grasa dietaria (aceite de maíz (AM) por aceite de hígado de bacalao (AHB)), durante los últimos 2 meses con DRS, normaliza la dislipemia, la secreción de VLDL-Tg, su remoción plasmática y la homeostasis de la glucosa, sin modificar la insulinemia. Las enzimas relacionadas con la lipogénesis "de novo" disminuyen hasta alcanzar valores semejantes a las ratas alimentadas con dieta control. La oxidación de ácidos grasos hepáticos se incrementan (actividades mayores CPT-1 y FAO). Estos resultados indican un destino preferencial

de los ácidos grasos hacia la vía oxidativa en presencia de AHB dietario.

PALABRAS CLAVE: Dislipemia, hígado, n-3 PUFAs.

SUMMARY: *Effects of marine n-3 pufas over some liver key enzymes involved in the lipid metabolism in dyslipemic rats.*

The aim of this work are twofold: i) To study some liver enzymes involved in the lipogenesis and oxidation of fatty acids; and ii) To analyze the effects of n-3 PUFAs over those parameters, in rats fed a sucrose-rich diet (SRD) during 8 months. The results show that the substitution of the source of fat in the diet (corn oil (CO) by cod liver oil (CLO)) during the last 2 months on the SRD diet normalizes dyslipemia, VLDL-Tg secretion rate and its plasmatic removal, and glucose homeostasis, with no changes in plasmatic insulin levels. The enzymes involved in "de novo" lipogenesis return to control values. The hepatic fatty

acids oxidation is elevated (greater CPT-1 and FAO activities are observed). These results indicate a preferential destiny of fatty

acids to the oxidative way in the presence of dietary CLO.

KEYWORDS: Dyslipemia, liver, n-3 PUFAs.

Introducción

El Síndrome Metabólico o también llamado Síndrome "X" representa en la actualidad un problema aún no resuelto desde el punto de vista de su patogenicidad y consecuentemente para su prevención y/o tratamiento (1). Tanto factores genéticos como ambientales (tales como nutrición, estilo de vida, etc.) contribuyen al desarrollo del mismo, el cual prevalece en la población mundial y se refiere a la simultánea presencia de anomalías crónicas que incluyen: insulino resistencia, dislipemia, hipertensión, obesidad, intolerancia a la glucosa y diabetes mellitus tipo 2. Todos estos representan factores de riesgo de enfermedades cardiovascular (2).

A nivel experimental es posible inducir un estado metabólico similar mediante la administración crónica de una dieta rica en hidratos de carbono (sacarosa, fructosa). Estudios de nuestro grupo y otros investigadores demostraron que ratas Wistar normales alimentadas con una dieta rica en sacarosa (DRS) durante 3 a 5 semanas desarrollan dislipemia (incremento de triglicéridos (Tg) y ácidos grasos no esterificados plasmáticos (AGNE), anormal homeostasis a la glucosa, hiperinsulinemia y alterada sensibilidad insulínica en el tejido hepático y periféricos (3, 4, 5, 6, 7, 8). La magnitud de los cambios endócrino-metabólicos inducidos por la ingesta de una dieta rica en sacarosa, depende de la cronicidad de la dieta. Al respecto trabajos previos de nuestro grupo demostraron que, en presencia de dislipemia, el perfil metabólico y hormonal de este modelo experimental evoluciona

desde normoglucemia e hiperinsulinemia (3-5 semanas) a una moderada hiperglucemia y normoinsulinemia (13-40 semanas). La insensibilidad insulínica periférica global se encuentra reducida a las 3-5 semanas y continúa deteriorándose aún más con la cronicidad de la dieta (13-40 semanas) (9).

Diferentes estudios demostraron que la DRS, administrada por un corto periodo de tiempo, incrementa la actividad de enzimas claves en la lipogénesis hepática (sintasa de ácidos grasos (FAS), acetil-CoA carboxilasa (ACC), enzima málica (ME), glucosa-6-fosfato-dehidrogenasa (G-6-PDH)) (10, 11, 12), conduciendo a un incremento del contenido de Tg hepáticos y a una mayor secreción de lipoproteína de muy baja densidad-Tg (VLDL-Tg). También, Miyazaki y col. (13) observaron en ratones alimentados con 60% de fructosa durante 7 días una inducción de la expresión génica de las enzimas FAS, ACC y estearoil-CoA desaturasa (SCD). Algunos trabajos a nivel experimental se han focalizado en estudios de mejoramiento y/o reversión de estas anormalidades, utilizando cambios nutricionales y/o farmacológicos (tipo de grasa dietaria, su porcentaje de hidratos de carbono simples, drogas hipolipemiantes, etc.).

Los ácidos grasos n-3 de origen marino eicosapentaenoico (EPA 20:5, n-3) y docosahexaenoico (DHA 22:6, n-3) además de ser componentes vitales de los fosfolípidos de las membranas celulares y así optimizar el funcionamiento de los tejidos (14), pueden mejorar la degeneración vascular ateroesclerótica (15), enfermedades coronarias,

dislipemia, intolerancia a la glucosa, diabetes mellitus tipo 2, resistencia insulínica, hipertensión, etc. (16, 17), todos involucrados en el síndrome metabólico. En animales de experimentación ejercen un efecto hipolipemiante descendiendo los niveles de Tg y VLDL-Tg plasmáticos. Numerosos estudios empleando modelos experimentales, observan que el efecto hipolipemiante de los n-3 PUFAs se debería a: 1) su capacidad de actuar como ligandos naturales de receptores- α activadores de la proliferación peroxisomal (PPAR α) favoreciendo la oxidación de ácidos grasos y/o 2) la disminución de la abundancia nuclear y expresión de la proteína-1 que une elementos reguladores de esteroides (SREBP-1), que regula enzimas involucradas en la lipogénesis "de novo" hepática (18; 19; 20).

En este contexto y por lo anteriormente expuesto, el propósito del presente trabajo fue estudiar en ratas alimentadas crónicamente con DRS (8 meses) - en las cuales se encuentra presente una dislipemia e insulino resistencia estables -: 1- algunos mecanismos que analicen el destino preferencial (reserva, secretorio, versus oxidación) de la mayor disponibilidad de AGNE plasmáticos y su relación con la resistencia insulínica. Para tal fin se estudiaron: a) Enzimas hepáticas claves involucradas en la oxidación de ácidos grasos (carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1) y oxidasa de ácidos grasos (FAO)) y en la lipogénesis hepática (FAS, ME y G-6-PDH); b) Velocidad de secreción hepática de VLDL-Tg y de remoción plasmática de Tg; 2- Evaluar el posible efecto beneficioso de la sustitución parcial e isocalórica del tipo de grasa dietaria (AM por AHB) sobre los parámetros antes mencionados.

Materiales y métodos

Animales y dietas

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Buenos Aires, Argentina, con un peso inicial de 180-200g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura (22 ± 1 °C) y humedad controladas, con un ciclo de 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 %p/p) (DRS) durante 6 meses, finalizado este período los animales se subdividieron en forma aleatoria en dos subgrupos. El primer subgrupo continuó con la DRS hasta completar los 8 meses de ingesta. El segundo subgrupo recibió a partir del sexto y hasta el octavo mes una DRS en donde la fuente grasa (aceite de maíz 8 %p/p) fue reemplazada por aceite de hígado de bacalao (AHB) (7 %p/p) y adicionado de aceite de maíz (1 %p/p) (DRS+AHB). El grupo control recibió una dieta control (fuente de hidrato de carbono: almidón 62,5 %p/p) (DC) a lo largo de toda la experiencia. La Tabla 1 muestra la composición de las dietas cuyos componentes se basan en las recomendaciones del Comité ad hoc del "American Institute of Nutrition" (21). Las dietas fueron preparadas semanalmente y mantenidas a 4 °C hasta el momento del consumo. Todas proveen aproximadamente 16,05 kJ/g de comida y se administraron ad libitum. La mezcla base se almacenó también a 4 °C hasta la preparación de las dietas. Los aceites fueron conservados a 4 °C bajo atmósfera de N₂ y se adicionaron a las dietas dia-

Tabla 1: Composición de las dietas experimentales¹.

Componentes	DC	DRS	DRS + AHB
		g/100 g	
Caseína libre de vitaminas	17,0	17,0	17,0
Almidón de maíz	62,5	-	-
Sacarosa	-	62,5	62,5
Aceite de maíz	8,0	8,0	1,0
Aceite hígado de bacalao	-	-	7,0
Celulosa	7,5	7,5	7,5
Mezcla de sales ²	3,5	3,5	3,5
Mezcla de vitaminas ³	1,0	1,0	1,0
Cloruro de colina	0,2	0,2	0,2
Metionina	0,3	0,3	0,3

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

2. Mezcla de sales AIN-93M-MX (g/kg de dieta): carbonato de calcio, 357; fosfato monobásico de potasio, 250; cloruro de sodio, 74; sulfato de potasio, 46,6; citrato de potasio monohidratado, 28; óxido de magnesio, 24; citrato férrico, 6,06; carbonato de zinc, 1,65; carbonato de manganeso, 0,63; carbonato cúprico, 0,30; yodato de potasio, 0,01; selenato de sodio, 0,01025; molibdato de amonio, 0,00795; cromato de potasio, 0,275.

3. Mezcla de vitaminas AIN-93-VX (g/kg de dieta): vitamina A (500.000 UI/g) 0,8; vitamina D3 (400.000 UI/g) 2,75; vitamina E (500 UI/g) 15; vitamina K, 0,075; biotina, 0,020; vitamina B12, 2500; ácido fólico, 0,200; niacina, 3; pantotenato de calcio, 1,6; piridoxina HCl, 0,7; rivoflavina, 0,6; tiamina HCl, 0,6.

riamente. La composición de ácidos grasos de los aceites fue analizada por cromatografía como se describió previamente (17). 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.

Finalizado los 8 meses de experimentación, se removió el alimento al finalizar el período de oscuridad (7 h) y los diferentes ensayos fueron llevados a cabo entre las 8 y las 10 h, excepto que se especifique lo contrario.

Métodos analíticos

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbi-

tal sódico (60 mg/kg de peso corporal). Las muestras de sangre obtenidas de la vena cava superior fueron inmediatamente centrifugadas a 4 °C. El suero obtenido fue utilizado inmediatamente o se conservó a -20 °C hasta su procesamiento (no más de una semana). Muestras de tejido hepático fueron rápidamente removidas y pesadas. Los niveles plasmáticos de Tg, AGNE y glucosa fueron cuantificados por métodos espectrofotométricos comunes. La insulina plasmática fue dosada mediante ensayo inmuno reactivo según se describió previamente (22) utilizando un estándar de insulina de rata (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca). Homogeneizados de tejido hepático congelado fueron utilizados para la determinación del contenido de Tg (21).

Determinación de actividades de enzimas lipogénicas:

1. FAS: La fracción citosólica de las muestras de homogeneizado hepático (en buffer conteniendo 0,25 M de sacarosa, 1 mM de DTT y 1 mM de EDTA – pH: 7,4) fue obtenida por centrifugación a 100.000 xg durante 1 hora a 4°C y se determinó inmediatamente la actividad de FAS como fue descrito anteriormente por Halestrap y Denton (23). La actividad de FAS se determinó en un espectrofotómetro a 340 nm a temperatura ambiente en un buffer conteniendo: 100 mM de buffer fosfato de potasio (pH: 6,5), 0,1 mM de NADPH, 25 μ M de acetil-CoA y microlitros de muestra. La reacción se inicia inmediatamente del agregado de 60 μ M de malonil-CoA. Se registra la variación de densidad óptica debido a la oxidación de NADPH; una unidad de actividad enzimática representa 1 μ mol de NADPH oxidado por minuto a 37°C. La concentración de proteína se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (24). Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

2. ME: La actividad fue medida mediante el método propuesto por Ochoa con una pequeña modificación de acuerdo a Hsu y col. (25). Se registró la variación de densidad óptica en un buffer de reacción (0,4 M trietanolamina, 0,12 M $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 3,4 mM de NADP^+), se agregó luego de 10 minutos (para estabilizar la lectura) 0,03 M de L-malato y se leyó a intervalos de 15 segundos a 340 nm en espectrofotómetro. Una unidad de actividad enzimática representa 1 μ mol de NADP^+ reducido por minuto a 340 nm y a 37°C. La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (24). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína.

3. G-6-PDH: La actividad de la enzima G-6-PDH fue analizada como se describió anteriormente (26), donde la velocidad de formación de NADPH a 340 nm, expresada en μ mol/minuto, representa la actividad enzimática de la G-6-PDH. La concentración de proteína del extracto se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (24). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína.

Determinación de actividades de enzimas oxidativas de ácidos grasos:

1. CPT-1: La actividad de la enzima CPT-1 se determinó espectrofotométricamente mediante la liberación de CoA-SH del palmitoil-CoA en homogeneizados de tejido hepático en presencia y ausencia de L-carnitina (27). Brevemente, 1 gramo de tejido hepático se homogeneizó con un buffer (0,25 M sacarosa, 1 mM EDTA, 0,1% etanol, 1 mg/L antipain, 2 mg/L aprotinin, 1 mg/L leupeptin, 0,7 mg/L pepstatin, 0,2 mM PMSF) en relación 1:5 (p/v). Luego de centrifugaciones a 300 xg para la separación de detritos celulares y a 12000 xg para el aislamiento mitocondrial, se separó el sobrenadante y se procedió a la determinación de la actividad de CPT-1. Se incubaron dos fracciones conteniendo: 800 μ l de buffer Tris-HCl-DTNB (pH: 8), 75 μ l de buffer homogeneización (detallado anteriormente) y 100 μ l de palmitoil-CoA 0,5 mM, con 5 μ l de L-carnitina y sin L-carnitina, durante 5 minutos a 30 °C y luego se agregó la fuente de enzima. Se leyó inmediatamente los incrementos de densidad óptica en un espectrofotómetro a 412 nm. La actividad enzimática se define como nmol de CoA-SH liberado/min/mg proteína. El contenido de proteína en el extracto se determinó de acuerdo al procedimiento descrito por Lowry y col. (24).

2. FAO: La actividad enzimática de la oxidasa de ácidos grasos (FAO) fue medida por una modificación al procedimiento propuesto por Vamecq (28). Brevemente, se aisló una fracción enriquecida con peroxisomas según Goglia y col. (29), homogeneizando 0,5 gramos de tejido hepático con cinco volúmenes de un buffer frío que contenía 0,3 mM de sacarosa, 20 mM de Tris-HCl pH: 7,4 y 0,5 mM de EDTA. Luego de centrifugaciones a 3000 xg para la separación de detritos celulares y a 27000 xg para el aislamiento peroxisomal, se resuspendió la fracción en el buffer anterior y se congeló inmediatamente hasta la determinación de la actividad. La actividad de FAO se determinó fluorométricamente mediante la liberación de H₂O₂ a través de una reacción peroxidativa acoplada, empleando homovanilato en presencia de horseradish peroxidase. La mezcla de reacción contenía 80 mM de buffer glicilglicina (pH: 8,3), 5 mM de homovanilato, 0,1 g/L Brij 58, 0,1 mg de horseradish peroxidase (tipo II), 0,02 mM de FAD, 0,1 mM de palmitoil-CoA. La reacción comenzó con el agregado de palmitoil-CoA, a intervalos de 2 minutos comenzando 4 minutos luego de que la reacción haya sido iniciada, una alícuota se removió y se mezcló con ml de buffer (pH 10,7) de carbonato-bicarbonato 0,5 M. La fluorescencia producida se midió en un espectrofluorómetro con una longitud de onda de 325 nm (excitación) y 425 nm (emisión). Además se realizó la correspondiente curva de calibrado, con concentraciones crecientes de H₂O₂ preparada de un solución al 30%. La actividad de la enzima se expresa como nmoles de H₂O₂ liberados/min/mg proteína. La concentración de proteína se determinó empleando albúmina sérica bovina como estándar (24).

Determinación de la Velocidad de secreción de VLDL-Tg:

La velocidad de secreción de triglicéridos (VLDL-Tg) fue determinada en ratas con 12 h de ayuno, mediante el empleo del detergente iónico Triton-X100 que bloquea la remoción plasmática de los Tg. La velocidad de secreción de Tg fue calculada por medio del incremento lineal de los Tg vs tiempo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (17).

Determinación de la Velocidad de remoción plasmática de Tg:

La velocidad de remoción plasmática de Tg se determinó en ratas ayunadas 12 h, mediante inyección intravenosa de 0,1 ml/100g de peso corporal de una emulsión grasa artificial "Intralipid". Se extrajeron muestras de sangre inmediatamente, antes y posterior a la administración del Intralipid, durante intervalos de tiempo comprendidos entre 2 y 30 minutos, como lo sugiere la metodología descrita por Lombardo y col. (17). Los resultados se expresaron como K₂ (% min⁻¹).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio ± 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 (30). Valores de p < 0,05 fueron consideradas estadísticamente significativos.

Resultados

Incremento de peso corporal e ingesta calórica

A lo largo de todo el período experimental, el peso corporal e ingesta calórica fue monitoreado cuidadosamente en todos los

grupos. Como se demostró previamente (22, 31) en la Tabla 2 se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) en el peso corporal y la ingesta calórica en los animales que fueron alimentados con DRS durante un período de 8 meses en comparación con los animales alimentados con DC. Por otro lado en el grupo de animales en donde se sustituyó parcialmente el AM por AHB en los dos últimos meses de ingesta dietaria observamos una moderada reducción en la ganancia de peso comparado tanto con los animales alimentados con DRS o DC.

Determinaciones plasmáticas

Al finalizar el período de ingesta, los niveles plasmáticos de triglicéridos, AGNE y

glucosa de las ratas alimentadas con DRS fueron significativamente más altos en comparación a las que recibieron DC ($p < 0,05$). Mediante la sustitución de la fuente grasa dietaria durante los últimos dos meses de ingesta (AM por AHB) se lograron normalizar todos los metabolitos previamente descritos. La insulinemia no se modificó en ninguno de los lotes (Tabla 3).

Contenido hepático de triglicéridos, velocidad de secreción de VLDL-Tg y remoción plasmática de Tg

Tanto la concentración de Tg hepáticos como la secreción de VLDL-Tg, fueron significativamente más elevadas en los animales del grupo con DRS comparado con los ali-

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)

Dieta	Período de ingesta: 0 a 6 meses			Dieta	Período de ingesta: 6 a 8 meses			
	Peso corporal inicial	Peso corporal final	Ingesta calórica		Peso corporal inicial	Peso corporal final	Ganancia de peso	Ingesta calórica
	(g)		(kJ/día)		(g)			(kJ/día)
DC	191,2 ± 3,4	405,3 ± 13,6 ^b	273,9 ± 3,6 ^b	DC	405,3 ± 13,6 ^b	427,1 ± 12,9 ^b	21,8 ± 3,5 ^a	270,6 ± 4,3 ^b
DRS	190,7 ± 4,1	453,9 ± 9,2 ^a	321,2 ± 5,1 ^a	DRS	455,5 ± 13,9 ^a	480,7 ± 13,6 ^a	25,2 ± 2,9 ^a	330,5 ± 12,7 ^a
				DRS + AHB	452,1 ± 12,2 ^a	467,9 ± 10,7 ^a	15,8 ± 3,2 ^b	310,4 ± 7,1 ^a

Los valores se expresan como promedio ± SEM (n = 6). Los valores en cada columna con letras supraescritas diferentes son significativamente diferentes ($p < 0,05$) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

mentados con DC ($p < 0,05$). La velocidad de remoción de Tg plasmáticos se encuentra significativamente disminuida en el grupo de animales con DRS respecto a su control (DC) ($p < 0,05$). La administración de AHB logra normalizar todos los parámetros antes mencionados (Tabla 4).

Actividades de enzimas lipogénicas hepáticas: ME, FAS, G-6-PDH

En la Figura 1 observamos un incremento significativo ($p < 0,05$) en las actividades de las enzimas lipogénicas de los animales que recibieron DRS, en comparación a las ratas con DC (expresadas en mU/mg pro-

Tabla 3: Niveles plasmáticos de Tg, AGNE, Glucosa e insulina en animales alimentados con DC, DRS o DRS + AHB

Dieta	Triglicéridos (mM)	AGNE (mM)	Glucosa (mM)	Insulina (pM)
DC	0,54 ± 0,05 ^b	239 ± 19 ^b	6,59 ± 0,19 ^b	378 ± 25
DRS	1,79 ± 0,19 ^a	728 ± 32 ^a	8,10 ± 0,16 ^a	372 ± 44
DRS + AHB	0,56 ± 0,05 ^b	327 ± 42 ^b	6,53 ± 0,23 ^b	379 ± 27

Los valores se expresan como promedio ± SEM (n = 6). Los valores en cada columna con letras supraescritas diferentes son significativamente diferentes (p < 0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

Tabla 4: Concentración de Tg hepáticos, velocidad de secreción de VLDL-Tg y velocidad de remoción plasmática de Tg (K2 % min⁻¹) en animales alimentados con DC, DRS o DRS + AHB

Dieta	Tg hepático (μmol/g tejido húmedo)	VLDL-Tg (nmol/100g/min)	K2 % min⁻¹
DC	13,82 ± 0,98 ^b	161,5 ± 3,0 ^b	10,4 ± 0,7 ^a
DRS	23,10 ± 1,50 ^a	194,6 ± 8,5 ^a	4,8 ± 0,5 ^b
DRS + AHB	13,88 ± 1,47 ^b	120,3 ± 9,5 ^c	8,9 ± 0,3 ^a

Los valores se expresan como promedio ± SEM (n = 6). Los valores en cada columna con letras supraescritas diferentes son significativamente diferentes (p < 0,05) cuando cada variable es comparada con el test de Newman Keuls.

teína). Al reemplazar la fuente de grasa dietaria (AM por AHB), todas estas enzimas lograron alcanzar valores similares a las ratas alimentadas con DC. El mismo comportamiento puede observarse cuando las actividades se expresan por órgano total o por 100 gramos de rata (mU/órgano total ó mU/100 g rata – datos no mostrados).

Actividades de enzimas hepáticas involucradas en la oxidación de ácidos grasos: FAO, CPT-1

En la Figura 2 se observa una disminución significativa en la actividad enzimática

de CPT-1 (expresada como mU/mg proteína) en las ratas con DRS (p < 0,05) respecto de los animales alimentados con DC. Por el contrario la actividad enzimática de FAO no se modificó. Al sustituir el AM por AHB, las actividades de FAO y CPT-1 incrementaron (p < 0,05), alcanzando valores estadísticamente significativos con respecto a los animales alimentados con DRS y con DC. El mismo patrón de comportamiento enzimático se observa cuando se afecta por el peso del órgano total o expresados por 100 gramos de rata (mU/órgano total ó mU/100 g rata – datos no mostrados).

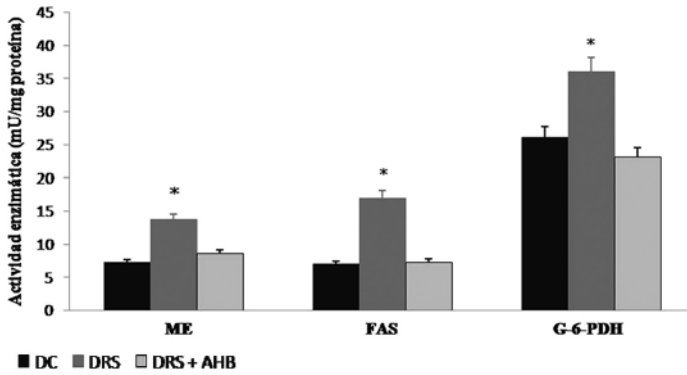


Figura 1: Actividades de enzimas lipogénicas: ME, FAS y G-6-PDH. Los valores se expresan como promedio ± SEM (n = 6). * p < 0,05 DRS vs DC y DRS + AHB.

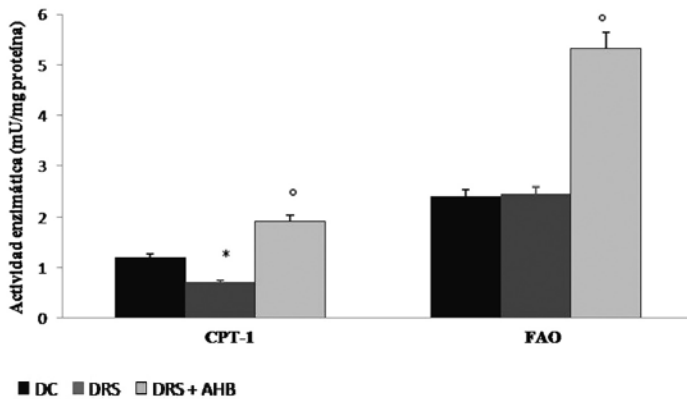


Figura 2: Actividades de enzimas oxidativas de ácidos grasos: CPT-1 y FAO. Los valores se expresan como promedio ± SEM (n = 6). * p < 0,05 DRS vs DC y DRS + AHB; ° p < 0,05 DRS + AHB vs DC y DRS.

Discusión

Este trabajo analiza el efecto de los ácidos grasos n-3 sobre algunos aspectos del metabolismo lipídico en el tejido hepático de ratas dislipémicas insulino-resistentes alimentadas con DRS a largo plazo. Los resultados obtenidos señalan: a) incremento en las actividades de enzimas lipogénicas; b) disminución de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos; c) incremento de los Tg, acompañado de una mayor secreción de VLDL-Tg y una menor remoción plasmática de los mismos; d) incremento de Tg, AGNE y glucosa plasmática sin modificación de la insulinemia. El cambio de ácidos grasos

dietarios (AM por AHB) en los dos últimos meses de experimentación normalizó todos los parámetros analizados.

Los niveles de AGNE plasmáticos están muy elevados en las ratas alimentadas por un largo periodo de tiempo con DRS (9). La mayor disponibilidad de AGNE plasmáticos puede conducir a nivel hepático, a una mayor re-esterificación a triglicéridos aumentando su pool (11), asociado a una menor oxidación de los mismos que favorecería la mayor secreción hepática de VLDL-Tg. Por otro lado las DRS inducen una mayor síntesis de ácidos grasos que también contribuirían al excesivo acumulo de Tg he-

páticos observado en estos animales. La hipertrigliceridemia presente en las ratas con DRS sería la consecuencia de una mayor secreción de VLDL-Tg y una menor remoción plasmática de Tg. Los mecanismos involucrados en este proceso implican una regulación positiva de la expresión de los factores de transcripción SREBP-1c y negativa del PPAR α . Al respecto Nagai y col. observaron en ratas alimentadas con fructosa, un incremento de la expresión génica del SREBP-1c y una disminución de la expresión del PPAR α , ambos factores involucrados en la regulación de las enzimas lipogénicas y de la oxidación de ácidos grasos a nivel hepático (32).

Cuando se cambió la fuente grasa dietaria (AM por AHB), los efectos observados fueron muy marcados. La ganancia de peso registrado en los animales que fueron alimentados con DRS + AHB fue menor que en lote alimentado con DRS, aún cuando la ingesta calórica fue similar. Al respecto, trabajos de Jandacek y col. (33) y Jones y col. (34) 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. El efecto hipolipemian-te del AHB logró normalizar los Tg hepáticos, la secreción de VLDL-Tg y su remoción plasmática. A nivel hepático, el AHB normalizó las actividades de las enzimas lipogénicas e incrementó las relacionadas con la oxidación grasa a nivel peroxisomal y mitocondrial. Jump y col. (35) observaron en hepatocitos aislados de ratas Sprague-Dawley una disminución del 50-90% en la expresión de enzimas que codifican para la ME, FAS, entre otras, cuando se adiciona n-3 PUFAs a las diferentes dietas. Existen autores que proponen dos mecanismos importantes de los ácidos grasos n-3 como son: inhibir la

lipogénesis hepática actuando sobre los ARNm que codifican las enzimas involucradas en lipogénesis (42) e incrementar la capacidad oxidativa hepática actuando como ligando activadores de los PPAR α y de esta forma inducir la transcripción de diferentes genes que codifican enzimas relacionadas con la oxidación de los ácidos grasos (43). Esta acción conjunta, favorecería la reversión de la hipertrigliceridemia inducida por una ingesta crónica de sacarosa en los animales alimentados con AHB.

Finalmente estos resultados sugieren que en los animales alimentados con DRS, una mayor actividad de las enzimas relacionadas con la síntesis "de novo" sumada a un posible incremento de la re-esterificación de AGNE -debido a su elevada disponibilidad plasmática-, favorecería el incremento de Tg hepáticos. Mediante la adición de AHB durante los 2 últimos meses de dieta, es posible inducir una reversión de los lípidos plasmáticos y de la anormal homeostasis de la glucosa en este modelo experimental de resistencia insulínica y dislipemia.

Bibliografía

1. Reaven G.M. (2000): Diet and Syndrome X. *Curr. Atheroscler. Res.* **2**: 503-507.
2. Cheal K.L.; Abbasi F.; Lamendola C.; McLaughlin T.; Reaven G.M.; Ford E.S. (2004): Relationship to insulin resistance of the adult treatment panel III diagnostic criteria for identification of the metabolic syndrome. *Diabetes* **53**: 1195-1200.
3. Lombardo, Y.B.; Chicco, A.; Mocchiutti, N.; Rodi, M.; Nusimovich, B. and Gutman, R. (1983): Effects of sucrose diet on insulin secretion in vivo and in vitro and triglyceride storage and mobilization of heart of rats. *Horm. Metab. Res.* **15**:69-76.

4. Reaven, G.M. (1984): Diabetic hipertrigliceridemia in the rat: animal models simulating the clinical syndromes of impaired glucose tolerance, noninsulin-dependent diabetes and insulin-dependent diabetes. In: Shafrir E, Renold AS, editors. *Lessons from animal diabetes*. London (UK): Libby; pp. 531-536.
5. Gutman, R.; Basílico, M.Z.; Mocchiutti, N.; Chicco, A. and Lombardo, Y.B. (1985): Diazoxide prevents the development of hormonal and metabolic abnormalities present in rats fed a sucrose rich diet. *Horm. Metab. Res.* **17**: 491-494.
6. Vråna, A. and Kazdova, L. (1986): Effects of dietary sucrose or fructose on carbohydrate and lipid metabolism. *Prog. Biochem. Pharmacol.* **21**: 59-73.
7. Chicco, A.; Gutman, R. and Lombardo, Y.B. (1991): Biochemical abnormalities in the heart of rats fed a sucrose-rich diet: is the low activity of the pyruvate dehydrogenase complex a result of increased fatty acid oxidation?. *Metabolism.* **40** (1): 15-21.
8. Bernal, C.; Gutman, R. and Lombardo, Y.B. (1995): The duration of feeding on a sucrose-rich diet determines variable in vitro effects of insulin and fructose in rat liver triglyceride metabolism. *J. Nutr. Biochem.* **6**: 422-430.
9. Lombardo, Y.B.; Drago, S.; Chicco, A.; Fainstein-Day, P.; Gutman, R.; Gagliardino, J.J. & Gomez-Dumm, C.L. (1996a): 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. Bruckdorfer K.R.; Khan I.H. and Yudkin J. (1972): Fatty acid synthetase activity in the liver and adipose tissue of rats fed with various carbohydrates. *Biochem. J.* **129**: 439-446.
11. Vråna, A. and Fabry, P. (1983): Metabolic effects of high sucrose or fructose intake. *World Review of Nutrition and Diabetics. S. Karger Basel Vol.* **42**: 70.
12. Fukuda H.; Iritani N. and Tanaka T. (1983): Effects of high-fructose diet on lipogenic enzymes and their substrate and effector levels in diabetic rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **29**: 691-699.
13. Miyazaki M.; Dobrzyn A.; Man W.; Chu K.; Samphat H.; Kim H.J.; Ntambi J.M. (2004): Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose mediated induction of lipogenic gene expression by sterol-regulatory element binding protein-1c dependent and independent mechanisms. *The J. of Biol. Chem.* **279**: 25164-25171.
14. Kinsella, J.E.; Lokesh, B. & Stone, R.A. (1990): Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms. *Review American Journal of Clinical Nutrition.* **52**: 1-28.
15. Simopoulos, A.P. (1999): Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **70** (Suppl): 560S-569S.
16. Storlien, L.H.; Jenkins, A.B.; 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 triglyceride and ω -3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes.* **40**: 280-289.
17. Lombardo, Y.B.; Chicco, A.; D`Alessandro, M.E.; Martinelli, M.; Soria, A.; Gutman, R. (1996b): Dietary fish oil normalize dislipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. *Biochimica et Biophysica Acta.* **1299**: 175-182.
18. Bordoni A.; Nunzio M.D.; Danesi F. and Biagi P.L. (2006): Polyunsaturated fatty acids: from diet to binding to PPARs and other nuclear receptors. *Genes & Nutrition.* **1**(2): 95-106.
19. Delarue J.; LeFoll C.; Corporeau C. and Lucas D. (2004): n-3 long chain polyunsaturated fatty acids: a nutritional tool to prevent insulin resistance associated to type 2 diabetes and obesity?. *Reprod. Nutr. Dev.* **44**: 289-299.
20. Sampath H. and Ntambi J.M. (2005): Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of

- lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **25**: 317-340.
- 21.** Reeves P; Nielsen F. and Fahey G. (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee on the reformulation of AIN-76A rodent diets. *J. Nutr.* **13**: 1939-1951.
- 22.** Chicco, A.; D`Alessandro, M.E.; Karabatas, L.; Pastorale, C.; Basabe, J.C. and 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.
- 23.** Halestrap A.P.; Denton R.M. (1973): Insulin and the regulation of adipose tissue acetylCoA carboxylase. *Biochem. J.* **132**: 509-517.
- 24.** Lowry O.H.; Rosebrough N.J.; Farr A.L.; Randall R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- 25.** Hsu T.H.; Lardy H.A. (1969): Method of enzymatic analysis, vol XIII, pp 230.
- 26.** Chicco A.; D`Alessandro M.E.; Karabatas L.; Gutman R.; Lombardo Y.B. (1996): Effect of moderate levels of dietary fish oil on insulin secretion and sensitivity, and pancreas insulin content in normal rats. *Ann. Nutr. Metab.* **40**(2): 61-70.
- 27.** Karlic H.; Lohninger S.; Koeck T.; Lohninger A. (2002): L-carnitine stimulates carnitine acyltransferases in the liver of aged rats. *J. Histochem Cytochem.* **50**: 205-212.
- 28.** Vamecq J. (1990): Fluorometric assay of peroxisomal oxidase. *Anal. Biochem.* **186**: 340-349.
- 29.** Goglia, F.; Liverini, G.; Lanni, A.; Iossa, S. & Barletta, A. (1989). Morphological and functional modifications of rat liver peroxisomal subpopulations during cold exposure. *Exp. Biol.* **48**: 127-133.
- 30.** Snedecor G.W.P.; Cochran W.G. (1967): In *Statistical methods*. Iowa University Press, Ames, IA. Pp 339-350.
- 31.** Chicco A.G.; Basabe J.C.; Karabatas L.; Ferraris N.; Fortino A.; Lombardo Y.B. (2000): Troglitazone (CS-045) normalizes hypertriglyceridemia and restores the altered patterns of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipemic rats. *Metabolism* **49**: 1346-1351.
- 32.** Nagai Y.; Nishio Y.; Nakamura T.; Maegawa H.; Kikkawa R. and Kashiwagi A. and Kashiwagi A. (2002): Amelioration of high fructose-induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**:1180-1190.
- 33.** McGarry J.D.; Mills S.E.; Long C.S. and Foster D.W. (1983): Observations on the affinity for carnitine, and malonyl-CoA sensitivity, of carnitine palmitoyltransferase I in animal and human tissues. *Biochem. J.* **214**: 21-28.
- 34.** 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.
- 35.** Jones, P.J.H.; Schoeller, D.A. (1988): Polyunsaturated:unsaturated ratio of diet fat influences energy substrate utilization in the humans. *Metabolism.* **37**: 145-151.
- 36.** Jump D.B.; Clarke S.D.; Thelen A. and Liimatta M. (1994): Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid. Res.* **35**: 1076-1084.
- 37.** Neschen S.; Moore I.; Regittnig 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.
- 38.** Harris, W.S. (1989): Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J. Lipid Res.* **30**: 785-807.