

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Departamento de Ciencias Biológicas

**“IMPACTO DE LA EXPOSICIÓN CRÓNICA AL
CONTAMINANTE ALIMENTARIO DI (2-ETIL HEXIL)
FTALATO (DEHF) SOBRE ASPECTOS METABÓLICO-
NUTRICIONALES EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN”**

Tesista: Bioquímica Marcela I. Martinelli

Director de Tesis: Dr. Claudio Bernal

Tesis para la obtención del Grado Académico de
Doctor en Ciencias Biológicas – FBCB – UNL

Año de presentación: 2006.

"Tantas cosas he aprendido de ustedes, los hombres... He aprendido que todo el mundo quiere vivir en la cima de la montaña sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada."

Gabriel García Márquez.

Gracias a todos los que en la vida me ayudan y me acompañan a subir la escarpada...

AGRADECIMIENTOS

A mi Padres: les agradezco todo lo que me han dado en la vida: amor irremplazable, contención, educación y la infinidad de valores que han hecho de mí lo que soy.

A mi Mamá: que sigue estando siempre conmigo en todo momento, apoyándome incondicionalmente en todas las etapas de mi vida.

A mis Hijos: que son la luz de mi vida y la razón de vivir...

A mi Hermana: que es un sol brillando permanentemente y siempre está al lado “contra viento y marea”. Gracias por la paciencia...

A mi tía Nidia: mi segunda mamá...

A mi tía Ida: por su apoyo incondicional

A mi cuñado Raúl: que es “mi hermano del alma”...

A Norberto Mocchiutti: mi más profundo agradecimiento y admiración por ser excelente Profesor e Investigador. También por su calidez, su capacidad para ayudarme no sólo en lo laboral sino también en lo personal, por confiar en mí, por impulsarme “siempre a seguir” y por ser “ejemplo de vida”.

A Claudio Bernal: “fuente inagotable de energía”, gracias por incentivar me, ayudarme y acompañarme en mi crecimiento profesional, por su capacidad para contagiar “sus ganas de todo” y por el gran empuje que nos da a todo el grupo de trabajo.

A mis amigas de la vida: Sandra e Isabel, por su apoyo incondicional “siempre”... A Viviana por acompañarme y alentarme durante tantos años...

A todos mis compañeros de trabajo del Dpto. de Ciencias Biológicas, los que están y los que ya se fueron, por estar siempre conmigo, valorando mis esfuerzos y compartiendo la lucha diaria.

A la FBCB: en la cual estudié y espero permanecer trabajando hasta que me sea posible.

A la UNL: por los subsidios de los Proyectos CAI+D que financiaron este trabajo.

PRESENTACIONES A CONGRESOS Y PUBLICACIONES

TRABAJOS PUBLICADOS

- Bernal C.A.; Martinelli M.I.; Mocchiutti N.O. (2002). Effect of the dietary exposure of rat to di(2-ethyl hexyl) phthalate on their metabolic efficiency. *Foods Additives and Contaminants* vol 19, N° 11, 1091-1096.
- Martinelli M.I., Mocchiutti N.O.; Bernal C.A. (2006). Dietary di(2-ethyl hexyl) phthalate impaired glucose metabolism in experimental animals. *Human and Experimental Toxicology*. 25: 531-538.

RESÚMENES PUBLICADOS

- Bernal C.A.; Martinelli M.I.; Mocchiutti N.O. (2005). El contaminante alimentario Di (2-etilhexil) ftalato altera la tolerancia y el metabolismo de la glucosa en animales de experimentación. *Medicina*. Vol. 65 Supl. 2, pág. 115.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS

- Martinelli M., Rossi A., Allassia M., Celeghin A., Bernal C., Mocchiutti N. (2000). Evaluación en la retención de energía en carcasa de ratas alimentadas crónicamente con dieta suplementada con di(2-etil hexil) ftalato”. II Encuentro Bioquímico del Litoral. V Jornadas de Comunicaciones Técnico Científicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – U.N.L. Santa Fe, junio de 2000.
- Martinelli M, Bernal C., Castro A. y Mocchiutti N. Contaminante alimentario di(2-etil hexil) ftalato (DEHF): efecto sobre el metabolismo glucolítico muscular. Congreso “Alimentación en el siglo XXI” organizado por la Facultad de Ciencias

Agrarias-Universidad Nacional de Cuyo y CASLAN (Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición). Mendoza, octubre de 2003.

- Martinelli M., Bernal C., Mocchiutti N. Acción del contaminante alimentario di(2-etil hexil) ftalato sobre la tolerancia oral a la glucosa y el metabolismo glucolítico en músculo esquelético de animales de experimentación. XXVII Reunión Anual de CASLAN y Jornadas de Nutrición y Salud-FBCB.UNL. Santa Fe, noviembre de 2004.
- Martinelli M., Mocchiutti N., Fontana A., Bernal C. El contaminante alimentario DEHF altera el flujo glucolítico en músculo e hígado de animales de experimentación. III Encuentro Bioquímico del Litoral y VI Jornadas de Comunicaciones Técnico-Científicas. Santa Fe, junio de 2005.
- Bernal C., Martinelli M., Mocchiutti N. El contaminante alimentario di(2-etil hexil) ftalato altera la tolerancia y el metabolismo de la glucosa en animales de experimentación. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). 50 Reunión Científica Anual. Mar del Plata, noviembre de 2005.
- Martinelli M. "Materiales en contacto con los alimentos". Disertación en la XXVIII Reunión Anual de CASLAN y XXII Jornadas Regionales de Bromatología y VII de Nutrición. Gualeguaychú, Entre Ríos, octubre de 2005.

ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxiribonucleico
- AG: Ácidos grasos
- ALAT: Alanina amino transferasa
- ASAT: Aspartato amino transferasa
- ATP: Adenosín trifosfato
- CK: Creatina kinasa
- CP: Creatina fosfato
- DEHF: Di(2-etil hexil) ftalato
- DHAP: Dihidroxiacetona fosfato
- E.C.: Contenido energético de la carcasa
- EE: Eficiencia energética
- 2-EH: 2-Etilhexanol
- F-1,6-P2: Fructosa-1,6-difosfato
- F-6-P: Fructosa-6-fosfato
- FL: Fosfolípidos
- G-1-P: Glucosa-1-fosfato
- G-3-P DH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- G-3-P: Gliceraldehído-3-fosfato
- G-6-P DH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- G-6-P: Glucosa-6-fosfato
- HDL: Lipoproteína de alta densidad
- HK: Hexoquinasa
- LD50: Dosis Letal Media
- LDH: Lactato deshidrogenasa
- LDL: Lipoproteína de baja densidad
- LPL: Lipoproteína lipasa
- MCT 1: Proteína transportadora monocarboxilato 1
- MCT 2: Proteína transportadora monocarboxilato 2

- MDH: Malato deshidrogenasa
- MEHF: Mono(2 etil hexil) fatalato
- MG: Macro-glucógeno
- N: Nitrógeno
- NAD: Nicotinamida adenina dinucleótido
- NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
- NADP: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
- PEP: Fosfoenolpiruvato
- PG: Pro-glucógeno
- PGI: Fosfoglucosa isomerasa
- PGM: Fosfoglucmutasa
- PK: Piruvato kinasa
- PPARs: Receptores activados por proliferadores peroxisomales
- PPs: Proliferadores peroxisomales
- PVC: Policloruro de vinilo
- RfD: Dosis Diaria de Referencia
- T₃: Triiodotironina
- T₄: Tiroxina
- TDI: Ingesta Diaria Tolerable
- TG: Triglicéridos
- TPI: Triosa fosfato isomerasa
- TSH: Hormona estimulante de la glándula tiroides
- TTOG: Test de tolerancia oral a la glucosa
- VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad

INDICE GENERAL

Contenido	Página
CAPÍTULO I: RESUMEN	1
CAPÍTULO II: ABSTRACT	5
CAPÍTULO III: INTRODUCCIÓN	9
1. Consideraciones generales sobre los ftalatos y sus derivados	10
2. Consideraciones específicas sobre el di(2-etil hexil) ftalato (DEHF)	11
2.1. Propiedades fisicoquímicas	11
2.2. Aplicaciones en la industria	12
2.3. Implicancia potencial para la salud	12
3. Exposición al DEHF	13
3.1. Exposición ambiental	14
3.2. Exposición ocupacional	16
3.3. Exposición oral	16
3.3.1. Exposición por los alimentos	16
3.3.2. Exposición por juguetes y elementos de puericultura	19
3.4. Exposición a través de insumos y procedimientos médicos	20
4. Biotransformación del DEHF	21
5. Efectos biológicos del DEHF	24
5.1. Efectos sobre el peso corporal	26
5.2. Efectos sobre los riñones	26
5.3. Efectos sobre órganos sexuales y función reproductiva	26

7.2.	Determinación de agua	44
7.3.	Determinación de grasa	45
7.4.	Determinación de cenizas	45
8.	Contenido energético corporal y eficiencia energética	45
8.1.	Contenido energético según la composición corporal	46
8.2.	Contenido energético corporal obtenido por calorimetría	46
8.3.	Eficiencia energética	46
9.	Cuantificaciones tisulares	47
9.1.	Contenido de lípidos	47
9.1.1.	Triglicéridos	47
9.1.2.	Colesterol	48
9.1.3.	Fosfolípidos	48
9.2.	Contenido de metabolitos energéticos	48
9.2.1.	ATP	48
9.2.2.	Creatina fosfato	49
9.2.3.	Creatina	49
10.	Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa	49
10.1.	Glucosa	50
10.2.	Glucosa-6-fosfato	50
10.3.	Fructosa-6-fosfato	51
10.4.	Fructosa-1,6-difosfato	51
10.5.	Piruvato	51
10.6.	Lactato	52
10.7.	Glucosa-1-fosfato	52
10.8.	Glucógeno total y sus fracciones pro- y macro-glucógeno	52
10.9.	Citrato	53
10.10.	Actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	53
11.	Test de Tolerancia Oral a la Glucosa	55

12.	Parámetros relacionados al metabolismo lipídico	55
12.1.	Actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) en músculo esquelético	55
12.2.	Actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) en tejido adiposo	57
12.3.	Estudio de la lipólisis “in vitro”	58
12.3.1.	Aislamiento de adipocitos	58
12.3.2.	Determinación del diámetro y volumen de los adipocitos	58
12.3.3.	Determinación del número de células en la suspensión	59
12.3.4.	Determinación de la lipólisis basal e inducida	60
13.	Análisis estadístico	61
	CAPÍTULO VI: RESULTADOS	62
	Experiencias preliminares	63
1.	Efecto del DEHF sobre el peso corporal e ingesta de alimento	64
2.	Efecto del DEHF sobre el peso de hígado y tejido adiposo	65
3.	Efecto del DEHF sobre los niveles plasmáticos y tisulares de lípidos	66
	Efectos del DEHF a la dosis-tiempo seleccionada	68
1.	Balance Nitrogenado	68
2.	Estado Energético	73
2.1.	Composición corporal	73
2.2.	Contenido energético corporal y eficiencia energética	73
2.3.	Metabolitos y hormonas relacionadas con la eficiencia energética	75

3.	Efectos del DEHF sobre algunos parámetros del metabolismo de hidratos de carbono	77
3.1.	Test de tolerancia oral a la glucosa	77
3.2.	Intermediarios relacionados al metabolismo de la glucosa	78
3.3.	Flujo de sustratos a través de enzimas del metabolismo de la glucosa	81
4.	Metabolismo de lípidos	83
4.1.	Actividades lipoproteínas lipasa	83
4.2.	Lipólisis en tejido adiposo	86
CAPÍTULO VII: DISCUSIÓN		91
1.	Efectos sobre la composición corporal y la eficiencia energética	96
2.	Alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono	101
3.	Efecto hipolipemiante	107
CAPÍTULO VIII: CONCLUSIÓN		109
CAPÍTULO IX: BIBLIOGRAFÍA		112

CAPÍTULO I

RESUMEN

RESUMEN

El di(2-etil hexil) ftalato (DEHF) es un éster del ácido ftálico que se utiliza ampliamente como plastificante en la fabricación de plásticos de PVC para conferirle flexibilidad, ductilidad y extensibilidad al producto final. El PVC flexible tiene numerosas aplicaciones en materiales de la construcción, en la elaboración de recipientes para envasar alimentos, en juguetes para niños, en insumos médicos, etc. Dado que el DEHF no se une químicamente al PVC y tiene capacidad de migrar desde los productos que lo contienen hacia el ambiente circundante, el mismo se encuentra ampliamente distribuido en el ecosistema, siendo incluido entre los contaminantes ambientales más abundantes producidos por el hombre.

La población en general está expuesta al DEHF por vía oral o inhalatoria, dado que puede ser vehiculizado a través de los alimentos, del agua y del aire. Se considera que la ruta de exposición cuantitativamente más importante es a través de los alimentos, razón por la cual se ha llegado a considerar a este plastificante como un “contaminante alimentario”.

El objetivo del presente trabajo de tesis fue investigar el impacto que la exposición crónica al contaminante alimentario DEHF podría producir sobre algunos aspectos metabólico-nutricionales en animales de experimentación.

Luego de establecer en experiencias preliminares las condiciones de trabajo más adecuadas, se encontró que la adición de 2% de DEHF a la dieta produce un descenso significativo de la ganancia de peso corporal, no correlacionado a hipofagia, ni a malabsorción de nutrientes. Además, estos animales presentaron una menor retención de nitrógeno y grasa corporal, conduciendo a disminución en la retención de energía corporal y en la eficiencia energética.

La menor retención de proteínas corporales estuvo asociada a un disminuido balance nitrogenado diario en los animales alimentados con DEHF. Esta depleción en el balance nitrogenado se relacionó con una incrementada

excreción de nitrógeno en orina, sin modificaciones en la ingesta y excreción fecal de nitrógeno. Nuestros resultados de mayor excreción de nitrógeno en orina, atribuida principalmente al nitrógeno ureico, podría relacionarse a un mayor catabolismo proteico, justificando así parcialmente la menor retención de proteínas corporales.

La depleción de la grasa corporal estuvo acompañada de una disminución significativa en el peso del tejido adiposo epididimal, con un menor tamaño de los adipocitos. Estas alteraciones no parecen estar asociadas a una mayor movilización de lípidos, ya que se demostró que el DEHF no modificó la lipólisis basal ni la estimulada por noradrenalina "in vitro".

Por otro lado, se comprobó que los animales alimentados con DEHF presentaron una disminución en la utilización periférica de glucosa. Esta alteración estuvo relacionada con un anormal flujo de intermediarios del metabolismo de la glucosa en el hígado y músculo esquelético.

En el hígado, la exposición al DEHF conduce a un significativo descenso de la glucólisis, tal como lo reflejan los bajos niveles de G-6-P, F-6-P, piruvato y lactato. La disminuida relación G-6-P/glucosa sugiere un menor flujo a través de la enzima glucoquinasa la cual cumple un rol clave en la regulación de la glucólisis. La menor concentración intracelular de G-6-P podría determinar una disminución de la actividad de la glucógeno sintasa, lo que podría conducir al descenso en los niveles de glucógeno hepático encontrados.

En el músculo gastrocnemius demostramos que los niveles de glucosa y glucógeno permanecieron invariables. Sin embargo se observaron alteraciones en otros sustratos intracelulares relacionados con el metabolismo de la glucosa: disminución en la G-6-P y aumento del contenido de F-1,6-P₂, piruvato y lactato. La disminuida relación G-6-P/glucosa observada sugiere también aquí un menor flujo a través de la hexoquinasa. El aumento demostrado en la relación lactato muscular/lactato plasmático es compatible con la hipótesis que el DEHF podría disminuir el transporte trans-sarcolema de dicho metabolito. Esta ineficiencia en el

transporte de lactato podría explicar no sólo la acumulación de lactato, sino también el incremento observado de piruvato y F1,6-P₂ en músculo esquelético.

Los niveles reducidos de triglicéridos circulantes observados en animales alimentados con el contaminante alimentario podrían estar relacionados a una incrementada remoción de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Específicamente, nuestros hallazgos sugieren que el adiposo sería el principal tejido involucrado en dicho efecto, dado que las actividades LPL en tejido adiposo lumbar y epididimal incrementaron significativamente, mientras que en músculo esquelético las mismas no se modificaron por efecto de la dieta.

En su conjunto, los resultados obtenidos en la presente tesis constituyen un avance en el conocimiento e interpretación de los mecanismos involucrados en los efectos biológicos deletéreos inducidos por el DEHF. Además de nuestros resultados, la existencia de gran cantidad de evidencias que demuestran las innumerables alteraciones biológicas producidas por el DEHF, permiten vislumbrar la potencial implicancia que el uso indiscriminado de este compuesto podría tener sobre la salud humana.

CAPÍTULO II

ABSTRACT

ABSTRACT

Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), an ester of phthalic acid, is widely used as a plasticizer in polyvinyl chloride (PVC) plastics to give them the desired properties (flexibility, ductility, extensibility) for a number of applications, such as construction materials, food packaging film and containers, children toys, medical supplies and accessories, among others. Since DEHP does not combine chemically with PVC and is able to migrate from the products containing it to the environment, it is widely distributed in the ecosystem, being thus included among the most abundant man-made environmental pollutants.

Additionally, it may be carried by food, water and air, so the whole population is exposed to this plasticizer, either by inhalation, ingestion, or dermal contact. Being food the quantitatively most significant route of exposure, DEHP has been considered as a "food contaminant".

The objective of the present thesis was to investigate the impact of the chronic exposure to DEHP on some metabolic and nutritional aspects in experimental animals.

Preliminary experiences carried out to determine the most adequate working conditions showed 2% DEHP addition to the diet to cause a significant decrease, not related to hypophagia or nutrient malabsorption, in body weight gain. Also, these animals showed lower nitrogen and fat body retention, which resulted in diminished body energy retention and energy efficiency.

The lower body protein retention in animals fed with DEHP was shown to be associated to a decreased daily nitrogen balance which, in turn, was related to an increased nitrogen excretion in urine, there being no changes in nitrogen intake and faecal excretion. The higher urine nitrogen excretion results obtained in our experiences, attributable mainly to ureic nitrogen, could be connected with a higher protein catabolism which would, at least in part, account for the less body protein retention.

Body fat decrease was accompanied by a significant decrease in the weight of epididimal adipose tissue, together with less size adipocytes. These alterations do not seem to be associated with higher lipid mobility, since neither basal lipolysis nor that stimulated by “in vitro” noradrenaline showed to be modified by DEHP.

On the other hand, animals fed with DEHP exhibited a depressed peripheral glucose use, related to an abnormal flow of intermediates of glucose metabolism both in the liver and the skeletal muscle.

As regards the liver, DEHP exposure leads to a significant decrease in glycolysis, as shown by the low levels of G-6-P, F-6-P, piruvate and lactate. The diminished G-6-P/glucose ratio suggests a lower flow through the enzyme glucokinase, which plays a key role in regulating glycolysis. The lower G-6-P intracellular concentration, in turn, could determine a decrease in glycogen synthase activity, leading to a reduction of hepatic glycogen levels.

As to the gastrocnemius muscle, glucose and glycogen levels were found to remain unchanged, though some alterations were indeed observed in another intracellular substrates related to glucose metabolism: a decrease in G-6-P, and an increase in F-1,6-P₂, piruvate and lactate contents. The decreased G-6-P/glucose ratio advocates a lower flow through the enzyme hexokinase. With regard to muscle lactate/ plasmatic lactate ratio, the observed increase is compatible with the hypothesis that DEHP could decrease the trans-sarcolemma transport of such metabolite. The inefficient lactate transport could account for not only lactate accumulation, but also the increase in piruvate and F-1,6-P₂ in skeletal muscle.

The reduced levels of circulating triglycerides observed in animals fed with the food contaminant could be associated to a higher removal of triglyceride-rich lipoproteins. Our findings suggest, specifically, that the main tissue involved in such effect would be the adipose one, since LPL activities in lumbar and epididimal adipose tissues increased significantly, whereas no change was verified in those corresponding to skeletal muscle as a consequence of the diet.

In general, it could be said that the results obtained in this thesis represent a step forward in the understanding and interpretation of the mechanisms involved in the DEHP-induced deleterious biological effects. In addition to our results, there is strong evidence showing the uncountable biological alterations produced by DEHP, which are symptomatic of the potential human health risks associated with the indiscriminate use of this compound.

CAPÍTULO III

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.- Consideraciones generales sobre los ftalatos y sus derivados

La familia de compuestos químicos denominados “ftalatos” se caracteriza por la presencia de una estructura química común, dialquil ó alquil/aril éster del ácido 1,2-benzenodicarboxílico. Las propiedades químicas de estos compuestos, y por lo tanto su potencial campo de aplicación, dependen de la longitud y la ramificación de las cadenas dialquil o alquil/aril, dado que son ellas las que constituyen la porción alcohol del éter.

Desde 1930 los ftalatos se han utilizado en variadas aplicaciones industriales, incluyendo la fabricación de productos de uso personal (perfumes, lociones, cosméticos, etc.), de pinturas y de ciertos tipos de insumos médico-farmacéuticos.

Algunos ftalatos son frecuentemente adicionados en la industrialización de algunos productos comerciales para retener el color o la fragancia del producto original, en otros para proporcionar un film o esmalte y en el caso de los productos farmacéuticos para otorgarles un tiempo apropiado a la liberación del principio activo que contienen.

Sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo, los ftalatos son fundamentalmente utilizados como “plastificantes”, es decir, son adicionados para conferir flexibilidad al policloruro de vinilo (PVC) originalmente rígido (ATSDR, 1993 y 2002; Latini, 2005).

En los procesos industriales, a nivel mundial, se utilizan por año aproximadamente 2.7×10^6 toneladas de ftalatos, de los cuales los no plastificantes (di-metil y di-etil ftalatos) representan una muy pequeña fracción. De los ftalatos plastificantes, el di(2-etil hexil) ftalato (DEHF) es cuantitativamente el más empleado, debido a su bajo costo y a su fácil adaptabilidad al producto final. Esto ha determinado que la producción anual mundial de DEHF supere los 1.5×10^5 toneladas (IPCS, 1992; Lorz, 2002).

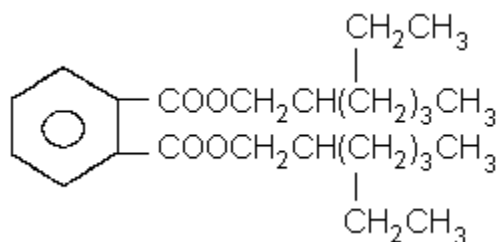
Se ha demostrado que estos plastificantes migran desde los productos plásticos finales hacia el ambiente circundante, lo que determina que se encuentren ampliamente distribuidos en el ecosistema, razón por la cuál se incluyen entre los más abundantes contaminantes ambientales producidos por el hombre.

Es por lo anteriormente expresado que el desarrollo de esta Tesis se ha centralizado exclusivamente en el ftalato plastificante DEHF.

2.- Consideraciones específicas sobre el di(2-etil hexil) ftalato (DEHF)

2.1.- Propiedades fisicoquímicas

El DEHF ($C_{24}H_{38}O_4$) es un éster del ácido ftálico de elevado PM (390,6 g/mol) que se produce mediante la reacción del 2-etilhexanol con el anhídrido ftálico en presencia de un catalizador metálico o ácido, a elevadas temperaturas (CMA, 1999; NTP, 2000).



Estructura química di(2-etil hexil) ftalato (DEHF)

A temperatura ambiente el DEHF es un líquido aceitoso (densidad =1.08 g/ml) y de color ligeramente amarillo. Su solubilidad en agua es baja, pero es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Es miscible con los aceites minerales y con las grasas (European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General, 2002).

2.2. - Aplicaciones en la industria

El DEHF se utiliza ampliamente como plastificante en las formulaciones PVC para conferirle al producto final flexibilidad, ductilidad y extensibilidad. El PVC flexible así obtenido tiene numerosas y variadas aplicaciones, por lo que se lo utiliza en la fabricación de productos para la construcción (cables, tuberías, etc.), en la producción de indumentaria (calzado, ropa de lluvia, etc.), en la industria automotriz (neumáticos, tapizados), en la elaboración de envases para alimentos, en la elaboración de artículos de puericultura (chupetes, juguetes, etc.) y en una variedad de insumos habitualmente utilizados en medicina (catéteres, bolsas para almacenar sangre, etc.) (Jaeger y Rubin, 1973a; Sharma y col., 1994; Stringer y col., 2000).

La proporción de DEHF que se adiciona en la fabricación de las resinas de PVC flexible es muy variable, y la misma es acorde con el grado de flexibilidad del producto final que se desea obtener. Es así que la cantidad de DEHF adicionado puede oscilar entre 10-40% del peso final del producto (Jaeger y Rubin, 1973a; CEPA, 1994; ASTDR, 2002).

Como el DEHF adicionado no se encuentra químicamente unido al PVC tiene capacidad de migrar desde los productos que lo contienen hacia el ambiente circundante (Jaeger y Rubin, 1972; Pearson y Trissel, 1993; Kambia y col., 2001). Es por ello que el uso indiscriminado del DEHF en la industria del plástico ha provocado su gran dispersión en el medio ambiente, de modo tal que se lo encuentra en el suelo, en el agua, en el aire y en los alimentos, razón por la cuál se lo ha considerado un contaminante ambiental ubicuo (Rubin y Jaeger, 1972 y 1973a; Nazir y col 1973; Peck y col, 1979; Griffiths y Lerner, 1985; Pollack y col, 1985; Sharman y col., 1994).

2.3.- Implicancia potencial para la salud

El empleo de plásticos de PVC en la elaboración de insumos médicos tuvo gran auge con la introducción del uso de las bolsas plásticas destinadas a almacenar sangre. Las transfusiones sanguíneas se hicieron muy comunes y

frecuentes durante la Segunda Guerra Mundial, pero en ese entonces se utilizaban recipientes de vidrio para contener la sangre, mientras que las bolsas plásticas se introdujeron aproximadamente en la década del sesenta.

En la década del setenta Jaeger y Rubin fueron los primeros en detectar la posibilidad de contaminación de la sangre almacenada en estas bolsas y realizaron observaciones detalladas de la migración, extracción, localización y metabolismo de los ftalatos que contenían las bolsas y catéteres utilizados para las transfusiones (Rubin y Jaeger, 1972, 1973a). Otros estudios se publicaron en esa época focalizando la atención en las posibilidades de exposición que se presentan para la población y los potenciales efectos adversos que estos compuestos pueden ocasionar (Turner y col.1974).

Una situación clínica oportunamente discutida en detalle, que está relacionada con el PVC, y por lo tanto con el DEHF, fue la descripción de una enterocolitis necrosante neonatal observada por Hastings en 1982. Algunos autores sugirieron que esta condición podría estar relacionada con las numerosas transfusiones recibidas por esos niños durante su tratamiento (Rogers y Dunn, 1968).

Por otro lado, Jaeger and Rubin (1973b) también demostraron que las plaquetas almacenadas en bolsas de PVC presentaban una mayor adhesividad y una mayor tendencia a la formación de micro-agregados con respecto a las que se almacenaban en recipientes de vidrio. Es así que a partir de esta década comenzaron a llevarse a cabo distintos estudios cuyo objetivo fue analizar los posibles efectos tóxicos que podría ejercer el DEHF cuando es incorporado al organismo por distintas vías.

3. – Exposición al DEHF

La población en general está expuesta al DEHF por ingestión o inhalación, dado que el mismo puede ser vehiculizado a través de los alimentos, del agua y del aire. (NTP, 2000; Stringer y col, 2000). Un grupo poblacional de especial

interés son los individuos que están sometidos a tratamientos médicos que requieren el uso de material plástico flexible (pacientes en hemodiálisis, los sometidos a transfusiones múltiples, etc.), ya que en estos casos, la incorporación del DEHF al organismo sería a través de la vía intravenosa.

Existen en la bibliografía dos formas distintas que se han empleado para estimar la exposición de la población al DEHF. Una de ellas consiste en evaluar la denominada exposición externa por medio de la determinación de su presencia en el ambiente, en los alimentos, en los juguetes, en los insumos médicos, etc. La otra forma, evalúa los metabolitos del DEHF una vez que es incorporado al organismo (monitoreo biológico) (Latini y col., 2004).

La exposición externa es muy difícil de evaluar por dos razones. En primer lugar porque la determinación analítica es extremadamente complicada debido a que el DEHF, al ser un compuesto de distribución ubicua, puede estar presente incluso en el ambiente del laboratorio. En segundo lugar, porque es sumamente difícil calcular la dosis individual a la cual puede estar expuesto un individuo a partir de los datos ambientales y, sobre todo, a partir de ingesta de alimentos, dado que ambas están muy influenciadas por las variaciones individuales. Mientras que el monitoreo biológico permite estimar de una manera más precisa la dosis individual a la cual está expuesto cada individuo, debido a que su determinación integra todas las fuentes de exposición externa al DEHF, por lo cual ha sido utilizada por numerosos investigadores (Blount y col., 2000; Barr y col., 2003; Koch y col., 2003 y 2004).

3.1.- Exposición Ambiental

Podemos considerar que el DEHF ingresa al medio ambiente por diversas vías: durante su propia producción (aunque su volatilidad es baja), durante la fabricación de las resinas de PVC, por la incineración de desechos industriales y domiciliarios o por lixiviación desde los numerosos productos fabricados con PVC. La mayor parte de los productos plásticos descartados se incineran o se entierran en lugares destinados a recibir desechos, tierra y escombros. Cuando el DEHF

toma contacto con el suelo, permanece unido a las partículas orgánicas. Su biodegradación se produce a lo largo de semanas en ambientes aeróbicos y ricos en nutrientes, pero es extremadamente lenta bajo condiciones anaeróbicas. En general, se requieren muchos años para que el DEHF presente en los materiales plásticos descartados desaparezca del medio ambiente (ASTDR, 1993).

Debido a su baja presión de vapor y su escasa solubilidad en agua las concentraciones de DEHF en la atmósfera y en el agua son bajas. Sin embargo, la cantidad de DEHF que se encuentra en las aguas superficiales puede incrementarse debido a su absorción en las partículas orgánicas que se encuentran en suspensión (Tan, 1995; CMA, 1999). Se ha observado que la bioacumulación en los organismos vivos depende de su capacidad de metabolización, habiéndose demostrado que el DEHF se acumula en alto grado en una variedad de invertebrados acuáticos, peces y anfibios (IPCS, 1992).

La exposición de la población a través de inhalación del aire ambiental no se considera una ruta significativa de exposición al DEHF (Huber y col., 1996; Doull y col., 1999) y como se mencionó anteriormente, es muy difícil de evaluar debido a la naturaleza ubicua de este plastificante. Sin embargo en los últimos años se han desarrollado diversos sistemas para estudiar la migración del DEHF hacia el ambiente minimizando las posibilidades de error (Shea, 2003). En este sentido, un grupo de investigadores determinó las concentraciones de los ftalatos más comunes en el interior de los hogares de Tokio (Otake y col, 2004) encontrando que las concentraciones en el ambiente fueron 100 a 1000 veces mayores que las concentraciones determinadas en el exterior. En otro trabajo se estudió la migración de ftalatos, entre ellos el DEHF, a partir de cueros sintéticos, papeles para paredes y pisos de vinilos. En todos los casos se verificó que existe una real migración al ambiente y que la misma se incrementa con la temperatura (Fujii y col, 2003).

3.2.- Exposición ocupacional

La exposición ocupacional ocurre durante la producción del DEHF y cuando es utilizado en la fabricación de materiales plásticos de PVC (ATSDR, 1993). En estos casos se ha verificado que la ruta principal de exposición es la inhalación (Doull y col., 1999), aunque también se ha comprobado que puede existir una exposición dérmica en aquellos trabajadores que utilizan por períodos prolongados guantes fabricados con plásticos que contienen DEHF (Jaeger y Rubin, 1997).

3.3- Exposición oral

3.3.1 Exposición a través de los alimentos

Se considera que la ruta de exposición al DEHF cuantitativamente más importante para la población es a través de los alimentos, razón por la cual se ha llegado a considerar a este plastificante como un “contaminante alimentario” (NTP, 2000). Esta contaminación se debe a la demostrada presencia del DEHF que se puede acumular en ciertos alimentos como consecuencia de su liberación desde la matriz polimérica del envase de PVC al alimento. Además debido a su alta liposolubilidad, el DEHF migra preferencialmente hacia los alimentos con elevado contenido de materia grasa (lácteos, pescados, carnes y aceites) (Sharman y col, 1994).

Ya en 1975 se informó la migración del DEHF a los alimentos envasados en plásticos luego de 7 días de contacto (IPCS, 1992). Es por ello que en el año 2005 el “National Toxicological Program” (NTP) publica un informe en el que puede observarse el contenido de DEHF de algunos alimentos (Tabla 1).

Tabla 1: Concentración de DEHF en algunos alimentos.

Alimento	µg/g	Rango
Grasas y aceites	2.4	0.7-11.9
Productos lácteos (excluyendo leche)	0.96	0.059-16.8
Leche	0.035	<0.005-1.4
Carnes procesadas	0.45	<0.1-1.32
Fórmulas infantiles en polvo	0.12	< 0.012-0.98
Alimentos para bebés	0.12	0.01-0.6
Huevos	0.12	<0.01-0.6
Cereales	0.05	0.02-1.7
Frutas	0.02	<0.02-0.11
Vegetales	0.048	0.0098-2.2

Clark y col.(2003)

Con el objetivo de limitar la exposición poblacional al DEHF a través de los alimentos, la “Food and Drug Administration” (FDA -USA) ha establecido un límite para el contenido de DEHF en los materiales que pueden estar en contacto directo con los alimentos, fijando un máximo de 3% (p/p) (Code of Federal Regulations 1987 y 1999).

Si bien la exposición dietaria puede variar de un país a otro debido a los diferentes hábitos alimentarios de sus poblaciones, en los últimos años se ha informado que la exposición de la población a través de alimentos contaminados oscila en el amplio rango de 3-30 µg/kg peso corporal/día (ASTDR, 1993; Doull y col.,1999).

Diferente es la situación de los niños y recién nacidos, dado que ellos consumen mayor cantidad de productos lácteos y otros alimentos con elevado contenido de grasa /kg de peso corporal con respecto a los adultos, razón por la cual la exposición al DEHF por vía alimentaria podría ser más alta en bebés y niños pequeños (Nerin, 1983; Meek y Chan, 1994; Shea, 2000) (Tabla 2).

TABLA 2: Ingesta estimada de DEHF por grupos de edad.

Grupo (según edad)	Ingesta media estimada de DEHF ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$)
Adultos (20-70 años)	8.2
Adolescentes (12-19 años)	10
Niños (5-11 años)	18.9
Niños (7 meses-4 años)	25.8
Lactantes (0-6 meses)	
Alimentados con fórmula	5.0
Alimentados con leche materna	7.3

Clark y col. 2003

Debido a la considerable incorporación del DEHF al organismo a través de los alimentos, distintos países han establecido valores límites preventivos para la población. En Estados Unidos de América, la “Environmental Protection Agency” (EPA) fijó una dosis diaria de referencia (RfD) de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día mientras que la “Unión Europea” estableció una ingesta diaria tolerable (TDI) de 37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal/día (CSTEE, 1998; Koch y col, 2003).

Sin embargo, en algunos países se han encontrado niveles de exposición que exceden los considerados como tolerables para la población general. En este sentido, estudios publicados por Koch en Alemania (2002), realizando monitoreo biológico de los metabolitos excretados por humanos, han encontrado que el 30% de la población tiene valores más altos que la RfD de la EPA-USA y un 20 %

exceden el valor de la TDI establecido por la “Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment” (CSTEE, 1998).

Por otro lado, se observaron variaciones en el nivel de exposición al DEHF dependiente de la edad, probablemente debido a la existencia de diferentes patrones de captación y metabolización en niños y adultos. Recientemente, en un trabajo en donde se estudió el metabolismo biológico del DEHF se encontraron concentraciones significativamente más elevadas en los niños que en los adultos (Koch y col., 2004).

3.3.2 – Exposición a través de juguetes y elementos de puericultura

Un grupo poblacional que puede presentar una de las mayores exposiciones al DEHF a través de la vía oral son los infantes y niños, dado el hábito de llevar a la boca juguetes y elementos de puericultura que son fabricados mayoritariamente con PVC flexible.

Numerosos trabajos realizados en distintos países (Estados Unidos, Tailandia, España, etc.) han demostrado la presencia del DEHF en niveles que pueden variar entre 0.1-34% en peso, en distintos elementos utilizados por los niños tales como chupetes, mordillos, tetinas para mamaderas, juguetes plásticos, etc. (NTP, 2000; Stringer y col., 2000). Se ha comprobado, que produciendo un contacto de diferentes partes de juguetes fabricados con PVC con un simulante de la saliva, también existe una migración del DEHF desde estos productos (Steiner y col, 1998; Bouma y Schakel, 2002). De esta manera, los bebés pueden llegar a ingerir hasta 6mg de DEHF por día mordiendo juguetes plásticos (Schmid y Schalatter, 1985; Marin y col, 1998).

Por estas razones y debido a la considerable exposición de los niños al DEHF, en 1999 la “European Union Commission”, propuso una emergencia y estableció una prohibición a la presencia de ftalatos en juguetes y artículos destinados a menores de 3 años (Latini, 2000). Siguiendo estas recomendaciones, en nuestro país el Ministerio de Salud Pública mediante una Resolución del año 2001, y a nivel latinoamericano el MERCOSUR en el año 2003, han suspendido la

fabricación, importación y comercialización de artículos de puericultura y juguetes destinados a ser llevados a la boca por niños menores de 3 años, fabricados con plásticos que contuvieran más de 0,1% en peso de DEHF, entre otros ésteres de ftalatos.

En Estados Unidos y Canadá, puede considerarse que la exposición al DEHF en niños ha disminuido en los últimos años, dado que prácticamente no está presente en los juguetes que los niños llevan a la boca, aunque se los puede encontrar en juguetes para niños más grandes (NTP, 2000).

3.4 - Exposición a través de insumos y procedimientos médicos

Una gran variedad de procedimientos médico-quirúrgicos que se llevan a cabo en la clínica médica requieren el uso de equipamiento especializado: hemodiálisis; transfusión de sangre entera, de plaquetas y plasma; oxigenación extracorpórea; bypass cardiopulmonar; administración de fluidos intravenosos, alimentación enteral y parenteral, etc. Los insumos médicos utilizados en estos procedimientos están mayoritariamente elaborados con plásticos de PVC, el cual puede llegar a contener entre un 20-40% (p/p) de DEHF. Como se mencionó anteriormente, el DEHF migra desde el PVC al material con el cuál está en contacto, siendo la velocidad de migración dependiente de las condiciones de conservación (temperatura, tiempo de contacto, agitación, etc) y de la composición del fluido almacenado en el contenedor plástico. Cuanto mayor es la concentración de lípidos en el fluido que contacta con el PVC (sangre, plasma, concentrado de plaquetas, solución nutrición parenteral, etc) mayor será la velocidad de migración del DEHF (NTP, 2000). Jaeger y Rubin en 1973, detectaron presencia de DEHF en estos fluidos cuando fueron conservados en bolsas de PVC durante 21 días (Jaeger y Rubin, 1973a; Kicheva y col.,1995). La FDA en un informe reciente de ensayo de seguridad sobre el DEHF liberado desde los insumos médicos de PVC, ha informado que este plastificante promueve la agregación de las plaquetas y una activación del complemento, con las potenciales consecuencias clínicas adversas que ello pudiera ocasionar (Inoue y col., 2005).

La exposición del ser humano al DEHF a través de la utilización de insumos médicos plásticos puede darse a corto plazo, en dosis moderadas (ej. una simple transfusión de sangre); o en altas dosis (ej. exanguíneo transfusión); igualmente la exposición crónica puede darse también a dosis moderadas o altas (ej. hemodiálisis en pacientes con insuficiencia renal crónica o múltiples transfusiones a largo plazo en pacientes con cáncer). Si bien, se ha demostrado por ejemplo que la migración del DEHF puede ser insignificante en cada hemodiálisis (décimas de miligramos por kg de peso corporal), cuando estos pacientes reciben 100-150 tratamientos por año, la acumulación del DEHF puede llegar a ser muy elevada (decenas de mg/kg de peso corporal por año) (Pollack y col., 1985a; Latini, 2000; NTP, 2000).

La FDA ha establecido que los neonatos que se encuentran en la Unidades Neonatales de Cuidados Intensivos, constituyen un grupo poblacional de alto riesgo particularmente teniendo en cuenta su bajo peso, sus condiciones físicas y la frecuente exposición a múltiples insumos médicos que contienen DEHF (Center for Devices and Radiological Health, U.S. Food and Drug Administration, 2001; Woodward, 1990; Latini y col., 2004; Calafat y col., 2004).

4.- BIOTRANSFORMACIÓN DEL DEHF

Estudios realizados en animales de experimentación administrando DEHF marcado con ^{14}C en forma oral, determinaron que aproximadamente el 42% de la radiactividad se excretaba por orina y el remanente por las heces durante 7 días posteriores a la ingesta (Daniel, 1978). El 14% del DEHF marcado se excretaba por bilis durante los primeros 4 días, sugiriendo entonces la existencia de una pequeña, pero posiblemente significativa, circulación enterohepática del compuesto o de sus metabolitos.

Cuando el DEHF se administró a roedores en una concentración dietaria de 5000 ppm, equivalente a una dosis de 600mg/ kg/ día, luego de 14 días de ingesta se determinó la presencia del DEHF en hígado, en tejido adiposo y en pequeña

cantidad en corazón y en cerebro. La mayor concentración observada en el tejido adiposo estuvo estrechamente ligada a su liposolubilidad (Tanaka y col., 1975). No obstante el DEHF es rápidamente metabolizado y sus metabolitos son excretados por orina, con una vida media estimada de 2-4 días (Albro y Moore, 1974).

Existe poca información disponible respecto a la presencia del DEHF en humanos, principalmente en los tejidos corporales y a su distribución luego de una exposición (Weindenhoffer y col.,1996). Cuando se estudiaron tejidos humanos post-mortem de pacientes politransfundidos se encontró que el tejido adiposo, el bazo, el hígado y los pulmones contenían cantidades significativas de DEHF, siendo las mayores concentraciones las detectadas en el tejido adiposo (0.3-1.0 ppm) (Jaeger y Rubin, 1972 y 1997; Jacobson y col.,1974; Mess y col., 1974).

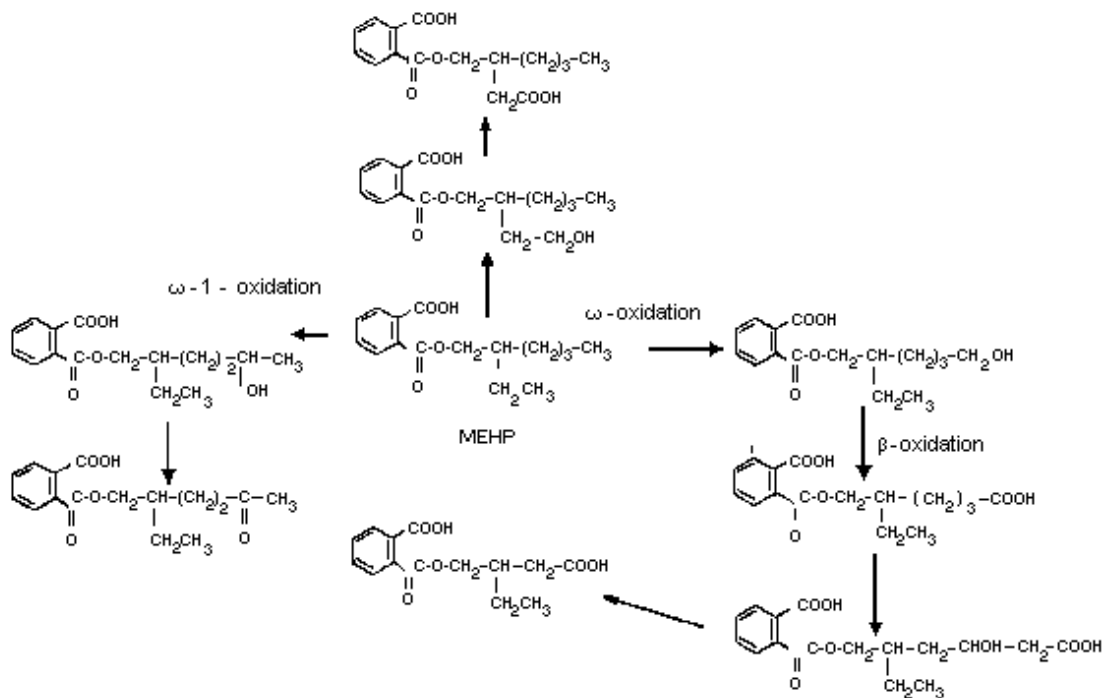
La toxicocinética del DEHF ha sido muy estudiada en roedores, lo que ha permitido establecer que cuando el DEHF se administra en forma oral es rápidamente metabolizado en el intestino por la lipasa pancreática dando como productos: mono (2-etil hexil) ftalato (MEHF) y 2-etilhexanol (2-EH). Ambos productos son absorbidos luego rápidamente por el intestino (Gaunt y Butterwoerth,1982; Pollack y col, 1985b; Sjoberg y col, 1985).

Algunos investigadores estudiaron la distribución del DEHF y del MEHF en el organismo, y determinaron que el DEHF se une a las lipoproteínas plasmáticas con un orden de afinidad: LDL > VLDL > HDL > Quilomicrones, mientras que el MEHF establece un equilibrio entre lo que circula libremente y lo unido a la albúmina. (Albro, 1986; Byron, 1988).

Se ha demostrado que el hígado es el órgano principal para la metabolización del MEHF. Este compuesto sufre una rápida ω y ω -1 oxidación de la cadena alifática a derivados más polares (Fig. 1). Estos productos de oxidación constituyen más del 85% de los metabolitos. Uno o varios de los productos de la ω oxidación pueden ser posteriormente metabolizados por β -oxidación en los peroxisomas hepáticos (Albro y col., 1973; Mitchell y col., 1985a; Lhugenot y col., 1985). Los metabolitos obtenidos a partir de estas vías de oxidación son luego

parcialmente glucuronizados para ser excretados a través de la orina y de las heces (Sjoberg y col., 1991).

Figura 1: Rutas propuestas del metabolismo del MEHF



Lhuguenot y col., 1985.

Se han informado diferencias entre especies en relación con los caminos de metabolización del DEHF, en particular entre roedores y primates. En primer lugar, se ha demostrado que los roedores poseen una mayor actividad de lipasa intestinal, lo cual podría facilitar la conversión del DEHF en su metabolito activo (MEHF). En segundo lugar se ha observado en el metabolismo del MEHF que la ω-oxidación parece jugar un papel preponderante en la rata mientras que representa un camino de menor importancia en ratones, hamsters y monos (Albro y col., 1982; Lughenot y col., 1985). En cuanto a la excreción, en orina de ratas alimentadas con DEHF se han encontrado metabolitos conjugados y no conjugados, siendo éstos últimos derivados compuestos más oxidados.

En humanos, diferentes estudios han establecido que la vía metabólica más importante del MEHF es la ω-1 oxidación de su cadena alifática, por lo que los

metabolitos secundarios generados son el mono (2-etil-5-hidroxihexil) ftalato y mono (2-etil-5-oxohexil) ftalato, los que posteriormente se excretan por orina como derivados glucurónidos (Albro y col., 1982; Peck y Albro, 1982; Koch y col., 2003). Recientemente también se ha informado que existen diferencias en la excreción de estos compuestos según la edad del individuo. En efecto, se demostró que los niños entre 2-6 años excretan concentraciones más altas de derivados del DEHF con respecto a los adultos (Koch y col., 2004).

5. – EFECTOS BIOLÓGICOS DEL DEHF

Desde el final de los años sesenta, se han realizado numerosos estudios en animales de experimentación con el objetivo de evaluar los efectos biológicos que producirían los ésteres del ácido ftálico en general y del DEHF en particular. Durante todos estos años se han publicado un gran número de trabajos de investigación sobre los efectos adversos del DEHF y el MEHF tanto en animales como en humanos (Latini, 2000). Dichos estudios han sido realizados por grupos de investigación y por organismos oficiales tales como “British Industrial Biological Research Association” (BIBRA, 1984), “International Program of Chemical Safety” (IPCS, 1992), “Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction” (National Toxicological Program-CERHR, NTP 2000 y 2005), “Health and Consumer Protection Directorate General of European Commission” (CSTEE, 1998, 1999, 2002).

Los estudios antes mencionados han empleado distintas vías, dosis y tiempos de exposición al DEHF, habiéndose comprobado en todos ellos que los efectos biológicos ocasionados por este plastificante dependen en mayor proporción de su principal metabolito, el MEHF. Se ha visto que el porcentaje de conversión del DEHF en MEHF varía según la ruta de exposición (ingestión, dérmica, inhalación o intravenosa), la especie de animal estudiado y la edad a la cual los animales han sido expuestos. Por lo que puede aseverarse que los

efectos tóxicos producidos por el DEHF dependen de numerosas variables, las que deben ser tenidas en cuenta al momento de efectuar un estudio.

Existe un consenso general que el DEHF presenta una baja toxicidad aguda, dado que la Dosis Letal media (LD50) para animales de laboratorio que reciben este compuesto a través de las vías oral, dérmica o intraperitoneal varían desde 14 a 50 g/ kg peso (Hodge, 1943; Thomas y col., 1978), mientras que cuando el DEHF es administrado intravenosamente, la LD50 es mucho menor (200mg/ kg) (Calley y col., 1966; Schulz y col.,1975; Rubin y Ness, 1989).

El MEHF puede llegar a ser más tóxico que el diéster, pero los datos disponibles al presente son mucho más limitados. En un informe de Villeneuve y col. (1978) se estableció una LD 50 para el MEHF de 1.4g/ kg y 1.8 g/ kg de peso corporal en ratas hembras y en ratas machos, respectivamente.

La mayor parte de los estudios a largo plazo relacionados con los efectos biológicos que puede producir el DEHF en animales de laboratorio se realizaron utilizando la vía oral, en los que este compuesto se adiciona directamente a la dieta, a distintas concentraciones y durante períodos de tiempo variables.

En la mayor parte de estos trabajos se ha encontrado que el DEHF produce un descenso del peso corporal, aumento absoluto y relativo del peso del hígado (Daniel, 1978; Mann y col., 1985; Tomaszewski y col., 1987; Mocchiutti y Bernal, 1997), proliferación de peroxisomas hepáticos (Dostal y col, 1987; David y col., 2000a y 2000b), aumentos en las actividades de distintas enzimas hepáticas peroxisomales (palmitoil CoA oxidasa, glicerol-P-deshidrogenasa y catalasa) (Mann y col., 1985; Reubsaet, 1990 y 1991), alteraciones en el metabolismo lipídico (Mitchell, 1985b; Howarth y col., 2001), alteraciones en la glándula tiroides (Price, 1988), carcinomas hepatocelulares (NTP, 1986, 2000 y 2005), disminución en la fertilidad (NTP 2000), etc.

5.1.- Efectos sobre el peso corporal

Existe coincidencia en la bibliografía de que el DEHF, administrado a animales de laboratorio por vía oral, produce un significativo descenso en la ganancia de peso corporal.

Así, en ratas alimentadas con 2% de DEHF en la dieta durante 21-30 días se ha observado una menor ganancia de peso corporal y ésta no pudo ser atribuida a una menor ingesta de alimento. (BIBRA, 1984; Nair y Kurup, 1986; Mann y col, 1985; Yanagita y col., 1987). Mientras que en estudios realizados durante períodos más prolongados (hasta 104 semanas) y con concentraciones dietarias menores de DEHF (entre 0.1% hasta 1.25%), se observó que el peso corporal y el consumo de alimento estuvieron significativamente disminuidos en aquellos animales que recibieron la dosis más elevada (David y col., 2000a).

5.2.- Efectos biológicos sobre los riñones

En los riñones, luego de una exposición al DEHF se han observado diversos efectos tales como aumento en el peso (Nagasaki y col., 1974; Dostal y col., 1987), alteraciones histológicas (necrosis centrolobular y aumento en la formación de quistes), que estuvieron asociadas a alteraciones funcionales principalmente a una reducción en el clearance de creatinina (Woodward y col., 1990; Croker y col., 1988; Davis y col., 2000a).

En algunos trabajos se demostró también la existencia de proliferación peroxisomal en los riñones (Ohno y col. 1982; Cimini y col., 1994). Por otro lado, Reubsaet y col. (1990) observaron una incrementada β -oxidación peroxisomal y mitocondrial de los ácidos grasos en homogenados de los riñones que fueron atribuidas a una mayor actividad de las enzimas acil Co-A oxidasa y carnitina palmitoil transferasa.

5.3.- Efectos sobre órganos sexuales y la función reproductiva

La toxicidad del DEHF ha sido extensamente revisada por el NTP a través del "Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction" (CERHR) y el

“Center for Devices, Radiological Health” (CDRH) de la U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2001) existiendo un consenso general sobre la existencia de efectos adversos en la salud reproductiva de los animales. Se han observado efectos teratogénicos y de toxicidad reproductiva en animales de laboratorio expuestos al DEHF en distintas etapas de la vida: antes de aparearlos, durante una parte o todo el período de gestación y lactancia, o de forma continua durante múltiples generaciones. En estos estudios se ha comprobado que el sistema más sensible es el tracto reproductivo de los machos inmaduros (Mann y col., 1985; Sjöberg y col., 1985; Melnik y col., 1987). En las crías de roedores expuestas al DEHF se observó disminución en los pesos de los testículos y epidídimos, acompañados de evidencias histopatológicas de atrofia testicular y de los túbulos seminíferos con alteración en las células de Sertoli. Estas alteraciones posteriormente afectan la espermatogénesis, y por lo tanto, la función reproductiva. (Lamb y col., 1987; Poon y col., 1997; Ema y col., 2000; Gray y col., 2000).

En ratas hembras adultas, la exposición al DEHF disminuye el peso de los ovarios, oviductos, útero y vagina, además de incrementar la presencia de ovarios poliquísticos (Davis y col., 1994a y 1994b).

Se ha demostrado también que el mecanismo de toxicidad reproductiva del DEHF puede deberse a sus efectos sobre el metabolismo de las hormonas esteroideas y el desarrollo sexual. En este sentido muchos autores han propuesto que el DEHF puede ser considerado un disruptor endocrino, que interferiría con la función del sistema endócrino, la cual es responsable del crecimiento, desarrollo sexual y otras funciones fisiológicas esenciales, tanto en machos como en hembras (Zacharewski y col., 1998; Sharpe, 2001; Wong y col., 2002). En particular, se ha demostrado que el DEHF a través de su metabolito MEHF, al actuar a través de un mecanismo mediado por receptores, altera la producción de estradiol en el ovario, conduciendo a ciclos anovulatorios (Lovekamp-Swan y Davis, 2003).

Según un informe de ASTDR del año 2002, la exposición en ratas y ratones al DEHF durante la gestación es embriotóxica y teratogénica. Se han observado una gran variedad de efectos incluyendo muertes intrauterinas, malformaciones cardiovasculares y esqueléticas, defectos en el cierre del tubo neural y elevada mortalidad perinatal, entre otros.

5.4.- Efectos biológicos del DEHF sobre el hígado.

Otro de los efectos característicos observados en los animales de laboratorio alimentados con DEHF es la hepatomegalia. Al respecto, en distintos estudios donde se administró DEHF en la dieta durante 14 o 21 días, se encontró que aquellos que ingirieron una dieta con 2% de DEHF, presentaron aumento absoluto y relativo del peso del hígado. (Reddy y col., 1976; Osumi y Hashimoto, 1978; Okita y Chance, 1984; Mann y col., 1985; Tomaszewski y col., 1987; Reubsaet y col., 1990). Otros estudios demostraron que el aumento en el tamaño del hígado inducido por el DEHF está fundamentalmente asociado a una hipertrofia que pudo ser atribuida a una mayor proliferación de peroxisomas y de microsomas y a una hiperplasia caracterizada por un aumento en la síntesis de ADN e inhibición de la apoptosis celular. (Goll y col., 1999).

Se ha establecido que el DEHF pertenece a un grupo de compuestos químicos conocidos como proliferadores peroxisomales (PPs) hepáticos, los cuales inducen un incremento en la formación de peroxisomas y un aumento en las actividades de ciertas enzimas hepáticas peroxisomales.

En ratas alimentadas con DEHF, se encontró que enzimas hepáticas tales como carnitina acil transferasa, palmitoil CoA-oxidasa y catalasa incrementan su actividad específica luego de 2 a 3 semanas de exposición (Moody y Reddy, 1978; Osumi y Hashimoto, 1978; Mann y col., 1985), efectos que han sido observados aún a concentraciones muy bajas de DEHF en la dieta (0.1% p/p) (BIBRA, 1984). Se ha comprobado además que el aumento de la actividad de la enzima palmitoil CoA oxidasa fue dependiente de la dosis de administración del DEHF (Lake y col., 1986; Dostal y col., 1987; Tomaszewski y col., 1987; Sharma y col., 1988). En

forma paralela se informaron alteraciones en la actividad de la enzima α -glicero-P-DH y se demostró la inducción de cit.P-450 microsomal (Mitchell y col., 1985a).

Estos cambios en las actividades de las enzimas hepáticas mencionadas estuvieron acompañados por un aumento en la velocidad de oxidación de ácidos grasos, la que fue mayor en peroxisomas que en mitocondrias. Esta mayor oxidación de ácidos grasos pudo ser atribuida a una mayor síntesis proteica de las enzimas de la β -oxidación peroxisomal y mitocondrial (Reubsaet y col., 1990 y 1991).

Trabajos realizados en los últimos años ha intentado conocer a través de qué mecanismos el DEHF produce la proliferación peroxisomal. Diversos autores (Issemann y Green, 1990; Dzhekova-Stojkova y col., 2001; Reddy, 2004) establecieron para algunos proliferadores peroxisomales que los efectos ejercidos en el hígado están mediados por la unión y activación a un miembro de la superfamilia de receptores nucleares llamados PPARs (receptores activados por proliferadores peroxisomales). De esta forma se induce la expresión génica de las enzimas peroxisomales y de ciertas enzimas del cit. P-450, produciendo en consecuencia un aumento en el número y en el tamaño de los peroxisomas hepáticos. Se ha demostrado “in vitro” que el PPAR α y el PPAR β son activados preferencialmente por los metabolitos del DEHF (Maloney y Waxman, 1999; Wong y Gill, 2002; Hurst y Waxman, 2003). El PPAR α fue activado moderadamente por el MEHF de una manera dependiente de la concentración y en menor grado por el ácido 2-etil hexaenoico (Lapinskas 2005).

Por otro lado, se ha comprobado que el DEHF produce hiperplasia e hipertrofia hepática en roedores que reciben una dieta conteniendo 0.1 a 0.5 g de DEHF/ 100g de alimento durante 70 a 104 semanas, lo que conduce a la formación de carcinomas hepatocelulares (Reddy, 1982; Kluwe y col., 1982; Asbhy y col., 1994).

Los mecanismos conducentes a la formación de carcinomas hepáticos podrían estar asociados a una incrementada proliferación peroxisomal hepática, lo que podría generar un exceso de peróxido de hidrógeno. El exceso de radicales

libres conduciría a daños en las membranas y en el ADN, determinando injuria celular con la posterior formación del tumor (Reddy, 1982; Rao y Reddy, 1987; Goll y col., 1999; Doull col., 1999).

En base a trabajos en modelos animales la “Environmental Protection Agency” (EPA, 1987) ha clasificado al DEHF como “posible carcinógeno en humanos” (group 2B). Sin embargo la “International Agency for Research Cancer” (IARC), recientemente enmarcó al DEHF como “not clasificable as to its carcinogenicity to humans” (group 3) debido a la conclusión que el DEHF produce tumores hepáticos en hígado de ratas y ratones por un mecanismo que involucra la proliferación peroxisomal, la cual puede no ser relevante en humanos (NTP, 2000). Sin embargo, Melnick sostiene que otros mecanismos distintos de la proliferación peroxisomal pueden estar involucrados en el desarrollo de carcinogénesis. Por lo tanto se considera que el DEHF puede ser “potencialmente carcinogénico en humanos” (Melnick, 2001).

6.- EFECTOS SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO

Entre las numerosas modificaciones bioquímicas producidas por este contaminante alimentario, se han informado alteraciones en el metabolismo lipídico, las que estuvieron caracterizadas por la constante presencia de una marcada hipolipemia asociada principalmente a un descenso en los niveles de triglicéridos plasmáticos, aunque también se presentaron descensos en los niveles plasmáticos de colesterol y fosfolípidos (Reddy y col., 1976; Mitchell y col., 1985; Rhodees y col., 1986; Tomaszewski y col., 1987; Dirven y col., 1990; Poon y col., 1997).

Dentro de los mecanismos que conducen al efecto hipocolesterolémico, Nair y Kurup (1986) alimentando ratas con 2% DEHF durante 30 días observaron un descenso del 40% del colesterol plasmático y lo atribuyeron a un aumento en la excreción del colesterol como sales biliares (Nair y Kurup, 1986).

En ratas jóvenes alimentadas con DEHF al 0.5 % en la dieta se demostró también una disminución de los fosfolípidos del plasma asociado una significativa acumulación de fosfolípidos hepáticos (Yanagita y col., 1978). Estas alteraciones de los fosfolípidos hepáticos se correlacionaron con una disminución en la relación Fosfatidilcolina/Fosfatidiletanolamina y con cambios en la composición de los ácidos grasos constitutivos de dichos fosfolípidos (Yanagita y col., 1987; Mizuguchi y col., 1999).

Nuestro grupo de trabajo, encontró que una elevada capacidad de remoción de lipoproteínas plasmáticas ricas en triglicéridos podría explicar el marcado descenso de triglicéridos plasmáticos observados en ratas Wistar jóvenes alimentadas durante 21 días con una dieta que contiene 2% (p/p) de DEHF (Mocchiutti y Bernal, 1997). Otros autores han sugerido que el descenso en los niveles de lípidos plasmáticos podría estar relacionado a la mayor velocidad de β -oxidación hepática de ácidos grasos, disminuyendo de esta forma la concentración de uno de los sustratos para la síntesis de triglicéridos en el hígado. (Osumi y Hashimoto, 1978; Tomaszewski y col, 1987; Reubsaet y col., 1990).

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Dada la diversidad de los efectos deletéreos del DEHF publicados en la bibliografía, como así también la repercusión que los mismos podrían tener sobre la salud humana, el objetivo general del presente trabajo de tesis fue investigar en animales de experimentación el impacto que la exposición crónica al contaminante alimentario DEHF produce sobre algunos aspectos metabólico-nutricionales.

En una experiencia preliminar se acotaron las variables dosis-tiempo estableciendo las condiciones apropiadas para el realizar los estudios posteriores.

En animales alimentados crónicamente con una dieta suplementada con 2% p/p de DEHF durante 21 días, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la relación existente entre la ganancia de peso corporal, la composición corporal y la eficiencia en la utilización de nutrientes.
- Evaluar el impacto nutricional del DEHF sobre el balance nitrogenado y el balance energético.
- Analizar el efecto de la exposición al DEHF sobre algunos aspectos del metabolismo de los hidratos de carbono en hígado y músculo esquelético.
- Estudiar el efecto del DEHF sobre algunos de los mecanismos responsables de la regulación de los lípidos plasmáticos.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- ANIMALES

Para realizar las distintas experiencias se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar provenientes de la Comisión Nacional de Energía Atómica (Buenos Aires, Argentina).

Los animales a su arribo se mantuvieron para su aclimatación en un ambiente con temperatura de 22 ± 2 °C, humedad 60 ± 3 % y un ciclo luz-oscuridad de 12 hs, con libre acceso al agua y a dieta estándar de laboratorio. Cuando los animales alcanzaron un peso aproximado de 110g se colocaron en jaulas metabólicas individuales que permitieron realizar la recolección diaria de orina, heces y restos de alimento.

Todos los animales se mantuvieron en condiciones de acuerdo a lo establecido por la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y las experiencias se programaron según normas internacionales para el uso de animales de laboratorio (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) que fueron oportunamente aprobadas para los Proyectos que subsidiaron los trabajos experimentales que conforman esta tesis.

2.-DIETAS

Los animales se alimentaron durante el tiempo establecido para cada experiencia con “dieta estándar de laboratorio” o “dieta experimental” según corresponda. La dieta estándar se preparó en el laboratorio cada 4-5 días y se conservó en heladera a 4 °C. Su composición (Tabla 3) está basada en las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (dieta AIN-93G formulada para roedores en la fase de crecimiento, preñez y lactancia) (Reeves P., 1993). La dieta experimental se preparó suplementando la dieta estándar con DEHF en la proporción adecuada al grupo dietario. El contenido energético de ambas dietas fue equivalente.

Tabla 3: Composición de la dieta estándar

		g% (p/p)	% Energía
Hidratos de Carbono	Almidón	53	54.5
	Sacarosa	10	10
Proteínas		20	19.9
Lípidos		7	15.6
Fibra		5	
Minerales		3.5	
Vitaminas		1.0	
L-Cistina		0.25	
Bitartrato de colina		0.25	

Composición de la dieta estándar de laboratorio basada en las recomendaciones del Instituto Americano de Nutrición (dieta AIN-93G)

3.- GRUPOS EXPERIMENTALES

Animales de 6 a 8 semanas de vida (peso aproximado de 110 g) se dividieron en grupos para realizar las distintas experiencias:

1. Grupo Control 21 días: animales que recibieron la dieta estándar de laboratorio durante 21 días (DC-21).
2. Grupo DEHF 2%: animales que recibieron la misma dieta estándar suplementada con 2 g de DEHF / 100 g de alimento durante 21 días (DEHF 2%-21).
3. Grupo control 90 días: animales que se alimentaron con la misma dieta estándar de laboratorio durante 90 días (DC-90).

4. Grupo DEHF 0.5%: animales que recibieron la misma dieta estándar suplementada con 0.5 g de DEHF / 100 g de alimento durante 90 días (DEHF 0.5%-90)

(A) En las experiencias preliminares los grupos de animales utilizados fueron los correspondientes a los ítems 1, 2, 3 y 4

(B) Para estudiar los efectos del DEHF a la dosis-tiempo seleccionada los grupos de animales utilizados fueron los correspondientes a los ítems 1 y 2, los cuáles fueron designados como DC y DEHF respectivamente.

4. TOMA DE MUESTRAS

Excepto se indique lo contrario, finalizado el período experimental (21 o 90 días) los animales se anestesiaron inyectando una mezcla de acepromacina (1mg/ kg peso corporal) y ketamina (100 mg/ kg peso corporal). Se tomaron muestras de sangre de la vena cava inferior, las que se centrifugaron a 4 °C y los sueros obtenidos se procesaron inmediatamente o se conservaron a - 20 °C hasta el momento de su utilización. Se tomaron muestras de hígado, corazón y tejido adiposo lumbar y epididimal y de músculos gastrocnemius, diafragma y soleus, los que se congelaron rápidamente con una pinza de Wollenberger enfriada en nieve carbónica. Los tejidos congelados se trituraron y se conservaron a - 80 °C hasta su utilización.

5.- CUANTIFICACIONES EN SANGRE

En las muestras de suero o plasma se cuantificaron:

- Las concentraciones de metabolitos: triglicéridos (TG), colesterol, fosfolípidos (FL), glucosa y lactato.

- Los niveles de hormonas: hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH), triiodotironina (T_3), tiroxina (T_4)
- Las actividades de las enzimas: aspartato aminotransferasa (ASAT), alanina aminotransferasa (ALAT)

5.1.- Cuantificación de metabolitos

5.1.1.- Triglicéridos

La concentración de triglicéridos (TG) en suero se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Wiener Lab.). La técnica se basa en la hidrólisis de los TG por medio de lipasas dando lugar a la formación de glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado a glicerol-fosfato en presencia de glicerokinasa y ATP, luego este derivado fosforilado es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de la glicerol fosfato oxidasa. El indicador final de color es una quinoneimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminoantipirina y 4-clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La quinoneimina posee un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de TG presentes en la muestra. Los resultados se expresaron en mg/ 100 ml y mM.

5.1.2- Colesterol

El nivel de colesterol en suero se determinó mediante el método espectrofotométrico de Harrison y Leffler (1959). Este método consta de dos etapas. En la primera se realiza una extracción en fase orgánica con alcohol isopropílico por medio de la cual se precipitan las proteínas del suero y el colesterol es simultáneamente extraído. El agregado del reactivo de color ($FeCl_3 + H_3PO_4 + H_2SO_4$) a una alícuota del sobrenadante produce un color estable cuya densidad óptica leída a 540 nm es proporcional a la cantidad total de colesterol presente. Los resultados se expresaron en mg/ 100 ml

5.1.3.- Fosfolípidos

Para la determinación de fosfolípidos (FL) totales se utilizó la técnica de Duck-Chong (1979). El fósforo de los FL se convierte primero en fósforo inorgánico, calentando a fuego directo el extracto lipídico en presencia de $Mg(NO_3)_2$ hasta desprendimiento de vapores blancos. El residuo se disuelve en HCl. El fósforo inorgánico se determina con un reactivo ácido de molibdato-verde de malaquita dando lugar a la formación de un complejo entre el fosfomolibdato y el colorante básico a pH bajo que se estabiliza con un tensoactivo. La intensidad de color medida a 650 nm es directamente proporcional a la concentración de FL presentes en la muestra. Los resultados se expresaron en mg/ 100 ml.

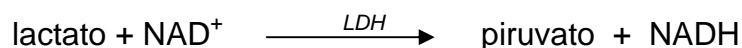
5.1.4.- Glucosa.

Los niveles de glucosa en plasma se cuantificaron mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Wiener Lab.). La glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Éste último en presencia de peroxidasa oxida al cromógeno 4-aminofenazona/fenol a una quinoneimina de color rojo cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a 505 nm y es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra. Los resultados se expresaron en mg/ dl.

5.1.5 - Lactato

Para cuantificar los niveles de lactato se desproteinizó la sangre inmediatamente luego de su extracción con ácido perclórico al 6%. Luego de centrifugar se separó el sobrenadante y se neutralizó con carbonato de potasio. En el sobrenadante se cuantificó la concentración de lactato utilizando un método enzimático (Lowry y Passonneau, 1972).

La enzima lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la oxidación del L-lactato utilizando NAD como cofactor:



Para obtener una oxidación cuantitativa del L-lactato los productos de reacción se removieron del medio a través de la adición de hidracina que es convertida en hidrazona.

El incremento de la fluorescencia debido a la formación del NADH es proporcional a la concentración de L-lactato. Los resultados se expresaron en μM .

5.2.- Cuantificación de hormonas tiroideas

Los niveles de tiroxina (T_4), triiodotironina (T_3) y hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH) circulantes en suero se cuantificaron mediante técnicas de radioinmunoensayo en fase sólida.

5.2.1 - Tiroxina.

Los niveles de tiroxina (T_4) circulantes en suero se cuantificaron empleando tubos recubiertos con el Anticuerpo anti- T_4 . La T_4 marcada con ^{125}I compite con la T_4 presente en la muestra de suero de los animales por el Anticuerpo, en presencia de agentes que bloquean las proteínas que enlazan a la hormona tiroidea. Los tubos se lavan, se decanta y se mide la radiactividad remanente. La concentración de T_4 se obtuvo a partir de una curva de calibración y se expresó como $\mu\text{g}/100\text{ml}$.

5.2.2.- Triiodotironina.

Los niveles totales de Triiodotironina (T_3) circulantes en suero se cuantificaron mediante de radioinmunoensayo en fase sólida. La T_3 marcada con ^{125}I compite con la T_3 presente en el suero por los sitios de unión del Anticuerpo. Esta reacción tiene lugar en presencia de agentes bloqueantes cuya función es liberar la T_3 unida a las proteínas de transporte. Por lo tanto el ensayo permite cuantificar la T_3 total, ya que tanto la T_3 libre como la conjugada a proteínas son capaces de competir con la T_3 marcada por los sitios del Anticuerpo. Dado que el Anticuerpo se encuentra inmovilizado a la pared del tubo de polipropileno, se decanta el sobrenadante para terminar la competición y aislar la fracción de T_3

marcada unida al anticuerpo. Utilizando un contador gamma se obtuvo el valor de radiactividad y mediante una curva de calibración se pudo obtener la concentración de T₃ presente en el suero. Los resultados se expresaron como ηg/100 ml.

5.2.3.- Hormona estimulante de la glándula tiroides (TSH)

La cuantificación de TSH en suero se realizó mediante un método radioinmunológico. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-TSH marcado con ¹²⁵I en fase líquida y un anticuerpo anti-TSH monoclonal inmovilizado en la pared del tubo de poliestireno. La TSH es captada por el anticuerpo anti-TSH monoclonal de la superficie del tubo de poliestireno y el anticuerpo anti-TSH policlonal marcado radiactivamente. El anticuerpo anti-TSH marcado con ¹²⁵I es removido decantando la mezcla de reacción y lavando el tubo, con el fin de reducir la unión no específica. La concentración de TSH es directamente proporcional a la radiactividad presente en el tubo luego del lavado. La radiactividad se midió en un contador de emisión gamma y mediante una curva de calibración se pudo obtener la concentración de TSH presente en el suero. Los resultados se expresaron como mUI/ ml.

5.3.- Cuantificación de actividades enzimáticas

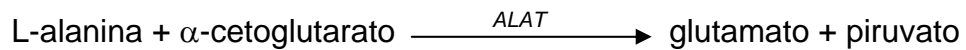
En muestras de suero se determinaron las actividades de enzimas marcadoras de la funcionalidad hepática: aspartato amino transferasa y alanina amino transferasa, utilizando kits comerciales (Wiener Lab.).

5.3.1.- La aspartato amino transferasa (ASAT) cataliza la siguiente reacción:



El oxalacetato formado es inestable y se transforma en piruvato, el cual reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505 ηm. La intensidad de color obtenida es proporcional a la actividad ASAT. Los resultados se expresaron en UI/ l.

5.3.2.- La alanina amino transferasa (ALAT) cataliza la siguiente reacción:



El piruvato formado reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505 nm. La intensidad de color obtenida es proporcional a la actividad ALAT. Los resultados se expresaron en UI/ l.

6. BALANCE NITROGENADO

En las experiencias destinadas a evaluar el balance nitrogenado, la composición corporal y la eficiencia energética a lo largo de todo el período experimental (21 días), se procedió de la siguiente manera: diariamente se pesaron los animales, registrándose la ingesta de alimento y recolectando en forma separada la orina, materia fecal y los restos de alimento. La orina se recolectó en recipientes conteniendo H₂SO₄ (2M) en un volumen suficiente como para mantener el pH < 2, a los fines de conservar la orina y evitar pérdidas de nitrógeno (N). Una vez registrado el volumen total de 24 hs, se centrifugaron y el sobrenadante se conservó a - 20 °C para la posterior cuantificación de N, urea y creatinina. La totalidad de la materia fecal se recolectó en recipientes metálicos que se colocaron en estufa a 60 °C hasta peso constante. Alícuotas de esta materia fecal deshidratada se conservaron a - 20 °C para la posterior cuantificación de N (Houseknecht y col, 1992; Boisclair y col. 1993).

Para determinar humedad y contenido de N del alimento, muestras de las distintas dietas se secaron hasta peso constante.

6.1.- Cuantificación de Nitrógeno

La cuantificación de N en alícuotas de orina (1 ml), de materia fecal (aproximadamente 1g) y de alimento (aproximadamente 1-2 g) se realizó mediante el método de Kjeldahl (Cunniff, 1999). Básicamente para ello, las muestras se

digirieron con H_2SO_4 concentrado con el fin de destruir oxidativamente la materia orgánica. De esta manera el N es transformado en H_3N , el cual queda retenido como $(\text{H}_4\text{N})_2\text{SO}_4$. El proceso se aceleró mediante catalizadores como CuSO_4 o Se y por elevación de la temperatura de ebullición del H_2SO_4 por el agregado de Na_2SO_4 o K_2SO_4 anhidro. Toda la materia orgánica se transforma en CO_2 y H_2O que se eliminan por calentamiento. El H_4N^+ es transformado en H_3N por adición de una solución de alcalina (NaOH conc.). Este H_3N es arrastrado por vapor de agua y recibido en un frasco colector que contiene HCl 0.1N. El exceso de HCl que no reaccionó con el H_3N , se titula con NaOH 0.1N. Los meq de N corresponden a la diferencia entre los meq de HCl totales presentes en el frasco colector y los meq de HCl en exceso. Los resultados se expresaron como g N excretados en orina/ 24 hs, g N excretados en materia fecal/ 24 hs o g N ingerido/ 24 horas.

Conociendo la cantidad y contenido de N de la comida ingerida, de la orina y de las heces de cada animal, se calculó el balance nitrogenado como la diferencia entre N ingerido y el N excretado en orina y materia fecal.

El balance nitrogenado acumulado se calculó como la sumatoria de los valores diarios de balance nitrogenado durante los 21 días de la experiencia.

6.2.- Cuantificación de urea

La urea se cuantificó en orina mediante el método enzimático que emplea ureasa como generador de amoníaco (Wiener Lab.) En presencia de ión amonio proveniente de la urea y por acción de hipoclorito de sodio en medio alcalino, se produce la oxidación del fenol con formación de indofenol (reacción de Berthelot) compuesto de color azul, cuya intensidad, medida espectrofotométricamente a 540 nm es proporcional a la concentración de amoníaco y por lo tanto a la de urea presente en la muestra. Los resultados se expresaron en g/ l.

6.3.- Cuantificación de creatinina

El nivel de creatinina en orina se determinó mediante la reacción de Jaffé, empleando un kit comercial (Wiener Lab.). La creatinina reacciona con el ácido pícrico produciendo un compuesto coloreado cuya intensidad de color se mide espectrofotométricamente a 510 nm. Las concentraciones se expresaron en g/l.

7.- COMPOSICIÓN CORPORAL

Para determinar la composición corporal inicial, un grupo de animales se sacrificaron al día 0 de la experiencia. Para ello los animales se anestesiaron según se describió en el ítem 4 y se rasuraron para eliminar completamente el pelo. Luego de realizada una incisión abdominal se evisceraron, pesándose la carcasa que se conservó a - 20 °C hasta su procesamiento. Distintas alícuotas de carcasas se utilizaron para la determinación del contenido de proteínas, grasas, agua y cenizas (Jeszka y col., 1991; Ouerghi, 1992).

La composición corporal final se determinó en los animales de ambos grupos al finalizar el período experimental (21 días), de la misma manera que se detalló anteriormente.

7.1.- Determinación de proteínas

Alícuotas de aproximadamente 1 g de carcasa se procesaron mediante la técnica de Kjeldahl descrita anteriormente en el ítem 6.1. El contenido total de N de las carcasas secas se multiplicó por 6.25 con el fin de estimar la cantidad de proteínas presentes (Cunniff, 1999). Los resultados se expresaron como g de proteínas/ 100 g de carcasa.

7.2.- Determinación de agua.

El contenido de agua se determinó mediante secado térmico (Cunniff, 1999). Para ello se pesaron alícuotas de aproximadamente 30g de carcasa que se

llevaron a estufa a 60 °C hasta peso constante. Los resultados se expresaron en g de agua/ 100g de carcasa.

7.3.- Determinación de grasa

La cuantificación del contenido de grasa total se realizó mediante extracción con solvente utilizando el extractor de Twysselman (Cunniff, 1999). Para ello, en alícuotas de carcasas secas y trituradas se realizó una extracción con éter de petróleo. De esta forma se valoraron todas las sustancias solubles en éter. El contenido de grasa se obtuvo por gravimetría. Los resultados se expresaron en g de grasa/ 100g de carcasa.

7.4.- Determinación de cenizas

Las cenizas se determinaron por incineración única (Cunniff, 1999). Para ello, alícuotas de carcasas secas se colocaron en crisoles de porcelana los que se calentaron inicialmente sobre tela de amianto con mechero hasta lograr la carbonización de la materia orgánica, para continuar luego en triángulo de pipa a fuego directo. El calcinamiento se concluyó en mufla a una temperatura de 550 °C. Una vez obtenidas las cenizas blancas los crisoles se dejaron enfriar en desecador y se pesaron. Los resultados se expresaron en g cenizas/ 100g de carcasa.

8.- CONTENIDO ENERGÉTICO CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA

El contenido de energía corporal se determinó en los animales sacrificados al inicio de la experiencia y en los grupos DC y DEHF luego de los 21 días del tratamiento dietario.

El contenido de energía de las carcasas se evaluó mediante 2 metodologías: a partir de la composición corporal centesimal y mediante el empleo de bomba calorimétrica para corroborar la exactitud de los resultados (Jeszka J. y col. 1991, Ouerghi y col., 1992).

8.1.- Contenido energético según la composición corporal centesimal

Se calculó a partir del contenido de proteínas y lípidos de la carcasa determinados según se explicara anteriormente en animales sacrificados al día 0 y al final del período experimental (21 días). Se emplearon los factores de conversión de Canolty (1976): 18.4 KJ/ g de proteína y 39.7 KJ/ g de lípido para transformar en energía (KJ) el contenido de proteínas y grasas (Dulloo y Girardier,1992). El contenido energético de la carcasa (E.C.) se calculó como:

$$\text{E.C. (KJ)} = (\text{g proteínas} \times 18.4 \text{ KJ/ g proteína}) + (\text{g grasas} \times 39.7 \text{ KJ/ g grasa})$$

Los valores de E.C. fueron afectados por el peso corporal de cada animal.

$$\text{E.C.} = \text{KJ carcasa/ g} \times \text{peso animal (21 días)}.$$

La ganancia de energía así como también la ganancia de masa proteica y grasa corporal durante 21 días se calculó como la diferencia entre el contenido corporal al final de la experiencia del grupo DC o DEHF (día 21) y el contenido corporal inicial.

8.2.– Contenido energético corporal obtenido por Calorimetría

En muestras de 0.5 a 1 g de homogenado de carcasas secas se determinó el calor de combustión utilizando un calorímetro Parr (mod 1341). Se empleó ácido benzoico como estándar de referencia termoquímico para la calibración del calorímetro.

8.3.- Eficiencia energética

La eficiencia energética (EE) durante 21 días de dieta se calculó mediante el cociente entre la ganancia de energía de la carcasa y la ingesta energética (IE) en dicho período (Dulloo y Girardier, 1992; Bell y col, 1995; Especter y col, 1995). La ingesta energética se calculó multiplicando la cantidad de alimento consumido por el número de KJ aportados por gramo de dieta (16.8 KJ/g).

$$\text{EE} = \frac{\text{E. carcasa final} - \text{E. carcasa inicial}}{\text{I.E. (MJ/21 días)}} \text{ (KJ/21 días)}$$

$$\text{I.E. (MJ/21 días)}$$

9. CUANTIFICACIONES TISULARES

Para cuantificar los niveles de: triglicéridos, colesterol y fosfolípidos una cantidad determinada del tejido conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se homogeneizó con un volumen apropiado de solución fisiológica fría ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Cuando fue necesario se prepararon extractos tisulares libres de proteínas mediante desproteinización con ácido perclórico (HClO_4). El sobrenadante obtenido luego de una centrifugación a 15000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos se neutralizó con KHCO_3 . Cuando la mayor parte del CO_2 ha sido liberado, el precipitado de KClO_4 se removió por centrifugación a 15000 rpm a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos. El sobrenadante se fraccionó en distintas alícuotas para la cuantificación de diversos metabolitos.

9.1.- Contenido de lípidos

9.1.1.- Triglicéridos

Se utilizaron 2 metodologías:

a) En homogeneizados de tejidos (hígado, músculos y corazón) se determinó el contenido de triglicéridos (TG) mediante la técnica propuesta por Laurell (1966). Los TG se extraen utilizando una mezcla éter isopropílico:etanol (95:5; v/v) y luego son saponificados con una solución KOH 6N:etanol (0.5:9.5; v/v). El glicerol liberado es cuantificado mediante el ensayo de Lambert y Neish que consiste en la oxidación del glicerol con peryodato generando un mol de ácido fórmico y dos moles de formaldehído por cada mol de sustrato. El formaldehído reacciona a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ con ácido cromotrópico para dar un compuesto violeta, cuya intensidad de color se mide a 570 nm y es proporcional a la cantidad de TG presentes en la muestra. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol/ g}$ tejido húmedo.

b) Para determinar el contenido de TG en suspensiones celulares de tejido adiposo se realizó una extracción de los lípidos con una mezcla cloroformo/metanol (2:1; v/v) según la técnica descrita por Folch (1957). Luego

de 2 horas de extracción se filtró y se realizaron sucesivos lavados con soluciones de sales y solventes para eliminar sustancias no lipídicas. Se separaron las fases y se cuantificó el glicerol mediante la técnica de Lambert y Neish descrita en el apartado anterior.

9.1.2.- Colesterol

En homogeneizados (1/10) de hígado y de corazón se determinó la concentración de colesterol según la técnica descrita para suero (ítem 5.1.2). Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.

9.1.3.- Fosfolípidos

En homogeneizados (1/10) de hígado se determinó la concentración de FL según la técnica descrita para suero (ítem 5.1.3). Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.

9.2.- Contenido de metabolitos energéticos.

En extractos tisulares de hígado y músculo obtenidos mediante desproteinización con ácido perclórico (HClO_4) (ítem 9) se cuantificaron por métodos enzimáticos fluorimétricos las concentraciones de ATP, creatina fosfato y creatina (Lowry y Passonneau, 1972).

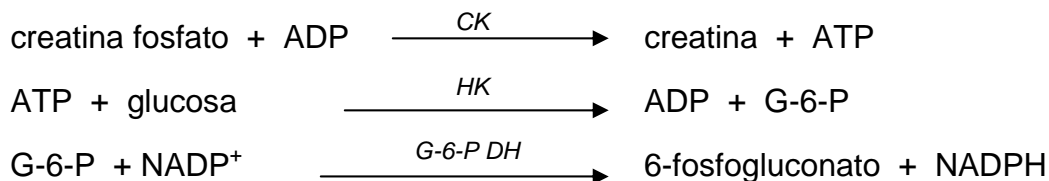
9.2.1.- ATP

El ATP presente en la muestra se defosforila en presencia de glucosa por acción de la hexoquinasa (HK). La glucosa-6-fosfato (G-6-P) generada en la reacción anterior es oxidada a 6-fosfogluconato en presencia de NADP y la enzima G-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P DH). El aumento de la fluorescencia debido a la formación de NADPH es proporcional a la concentración de ATP en la muestra.



9.2.2.- Creatina fosfato

La creatina fosfato en presencia de ADP y creatina kinasa (CK) genera ATP. Este último es posteriormente cuantificado siguiendo la secuencia de reacciones descritas anteriormente (ítem 9.2.1). El aumento de la fluorescencia debido a la formación de NADPH es proporcional a la concentración de creatina fosfato. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.

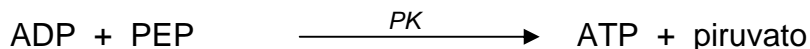


9.2.3.- Creatina

La creatina kinasa (CK) cataliza la fosforilación de la creatina en presencia de ATP mediante la siguiente reacción:



El ADP formado es fosforilado nuevamente en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP) y la enzima piruvato kinasa (PK):



El piruvato producido es reducido por la enzima Lactato dehidrogenasa (LDH) utilizando NADH como cofactor:



La disminución de la fluorescencia debido a la oxidación del NADH es proporcional a la concentración de creatina presente en la muestra. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo

10.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

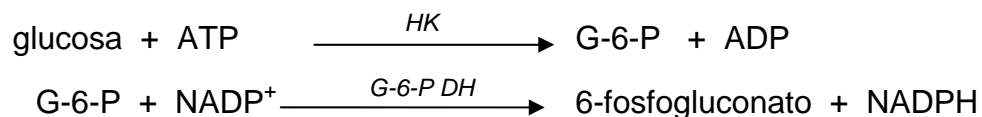
En extractos tisulares de hígado y músculo obtenidos mediante desproteinización con ácido perclórico (HClO_4) (ítem 9) se cuantificaron por

métodos enzimáticos fluorimétricos las concentraciones de los principales metabolitos que participan en el metabolismo de la glucosa, a saber: glucosa, glucosa-6-fosfato (G-6-P), glucosa-1-fosfato (G-1-P), fructosa-6-fosfato (F-6-P), fructosa-1,6-difosfato (F-1,6-P₂), piruvato y lactato (Lowry y Passonneau, 1972), así como también las concentraciones de glucógeno (Adamo y Graham 1998) y citrato (Lowry y Passonneau, 1972).

10.1.-Glucosa

El contenido de glucosa se determinó por un método enzimático que utiliza las enzimas hexoquinasa (HK) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P DH).

En el primer paso, la adición de la enzima HK fosforila la glucosa a G-6-P en presencia de ATP. Luego, la G-6-P es oxidada con formación de 6-fosfogluconato en presencia de la enzima G-6-P DH que utiliza NADP como cofactor. El aumento de la fluorescencia debido a la reducción del NADP es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/ g}$ tejido húmedo.



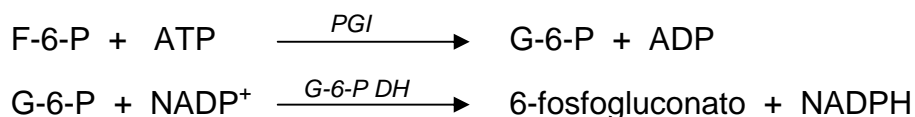
10.2.- Glucosa-6-P

Para cuantificar la G-6-P se adicionó la enzima G-6-P DH, que en presencia de NADP como cofactor conduce a la oxidación de la G-6-P con formación de 6-fosfogluconato y NADPH. El incremento de la fluorescencia debido a la formación de éste último compuesto es proporcional a la concentración de G-6-P presente en la muestra. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/ g}$ tejido húmedo.



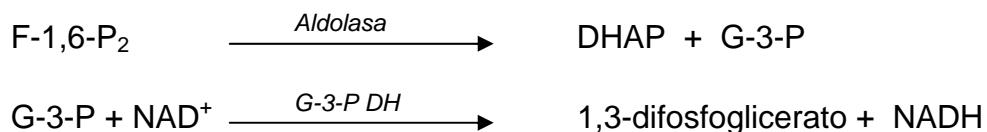
10.3.- Fructosa-6-P (F-6-P)

Para cuantificar la F-6-P se adicionó la enzima fosfoglucoasa isomerasa (PGI), la que en presencia de ATP convierte la F-6-P en G-6-P. La adición de la enzima la G-6-P DH en presencia de NADP como cofactor conduce a la oxidación de la G-6-P con formación de 6-fosfogluconato y NADPH. El incremento de la fluorescencia debido a la formación de éste último compuesto es proporcional a la concentración de F-6-P. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.



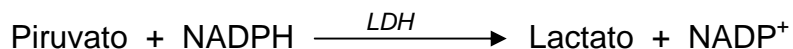
10.4.- Fructosa-1,6-difosfato (F-1,6-P₂)

Para la determinación de F-1,6-P₂ se adicionó la enzima aldolasa, que escinde la F-1,6-P₂ en dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (G-3-P). Este último en presencia de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G-3-P DH) que utiliza NAD como cofactor, es oxidado a 1,3-difosfoglicerato con formación de NADH. El incremento de la fluorescencia debido a la formación de éste último compuesto es proporcional a la concentración de F-1,6-P₂. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.



10.5.- Piruvato

Para la determinación de piruvato se adicionó la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) que cataliza la reducción del piruvato utilizando NADPH como cofactor:



El equilibrio de la reacción está desplazado hacia la formación de lactato, por lo que la disminución de la fluorescencia debida a la oxidación del NADPH es

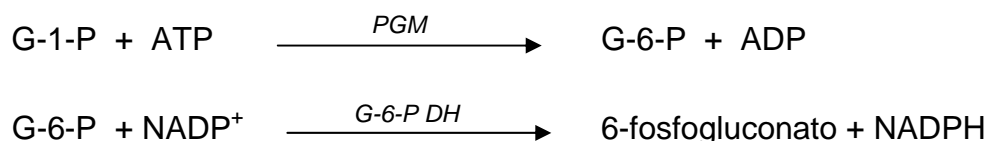
proporcional a la concentración de piruvato. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/ g}$ tejido húmedo.

10.6.- Lactato

Se utilizó la misma técnica descrita para cuantificar lactato en sangre (ítem 5.1.5). Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/ g}$ tejido húmedo

10.7.- Glucosa-1-fosfato (G-1-P)

Para la G-1-P se adicionó la enzima fosfoglucomutasa (PGM), la que convierte la G-1-P en G-6-P en presencia de ATP. Luego se adiciona la enzima G-6-P DH que en presencia de NADP como cofactor conduce a la oxidación de la G-6-P con formación de 6-fosfogluconato y NADPH. El incremento de la fluorescencia debido a la formación de éste último compuesto es proporcional a la concentración de G-1-P. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/ g}$ tejido húmedo.



10.8.- Glucógeno total y sus fracciones pro- y macro-glucógeno

El glucógeno total se cuantificó mediante dos metodologías: hidrólisis ácida y separación de las fracciones pro-glucógeno (PG) y macro-glucógeno (MG) (Adamo y Graham, 1998).

- Método de la hidrólisis ácida

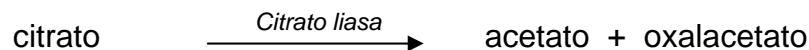
Muestras de tejidos se homogeneizaron en presencia de HCl 2M y se mantuvieron 2 hs a 100 °C para hidrolizar el glucógeno a glucosa. Una vez neutralizado con NaOH 2M se cuantificó el contenido de glucosa por el método enzimático descrito en el ítem 10.1 utilizando las enzimas hexoquinasa y G-6-P DH. Los resultados se expresaron en μmol de glucosa/ g tejido húmedo.

- Fracciones pro-glucógeno y macro-glucógeno

Para realizar la separación de las fracciones PG y MG, muestras de tejido hepático y/o muscular se desproteinizaron mediante la adición de HClO₄ 1.5M. Luego en el sobrenadante se procedió a determinar el contenido de MG mientras que en el precipitado se cuantificaron los niveles de PG. Para tal fin, en ambas fracciones se realizó una hidrólisis ácida con HCl 2M y se mantuvieron 2 hs a 100°C para hidrolizar el glucógeno a glucosa. Posteriormente se cuantificó el contenido de glucosa en ambas fracciones mediante la técnica enzimática fluorimétrica descrita en el ítem 10.1. Los resultados de MG y PG se expresaron en μmol de glucosa/ g tejido húmedo.

10.9.- Citrato

La enzima citrato liasa cataliza la degradación del citrato a oxalacetato y acetato según la siguiente reacción:



La reacción es reversible por lo que la ruptura del citrato es cuantitativa si se remueve completamente el oxalacetato del sistema. Para tal fin se adicionó la enzima malato deshidrogenasa (MDH) que permitió la reducción del oxalacetato a malato con la oxidación del NADH.



La disminución de la fluorescencia debido a la desaparición del NADH es proporcional a la concentración de citrato presente en la muestra. Los resultados se expresaron en μmol/ g tejido húmedo.

10.10.-Determinación de la actividad glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G-6-P DH)

Para determinar la actividad de la enzima G-6-P DH en hígado se utilizó la técnica de Löhr y Waller (Bergmeyer). Para ello, el hígado se lavó con solución fisiológica fría (4 °C) para remover la mayor parte de la sangre y así evitar errores

como consecuencia de la G-6-P DH presente en los glóbulos rojos. Luego se realizó un homogenado con solución salina conteniendo EDTA 6.6×10^{-4} M para la obtención del extracto crudo de la enzima. En el mismo se determinó la actividad enzimática según la reacción:



La velocidad de formación del NADPH fue cuantificada mediante el aumento en la absorción a 340-366 nm en función del tiempo.

La actividad enzimática G-6-P DH se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Actividad} = \frac{\Delta E}{\Delta t} \times \frac{V}{\epsilon \times d \times v} \times C_{\text{proteínas}}^{-1} = \mu\text{mol}/\text{min} \times \text{mg prot.}$$

Donde:

Actividad = $\mu\text{mol}/\text{min. mg proteína}$

$\Delta E/\Delta t$: variación de la extinción respecto del tiempo (min^{-1})

ϵ = coeficiente de extinción del NADPH a 340 nm = $6.22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$

d = paso de luz de la cubeta (cm)

V = volumen de ensayo (ml)

v = volumen de muestra utilizado en el ensayo (ml)

$C_{\text{proteínas}}$ = concentración de proteínas en el extracto analizado (mg/ml)

La actividad enzimática en el hígado se expresó por mg de proteína soluble en el sobrenadante. Para cuantificar las proteínas se utilizó el método del ácido bicinquinónico. Para ello, a una alícuota del sobrenadante se le adicionó el reactivo de trabajo constituido por una solución alcalina del ácido bicinquinónico y una solución de CuSO_4 . Bajo condiciones alcalinas, el Cu^{+2} forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas y lo reduce a Cu^{+1} . El ácido bicinquinónico actúa como reactivo de captura del Cu^{+1} . La absorbancia medida a 565 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas presentes en la muestra.

11.- TEST DE TOLERANCIA ORAL A LA GLUCOSA

Con la finalidad de evaluar la capacidad de asimilación y metabolización por los tejidos periféricos de la glucosa se realizó un Test de Tolerancia Oral a la Glucosa (TTOG). Los animales de ambos grupos fueron ayunados restringiéndose el alimento a 4 g de comida a las 17 hs del día anterior al de la prueba, verificando que fuera consumido en 1 a 2 hs. Entre las 8.00 y las 10.00 hs del día siguiente se realizó el TTOG administrando por sonda oral una solución de glucosa al 20% a razón de 1g de glucosa/ kg de peso corporal. Se recolectaron muestras de sangre de la cola en tubos conteniendo EDTA (18 mmol/ l de concentración final) inmediatamente antes y a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la incorporación de la glucosa (Teachey y col., 2003). Las muestras se centrifugaron a 3000 x g y el plasma así obtenido se procesó inmediatamente para determinar la concentración de glucosa mediante el método enzimático descrito en el ítem 5.1.4). Inmediatamente después de finalizado el TTOG, los animales recibieron subcutáneamente 2.5 ml de solución salina estéril 0.9% para compensar las pérdidas de plasma.

La respuesta al TTOG fue evaluada a través de la comparación de los valores individuales a cada tiempo y mediante la cuantificación del área integrada bajo la curva (AIC, 0 a 180 minutos).

12.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO LIPÍDICO

12.1.- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo esquelético

Dada la diferencia en la capacidad oxidativa y en la utilización energética de las distintas fibras musculares, seleccionamos como representativos para estas cuantificaciones los músculos gastrocnemius, soleus y diafragma.

La actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) se determinó en las muestra de tejidos musculares mediante una adaptación de la técnica de Nilsson-Ehle y Schotz (1976). Para tal fin, los animales se anestesiaron luego de 12 horas

de ayuno y se tomaron los músculos indicados que se lavaron en buffer de NH₄Cl, se secaron, y se congelaron para su posterior conservación a - 80 °C hasta el momento de su utilización. Se preparó un homogenado (1:10) de tejido muscular en buffer NH₄Cl/ heparina 50 mM-pH=8.6/ 4UI/ml, se centrifugó a 6500 rpm a 4 °C durante 15 min y el sobrenadante se incubó con una emulsión del sustrato durante 1 hora a 37 °C con agitación constante. El sustrato se preparó utilizando una emulsión lipídica (lipofundin 20%) que contiene TG con ácidos grasos de cadena larga y media, suero de rata inactivado a 56 °C durante 10 min como aportador de apoproteína C, albúmina sérica bovina y buffer de glicina 100mM pH=8.6. Los ácidos grasos liberados (AG) al medio se extrajeron con un sistema bifásico de H₂SO₄ 1N/ heptano/ alcohol isopropílico (0.1:1:4; v/v/v) y los AG presentes en la fase orgánica se cuantificaron mediante la técnica de Dole y col. (1960). Para ello, al extracto obtenido se le adicionó agua y heptano para lograr la separación de fases. Se controló el pH de la fase acuosa y cuando fue necesario se ajustó a pH 2.0 a 2.5. El sistema se separó en dos fases bien definidas y se tomó un volumen de la fase superior por duplicado y los ácidos grasos presentes se titularon con NaOH 0.018 N en presencia de azul de timol al 0.1% como solución indicadora y bajo corriente de nitrógeno gaseoso. Cuando se alcanzó el punto final (viraje de color) se detuvo el flujo de nitrógeno para permitir la separación de fases y se midió el volumen de álcali gastado. Como estándar se utilizó ácido palmítico recristalizado disuelto en heptano.

La actividad de la LPL en tejidos musculares se calculó de la siguiente forma:

$$\text{Actividad} = \frac{\mu\text{mol AG}}{\text{g tejido} \times \text{hora}}$$

Los resultados de las actividades de las enzimas LPL musculares se expresaron como $\mu\text{mol/ g tejido/ hora}$

12.2.- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo lumbar y epididimal

A pesar de que el tejido adiposo de la rata representa sólo un 7-10% de su peso corporal y que recibe menos del 5% del flujo sanguíneo, se ha demostrado que es el principal tejido responsable de la remoción de las lipoproteínas ricas en triglicéridos presentes en circulación. La actividad de la LPL en tejido adiposo se determinó empleando la técnica descrita por Martín Hidalgo y col. (1994). Una cantidad de tejido adiposo se homogeneizó con buffer Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl) 0.2 M pH=8.2 a 4 °C, en una proporción de 0.2 g de tejido/ ml de buffer y se homogeneizó en frío. Una alícuota del homogeneizado fue utilizada para la preparación del extracto enzimático “polvo de acetona”. Esta preparación consiste en una doble extracción con acetona fría (1:6) (-20°C) y una doble extracción con éter dietílico frío (1:6) (- 20 °C). El polvo de acetona obtenido se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno (1 hora a 4 °C) y se resuspendió en buffer NH₄OH-NH₄Cl 0.05 M pH=8.1, en ausencia y en presencia de NaCl 2M. Alícuotas de dicha suspensión se incubaron durante 1 hora a 37 °C, en un baño termostatizado con agitación en un medio constituido por: trioleína (5.66 µmol), lecitina (0.3 mg/ ml), albúmina sérica bovina (1g/ 100ml), buffer Tris-HCl pH=8.0 (66.67 mM) y suero inactivado de rata (8.33%). Finalizado el período de incubación, la reacción se detuvo por el agregado de una mezcla de H₂ SO₄1N:n-heptano:alcohol isopropílico (0,1:1:4; v/v/v) que a su vez permitió la extracción de los AG liberados en la fase superior no polar, los cuales fueron cuantificados mediante la técnica de Dole y col. (1960) tal como se describió en el ítem 12.1.

La actividad LPL en tejido adiposo se determinó sustrayendo la actividad lipolítica no específica (determinada en presencia de NaCl 2M) de la actividad lipolítica total (determinada en ausencia de NaCl 2M).

Actividad LPL T.A.= (µmoles AG/g/h) sin ClNa - (µmoles AG/g/h) con ClNa

Los resultados de las actividades de las enzimas LPL de los tejidos adiposos se expresaron como µmol/ g tejido/ hora.

12.3.- Estudio de la lipólisis “in vitro”

12.3.1.- Aislamiento de adipocitos

El aislamiento de adipocitos se realizó mediante la técnica de Rodbell modificada (Soria y col. 2002). Los animales de experimentación previamente ayunados se sacrificaron mediante decapitación y el tejido adiposo epididimal se lavó rápidamente con solución fisiológica (NaCl al 0.9 %). El tejido adiposo se colocó en viales de vidrio con buffer Krebs-Ringer pH = 7.4 que contenía 1.25 mM de CaCl₂, 5.5 mM de glucosa, 3% de albúmina bovina sérica y 1mg de colagenasa/ g de tejido. La digestión del tejido adiposo se realizó a 37 °C durante 60 minutos, con agitación constante (120 ciclos por minuto) y oxigenación con O₂/CO₂ (95%/ 5%). Luego de finalizado el tiempo de incubación las células grasas se separaron del estroma y de los vasos sanguíneos por filtración a través de una doble capa de malla de nylon. Los adipocitos se removieron cuidadosamente por aspiración, se lavaron mediante resuspensión en buffer sin colagenasa a 37 °C y se centrifugaron a 160 x g durante 1 min. Este procedimiento de lavado se repitió 2 veces. Finalmente los adipocitos lavados se resuspendieron en el mismo buffer sin colagenasa.

12.3.2 - Determinación del diámetro y volumen promedio de los adipocitos

Para medir los diámetros de los adipocitos se utilizó la metodología propuesta por Di Girolamo y col. (1971). A una alícuota de la suspensión celular, obtenida según lo descrito en el ítem 12.3.1, se le agregó una gota de solución acuosa del colorante azul de metileno al 1% y se examinó al microscopio. Los diámetros de los adipocitos aislados se midieron con un aumento de 40X, utilizando un ocular graduado. La medición del diámetro de 200 células grasas se realizó en 15-20 minutos, ya que cuando se prolonga el tiempo de observación, las células comienzan a deformarse. Se graficó la distribución de las células en función de los diámetros celulares y se calculó el diámetro medio de la población celular y su varianza.

Dado que la población de células grasas presentó una distribución normal con respecto al diámetro, el volumen medio de la célula adiposa se calculó de acuerdo a la fórmula propuesta por Goldrick (1967):

$$VC = \pi/6 \times (3S^2 + X^2) X$$

Donde:

VC: volumen celular medio

X: diámetro celular medio

S²: varianza del diámetro celular medio

12.3.3.- Determinación del número de células en la suspensión

Si bien en distintos tejidos, la celularidad se puede determinar por su contenido de ADN, esto no es del todo conveniente en el tejido adiposo debido a que, aún cuando los adipocitos son los constituyentes principales de este tejido, las células del estroma representan la fuente más importante de material nuclear extractable. Por esta razón la estimación del número de células grasas en la suspensión celular se obtuvo dividiendo el contenido total de triglicéridos (TG) en la suspensión por el contenido de TG promedio en las células grasas (CLCM), suponiendo que todo el contenido lipídico en el tejido adiposo es intracelular y asumiendo una configuración esférica en las células grasas (Di Girolamo, 1971; Jolly y col. 1980).

De esta manera: **CLCM = VC x δ trioleína** donde δ : densidad

El contenido total de TG se determinó en una alícuota de la suspensión celular mediante el método propuesto por Folch y col. descrito anteriormente (ítem 9.1.1.b).

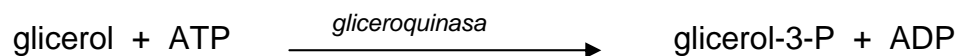
$$\text{Nº de células en suspensión} = \text{TG totales en suspensión} / \text{CLCM}$$

12.3.4.- Determinación de la lipólisis basal e inducida en adipocitos aislados

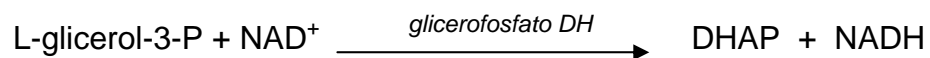
Luego del aislamiento, los adipocitos se incubaron ($1-2.5 \times 10^5$ células/ ml) con o sin adición de un efector de la lipólisis (noradrenalina) a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 μM) a 37 °C, con agitación constante y oxigenación con O_2/CO_2 (95% / 5%) durante 1 hora. (Olefky, 1977; Jolly y col., 1980).

Antes de la incubación (tiempo = 0) y 1 hora después, se detuvo la reacción sumergiendo los viales en un baño de agua fría, seguido de centrifugación a 160 x g a 4 °C durante 5 min. Se separó la capa superior de adipocitos y se desproteinizó el medio de incubación libre de células con HClO_4 . Luego de la centrifugación, el sobrenadante se neutralizó y se conservó a - 20°C para la determinación de glicerol como índice de la lipólisis (Yamaghisi, 2000).

La cuantificación del glicerol se realizó utilizando una adaptación del método enzimático de Wieland para cuantificar el NADH mediante fluorimetría. Básicamente, el glicerol es fosforilado a glicerol-3-P mediante la acción de la enzima gliceroquinasa con consumo de ATP.



El Glicerol-3-P es convertido a DHAP por la glicerofosfato deshidrogenasa con formación de NADH.



El aumento de la fluorescencia debido a la formación de NADH es proporcional a la cantidad de glicerol presente.

Para desplazar el equilibrio de la reacción 2 en la dirección deseada, la reacción se realiza a pH 9.8 y el producto de reacción (DHAP) es atrapado con hidracina.

Los resultados de la lipólisis basal e inducida por noradrenalina se expresaron como ηmol glicerol liberado / μmol TG de la suspensión celular.

13.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media \pm SEM y el número de muestras fue indicado en cada caso, siendo siempre igual o mayor a 5.

En las experiencias preliminares se empleó Análisis de la Variancia (ANOVA 2 x 2) (De Groot, 1975) para comparar los efectos del tratamiento dietario y dosis-tiempo. Cuando se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0.05$), se utilizó posteriormente el test de Scheffé para comparar los efectos individuales entre grupos.

Las diferencias estadísticas entre los grupos DEHF y Control fueron analizadas mediante el test de Student.

En todos los casos, valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

REACTIVOS

- Anestesia: acepromacina maleato y clorhidrato de ketamina (Lab Holliday-Scott S.A., Buenos Aires, Argentina).
- Di (2-Etil Hexil) Ftalato (97% puro por HPLC) de Reidel-der Häen (Frankfurt, Alemania).
- Enzimas y cofactores de SIGMA (St. Louis, MO, USA).
- Kits de creatinina, úrea, triglicéridos, glucosa, ASAT y ALAT (Wiener Lab., Rosario, Argentina).
- Kits de T₃, T₄, TSH (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles CA, USA).
- Otros reactivos: grado analítico o superior (Merck, Cicarelli, Reidle-der Häen, ICN).

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

RESULTADOS

EXPERIENCIAS PRELIMINARES

Dentro de las innumerables variables que determinan el modelo experimental en estudio, podemos considerar, entre otras, las atinentes al animal: especie, edad, sexo, estado fisio-patológico, y las referentes al compuesto en estudio: vía de administración, dosis, tiempo, formulación.

La mayoría de los estudios bioquímico-nutricionales abocados a la investigación del efecto del DEHF se han realizado en ratas y/o ratones de laboratorio. En este estudio se seleccionó el empleo de ratas Wistar y para minimizar el efecto de variaciones hormonales se utilizaron animales machos. La edad elegida tuvo en cuenta que los animales se encuentren en pleno desarrollo para así evaluar el potencial impacto en un período etario de alta demanda nutricional. La vía de administración elegida fue oral ya que nuestro objetivo se centró en el potencial impacto deletéreo del DEHF como “contaminante alimentario”. Las condiciones generales de laboratorio se mantuvieron según las recomendaciones estándares establecidas para animales de laboratorio ya detalladas en el capítulo de Materiales y Métodos.

Habiendo precisado los animales y las condiciones generales del estudio, y con el fin de lograr los objetivos, en una primera fase se desarrollaron experiencias preliminares las que permitieron fijar la dosis-tiempo de estudio. Además se acotaron las variables “dosis-tiempo” en virtud de citas bibliográficas consultadas de estudios equivalentes.

Numerosos trabajos utilizaron bajas dosis de DEHF durante largos períodos de tiempo, mientras que otros estudios emplearon dosis elevadas en períodos más reducidos. No obstante en general, en la mayoría de las experiencias, las dosis administradas por unidad de peso fueron semejantes. Por ello, en una experiencia preliminar se evaluó el empleo de dosis orales de 0.5 % de DEHF durante 90 días comparadas con dosis de 2% de DEHF durante 21 días.

Los criterios adoptados para evaluar los potenciales efectos del DEHF se centraron en aquellas observaciones más frecuentemente reportadas, consideradas indicadoras de efectos metabólicos del contaminante alimentario. Entre ellas, el efecto depresor sobre la ganancia de peso, el efecto hipolipemiante y la hepatomegalia.

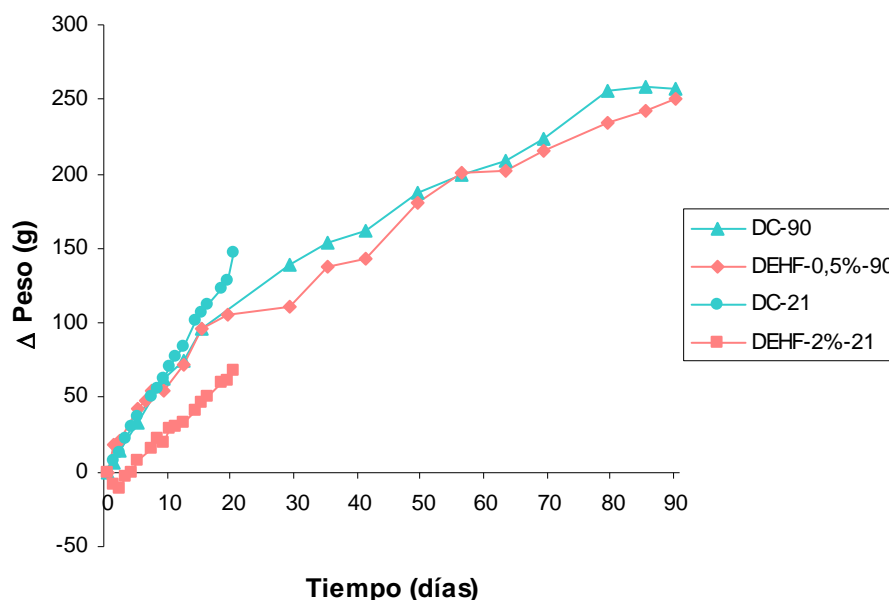
Los animales alimentados con DEHF, independientemente de las dosis-tiempo analizadas, no mostraron signos biológicos evidentes de alteraciones toxicológicas, como asimismo no se registraron muertes de los mismos durante el tiempo experimental.

1.- Efectos del DEHF sobre el peso corporal e ingesta de alimento

El consumo de alimento para los animales del Grupo DEHF 2%-21 días no fue uniforme a lo largo de los 21 días de la experiencia. Expresando la ingesta en energía (KJ) consumida, se pudo observar que la ingesta energética acumulada para las ratas DEHF 2%-21 desde el inicio hasta el día 4 fue 825 ± 53 KJ y para las ratas alimentadas con DC-21 fue 1117 ± 40 KJ. La ingesta energética acumulada desde el día 4 hasta el día 21 (final de la experiencia) fue de 3122 ± 237 KJ para las ratas DEHF 2%-21 y 3842 ± 279 KJ para las ratas alimentadas con DC-21. Según estos resultados se pudo comprobar que la ingesta energética estuvo significativamente disminuida en ratas DEHF 2%-21 durante los primeros 4 días ($p < 0.05$) con respecto a sus controles. Estos cambios en la ingesta se vieron reflejados en la ganancia de peso corporal. Como consecuencia de la menor ingesta en los primeros 4 días, en los animales del Grupo DEHF 2%-21 se observó menor incremento del peso corporal con respecto al grupo control (variación de peso día 0-4 (g): DEHF: 17.8 ± 3.6 vs DC: 33.8 ± 1.36 ; $p < 0.05$). Posteriormente la ingesta fue semejante entre ambos grupos, pero en los animales del Grupo DEHF 2%-21 la velocidad de ganancia de peso fue menor, resultando en un menor peso final al concluir la experiencia (ganancia de peso corporal media del grupo DEHF fue 34.4% menor comparado con sus controles).

Para los animales del grupo DEHF 0.5%-90, la ingesta energética fue uniforme y semejante a la de sus respectivos controles a lo largo de toda la experiencia (ingesta promedio en KJ/día: DC: 195 ± 18 vs DEHF: 189 ± 21 ; $p > 0.05$). Estos animales tuvieron un continuo incremento de peso y no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso corporal total al final de la experiencia con respecto a los animales del grupo DC-90. (Fig. 2).

Figura 2: Efecto de la exposición al DEHF sobre la ganancia de peso



Valores expresados como media de al menos 6 animales en cada grupo.

2.- Efecto del DEHF sobre el peso de hígado y tejido adiposo

Como se observa en la Tabla 4, los animales alimentados con DEHF independientemente de la dosis-tiempo, presentaron una marcada hepatomegalia. Cuando los pesos de los hígados se refirieron respecto a los pesos de los animales las diferencias estadísticas fueron aún más marcadas, mostrando un mayor incremento en el grupo DEHF 2%-21.

En los animales alimentados con DEHF 2%-21 el peso del tejido adiposo epididimal estuvo significativamente disminuido comparado a su respectivo control. Sin embargo, cuando el DEHF se administró a la dosis menor (0.5%)

durante un período de tiempo mayor (90 días), no hubo diferencias estadísticas en el peso del tejido adiposo epididimal.

Tabla 4: Efecto del DEHF sobre el peso del hígado y del tejido adiposo

	DC-21	DEHF 2%-21	DC-90	DEHF 0.5%-90
Peso absoluto hígado (g)	10.56 ± 0.34 ^a	17.35 ± 0.79 ^b	11.95 ± 0.67 ^a	18.46 ± 0.50 ^b
Peso relativo hígado (g/100g peso corporal)	4.58 ± 0.34 ^a	8.77 ± 0.34 ^b	3.23 ± 0.07 ^a	5.24 ± 0.11 ^b
Peso absoluto epidídimo (g)	3.11 ± 0.20 ^a	2.34 ± 0.14 ^b	2.90 ± 0.11 ^a	2.78 ± 0.27 ^a

Valores expresados como media ± SEM; n = 5 en cada grupo. Letras diferentes en superíndices indican diferencia estadística entre grupos evaluada a través del test de Scheffé (p<0.05)

3.- Efecto del DEHF sobre los niveles plasmáticos y tisulares de lípidos

Los resultados obtenidos de las concentraciones de los lípidos plasmáticos (triglicéridos, colesterol y fosfolípidos) se muestran en la Tabla 5. El análisis estadístico de variancia (2x2 ANOVA) muestra un marcado descenso de la concentración de triglicéridos plasmáticos (p< 0.001) por efecto del DEHF. Las concentraciones plasmáticas de colesterol disminuyeron aproximadamente un 30% por la suplementación con DEHF a dosis-tiempo 2%-21 días y 0.5%-90 días. Dichos descensos fueron exclusivamente dependientes de la dieta (nivel de significancia: Dieta <0.001 y Dosis-tiempo =0.713). Los niveles de fosfolípidos circulantes mostraron una tendencia análoga a descender (15%) en los grupos DEHF 2%-21 y DEHF 0.5%-90 respecto de sus controles dietarios, no obstante dicha reducción no logró alcanzar significancia estadística.

Todas estas modificaciones de los niveles de los componentes lipídicos del plasma se produjeron con ambas dosis de DEHF, sin alterar los niveles de triglicéridos y colesterol en hígado y en corazón.

Tabla 5: Efectos del DEHF sobre los niveles de lípidos plasmáticos y tisulares

	DC-21	DEHF 2%-21	DC-90	DEHF 0.5%-90
Plasma (mg/100 ml)				
Triglicéridos	37.71 ± 2.91 ^a	24.37 ± 2.05 ^b	50.67 ± 2.917 ^c	25.00 ± 2.59 ^b
Colesterol	64.75 ± 2.09 ^a	45.14 ± 1.83 ^b	63.00 ± 3.94 ^a	44.64 ± 3.03 ^b
Fosfolípidos	107.14 ± 10.85 ^a	90.92 ± 5.74 ^a	110.55 ± 14.31 ^a	93.52 ± 5.16 ^a
Hígado (µmol/g TH)				
Triglicéridos	7.41 ± 0.44 ^a	6.66 ± 0.61 ^a	7.03 ± 0.82 ^a	7.14 ± 0.82 ^a
Colesterol	8.92 ± 0.66 ^a	8.78 ± 0.24 ^a	9.53 ± 0.12 ^a	9.92 ± 0.17 ^a
Corazón (µmol/g TH)				
Triglicéridos	5.47 ± 0.15 ^a	5.33 ± 0.44 ^a	5.29 ± 0.37 ^a	5.46 ± 0.18 ^a
Colesterol	7.13 ± 0.44 ^a	7.67 ± 0.35 ^a	7.16 ± 0.26 ^a	7.11 ± 0.48 ^a

Valores expresados como media ± SEM; n = 5 en cada grupo. Letras diferentes en superíndices indican diferencia estadística evaluada a través del test de Scheffé (p<0.05)

En estas experiencias preliminares se pudo comprobar que con la dosis de 2% de DEHF en la dieta suministrada a los animales de experimentación durante 21 días, se obtuvieron las máximas variaciones en los indicadores considerados característicos de los efectos deletéreos del DEHF, como ser disminución en la ganancia de peso corporal, hepatomegalia y descenso en los niveles de triglicéridos plasmáticos. Por lo tanto, todos los estudios subsiguientes se realizaron empleando la dosis de 2% de DEHF administrada durante 21 días comparándolos con sus respectivos controles, y adoptando la denominación Grupo DEHF y Grupo Control (DC), respectivamente.

EFFECTOS DEL DEHF A LA DOSIS-TIEMPO SELECCIONADA

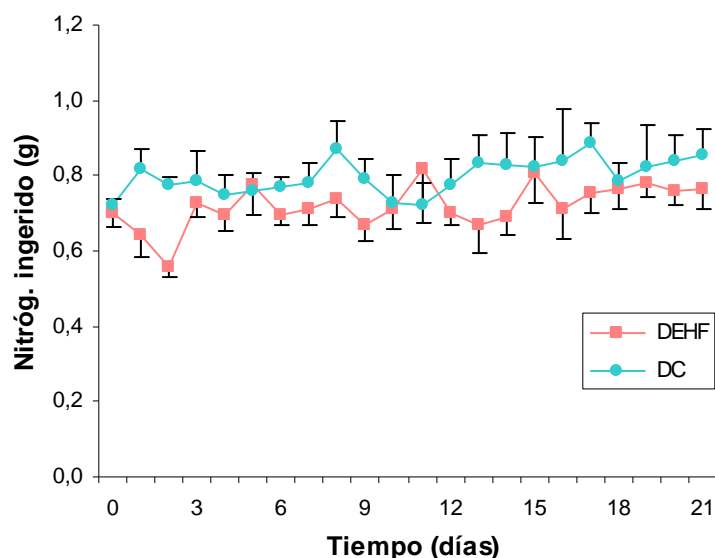
En los animales alimentados con DEHF a 2%-21 días, además de la ausencia de muertes y signos toxicológicos, no se observaron alteraciones en la funcionalidad hepática evaluada a través de algunos parámetros indicativos como las actividades de las enzimas ASAT y ALAT (UI/l; ASAT, DC: 30.8 ± 2.4 vs DEHF: 34 ± 0.8 , $p > 0.05$ y ALAT, DC: 14.2 ± 1.0 vs DEHF: 16.1 ± 1.6 , $p > 0.05$).

1.- Balance Nitrogenado

El contenido de nitrógeno (N) en ambas dietas presentó un promedio de 4.27 g % de N. Conociendo la cantidad (g) de alimento ingerido por día por cada animal, se pudo calcular la ingesta de N/día/rata.

La ingesta promedio diaria de N en ambos grupos fue similar a lo largo de los 21 días de la experiencia, tal como puede observarse en la Fig. 3. No obstante, durante los primeros 4 días de dieta se observó una menor ingesta de N en el grupo DEHF.

Figura 3: Efecto del DEHF sobre la ingesta de nitrógeno.

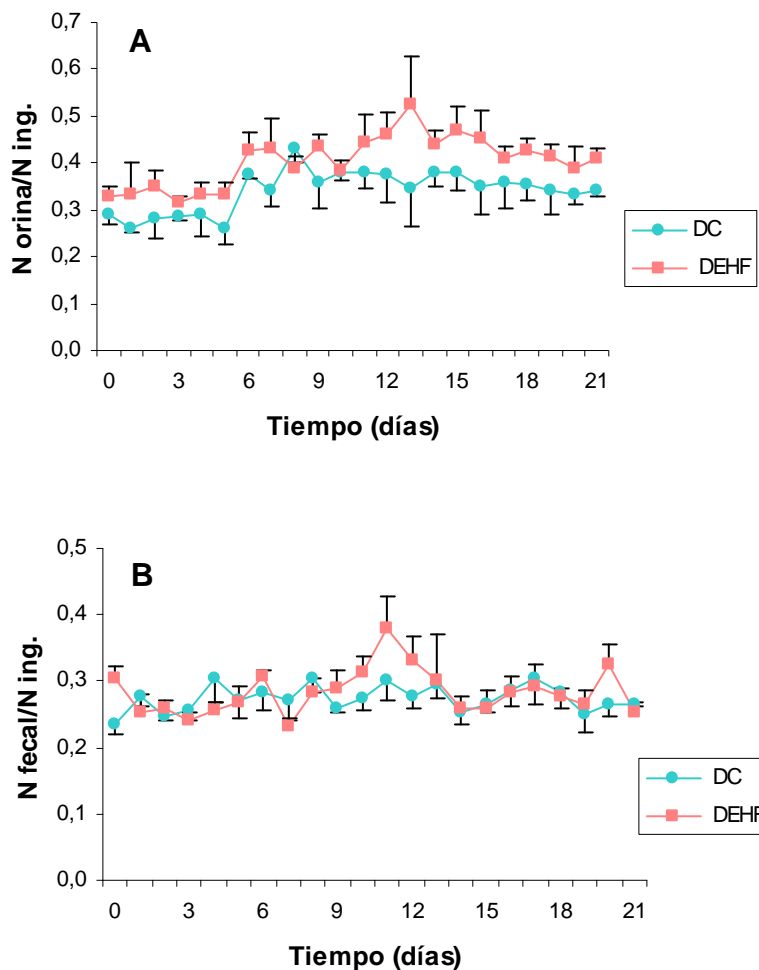


Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales en cada grupo.

En la Fig. 4 se muestran las excreciones de N en orina y en materia fecal. Para reducir las fluctuaciones diarias de las pérdidas de N y considerando que las ingestas fueron semejantes, se normatizaron los resultados calculando las relaciones diarias de N urinario/N ingerido (Fig. 4.A) y N fecal/N ingerido (Fig. 4.B).

Se pudo observar que las ratas alimentadas con la dieta suplementada con DEHF excretaron más N en la orina que los animales del grupo DC, sin cambios en la excreción de N en materia fecal.

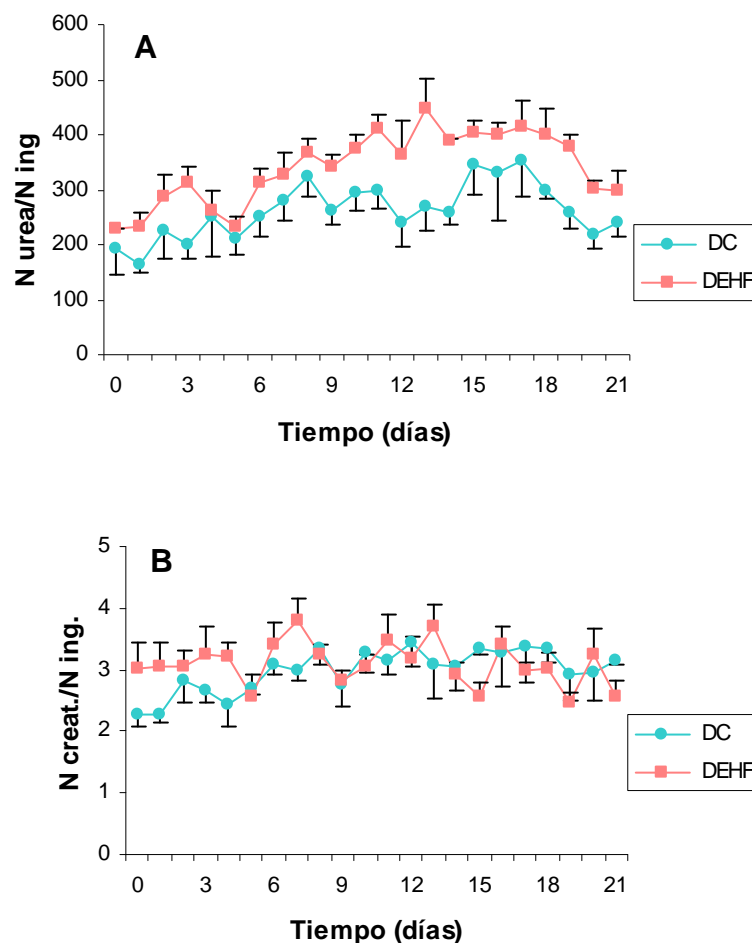
Figura 4: Efectos del DEHF sobre la excreción de nitrógeno



Excreción de N en orina (A) y en materia fecal (B) en relación al nitrógeno ingerido. Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales en cada grupo.

En orina se cuantificaron los niveles de los dos componentes nitrogenados más importantes, creatinina y urea, expresando los resultados como N excretado como creatinina y N excretado como urea. Estos resultados fueron a su vez normalizados calculando las relaciones diarias N creatinina/ N ingerido y N urea/ N ingerido. Se pudo observar que en los animales del grupo DEHF la mayor excreción urinaria de N estuvo asociada a incrementada excreción urinaria de urea (Fig.5.A), mientras la excreción urinaria de creatinina permaneció relativamente constante durante el período experimental. (Fig. 5.B)

Figura 5: Efectos del DEHF sobre la excreción de compuestos nitrogenados

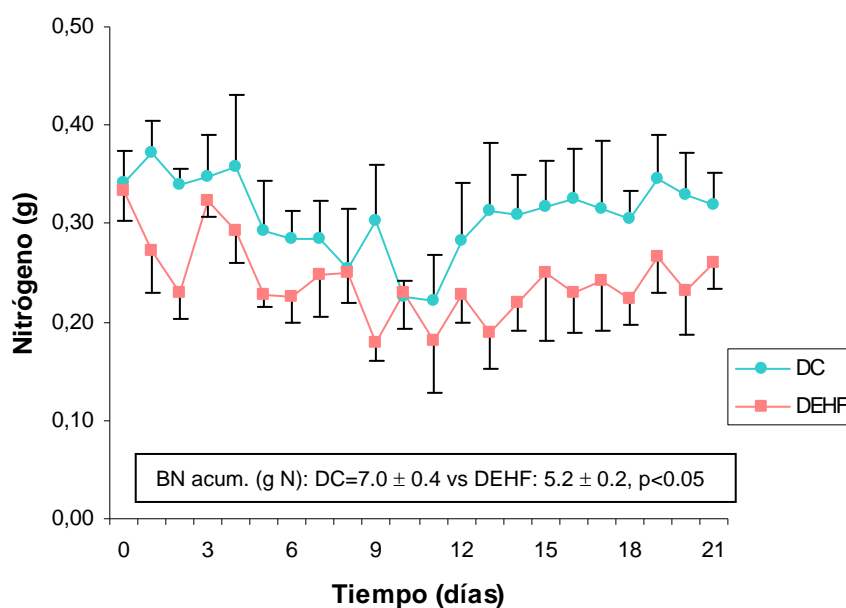


A: Excreción de urea y B: Excreción de creatinina en orina en relación al nitrógeno ingerido. Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales en cada grupo.

Como estimación del metabolismo proteico corporal total, se determinó el balance nitrogenado diario en cada rata. Como se muestra en la Fig. 6, ambos grupos mostraron valores positivos a lo largo de todo el período experimental. Sin embargo, los valores de balance nitrogenado individuales de las ratas alimentadas con DEHF estuvieron siempre ligeramente por debajo de los correspondientes controles.

Como consecuencia, cuando los resultados se expresaron como balance nitrogenado acumulado (0-21 días), se observó una significativa disminución en los animales DEHF.

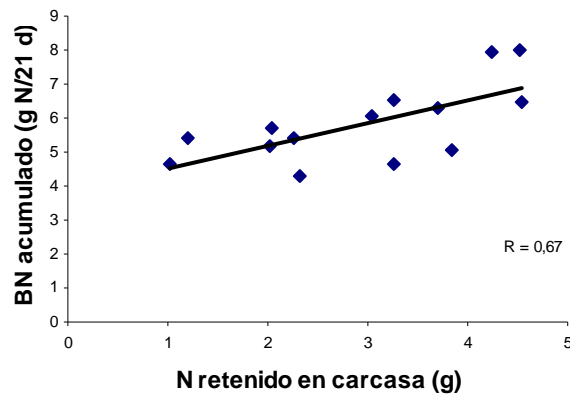
Figura 6: Efecto del DEHF sobre el balance nitrogenado diario



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales en cada grupo.

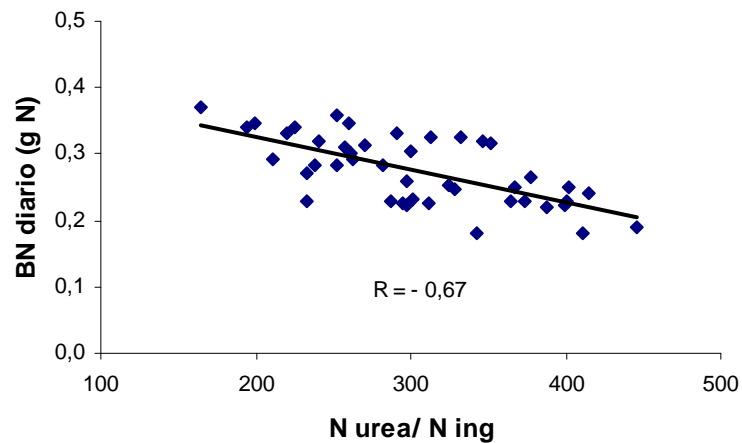
Este menor balance nitrogenado acumulado en los animales del grupo DEHF estuvo estrechamente asociado a una menor retención de nitrógeno corporal, tal como se observa en la Fig. 7.

Figura 7: Correlación entre el balance nitrogenado acumulado y el nitrógeno retenido.



Debido a que la ingesta y la excreción fecal de nitrógeno fueron similares para los dos tratamientos dietarios, la excreción aumentada de nitrógeno en orina podría ser la responsable de la disminución en el balance nitrogenado. Además, como se observa en la Fig.5, la excreción de nitrógeno en la orina como creatinina fue similar entre ambos grupos, pero la excreción de nitrógeno como urea fue significativamente mayor en el grupo DEHF, pudiendo ser el principal responsable del menor balance nitrogenado (Fig. 8).

Figura 8: Correlación entre el balance nitrogenado diario y la excreción de urea.

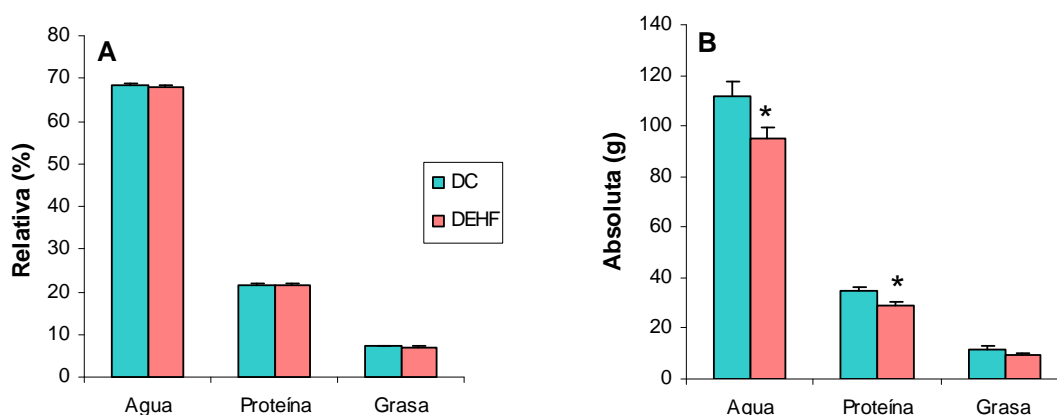


2.- Estado Energético

2.1.- Composición corporal

Cuando se analizó la composición corporal pudimos observar que la presencia de DEHF al 2% en la dieta de los animales no afectó el contenido relativo de agua, proteínas y grasas corporales (expresado como porcentaje del peso total de la carcasa) (Fig. 9.A). Sin embargo, en términos absolutos, las ratas del grupo DEHF presentaron menores cantidades de proteínas y agua en sus carcasas con respecto a los animales DC (Fig. 9.B). El contenido absoluto de grasa en los animales del grupo DEHF fue 20% menor, sin alcanzar diferencias significativas con respecto al grupo DC.

Figura 9: Efectos del DEHF sobre la composición de las carcasas.



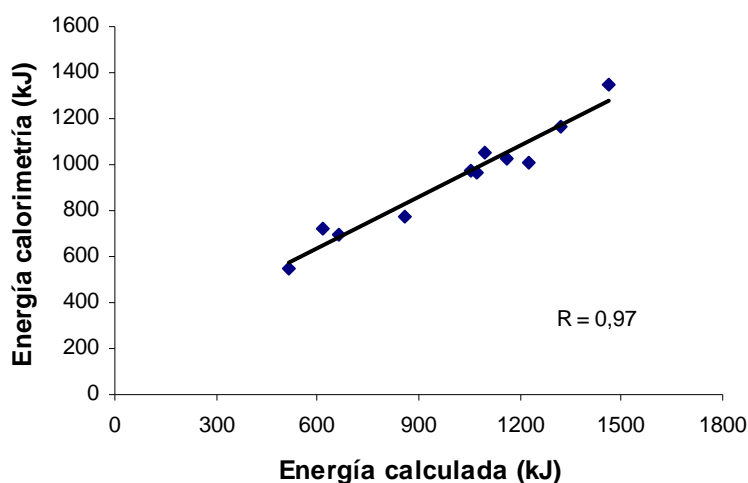
(A). Composición relativa y (B) composición absoluta de las carcasas. Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales en cada grupo. * $p < 0.05$ respecto a DC.

2.2- Contenido energético corporal y eficiencia energética

Con la finalidad de conocer la ganancia de energía corporal durante los 21 días de experiencia se determinaron el contenido energético corporal inicial y el final.

Como se describió en el capítulo de Materiales y Métodos, el contenido de energía de la carcasa fue evaluado por dos metodologías: indirectamente a través de la composición corporal y directamente mediante calorimetría. Los resultados individuales del contenido energético en homogenados de carcasas obtenidos mediante la determinación por calorimetría, considerado el método de referencia, mostraron una muy alta correlación con los calculados a partir de la composición corporal ($r = 0.97$) (Fig. 10).

Figura 10: Correlación entre la energía corporal cuantificada por calorimetría y estimada a partir de la composición corporal.

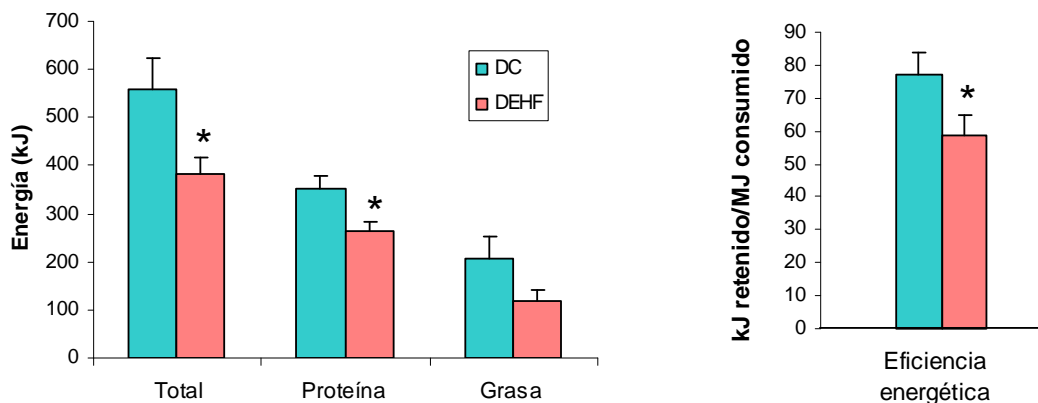


La retención de energía corporal se estimó como la diferencia entre el contenido energético corporal final y el contenido energético corporal inicial. Como se muestra en la Fig. 11, en el grupo DEHF se observó una disminuida retención de energía corporal total, atribuida a una disminución en la retención de energía como grasas y como proteínas, alcanzando diferencias significativas ($p < 0.05$) en la retención de energía como proteínas.

La eficiencia energética calculada como el cociente entre la ganancia de energía corporal de la carcasa (kJ) y la ingesta energética (MJ), estuvo disminuida un 26% en ratas alimentadas con DEHF, lo que nos indica que estas ratas

retuvieron menos cantidad de energía corporal por kJ de energía del alimento consumido.

Figura 11: Efecto del DEHF sobre la retención de energía corporal y eficiencia energética



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales en cada grupo. * $p < 0.05$ respecto a DC.

Dado que las dietas son isocalóricas, la eficiencia del alimento calculada como el cociente entre la ganancia de peso corporal (g) y la ingesta de alimento (g), estuvo significativamente disminuida en los animales alimentados con DEHF (DC= 6.96 ± 0.5 vs DEHF= 5.08 ± 0.27 , $p < 0.05$).

Como consecuencia de estos hallazgos, y dado que la ingesta fue similar en ambos grupos, es evidente que los animales alimentados con DEHF presentaron una ineficiencia en la conversión de los nutrientes de los alimentos en proteínas y grasas corporales.

2.3.- Metabolitos y hormonas relacionadas con la eficiencia energética

Como las alteraciones en la eficiencia energética podrían estar asociadas a modificaciones en el contenido de compuestos relacionados con la reserva energética y/o a variaciones en los mecanismos de transferencia energética, se evaluó el efecto del DEHF sobre ciertos metabolitos energéticos: ATP, creatina-P

y creatina en músculo, y ATP en hígado. Asimismo se cuantificaron las concentraciones plasmáticas de hormonas relacionadas: tiroxina y TSH

Como puede observarse en la Tabla 6, los niveles de ATP en músculo e hígado y los de creatina, creatina-P y creatina Total en músculo gastrocnemius no mostraron diferencias entre los grupos analizados.

Asimismo los niveles séricos de T₄ y TSH tampoco presentaron variaciones por la exposición crónica al DEHF. Los niveles de T₃ circulante se cuantificaron solamente en 4 animales de cada grupo y no presentaron diferencias entre grupos dietarios.

Tabla 6: Efectos del DEHF sobre los niveles de metabolitos y hormonas relacionadas con la eficiencia energética

	DC	DEHF
ATP hígado ($\mu\text{mol/g T.H.}$)	1.58 \pm 0.11	1.49 \pm 0.14
ATP músculo ($\mu\text{mol/g T.H.}$)	6.94 \pm 0.28	7.53 \pm 0.67
Creatina músculo ($\mu\text{mol/g T.H.}$)	18.7 \pm 2.53	12.3 \pm 4.0
Creatina-P músculo ($\mu\text{mol/g T.H.}$)	11.64 \pm 1.18	14.77 \pm 1.03
Creatina total ($\mu\text{mol/g T.H.}$)	30.0 \pm 1.4	27.1 \pm 4.5
Hormona tiroide estimulante (TSH) (mUI/ml)	1.98 \pm 0.2	2.11 \pm 0.1
Tiroxina (T ₄) ($\mu\text{g/100 ml}$)	4.2 \pm 0.6	3.44 \pm 0.5

Valores expresados como media \pm SEM. Los valores presentados representan la media de al menos 5 animales en cada grupo.

Estos resultados parecieran indicar que los parámetros analizados no estarían implicados en la ineficiencia energética observada en los animales del grupo DEHF.

3.- Efectos del DEHF sobre algunos parámetros del metabolismo de hidratos de carbono

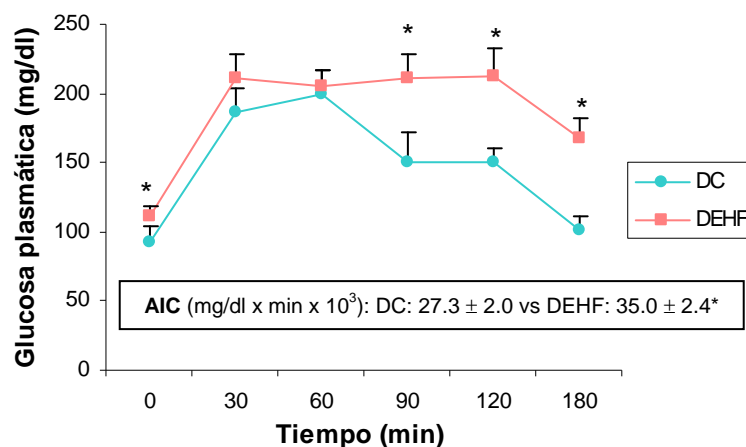
Con el fin de evaluar algunos aspectos del metabolismo de los carbohidratos estimamos parámetros relacionados a la utilización y metabolización de la glucosa a través de un test de sobrecarga oral a la glucosa y de metabolitos y enzimas tisulares relacionadas con la misma.

3.1.- Test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG)

Los animales alimentados con dieta suplementada con DEHF presentaron niveles de glucemia en ayuno superiores a los de los animales controles. Cuando se analizó el perfil luego de la sobrecarga de glucosa se observaron niveles elevados de glucemia a lo largo de la prueba, siendo las diferencias estadísticamente significativas a los 90, 120 y 180 minutos, tal como puede apreciarse en la Fig. 12. Asimismo se pudo observar que la glucemia no se normalizó al final del test (180 minutos), a diferencia de lo que ocurrió en los animales controles, que luego de 180 minutos de la sobrecarga de glucosa lograron retornar a sus niveles basales de glucemia.

Esta alterada utilización periférica de la glucosa determinó que el área integrada bajo la curva (AIC) para la respuesta a la glucosa durante el TTOG fuera un 22% mayor en ratas alimentadas con DEHF con respecto a los animales del grupo DC.

Figura 12: Efecto del DEHF sobre el Test de Tolerancia Oral a la Glucosa



Valores expresados como media \pm SEM de 6 animales por grupo. En cuadro inserto: resultados del área integrada bajo la curva (AIC). * $p < 0.05$ respecto a DC.

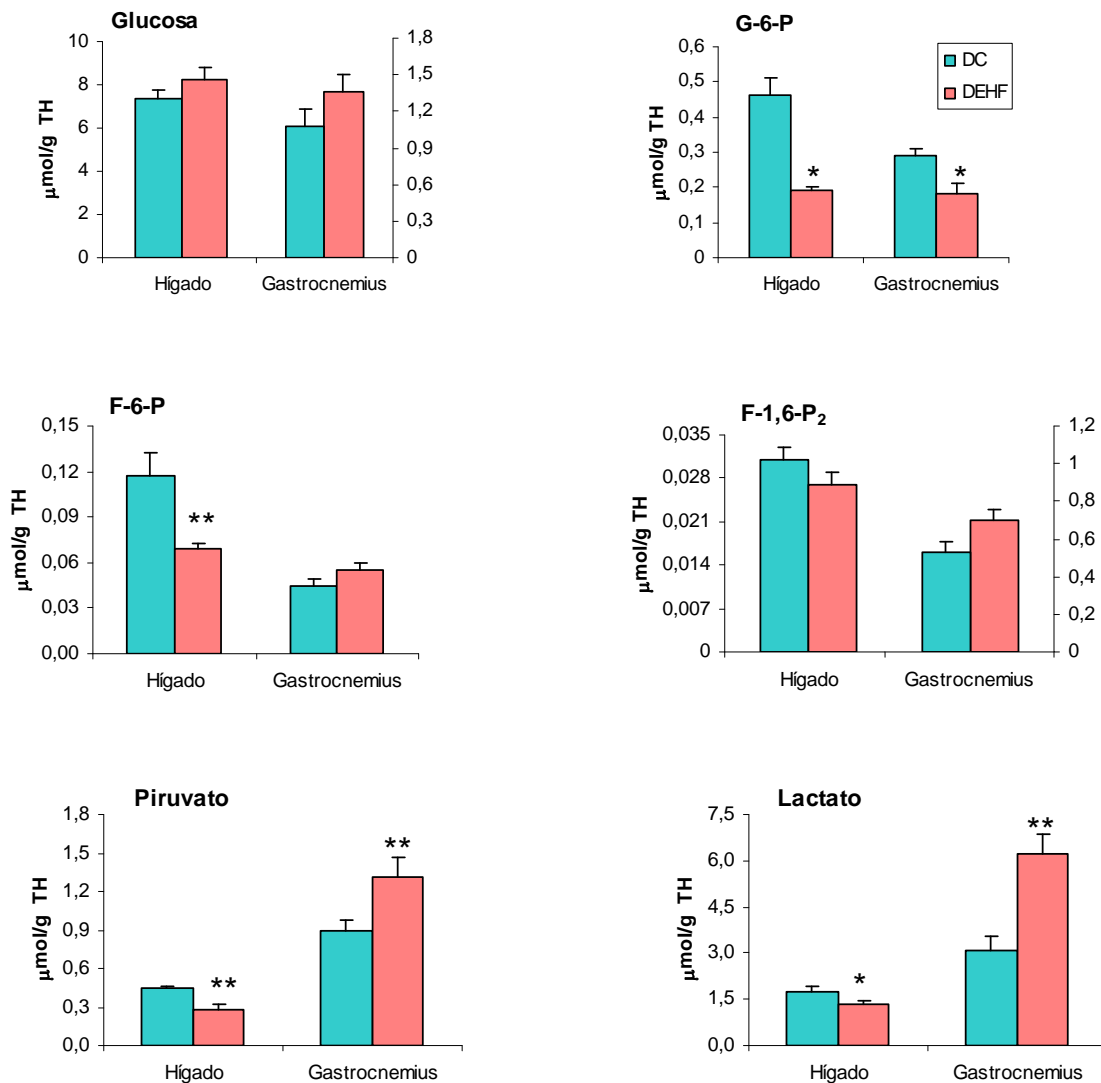
3.2- Intermediarios relacionados al metabolismo de la glucosa

Para establecer la existencia de alguna relación entre la alteración en la tolerancia a la glucosa y su metabolismo en los principales tejidos implicados, se cuantificaron diversos intermediarios relacionados al metabolismo de la glucosa en hígado y músculo de ratas alimentadas con dieta control y con dieta suplementada con DEHF.

En lo que respecta a los metabolitos glucolíticos proximales en el hígado, se encontró que los animales alimentados con DEHF presentaron disminución en los valores de G-6-P. La G-6-P es un compuesto importante que está relacionado con la vinculación de varias vías metabólicas de utilización de la glucosa (glucólisis, gluconeogénesis, vía de las pentosas, glucogenogénesis, glucogenólisis), por lo que las variaciones en sus valores podrían estar relacionados con alteraciones en dichas vías (Fig. 13).

Los menores niveles de G-6-P en hígado de los animales del grupo DEHF se correlacionaron con niveles disminuidos de F-6-P, lactato y piruvato, sin alteraciones en los niveles F-1,6-P₂, tal como se observa en la Figura 13.

Figura 13: Efecto del DEHF sobre los niveles de metabolitos glucolíticos en hígado y músculo gastrocnemius



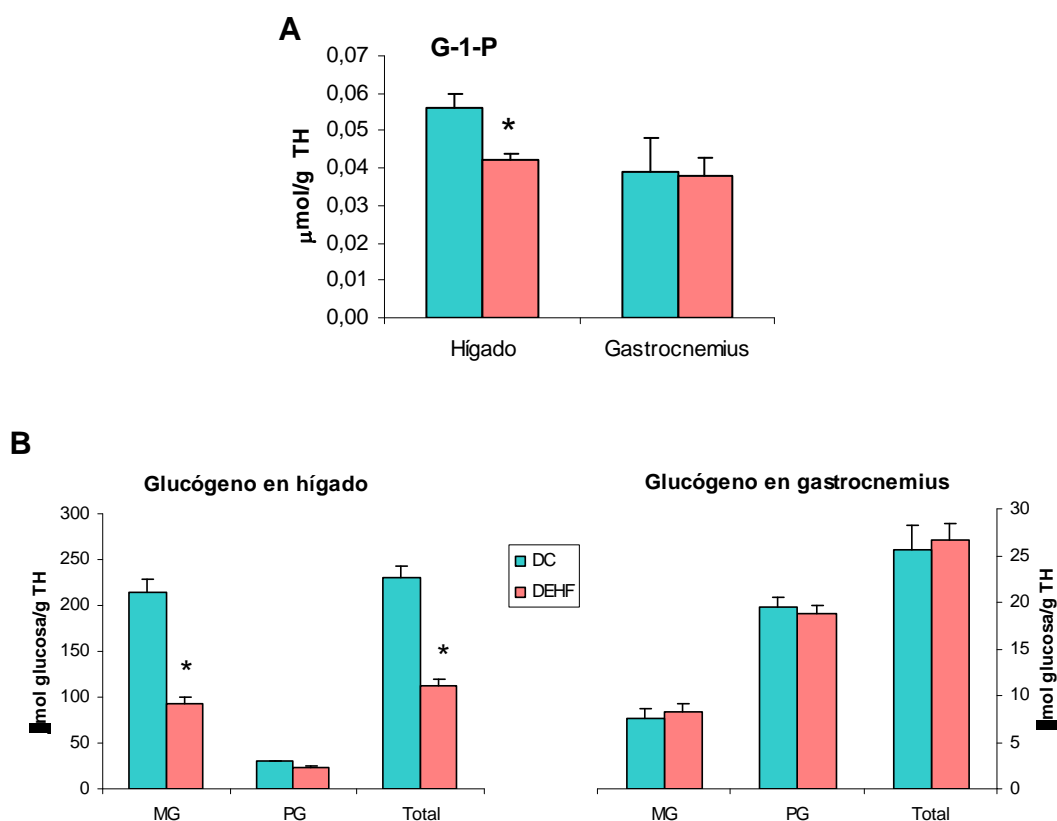
Valores expresados como media \pm SEM de 6 animales por grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto a DC.

Por otro lado, los niveles disminuidos de G-6-P en hígado se correlacionaron con descensos de los niveles de G-1-P, metabolito a partir del cual se lleva a cabo la síntesis de glucógeno. Al mismo tiempo se observó una clara disminución en el contenido hepático de glucógeno asociado a una disminución en los niveles de G-1-P (Fig 14.A y 14.B).

Cuando analizamos los resultados obtenidos para las fracciones pro-glucógeno (PG) y macro-glucógeno (MG), se observó que ambas fracciones estuvieron significativamente disminuidas, pero la fracción MG fue la más afectada por la presencia de DEHF en la dieta (reducción en un 60% para fracción MG respecto a reducción en un 20% para la fracción PG) (Fig. 14.B)

Los resultados de glucógeno total obtenidos a partir de las unidades de glucosa liberadas de las fracciones PG y MG (glucosa de MG + glucosa de PG) presentaron una elevada correlación con los valores obtenidos por hidrólisis ácida total ($r = 0.99$).

Figura 14: Efectos del DEHF sobre los niveles de metabolitos relacionados a la síntesis de glucógeno en hígado y músculo gastrocnemius.



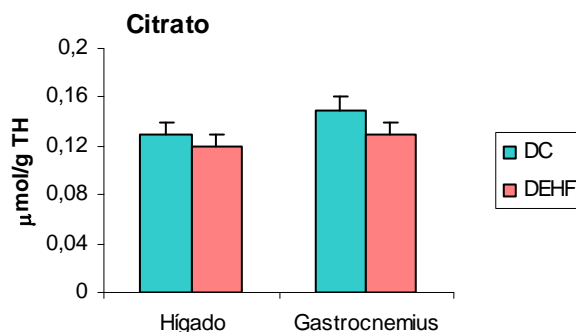
Concentraciones de: A) G-1-P en hígado y gastrocnemius; B) Glucógeno total, pro- y macro-glucógeno en hígado y gastrocnemius. Valores expresados como media \pm SEM de al menos 5 animales por grupo. * $p < 0.05$ respecto DC.

En el músculo gastrocnemius de animales del grupo DEHF los niveles de G-6-P se encontraron disminuidos (Fig.13), sin cambios en la G-1-P y en el contenido de glucógeno total y de sus fracciones (Fig.14).

Por otro lado, tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de los metabolitos glucolíticos F-6-P y F-1,6-P₂. Sin embargo, los niveles de lactato y piruvato estuvieron significativamente incrementados en animales alimentados con dieta suplementada con DEHF (Fig.13).

El citrato es uno de los reguladores más importantes de la glicólisis a través de su acción sobre la enzima fosfofructoquinasa. En los animales alimentados con DEHF no se encontraron diferencias significativas en los niveles de citrato hepático y muscular (Fig. 15) por lo que podríamos sugerir que las alteraciones glucolíticas observadas no estarían relacionadas a este regulador clave.

Figura 15: Efectos del DEHF sobre los niveles de citrato en hígado y músculo gastrocnemius



Valores expresados como media ± SEM de al menos 5 animales por grupo.

3.3.- Flujo de sustratos a través de enzimas del metabolismo de la glucosa

Para determinar el flujo de sustratos a través de las principales enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa en hígado y músculo, se estimaron algunas relaciones producto/sustrato.

Como se observa en la Tabla 7, en hígado de animales alimentados con DEHF las disminuidas relaciones G-6-P/glucosa y glucógeno/G-1-P indicarían

alteraciones en el flujo a través de las enzimas glucoquinasa y glucógeno sintasa, las cuales podrían explicar una inhibición en la glucólisis y glucogenogénesis.

Al mismo tiempo la disminución de la relación lactato/piruvato en el hígado podría indicar una alteración en el flujo de sustratos a través de la enzima lactato deshidrogenasa y/o alteración en el estado redox citoplasmático.

Tabla 7: Efectos del DEHF sobre las relaciones producto/sustrato en el metabolismo de la glucosa

	HÍGADO		MÚSCULO	
	DC	DEHF	DC	DEHF
G-6-P / Glucosa	0.057 ± 0.007	0.024 ± 0.002*	0.31 ± 0.05	0.15 ± 0.03*
Glucógeno/G-1-P	4301 ± 469	2708 ± 166*	920 ± 25	851 ± 58
F-1,6-P ₂ / F-6-P	0.29 ± 0.05	0.42 ± 0.03	11.2 ± 2.43	12.6 ± 1.23
Lactato / Piruvato	4.36 ± 0.34	3.37 ± 0.27*	3.46 ± 0.47	4.39 ± 0.69

Datos corresponden a la media ± SEM de al menos 5 animales por cada grupo. *p<0.05 respecto DC.

Para conocer la derivación de la glucosa a través de la vía de las pentosas en el hígado, se cuantificó la actividad de la G-6-P deshidrogenasa. La actividad de esta enzima no mostró variaciones en los animales alimentados con DEHF (nmol/ min x mg proteína: DC: 12.2 ± 1.4 vs DEHF: 14.5 ± 1.1; p>0.05), lo cual indicaría que esta etapa clave del ciclo de las pentosas podría no estar alterada por la presencia del DEHF.

En el músculo esquelético, sólo se observó disminución en el flujo de sustratos a través de la enzima hexoquinasa tal como lo demuestran los valores disminuidos de la relación G-6-P/glucosa en los animales del grupo DEHF. No se

observaron diferencias significativas en el flujo a través de las enzimas glucógeno sintasa, fosfofructoquinasa y lactato deshidrogenasa (Tabla 7).

4.- Metabolismo de lípidos

Dada la marcada hipolipemia observada en los animales alimentados con DEHF se evaluaron algunos parámetros fundamentales en la regulación de los niveles de lípidos plasmáticos. Para tal efecto se determinó la actividad de enzimas claves responsables de la remoción de triglicéridos (TG) circulantes y la actividad lipolítica en tejido adiposo.

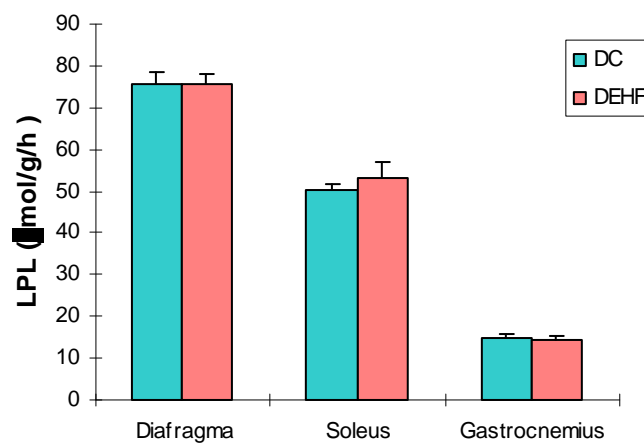
4.1.- Actividades lipoproteínas lipasa (LPL)

Para evaluar la contribución de la remoción periférica de TG sobre el descenso de los TG plasmáticos en ratas alimentadas con dieta suplementada con DEHF se cuantificaron las actividades de las enzimas lipoproteínas lipasa (LPL) en tejidos musculares y adiposos.

Las actividades de las enzimas LPL mostraron diferencias según el tejido muscular analizado, donde las actividades fueron diafragma > soleus > gastrocnemius. No obstante el DEHF no afectó significativamente las actividades LPL en estos tres músculos (Fig. 16), resultados que estuvieron asociados a niveles invariables de TG en los mismos (Fig. 17).

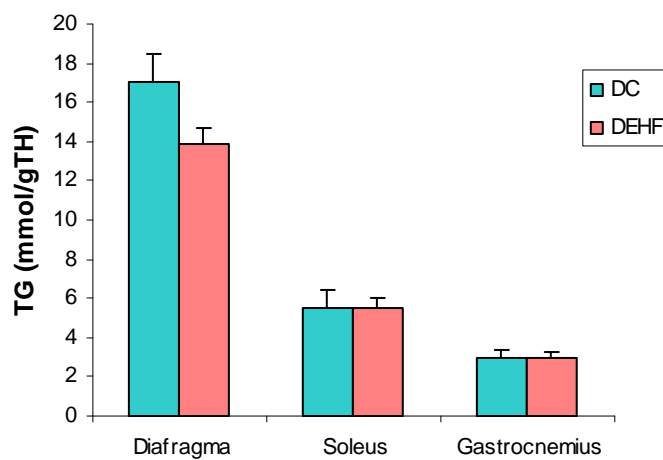
A diferencia de lo observado en los distintos músculos, en los tejidos adiposos no se encontraron variaciones en las actividades LPL, pero se presentaron incrementos significativos en las actividades LPL lumbar y epididimal de los animales alimentados con DEHF (Fig. 18).

Figura 16: Efectos del DEHF sobre la actividad lipoproteína lipasa en tejido muscular.



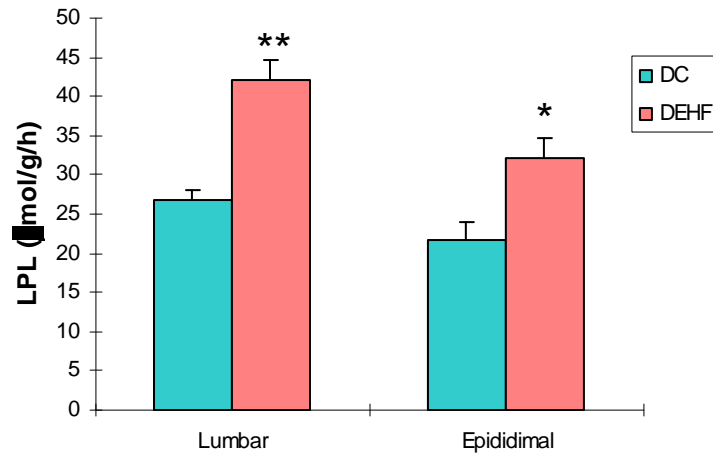
Actividades de LPL en tejido muscular (diafragma, soleus, gastrocnemius). Valores expresados como media \pm SEM de al menos 5 animales por grupo.

Figura 17: Efectos del DEHF sobre los niveles de triglicéridos musculares



Niveles de TG en músculos (diafragma, soleus y gastrocnemius). Valores expresados como media \pm SEM de al menos 5 animales por grupo.

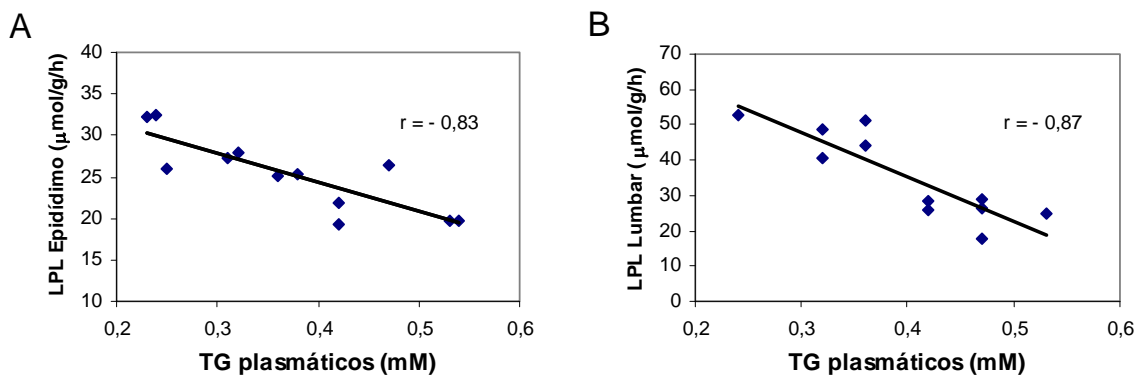
Figura 18: Efectos del DEHF sobre la actividad lipoproteínas lipasa (LPL) en tejido adiposo



Actividades LPL en tejido adiposo epididimal y lumbar. Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ respecto a DC.

Las actividades LPL en tejido adiposo epididimal y lumbar mostraron una correlación inversa ($r = -0.83$ y $r = -0.87$, respectivamente) con los niveles de TG circulantes.

Figura 19: Relación entre las actividades lipoproteínas lipasa (LPL) tisulares con los niveles de triglicéridos plasmáticos.



Correlación entre las actividades LPL: A) epididimal y B) lumbar con los niveles de TG plasmáticos

4.2.- Lipólisis en tejido adiposo

Debido a que se comprobó en los animales alimentados con dieta conteniendo DEHF, que existe una disminución en el contenido de grasa corporal total acompañada de un descenso del peso del tejido adiposo epididimal (Tabla 8), se intentó establecer si este último tenía alguna relación con el número y tamaño de los adipocitos, como así también con la actividad lipolítica en el mismo.

Los diámetros de los adipocitos en ambos grupos presentaron una gran amplitud de valores (7,5 - 95 μm), como lo demuestran las imágenes presentes en las fotos 1 y 2.

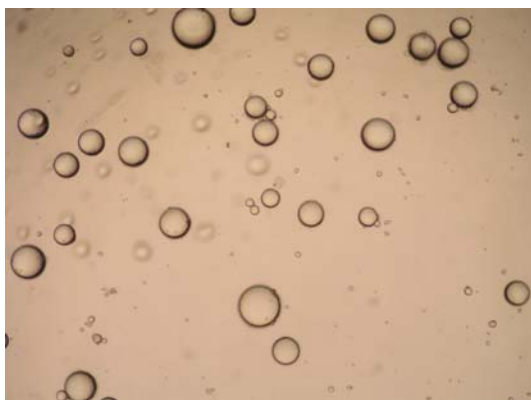


Foto 1: DC

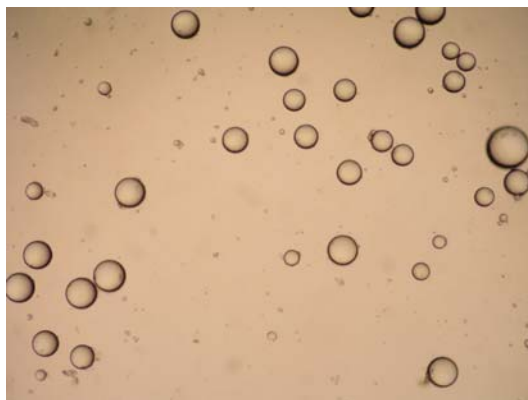
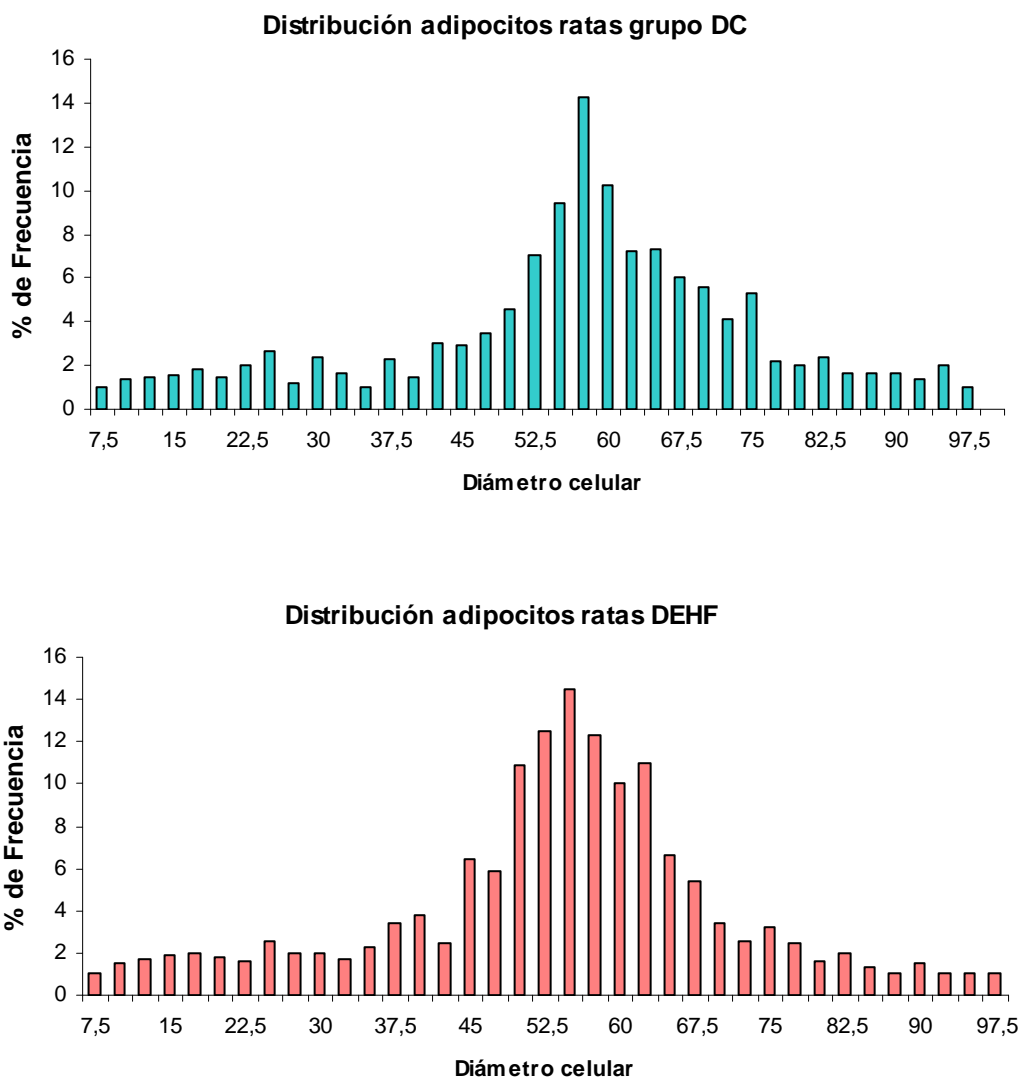


Foto 2: DEHF

Las distribuciones de los adipocitos según el diámetro pueden ser observadas en los histogramas de las Fig. 20 (DC y DEHF, respectivamente). En ambos grupos dietarios se pudo considerar que existe una distribución normal de las células en función de su diámetro.

Figura 20: Histograma de la distribución de las células adiposas epididimales en función del diámetro celular.



Columnas representan la media del diámetro medido (%) de al menos 5 animales por cada grupo.

Quando se calculó el promedio y la desviación estándar del diámetro celular, se encontró que los adipocitos aislados de las ratas alimentadas con DEHF presentaron un menor diámetro celular con respecto a sus controles, tal como se observa en la Tabla 8.

Teniendo en cuenta que la distribución de las células adiposas según el diámetro es una distribución normal en ambos grupos dietarios, se calculó el volumen celular según las fórmulas propuestas por Goldrick (1967) y se pudo observar que los volúmenes de los adipocitos aislados de ratas DEHF son menores cuando se compararon con sus respectivos controles.

Como consecuencia del menor volumen celular, el número de células expresado por gramo de tejido fue mayor en ratas alimentadas con DEHF. Sin embargo el número de células calculadas por órgano total no presentó diferencias significativas con respecto al grupo control.

Tabla 8: Efectos del DEHF sobre el tejido adiposo

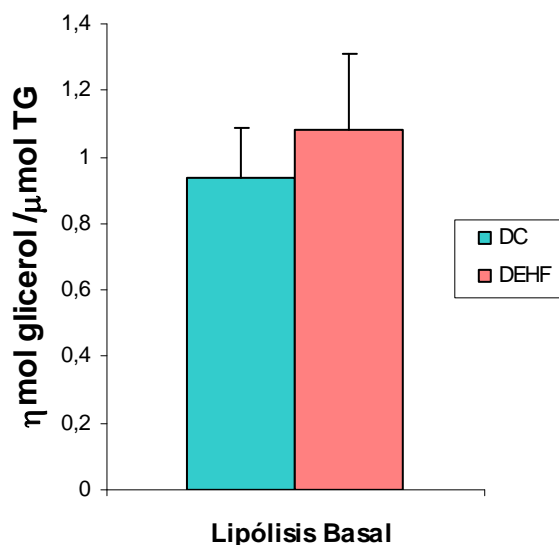
	DC	DEHF
Peso epidídimo total (g)	3.12 ± 0.2	2.34 ± 0.14***
Diámetro celular (µm)	56.1 ± 1.17	52.32 ± 1.39*
Volumen celular (pl)	121.2 ± 4.7	94.23 ± 5.55**
Nº células . 10 ⁶ / g tejido	7.93 ± 0.37	10.25 ± 0.68**
Nº células . 10 ⁶ / peso total	24.1 ± 1.2	24.5 ± 1.4

Valores expresados como media ± SEM; n=5 por cada grupo. *: p < 0.05, **: p < 0.01 y ***: p < 0.001, respecto a DC.

Para estudiar la lipólisis de los TG contenidos en los adipocitos, se lo puede hacer en ausencia o en presencia de algún efector de la lipólisis, los cuales son sustancias capaces de estimular la lipasa hormono-sensible (LHS). El efector utilizado en este trabajo (noradrenalina) se seleccionó dado que es sabido que actúa rápidamente en la estimulación de la lipólisis vía activación de la adenil ciclasa, enzima que convierte el ATP en AMPc. Este intermediario, mediante la estimulación de la proteína quinasa dependiente del AMPc, convierte la LHS inactiva en LHS activa.

Como puede observarse en la Fig. 21 la lipólisis basal (en ausencia de efector) no presentó diferencias entre los adipocitos aislados de los distintos grupos dietarios.

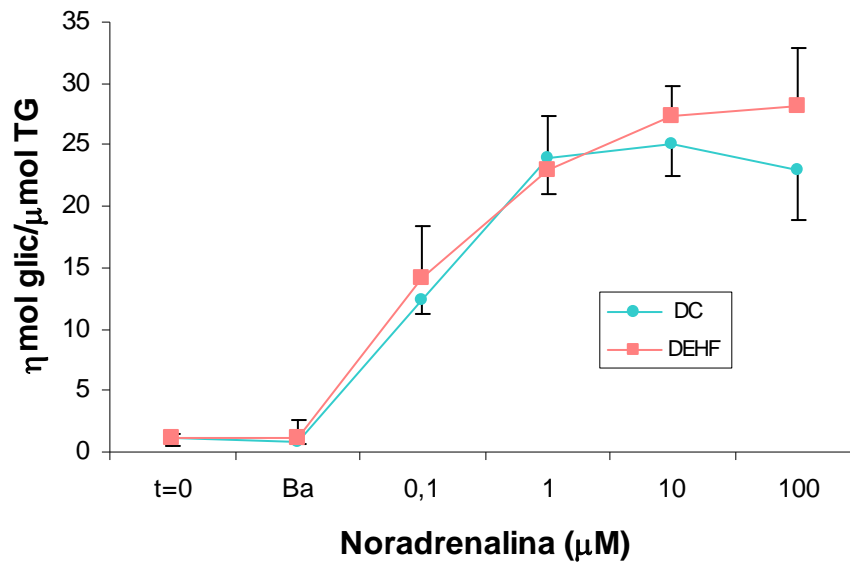
Figura 21: Efectos del DEHF sobre la respuesta lipolítica basal en tejido adiposo epididimal



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 5 animales por grupo.

La lipólisis estimulada por noradrenalina en los adipocitos aislados de animales DEHF y DC presentó una respuesta lipolítica típica de saturación en función de la concentración del efector utilizado. En la Fig. 22 puede observarse que la máxima respuesta lipolítica se obtuvo a la concentración de 1 μ M de noradrenalina y que el perfil de ambas curvas fue equivalente, no mostrando diferencias significativas entre cada una de las dosis estudiadas.

Figura 22: Efectos del DEHF sobre la respuesta lipolítica estimulada por noradrenalina en tejido adiposo epididimal



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 5 animales por grupo.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Esta tesis es un aporte más a los conocimientos alcanzados sobre los efectos que causa, en un modelo animal, la exposición crónica al contaminante alimentario di(2-etil hexil) ftalato (DEHF), lo que nos permite postular que por lo tanto podría existir cierta implicancia sobre la salud humana.

El DEHF administrado a animales de experimentación causa profundos cambios bioquímicos y morfológicos (Rubin y col, 1973; Doull y col, 1999; NTP 2000) que son influenciados, entre otros, por la dosis, vía de administración, tiempo, y edad de los animales. A lo largo de muchos años se han estudiado diversos efectos suministrando el compuesto por distintas vías (intraperitoneal, intravenosa, oral) en forma aguda y en forma crónica. En base a estos estudios se pudo demostrar que la toxicidad aguda del DEHF es prácticamente nula, por lo que la mayoría de las investigaciones centraron su atención en los efectos crónicos. Asimismo en dichos estudios la vía de administración más utilizada fue la oral y las dosis empleadas en el alimento han variado en un rango desde 0.5 a 2%.

En una experiencia preliminar realizada como parte de esta tesis se compararon los efectos del DEHF sobre marcadores específicos: ganancia de peso corporal, hepatomegalia e hipolipemia a una dosis bajas (0.5%) por un período de tiempo prolongado y relacionando con dosis más elevadas (2%) por un período de 21 días.

Los animales alimentados con DEHF, independientemente de la dosis-tiempo utilizada, no mostraron signos biológicos evidentes de alteraciones toxicológicas, como tampoco se registraron muertes durante los períodos experimentales.

Nuestros resultados a la dosis-tiempo (2%-21 días) son coincidentes con los de otros autores (Reubsaet y col., 1990) en los que se observaron pérdida inicial de peso durante los primeros cuatro días acompañada con una disminución en la ingesta. Luego de este período una menor ganancia de peso corporal se

registró a lo largo de los 21 días, la que no pudo ser atribuida a una menor ingesta de alimento. En otros trabajos se observó que la ingesta de alimento en los animales DEHF fue semejante a la de los controles a lo largo del período experimental, pero con un menor aumento de peso (Nair y Kurup, 1986; Mann y col. 1985; Yanagita y col. 1987). Dostal y col. (1987) empleando ratas jóvenes (1-3 semanas de edad) que recibieron DEHF durante 5 días en dosis desde 10 a 2000 mg/ kg de peso corporal demostraron que el retardo en el crecimiento fue más pronunciado que en ratas adultas aún con las dosis más bajas, y observaron que con la dosis más altas se presentó un elevado porcentaje de muertes. Estos efectos son de particular importancia, ya que sugiere que las ratas neonatales y jóvenes son más sensibles al retardo en crecimiento y muerte que las ratas adultas. Esto podría tener una elevada implicancia a nivel humano, sobre todo si se considera a los niños que se encuentran en Unidades de Cuidados Intensivos quienes están expuestos a elevadas concentraciones de DEHF, por el uso de gran cantidad de insumos médicos fabricados con PVC.

En nuestro trabajo, los animales alimentados con 0.5% de DEHF-90 días crecieron en forma semejante a los controles desde el primer día hasta el final de la experiencia y no se observaron modificaciones en el patrón de ingesta, lo que también fue observado por otros autores con la misma dosis e igual período de tiempo (Poon y col. 1997). Sin embargo investigaciones realizadas a más largo plazo (9 meses y 104 semanas) demostraron que el peso corporal estuvo significativamente disminuido por el efecto del contaminante alimentario (Mitchell, 1985a; David, 2004).

Otra alteración característica provocada por la ingesta de DEHF es la presencia de hepatomegalia acompañada de un aumento en el tamaño y número de peroxisomas (Osumi, 1978; Nair y Kurup, 1986; Dostal y col., 1987; Poon y col., 1997). Tomaszewski y col. (1987) indicaron que la hepatomegalia era dependiente de la dosis y se presentaba a concentraciones de DEHF en la dieta tan bajas como 0.1%. De la misma manera, en nuestras experiencias los hígados de las ratas alimentadas con 0.5%-90 días y 2%-21 días, mostraron un significativo incremento en los pesos de los hígados y cuando dichos pesos se refirieron a los

correspondientes pesos de los animales, mostraron diferencias estadísticas aún mayores, manteniendo una relación directa con la dosis pero no con el tiempo de exposición. Algunos autores sugieren que la hepatomegalia inducida por el DEHF, al igual que lo que ocurre con otros proliferadores peroxisomales, se debe a una hipertrofia masiva de hepatocitos resultante en parte del aumento en el número de peroxisomas. Esta proliferación hepatocelular se considera que es una respuesta mitogénica primaria y no una hiperplasia reparatoria, ya que los proliferadores peroxisomales no son necrogénicos (Reddy, 2004).

Estas alteraciones en la ganancia de peso y hepatomegalia podrían estar asociadas a alteraciones funcionales. En este sentido el informe del National Toxicological Program del año 2000 (NTP) ha establecido, según las distintas investigaciones analizadas, que uno de los principales órganos blanco del efecto del DEHF es el hígado. Sin embargo, en nuestro trabajo no se encontraron alteraciones en los niveles séricos de ASAT Y ALAT, al igual que en estudios realizados a más largo plazo por otros investigadores, indicando que no existiría daño celular hepático (Poon, 1997; David, 2000).

Otro de los parámetros característicos de los efectos del DEHF es la hipolipemia. Con ambas dosis-tiempo de DEHF observamos un significativo descenso de la concentración de triglicéridos plasmáticos, efecto que también fue notado en otros trabajos (Mitchell y col., 1985b; Dostal y col., 1987; Howarth y col., 2001). Algunos autores han intentado dilucidar los mecanismos responsables del descenso de los niveles de triglicéridos en plasma. Al respecto, distintos trabajos han sugerido la existencia de una relación entre el efecto hipolipidémico y la proliferación peroxisomal. En este sentido, han sugerido que el descenso en los niveles plasmáticos de triglicéridos podría estar relacionado a una mayor β -oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas, disminuyendo de esta forma la concentración de uno de los sustratos para la síntesis de triglicéridos en el hígado (Osumi y Hashimoto, 1978; Tomaszewski y col., 1987; Reubsæet y col., 1990; Howarth y col., 2001).

Las concentraciones plasmáticas de colesterol encontradas en este trabajo disminuyeron en una proporción semejante a las concentraciones de los triglicéridos (30%) por la suplementación con DEHF a dosis-tiempo 2%-21 días y 0.5%-90 días. Nair y Kurup (1986) demostraron que el descenso de colesterol fue debido a un aumento en la excreción de colesterol como sales biliares, debido a la inducción de la actividad de la enzima 7- α hidroxilasa y a una disminución en la síntesis de colesterol por disminución en la actividad hidroximetil glutaril CoA reductasa. Trabajos más recientes relacionaron las alteraciones en el colesterol plasmático con la activación que el DEHF ejerce sobre el PPAR α . Se ha demostrado que los proliferadores peroxisomales aumentan la transcripción de genes de ciertas proteínas tales como apolipoproteínas (apo A_I, A_{II} y C_{III}) y de enzimas (lipoproteínas lipasa) que están involucradas en el control de los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos (Bosgra, 2004).

Los niveles de fosfolípidos circulantes encontrados en este trabajo mostraron una tendencia a descender en los grupos DEHF 2%-21días y DEHF 0.5%-90 días respecto de sus controles; no obstante dicha reducción no logró alcanzar significancia estadística. Estos resultados no coinciden con aquellos de Yanagita y col. (1978), que informaron disminución de los fosfolípidos en plasma en ratas jóvenes alimentadas con DEHF al 0.5%. Sin embargo no existen estudios que revelen la importancia fisiológica que pudieran tener estos resultados.

Todas estas modificaciones en los niveles de los componentes lipídicos del plasma se produjeron con ambas dosis de DEHF, sin alterar los niveles de triglicéridos y colesterol en hígado y en corazón.

Resumiendo, estas experiencias preliminares permitieron comprobar que con la dosis de 2% de DEHF durante 21 días se obtuvieron las máximas variaciones en los indicadores característicos de los efectos del DEHF (disminución en la ganancia de peso corporal, hepatomegalia y descenso en los niveles de triglicéridos plasmáticos), por lo tanto, la misma fue empleada por nosotros para profundizar los conocimientos de los mecanismos bioquímicos que podrían estar involucrados en los efectos del DEHF.

EFECTOS SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL Y LA EFICIENCIA ENERGÉTICA

Empleando un modelo animal experimental, en este trabajo se demostró que el contaminante alimentario DEHF puede afectar su estado metabólico-nutricional. Como hemos mencionado anteriormente, la inclusión del DEHF en la dieta, particularmente a la dosis de 2% (p/p) durante 21 días, determina un descenso significativo de la ganancia de peso corporal. A diferencia de algunos estudios (Daniel, 1978; Mitchell, 1985a; Reubsæet 1990), en el presente trabajo la menor ganancia de peso corporal no se correlacionó con hipofagia ni con malabsorción de nutrientes dado que a lo largo de la experiencia la ingesta energética fue semejante y estuvo acompañada de similar energía excretada en materia fecal (energía materia fecal, KJ/ 21 días = DC: 2642 ± 250 vs DEHF: 2409 ± 107 ; $p > 0.05$).

La presencia de DEHF no modificó la proporción de los principales componentes de la carcasa: proteínas, grasas y agua. Sin embargo, los animales alimentados con DEHF presentan menor retención absoluta de nitrógeno y grasa corporal, conduciendo a una disminuida retención de energía corporal. Como consecuencia, la eficiencia energética fue 32% menor, es decir, retuvieron menos cantidad de energía por KJ de nutriente ingerido. Dado que la composición de micro y macronutrientes del alimento es idéntica para todos los animales y la única diferencia es la presencia del DEHF, los datos presentados en este trabajo sugieren que el DEHF podría alterar la eficiencia metabólica de conversión de nutrientes y de energía presentes en el alimento a masa y energía corporal, lo que consecuentemente se refleja en una menor ganancia de peso corporal.

Para explicar las alteraciones observadas en la eficiencia energética se estudiaron diversos mecanismos bioquímicos, involucrados específicamente en la menor retención de proteínas y grasa corporal.

Como indicador del metabolismo proteico corporal total, el balance nitrogenado diario mostró en ambos grupos valores positivos a lo largo de todo el período experimental. Sin embargo los valores individuales de las ratas alimentadas con DEHF estuvieron siempre ligeramente por debajo de los animales

controles. Esto condujo, al final del período experimental, a un menor balance nitrogenado acumulado, acompañado de una menor retención de proteínas en las carcasas. Al menos a nuestro conocimiento, no existe información referida a estudios de balance nitrogenado en animales alimentados con DEHF. No obstante, algunos estudios junto con los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten postular posibles mecanismos por los que el contaminante alimentario DEHF podría afectar el metabolismo proteico.

Dado que la ingesta nitrogenada fue equivalente en ambos grupos, el menor balance nitrogenado observado puede deberse a una depleción en la síntesis y/o a un mayor catabolismo de las proteínas corporales. En este sentido, no se dispone de información referida a síntesis proteica en animales alimentados con DEHF, pero probablemente este compuesto podría interferir en la utilización de aminoácidos y de este modo con la cantidad de proteínas que los animales pueden sintetizar. No obstante nuestros estudios, como los de otros autores inducen a suponer que el DEHF conduciría a una mayor velocidad de proteólisis y/o incrementada oxidación de aminoácidos esenciales. Según nuestros resultados la mayor excreción de nitrógeno en orina, fundamentalmente atribuida a una mayor excreción urinaria de urea, sin cambios en la ingesta y excreción fecal de nitrógeno, podrían estar relacionadas a un mayor catabolismo proteico. Otros autores (McDonald y col., 2001) han encontrado que el DEHF altera la expresión de genes que codifican para enzimas involucradas en el metabolismo de aminoácidos (arginasa 1, aspartato amino transferasa, glicina N metil transferasa, etc.) lo que podría conducir a un aumento en la degradación de aminoácidos.

La disminuida retención de proteínas estuvo acompañada de una menor retención de grasa corporal en los animales que recibieron el contaminante alimentario en estudio.

La menor retención de energía corporal como grasa puede estar mediada en parte por efectos específicos del DEHF sobre el tejido adiposo. Está bien demostrado que el adipocito cumple un rol importante en la regulación del balance energético y composición corporal.

El descenso de grasa corporal observado estuvo acompañado por una disminución significativa en los pesos de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal. El menor peso del tejido adiposo epididimal estuvo correlacionado con una disminución del tamaño y del volumen de los adipocitos. El menor tamaño celular puede ser atribuido a: alteraciones en la diferenciación de adipocitos, acelerada lipólisis y/o menor captación de triglicéridos de la circulación.

Por un lado, debido a que solo se midieron los diámetros de los adipocitos maduros, podría sugerirse la existencia de un potencial deterioro en la diferenciación de los preadipocitos inducida por el DEHF. Como consecuencia disminuiría la cantidad de adipocitos maduros, lo que podría ser responsable del reducido tamaño del tejido adiposo.

Una reducción en el contenido intracelular de triglicéridos por una incrementada lipólisis podría determinar la disminución del tamaño celular. Por esta razón se estudió el efecto del DEHF sobre la lipólisis en tejido adiposo epididimal ya que este depósito es muy sensible a los estímulos lipolíticos (Coppack y col., 1994). Específicamente, la lipólisis se refiere a un proceso en el cual los triglicéridos son hidrolizados, vía intermediarios di- y mono-glicéridos, a ácidos grasos y glicerol. La lipólisis intracelular ocurre dentro de los tejidos donde se encuentran las reservas de triglicéridos, de modo que los lípidos pueden ser movilizados para procesos oxidativos o no oxidativos. La etapa limitante de la velocidad de movilización de los triglicéridos del tejido adiposo es su hidrólisis por la enzima lipasa hormono-sensible (LHS). Por lo tanto dicha enzima es la que determina la disponibilidad de combustible lipídico para todo el organismo. El contaminante alimentario DEHF no alteró la lipólisis basal, ni la estimulada por noradrenalina, evaluada “in vitro” en tejido adiposo epididimal, lo que podría indicar que el descenso del peso del tejido adiposo no estaría correlacionado a una mayor movilización de lípidos.

No obstante, estos resultados no excluyen la posibilidad de que otros o distintos niveles de efectores biológicos podrían estar involucrados en una mayor lipólisis “in vivo”. La actividad de la LHS está regulada por diferentes hormonas. La

acción principal de la insulina en el tejido adiposo es la de inhibir la actividad de la LHS, mientras que otras hormonas como noradrenalina, glucagon, hormona estimulante de la tiroides, hormonas tiroideas, etc., determinan un aumento en su actividad. En nuestra experiencia, como previamente encontró Badr y col. (1992), el DEHF no tiene efecto sobre los niveles circulantes de hormonas tiroideas, por lo tanto, en nuestro caso, esta hipótesis debería ser descartada. No existen, a nuestro conocimiento, estudios que demuestren posibles alteraciones en los niveles de otras hormonas involucradas en la regulación de la lipólisis.

Otro mecanismo que podría ser responsable del menor tamaño del adipocito es una menor captación de ácidos grasos para la síntesis de triglicéridos en el interior de la célula. Los resultados encontrados en este trabajo no están de acuerdo con esta hipótesis ya que se demostró que existe una mayor velocidad de captación debida a la aumentada actividad de la enzima lipoproteínas lipasa (LPL) en tejido adiposo epididimal.

Se puede postular un mecanismo alternativo que justificaría la disminución de la grasa corporal. En este sentido, debemos tener en cuenta que diversos autores han demostrado que los proliferadores peroxisomales activan el PPAR β/δ en tejido adiposo. Esto conduce a la inducción de la expresión de genes de distintas proteínas que se requieren para la oxidación de ácidos grasos y disipación de energía, lo que estaría contribuyendo al descenso de la adiposidad (Wang 2003). Específicamente, la activación del PPAR β/δ conduce a una estimulación de los genes que codifican para las enzimas que intervienen en las 3 etapas del catabolismo de ácidos grasos: hidrólisis, oxidación y desacople de la fosforilación oxidativa (proteínas desacoplantes UCPs). Las proteínas desacoplantes forman un canal en la membrana interna de la mitocondria que permite el reingreso de los protones a la matriz mitocondrial sin pasar por el complejo ATP sintasa. Esto permite una continua oxidación de combustible (ácidos grasos) sin síntesis de ATP, disipando la energía como calor y consumiendo calorías dietarias o grasas de reserva en cantidades potencialmente importantes. Estos cambios se observan fundamentalmente en tejido adiposo marrón, pero también se ha demostrado la inducción de estas proteínas, aunque

en menor grado, en tejido adiposo blanco (fundamentalmente la proteína UCP-1). Si bien la inducción de estos genes es menor en tejido adiposo blanco, su importancia fisiológica no debe ser excluida dada la gran cantidad de este tejido presente en el organismo. Este podría ser otro de los mecanismos responsables de la depleción de grasa y pérdida de peso en los animales alimentados con DEHF.

Las alteraciones en la eficiencia energética y en la composición corporal podrían estar asociadas al efecto estimulante del DEHF sobre el PPAR β/δ presente en otros tejidos distintos al tejido adiposo, como ser el tejido muscular e hígado (Bility y col., 2004; Lapinkas y col., 2005). La activación de este receptor conduce, al igual que lo que ocurre en tejido adiposo, a la inducción de la expresión de genes que se requieren para la oxidación de ácidos grasos y disipación de energía, lo que podría contribuir a la depleción de grasa corporal, termogénesis aumentada y pérdida de peso (Nelson, 2001). En adición, es probable que el DEHF, a través de la unión al PPAR α , permitiría aumentar la expresión génica de la proteína desacoplante UCP-3 en músculo esquelético (Watt y col., 2004; Dressel, 2003). Otros autores han demostrado que algunos ésteres de ftalatos inhiben en el hígado la cadena respiratoria a nivel de la citocromo c reductasa (Mitchel y col., 1985a; Winberg y Badr, 1995; Zhou y Wallace, 1998).

Resumiendo, el DEHF podría alterar distintas vías metabólicas, por sí mismo o a través de su capacidad de unirse a distintos PPARs, lo que determinaría una menor retención de grasas y proteínas corporales. Esto conduciría a la ineficiencia energética observada en los animales alimentados con este contaminante alimentario.

ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO

Dado que la ineficiencia metabólica anteriormente descrita podría estar relacionada a alteraciones en la utilización de los hidratos de carbono, estudiamos

el efecto potencial del DEHF sobre la asimilación periférica de la glucosa y su metabolismo en los principales órganos implicados.

Los animales alimentados con DEHF presentaron una alteración en la utilización de glucosa con niveles aumentados de glucemia en ayuno y una incapacidad de normalizar los valores al final de la sobrecarga oral. Esta alteración en la utilización de glucosa por los tejidos periféricos también fue demostrada por otros autores (Mushtaq y col., 1980).

La utilización y metabolismo de la glucosa está principalmente relacionada a dos órganos claves: el músculo esquelético y el hígado. Dado que el músculo esquelético representa el 40% de la masa corporal y regula la utilización neta de los principales sustratos energéticos, el anormal manejo de sustratos lipídicos y proteicos observado en ratas DEHF podría estar asociado con un metabolismo anormal de la glucosa en músculo. Mientras que el hígado desempeña un rol crucial como regulador del metabolismo intermedio, controlando no sólo la vía glucolítica sino que además establece conexiones con otras rutas metabólicas lo que nos permitiría explicar como la integración de las mismas ejercen un control coordinado del estado metabólico general.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la exposición al DEHF conduce a una significativa inhibición de la glucólisis en el hígado, tal como lo refleja la reducción de los niveles de G-6-P, F-6-P, piruvato y lactato. Además, la disminuida relación G-6-P/glucosa sugiere un menor flujo a través de la enzima glucoquinasa, la cual cumple un rol clave en la regulación de la glucólisis.

Distintos mecanismos podrían explicar las alteraciones en el metabolismo de la glucosa en el hígado. La activación del PPAR α hepático por el contaminante alimentario DEHF podría estar asociada a alteraciones en algunas etapas del metabolismo de la glucosa. En este sentido, se ha demostrado que el DEHF inhibe la expresión génica para las enzimas hepáticas α -enolasa y fructosa 1,6-difosfatasa, lo cual nos estaría indicando una posible existencia de alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono (McDonald y col., 2001). Además, está

demostrado que algunos proliferadores peroxisomales inhiben la expresión génica para la enzima piruvato kinasa en hígado, la que controla uno de los sitios claves de regulación de la glucólisis, lo cual podría explicar los niveles disminuidos de piruvato encontrados en nuestro trabajo (Pan y col., 2000). A su vez, se observó un descenso en los niveles de lactato, dando como resultado una relación lactato/piruvato disminuida lo que indicaría un estado redox citoplasmático alterado a nivel hepático en los animales del grupo DEHF.

Por otro lado, la unión del MEHF al PPAR α en el hígado determina un aumento en la expresión génica, y en las actividades de las enzimas que intervienen en la β -oxidación peroxisomal y mitocondrial de ácidos grasos (acil-CoA oxidasa, enoil-CoA hidratasa y 3-cetoacil-CoA tiolasa), generando de esta manera acetil CoA y frenando la entrada de los carbonos provenientes de la glucosa al Ciclo de Krebs. Esto conduciría a una mayor oxidación de ácidos grasos a expensas de una menor oxidación de la glucosa en el hígado de animales alimentados con DEHF (McDonald y col., 2001).

Los niveles disminuidos de glucógeno hepático confirman resultados previamente reportados que el DEHF inhibe la glucogenogénesis en el hígado (Mushtaq y col., 1980). Actualmente se conoce que el glucógeno no es una molécula uniforme, sino que existen dos "pools" del mismo (Lomako y col., 1993; Alonso y col., 1995). La fracción macro-glucógeno (MG) se presenta con una elevada relación carbohidratos a proteínas, mientras que la fracción pro-glucógeno (PG) tiene el mismo contenido de proteínas pero menos carbohidratos. No se conocen todavía con exactitud los roles fisiológicos ni las regulaciones metabólicas de estas dos fracciones, aunque se postula que a través de la interconversión de PG a MG, y viceversa, los tejidos pueden regular rápidamente los depósitos de glucógeno.

En este trabajo se encontró que la disminución del contenido total de glucógeno hepático fue debida principalmente a una disminución importante de la fracción MG (descenso del 60%), indicando que la conversión de PG a MG está reducida, y que los niveles de proteínas (glicogenina) podrían no ser limitantes en

la síntesis hepática de glucógeno. Es importante considerar que la actividad de la glucógeno sintasa, enzima que cataliza la etapa limitante en la síntesis de glucógeno, está en relación directa con la concentración intracelular de G-6-P (Ferrer, 2003). En los animales alimentados con DEHF los niveles hepáticos de G-6-P se encuentran disminuidos y este podría ser un factor responsable de la disminución en la síntesis de glucógeno. Por otro lado algunos trabajos han sugerido que el PG está asociado con una única sintasa (PG sintasa) que es regulada en manera diferente a la sintasa asociada con MG (Lomako y col.1993). Estudiando los mecanismos reguladores de la actividad de estas dos enzimas involucradas en la síntesis de glucógeno, podrían esclarecerse los factores determinantes de la disminución del glucógeno hepático.

El músculo gastrocnemius contiene una mezcla de fibras tipo I y fibras tipo II y representa la composición muscular corporal media, siendo el tejido de elección para estudiar el metabolismo de la glucosa. Bajo nuestras condiciones experimentales los contenidos de glucosa y glucógeno permanecieron invariables en las ratas DEHF; sin embargo, otros sustratos intracelulares relacionados al metabolismo de la glucosa estuvieron alterados.

El contenido de glucosa libre en el músculo no se vio afectado por la presencia de DEHF en la dieta. Sin embargo, la mayor concentración de glucosa en el plasma, asociada a un normal contenido de glucosa intracelular, nos podría estar indicando una deficiencia en los sistemas de transporte de glucosa muscular. En las membranas plasmáticas de las células musculares el transporte de glucosa está mediado por una glicoproteína trans-membrana conocida como transportador GLUT 4. La insulina actúa rápidamente estimulando la captación de glucosa por el músculo, aumentando el contenido neto de GLUT 4 en la superficie celular. A nuestro conocimiento, no existen datos disponibles que evidencien una disminución del contenido de GLUT 4 en las membranas por alteración en los niveles de insulina, ni tampoco evidencias que sustenten algún cambio en la afinidad de este transportador. Aunque podemos sugerir que algunas de estas

anormalidades podrían estar presentes y justificar la alterada tolerancia a la glucosa “in vivo” presente en los animales alimentados con DEHF.

Los cambios más notables observados en el músculo de las ratas DEHF fueron un aumento en el contenido de metabolitos glucolíticos distales, es decir F1,6-P₂, lactato y piruvato y una disminución en el contenido del primer metabolito glucolítico G-6-P. Este menor contenido de G-6-P asociado a un nivel normal de glucosa intracelular en ratas DEHF, sugieren que podría existir una reducción del flujo a través de la enzima hexoquinasa. A nuestro conocimiento, no existe información que demuestre cambios en la actividad de esta enzima regulatoria clave del metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético en ratas del grupo DEHF.

El incremento significativo observado de la relación lactato muscular/lactato plasmático y el elevado contenido intracelular de lactato son compatibles con la hipótesis que el DEHF podría disminuir el transporte trans-sarcolema del lactato. Si bien una mayor producción de lactato podría estar presente, parece razonable considerar que la ineficiencia de su transporte conduciría a una acumulación de lactato, piruvato y F1,6-P₂ en el músculo. El transporte de lactato muscular es regulado por las proteínas transportadoras monocarboxilato (MCT1 y MCT4) y por su distribución intracelular (Bonen, 2001). Es conocido que la intolerancia a la glucosa se asocia con alteraciones en el contenido de MCT1, de modo que la acumulación de lactato intracelular podría disminuir la glucólisis y deteriorar la señal de la Insulina en el músculo esquelético. Sin embargo, a nuestro conocimiento no existe información que sustente esta razonable suposición.

Las alteraciones mencionadas en la metabolización de la glucosa muscular no estuvieron asociadas a cambios en los niveles de citrato, uno de los reguladores más importantes de enzimas claves de la glucólisis.

Otros mecanismos podrían explicar las alteraciones observadas en el metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético. Como se mencionara anteriormente, en el músculo se encuentran expresados no sólo el PPAR α sino también el PPAR β/δ , los cuáles son activados por el MEHF (Lapinskas y col.,

2005; Bility y col., 2004). Se ha demostrado que ligandos del PPAR α y del PPAR β/δ inducen la expresión de genes involucrados en el control del metabolismo de ácidos grasos en el músculo esquelético. La activación del PPAR β/δ por proliferadores peroxisomales induce la expresión de genes implicados en la utilización preferencial de lípidos (captación y β -oxidación) y genes que codifican enzimas involucradas en la disipación de energía desacoplando las mitocondrias (UCPs). Específicamente, aumentado la expresión génica de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT-1) se favorece la entrada de ácidos grasos a la mitocondria para la β -oxidación, aumentando en consecuencia los niveles de acetil CoA. Este metabolito es uno de los inhibidores de la piruvato deshidrogenasa (PDH), enzima que cataliza uno de los sitios claves regulatorios de la glucólisis.

Además, la activación del PPAR α en el músculo induce la expresión del gen que codifica para la enzima piruvato deshidrogenasa kinasa-4 (PDHK-4) (Ferré, 2004; Muoio 2002a y 2002b; Dressel y col., 2003). La activación de esta enzima determina la fosforilación de la PDH, lo que conduce a su inactivación.

La relación NADH/NAD como indicador del estado redox citoplasmático se determinó mediante el cociente lactato/piruvato. Los niveles de ambos metabolitos se encontraron aumentados en el músculo de animales del grupo DEHF, con un cociente lactato/piruvato aumentado. Este incremento en la relación NADH/NAD sería potencialmente otro factor relacionado a una disminución de la actividad de la enzima PDH.

Los tres mecanismos enunciados: aumento de la β -oxidación, aumento en la expresión de la PDHK-4, incremento en la relación lactato/piruvato, pueden derivar los carbonos de la glucosa desde la oxidación a la síntesis de lactato. Por lo tanto, este sería otro mecanismo capaz de explicar la disminuida utilización de glucosa y el aumento en las concentraciones de lactato a nivel muscular.

Los niveles de glucógeno total y de las fracciones PG y MG en músculo permanecieron invariables en los animales alimentados con DEHF, en contraste con los cambios observados en el hígado. Esta diferencia podría deberse a la

distinta regulación de la glucógeno sintasa según el tejido que se considere. Se ha demostrado que existen dos isoformas de glucógeno sintasa en mamíferos (Ferrer y col., 2003). La mayor parte de los órganos expresan la forma muscular, mientras la isoenzima hepática parece ser específica de este tejido. A pesar de que las dos formas son 70% idénticas en su secuencia de aminoácidos, los sitios de fosforilación que regulan la actividad de la enzima, muestran un muy bajo grado de homología. Estas diferencias y sus distintas distribuciones intracelulares sugieren que las glucógeno sintasas hepática y muscular tienen diferentes capacidades en el control de la síntesis de glucógeno en los respectivos órganos. La síntesis de glucógeno en el músculo no depende de la capacidad de fosforilación de la glucosa en la célula, como ocurre en el hígado, sino del transporte de la glucosa a través del transportador GLUT 4 y de la actividad de la glucógeno sintasa. Por lo tanto, bajas concentraciones de G-6-P no serían limitantes de la síntesis de glucógeno en músculos de animales alimentados con DEHF. Esta diferente regulación de las glucógeno sintasas hepática y muscular podrían explicar los niveles disminuidos de glucógeno en hígado sin variaciones en el contenido de glucógeno muscular.

Resumiendo, la ingesta crónica de DEHF podría alterar la tolerancia y el metabolismo de la glucosa en hígado y músculo. En el hígado, modificaciones de la actividad de la glucoquinasa, alteración de la expresión génica de la enzima piruvato kinasa y la elevada oxidación de ácidos grasos podrían jugar un rol clave en las modificaciones del metabolismo de la glucosa. Mientras que en el músculo esquelético, alteraciones en el transporte de glucosa y lactato, modificaciones de la actividad de la hexoquinasa y aumento de la β -oxidación de ácidos grasos podrían explicar las alteraciones observadas.

EFEECTO HIPOLIPEMIANTE

Se ha demostrado, al igual que en otros trabajos, que el DEHF induce hipolipemia, con un descenso pronunciado en la concentración de triglicéridos

(Osumi y Hashimoto, 1978; Tomaszewski y col., 1987; Mocchiutti y col, 1997; Howarth y col., 2001).

El nivel de triglicéridos plasmáticos depende de la síntesis endógena a nivel hepático y del “clearance” por los tejidos extrahepáticos. La síntesis de triglicéridos en el hígado es controlada en gran parte por la disponibilidad de sustrato (ácidos grasos) mientras que el “clearance” tisular depende de la actividad de las enzimas lipoproteínas lipasa (LPL).

Los triglicéridos sintetizados en el hígado se unen a apoproteínas formando las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-TG) y son secretados a circulación por exocitosis. La remoción de los triglicéridos ocurre en el lumen de los capilares por acción de las LPL presentes en distintos tejidos (principalmente en tejido adiposo y músculo esquelético). De esta manera los ácidos grasos incorporados al interior de la célula pueden ser reesterificados a triglicéridos (predominantemente en tejido adiposo) u oxidados para obtener energía (principalmente en músculo esquelético).

En lo que respecta a la remoción de triglicéridos plasmáticos, nuestro grupo ha informado en trabajos previos que existe una disminuida actividad lipolítica post-heparínica (Mocchiutti y Bernal, 1997). Dicha actividad refleja la eficiencia de la remoción de los triglicéridos plasmáticos, e incluye una gran variedad de enzimas lipolíticas (lipoproteína lipasa de tejidos extrahepáticos, triglicérido hidrolasa hepática, fosfolipasa, monoglicérido hidrolasa, etc) localizadas en diversos tejidos y reguladas por distintos factores hormonales y/o nutricionales. En el presente trabajo comprobamos específicamente que las actividades LPL de los músculos gastrocnemius, soleus y diafragma permanecieron invariables luego de la administración del DEHF. Sin embargo, las actividades LPL en los tejidos adiposos lumbar y epididimal estuvieron aumentadas, siendo el incremento mayor para la LPL lumbar. En adición, las actividades LPL de estos tejidos estuvieron inversamente relacionadas con el nivel de TG circulantes.

Algunos trabajos han demostrado que ciertos proliferadores peroxisomales pueden estimular el “clearance” de los triglicéridos a través de a una disminuida

transcripción y síntesis de la Apo C-III, apolipoproteína que limita la remoción tisular de triglicéridos (Peters y col., 1997).

La activación del PPAR α por proliferadores peroxisomales puede disminuir la velocidad de producción de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Específicamente, se ha demostrado que la activación del PPAR α en el hígado estimula la captación de ácidos grasos y su conversión a derivados acil-CoA, los cuales son rápidamente oxidados por la inducción de los caminos de β -oxidación en peroxisomas y mitocondrias. De esta forma, los PPAR α , modulando la oxidación de ácidos grasos pueden también afectar la síntesis de novo de los mismos, lo que podría contribuir al descenso en la síntesis de triglicéridos y producción de VLDL-TG. Sin embargo, nosotros hemos demostrado que los animales alimentados con DEHF no presentaron alteraciones en la velocidad de secreción hepática de VLDL-TG (Mocchiutti y col, 1997).

Resumiendo, podemos sugerir que la velocidad de secreción hepática de triglicéridos pareciera no ser un factor limitante en el nivel de triglicéridos plasmáticos. Según los resultados encontrados, uno de los mecanismos involucrados en el descenso de triglicéridos plasmáticos podría ser el aumento en las actividades LPL del tejido adiposo lumbar y epididimal.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIÓN

CONCLUSIÓN

En este trabajo se ha demostrado que el contaminante alimentario DEHF, cuando está presente en la dieta de animales de experimentación, conduce a una menor ganancia de peso corporal relacionada a ineficiencia en la utilización de nutrientes, la que se manifiesta con una menor retención de nitrógeno y de grasa corporal. Estos efectos observados sugieren una alteración en el metabolismo de proteínas, grasas y carbohidratos.

El menor balance nitrogenado, asociado a una mayor excreción de nitrógeno ureico, podría ser indicativo de un exacerbado catabolismo proteico, posible responsable de la depleción de proteínas corporales.

La disminuida retención de grasa corporal no estuvo correlacionada a una alteración de la lipólisis “in vitro” en tejido adiposo, ni a modificaciones en los niveles de algunas hormonas reguladoras, como T₄ y TSH. No obstante estas observaciones, no se descarta la posibilidad que el entorno metabólico-hormonal presente “in vivo” pueda conducir a un desequilibrio en el metabolismo del tejido adiposo.

La intolerancia a la glucosa observada en los animales DEHF estuvo relacionada con alteraciones en los niveles de intermediarios del metabolismo de la glucosa en hígado y músculo esquelético. Las modificaciones en músculo fueron diferentes a las observadas en hígado, y aunque diversos mecanismos pueden estar involucrados, los resultados encontrados sugerirían que alteraciones en el transporte de glucosa y lactato, modificaciones de las actividades hexoquinasa en músculo y glucoquinasa en hígado podrían desempeñar un rol clave en la alterada tolerancia a la glucosa.

El efecto hipolipemiante del DEHF pareciera estar vinculado principalmente a una mayor remoción de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Esto se sustenta en que las actividades LPL en tejido adiposo lumbar y epididimal incrementaron significativamente en los animales alimentados con DEHF, sin modificaciones en

las actividades LPL musculares ni en la velocidad de secreción hepática de triglicéridos.

Dado el uso industrial masivo del plastificante DEHF, y teniendo en cuenta la migración del mismo hacia el ambiente circundante así como los efectos deletéreos observados en esta tesis y en otros trabajos de investigación, consideramos que se impone limitar el empleo de este compuesto para reducir el potencial impacto que el mismo podría ejercer sobre la salud humana.

CAPÍTULO IX

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adamo KB, Graham T. (1998). Comparison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen. *J. of Appl. Physiol.* 84: 908-913.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1993). Toxicological profile for di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Atlanta, GA. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2002). Toxicological profile for di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). Atlanta, GA. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Albro P. (1986). Absorption, metabolism, and excretion of Di (2-ethylhexyl) phthalate by rats and mice. *Environ. Health Perspect.* 65: 293-298.
- Albro P. and Moore B. (1974). Identification of metabolites of simple phthalate diesters in rat urine. *J. Chromatography* 94: 209-218.
- Albro P., Corbett J., Schroeder J., Jordan S., Matthews H. (1982). Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ. Health Perspect.* 45: 19-25
- Albro P., Thomas R., Fishbein L. (1973). Metabolism of diethylhexyl phthalate by rats. Isolation and characterization of the urinary metabolites. *J. Chromatography* 76: 321-330.
- Alonso M., Lomako J., Lomako W., Whelan W. (1995). A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 9: 1126-1137.
- Asbhy J., Brady A., Elcombe C., Elliott B., Ismael J., Odum J., Tugwood J., Purchase I. (1994). Mechanistically based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Hum. Exp. Toxicol.* 13, (Suppl 2): S1-117.

- Badr M. (1992). Induction of peroxisomal enzyme activities by di (2-ethylhexyl) phthalate in thyroidectomized rats with parathyroid replants. *J. Pharmacol.* 263: 1105-1111.
- Barr D., Silva M., Kato K., Reidy J., Malek N., Hurtz D., Sadowski M., Needham I., Calafat A. (2003). Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. *Environ. Health Perspect.* 111: 1148-1151
- Bell R., Spencer M., Sherriff J. (1995). Diet-induced obesity in mice can be treated without energy restriction using exercise and/or a low fat diet. *J. Nutr.* 125: 2356-2363.
- BIBRA/R. A 21 day dose/relationship Study of di (2-ethylhexyl) phthalate in rats. (1984). Project n° 3.0512, Report n° 0512/1/94. CMA Reference PE28. 0 BT BIB. Chemical Manufacturers Association.
- Bility M., Thompson J., McKee R., David R., Butala J., Vanden Heuvel J., Peters J. (2004). Activation of mouse and human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by phthalate monoesters. *Toxicol. Sci.* 82: 170-182.
- Blount B, Silva M., Caudill S., Needham L., Pirkle J., Sampson E., Lucier G., Jackson R., Brock J. (2000). Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* 108:979-982.
- Boisclair Y., Bell A., Dunshea F., Harkins M., Bauman D. (1993). Evaluations of the arteriovenous difference technique to simultaneously estimate protein synthesis and degradation in the hindlimb of fed and chronically underfed steers. *J. Nutr.* 123: 1076-1088.
- Bonen A. (2001). The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. *European J. of Appl. Physiol.* 86: 6-11.
- Bosgra S., Mennes W., Seinen W. (2005). Proceedings in uncovering the mechanism behind peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis. *Toxicology* 206: 309-323.

- Bouma K., Schakel D. (2002). Migration of phthalates from PVC toys into saliva simulat by dynamic extraction. *Food Additive & Contam.* 19: 602-10.
- Brouwer E. (1965). Report of sub-committee on constants and factors in energy metabolism. Edited by K .L. Blaxter Academic Press, London. p 441-443.
- Byron A. (1988). Toxicological quandary of the use of bis (2-diethylhexyl) phthalate (DEHP) as a plasticizer for blood bags. *Annals of Clin. and Lab. Sci.* 18: 131-140.
- Calafat AM, Needham LL, Silva MJ, Lambert G. (2004). Exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 113: E429-E437
- Calley D., Autian J., Guess W. (1966). Toxicology of a series of phthalate esters. *J. Pharmacol. Sci.* 55: 158-162.
- Canadian Environmental Protection Act (CEPA). (1994). Priority Substances List. Assessment Report. Bis (2-ethylhexyl) phthalate. Government of Canada. Environment Canada. Health Canada.
- Canolty, N. and Koong, L. (1976). Utilization of energy for maintenance and for fat and lean gains by mice selected for rapid post-weaning growth rate. *J. of Nut.* 106, 1202-1208.
- Carcinogenesis Bioassay of di (2-ethylhexyl) phthalate (CAS N° 117-81-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Study). TR 217. (1982). Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program
- Cimini A, Sulli A., Stefanini S., Serafin B., Moreno S., Rossi L., Giorgi M., Ceru M.(1994). Effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on peroxisomes of liver, kidney and brain of lactating rats and their pups. *Cell. Mol. Biol.* 40: 1063-1076.
- CMA. (1999). Comments of the Chemical Manufacturers Association phthalate esters panel in response to request for the public input on seven

phthalate esters. FR Doc. 99-9484. Washington, DC: Chemical Manufacturers Association. <http://www.cmahq.com/cmawebsite.nsf>

- Coppack S., Jensen M., Miles J. (1994). In vivo regulation of lipolysis in humans. *J. Lipid Res.* 35: 177-193.
- Croker J., Safe S., Acott P. (1988). Effects of chronic exposure on the kidney. *J. Toxicol. Environ. Health* 23: 433-444
- CSTE (Scientific Committee for Toxicity, Ecotoxicity and the Environment). Opinion on phthalate migration from soft PVC toys and child /care articles ± opinion expressed at the 6 th CSTE plenary meeting, Brussels, 26/27 November 1998. <http://europa.eu.in/comm./food/fs/sct/out19>.
- Cunniff, P. (editor) (1999). Official Methods of Analysis of Association of Official Agricultural Chemists 16th Ed., 5th Revision (Maryland, USA: AOAC International).
- Daniel J. (1978). Toxicity and metabolism of phthalate esters. *Clin. Toxicol.* 13 (2): 257-268
- David R., Moore M., Cifone M., Finney D., Guest D. (1999). Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di (2-ethylhexyl) phthalate and the effects of recovery. *Toxicol. Sci.* 50: 195-205
- David R., Moore M., Finney D., Guest D. (2000a). Chronic toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicol. Sci.* 55: 433-443
- David R., Moore M., Finney D., Guest D. (2000b). Chronic toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate in mice. *Toxicol. Sci.* 58: 377-385
- Davis B., Maropont R., Heidel J. (1994a). Di (2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128: 216-223.

- Davis B., Weaver R., Gaines L., Heindel J. (1994b). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128: 224-228.
- DeGroot, M.H. (editor) (1975). *Probability and Statistics*. (Massachusetts, USA: Addison-Wesley Publishing Company, Inc., Reading).
- Di Girolamo M., Mendlinger S., Fertig J. (1971). A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species. *Am. J. Physiol.* 221: 850-858.
- Dirven H., van den Broeck P., Jongeneelen F. (1990). Effect of di (2-ethylhexyl) phthalate on enzyme activity levels in liver and serum of rats. *Toxicol.* 65: 199-207.
- Dole V., Meinertz H. (1960). Microdetermination of long chain fatty acids in plasma and tissues. *J. Biol. Chem.* 235: 2595-2599.
- Dostal L., Jenkins W., and Schwetz B. (1987). Hepatic peroxisome proliferation and hipolipidemic effects of DEHP in neonatal and adults rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 87: 81-90
- Doull J., Cattley R., Elcombe C. (1999). A cancer risk assessment of di (2-ethylhexyl) phthalate: application of the new US EPA risk Assessment Guidelines. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 29(3): 327-57.
- Dressel U., Allen T., Pippal J., Rohde P., Lau P., Muscat G. (2003). The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. *Mol. Endocrinol.* 17: 2477-2493.
- Duck-Chong C. (1979). A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorous involving digestion with magnesium nitrate. *Lipids* 14: 492-497.
- Dullo A., Girardier. (1992). Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for cath-up growth and obesity relapse. *Metabolism* 41, 1336-1342.

- Dzhékova-Stojkova S., Bogdanska J., Stojkova Z. (2001). Review: Peroxisome proliferators: their biological and toxicological effects. *Clin. Chem. Lab. Med.* 39 (6): 468-474.
- Ema M., Miyawaki E., Kawashima K. (2000). Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicol. Letters* 111: 271-278.
- Environmental Protection Agency. (EPA). (1987). Health effect assessment for selected phthalic acids esters. Cincinnati OH: U.S. Environmental Criteria and Assessment Office. EPA/600/8-88/053.PB88-178934
- European Commission. Health & Consumer. (2002). Protection Directorate-General. Opinion on medical devices containing DEHP plasticized PVC. Neonates and other groups possibly at risk from DEHP toxicity.
- Ferré P. (2004). The biology of peroxisome proliferator-activated receptors. Relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 53: S43-S46.
- Ferrer J., Favre C., Gomis R., Fernández-Novell J., García-Rocha M., Iglesia N., Cid E., Guinovart J. (2003). Control of glycogen deposition. *FEBS Letters* 546: 127-132.
- Folch R., Lees M., Stanley S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497-509
- Food and Drug Administration (FDA). (1999). Code Federal of Regulations. 21 CFR 181.7: Plasticizers.
- Food and Drug Administration (FDA). (2001). Center for Devices and Radiological Health, U.S. Safety assessment of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) released from medical devices. Available at <http://fda.gov/cdrh/ost/dehppvc.pdf>.

- Fujii M., Sinohara N., Lim A., Otake T., Kumagai K., Yanagisawa Y. (2003). A study on emission of phthalate esters from plastic materials using a passive flux of sampler. *Atmospheric Environ.* 37: 2495-5504.
- Fukuwatari T., Susuki Y., Sugimoto E., Shibata K. (2002). Elucidation of the toxic mechanism of the plasticizers, putative endocrine disrupters: effects of dietary di (2-ethylhexyl) phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 705-10
- Ganning AE, Brunk U, Boone BJ. (1976). Delivery of di (2-ethylhexyl) phthalate of patients during haemodialysis. *J. Lab. Clin. Med.* 87: 519-254.
- Gaunt I., Butterwoerth K. (1982). Autoradiographic study of orally administered di-(2-ethylhexyl) phthalate in the mouse. *Food Chem. Toxicol.* 20: 215-7.
- Goel S., Lalwani N., Reddy J. (1986). Peroxisome proliferation and lipid peroxidation in rat liver. *Cancer Res.* 46: 1324-1331.
- Goldrick R. (1967). Morphological changes in the adipocyte during fat deposition and mobilization. *Am. J. Physiol.* 212: 777-782.
- Goll V., Alexandre E., Viollon-Abadie C., Nicod L., Jack D., Richert L. (1999). Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160: 21-23
- Gray L., Ostby J., Furr J., Price M., Veeramachanemi D., Parks L. (2000). Perinatal exposures of the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DTOP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* 58: 350-365.
- Green R., Hauser R., Calafat A., Weuve J., Schettler T., Ringer S., Huttner K., Hu H. (2005). Use of Di (2-ethylhexyl) Phthalate-Containing Medical Products and urinary Levels of Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in Neonatal Intensive Care Unit Infants. *Environ. Health Perspect.* 113: 1222-1225.

- Griffiths W., Lerner H. (1985). Bis-(2-ethylhexyl) phthalate, an ubiquitous environmental contaminant. *Am. Clin. Lab. Sci.* 15: 140-151.
- Hodge H. (1943.). Acute toxicity for rats and mice of di (2-ethylhexyl) phthalate with a note upon the mechanism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 53: 20-23
- Houseknecht K., Bauman D., Fox D., Smith D. (1992). Abomasal infusion of casein enhances nitrogen retention in somatotropin-treated steers. *J. Nutr.* 122: 1717-1725.
- Howarth J., Price S., Dobrota M., Kentish P., Hinton R. (2001). Effects on male rats of di (2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. *Toxicol. Letters* 121: 35-43.
- Huber W., Grasl-Kraupp B., Schulte-Hermann R. (1996). Hepato carcinogenic potential of Di-2-ethylhexyl Phthalate: in rodents and its implications on human risk. *Crit. Rev. Toxicol.* 23: 365-481.
- Hurst C., Waxman D. (2003). Activation of PPAR α and PPAR γ by environmental phthalate monoesters. *Toxicol. Sci.* 74: 297-308.
- IARC. (2000). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: Some industrial chemicals.
- Inoue K., Kawaguchi M., Yamanaka R., Higuchi T., Ito R., Saito K., Nakazawa H. (2005). Evaluation and analysis of exposure levels of di (2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clin. Chim. Acta* 358: 159–166.
- IPCS. International Program on Chemical Safety. (1992). Diethylhexyl Phthalate. *Environmental Health Criteria* 131.
- Issemann I. And Green S. (1990). Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347, 645-650.
- Jacobson MS, Parkman R., Button L., Jaeger R., Kevy S. (1974). The toxicity of human serum stored in flexible polyvinylchloride containers on

human fibroblast cell cultures: an effect of di-2-ethylhexyl phthalate. *Res. Comm. Chem. Pathol. and Pharmacol.* 9 (2): 315-323.

- Jaeger R. and Rubin R. (1972). Migration of phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. *The New England Journal of Medicine* 287: 1114-1118.
- Jaeger R. and Rubin R. (1973b). Di-2-ethylhexyl phthalate, a plasticizer contaminant of platelet concentrates. *Transfusion*, Mar-Apr.: 107-108.
- Jaeger R. and Rubin R. (1997). Migration of a phthalate ester plasticizer from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. *Nutrition* 13: 11-12.
- Jaeger R. and Rubin R. (1973a). Extraction, localization and metabolism of di-2-ethylhexyl phthalate from PVC plastic medical devices. *Environ. Health Perspect.* January: 95-102.
- Jeszka J., Grav H., Holm H., Hustvedt B., Lovo A., Ueland O. (1991). Opposite effect of cold on energetic efficiency in normal and obese Wistar rats with hypothalamic lesions. *J. Nutr.* 121: 386-394.
- Jolly S., Lombardo Y, Lech J., Menahan L. (1980). Effect of aging and cellularity on lipolysis in isolated mouse fat cells. *J. Lipid Res.* 21: 44-52.
- Kambia K., Dine T., Azar R., Gressier B., Luyckx M., Brunet C. (2001). Comparative study of leachability of di (2-ethylhexyl) phthalate and tri (2-ethylhexyl) trimellitate from haemodialysis tubing. *Intern. J. Pharmac.* 229: 139-146.
- Kicheva Y., Kostov V., Chichovska M. (1995). In vitro and in vivo studies of the effect of the concentration of plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate on the blood compatibility of plasticized poly (vinyl chloride) drain tubes. *Biomaterials* 16: 575-579.
- Kluwe W., McConnell E., Huff J., Haserman J., Douglas J., Hartwell W. (1982). Carcinogenicity testing of phthalate esters and related compounds

by the National Toxicological Program and the National Cancer Institute. *Environ. Health Perspect.* 45: 129-133.

- Koch H., Drexler H., Angerer J. (2004). Internal exposure of nursery-school children and their parents and teachers to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Int. J. Hyg. Environ. Health* 207: 15-22.
- Koch H, Rossbach B, Drexler H., Angerer J. (2003). Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ. Res.* 93: 177-85
- Lake B., Gray T., Gangolli S. (1986). Hepatic effects of phthalate esters and related compounds. In vivo and in vitro correlations. *Environ. Health Perspect.* 67: 283-290.
- Lamb J., Chapin R., Teague J., Lawton A., Reel J. (1987). Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 88: 255-269.
- Lapinskas P., Brown S., Leesnitzer L., Blanchard S., Swanson C., Cattley R., Corton J. (2005). Role of PPAR α in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology* 207: 149–163
- Latini G. (2000). Potential hazards of exposures to di-(2-ethylhexyl) phthalate in babies. *Biol. Neonate* 78: 269-276.
- Latini G. (2005). Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin. Chem. Acta* 361: 20–29.
- Latini G., De Felice C., Verrotti A. (2004). Plasticizers, infant nutrition and reproductive health. *Reprod. Toxicol.* 19: 27-33.
- Laurell S. (1966). A method for routine determinations of plasma triglycerides. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18: 668-672.
- Leffler H. (1959). Estimation of cholesterol in serum. *Am. J. Clin. Pathol.* 31: 310-313.

- Lomako J., Lomako W., Whelan W., Dombro R., Neary J., Noremborg M. (1993). Glycogen synthesis in the astrocyte: from glycogenin to proglycogen to glycogen. *FASEB J* 7: 1386-1393.
- Lovekamp-Swan T., Davis B. (2003). Mechanism of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health Perspect.* 111: 139-46.
- Lowry O., Passonneau J. A flexible system of enzymatic analysis, Academic Press: New York - London, 1972.
- Lughenot J, Mitchell A., Milner G., Lock E., Elcombe C. (1985). The metabolism of DEHP in rats in vivo and in vitro dose and time dependency of metabolism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80: 11-22.
- Macdonald N, Chevalier Stephan, Tonge R., Davison M., Rowlinson R., Young J., Rayner S., Roberts R. (2001). Quantitative proteomic analysis of mouse liver response to the peroxisome proliferator diethylhexylphthalate (DEHP). *Arch. Toxicol.* 75: 415-424.
- Maloney E., Waxman D. (1999). Trans-activation of PPAR α and PPAR γ by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 161: 209-218.
- Mann A., Price S., Mitchell F., Grasso P., Hinton R., Bridges J.(1985). Comparison of the short-term effects of di(2-ethylhexyl phthalate) and di (n-octyl) phthalate in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 77: 116-132.
- Marin M., Lopez J., Sanchez A., Vilaplana J., Jimenez A. (1998). Analysis of potentially toxic phthalate plasticizers used in toy manufacturing. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60, 68-73.
- Meek M., Chan P. (1994). Bis(2-ethylhexyl) phthalate: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *Environ. Carcin. Ecotoxicol. Rev.* C12: 179-94.
- Melnick R. (2001). Is the peroxisome proliferation an obligatory precursor step in the carcinogenicity of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)? *Environ. Health Perspect.* 109 (5): 437-442.

- Melnick R., Schiller C. (1982). Mitochondrial toxicity of phthalate esters. *Environ. Health Perspect.* 45: 51-56.
- Mess J., Coffin D, Campell D. (1974). Di-n-butyl and di-2-ethylhexyl phthalate in human adipose tissue. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12: 721-725.
- *Methods of Enzymatic Analysis* edited by Hans-Ulrich. Bergmeyer. (1963). Section C: Measurement of enzyme activity. Chapter II: Methods. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. (Hans-Ulrich Bergmeyer. Verlag Chemie. GMBH. Weinheim/Bergstr). Academic Press. New York and London. Page 744-751.
- Mitchell A., Lhuguenot J., Bridges, Elcombe C. (1985a). Identification of the proximate peroxisome proliferators derived from di (2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 80: 23-32.
- Mitchell F., Price S., Hinton R., Grasso P., Bridges J. (1985b). Time and dose-responded study of the effects on rats of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 81: 371-392.
- Mizuguchi H., Kudo N., Ohya T., Kawashina Y. (1999). Effects of tiadenol and di (2-ethylhexyl) phthalate on the metabolism of phosphatidyl-choline and phosphatidylethanolamine in the liver of rats. *Biochem. Pharmacol.* 57: 869-876.
- Mocchiutti, N. and Bernal C. (1997). Effects of chronic Di (2-ethyl hexyl) Phthalate intake on the secretion and removal rate of triglyceride-rich lipoproteins in rats. *Food and Chem. Toxicol.* 35: 1017-1021.
- Moody D., Reddy J. (1978). Hepatic peroxisome (microbody) proliferation in rats fed plasticizers and related compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45: 497-504.
- Muoio D., Way J., Tanner C., Winegar D., Kliewer S., Houmard J., Kraus W., Dohm L. (2002a). Peroxisome proliferator.activated receptor- α regulates

fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells. *Diabetes* 51: 901-909.

- Muoio. D. Mc Lean P., Lang D., Li s., Houmard J., Way J., Winwgar D., Corton J., Dohm G., Kraus W. (2002b). Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α Knock-out mice. *J. Biol. Chem.*, 277, 29: 26089-26097.
- Mushtaq M., Srivastava S., Seth P. (1980). Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on glycogen metabolism in rat liver. *Toxicology* 16: 153-161.
- Nagasaki H., Tomii S., Mega T., Hirao K., Shinohara Y., Ito N. (1974). Chronic toxicity of dioctyl phthalate (DOP) in male rats and mice. *Journal-Nara Med. Association* 25: 649-654.
- Nair N., Kurup R. (1986). Investigations on the mechanism of the hypocoesterolemic action of diethylhexyl phthalate in rats. *Biochem. Pharmacol.* 35 (20): 3441-3447.
- Nazir D., Beroza M., Nair P. (1973). Di-2-ethylhexyl phthalate in bovine heart muscle mitochondria: its detection, characterization, and specific localization. *Environ. Health Perspect.* 3: 141-148.
- Nelson.D, Cox M. Lehninger. *Principios de Bioquímica.* (2001). 3ª. Edición. Ediciones Omega. Barcelona.
- Nerin C., Cacho J., Gancedo P. (1983). Plasticizers from printing inks in a selection of food packagings and their migration to food. *Food Addit. Contam.* 10: 453-460.
- Nilson-Ehle P., Schotz M. (1976). A stable, radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J. of Lipid Res.* 17: 536-541
- NTP 1986: National Toxicological Program. U.S. Department of Health and Human Services. NTP- CERHR Expert Panel Report on Di (2-ethylhexyl) phthalate.

- NTP 2000: National Toxicological Program. U.S. Department of Health and Human Services. NTP- CERHR Expert Panel Report on Di (2-ethylhexyl) phthalate.
- NTP 2005: National Toxicological Program. U.S. Department of Health and Human Services. Center for the evaluation of risks to human reproduction. NTP-CERHR expert panel update on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate.
- Ohno S., Fujii Y., Usuda N., Murata F., Nagata T. (1982). Peroxisome proliferation in rat kidney induced with DEHP. Numerical change by light microscopic morphometry. *Acta Histochem. Cytochem.* 15: 40-57
- Okita R., Chance C. (1984). Induction of laurate ω -hydroxylase by di(2-ethylhexyl) phthalate in rat liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121 (1): 304-309
- Olefky J. (1977). Insensitivity of large adipocytes to the antilipolytic effects of insulin. *J. Lipid Res.* 18: 459-464.
- Osumi T., Hashimoto T. (1978). Enhancement of fatty acyl/CoA oxidizing activity in rat liver peroxisomes by di(2-ethylhexyl) phthalate. *J. Biochem.* 83 (5): 1361-1365.
- Otake T., Yoshinaga J., Yanisawa J. (2004). Exposure to phthalate esters from indoor environment. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 14: 524-528.
- Ouerghi D., Rivest S., Richard D. (1992). Adrenalectomy attenuates the effects of chemical castration on energy balance in rats. *J. Nutr.* 122: 369-373.
- Pan DA, Mater M., Thelen A., Peters J., Gonzalez F., Jump D. (2000). Evidence against the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) as the mediator for polyunsaturated fatty acid suppression of L-pyruvate kinase gene transcription. *J. Lipid Res.* 41: 742-751.

- Pearson S. and Trissel L. (1993). Leaching of diethylhexyl phthalate from polyvinyl chloride containers by selected drugs and formulation components. *Am. J. Hosp. Pharmacol.* 50: 1405-1409.
- Peck C., Albro P. (1982). Toxic potential of the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate in the context of its disposition and metabolism in primates and man. *Environ. Health Perspect.* 45: 11-17.
- Peck C., Odom D., Friedman H., Albro P., Jass J., Brady J., Jess D. (1979). Di-2-ethylhexyl Phthalate (DEHP) and a Mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) accumulation in whole blood and red cell concentrates. *Transfusion* 19: 137-146.
- Peters J., Hennuyers N., Staels B., Fruchart J., Fievet C., Gonzalez F., Auwerx J. (1997). Alterations in lipoprotein metabolism in peroxisome proliferator-activated receptor α -deficient mice. *J. Biol. Chem.* 272: 27307-27312.
- Pollack G., Buchanan J., Slaughter R., Kholi R., Shen D. (1985a). Circulating concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate and its de-esterified phthalic acid products following plasticizer exposure in patients receiving hemodialysis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 79: 257-267.
- Pollack GM, Li R., Ermer J., Shen D. (1985b). Effects of route of administration and repetitive dosing on the disposition kinetics of di(2-ethylhexyl) phthalate and its mono-de-esterified metabolite in rats. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 79: 246-256.
- Poon R., Lecavalier P., Mueller R., Valli V., Procter B., Chu I. (1997). Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food and Chem. Toxicol.* 35: 225-239.
- Price S., Chescoe D., Grasso P., Wright M., Hinton R. (1988). Alterations in the thyroids of rats treated for long periods with di (2-ethylhexyl) phthalate or with hypolipidemic agents. *Toxicology Letters* 40: 37-46.

- Rao M., Reddy J. (1987). Peroxisome proliferation and hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 8: 631-636.
- Reddy J. (2004). Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biotic and Xenobiotic Sensing. Am. J. Pathol.* 164 (6): 2305-2321.
- Reddy J. Moody D., Azarnoff D., Rao M. (1976). Di(2-ethylhexyl) phthalate An industrial plasticizer induces hypolipidemia and enhances hepatic catalase and carnitine acyltransferase activities in rats and mice. *Life Sci.* 18: 941-946.
- Reddy J., Lalwani N. (1982). Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risks of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 12: 1-58.
- Reddy J. (2004). Peroxisome proliferators and peroxisome proliferators-activated receptor. *Am. J. of Pathol.* 164: 2305-2321.
- Reeves P., Forrest N., Fahey G. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American institute of Nutrition ad oc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* 123: 1939-1951.
- Reubsaet F., Veerkamp J., Brückwilder M., Frans Trijbels J., Monnens H. (1991) Peroxisomal oxidases and catalase in liver and kidney homogenates of normal and di(ethylhexyl) phthalate-fed rats. *Int. J. Biochem.* 23, 9: 961-967.
- Reubsaet F., Veerkamp J., Dirven H., Bruckwilder M., Hashimoto T., Trijbels J. and Monnens L. (1990). The effect of di (ethylhexyl) phthalate on fatty acid oxidation and carnitine palmitoyltransferase in various rats tissues. *Bioch. Biophys. Acta* 1047: 264-270.
- Rhodees C., Orton T., Pratt I., Batten P., Bratt H., Jackson S., Elcombe R. (1986). Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di(2-

ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man. *Environ. Health Perspect.* 65: 299-308.

- Rodbell M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J. Biol. Chem.* 239, nº2: 375-380.
- Rogers A., Dunn P. (1968). Intestinal perforation, exchange transfusion and PVC. *The Lancet* 2:1246.
- Rubin R., Jaeger R. (1973). Some pharmacological and toxicologic effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate (DEHP) and other plasticizers. *Environ. Health Perspec.*, January, 53-59.
- Rubin R., Ness P. (1989). What price progress? An update on vinyl plastic bags. *Transfusion* 29: 358-361.
- Rustan A., Hustvedt B., Drevon C. (1993). Dietary supplementation of very long-chain n-3 fatty acids decreases whole body lipid utilization in the rat. *J. Lipid Res.* 34: 1299-1309.
- Schmid P., Schalatter C. (1985). Excretion and metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate in man. *Xenobiotica* 15: 251-256.
- Schultz C., Rubin R., Hutchins G. (1975). Acute lung toxicity and sudden death in rats following the intravenous administration of the plasticizer, di (2-ethylhexyl) phthalate, solubilized with tween surfactants. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 33: 514-525.
- Sharma R., Lake B., Gibson G. (1988). Co-induction of microsomal cytochrome P-452 and the peroxisomal fatty acid β -oxidation pathway in the rat by clofibrate and di (ethylhexyl) phthalate. *Biochem. Pharmacol.* 37: 1203-1206.
- Sharman M., Read W., Castle L., Gilbert John. (1994). Levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and total phthalate esters in milk, cream, butter and cheese. *Food Additive and Contam.* 11, nº 3: 375-385

- Sharpe R. (2001). Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicol. Letters* 120: 221-232.
- Shea K., and the Committee on Environmental Health. (2003). Pediatric exposure and potential toxicity of phthalate plasticizers. *Pediatrics* 111 (6): 1467-1474.
- Sjoberg P., Egestad B., Klasson-Wheler E., Gustafsson J. (1991). Glucuronidation of mono (2-ethylhexyl) phthalate. Some enzyme characteristics and inhibition by bilirubin. *Biochem. Pharmacol.* 41: 1493-1496.
- Sjoberg P., Lindquist N., Ploen L. (1985). Effects of repeated intravenous infusions of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate in young male rats. *Toxicol.* 58: 78-83.
- Soria A., Chicco A., D'Alessandro E., Rossi A., Lombardo Y. (2002). Dietary fish oil reverse epididymal tissue adiposity, cell hypertrophy and insulin resistance in dyslipemic sucrose fed rat model. *J. Nutr. Biochem.* 13: 209-218.
- Specter S., Hamilton J., Stern J., Horwitz B. (1995). Chronic protein restriction does not alter energetic efficiency or brown adipose tissue thermogenic capacity in genetically obese (fa/fa) Zucker rats. *J. Nutr.* 125: 2183-2193.
- Steiner I., Scharf L., Fiala F., Washuttl J. (1998). Migration of di (2-ethylhexyl) phthalate from PVC child articles into saliva and saliva simulant by dynamic extraction. *Food Additive & Contaminants* 15: 812-817.
- Stringer R., Labunska I., Santillo D., Johnston P., Siddorn J., Stephenson A. (2000). Concentrations of phthalates esters and identification of other additives in PVC children's toys. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* 7: 1-10.
- Tan G. (1995). Residue levels of phthalate esters in water and sediment samples from the Klang River Basin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54: 171-176.

- Tanaka A., Adachi T., Takahashi T., Yamaha T. (1975). Biochemical studies on phthalic esters. Elimination, distribution and metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicol.* 4: 253-264.
- Teachey M., Taylor Z., Maier T., Saengsirisuwan V., Sloniger J., Jacob S., Klatt M., Ptock A., Kraemer K., Hasselwander O., Henriksen E. (2003). Interactions of conjugated linoleic acid and lipid acid on insulin action in the obese Zucker rat. *Metabolism* 52, 9: 1167-1174.
- Thomas J., Darby T., Wallin R., Garvin P., Martis L. (1978). A review of the biological effects of di (2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45, 1-27.
- Tomaszewski K., Derks M., Melnick R. (1987). Acyl CoA oxidase is the most suitable marker for hepatic peroxisomal changes by treatment of F344 rats with di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Letters* 37:203-212.
- Turner J., Petricciani J., Crouch M., Wenger S. (1974). An evaluation on the effects of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on mitotically capable cells in blood packs. *Transfusion* 14: 560-566.
- Villeneuve D., Franklin C., Chu I., Yagminas A., Marino I., Ritter L., Ruddick J. (1978). Toxicity studies on mono-2ethylhexyl phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 45, 250-251.
- Wang Y., Lee C., Tjep S., Yu R., Ham J., Kang H., Evans R. (2003). Peroxisome proliferators activated receptor δ activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 113: 159-170.
- Watt M., Southgate R., Holmes A., Febbraio M. (2004). Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α and δ and PPAR coactivator 1 α in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. *J. Mol. Endocrinol.* 33: 533-544.
- Weindenhoffer Z., Turek B., Mitera J. (1996). Xenobiotics in food: I. Metabolic phthalate degradation. *Cent. Eur. J. Public Health* 4: 11-15.

- Wieland O. (1974). Glycerol U.V. method. In methods of enzymatic analysis. Vol 4, H.U. Bergmeyer, editor. Academic Press, New York. 1404-1409.
- Winberg L., Badr M. (1995). Mechanism of phthalate-induced inhibition of hepatic mitochondrial β -oxidation. *Toxicol. Letters* 76: 63-69.
- Wong J., Gill S. (2002). Gene expression changes in mouse liver by di (2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 185: 180-196.
- Woodward K. (1990). Phthalate esters, cystic kidney in animals and possible effects on human health: A review. *Human Exp. Toxicol.* 9: 397-401.
- Yamagishi H., Okazaki H., Shimizu M., Izawa T., Komabayashi T. (2000). Relationships among serum triacylglycerol, fat pad weight, and lipolysis in iron-deficient rats. *J. Nutr. Biochem.* 11: 455-460.
- Yamazaki K., Kuromitsu J., Tanaka I. (2002). Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator-activated receptor agonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 1114-1122.
- Yanagita T., Kobayash K., Enomoto N. (1978). Accumulation of Hepatic Phospholipids in rats fed di (2-ethylhexyl) phthalate. *Biochem. Pharmacol.* 27: 2283-2288.
- Yanagita T., Satoh M., Nomura H., Enomoto N., Sugano M. (1987). Alteration of hepatic phospholipids in rats and mice by feeding DEHP and di(2-ethylhexyl)adipate. *Lipids* 22 (8): 572-577.
- Zacharewski T., Meek M., Clemons J., Wus Z., Fielden M., Matthews J. (1998). Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* 46: 282-293.
- Zhou S., Wallace K. (1998). The effect of peroxisome proliferators on mitochondrial bioenergetics. *Toxicol. Sci.* 48: 82-89.