

Trabajos

Efectos del aceite de soja dietario sobre la reversión y/o mejoramiento de la dislipemia e insulino resistencia inducida por dieta rica en sacarosa

RECIBIDO: 20/05/2008

ACEPTADO: 10/07/2008

Bernard, M.C. • Lombardo, Y.B. • Rossi, A. • Fortino, M.A. Chicco A.

Cátedra de Química Biológica. Laboratorio de Estudio de Enfermedades Metabólicas Relacionadas con la Nutrición. Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria. Paraje El Pozo. S3000ZAA Santa Fe. Argentina. Tel.: (0342) 457 5211
Email: achicco@fbc.unl.edu.ar

El presente trabajo corresponde al desarrollo de la Tesina de la Licenciatura en Biotecnología de la Licenciada María Cecilia Bernard.

RESUMEN: En ratas dislipémicas e insulino resistentes alimentadas con dieta rica en sacarosa (DRS) analizamos el efecto de la sustitución del tipo de ácidos grasos dietarios sobre las alteraciones endocrinas-metabólicas inducidas por la dieta.

Ratas machos Wistar fueron alimentadas durante 5 meses con dieta control (DC) o con DRS. En la mitad del lote DRS se sustituyó durante los dos últimos meses de ingesta el aceite de maíz, rico en ácido linoleico, por aceite de soja (AS), rico en ácido α -linolénico (DRS+AS). Al finalizar el período experimental los animales del lote DRS+AS mostraron: i) normalización del colesterol total y HDL-colesterol plasmáticos; ii) mejoramiento sin normalización de los triglicéridos

plasmáticos y tisulares (menor secreción de VLDL-Tg y mayor remoción plasmática de triglicéridos); iii) ningún efecto sobre la moderada hiperglucemia y acentuada resistencia insulínica periférica global. Se sugiere que los efectos alcanzados se deben principalmente a la cantidad de ácido α linolénico (ALA) y a la relación entre LA/ALA presente en la dieta.

PALABRAS CLAVE: dislipidemia; aceite de soja; ácido α -linolénico.

SUMMARY: *Effect of dietary soybean oil on the reversion and/or amelioration of dyslipemia and insulin resistance induced by a sucrose rich diet.*

We analyzed the effect of dietary fatty acid substitution on the endocrine and metabolic alterations induced by a sucrose-rich diet

(SRD). Male Wistar rats were fed with a control (CD) or SRD for 5 months. In half of the SRD-fed rats the source of fat, corn oil, rich in linoleic acid, was replaced by soybean oil, rich in alpha-linolenic acid (SRD+AS), for the last two months of feeding. At the end of the experimental period, the SRD+AS-fed group showed: i) normalization of total cholesterol and HDL cholesterol; ii) improvement in plasma and tissue triglycerides, without reaching

normal values (VLDL-Tg secretion was low and fat removal was high); iii) no effect on the moderated hyperglycemia and insulin resistance. The amount of linolenic acid and the relationship between linoleic/linolenic present in the diet could be the main factors responsible for the effect observed when the source of fat in the diet was soybean oil.

KEYWORDS: dyslipidemia; soybean oil; α -linolenic acid.

Introducción

La prevalencia del Síndrome Metabólico (SM) ha incrementado a nivel mundial, llegando en los países Latinoamericanos, incluida Argentina, a un 20% (1). La constelación de factores de riesgo que definen al SM incluyen obesidad, incremento de presión arterial y de triglicéridos plasmáticos, bajos niveles de HDLcolesterol, alterada glucemia basal en ayuno y resistencia insulínica (RI) (2). La asociación de tres o más de estos factores conducen a un aumento del riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (3). Los macronutrientes dietarios pueden afectar individualmente cada uno de los componentes del SM. Durante las últimas décadas, se puso mucho énfasis en disminuir la ingesta de grasa saturada ya que ésta se asocia con obesidad y enfermedad cardiovascular. Los hidratos de carbono simples han reemplazado en gran parte las grasas dietarias. Esto condujo a un mayor crecimiento en las tasas de obesidad y diabetes tipo 2 (4). Además de la cantidad, el tipo de grasa dietaria parece tener efectos diferentes en la salud. Al respecto los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs: 20:5 n-3 EPA y 22:6 n-3 DHA) de origen marino han mostrado

mejorar diferentes aspectos del SM (5-7). Tanto por hábitos alimentarios de nuestra sociedad como por sustentabilidad de la fuente marina, es importante considerar la posibilidad de contar con otras fuentes que aporten los ácidos grasos n-3. El ácido α -linolénico (ALA, 18:3 n-3), es un ácido graso esencial que se encuentra presente en distintas proporciones en diferentes aceites vegetales tales como perrilla, colza, lino, soja. El ALA es precursor -vía elongasas y desaturasas- de los ácidos grasos poliinsaturados EPA y DHA. Los estudios que focalizan el efecto del ALA sobre algunos de los factores de riesgo del SM no son todos consistentes y dependen tanto de las condiciones experimentales, de la cantidad y tipo de aceite utilizado y del tiempo de ingesta. Algunos estudios con humanos a nivel epidemiológico y experimental mostraron una asociación inversa entre la ingesta de ALA y los riesgos de enfermedad cardiovascular (8), mientras que otros estudios no lograron encontrar tal asociación (9).

A nivel experimental Kim y col (10) demostraron en ratas normales que dietas con un 10% de aceite de perrilla (rico en ALA) o de aceite de pescado (rico en DHA y EPA) disminuyen los niveles de coleste-

rol y triglicéridos plasmáticos y hepáticos y que dicha disminución se relaciona con la actividad de la enzima sintetasa de ácidos grasos, enzima clave en la regulación de la lipogénesis. Las dietas ricas en ALA suprimen la actividad de dicha enzima (11). Ide y col (12) compararon la acción de las dos fuentes de n-3 (perrilla o pescado) sobre la expresión génica de enzimas involucradas en el metabolismo de los lípidos. Mientras ambos aceites ejercen un efecto similar sobre la activación de la oxidación de ácidos grasos, sólo el aceite de pescado inhibe enzimas de la síntesis de ácidos grasos. Además Ghafoorunissa y col (13) observaron una mayor sensibilidad insulínica periférica cuando se suministra dietas con creciente cantidad de aceite de lino como fuente de ALA a ratas normales, concluyendo que la relación entre ácidos grasos n-6 y n-3 es un factor importante en dicho efecto (13).

Diferentes investigaciones incluidas las de nuestro grupo han demostrado que ratas normales alimentadas con una dieta rica en sacarosa (DRS) por un período de 3-5 semanas desarrollan hipertrigliceridemia, elevados niveles de ácidos grasos libres (AGL), hiperinsulinemia y normoglicemia con disminuida acción insulínica. Cuando la dieta se prolonga en el tiempo (15 a 40 semanas) se presenta un milieu metabólico-hormonal diferente. La profundización de los desórdenes lipídicos (mayores niveles plasmáticos de triglicéridos, AGL, colesterol) se acompañan de moderada hiperglicemia, normoinsulinemia y alterada secreción de insulina bajo el estímulo de la glucosa en islotes pancreáticos aislados (14-16). Estas alteraciones se acompañan de ligero sobrepeso, adiposidad visceral y un acumulo de triglicéridos en tejidos no adiposos (músculo esqueléticos, corazón, hígado, páncreas)(17). Todas estas anomalías se asemejan en varios aspectos

los a los observados en humanos diabéticos tipo 2 y obesos. Mientras diferentes trabajos (7) han mostrado que la adición de aceite de pescado a las DRS en el corto plazo de ingesta (3-5 semanas) previene el desarrollo de la dislipemia e insensibilidad insulínica inducida por la sacarosa, trabajos de Lombardo y col (7) y Pighin y col (17) han demostrado en estudios a largo plazo (15-30 semanas con DRS) que cuando se reemplaza isocalóricamente la fuente de grasa dietaria (aceite de maíz rico en n-6 por aceite de pescado rico en n-3 de cadena larga) durante los dos últimos meses de ingesta, se mejora la dislipidemia y se corrige parcialmente la resistencia insulínica inducida por la sacarosa. Al presente existen pocos trabajos que examinen la eficiencia de la dieta rica en ALA en el modelo de resistencia insulínica inducida por DRS. Recientemente Gafforunissa y col (13) mostraron en ratas recién destetadas que la sustitución de un tercio de LA por ALA durante 3 meses resulta en menores niveles de lípidos séricos y una parcial corrección de la resistencia insulínica inducida por sacarosa. Por otra parte, hemos demostrado en ratas alimentadas por 4 semanas con DRS, que la sustitución del aceite de maíz por aceite de soja (con un 7% de ALA) es incapaz de prevenir el desarrollo de la dislipemia e insensibilidad insulínica (18). Frente a estos hallazgos y considerando que el consumo de aceite de soja como otros productos manufacturados de la soja están aumentando considerablemente, el objetivo del presente trabajo fue analizar en el modelo nutricional de dislipemia y resistencia insulínica inducido por ingesta crónica (3-5 meses) de DRS, si la composición de los ácidos grasos de la dieta pueden atenuar o revertir las alteraciones endocrino metabólicas producidas por la DRS. Para lograr este objetivo se sustituyó en los dos últimos meses de la ingesta el

tipo de aceite dietario en forma isocalórica: aceite de maíz rico en n-6 por aceite de soja, rico en ácido α -linolénico 18:3. Para lograr estos objetivos se analizaron: i) niveles plasmáticos de glucosa, insulina, AGL, triglicéridos, colesterol total y HDL colesterol y contenido de triglicéridos en tejidos claves a la acción insulínica; ii) Velocidad de secreción "in vivo" de lipoproteínas de baja densidad y de remoción de triglicéridos plasmáticos; iii) determinación de la sensibilidad insulínica periférica global por medio de la clamp euglicémica: hiperinsulinémica.

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 180-200 g. Los animales se mantuvieron bajo condiciones de temperatura (22 ± 1 °C) y humedad

controladas, con un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (7:00-19:00 h) con 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 61% p/p) (DRS) durante 3 meses. Finalizado este período los animales se subdividieron en forma aleatoria en dos subgrupos. El primer subgrupo continuó con la DRS hasta completar los 5 meses de ingesta. El segundo subgrupo recibió a partir del tercer mes y hasta el quinto mes una DRS donde la fuente grasa (aceite de maíz 10% p/p) fue reemplazado por aceite de soja (DRS-AS). El grupo control recibió, a lo largo de toda la experiencia, una dieta control (fuente de hidratos de carbono: almidón 61% p/p) (DC). La Tabla 1 muestra la composición de las dietas experimen-

Tabla1. Composición de las dietas experimentales

Las dietas se basan en la dieta AIN-93M. ¹ La mezcla de sales (AIN-93M-Mx); ² Mezcla de vitaminas (AIN-93-Vx) DC: dieta control; DRS: dieta rica en sacarosa; DRS + AS: dieta rica en sacarosa con aceite de soja.

Ingrediente de la dieta	DC		DRS		DRS+AS	
	% en calorías	% en calorías	% en peso	% en calorías	% en peso	% en calorías
Caseína libre de vitaminas	17.0	16.9	17.0	16.9	17.0	16.9
Mezcla de sales ¹	3.5		3.5		3.5	
Mezcla de vitaminas ²	1.0		1.0		1.0	
Cloruro de colina	0.2		0.2		0.2	
Metionina	0.3		0.3		0.3	
Celulosa	7.0		7.0		7.0	
Almidón de maíz	61.0	60.7				
Sacarosa			61.0	60.7	61.0	60.7
Aceite de maíz	10.0	22.4	10.0	22.4		
Aceite de soja					10.0	22.4

tales. Todas proveen 18,82 kJ/g de dieta y se administra "ad libitum" a los animales. La mezcla base de cada dieta se preparó semanalmente y se almacenó 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 diariamente. Mayores detalles de la preparación y el manejo de las dietas fue descrito en trabajos previos (14,16,17). La composición en ácidos grasos de los aceites usados en las dietas, se describe en la Tabla 2.

La ingesta calórica y la ganancia de pesos individuales de las ratas pertenecientes a cada grupo dietario se determinó dos veces por semana a lo largo de todo el período experimental. Finalizado los 5 meses de experimentación y excepto se indique lo contrario, se removió el alimento al finalizar el período de oscuridad (7:00h) y los animales fueron sacrificados entre las 7:00 y 9:00 h. El protocolo experimental fue apro-

bado por el Comité de Ética y Seguridad de Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral.

Métodos Analíticos

Los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (60 mg/Kg de peso corporal). Las muestras de sangre obtenidas de la vena cava inferior 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). Los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal fueron extraídos y pesados. Muestras de tejido hepático y cardíaco fueron rápidamente removidas, pesadas y congeladas con una pinza Wollenberger, previamente enfriada en nieve carbónica, y conservadas a la temperatura de N₂ líquido hasta su procesamiento. Los niveles plasmáticos de triglicé-

Tabla2. Composición en ácidos grasos de las dietas experimentales (g/ 100 gr de ácidos grasos totales).

¹ Aceite Mazzola: composición según proveedor (aceite comercial)

² Aceite de soja: composición según proveedor (MP Biomedicals, Inc, Solon, Ohio)

Acidos grasos	Aceite de maíz¹	Aceite de soja²
16:0	10.4	13.0
18:0	2.6	4.0
18:1	32.1	20.0
18:2 (n-6)	51.5	50.3
18:3 (n-3)	0.4	7.3
Total saturados	13.4	18.8
Total monoinsaturados	33.7	22.0
Total n-6 poliinsaturados	51.6	52.4
Total n-3 poliinsaturados	0.4	7.3
Relación P/S	3.88	3.20
Relación n-6/n-3	129.0	7.1

dos, AGL, colesterol total, HDL colesterol y glucosa fueron cuantificados por métodos espectrofotométricos comunes. La insulina plasmática se determinó mediante ensayo inmunorreactivo según se describió previamente (14) utilizando un estándar de insulina de rata (Novo Nordisk, Copenhague, Dinamarca). Homogeneizados de tejido hepático y cardíaco fueron utilizados para la determinación del contenido de TG tisular (19).

Velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos

La velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos (VSTG) se llevo a cabo de acuerdo a la técnica descrita por Otway y col (20) y utilizada previamente por nuestro grupo (21). Ratas en ayunas durante 12-16 h, fueron anestesiadas y canuladas en su vena yugular. Se extrajo una muestra de sangre a tiempo cero (basal). Posteriormente se inyectó vía intravenosa una solución de Tyloxapol (Triton WR 1339) en solución fisiológica (600 mg/Kg peso corporal). Luego de la administración de Triton, se realizaron extracciones de sangre de la otra vena yugular a los 60, 90 y 120 minutos; las muestras se conservaron a 4°C hasta finalizar la experiencia. Se cuantificó el contenido de triglicéridos por Kit enzimático convencional. La VSTG fue calculada a partir del incremento de los triglicéridos versus el tiempo siguiendo el procedimiento descrito por Lombardo y col (21).

Velocidad de remoción de triglicéridos plasmáticos

La velocidad de remoción de triglicéridos se determinó utilizando la técnica descrita por Lewis y col (22). Ratas en ayunas durante 12-16h, fueron anestesiadas y canuladas (vena yugular) y se extrajo una muestra de sangre a tiempo cero (basal). Luego, a través

de la misma cánula se inyectó una solución de la emulsión grasa artificial Intralipid al 10% (v/v) (dosis: 0.1 ml/100 g de peso corporal). Utilizando la otra vena yugular, se recolectaron muestras de sangre heparinizadas a los 2, 4, 6, 10, 15, 20 y 30 minutos posteriores a la administración de la emulsión grasa. Las muestras de sangre se conservaron a 4°C durante 2 horas aproximadamente. El suero obtenido por centrifugación a baja velocidad (aproximadamente 600 rpm) para evitar la precipitación de la partícula grasa, fue utilizado para medir la velocidad de desaparición del Intralipid en el plasma por nefelometría. Los valores fueron graficados en una escala semi-logarítmica versus el tiempo. La constante de 1° orden K2 de eliminación de la partícula grasa de la circulación, se calculó por el método de los cuadrados mínimos previamente descritos (23).

Clamp euglucémica hiperinsulémica

Se determinó la sensibilidad insulínica periférica global utilizando la técnica de la clamp euglucémica- hiperinsulinémica descrita por De Fronzo y col (24) y previamente utilizada por nuestro grupo (16). Ratas de cada grupo experimental en ayunas durante 5h, fueron anestesiadas, extrayéndose muestras de sangre en las que se cuantificaron los niveles de glucosa e insulina. Luego se administró insulina porcina neutra altamente purificada (Actrapid, Novo Nordisk) a velocidad constante (0,8 U/Kg de peso corporal x 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, Indianapolis; IN, USA) dentro de los 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 glucosa (VIG) en el estado estacionario (segunda hora de la clamp) considerada como la velocidad de captación periférica de la glucosa, se expresó como mg de glucosa/(Kg x min).

Análisis estadísticos

Los resultados se expresan como media \pm SEM. El estudio estadístico entre grupos se realizó por análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de Newman Keuls, para examinar las diferencias entre pares de medias (25). Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

Resultados

Peso corporal, ingesta calórica y peso de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal.

La Tabla 3 muestra el peso corporal y la ingesta calórica que fueron monitoreadas cuidadosamente en todos los lotes de ani-

males a lo largo del período experimental. Como se observó en trabajos anteriores, el peso corporal y la ingesta calórica de los lotes DC y DRS fue semejante hasta los 3 meses de ingesta (16). Cuando la dieta fue suministrada hasta los 5 meses, los animales alimentados con sacarosa presentan un significativo incremento tanto en el peso corporal como en la ingesta calórica que no se modifica independientemente del tipo de aceite utilizado.

Al finalizar el período de ingesta los animales alimentados con DRS, muestran un significativo incremento en el peso del tejido adiposo epididimal y retroperitoneal. Esta alteración no se modifica si se sustituye el aceite de maíz por aceite de soja durante los dos últimos meses de ingesta. Los datos se expresan como media \pm SEM (g) (n=8): Tejido adiposo epididimal: 6.7 \pm 0.36 en DC; 10.51 \pm 0.45 en DRS y 9.73 \pm 0.86 en DRS + AS, $p < 0.05$ DRS y DRS+AS vs DC; Tejido adiposo retroperitoneal: 7.07 \pm 0.77 en DC; 10.6 \pm 0.28 en DRS y 9.73 \pm 0.86 en DRS+AS, $p < 0.05$ DRS y DRS+AS vs DC.

Tabla 3. Peso corporal e ingesta calórica de ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o dieta rica en sacarosa con aceite de soja como fuente grasa (DRS + AS).

Los valores se expresan como media \pm SEM. () Números de animales incluidos en cada grupo experimental (ver materiales y métodos). Los valores en cada columna que no comparte la misma letra superescrita son significativamente diferente ($p < 0.05$) cuando se compara una variable por el test de Newman Keuls.

Dieta	Peso Corporal (g)			Ingesta calórica (Kj/día)	
	Inicial	3 meses	5 meses	0-3 meses	3-5 meses
DC (8)	206.2 \pm 12.6	379.0 \pm 13.5	400.0 \pm 6.7 ^b (8)	280 \pm 15	279 \pm 12 ^b
DRS (16)	206.1 \pm 3.6	386.0 \pm 6.3	478.7 \pm 22.8 ^a (8)	283 \pm 12	339 \pm 12 ^a
DRS+AS			448.9 \pm 9.6 ^a (8)		341 \pm 14 ^a

Niveles de metabolitos plasmáticos

Los niveles de triglicéridos, ácidos grasos libres, colesterol y glucosa plasmáticos se incrementaron significativamente en los animales alimentados con DRS cuando se los compara a los animales de igual sexo y edad alimentados con la DC. Al sustituir la fuente grasa dietaria, maíz por soja, se observó una normalización de los niveles de colesterol y de la relación HDLcolesterol/ colesterol total (%), que alcanzaron valores similares a los del lote DC, y una disminución significativa en los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres plasmáticos (Tabla 4) que no alcanzan a normalizarse.

La moderada hiperglucemia observada en el grupo alimentado con DRS tiende a disminuir pero no se diferencia significativamente en los animales alimentados con DRS+AS. No se observaron modificaciones en los niveles plasmáticos de insulina. Los valores alcanzados fueron semejantes en los tres lotes experimentales (Tabla 4).

Contenido y secreción de triglicéridos hepáticos y velocidad de remoción fraccional de una emulsión grasa

Las ratas alimentadas con DRS durante 5 meses muestran un significativo incremento en la velocidad de secreción "in vivo" de triglicéridos (VSTG) y una disminuida velocidad fraccional de remoción de una emulsión grasa (Intralipid) ($K_2\% \text{min}^{-1}$) comparado con los animales de igual sexo y edad alimentados con dieta control (Figura 1A y 1B). Estos resultados se acompañan de un significativo incremento del contenido de triglicéridos hepáticos y el pool de triglicéridos plasmáticos (Figura 1C y 1D). La sustitución en la DRS de la fuente grasa (maíz por soja) durante los dos últimos meses de ingesta induce a un mejoramiento en la secreción de triglicéridos hepáticos y en la remoción plasmática, acompañado de una notoria reducción de los niveles de triglicéridos hepáticos y del pool plasmáticos de los mismos (Figura 1A, B, C, D). Cabe destacar que ninguno de estos parámetros logra alcanzar aun los niveles observados en los animales controles.

Tabla 4. Niveles de metabolitos plasmáticos y de insulina en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con aceite de soja como fuente grasa (DRS + AS).

Los valores se expresan como media \pm SEM, n=6. Los valores en cada columna no comparten la misma letra superescrita son significativamente diferente ($p < 0.05$) cuando se compara una variable por el test de Newman Keuls.

	Dieta		
	DC	DRS	DRS + AS
Triglicéridos (mM)	0.53 \pm 0.06 ^c	1.80 \pm 0.02 ^a	0.84 \pm 0.13 ^b
Ácidos grasos libres (μ M)	239.0 \pm 21.0 ^c	730.0 \pm 35.1 ^a	419.0 \pm 67.8 ^b
Colesterol total (mM)	2.53 \pm 0.18 ^b	3.51 \pm 0.20 ^a	2.44 \pm 0.17 ^b
HDL- colesterol (mM)	1.45 \pm 0.02	1.13 \pm 0.05	1.12 \pm 0.02
HDL-colesterol (%)	57.3 \pm 5.3 ^a	32.0 \pm 1.4 ^b	46.2 \pm 2.7 ^a
Glucosa (mM)	6.00 \pm 0.08 ^b	8.00 \pm 0.18 ^a	7.42 \pm 0.40 ^a
Insulina (pM)	367.0 \pm 28.0	315.0 \pm 29.0	350.0 \pm 32.0

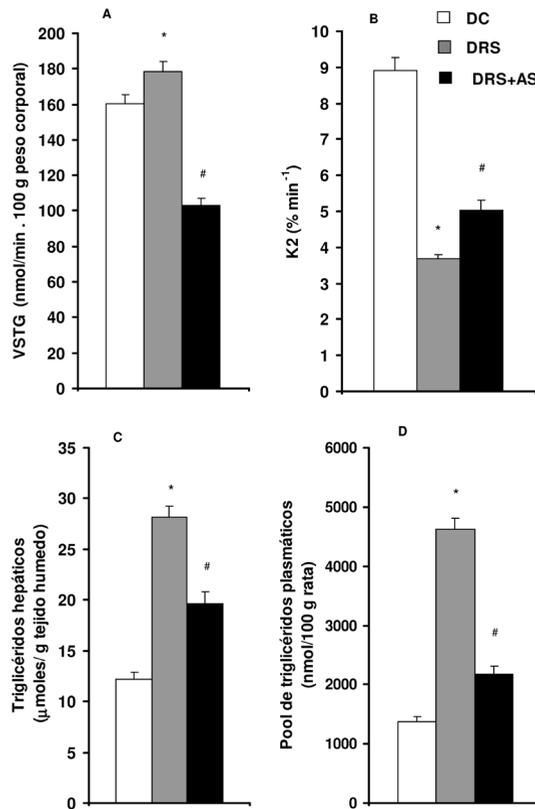
Figura 1. Velocidad de secreción hepática (A), remoción plasmática (B), contenido hepático (C) y pool plasmático de triglicéridos (D) en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con aceite de soja como fuente grasa (DRS + AS).

Los valores se expresan como promedio \pm SEM (n=6).

* $p < 0.05$ DRS vs DC

$p < 0.05$ DRS+AS vs DC

Figura 1



Clamp euglucémica hiperinsulinémica

Con el objeto de analizar el efecto de la sustitución del tipo de grasa de la dieta (aceite de soja por aceite de maíz) sobre la sensibilidad insulínica global (resistencia insulínica), se realizó, al final del período de ingesta, el estudio de la clamp euglucémi-

ca hiperinsulinémica. La glucosa fue clampada a 5.5 – 6.0 mM. Las concentraciones de glucosa luego de 5 h de ayuno, previo al inicio de la clamp, fueron los siguientes: media \pm SEM (mM) (n=6) : 5.25 \pm 0.05 en DC; 7.83 \pm 0.06 en DRS y 7.58 \pm 0.08 en DRS+AS. En todos los grupos dietarios, los

niveles de insulina fueron similares a los observados al final del período de oscuridad (datos no mostrados).

La Figura 2 detalla la sensibilidad insulínica periférica global como la velocidad de infusión de glucosa (VIG). Como demostráramos previamente (16) los resultados del presente trabajo muestran que los animales alimentados con DRS durante un período prolongado de tiempo (3- 5 meses) presentan una menor sensibilidad insulínica periférica, la cual no pudo mejorarse y/o revertirse por la sustitución del tipo de grasa dietaria. No se mostraron diferencias en el valor del hematocrito durante todo el período de la clamp (datos no publicados) en ninguno de los lotes dietarios.

Relación entre el contenido de triglicéridos en el músculo cardíaco y los niveles de ácidos grasos circulantes.

El contenido de triglicéridos del músculo cardíaco mostró una fuerte correlación positiva con los niveles de ácidos grasos circulantes (Figura 3). Los mayores niveles de AGL circulantes observados en los animales alimentados con DRS se relacionan con un mayor contenido de Tg musculares. La sustitución del aceite de maíz por aceite de soja durante los dos últimos meses de ingesta logra disminuir los niveles circulantes de AGL y esto se asocia con una reducción en el contenido de triglicéridos en el músculo cardíaco.

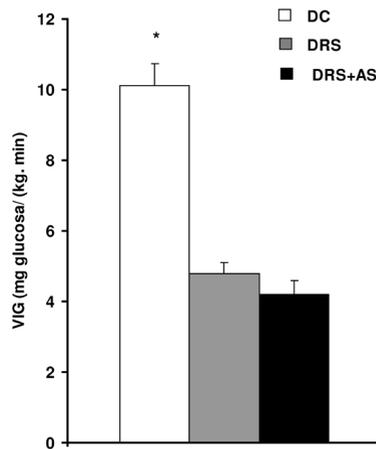
Discusión

Cambios sustanciales en la composición de los macronutrientes dietarios (tipo de hidratos de carbono y/o de ácidos grasos) y su interacción con otros factores como el estilo de vida contribuyen al incremento de las alteraciones en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono observadas en el SM. Los mayores hallazgos del presente trabajo, utilizando el modelo experimental de dislipi-

Figura 2. Velocidad de infusión de glucosa (VIG) durante la clamp euglicémica hiperinsulinémica en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con aceite de soja como fuente grasa (DRS + AS).

Los valores se expresan como promedio \pm SEM (n=6).

* $p < 0.05$ DC vs DRS y DRS+AS



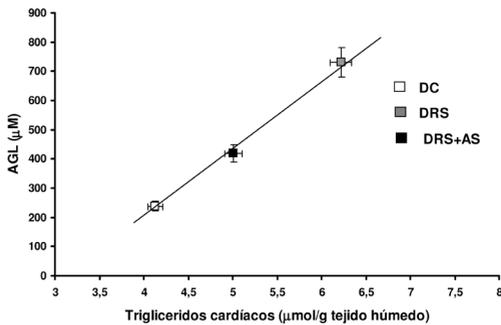
demia, y resistencia insulínica donde se sustituyó la fuente grasa dietaria (aceite de maíz, rico en LA por aceite de soja rico en ALA) durante los dos últimos meses de ingesta, son:

- 1) Una normalización de los niveles plasmáticos de colesterol total y de la relación porcentual HDL colesterol / Colesterol total.
- 2) Una disminución significativa de los niveles plasmáticos de AGL y triglicéridos, asociados a una menor velocidad de secreción hepática de VLDL-Tg y una mejora en la remoción plasmática de triglicéridos. Ninguno de estos parámetros logra normalizarse.
- 3) Una disminución significativa del contenido de triglicéridos hepáticos y musculares que no alcanzan los valores observados en los animales de igual sexo y edad alimenta-

Figura 3. Correlación entre el contenido de triglicéridos del músculo cardíaco y los niveles de AGL en ratas alimentadas con dieta control (DC), dieta rica en sacarosa (DRS) o DRS con aceite de soja como fuente grasa (DRS + AS).

Los valores expresan el promedio \pm SEM de 6 animales en cada lote.

n= 18; r= 0.81 p<0.01



dos con dieta control. 4) La moderada hiperglucemia y la resistencia insulínica periférica global presente en los animales crónicamente alimentados con DRS no se modificó. 5) El incremento de peso corporal y adiposidad visceral fue semejante independiente del tipo de aceite utilizado.

En trabajos previos (7) así como en el presente, hemos demostrado que dietas ricas en sacarosa conducen a hipertrigliceridemia como resultado de una acelerada secreción hepática de VLDL-Tg y una menor remoción plasmática de triglicéridos circulantes. Esto se asocia con un mayor contenido de triglicéridos hepáticos y un incremento de las actividades de las enzimas

lipogénicas y menor actividad de las enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos (7,26,27). Los posibles mecanismos íntimos involucrados en estos procesos podrían relacionarse con una regulación negativa de la expresión génica del receptor activador de proliferación peroxisomal alfa (PPAR α) y una regulación positiva de la expresión génica del elemento regulador de esteroides-proteína de unión (SREBP-1) (27).

Diferentes estudios avalan el hecho que los ácidos grasos poliinsaturados n-3 mejoran la dislipidemia, la síntesis hepática de lípidos y aumentan la oxidación de ácidos grasos tanto a nivel hepático como muscular (7,27,28). De la familia de PUFAs n-3, los principales en ejercer dichas funciones son los EPA y DHA, presentes mayoritariamente en los peces y algas marinos. El ALA es el ácido graso esencial de origen vegetal precursor del EPA y DHA en hígado. En el presente trabajo, utilizando el aceite de soja durante dos meses se logra mejorar la dislipidemia presente en los animales alimentados con DRS pero sin alcanzar los valores observados en los animales de igual sexo y edad alimentados con dieta control. Si bien en estudios in vivo se demostró que el % de conversión de ALA dietario en ácidos grasos de cadena larga es bajo (8-15%), tanto la cantidad de ALA como la relación entre ALA y LA parecen jugar un papel importante en la regulación de la dislipidemia (29,30). En un trabajo reciente (31) administrando semilla de chia (rico en ALA) por un período de dos meses, demostramos una normalización de la dislipidemia e insulina resistencia sin cambios en los niveles de insulina plasmática en animales crónicamente alimentados con DRS. La discrepancia entre los resultados de ambos trabajos de nuestro grupo podría deberse tanto a la cantidad absoluta de ALA (semilla de chia: 64.6%

de ALA / 100 g de ácidos grasos totales vs aceite de soja: 7,7% de ALA/ 100 g de ácidos grasos totales), como a la relación entre LA/ALA (0.287 semilla de chía vs 7.1 en aceite de soja). Ambos ácidos grasos, LA y ALA, compiten por las desaturasas y elongasas para poder convertirse en ácidos grasos de cadena larga (30) y el LA reduce los niveles del delta 6 desaturasa. Jeffrey y col (32) demostraron que el máximo efecto hipotriglicéridémico e hipocolesterolémico en las ratas se observa cuando la relación LA/ALA es de 0.33, sugiriendo que el ALA ejerce su efecto por conversión en EPA que se incorpora a los lípidos de membrana.

El mejoramiento, sin normalización, en la dislipidemia en los animales alimentados con soja es el resultado de una menor secreción de VLDL-Tg y mayor remoción plasmática de triglicéridos. Mas aún, en estos animales la menor disponibilidad de ácidos grasos circulantes podría ser una de las causas del menor contenido de triglicéridos hepático, aun sin llegar a valores normales. Es importante destacar que cuando la fuente de α -linolénico en la DRS fue la semilla de chia (31) no se alcanza a normalizar el contenido hepático de triglicéridos, sugiriéndose que a pesar del alto contenido de ALA y la buena relación LA/ALA, el tiempo de sustitución de la grasa dietaria no alcanzaba para mejorar dicho parámetro. Al respecto Ide y col (33) mostraron que el ALA es un ácido graso que sigue principalmente la vía de la oxidación y por lo tanto está menos disponible para la síntesis de triglicéridos y secreción de VLDL-Tg. Ratas normales alimentadas con perrilla (rico en ALA) induce la expresión génica del mRNA de las enzimas involucradas en la oxidación de ácidos grasos (34). En experiencias similares se observa además una menor expresión y

actividades de la enzima síntetasa de ácidos grasos, enzima clave en la síntesis de los ácidos grasos (35).

Por otra parte en el presente trabajo observamos que la administración del aceite de soja normaliza completamente los niveles de Colesterol total y de la relación HDL-colesterol/Colesterol total (%). Al respecto Ihara y col (36) mostraron que el ALA es un inhibidor mas potente del colesterol sérico que el LA, que se acompaña de una menor expresión de la enzima reguladora del metabolismo del colesterol, HMG-CoA reductasa. El posible mecanismos de la acción del ALA en el descenso del colesterol plasmático parece estar relacionado con la conversión de ALA en EPA.

Diferentes estudios han mostrado que dietas ricas en EPA y DHA mejoran la adiposidad visceral observada en las dietas ricas en sacarosa o grasa (7). En el presente trabajo no observamos un efecto de la sustitución del tipo de aceite en los animales alimentados con DRS ni en el peso corporal total ni en la adiposidad visceral. Al respecto Ghafoorunisa y col (13) mostraron resultados semejantes en ratas alimentadas con DRS durante 3 meses donde sustituyeron un tercio de LA por ALA. Por otra parte hemos demostrado que utilizando aceite de pescado o semilla de chia, es posible revertir la adiposidad visceral y disminuir el incremento de peso corporal en las ratas alimentadas crónicamente con DRS (31,37). Esto nuevamente parece estar relacionado a la relación LA/ALA. Es importante destacar que dicha relación es de 2 en el estudio de Ghafoorunisa, 7,1 en el presente estudio, 0.287 en estudio de semilla de chia y 2.3 cuando se usa aceite de pescado como fuente de grasa dietaria.

La ingesta crónica de DRS se acompaña de moderada hiperglucemia y acentua-

da resistencia insulínica periférica global que se mantiene cuando el tipo de grasa en esta dieta es sustituida isocalóricamente por aceite de soja. La RI está relacionada con los niveles de triglicéridos y AGL circulantes y con el contenido de triglicéridos en tejidos blancos a la acción insulínica tales como el tejido muscular (16). Al respecto vemos una alta correlación entre los niveles de triglicéridos en músculo cardíaco y los AGL en los diferentes lotes experimentales. En su conjunto estos resultados sugieren que los aún elevados lípidos circulantes como así también el contenido de triglicéridos musculares observados en la DRS + PS sería una de las causas de la persistencia en la resistencia insulínica. En concordancia con este concepto, hemos demostrado que tanto la administración de aceite de pescado (7) como de semilla de chia (31), que normalizan completamente los niveles de lípidos circulantes y de triglicéridos musculares son capaces de revertir la resistencia insulínica observada en la DRS. Además, la relación entre las cantidades de LA y ALA y su interacción competitiva en el metabolismo para convertirse en ácidos grasos de cadena larga afectan el perfil de los ácidos grasos de membrana, cambiando la fluidez de la misma y/o señales de los mensajeros de la acción insulínica como el diacilglicerol, que son considerados factores críticos que influyen tanto la secreción como la actividad biológica de la insulina (38,39). Si bien no conocemos la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana en los animales alimentados con DRS + AS, la alta relación LA/ALA presente en el aceite de soja podría ser la causa de la ausencia de un mejoramiento de la resistencia insulínica. Al respecto, Robbez Mason y col (40) demostraron en ratas alimentadas durante 8 semanas con fructo-

sa y 8% de aceite de lino (relación LA/ALA: 0.96) que la dieta rica en ALA que es capaz de decrecer la hipertrigliceridemia no puede prevenir la resistencia insulínica desarrollada por la ingesta de fructosa. Esto se debe principalmente a la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana. Además de la relación entre n-6/n-3, el tiempo de administración de las dietas también parece influir en la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana. Al respecto, Ghafoorunisa y col (13) demostraron una mejora en la sensibilidad insulínica en ratas alimentadas con DRS cuando la dieta que tiene una relación LA/ALA de 2 es administrada durante 3 meses. Estos animales presentan altos niveles de n-3PUFAs en los fosfolípidos de membrana tanto en el tejido adiposo como en el músculo esquelético.

En resumen, estos hallazgos muestran que el aceite de soja ejerce su mayor efecto beneficioso decreciendo los niveles de colesterol y de HDL colesterol del plasma, sin producir un efecto deletéreo en la resistencia insulínica ni en la homeostasis de la glucosa. Si bien los resultados obtenidos no pueden ser extrapolados en forma directa al humano, pueden aportar nuevos datos en el planteo de políticas de salud tendientes a cambiar hábitos alimentarios con el propósito de mejorar algunas de las patologías asociadas al Síndrome Plurimetabólico, de alta incidencia en nuestra población.

Agradecimientos

El presente estudio fue financiado por Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y CONICET. Subsidio PICTO 05-35670 BID 1728 OC/AR 2005 y PIP N° 5619/2005.

Referencias bibliográficas

1. Schargrodsky, H.; Hernández-Hernandez, R.; Champagne, M.; Silva, H.; Vinuesa, R.; Silva-Ayco-guer, L.C.; Touboul, P.J.; Boissonnet, C.P.; Escobedo, J.; Pellegrini, F.; Macchia, A.; Wilson, E. 2008. CARMEA: assessment of cardiovascular risk in seven Latin American cities. *Am. J. Med.* **121**: 58-65.
2. Tryong, H.; DiBello, J.R.; Ruiz Narvaez, E.; Kraft, P.; Campos, H.; Baylin, A. 2009. Does genetic variation in the $\Delta 6$ desaturase promoter modify the association between α -linolenic acid and the prevalence of metabolic syndrome? *Am. J. Clin. Nutr.* **89**: 920-925.
3. Chew, G.T.; Gan, S.K.; Watts, G.F. 2006. Revisiting the metabolic syndrome. *Med. J. Aust.* **185**: 445-448.
4. Roberts, S.B. 2000. High glycemic index food, hunger and obesity: is there a connection? *Nutr. Rev.* **58**: 163-169.
5. Esposito, K.; Ceriello, A., Giugliano, D. 2007. Diet and the metabolic syndrome. *Metab. Syndr. Relat. Disord.* **5** : 291-296.
6. Feldeisen, S.E.; Tucker, K.L. 2007. Nutritional strategies in the prevention and treatment of metabolic syndrome. *Applied Physiol. Nutr. Metab.* **32**: 46-60.
7. Lombardo, Y.B.; Chicco A. 2006. Effects of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistant in rodents and humans. A Review. *J. Nutr. Biochem.* **17**: 1-13.
8. Freese, R.; Mutanen, M. 1997. Alpha-linolenic acid and marine long-chain n-3 fatty acids differ only slightly in their effects on hemostatic factors in healthy subjects. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**: 591-598.
9. Sanderson, P.; Finnegen, Y.E.; Williams, C.M.; Calder, P.C.; Burdge, G.C.; Wootton, S.A.; Griffin, B.A.; Millward, D.J.; Pegge, N.C.; Bemelmans, W.J.A. 2002. UK food Standards Agency α -linolenic acid workshop report. *British J. of Nutr.* **88**: 573-579.
10. Kim, H.K.; Choi, H. 2001. Dietary alpha-linolenic acid lowers postprandial lipid levels with increase of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid contents in rat hepatic membrane. *Lipids* **36**: 1131-1136.
11. Kim, H.K.; Choi, S.; Choi, H. 2004. Supresión of hepatic fatty acid synthase by feeding α -linolenic acid rich perrilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats. *J. Nutr. Biochem.* **156**: 485-492.
12. Ide, T.; Kobayashi, H.; Ashakumary, L.; Rouyer, I.A.; Takahaswhi, T.; Aoyama, T.; Hashimoto, T.; Mizugaki, M. 2000. Comparative effects of perrilla oil and fish oil on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* **1485**: 23-35.
13. Ghafoorunissa, Ibrahim A.; Natarajan, S. 2005. Substituting dietary linoleic acid with alpha linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose-fed rats. *Biochem. Biophys. Acta.* **1733**: 67-75.
14. Gutman, R.; Basílico, 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**: 1013-1020.
15. Chicco, A.; Basabe, J.C.; Karabatas, L.; Ferraris, N.; Fortino, A.; Lombardo, Y.B. 2000. Troglitazone (CS-045) normalize hypertriglyceridemia and restores the altered pattern of glucose-stimulated insulin secretion in dyslipemic rats. *Metabolism.* **49**: 1346-1351.
16. Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Karabata, 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.
17. Pighin, D., Karabatas, L.; Rossi, A.; Chicco, A.; Basabe, J.C.; Lombardo, Y.B. 2003. Fish oil affects pancreatic storage, pyruvate dehydrogenase complex activity and insulin secretion in rats fed a sucrose-rich diet. *J. Nutr.* **133**: 4095-4101.
18. Bernard, M.C.; Hein, G.; Chicco, A.; Lombardo, Y.B. 2006. Polyunsaturated fatty acids (n-3) from vegetable source improve lipid metabolism in dyslipemic insulin resistant rats. 24th International Symposium on Diabetes and Nutrition. Salerno. Italia.

19. Laurell, S.A. 1966. A method for routine determination of plasma triglyceride. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **18**: 668-672.
20. Otway, S.; Robinson, D.S. 1967. The use of non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions. *J. Physiol.* **190**: 321-333.
21. Lombardo, Y.B.; Chicco A.; D'Alessandro, M.E.; Maertinielli, 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.
22. Lewis, B.; Boberg, J.; Mancini, M.; Carlson, L.A. 1972. Determination of the intravenous tolerance test with intralipid by nephelometry. *Atherosclerosis.* **15**: 83-86.
23. Bernal, C.; Basílico, M.Z.; Gutman, R.; Lombardo, Y.B. 1989. Secretion and removal rates of very low density lipoprotein triglycerides at the three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose-rich diet. *Nutr. Rep. Int.* **40**: 71-83.
24. De Fronzo, R.A.; Tobin, J.D.; Andres, R. 1979. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol.* **273**: E214-E223.
25. Snedecor, G.W.P.; Cochran, W.G. *Statistical Methods.* Ames, Iowa University Press IA pp 339-350.
26. Lombardo, Y.B.; Hein, G.; Chicco, A. 2007. Metabolic Syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids.* **42**: 427-437.
27. Nagai, Y.; Nishio, Y.; Nakamura, T.; Maegawa, H.; Kikkawa, R.; Kashiwagi, A. 2002. Amelioration of high fructose induced metabolic derangements by activation of PPAR α . *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**: E1180-E1190.
28. Clarke, S.D. 2001. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J. Nutr.* **131**: 1129-1132.
29. Kris-Etherton, P.M.; Taylor, D.S.; Yu-Poth, S.; Huth, P.; Moriarty, K.; Fishell, V.; Hargrove, R.L.; Zhao, G.; Etherton, T.D. 2000. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 179S-188S.
30. Benatti, P.; Peluso, G.; Nicolai, R.; Calvani, M. 2004. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**: 281-302.
31. Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Hein, G.; Oliva, M.E., Lombardo, Y.B. 2009. Dietary chia seed (*Salvia hispanica L*) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalizes hypertriglycerolaemia and insulin resistance in dyslipemic rats. *British J. of Nutr.* **101**:41-50.
32. Jeffery, N.M.; Sanderson, P.; Sherrington, E.J.; Newsholme, E.A.; Calder, P.C. 1996. The ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids in the rat diet alters serum lipid levels and lymphocyte function. *Lipids.* **31**: 737-745.
33. Ide, T.; Murata, M.; Sugano, M. 1996. Stimulation of the activities of hepatic fatty acid oxidation enzymes by dietary fat rich in alpha-linolenic acid in rats. *J. Lipid Res.* **37**: 448-463.
34. Ide, T. 2000. Effect of dietary alpha-linolenic acid on the activity and gene expression of hepatic fatty acid oxidation enzymes. *Biofactors.* **13**: 9-14.
35. Kabir, Y.; Ide, T. 1996. Activity of hepatic fatty acid oxidation enzymes in rats fed alpha-linolenic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **1304**: 105-119.
36. Ihara, M.; Umekawa, H.; Takahashi, T.; Furuchi, Y. 1998. Comparative effects of short and long-term feeding of safflower oil and perilla oil on lipid metabolism in rats. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* **121**: 223-231.
37. Soria, A.; Chicco, A.; D'Alessandro, M.E.; Rossi, A.; Lombardo, Y.B. 2002. Dietary fish oil reverse epididymal tissue obesity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model. *J. Nutr. Biochem.* **13**: 209-218.

- 38.** 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.
- 39.** Storlien, L.H.; Kriketos, A.D.; Calvert, G.D.; Baur, L.A.; Jenkins, A.B. 1997. Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance. *Prostaglandins Leuko. Essent. Fatty Acids.* **57**: 379-385.
- 40.** Robbez Masson, V.; Lucas, A.; Gueugneau, A.M.; Macaire, J.P.; Paul, J.L.; Grynberg, A.; Rousseau, D. 2008. Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids prevent metabolic and vascular disorders in fructose-fed rats. *J. Nutr.* **138**: 1915-1922.