

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Y

OBJETIVOS

1.- CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS LÍPIDOS DIETARIOS

Los lípidos son un amplio grupo de compuestos, en general solubles en solventes orgánicos y escasamente solubles en agua. Están compuestos por triglicéridos (TG), que bajo la forma de grasas y aceites son las principales formas de almacenar energía; fosfolípidos (FL) y esteroides, principales compuestos estructurales de las membranas biológicas, y otros, que se encuentran en cantidades relativamente pequeñas y desempeñan funciones muy importantes como cofactores de enzimas, pigmentos, agentes emulsificantes en el tracto digestivo, mensajeros intra y extracelulares, etc.

La mayoría de los lípidos muestran como componente común los ácidos grasos (AG). En algunos casos, éstos se encuentran totalmente saturados (no contienen dobles enlaces), en otros presentan uno o más enlaces dobles o insaturaciones. Los AG más comunes presentan números pares de átomos de carbono (entre 12 y 24), formando una cadena no ramificada o lineal. Muchos AG de tipo poli-insaturado (PUFA) pertenecen a diferentes series o familias, que pueden ser n-9, n-6 y n-3. El que un AG pertenezca a una u otra depende de que tenga el doble enlace contando a partir del grupo metilo en la posición 9, 6 o 3. Los AG n-9 derivan del ácido oleico, los n-6 del ácido linoleico y los n-3 del ácido α -linolénico.

Los TG son lípidos simples, y son los principales componentes de las grasas presentes en los alimentos; contienen AG con diferente longitud de cadena y grado de insaturación. Las grasas dietarias cumplen un rol nutricional muy importante proveyendo energía, componentes estructurales, transportando vitaminas liposolubles y suministrando AG esenciales, que son precursores de eicosanoides, biomoduladores de funciones celulares e inmunológicas. Asimismo, tienen efectos sobre diversos procesos normales y patológicos, impactando en la regulación de los

niveles de lípidos plasmáticos, la función inmune, la acción de la insulina, el desarrollo neuronal, la función visual y el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, obesidad, aterosclerosis, ciertos tipos de cánceres, etc. El tipo de AG dietario es el principal determinante de las propiedades biológicas de los aceites. En consecuencia, muchas de estas propiedades o funciones quedan determinadas por la longitud de cadena, el número de insaturaciones y la isomería, (configuracional y/o posicional) que presentan los AG que constituyen los TG dietarios.

Los efectos bioquímico-nutricionales de los AG han sido extensamente investigados, particularmente el efecto de los AG saturados, mono-insaturados y PUFAs de las series n-3 y n-6 con configuraciones naturales *cis*. Durante los últimos años, han sido objeto de gran atención los efectos bioquímicos de los AG isoméricos abriendo un campo científico-nutricional especial, principalmente por la potencial repercusión sobre la salud.

2.- CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS ISÓMEROS DE ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos insaturados pueden presentar isomería geométrica y/o posicional. Casi todos los que se encuentran en la naturaleza poseen configuración geométrica *cis*. Se habla de configuración *cis*, cuando el hidrógeno que poseen cada uno de los dos carbonos implicados en la insaturación están situados en el mismo plano, uno respecto al otro. La configuración *trans* se da cuando el hidrógeno de los carbonos involucrados en el doble enlace están situados en diferente plano, uno respecto al otro.

La isomería posicional implica la translocación del doble enlace al carbono adyacente, perdiéndose así el grupo metilénico en el caso del ácido linoleico. Los AG

que se encuentran en la naturaleza poseen mayoritariamente dobles enlaces que están en forma no conjugada, o sea, separados por un grupo metileno (Fig. 1).

A su vez, los dobles enlaces conjugados pueden adoptar una configuración geométrica *cis* o *trans*, existiendo de esta forma isomerías combinadas.

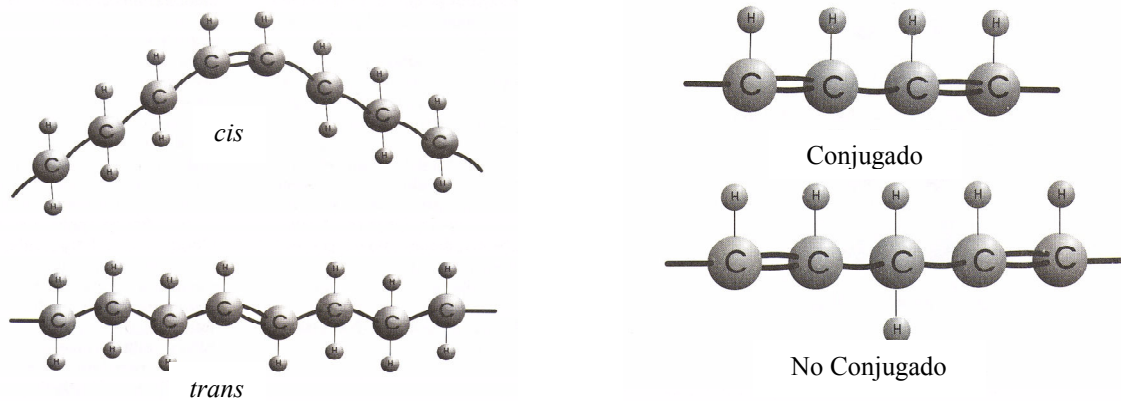


Figura 1: distintos tipos de isomería que pueden presentar los ácidos grasos.

Alteraciones en la estructura de los AG por isomería podrían afectar el metabolismo teniendo alta repercusión en la salud. Mientras que los ácidos grasos *trans* (AG-*t*) son cada vez más conocidos a expensas de sus efectos deletéreos sobre la salud humana, un nuevo isómero sale a la luz a raíz de sus supuestos efectos benéficos: los Conjugados del Ácido Linoleico (CLA). Por deficiencia, los CLA son AG dienoicos derivados del ácido linoleico, que se caracterizan por modificaciones isoméricas posicionales (9,11 ó 10,12) y geométricas (*cis/trans*) de sus dobles enlaces. Los mismos son generados por las bacterias del rumen y colónicas, por ello se encuentran naturalmente en la carne de rumiantes, leche y productos lácteos derivados, y también en menor proporción pueden ser formados durante el proceso de obtención de los aceites comestibles (Chin y col, 1992). Existen potencialmente 8 isómeros CLA, pero el *c9,t11*-CLA y el *t10,c12*-CLA son los más importantes (Figura 2).

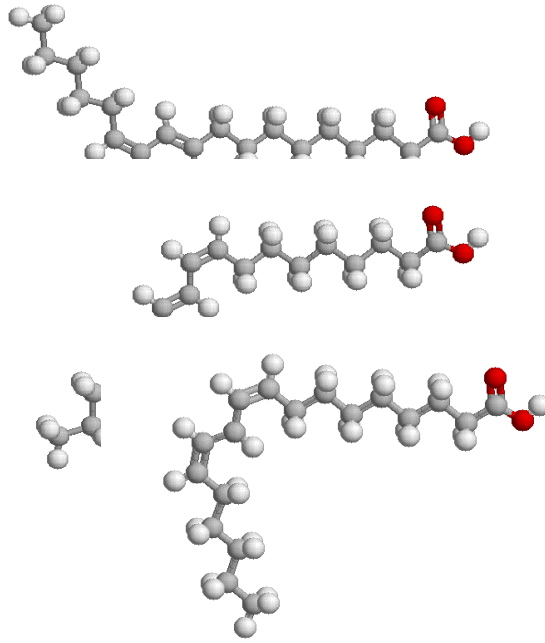


Figura 2: estructuras químicas de los isómeros *t10,c12*-CLA (superior), *c9,t11*-CLA (medio), y del ácido linoleico (inferior).

La historia de los CLA se remonta a los años '30, cuando se demostró que los AG provenientes de la manteca presentaban absorción a 230 nm, indicando la presencia de dos dobles enlaces conjugados. Pero no fue hasta el advenimiento de la cromatografía gas-líquido que Parodi y colaboradores pudieron determinar el perfil de ácidos grasos de la grasa láctea y así cuantificar algunos isómeros CLA, incluyendo el *c9,t11*-CLA, también llamado ácido ruménico. El punto de inflexión en la historia de los CLA se debe a los estudios de Michael Pariza en el año 1979, que revelaron la actividad inhibidora de la mutagénesis en extractos de carne grillada (Pariza y col, 1979). Trabajos subsiguientes establecieron que este extracto poseía actividad anticarcinogénica y que el principio activo eran los CLA (Ha y col, 1987). A partir de este descubrimiento, se han reportado numerosos efectos benéficos sobre la salud en diferentes aspectos metabólicos, siendo el principal su capacidad de reducir los depósitos grasos y aumentar la masa corporal magra (Pariza y col, 2001; Belury y Kempa-Steczko, 1997).

2.A.- PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Los AG-*t* presentan una conformación espacial lineal que hace que, en ciertos aspectos químicos y biológicos, estos isómeros se asemejen a los AG saturados. La configuración espacial que presentan los AG *cis* es doblada, mientras que en los AG-*t* y en los saturados ésta es lineal, lo que permite un empacamiento muy unido de las cadenas hidrocarbonadas, con el consecuente aumento del punto de fusión. Además, los enlaces *trans* son termodinámicamente más estables que los enlaces *cis*, y como consecuencia, son químicamente menos reactivos. Por esta razón las reacciones de isomerización favorecen la formación de isómeros *trans* y éstos son menos susceptibles a reacciones de auto-oxidación iniciadas por radicales libres (Allison y col, 1995).

En el caso de los CLA, se los puede considerar una grasa *trans* que no presenta las propiedades físico-químicas de estos últimos. Su configuración espacial, gracias a la ausencia del grupo metileno entre ambos dobles enlaces, es muy similar a la de los AG con isomería sólo *cis*, lo que disminuye su punto de fusión. Además, a diferencia de los demás ácidos grasos *trans* encontrados en la dieta humana, los CLA aparecen en forma natural. Por ello, en los EE.UU los enlaces *trans* en un sistema conjugado no son considerados como tales para propósito de regulaciones y rotulado alimentario.

2.B.- FUENTES ALIMENTARIAS

Los AG-*t* se encuentran en una proporción relativamente baja en productos naturales, siendo en este caso el principal aporte la biohidrogenación por las bacterias del rúmen de animales poligástricos. No obstante, los aceites parcialmente hidrogenados obtenidos industrialmente son la mayor contribución en una dieta corriente. El contenido de AG-*t* en los alimentos puede llegar a ser muy variado,

alcanzando máximos del 50% de los AG totales en margarinas, shortenings y grasas de panificación (Allison y col, 1995).

Los CLA presentes en los alimentos de origen animal consisten en aproximadamente 80% de *c9,t11*-CLA (Parodi, 1997). En cambio, los CLA producidos industrialmente a partir de aceites vegetales comerciales guardan una proporción isomérica *t10,c12*-CLA; *c9,t11*-CLA y otros CLA de 43; 43 y 14% respectivamente (Ma, 1999). El contenido de CLA en la leche de vaca es de aproximadamente 4 a 20 mg/g de grasa, dependiendo de la alimentación del animal, mientras que en los aceites vegetales su contenido es muy variado. En la tabla 1 se puede observar el contenido de CLA en diversos alimentos (Rainer y Heiss, 2004).

Los CLA también se encuentran actualmente en el mercado bajo la forma de suplementos dietarios, que se venden a nivel mundial como ayuda para bajar de peso, especialmente *via* Internet, aunque, como veremos, sus resultados no están aun completamente comprobados en humanos.

	Alimento	mg CLA/g lípidos
Lácteos	Leche Condensada	7,0
	Ricota	5,6
	Leche Homogeneizada	5,5
	Mozzarella	4,9
	Yogurt	4,8
	Manteca	4,7
	Queso Parmesano	3,0
	Carnes	Cordero
	Vaca	4,3
	Pollo	0,9
	Salmón	0,3
Aceites Vegetales		0-0,7

Tabla 1: contenido de CLA en alimentos de diversos orígenes (tomado de Rainer y Heiss, Dietetic Assoc. 2004)

2.C.- CONSUMO A NIVEL POBLACIONAL

Se han realizado varios estudios para estimar el consumo de *AG-t* en la población de varios países del mundo. La evaluación del contenido de *AG-t* en la dieta de la población norteamericana indica que éste es uno de los más elevados: los *AG-t* representan un 5-6% de la grasa total ingerida (Allison y col, 1995). Resultados similares fueron observados en otras poblaciones (Mozaffarian y col, 2007).

Diversos autores han estudiado el consumo de CLA a nivel poblacional. La ingesta de CLA se da fundamentalmente a través de alimentos de origen natural; principalmente los productos lácteos, seguido por las carnes, razón por la que se consume mayoritariamente el isómero *c9,t11*-CLA (Ritzenthaler y col, 2001). Los niveles son superiores en los países de Europa del Norte (Alemania: 400 mg/día) e inferiores en los países mediterráneos (150 mg/día), mientras que en Estados Unidos no llega a 200 mg/día (Martins y col, 2007). Al momento no hay datos referidos al consumo de CLA en la población de América Latina.

2.D.- SÍNTESIS DE ISÓMEROS CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO (CLA)

2.D.1.- Biosíntesis

El isómero *c9,t11*-CLA es el que se genera principalmente en el rumen durante la biohidrogenación microbiana de los ácidos linoleico y linolénico a través de un mecanismo enzimático que muestra propiedades inusuales (Figura 3). Luego de su formación, el isómero *c9,t11*-CLA puede ser directamente absorbido o ser metabolizado (biohidrogenado) por microorganismos del rumen a ácido *t11*-octadecenoico o vaccénico, el cual luego de su absorción puede ser convertido por la enzima Δ^9 desaturasa, también llamada Esteroil-CoA Desaturasa-1 (SCD-1), de nuevo en *c9,t11*-CLA. Esta parece ser la principal vía en la formación de *c9,t11*-CLA en la leche de vaca y en otros tejidos. Se desconoce el origen de los otros isómeros CLA que están presentes en forma natural en la leche, pero es probable que también deriven del metabolismo bacteriano del rumen (Pariza y col, 2001, Bauman y col, 2000).

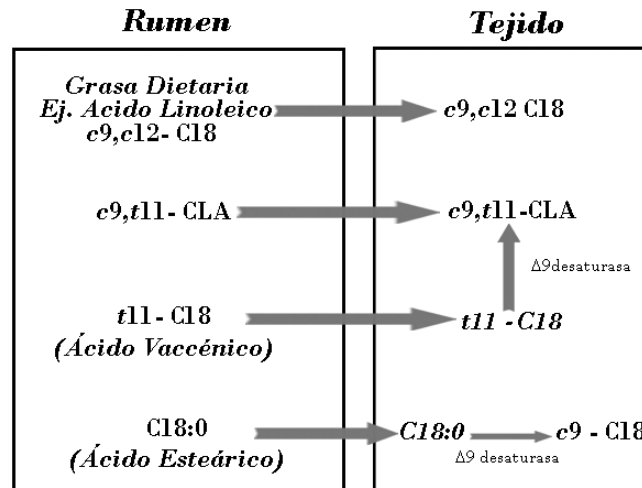


Figura 3: vías de síntesis de $c9,t11$ -CLA en rumen y en tejidos. (tomado de Bauman y col. Proc. Am. Soc. Anim. Sci. 2000).

2.D.2.- Síntesis química

Existe en la actualidad un interés creciente en la producción de CLA para su uso en alimentos y suplementos dietarios a causa de sus posibles efectos benéficos. Así, el objetivo de la síntesis química es producir CLA de composición caracterizada con máxima actividad biológica. Para ello, se han desarrollado métodos de laboratorio para convertir el ácido linoleico en una mezcla de CLA que contenga principalmente los isómeros $c9,t11$ -CLA y $t10,c12$ -CLA. La cantidad de cada isómero que se obtiene en los procesos industriales varía dependiendo de las condiciones del proceso. Como se puede ver en la figura 4, para la obtención de CLA se parte de aceites ricos en ácido linoleico, ya sea en la forma de TG, AG, ésteres de ácidos grasos, etc, y la concentración de CLA en el producto final depende en forma directa de la cantidad de ácido linoleico que contenga el material iniciador. La preparación se realiza por isomerización bajo condiciones alcalinas en presencia de un catalizador generalmente metálico (Bernas y col, 2003). El uso de estas preparaciones comerciales ha permitido la identificación de los roles específicos de los diferentes isómeros CLA en distintos aspectos

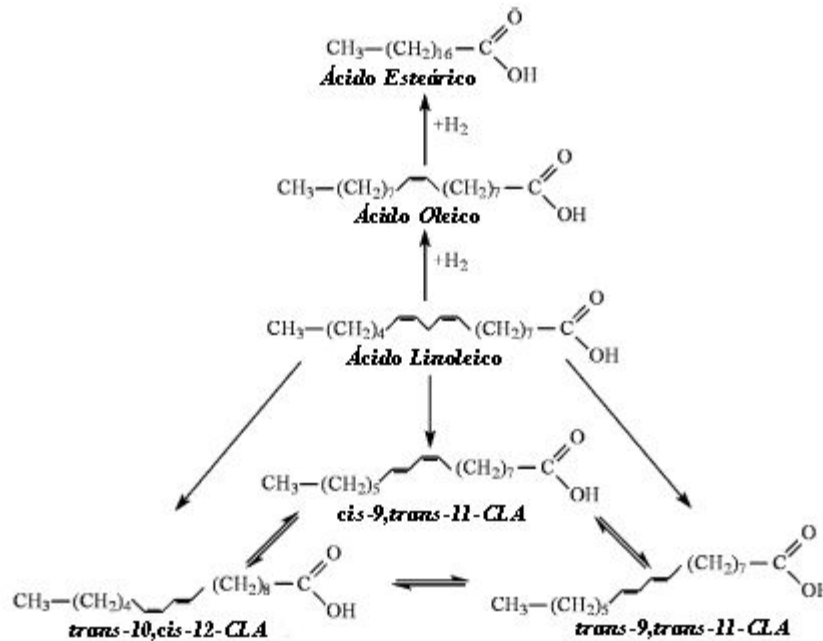


Figura 4: esquema de la reacción de isomerización e hidrogenación del ácido linoleico para la síntesis química de CLA (tomado de Bernas y col, Applied Catalysis A 2003).

3.- EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CLA

Las modificaciones estructurales que genera la isomería y las posibles alteraciones sobre propiedades físicas y químicas pueden producir:

- ✓ Cambios a nivel de membranas celulares
- ✓ Anormal metabolización de los AG
- ✓ Competencia con los sustratos naturales o inhibición de enzimas claves en distintas vías metabólicas

Además, los isómeros pueden actuar como sustratos alternativos en la síntesis de PUFAs de las series n-3 y n-6, llevando a la formación de eicosanoides sin actividad biológica o con actividades biomoduladoras opuestas o desconocidas. Por consiguiente, los isómeros de AG podrían generar alteraciones en la metabolización normal de los mismos, en las propiedades de membranas celulares y en la síntesis de

mediadores biológicos que tendrían impacto en varios aspectos metabólicos, produciendo profundas alteraciones.

Los numerosos efectos que se le atribuyen a los CLA generan a primera vista una pregunta: ¿cómo puede una sola sustancia ejercer tantos efectos? Gran parte de la respuesta subyace en el hecho de que el término CLA hace referencia a un conjunto de isómeros. Sin embargo, los efectos son atribuidos a sus dos isómeros principales: *t10,c12*-CLA y *c9,t11*-CLA.

Es conocido que los CLA poseen especificidad isomérica sobre diferentes efectos biológicos. Ha sido sugerido que el isómero *t10,c12*-CLA puede tener mayor efecto sobre el descenso en la grasa corporal (Pariza y col, 2000, Belury y col, 1997) y el isómero *c9,t11*-CLA efectos benéficos sobre el perfil de lípidos plasmáticos (Vaille y col, 2004), el crecimiento (Blankson y col, 2000, Ostrowska y col, 1999) y preventivos en cáncer (Ip y col, 1997, Yang y col, 2002). Los CLA han sido identificados como ligandos activadores del receptor nuclear de proliferadores peroxisomales- α (PPAR- α), siendo el isómero *c9,t11*-CLA ligeramente más potente que el *t10,c12*-CLA (Moya-Camarena y col, 1999, Muzio y col, 2007), mecanismo por el cual se podrían explicar muchos de sus efectos a nivel hepático. Con respecto a otro tejido blanco de los CLA, el tejido adiposo, donde predominan los receptores PPAR- γ , se han obtenido resultados dispares; algunos autores aseveran que los CLA pueden actuar como potentes ligandos activadores (Houseknecht y col, 1998), aunque actualmente otros autores le asignan una función antagonista, disminuyendo así la diferenciación de los adipocitos (Granlund y col, 2005; Miller y col, 2007).

Otra particularidad con respecto a los efectos biológicos de los CLA es que se ha observado una fuerte diferencia en la susceptibilidad a estos isómeros por parte de distintas especies. Así, la especie más susceptible han demostrado ser los ratones, seguidos por los hamsters y luego por las ratas (Kim y col, 2002). Las diferencias se han observado en distintos aspectos, ya sea en la variación de la composición

corporal, el perfil lipídico o la respuesta frente a los CLA que muestran los PPAR de las distintas especies (Moya-Camarena y Belury, 1999)

Los estudios de los efectos de los CLA sobre la salud humana son escasos y controversiales por su difícil interpretación, debido al tipo de CLA utilizado, la dosis, duración y características de los sujetos estudiados. Se han realizado estudios de corto y largo plazo, en adultos sanos y obesos, sedentarios o no. Algunos han mostrado efectos benéficos de los CLA disminuyendo la masa grasa sin afectar el peso corporal (Thom y col, 2001; Gaullier y col, 2005) o disminuyendo los niveles de lípidos plasmáticos (Noone y col, 2002), otros no han observado ningún efecto beneficioso sobre perfil lipídico (Petridou y col, 2003) ni composición corporal (Desroches y col, 2005) y varios han encontrado efectos adversos como aumento de marcadores de inflamación y stress oxidativo (Riserus y col, 2004, Poirier y col, 2006) o disminución de la sensibilidad a la insulina (Riserus y col, 2002). Los resultados encontrados en animales no se han visto reflejados en humanos. Más investigaciones a nivel experimental ameritan ser realizadas en personas adolescentes y adultas.

3.A- CLA Y CARCINOGENESIS

En animales de experimentación se ha demostrado una actividad preventiva de los CLA sobre el cáncer en distintos tejidos, principalmente de mamas. Se han realizado muchos estudios tanto en animales como en líneas celulares que indican los efectos benéficos de los CLA sobre el cáncer de mamas, pero en humanos no se ha establecido todavía una asociación directa entre los CLA dietarios y este tipo de cáncer (Chujo y col, 2003, Aro y col, 2000). Con respecto al cáncer de colon, se ha observado que ambos isómeros, en particular el *tl0,c12*-CLA, pueden prevenirlo (Cho y col, 2005). Sin embargo, la falta de estudios en humanos impide recomendarlos como terapia para dicha enfermedad (Larsson y col, 2005).

3.B- EFECTOS SOBRE EL PESO CORPORAL Y LA INGESTA ENERGÉTICA

Se ha comprobado en ratones que la ingesta de CLA se asocia con una disminución en el peso corporal, siendo las hembras más susceptibles que los machos (Park y col, 1997). Este efecto fue provocado por la ingesta de mezcla de isómeros (Belury y col, 1997) o por el isómero *t10,c12*-CLA, en forma independiente de la ingesta energética (Warren y col, 2003). Sin embargo, no se observaron cambios en estos parámetros en ratas alimentadas con la mezcla ni con los isómeros individuales (Patureau Mirand y col, 2004, Park y col, 2005a).

3.C- EFECTOS SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

3.C.1.- Disminución del tejido adiposo y aumento de la masa corporal magra

Park y col. (1997) fueron los primeros en demostrar que animales alimentados con CLA redujeron el contenido de grasa corporal e incrementaron la retención de proteínas corporales. Dichos efectos podrían deberse, en parte, a un incremento en la eficiencia del alimento, acompañado de una reducida deposición grasa, incrementada lipólisis en adipocitos, y a una aumentada oxidación de AG en músculo y adipocitos. La capacidad del isómero *t10,c12* CLA para inducir cambios en la composición corporal se debería en parte a que este isómero genera una disminución en la captación de lípidos por el adipocito como consecuencia de sus efectos sobre las enzimas SCD-1 y lipoproteína lipasa (LPL) (Fig. 5). Además, los cambios en la masa de tejido adiposo marrón y blanco de ratones alimentados con CLA son acompañados por alteraciones en la expresión genética de las proteínas reguladoras del metabolismo energético (UCP, proteínas desacoplantes) en tejido adiposo y músculo esquelético (Takahashi y col 2002). Por otro lado, en animales de experimentación ha sido demostrado que uno de los mecanismos ejercidos por los

CLA para disminuir la grasa corporal es a través de ciertos efectos adversos como apoptosis del adipocito (Tsuboyama-Kasaoka y col 2000).

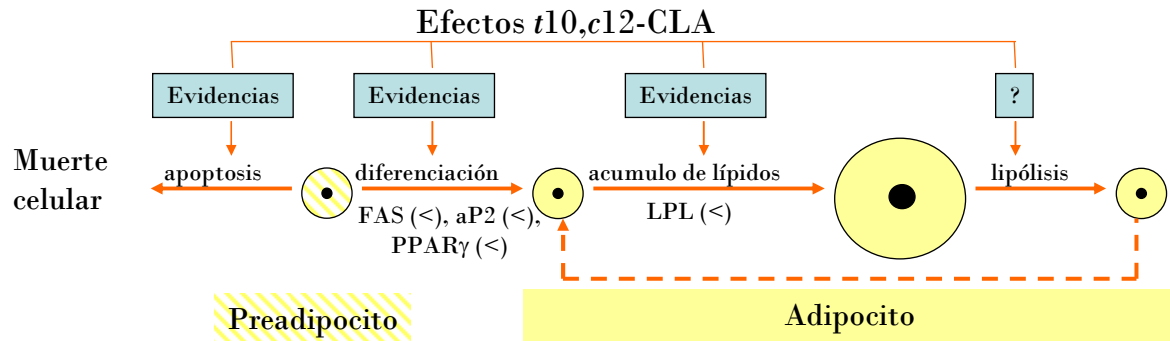


Figura 5: efectos del isómero $t10,c12$ -CLA sobre adipocitos y preadipocitos (tomado de Pariza y col. Progress in Lipid Research 2001).

3.C.2.- Efectos sobre el músculo esquelético

Evidencias de la acción de los CLA sobre músculo esquelético se limitan a reportes en los cuales se ha visto incrementada la actividad de la enzima Carnitin-Palmitoil-Transferasa-1 (CPT-1), en músculo de ratones alimentados con CLA, con el consiguiente aumento de la β -oxidación (Park y col 1997). Los mismos autores (Pariza y col, 2000) han propuesto que la masa muscular podría preservarse o incluso aumentarse como consecuencia de cambios inducidos por los CLA sobre la regulación y/o acción del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleuquina-1 (IL-1), citoquinas que afectan profundamente el catabolismo muscular y la respuesta inmune (Fig. 6). Además, Butz y col (2006) demostraron que los CLA, afectando la producción de eicosanoides y citoquinas, podrían prevenir la pérdida de peso y el catabolismo muscular que acompaña a la administración de endotoxinas y a otras enfermedades. Así, estas teorías indicarían una posible conexión entre el aumento de la masa corporal magra y la función inmune.

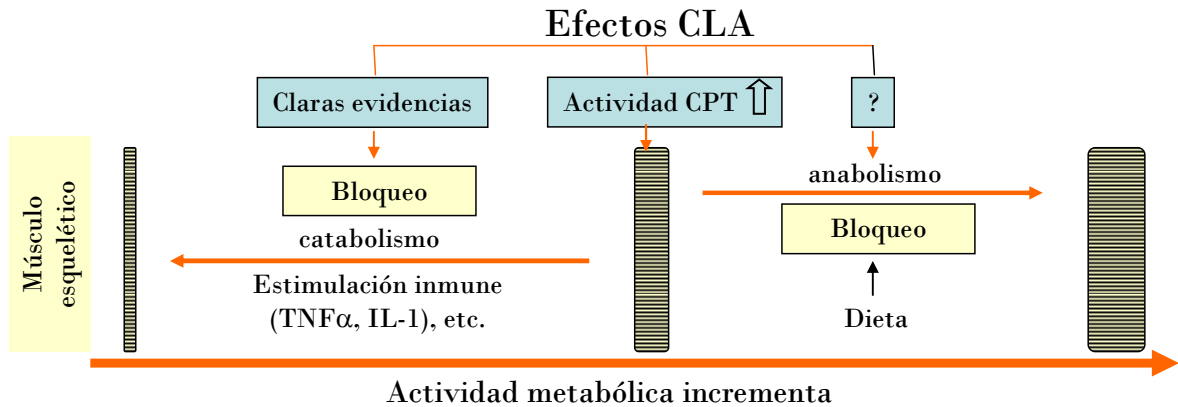


Figura 6: efectos del isómero *t10,c12*-CLA sobre músculo esquelético (tomado de Pariza y col. Progress in Lipid Research 2001).

3.D- CLA Y METABOLISMO DE LÍPIDOS

3.D.1.- Efectos sobre los lípidos hepáticos

El hígado es el principal órgano en el cual se han evidenciado los potenciales efectos adversos de los CLA sobre la salud (Larsen y col, 2003, Navarro y col, 2005). Si bien los resultados reportados son controversiales, ha sido demostrada una considerable acumulación de lípidos en el hígado (Belury y Kempa-Stecko, 1997, Wendel y col, 2008), lo que podría deberse a que el hígado es un tejido blanco para los CLA (Pariza y col, 2001). Existen evidencias de estudios en ratones que el isómero *t10,c12*-CLA puede producir hipertrofia hepática por redistribución de los depósitos de grasa que se asemeja a la lipodistrofia (Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000).

A través de diferentes mecanismos los CLA pueden afectar el metabolismo lipídico. En microsomas hepáticos de ratas, Bretillon y col (1999) demostraron que la actividad $\Delta 6$ desaturasa en hígado fue inhibida a altas dosis de *c9,t11*-CLA y de *t10,c12*-CLA, mientras que a bajas dosis solo el isómero *c9,t11*-CLA decreció dicha actividad enzimática. Además, notoriamente la actividad SCD-1 fue inhibida solo

con *t10,c12*-CLA. También fue hallado un notorio incremento en la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis hepática de AG (Takahashi y col, 2003)

3.D.2.- CLA, lípidos plasmáticos y aterosclerosis

Con respecto a los lípidos plasmáticos se han encontrado resultados dispares. En hamsters hipercolesterolémicos, los CLA redujeron los niveles de colesterol total y TG (Nicolosi y col, 1997), y en ratas alimentadas con 3% de CLA se encontró una disminución en el colesterol ligado a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-C), sin efectos en el colesterol ligado a las lipoproteínas de baja (LDL-C) y alta densidad (HDL-C) (Stangl y col, 2000). En ratones alimentados con CLA se evidenciaron aumentos en los niveles de HDL-C y disminución en el colesterol total y TG plasmáticos (Lee y col, 2005). No obstante, deDeckere y col (1999) reportaron que la mezcla de isómeros y el *t10,c12*-CLA, pero no el *c9,t11*-CLA, disminuyeron los niveles de LDL-C y HDL-C, pero incrementaron la fracción VLDL-C, sugiriendo que el isómero *t10,c12*-CLA sería el responsable de alterar el perfil lipídico.

En conejos alimentados durante 12 semanas con 0.5% de CLA con una dieta conteniendo 14 % de grasa y 0.1% de colesterol fue demostrado un efecto inhibitorio sobre el desarrollo de placas de aterosclerosis en aorta, asociado a un descenso en los niveles plasmáticos de TG, colesterol total y LDL-C, sin modificaciones en la fracción HDL-C (Lee y col, 1994). En otro estudio (Kritchevsky y col, 2004) en el que se administraron ambos isómeros por separado se encontró una disminución de la aterosclerosis, de igual magnitud en ambos grupos.

En hígados de ratas alimentadas con 1% de CLA se observó una elevada producción de cuerpos cetónicos, con elevada relación β -OH-butirato/acetoacetato, asociados a una menor secreción de TG y colesterol (Sakono y col, 1999). Así pareciera que los CLA ejercerían su efecto hipolipidémico, al menos en parte, por un

incremento en la β -oxidación de los AG y una mayor esterificación en el hígado. Con respecto a la secreción de VLDL por parte del hígado, también se han obtenido resultados diversos. En estudios en cultivos de células se encontró disminuida, (Lin y col, 2001), mientras que trabajos en ratones (Degrace y col, 2003) encontraron aumentado este parámetro, pero asociado a valores bajos de TG. La disparidad de los resultados justifica clarificar los efectos específicos.

3.D.3.- CLA y stress oxidativo

Los radicales libres son intermediarios de ciertas reacciones redox esenciales para el mantenimiento de la vida. La membrana celular separa el metabolismo citoplasmático del ambiente externo, y contiene una cantidad relativamente elevada de PUFAs, que en presencia de un iniciador de radicales libres y oxígeno, son muy lábiles a la oxidación. Este proceso, conocido como lipoperoxidación (LPO), es una reacción degenerativa biológica, y puede ser importante en procesos in vivo. La membrana es potencialmente más susceptible a la LPO por radicales libres que los componentes citoplasmáticos, y una LPO descontrolada puede asociarse a la pérdida de AG esenciales y a la formación de hidroperóxidos tóxicos u otros productos secundarios. La pérdida de AG esenciales puede causar grandes disturbios en la estructura de las membranas biológicas y afectar su permeabilidad y función, y a su vez los hidroperóxidos formados pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, causando daños irreversibles en la célula a causa del stress oxidativo.

En vista del potencial daño que pueden causar los radicales libres y los hidroperóxidos, y el posible efecto directo de varios oxidantes sobre los componentes celulares, es importante que la célula contenga sistemas de defensa. Los mecanismos antioxidantes clave actúan a través de scavengers de radicales libres como la vitamina E y de la detoxificación de los hidroperóxidos formados.

Entre estos últimos se destaca la acción de enzimas como glutathion peroxidasa (GSH-Px) y catalasa.

La GSH-Px es capaz de reducir al peróxido de hidrógeno, y es uno de los principales mecanismos para la protección de componentes celulares de los efectos deletéreos de los hidroperóxidos. La acción de la GSH-Px depende de la disponibilidad de glutathion reducido (GSH). El nivel de GSH es mantenido por la reducción del glutathion oxidado mediante la enzima glutathion reductasa utilizando NADPH como cofactor. El GSH es un tripéptido, y es el principal compuesto sulfhidrilo no proteico en los tejidos. Además de ser sustrato de la GSH-Px, el GSH es el principal compuesto antioxidante celular, y es necesario para mantener la forma reducida de los grupos sulfhidrilo de varias moléculas involucradas en diversas funciones celulares.

La catalasa se encuentra en casi todos los tejidos animales, encontrándose la actividad más alta en glóbulos rojos e hígado. El peróxido de hidrógeno formado en varias reacciones metabólicas oxidativas es degradado por la catalasa, protegiendo así a los componentes celulares del daño oxidativo.

Los CLA, al afectar la β -oxidación de AG, pueden alterar el equilibrio entre la generación de LPO y el contenido celular de depuradores de radicales libres, modificando la vulnerabilidad de las células a la injuria oxidativa y de este modo afectando el hígado. Además, los CLA podrían modular la composición de AG de las membranas celulares, ya sea incorporándose a las mismas o desplazando a otros PUFAs, alterando así la susceptibilidad de la membrana a la LPO. Se han encontrado en la bibliografía diferentes resultados en este aspecto: en células de cultivo, Arab y col (2006) encontraron que los CLA aumentan la producción de GSH, previniendo el incremento de los niveles de LPO, ejerciendo de este modo una acción protectora sobre la célula, y Kim y col (2005) encontraron que los CLA aumentan la estabilidad oxidativa en plasma e hígado de ratas deficientes en vitamina E. Sin embargo, otros autores (Bergamo y col, 2004; Devery y col, 2001), plantearon la hipótesis de que los CLA podrían generar radicales libres e incluso

aumentar los niveles de LPO. Estos resultados discordantes entre sí merecen mayores estudios.

3.D.4.- CLA, ácido araquidónico y eicosanoides

Los eicosanoides son mediadores biológicos cuya estructura deriva de los ácidos araquidónico (AA) y eicosapentaenoico (EPA). Poseen variados efectos sobre diversos tejidos: están involucrados en la función reproductiva, en inflamación y respuesta inmune, entre otros. Belury y Kempa-Stecko (1997) determinaron que los CLA son incorporados en los lípidos neutros y FL hepáticos de ratones a expensas de desplazar a los ácidos linoleico y araquidónico. Por otro lado, se ha sugerido que la ingesta de CLA podría inhibir la síntesis de AA y sus eicosanoides derivados, lo cual puede decrecer la esterificación a TG e incorporación en FL que son críticos para el metabolismo celular, y/o síntesis de lípidos segundos mensajeros (Banni y col, 1999). Alternativamente, los CLA podrían ser desaturados y elongados y luego metabolizados para producir diferentes eicosanoides derivados de los CLA y otros mediadores que tendrían actividades biológicas por sí mismos (Banni y col, 2004). Por consiguiente, los CLA pueden decrecer las señales celulares derivadas del AA tales como las prostaglandinas y leucotrienos que son críticos reguladores del crecimiento, diferenciación y metabolismo celular.

3.E- EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LOS CLA

Se ha demostrado que los CLA poseen actividad antiinflamatoria en cerdos de guinea y ratas, y que mejoran el cuadro de enfermedades asociadas a inflamación, incluyendo atenuación del desarrollo de lesiones inflamatorias inducidas por infección bacteriana en cerdos (Changhua y col, 2005). Tanto en estudios *in vivo* como *in vitro*, se ha demostrado que los CLA poseen efectos

mediadores sobre la producción de citoquinas y prostaglandinas, lo cual podría influenciar la respuesta inflamatoria. Estudios en líneas celulares y en animales han demostrado que los CLA inhiben la producción de PGE₂ y óxido nítrico, con la consiguiente disminución de la inflamación (Yu y col 2002, Lai y col 2005).

3.F- EFECTO DE LOS CLA SOBRE RESISTENCIA INSULÍNICA

Houseknecht y col (1998) aportaron las primeras evidencias de que los CLA son capaces de normalizar la tolerancia a la glucosa disminuida y la hiperinsulinemia en ratas pre-diabéticas. Otro estudio en un modelo animal similar (Ryder y col, 2001) arrojó los mismos resultados, además de una disminución de los niveles de glucosa e insulina en ayuno. También en el mismo estudio se evaluaron los efectos de la administración de *c9,t11*-CLA, que no afectó estos parámetros, sugiriendo que el isómero *t10,c12*-CLA sería el involucrado en los efectos benéficos de los CLA sobre la resistencia insulínica, resultados confirmados por Henriksen y col (2003). Trabajos en ratones (Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000) demostraron que la ingesta de CLA se vio acompañada de varios síntomas de diabetes lipoatrófica como resistencia a la insulina, y en otro estudio en ratones obesos, la ingesta de *t10,c12*-CLA elevó los niveles de glucosa e insulina séricas e indujo resistencia insulínica (Roche y col, 2002). Otro trabajo en el mismo modelo animal (Wargent y col, 2005) hace referencia a que la duración del tratamiento también tiene importancia, sugiriendo que aunque inicialmente la ingesta de CLA puede causar efectos negativos sobre la resistencia a la insulina, la ingesta durante un largo plazo podría mejorar la sensibilidad a la insulina. En conclusión, los estudios que evalúan los efectos de los CLA sobre la resistencia a la insulina tienen diferencias según el tiempo de duración, estado metabólico del animal y especie utilizada, llevando así a diferentes conclusiones según el modelo utilizado.

3.G- EFECTO DE LOS CLA SOBRE LA REPRODUCCIÓN

Ha sido demostrado que la cantidad (Shaw y col, 1997) y el tipo (Song y col, 2005) de grasa dietaria afectan la respuesta inmune. En efecto, la proliferación linfocitaria, la síntesis de citoquinas, la actividad de las células natural killer y macrófagos, parámetros fundamentales para mantener la integridad del organismo, se ven considerablemente afectados por la composición de los lípidos en la dieta más que por la cantidad en sí (Ostrowska y col, 1999). Los mecanismos involucrados no han sido aún esclarecidos totalmente, pero podrían estar relacionados a los efectos que los AG ejercen sobre la fluidez de las membranas celulares, producción de eicosanoides y mecanismos de apoptosis celular (Goodwin y col, 1983, De Pablo y col, 2000).

Las citoquinas son mediadores de la respuesta inmune y la inflamación, producidas por macrófagos y otras células inmunes cuando son estimuladas. Su producción es afectada por diferentes AG, por ejemplo, el ácido α -linolénico disminuye la producción por macrófagos de TNF e IL-1, citoquinas que participan activamente en la inflamación (Harbige y col, 2003).

Además, los ácidos grasos juegan un rol fundamental en los mecanismos involucrados en la reproducción. Existen dos aspectos fundamentales que deben tenerse en cuenta en la gestación: la implantación del embrión y su posterior desarrollo hasta el momento del alumbramiento y la respuesta inmune materna que, en condiciones normales, no es agresiva para el feto. Una buena respuesta inmune materna participaría en el crecimiento y sobrevivencia de la unidad feto-placentaria, donde la producción local de citoquinas intervendría activamente. Una gestación exitosa iría acompañada de un aumento en la secreción de citoquinas Th2 (IL-4 IL-5 y IL-10) y Th3 (factor de crecimiento transformante, TGF- β), mientras que la presencia de las del grupo Th1 (IL-2, interferón (IFN)- γ y factor de necrosis tumoral, TNF- α) conduciría a un anormal crecimiento placentario con la consecuente muerte fetal (Margni y col, 1999, Zenclussen y col, 2000). La IL-4

(citoquina Th2) y el TGF- β (citoquina Th3) juegan un rol muy importante en la inmunoregulación de la preñez, implantación del embrión y desarrollo de la placenta (Pepper y col, 1997, Lyall y col, 2001). El TGF- β podría ser responsable, al menos en parte, de la tolerancia inmunológica materna hacia el feto (Chaouat y col, 2002).

Los AG isoméricos y su posible relación con la reproducción han recibido mucha atención en los últimos años. Estudios en humanos y animales han demostrado que éstos ejercen muchos efectos metabólicos y biológicos, y podrían impactar la performance reproductiva. En este aspecto, los isómeros CLA podría tener influencia específica, aunque los mecanismos moleculares de estos efectos no están aun totalmente clarificados. El efecto específico del isómero de AG puede relacionarse con alteraciones en la composición de AG de los FL de membrana, en la biosíntesis de PUFAs y/o con cambios en mediadores biológicos clave como eicosanoides y citoquinas, como se ha mencionado anteriormente. Se ha demostrado que los CLA disminuyen la expresión de citoquinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , y que aumentan la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 (Changhua y col, 2005, Song y col, 2005).

Por otro lado, es sabido que una adecuada composición de la membrana del espermatozoide es necesaria para una correcta motilidad y maduración espermáticas y para poder llevar a cabo la reacción acrosomal (fusión de la membrana acrosomal externa del espermatozoide con la membrana nuclear del óvulo, seguida de la liberación del contenido acrosomal) y la interacción con componentes del útero y del oocito (Blesbois y col, 1997). Los AG dietarios pueden incorporarse en la membrana del espermatozoide y así los CLA podrían alterar la composición de AG de los FL de membrana y afectar su fluidez y el empacamiento de los receptores, como se observa con otros lípidos (Blesbois y col, 1997).

Aunque la correlación entre la ingesta de AG dietarios y alteraciones en las funciones reproductivas e inmunes han sido descriptas anteriormente, los efectos de los CLA no están muy claros y se necesita mayor investigación.

El consumo de dietas ricas en grasas, sobre todo en sociedades occidentales, está relacionado con el desarrollo de obesidad y diversas enfermedades crónicas como hipertensión, infarto agudo de miocardio y diabetes mellitus (Eckel y col, 2005; Shaw y col, 2005). La etiología de la obesidad es multifactorial, y la predisposición genética interactúa con factores relacionados al estilo de vida tales como la dieta y la actividad física para poner de manifiesto un fenotipo resultante. A diferencia de los hidratos de carbono y las proteínas, las grasas son compuestos cuya función principal es el almacenamiento de energía, y es sabido que el inicio de la oxidación grasa es lento, favoreciendo su acumulación cuando se comienza a consumir una dieta rica en lípidos (Chan y col, 2004).

Si bien algunos efectos benéficos y/o deletéreos de los CLA pudieron haber sido considerablemente investigados, es importante notar que los mecanismos involucrados no son claros y los efectos diferenciales de los isómeros CLA necesitan ser profundizados. Además, la mayor parte de los estudios realizados hasta el momento con CLA se han desarrollado utilizando niveles de grasa dietaria normales, emanados de normas alimentarias específicas de diferentes sociedades científicas. Sin embargo, el elevado consumo de grasas observado frecuentemente en nuestra población nos plantea el desafío de evaluar los efectos de los CLA incorporándolos en dietas cuyo contenido lipídico supere los niveles recomendados. Por ello, nuestro **primer objetivo general** es investigar las potenciales alteraciones producidas por dietas con elevado contenido de lípidos y ricas en CLA en un modelo animal de ratón.

Para alcanzar el primer objetivo general, se propone:

- Analizar las potenciales alteraciones del metabolismo lipídico en plasma y tejidos (hígado y músculo).
- Investigar los mecanismos conducentes a la acumulación de TG plasmáticos, evaluando la capacidad de secreción hepática *in vivo* y remoción plasmática de TG pre- β -lipoproteínas a través de las actividades lipoproteína lipasas en tejido adiposo y músculo esquelético.

- Determinar el daño peroxidativo y las defensas antioxidantes en hígado.
- Analizar el posible daño sobre el hígado a través de enzimas marcadoras de daño hepático y análisis histológico.
- Evaluar los efectos de los CLA sobre el metabolismo de los hidratos de carbono en hígado y músculo a través de la determinación de diversos metabolitos glucolíticos.
- Estudiar los efectos sobre la capacidad reproductiva de ratones hembra a través de la tasa de resorción fetal, número de fetos y placentas, como así también la expresión placentaria de citoquinas relacionadas a una gestación exitosa, tanto en la primera como en la segunda generación de ratones alimentados con las dietas experimentales.
- Estudiar los efectos sobre la capacidad reproductiva de ratones macho determinando recuento y motilidad espermática y capacidad de sufrir reacción acrosomal, tanto en la primera como en la segunda generación de ratones alimentados con las dietas experimentales.

4.- DEPLECIÓN PROTEICA

La capacidad que se le atribuye a los CLA de modificar la composición corporal incrementando la ganancia de masa magra y disminuyendo la grasa corporal los hacen objeto de estudio en relación a su potencial importancia y utilidad en la recuperación post estados catabólicos leves, en especial la depleción proteica.

4.A.- GENERALIDADES

La malnutrición proteica (MP) es un problema mundial que afecta más que nada a mujeres embarazadas y niños (Waterlow, 1996, Rosemberg, 1991). Está muy documentado que la MP con una adecuada ingesta de energía se caracteriza por pérdida de peso, depleción del contenido proteico, acumulación de lípidos intrahepáticos, edema e hipoalbuminemia, tanto en humanos como en animales (Waterlow, 1996; Blanchard y col, 1979). La MP es un estado de deficiencias múltiples, que incluyen una amplia gama de síntomas clínicos y alteraciones bioquímicas (Smit y col, 2004). Las consecuencias de la MP en las primeras etapas de la vida puede comprometer el crecimiento y acarrear alteraciones conductuales y de aprendizaje (Grantham-McGregor, 1995). De esta forma, una adecuada selección de nutrientes y una rápida intervención nutricional pueden ser cruciales para superar una etapa de depleción proteica.

La MP puede ser de origen primario, cuyo principal causante es la disminución del aporte proteico (niños en países subdesarrollados, pobreza, etc.), o de origen secundario, relacionado a otras patologías o a un aumento importante en los requerimientos nitrogenados. La MP de origen primario se manifiesta clínicamente como marasmo o kwashiorkor, o una combinación de los dos. Ambas

se caracterizan por pérdida de peso, mientras que el edema, las lesiones cutáneas y el hígado graso son alteraciones típicas del kwashiorkor (Waterlow, 1996).

Muchos casos de desnutrición asociados a algunas patologías, como en el curso de infección grave, malabsorción intestinal, politraumatismo, estadíos posteriores a intervenciones quirúrgica, cáncer, SIDA, diabetes, etc, están caracterizados por hipermetabolismo, resistencia insulínica, hiperglucemia y marcado catabolismo proteico, pero todas en general transcurren con alteraciones en el metabolismo intermedio, tanto proteico como glucídico o lipídico. Entre ellas son de gran importancia las del metabolismo de los hidratos de carbono. Se han encontrado alteraciones en el funcionamiento del páncreas endócrino, lo que llevaría a una disminución en la secreción de insulina en respuesta a varios estímulos, conduciendo esto a una marcada intolerancia a la glucosa (Smith y col, 1975). Sin embargo, otros autores (Okitolonda y col 1988, Dardevet y col 1991) aseveran que la restricción proteica induce un estado de hipoinsulinemia asociada a alterados niveles de glucosa plasmática. Estos resultados discordantes entre sí merecen mayores estudios.

Por otro lado, se ha demostrado una depresión en el sistema de defensas antioxidantes así como un aumento en la producción de radicales libres en los estados de malnutrición proteica (Golden y col, 1987), pero los datos sobre este tema son escasos. También la información es escasa, al menos a nuestro conocimiento, acerca de las posibles alteraciones en el metabolismo lipídico a causa de la MP. Esto nos lleva a investigar estos temas para esclarecer los mecanismos involucrados en las alteraciones observadas.

4.B.- POTENCIALES EFECTOS DE LOS CLA SOBRE LA DEPLECIÓN PROTEICA

La utilización de un modelo dietario experimental en el que se induce un estado catabólico leve a través de una depleción proteica persigue distintos objetivos. La temática aborda una situación problemática como es la falta de proteínas de origen primario por ingestas deficientes de nutrientes. Por otro lado, es extensible a situaciones más generales como sería reproducir un cuadro de malnutrición semejante al que presentan pacientes con enfermedades de distintos orígenes.

Conociendo diversos efectos de los CLA, entre ellos cambios en la composición corporal (reducción en la ganancia de grasa y aumento en la ganancia de masa corporal magra) y protección contra efectos catabólicos de la estimulación inmunológica, que podrían afectar y estimular la recuperación ante balances nitrogenados negativos, es posible postular que los CLA podrían tener un rol protagónico en diversas enfermedades que cursen con estados catabólicos, como la depleción proteica leve.

Por otro lado, dietas con elevada densidad energética pueden ser útiles en la recuperación post depleción proteica leve (Waterlow, 1996). Como la presencia de CLA y el nivel de grasa dietaria podrían jugar un rol importante en la recuperación post depleción proteica, se espera que este modelo animal pueda contribuir al conocimiento de posibles intervenciones nutricionales para la potencial recuperación de este estado.

Por todo lo mencionado, nuestro **segundo objetivo general** es investigar los potenciales beneficios de la suplementación lipídica con CLA sobre la capacidad de recuperación de los efectos catabólicos de la depleción proteica leve en un modelo experimental de ratas, utilizando dos niveles de grasa dietaria: normal y elevado. Así, podremos investigar la incidencia de dos variables (nivel de grasa dietaria y presencia o no de CLA en la dieta) sobre la recuperación post depleción proteica

leve y evaluar la posible reversión o agravamiento de las alteraciones producidas por la falta de proteínas dietarias en varios aspectos, como por ejemplo el acúmulo de lípidos en hígado.

Para lograr el segundo objetivo general tenemos como objetivos específicos la evaluación de:

- Composición corporal
- Balance nitrogenado
- Retención corporal de nitrógeno proteico
- Eficiencia en la utilización de energía dietaria
- Absorción aparente de lípidos dietarios
- Mecanismos conducentes a alteraciones de los TG plasmáticos, evaluando la capacidad de secreción hepática *in vivo* y remoción plasmática de TG-pre- β lipoproteínas.
- Alteraciones del metabolismo lipídico en plasma y tejidos (hígado y músculo).
- Enzimas plasmáticas marcadoras de daño hepático
- Diversos metabolitos plasmáticos: triglicéridos, colesterol, glucosa, urea, proteínas totales y albúmina.
- Metabolismo de la glucosa en hígado y músculo esquelético correlacionando el contenido tisular de indicadores del metabolismo glucolítico con la potencial utilización de la glucosa *in vivo*.
- Lipoperoxidación y defensas antioxidantes en hígado.

Se podrá así contribuir a dilucidar la potencial aplicación de los CLA a dos niveles de grasa dietaria en la recuperación de la depleción proteica leve que transcurre en una amplia variedad de enfermedades, ya que no existe en la bibliografía, al menos a nuestro nivel de conocimiento, un estudio sobre esta problemática.