

SECCIÓN II

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

1.- ANIMALES

Para el estudio de los efectos de los CLA sobre recuperación de estados catabólicos leves se emplearon ratas Wistar macho provistas por la Comisión Nacional de Energía Atómica (Buenos Aires). Durante el período experimental fueron mantenidas en condiciones controladas ($23 \pm 2^\circ\text{C}$ y ciclo luz-oscuridad de 12 horas). Todos los estudios fueron programados según normas internacionales para el uso de animales de laboratorio (Guide to the Care and Use of Experimental Animals of Laboratory).

Los animales tuvieron acceso libre a agua y dieta control, con los niveles recomendados de nutrientes hasta alcanzar 100-110 g de peso. Luego fueron colocados en jaulas individuales de acero inoxidable diseñadas para permitir la recolección de orina, heces y restos de alimento.

Elegimos el trabajo con ratas, a diferencia de la primera parte de este trabajo de tesis, por la mayor precisión y exactitud que ofrece esta especie a la hora de evaluar variaciones en el peso del animal y de diferentes órganos y tejidos, en la ingesta de alimento y excretas, así como por la posibilidad de obtener muestras de tejidos y órganos de mayor tamaño.

2.-DIETAS

Primeramente, los animales que alcanzaron el peso estipulado (100-110 g) fueron alimentados con una dieta restringida en proteínas (RP, dieta de Restricción Proteica), con 5% (p/p) de caseína, en la que las proteínas fueron reemplazadas por hidratos de carbono para que el contenido energético sea idéntico al de la dieta control.

Para la recuperación de este estado se tuvieron en cuenta dos variables: nivel de grasa dietaria normal o elevado (7 o 20% p/p) y presencia o no de CLA en la dieta. En las 4 dietas de recuperación el nivel de proteínas utilizado fue normalizado (20% p/p).

La dieta control (C) se preparó con 7% de aceite de maíz como fuente de grasa dietaria.

En la dieta API (rica en AG poli-insaturados), se aumentó la cantidad de aceite de maíz hasta un 20% p/p, a expensas de disminuir el contenido de hidratos de carbono, obteniéndose así una dieta hipercalórica.

La suplementación con CLA se realizó reemplazando 1% del aceite de maíz de la dieta C por aceite rico en CLA para así lograr la dieta C+CLA. En la dieta API+CLA, se sustituyó un 3% del aceite de maíz de la dieta API por aceite rico en CLA. Dado que los CLA compiten con el ácido linoleico en su metabolización (Banni y col, 2004), la suplementación con CLA se triplicó en la dieta API+CLA, para que los mismos representen un 15% de la grasa total en ambas dietas ricas en estos isómeros y no alterar la relación CLA/ácido linoleico.

La composición de las dietas se muestra en tabla 4, y se basa en las recomendaciones del Comité Ad Hoc del American Institute of Nutrition (AIN-93G) (Reeves, 1993). Las dietas C, API y API+CLA son las mismas que fueron utilizadas en la primera parte de este trabajo de tesis.

	RP	C	C+CLA	API	API+CLA
Almidón	679.5	529.5	529.5	399.5	399.5
Caseína	50	200	200	200	200
Sacarosa	100	100	100	100	100
Aceite de Maíz	70	70	60	200	170
Aceite rico en CLA	-	-	10	-	30
Fibras	50	50	50	50	50
Minerales	35	35	35	35	35
Vitaminas	10	10	10	10	10
L-Cistina	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Colina	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Energía (KJ/100 g)	16.569	16.569	16.569	19.288	19.288

Tabla 4: Composición de las dietas utilizadas

Al igual que en la Sección I, el aceite de maíz fue utilizado como fuente de AG poliinsaturados, por su alto contenido en ácido linoleico no conjugado, y se empleó la misma mezcla de CLA. Todas las dietas excedieron las recomendaciones de AG esenciales, y la composición de AG de las grasas utilizadas es la misma que fue mencionada en la sección I. Cada dieta fue ofrecida diariamente durante todo el período experimental.

En las dos dietas de recuperación con elevados niveles de grasa dietaria (API y API+CLA), ésta aportó un 38.5% de las calorías totales, superando así las recomendaciones emanadas de normas alimentarias específicas de diferentes

sociedades, pero basadas en el elevado consumo observado frecuentemente en nuestra población.

3.- GRUPOS EXPERIMENTALES

Cuando los animales alcanzaron 100-110 g de peso, un lote fue sacrificado (grupo Control basal, Cb) para determinar los valores basales de diferentes parámetros estudiados a lo largo de esta parte del trabajo de tesis. El resto fueron alimentados con la dieta restringida en proteínas (RP) por 14 días, con la finalidad de generar un estado catabólico leve. Al final de este período de depleción proteica, otro lote de animales fue sacrificado y el resto fueron divididos en cuatro grupos y alimentados *ad libitum* por 30 días con las dietas de recuperación anteriormente mencionadas, con cantidades normales de proteínas y niveles recomendados o elevados de grasa dietaria, suplementadas o no con aceite rico en CLA. Así, los grupos dietarios utilizados a lo largo de esta parte del trabajo de tesis fueron identificados como Cb, RP, C, C+CLA, API, y API+CLA. El diseño del estudio se puede ver en la figura 9.

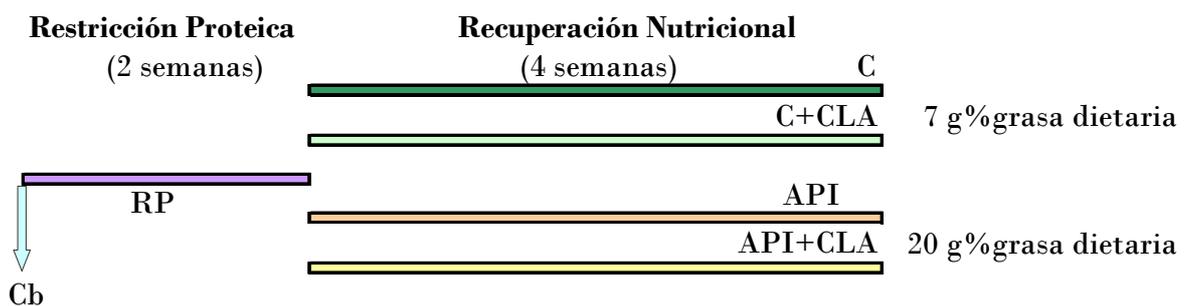


Figura 9: representación esquemática del diseño experimental del estudio de los efectos de los CLA sobre recuperación de estados de malnutrición proteica.

4. TOMA DE MUESTRAS

Para el sacrificio de los animales se siguió el procedimiento indicado en la Sección I, ítem 3.A.

5.- DETERMINACIONES REALIZADAS

5.A.- CUANTIFICACIONES EN SUERO/PLASMA

En las muestras de suero o plasma se cuantificaron:

- Las concentraciones de metabolitos: TG, colesterol y urea.
- Las actividades de las enzimas ASAT y ALAT.
- Las concentraciones de proteínas totales y albúmina.

5.A.1.- Cuantificación de metabolitos

5.A.1.1.- Triglicéridos: Ver sección I ítem 3.B.1.1.1

5.A.1.2.- Colesterol: Ver sección I ítem 3.B.1.1.2

5.A.1.3.- Urea

La urea se cuantificó en suero mediante el método enzimático que emplea ureasa como generador de amoníaco (Wiener Lab, Rosario, Argentina) 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.

5.A.2.- Cuantificación de actividades enzimáticas

En muestras de suero se determinaron las actividades de enzimas marcadoras de daño hepático: aspartato amino transferasa y alanina amino transferasa, utilizando kits comerciales (Wiener Lab, Rosario, Argentina) (Ver sección I ítem 3.B.1.2.1 y 3.B.1.2.2 respectivamente)

5.A.3.- Cuantificación de proteínas

5.A.3.1.- Cuantificación de proteínas totales

Los niveles de proteínas totales en plasma se cuantificaron empleando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). Los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ión cúprico, en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra. Los resultados se expresaron en g/dl.

5.A.3.2.- Cuantificación de albúmina

Los niveles de albúmina en plasma se cuantificaron empleando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). La albúmina reacciona específicamente (sin separación previa) con la forma aniónica de la 3,3',5,5'-tetrabromo-cresolsulfon-ftaleína, en presencia de un exceso de colorante, en medio tamponado a pH 3,9. El aumento de absorbancia a 625 nm respecto del blanco de

reactivo es proporcional a la cantidad de albúmina presente en la muestra. Los resultados se expresaron en g/dl.

5.B.- BALANCE NITROGENADO

En las experiencias destinadas a evaluar el balance nitrogenado, la composición corporal y la eficiencia energética 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 recepcionó en recipientes conteniendo H_2SO_4 (2M) en un volumen suficiente como para mantener el $\text{pH} < 2$, 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. 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.

5.B.1.- Cuantificación de Nitrógeno

La cuantificación de N en alícuotas de orina, materia fecal y alimento 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 concentrado). 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 miliequivalentes de N corresponden a la diferencia entre los miliequivalentes de HCl totales presentes en el frasco colector y los miliequivalentes 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 (BN) diario como la diferencia entre N ingerido (N_{ing}) y el N excretado en orina (N_{u}) y materia fecal (N_{mf}) diariamente:

$$\text{BN} = \text{N}_{\text{ing}} - (\text{N}_{\text{u}} + \text{N}_{\text{mf}})$$

El N que se elimina a través de los tegumentos (piel, pelos, uñas. etc), por su poca importancia cuantitativa, no fue tenido en cuenta.

5.C.- COMPOSICIÓN CORPORAL

Los animales se anestesiaron según se describió anteriormente 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 y agua (Jeszka y col, 1991; Ouerghi, 1992). La composición corporal final se determinó en los animales de todos los grupos.

5.C.1.- Determinación de proteínas

Alícuotas de carcasa se procesaron mediante la técnica de Kjeldahl descripta anteriormente en el ítem 5.B.1. El contenido total de N de las carcasas secas se multiplicó por 5,5 con el fin de estimar la cantidad de proteínas presentes (Rafecas y col, 1994). Los resultados se expresaron como g de proteínas/ 100 g de carcasa.

5.C.2.- Determinación de agua.

El contenido de agua se determinó mediante secado térmico (Cunniff, 1999). Para ello se pesaron alícuotas de carcasa que se llevaron a estufa a 60°C hasta peso constante. Los resultados se expresaron en g de agua/ 100g de carcasa.

5.C.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.

5.D.- RETENCIÓN ENERGÉTICA CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA

5.D.1.- Retención energética corporal

Se calculó a partir del contenido de proteínas y lípidos de la carcasa determinados según se explicara anteriormente. Se emplearon los factores de conversión de Canolty (1976): 18.62 KJ/ g de proteína y 39.12 KJ/ g de lípido para transformar en energía (KJ) el contenido de proteínas y grasas. La retención energética total de la carcasa (RETC) se calculó en función de la ganancia diaria de peso como proteínas y como grasa de cada animal.

$$\text{RETC (KJ/día)} = (\text{g proteína/día} \times 18.62 \text{ KJ/ g proteína}) + (\text{g grasa/día} \times 39.12 \text{ KJ/ g grasa})$$

Donde:

$$\text{Retención Proteica Diaria} = \text{g proteína/día} \times 18.62 \text{ KJ/ g proteína}$$

$$\text{Retención de Grasa Diaria} = \text{g grasa/día} \times 39.12 \text{ KJ/ g grasa}$$

5.D.2.- Eficiencia energética

La eficiencia energética (EE) durante el período experimental se calculó mediante el cociente entre la ganancia de energía diaria de la carcasa y la ingesta energética (IE) (Dulloo y Girardier, 1992; Bell y col, 1995; Specter y col, 1995). La ingesta energética se calculó multiplicando la cantidad de alimento consumido por el número de KJ aportados por gramo de dieta (Tabla 4).

$$EE = \frac{RETC \text{ (KJ/día)}}{I.E. \text{ (KJ/día)}}$$

5.E.- ABSORCIÓN APARENTE DE LÍPIDOS DIETARIOS

Ingestas y excretas diarias fueron llevadas a sequedad; por métodos extractivos con solventes se extrajeron las grasas totales y los niveles fueron cuantificados gravimétricamente. La absorción aparente (AA) de grasa dietaria, como índice de biodisponibilidad, fue calculada como el porcentaje de grasa ingerida que no fue excretada en materia fecal:

$$AA (\%) = \frac{\text{Grasa ingerida} - \text{Grasa fecal (mg/día)}}{\text{Grasa ingerida (mg/día)}} \times 100$$

5.F.- CUANTIFICACIONES TISULARES

5.F.1.- Contenido de triglicéridos: Ver sección I ítem 3.B.2.1

5.F.2.- Contenido de metabolitos energéticos

5.F.2.1.- ATP: Ver sección I ítem 3.B.2.2.1

5.F.2.2.- Creatina fosfato: Ver sección I ítem 3.B.2.2.2

5.F.2.3.- Creatina: Ver sección I ítem 3.B.2.2.3

5.G.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO LIPÍDICO

5.G.1.- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL)

5.G.1.1- Actividad de LPL en músculo gastrocnemius: Ver sección I ítem 3.B.3.1.1.

5.G.1.2.- Actividad de LPL en tejido adiposo epididimal: Ver sección I ítem 3.B.3.1.2.

5.G.2.- Secreción hepática “in vivo” de TG-pre- β lipoproteínas: Ver sección I ítem 3.B.3.2.

5.H.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL STRESS OXIDATIVO HEPÁTICO

5.H.1.- Determinación del grado de lipoperoxidación: Ver sección I ítem 3.B.4.1.

5.H.2.- Medida de la actividad de las enzimas antioxidantes hepáticas: Ver sección I ítem 3.B.4.2.

5.H.3.- Determinación del contenido de glutatión: Ver sección I ítem 3.B.4.3.

5.I.- 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). Animales de todos los grupos fueron ayunados restringiéndose el alimento a 4 g de comida a las 17 hs del día anterior a 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 3.B.1.1.3 de la sección I. 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).

5.J.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO DE LA GLUCOSA

5.J.1.-Glucosa: Ver sección I ítem 3.B.5.1.

5.J.2.- Glucosa-6-fosfato: Ver sección I ítem 3.B.5.2.

5.J.3.- Fructosa-6-fosfato (F-6-P): Ver sección I ítem 3.B.5.3.

5.J.4.- Fructosa-1,6-difosfato (F-1,6-P₂): Ver sección I ítem 3.B.5.4.

5.J.5.- Piruvato: Ver sección I ítem 3.B.5.5.

5.J.6.- Lactato: Ver sección I ítem 3.B.5.6.

5.J.7.- Glucosa-1-fosfato (G-1-P): Ver sección I ítem 3.B.5.7.

5.J.8.- Glucógeno total y sus fracciones pro- y macro-glucógeno: Ver sección I ítem 3.B.5.8.

5.J.9.- Citrato: Ver sección I ítem 3.B.5.9.

6.- 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.

Diferencias estadísticas entre las medias de los grupos Cb y RP fueron establecidas mediante test de Student (*), al igual que entre los grupos RP y C (#).

Los datos utilizados para comparar los efectos de las diferentes dietas durante la repleción proteica fueron analizados mediante ANOVA de dos vías (2x2), utilizando la suplementación con CLA y el nivel de grasa dietaria como variables independientes. Las comparaciones post-hoc fueron realizadas utilizando el test de Scheffe.

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