

SECCIÓN II

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LOS CLA SOBRE RECUPERACIÓN POST DEPLECIÓN PROTEICA LEVE EN RATAS

La segunda parte de este trabajo de tesis se llevó a cabo teniendo como objetivo investigar los potenciales beneficios de la suplementación lipídica con CLA sobre la capacidad de recuperación de los efectos catabólicos de la malnutrición proteica leve en un modelo experimental de ratas, utilizando dos niveles de grasa dietaria: normal y elevado. Los CLA son reconocidos por sus propiedades bioactivas, entre ellas, pueden mejorar el status proteico al incrementar la masa corporal magra (Park y col, 1997; Evans y col, 2002) y reducir la respuesta catabólica inducida por estimulación inmune (Cook y col, 1993; Miller y col, 1994). Por ello, hipotetizamos que la ingesta de CLA podría mejorar el status proteico luego de una depleción de proteínas dietarias. Así, investigamos el impacto potencial de los CLA a dos niveles de grasa dietaria sobre la recuperación post estados catabólicos leves. De esta manera, este modelo experimental podría contribuir a mejorar las intervenciones nutricionales para superar la etapa de déficit de proteínas. Los temas abarcados incluyen composición corporal, eficiencia del alimento, balance nitrogenado, metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, entre otros.

La depleción proteica en las primeras etapas de la vida y durante el desarrollo se asocia a escaso crecimiento, baja masa corporal y acúmulo de TG en el hígado (Waterlow, 1996, Soliman y col, 2000, Blanchard y col, 1979). Durante estas etapas, todas o algunas de estas alteraciones pueden revertirse mediante una adecuada intervención nutricional, y así prevenir consecuencias severas.

Las repercusiones de la depleción proteica dependen de la fase de la vida seleccionada en el modelo animal (White y col, 2000, Gosby y col, 2003). Utilizamos un modelo experimental de parcial restricción proteica en ratas macho jóvenes en edad de crecimiento donde la demanda proteica y la tasa de retención de nitrógeno son muy elevadas (White y col, 2000). Para la recuperación de este estado se

utilizaron dietas con niveles recomendados o elevados de grasa, conteniendo o no CLA.

1.- COMPOSICIÓN CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA

En diferentes modelos animales de depleción proteica (Blanchard y col, 1979, Holness y col, 2000, Gomes y col, 2003) se encontraron alterados el metabolismo energético, proteico y lipídico, coincidiendo con nuestros resultados en ratas jóvenes. Durante el período de restricción proteica, la ganancia de peso corporal fue muy baja (aproximadamente 1 g/día), a pesar de que la ingesta energética afectada por el peso metabólico del animal fue superior a la observada en animales alimentados con niveles normales de proteínas dietarias, coincidiendo con los resultados de Boualga y col (2000), luego de una restricción proteica de 28 días. Se ha sugerido que animales en crecimiento recibiendo dietas restringidas en proteínas incrementan la ingesta de alimento en un intento de alcanzar así su requerimiento proteico (Webster y col, 1993). Du y col (2000) evaluaron la ingesta en función de la concentración de proteínas dietarias, y hallaron que la mayor ingesta de alimento se da cuando éste posee entre un 8 y un 10% de caseína. Estos resultados indicarían que un óptimo crecimiento no puede llevarse a cabo sin el adecuado aporte de proteínas dietarias.

En nuestro modelo la restricción leve de proteínas dietarias condujo a una baja eficiencia de conversión de nutrientes. Si bien la retención de proteínas y lípidos fue baja, la composición corporal de los animales permaneció invariable con respecto a los valores basales. Aunque no fuera significativo, hallamos un leve aumento en el contenido de grasa corporal, que coincide con los hallazgos de otros autores como Even y col (2002) y White y col (1994). Du y col (2000) encontraron una redistribución de la energía corporal desde las proteínas hacia la grasa cuando el contenido de proteínas dietarias fue aproximadamente 5%. Un mecanismo que

podría explicar el incremento en la grasa corporal podría estar relacionado a elevados niveles de leptina plasmática (Ferreira y col 2007). Aunque las razones no son claras, diferencias de especie y edad de los animales podrían también explicar las discrepancias.

El grado de depleción proteica mantuvo siempre un balance nitrogenado positivo, pese a que el mismo fue muy bajo para animales en este grupo etario. Como era de esperar y coincidiendo con otros autores, fueron encontrados bajos niveles de proteínas plasmáticas (Kern y col, 2002), hepatomegalia (Kim y col, 2003) y esteatosis (Blanchard y col, 1979), características de este modelo. Todos los resultados obtenidos nos demuestran que la ingesta de dietas con bajo contenido de proteínas induce un estado catabólico leve y deteriora el estado nutricional general de los animales.

Para la recuperación nutricional utilizamos niveles recomendados de proteínas dietarias (Reeves y col, 1993). Años atrás se sugería un elevado contenido proteico en las dietas para la recuperación post malnutrición, pero esta opción ha sido descartada. Así, utilizando un modelo experimental, Kern y col (2002) demostraron que la repleción con altos niveles de proteínas (40% p/p) no provee beneficios con respecto al crecimiento o al status de las proteínas séricas, y que además genera hipertrofia del hígado y riñones. En nuestro trabajo, al normalizar los niveles de proteínas dietarias del 5 al 20% (p/p), manteniendo constantes todos los otros parámetros dietarios, no se observaron efectos adversos.

La restauración de las proteínas dietarias generó una significativa mejora en el estado nutricional general con todas las dietas empleadas, resultados coincidentes con los de Boualga y col (1999). El incremento en la ingesta de proteínas restituyó la ganancia de peso corporal, aumentando en forma directa las proteínas séricas y el balance nitrogenado diario. Al mismo tiempo, el tamaño del hígado se normalizó, coincidiendo este hallazgo con el reportado por Blanchard y col (1979). Igualmente, se observó una mayor eficiencia en la conversión de nutrientes, incrementando la retención de proteínas y lípidos, hallazgo reportado también por Kern y col (2002)

en ratas recuperadas con niveles semejantes de proteínas dietarias. Estos cambios se vieron asociados a un aumento en el porcentaje de grasa corporal. Dulloo y Girardier (1990) reportaron que el incremento de peso post restricción se debe fundamentalmente a una mayor ganancia de grasa corporal. Nuestros resultados coinciden con los mencionados hallazgos, aunque el modelo experimental de estos autores se basa en una restricción de energía y de proteínas dietarias.

Al considerar el nivel de grasa dietaria en la recuperación de estados de depleción proteica, las dietas hiperenergéticas con elevado contenido de ácido linoleico, independientemente de la presencia de CLA, no modificaron la ganancia de peso. Tal como se esperaba, la composición corporal mostró una tendencia a incrementar el contenido de grasa, llevando a un aumento en la retención energética como grasa en la carcasa y en el peso del tejido adiposo epididimal. Estos resultados se correlacionan con un incremento en la eficiencia energética, coincidiendo con los de Yang y col (2006) en ratas alimentadas con un 14% de grasa dietaria sin restricción previa. La retención energética como proteína en carcasa no se vio afectada, a pesar de una disminución del 14% en el balance nitrogenado a elevados niveles de grasa dietaria. Esta aparente discrepancia podría relacionarse con el hecho de que la retención proteica en carcasa representa solo una parte del metabolismo proteico corporal, el cual es mejor reflejado en su integridad por el balance nitrogenado *in vivo*. La disminución en el balance nitrogenado diario observada en los animales alimentados con elevado contenido de grasa dietaria es principalmente debida a una menor ingesta de alimento, y por consecuencia, de nitrógeno que no es totalmente compensada por la excreción.

A pesar de que el impacto nutricional de los CLA sobre animales con depleción proteica, a nuestro conocimiento, no ha sido estudiado, sus efectos sobre la ganancia de peso y la composición corporal son controversiales. En la bibliografía (DeLany y col, 2000; Park y col, 1997 y 2007; Terpstra y col, 2002), los efectos más consistentes fueron reportados en modelos de ratón sin restricción nutricional, donde el descenso de peso y la marcada disminución en el porcentaje de

grasa corporal son acompañadas de un incremento en el contenido de proteínas, agua y cenizas. Esto fue observado como consecuencia no sólo de la administración de CLA sino también de otros isómeros, como el ácido eicosadienoico conjugado (Park y col, 2005b), lo que sugeriría que las alteraciones a nivel de la composición corporal son generadas por los CLA en forma directa y a través de sus metabolitos derivados. Específicamente, en esta parte del estudio llevada a cabo en ratas de la cepa Wistar no se observaron efectos de la suplementación con CLA a ninguno de los niveles de grasa dietaria utilizados (7 y 20%) sobre la ganancia de peso, composición corporal y peso de tejidos u órganos, con excepción del tejido adiposo epididimal, en el cual los CLA previnieron el incremento de peso causado por la ingesta de dietas con elevado contenido de grasa. Posiblemente, sería necesario exceder una dosis umbral de CLA para obtener el efecto en el peso del tejido adiposo epididimal que se alcanza con un 3% de CLA. Este efecto no se correlacionó con alteraciones en la composición de la carcasa, lo que podría deberse, según Azain y col (2000) a que la sensibilidad del análisis químico es menor que la determinación del peso del tejido, y a que las ratas de la cepa Wistar podrían ser resistentes a cambios en la composición corporal. Yamasaki y col (2003) demostraron que el efecto de los CLA sobre la modulación de la composición corporal y el peso de los tejidos depende del nivel de grasa dietaria. Sin embargo, en sus estudios, la influencia más clara se observó con un 4% de la misma, sin encontrar grandes diferencias entre los animales alimentados con niveles normales (7%) y levemente elevados (10%). Cabe destacar que estos autores no trabajaron con niveles elevados de grasa dietaria similares a los nuestros.

Los pocos cambios inducidos por los CLA en nuestro modelo dietario concuerdan con resultados de otros autores en animales bien nutridos alimentados con niveles normales (Patureau Mirand y col, 2004; Kim y col, 2002, Azain y col, 2000) y elevados (Kim y col, 2002) de grasa dietaria. Hemos visto anteriormente que los CLA generan hepatomegalia en ratones y hamsters (Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000; Macarulla y col, 2005), aunque en otros modelos experimentales esto no fuera hallado, quizás debido, entre otros factores, a una diferencia de especie. La

ausencia de hepatomegalia observada concuerda con otros resultados en la misma especie en animales bien nutridos (Park y col 2005a, Yamasaki y col 2003, Martin y col 2000). En nuestro estudio los CLA tampoco ejercieron un significativo efecto sobre el status proteico tisular o plasmático en la etapa de repleción proteica, sin importar el nivel de grasa dietaria. La falta de efecto de los CLA sobre la retención nitrogenada se reflejó en la ausencia de cambios en la masa muscular, el balance nitrogenado diario y las proteínas plasmáticas. Estos resultados coinciden con los de otros autores (Azain y col, 2000; Park y col, 2005a; Alasnier y col, 2002). Patureau Mirand y col (2006) fueron los únicos en mostrar un limitado pero diferencial efecto de los CLA sobre el anabolismo proteico tisular, sin hallar cambios en las cantidades de proteínas musculares. El efecto de la administración de los diferentes tipos de isómero separados o la mezcla de los mismos podría ser relevante en dicha acción dependiendo si el recambio proteico es bajo o elevado.

El efecto de los CLA sobre las reservas energéticas en relación a períodos de restricción fue evaluado por dos autores en modelos animales diferentes a los nuestros. Por un lado, Park y col (2007) evaluaron el efecto de los CLA a niveles normales de grasa dietaria sobre la recuperación nutricional posterior a una restricción energética en ratones. Los autores hallaron que la ingesta de CLA redujo el incremento del peso y la ganancia de grasa corporal, explicado sólo en parte por un descenso en la ingesta de alimento. Por otro lado, Stangl (2000), en ratas en las que se induce la movilización de reservas de grasa a través de una restricción energética posterior a la ingesta de CLA, observó que los mismos disminuyen el contenido de grasa corporal e incrementan la ganancia de masa magra. La discrepancia en los resultados obtenidos podrían deberse a las diferentes especies animales utilizadas, a los distintos tipos de restricción dietaria aplicados y a los momentos en que se realizó la misma.

Las condiciones experimentales como edad y especie del animal, así como nivel y tipo de isómero y duración del tratamiento, juegan un rol importante en la manera en que los CLA afectan la composición corporal. Según varios autores

(Hargrave y col, 2002; Warren y col, 2003), los efectos de los CLA, especialmente a nivel de tejido adiposo, serían mediados por el isómero *t10,c12*-CLA, al igual que los efectos sobre el metabolismo lipídico en general, como fuera mencionado anteriormente. Por otro lado, la capacidad de los CLA de alterar la composición corporal no sólo ha sido reportada en roedores. Corino y col (2002) observaron que la ingesta de CLA disminuye la deposición grasa en conejos, y varios autores han hecho referencia a las alteraciones observadas en cerdos y otras especies animales criadas para el consumo de su carne (Ostrowska y col, 1999; Ramsay y col, 2001). Con respecto a los efectos diferenciales según el sexo del animal, Poulos y col (2001) evaluaron la incidencia de la ingesta de mezcla de CLA en ratas machos y hembras durante el período pre- y post-natal. Uno de sus hallazgos más llamativos fue que las hembras presentaron menos tejido adiposo y los machos un mayor incremento de los pesos de los músculos soleus y gastrocnemius.

Entre los mecanismos de acción de los CLA propuestos se ha descrito (West y col, 1998) el incremento de la tasa metabólica, aumentando así el gasto energético. Diversos estudios (DeLany y col, 2000; West y col, 2000; Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000) reportaron que la ingesta de CLA incrementa la expresión de las proteínas desacoplantes (UCPs) en varios tejidos, como músculo esquelético, tejido adiposo y riñón. Otros mecanismos involucrados específicamente en la reducción de la masa de tejido adiposo, a nivel de la proliferación, diferenciación y apoptosis de los adipocitos fueron comentados anteriormente.

En nuestro estudio la ingesta de CLA no alteró la retención de energía en la carcasa como grasa ni como proteínas, ni la eficiencia energética. Estos resultados coinciden con los de Martin y col (2000), Kloss y col (2005), Inoue y col (2006), Patureau Mirand y col (2004) y Hwang y col (2007). Sin embargo, otros autores hallaron diferencias en otras especies. Zabala y col (2006a) encontraron un incremento en la eficiencia energética utilizando hamsters, mientras que West y col (1998 y 2000) y Terpstra y col (2002) reportaron una disminución trabajando con ratones. West y col (1998 y 2000) reportaron que en ratones alimentados con CLA,

tanto a niveles normales como elevados de grasa dietaria, el gasto energético se incrementó continuamente a lo largo del tratamiento, en forma suficiente para disminuir las reservas grasas. Terpstra y col (2002) coincidieron con estos resultados, y además reportaron un aumento de la energía eliminada en las excretas, una disminución en la cantidad retenida en el organismo y, como consecuencia, una menor eficiencia energética. Chin y col (1994) demostraron que los CLA podrían actuar como un factor de crecimiento en ratas, mejorando la eficiencia energética e incrementando el crecimiento en crías nacidas de madres alimentadas con CLA. Pariza y col (2001) reportaron que los CLA pueden aumentar el crecimiento y la eficiencia del alimento, efecto atribuido al isómero *c9,t11*-CLA, mientras que el isómero *t10,c12*-CLA podría incluso disminuir estos parámetros.

La ingesta de CLA, al igual que los elevados niveles de grasa dietaria, no modificó la absorción aparente de la grasas dietaria. Este resultado coincide con lo reportado por Javadi y col (2007) en un modelo de ratones sin restricción proteica previa.

La relevancia de los CLA para el tratamiento de la obesidad en humanos no fue aun totalmente clarificada, aunque muchos trabajos en animales evidencian efectos anti-obesidad; y la interpretación de los datos es muy conflictiva. Se han realizado muchos estudios evaluando los efectos de los CLA sobre el descenso de peso en humanos, pero en la mayoría no se observaron cambios. Solo un estudio (Gaullier y col, 2004) reportó una disminución significativa de peso luego de un año de tratamiento, sin mostrar un efecto opuesto durante un año subsiguiente de consumo de placebo (Gaullier y col, 2005). Los cambios en composición corporal han sido determinados en una cantidad insuficiente de individuos por diversos métodos, y solo en unos pocos estudios se observó una disminución significativa de la masa grasa (Gaullier y col, 2004; Blankson y col, 2000; Thom y col, 2001; Smedman y Vessby, 2001), y en algunos de ellos la intervención nutricional se asoció a la práctica de ejercicio. Por esto, se deduce que no hay evidencia suficiente que demuestre que la ingesta de CLA tiene un efecto manifiesto sobre la

composición corporal en humanos, y menos aún, que ejerza un potencial efecto benéfico sobre la recuperación de estados catabólicos como el generado a través de una depleción proteica leve.

2.- METABOLISMO DE LÍPIDOS

2.A.- LÍPIDOS PLASMÁTICOS

Como es característico, la depleción de proteínas dietarias alteró el perfil de lípidos plasmáticos. Así, la disminución de los niveles de TG circulantes hallada con respecto al grupo control basal, que representa las condiciones al inicio de la experiencia, concordó con los resultados de Boualga y col (1999) y con los de Gouache y col (1991), en modelos similares al nuestro pero de mayor tiempo de restricción proteica. Los bajos niveles de colesterol hallados se contradicen con los de Gouache y col (1991), quienes encontraron valores incrementados, mientras que Meghelli-Bouchenak y col (1989) no hallaron cambios en los niveles de HDL-C, ni LDL-C. Dado que los niveles de TG circulantes pueden estar relacionados al equilibrio entre la velocidad de secreción hepática y la capacidad de remoción tisular de los TG-pre- β -lipoproteínas, la disminuida velocidad de secreción de TG (VSTG) observada podría explicar, al menos en parte, los bajos valores de TG plasmáticos encontrados en restricción proteica. La remoción de TG circulantes está fundamentalmente relacionada a la utilización y/o almacenamiento de los mismos, dependiendo del estado fisiológico del animal, en la cual la actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) en tejido adiposo y en músculo esquelético juega un rol preponderante. La elevada actividad LPL en tejido adiposo podría ser otro mecanismo que contribuya a los bajos valores de TG circulantes, concordando a su vez con la redistribución de la energía corporal hacia el mantenimiento de los depósitos grasos observado por Du y col (2000). Boualga y col (1999) hallaron una

disminución en la actividad LPL en tejido adiposo epididimal, difiriendo con nuestros resultados.

La repleción proteica incrementó los lípidos plasmáticos en forma dependiente del nivel de grasa dietaria e independiente de la presencia de CLA. Al normalizar el contenido de proteínas dietarias, el incremento en los niveles de colesterol estuvo directamente relacionado a la ingesta de grasa, coincidiendo con los resultados de Yang y col (2007) en animales bien nutridos. Un efecto diferente fue observado con el incremento del contenido de TG plasmáticos, donde la recuperación con niveles recomendados de grasa dietaria indujo un incremento muy marcado.

Cabe consignar que la VSTG es el resultado de la velocidad de acumulación de TG en el plasma por la inhibición de un agente que bloquea la remoción de los mismos, afectado por el volumen de distribución de los TG (volumen plasmático, V_p) y por el peso del animal (P). Dado que el V_p no guarda una relación lineal con el P (Wang y Hegsted, 1949), cuando los animales poseen gran diferencia de peso, la comparación de la VSTG no es apropiada, como sería el caso entre los animales del grupo control y los sometidos a restricción proteica. En consecuencia, entre ellos comparamos la velocidad de acumulación de TG en plasma, que no es afectada por el peso del animal. Así, encontramos que ésta fue 33% superior en los animales de grupo control. Este resultado explica el gran incremento de los TG plasmáticos en este grupo dietario.

La recuperación nutricional con niveles elevados de grasa dietaria también incrementó los TG circulantes, pero en menor medida que con niveles recomendados de la misma. Esto se asoció a una menor VSTG y a una elevada contribución en la remoción por parte de la LPL del tejido adiposo, resultado coincidente con lo hallado por Yang y col (2007) en un modelo de ratas alimentadas con elevados niveles de grasa dietaria, principalmente del tipo insaturada, sin restricción previa.

La presencia de CLA no afectó los lípidos plasmáticos, lo que se asoció a la ausencia de cambios en la remoción de los TG circulantes por medio de las enzimas LPL de músculo y tejido adiposo. El ligero incremento de la VSTG por la presencia de CLA a elevados niveles de grasa dietaria no alteró la concentración de TG plasmáticos. Stangl (2000) observó que la ingesta de CLA redujo la concentración de VLDL, en un modelo en el que se induce la movilización de reservas grasas a través de una restricción energética. La diferencia podría deberse a la necesidad, en este último caso, de mantener una acelerada oxidación grasa para adquirir energía. Otros autores no encontraron diferencias en los niveles séricos de TG y colesterol en ratas bien nutridas alimentadas con una dieta rica en CLA (Akahoshi y col, 2003; Azain y col, 2000; Kloss y col, 2005), así como tampoco se halló dependencia del tipo de isómero CLA consumido (Akahoshi y col, 2003). En otras especies se han obtenido diversos resultados, como hemos analizado en la primera parte de este trabajo de tesis.

2.B.- LÍPIDOS TISULARES

El hígado de los animales sometidos a restricción proteica presentó esteatosis, coincidiendo con los resultados de Boualga y col (1999) y Bouziane y col (1994). El acúmulo de TG hepáticos se correlacionó con la menor VSTG observada. Otros autores (Bouziane y col 1992), coincidiendo con nuestros resultados, han demostrado que la malnutrición proteica altera la composición de VLDL, disminuyendo las cantidades de apolipoproteínas, fosfolípidos y TG, como asimismo reduce los niveles de VLDL-TG circulantes. Bajo esta hipótesis, la restricción proteica conduciría a una menor síntesis de apolipoproteínas que alteraría la composición, el ensamble y la secreción de las pre- β -lipoproteínas hepáticas, induciendo un depósito de TG, característico de la esteatosis.

La deposición grasa en el hígado fue revertida durante la repleción proteica. Sin embargo, el nivel de grasa dietaria y la presencia de CLA pueden generar diferentes efectos: las dietas con niveles recomendados de grasa dietaria normalizaron el contenido de TG, mientras que con niveles altos de grasa, la normalización es parcial en ausencia de CLA y total en presencia del mismo. La esteatosis hepática podría estar íntimamente asociada a la VSTG, que fue disminuida por los elevados niveles de grasa dietaria e incrementada por la presencia de CLA, por lo que éstos a elevados niveles de grasa dietaria previenen la esteatosis. Es notable destacar que el efecto preventivo observado en ratas previamente malnutridas es claramente opuesto al observado con los mismos niveles de grasa dietaria y CLA en ratones bien nutridos, detallado en la sección anterior. Esto marca un efecto diferencial de los CLA en distintas especies animales, como también se observa en el tejido adiposo. En este último caso, los CLA previenen el incremento de peso del tejido provocado por elevados niveles de grasa dietaria en ratas, mientras que en el ratón inducen una fuerte atrofia del mismo. Purushotham y col (2007) reportaron que la ingesta de CLA a bajos niveles de grasa dietaria puede disminuir el contenido de TG hepáticos en mayor medida que el aceite de soja cuando la esteatosis es inducida por la ingesta previa de altas cantidades de grasa en lugar de una restricción proteica. Como nosotros observamos este efecto solamente a altos niveles de grasa dietaria, la discrepancia puede deberse a las diferencias del modelo dietario.

Con respecto al músculo gastrocnemius, la depleción de proteínas dietarias disminuyó los niveles de TG con respecto a los valores basales, los cuales se correlacionaron con una baja actividad LPL muscular. Boualga y col (1999) hallaron una disminución en la actividad de la enzima en músculo gastrocnemius, coincidiendo con nuestros resultados.

La ingesta de dietas conteniendo niveles recomendados de proteínas dietarias normalizó el contenido de TG musculares, mostrando valores más similares a los basales como consecuencia de la ingesta de dietas ricas en grasa. Este resultado

coincide con lo reportado por Yang y col (2007) en animales bien nutridos. La presencia de CLA no produjo alteraciones en los niveles de TG musculares ni en la actividad LPL muscular. Zabala y col (2006a) hallaron un descenso en ambos parámetros trabajando con hamsters sin restricción previa, resultados coincidentes con los de la primera parte de este trabajo de tesis, mientras que Henriksen y col (2003) encontraron disminuido el contenido de TG en músculo soleus de ratas diabéticas alimentadas con el isómero *l10,c12*-CLA. Evidentemente, la susceptibilidad de la especie y las condiciones del animal son determinantes en estos parámetros, así como el tipo de isómero utilizado.

3.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL STRESS OXIDATIVO HEPÁTICO

La esteatosis hepática observada en los animales sometidos a restricción de proteínas dietarias podría ser un factor importante en la generación de especies reactivas al oxígeno. La disminución de la cantidad de proteínas dietarias indujo la aparición de stress oxidativo, reflejado por los elevados valores de lipoperoxidación (LPO). Esta acción podría estar mediada, al menos en parte, por una disminución en la cantidad y/o actividad de enzimas antioxidantes claves. Este cuadro podría ser parcialmente compensado por un aumento en el contenido hepático de GSH. En la primera parte de esta tesis vimos que la ingesta de elevadas cantidades de PUFAs, altamente susceptibles a la peroxidación, producía stress oxidativo. En nuestro modelo de ratas, la disminución de las proteínas dietarias podría actuar como otro mecanismo inductor de LPO al comprometer la síntesis de ciertos sistemas enzimáticos antioxidantes como la catalasa. Otros autores (Natarajan y col 2006, Grattagliano y col 2003) evaluaron parámetros relacionados al stress oxidativo en ratas con esteatosis hepática inducida por otras causas (deficiencia de colina dietaria y administración de ácido valproico). Hallaron un incremento en los niveles de LPO y una menor actividad catalasa en hígado, resultados coincidentes con los nuestros. Aunque Grattagliano y col (2003) no encontraron alteraciones en

el contenido de GSH hepático, vieron incrementados todos los sistemas enzimáticos relacionados al mantenimiento del pool de GSH, excepto la enzima glutathion peroxidasa (GSH-Px). Nuestros resultados podrían diferir debido a que el modelo es diferente.

La repleción proteica normalizó los parámetros evaluados independientemente del nivel de grasa dietaria y de la presencia o no de CLA. A diferencia de lo observado en la primera parte de este trabajo de tesis, la ingesta de elevada cantidad de grasa dietaria en un modelo de ratas en recuperación proteica no produjo modificaciones en los parámetros relacionados al stress oxidativo hepático. La ingesta de CLA a los niveles de grasa dietaria evaluados no incrementa los niveles de GSH. Por lo expuesto podemos observar que el ratón sería una especie más susceptible que la rata a los efectos de los CLA dietarios.

4.- METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

Dado que estados de malnutrición están asociados a cambios en el metabolismo de la glucosa y que los CLA podrían prevenir alteraciones en el mismo, evaluamos su influencia en nuestro modelo de recuperación nutricional sobre la asimilación periférica de la glucosa y su metabolismo en los principales órganos implicados. Al menos a nuestro conocimiento, no existen estudios referidos a este tema.

Los animales sometidos a depleción proteica presentaron una rápida utilización de la glucosa luego de una sobrecarga, como es evidenciado por los bajos niveles de glucemia durante el test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG), y por consiguiente, la menor área integrada bajo la curva (AIC). No obstante, los niveles de glucemia en ayuno fueron similares a los del grupo control basal, y al final de la sobrecarga oral los valores retornaron a los observados al inicio de la prueba. Este cambio en la utilización de la glucosa podría deberse a que en estos animales,

malnutridos y en condiciones de ayuno, la glucosa administrada para la realización del test sea muy rápidamente metabolizada, por lo que su remoción del plasma podría ocurrir dentro de los primeros minutos de la prueba. Lifshitz y col (1972) hallaron un incremento en el transporte intestinal de glucosa asociada a un aumento en la utilización de la misma por el intestino de animales malnutridos, apoyando esta hipótesis. En nuestro caso, la mayor utilización de la glucosa se vio acompañada por bajos niveles de la misma, tanto en hígado como en músculo gastrocnemius cuando los animales estaban en estado post prandial. Bajo estas condiciones, particularmente en músculo, se pudo observar que la glucosa tiende preferencialmente a almacenarse bajo la forma de glucógeno. No hay muchos datos actuales sobre la relación entre la restricción de proteínas dietarias y el metabolismo de los hidratos de carbono, asimismo, no se observa una directa relación causa-efecto. Nuestros resultados coinciden con los de Weinkove y col (1976), quienes evaluaron la tolerancia a la glucosa y la liberación de insulina en ratas pequeñas, similares a nuestro grupo Cb, tanto antes como después de 3 semanas de consumo de una dieta con un 4% de proteínas. Estos autores hallaron una disminución en el AIC del TTOG, consecuencia de la depleción proteica, asociada a bajas concentraciones de insulina a lo largo del test y a una menor liberación de glucosa luego de la administración de insulina. Estos hallazgos indicarían que los animales no presentan resistencia a la insulina. La administración de insulina produjo una normal disminución en la glucosa plasmática en los animales alimentados con dieta de restricción, pero la hipoglucemia fue más prolongada. Este resultado concuerda con el bajo contenido hepático de glucosa hallado en nuestros animales. Otros autores (Okitolonda y col 1988, Dardevet y col 1991) también han reportado que la restricción de proteínas dietarias se asocia a bajos niveles de glucosa plasmática en ayunas y a disminuidas concentraciones de insulina. Sin embargo, hallaron un leve incremento en el AIC del TTOG al compararla con un grupo control de la misma edad alimentado con niveles normales de proteínas, lo cual puede ser la causa de las discrepancias con nuestros resultados.

El hígado de los animales sometidos a restricción de proteínas dietarias, además de presentar un bajo contenido de glucosa, mostró un significativo incremento en la concentración de citrato. Este puede estar asociado a la mayor disponibilidad de lípidos observada en estos animales que presentan esteatosis, tema ya desarrollado en la primera parte de esta Discusión. A su vez, pudimos observar que ni las alteraciones a nivel de la utilización de la glucosa, ni este incremento de los niveles de citrato, metabolito regulador de la glucólisis, afectaron la vía glucolítica en hígado y en músculo gastrocnemius.

La repleción proteica tendió a normalizar la utilización periférica de la glucosa. Sin embargo, el nivel de grasa dietaria y la ingesta de CLA tuvieron efectos diferentes: las dietas con un 7% de grasa normalizaron la utilización periférica de la glucosa, independientemente de la presencia de CLA. Elevados niveles de grasa dietaria disminuyeron la tolerancia a la glucosa, como lo demuestra una mayor AIC, pero la suplementación con CLA previno esta alteración. Esta acción de los CLA podría estar relacionada a la prevención del aumento del peso del tejido adiposo ejercida sólo a altos niveles de grasa dietaria.

Escasos trabajos han reportado los efectos de los CLA sobre el metabolismo de la glucosa en ratas normales. Park y col (2005) encontraron una disminución de la glucemia en ayunas en ratas que ingirieron CLA durante 18 meses; en forma semejante, O'Hagan y Menzel (2003), en otro estudio a largo plazo, hallaron que los menores niveles de glucosa en ratas alimentadas con CLA se asociaron a un incremento de los niveles de insulina. Efectos diferentes han sido encontrados por Akahoshi y col (2003), quienes reportaron un aumento en la glucemia, sin alteraciones en los niveles de insulina en ratas alimentadas tanto con mezcla de CLA, como con el isómero *t10,c12*-CLA durante 26 días. Estos hallazgos en ratas bien nutridas no coinciden con la ausencia de cambios en la glucemia en ayunas observada por nosotros. Acerca del TTOG, nuestros resultados están de acuerdo con los de Choi y col (2004) en un modelo con algunas similitudes, pero sin restricción previa. Los autores hallaron una disminución en la resistencia insulínica por efecto

de los CLA administrados a altos niveles de grasa dietaria, asociada a una menor AIC en el TTOG. Posteriormente, (Choi y col 2007) ligaron estos hallazgos a un incremento en la expresión de los receptores hepáticos de adiponectina, lo cual incrementaría la sensibilidad a la insulina y la β -oxidación, aumentando el gasto energético.

Las leves alteraciones inducidas por las distintas condiciones de recuperación nutricional a nivel de la utilización periférica de la glucosa no se vieron reflejadas por cambios significativos en los metabolitos determinados en hígado y músculo gastrocnemius. En ambos tejidos, la repleción de proteínas dietarias normalizó las alteraciones inducidas por la depleción, sin que los distintos niveles de grasa dietaria ni la presencia de CLA induzcan cambios, excepto por el leve incremento en los niveles de glucosa hepática a altos niveles de grasa dietaria. Las variaciones observadas en el TTOG podrían estar relacionadas a mecanismos en los que intervienen reguladores rápidos del metabolismo, como pueden ser adipocitoquinas y hormonas, y no a cambios en la expresión de enzimas intervinientes en el metabolismo hidrocarbonado hepático y muscular, que son alteraciones a más largo plazo.

Por otro lado, los resultados en otras especies son bastante diferentes. En hamsters alimentados con una dieta aterogénica, Simón y col (2006) reportaron que la ingesta de CLA previno el incremento del peso del tejido adiposo, pero no el aumento de las concentraciones plasmáticas de insulina, glucosa y AG libres, sin alterar los niveles de leptina y adiponectina. En ratas obesas diabéticas, varios autores han demostrado que los CLA ejercen efectos benéficos, incrementando la tolerancia oral a la glucosa y disminuyendo los niveles de glucosa, insulina y AG libres en plasma, cambios asociados a una disminución del peso corporal (Henriksen y col, 2003; Nagao y col, 2003; Noto y col, 2007a; Ryder y col, 2001). Los mecanismos mediante los cuales los CLA ejercerían este efecto podrían ser una disminución de los niveles de leptina (Noto y col, 2007b) y un incremento de los de adiponectina (Nagao y col, 2003). Estos resultados nos indican que el efecto de los

CLA sobre la resistencia insulínica depende no sólo de la especie animal utilizada, sino también de las condiciones metabólicas del mismo, la duración del tratamiento, composición de la dieta y tipo de isómero utilizado.

Con respecto a experiencias en humanos, estudios conducidos por Riserus y col (2002 y 2004) mostraron que ambos isómeros pueden disminuir la sensibilidad insulínica en personas con riesgo cardiovascular. Los individuos que recibieron el isómero *c9,t11*-CLA mostraron un 15% de disminución en la sensibilidad a la insulina y un incremento en la peroxidación lipídica (Riserus y col, 2002). El isómero *t10,c12*-CLA incrementó la resistencia a la insulina y la glucemia, mientras que la mezcla no produjo cambios (Riserus y col, 2004). En contraste, en otro estudio (Eyjolfson y col, 2004) los CLA mejoraron la sensibilidad insulínica en adultos jóvenes sedentarios, reflejada por una menor AIC en el TTOG y una menor insulina en ayunas. Sin embargo, el tamaño muestral fue pequeño. Así como en otros aspectos, se necesitan más estudios de mayor duración y que involucren a un mayor número de individuos para analizar los efectos de los CLA y sus isómeros sobre la resistencia insulínica y la hiperinsulinemia y así obtener mejores conclusiones al respecto.