

## **CAPÍTULO IV**

### **DISCUSIÓN**

## **SECCIÓN I**

# **CARACTERIZACIÓN DE ALTERACIONES PRODUCIDAS POR DIETAS RICAS EN CLA EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATÓN**

La primera parte del presente trabajo de tesis fue llevada a cabo persiguiendo el objetivo de investigar las potenciales alteraciones producidas por el consumo de dietas ricas en CLA con un elevado contenido de lípidos. Este tema podría tener un impacto en la población si se tiene en cuenta la escasa información disponible acerca de los efectos de los CLA a niveles de grasa dietaria comparables a los observados en una fracción importante de la población occidental. Los tópicos abarcados incluyen el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono y las posibles influencias sobre la reproducción.

Los efectos de los CLA sobre la composición corporal, los niveles de lípidos plasmáticos y tisulares y el metabolismo de los hidratos de carbono son controversiales. Esto puede deberse en parte a los modelos experimentales y los isómeros utilizados, como así también a la dosis, tiempo, edad de los animales al inicio de la experiencia. En nuestro modelo estudiamos el efecto de los CLA sustituyendo un 3% de aceite rico en AG poliinsaturados con alto contenido de ácido linoleico, por un 3% de aceite rico en una mezcla de isómeros CLA. A su vez, estos cambios fueron llevados a cabo en dietas con elevado contenido de grasa dietaria, quedando así conformado un modelo experimental sobre el que existen escasos estudios. Por esta razón, además de los grupos dietarios conteniendo o no CLA con un 20% de grasa dietaria, se incorporó un grupo control con niveles recomendados en ausencia de CLA para así diferenciar los efectos que pudiesen haber sido causados por una elevada ingesta de ácido linoleico.

## 1.- EFECTO DE LOS CLA SOBRE EL PESO Y LA COMPOSICIÓN CORPORAL

Entre las alteraciones características de los CLA a nivel tisular es ampliamente reportado el acúmulo de TG en hígado con hepatomegalia (Belury y Kempa-Stecko, 1997; West y col, 1998; Clement y col, 2002) y la disminución del peso del tejido adiposo (Park y col, 1997; Takahashi y col, 2002) asociados a un aumento de la masa corporal magra (Chin y col 1994; Cook y col, 1998).

En nuestra experiencia con ratones CF-1, no se observaron cambios en la **ganancia de peso corporal** de los animales. Estos resultados coinciden con los hallados por Tsuboyama-Kasaoka (2003 y 2000), en ratones hembra de la cepa C57BL/6J, alimentados con niveles normales y elevados de grasa dietaria. Sin embargo, hay diferencia con los obtenidos por Peters y col (2001) en ratones macho de la cepa C57BL/6N utilizando CLA a niveles normales de grasa dietaria, y con los resultados de DeLany (2000) en ratones macho de la cepa AKR/J alimentados con mezcla de isómeros a niveles normales y elevados de grasa dietaria, quienes hallaron un menor peso corporal. La discrepancia con nuestros resultados podría deberse, entre otros motivos, a la distinta cepa de ratón utilizada, o al diferente período etario de inicio del tratamiento. Nuestros animales recibieron las distintas dietas inmediatamente después del destete, hallándose los mismos en un período exponencial de crecimiento (3 semanas de edad), mientras que en los demás casos, los animales empezaron las experiencias entre 5 y 8 semanas de edad. En nuestro estudio, el inicio del tratamiento no implicó un stress adicional por el cambio de dieta, mientras que otros autores, luego del destete, mantuvieron a los animales primeramente con dieta control para, luego de un determinado período, incorporar la presencia de CLA. Nuestro protocolo se justifica aun más dado que en ciertos casos (West y col, 1998; Park y col, 2007; Hargrave y col, 2002) la ingesta de alimento se vio disminuida, lo cual podría explicar la diferente ganancia de peso.

En esta parte del trabajo de tesis no se evaluó la **composición corporal** centesimal. Sin embargo, otros autores han reportado que ésta es alterada por la

ingesta de CLA. Park y col (1997) fueron los primeros en observar cambios en la composición corporal de ratones alimentados con CLA, que mostraron una marcada disminución del contenido de grasa y aumento de las proteínas, asociados a un menor peso corporal. Por otro lado, Javadi y col (2007) reportaron que la ingesta de 0,5% de CLA disminuyó el porcentaje de grasa corporal en ratones alimentados con elevados niveles de grasa dietaria. Sin embargo, estos efectos no fueron observados por Patureau Mirand y col (2004) en ratas alimentadas con CLA.

Otra característica fuertemente asociada a la ingesta de CLA es la **hepatomegalia**. En nuestro trabajo se observó un incremento del tamaño del hígado de un 32%. Tsuboyama-Kasaoka y col (2003), utilizando un modelo similar pero con menores dosis de CLA (1%) y mayores cantidades de grasa dietaria (34%), encontraron resultados semejantes: aumento del 45% del peso del hígado asociado a esteatosis. Sin embargo, los autores reportaron anteriormente (Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000) que la ingesta de CLA a bajos niveles de grasa dietaria condujo a un grado aun mayor de esteatosis y hepatomegalia.

El ratón parece ser la especie en la cual los CLA ejercen su mayor efecto, en varios aspectos evaluados por nosotros y otros autores (Pariza y col, 2001; Evans y col, 2002) siendo, en general, los resultados consistentes entre diferentes cepas. Macarulla y col (2005) demostraron en hamsters un aumento del peso del hígado, pero sin la concomitante esteatosis, a diferencia de lo hallado en ratón por otros autores anteriormente mencionados. No se observaron estas alteraciones en modelos experimentales con ratas (Azain y col, 2000; Patureau Mirand y col, 2004, Park y col, 2005a).

En la mayoría de los trabajos publicados, la hepatomegalia es acompañada por un fuerte **descenso del peso de los diferentes tipos de tejidos adiposos**. Park y col (1997) fueron los primeros en demostrar este efecto en ratones en crecimiento alimentados con un 0,5% de CLA. En nuestro estudio se observó un aumento de peso del tejido adiposo como consecuencia de la ingesta de una dieta conteniendo 20% de aceite rico en ácido linoleico y una disminución del mismo en un 85%, por

la sustitución de 3% del isómero conjugado del ácido linoleico. Otros autores (Tsuboyama-Kasaoka y col, 2003; DeLany y col, 2000) hallaron resultados similares, pero además evaluaron el efecto de los CLA a diferentes niveles de grasa dietaria. Del mismo modo que fuera discutido anteriormente en el caso del hígado, Tsuboyama-Kasaoka y col (2003) hallaron que el efecto observado en el descenso del peso del tejido adiposo estuvo inversamente relacionado a los niveles de lípidos dietarios. Discrepando con este resultado, DeLany y col (2000) encontraron que la magnitud de la disminución inducida por los CLA es la misma independientemente del contenido de grasa dietaria, mientras se mantenga la proporción de CLA.

Warren y col (2003), comparando el efecto diferencial de los isómeros *t10,c12*-y *c9,t11*-CLA, demostraron que el isómero *t10,c12*-CLA sería el responsable de la disminución del peso del tejido adiposo retroperitoneal, así como del aumento del tamaño hepático y la esteatosis. Otros autores (Park y col, 1999) también demostraron que éste es también responsable de reducir la ganancia de grasa corporal. Así, este isómero sería el encargado de los cambios observados no solo a nivel de los lípidos hepáticos sino de los principales aspectos relacionados a las alteraciones del metabolismo lipídico inducidas por la ingesta de CLA. Por otro lado, también se ha propuesto que el isómero *c9,t11*-CLA sería el agente anabólico activo responsable del crecimiento observado en ciertos modelos (Wahle y col, 2004), y que el aumento relativo en la masa corporal magra observada en ratones podría preceder la disminución de la masa grasa (Park y col, 1999).

La diferente susceptibilidad de especie se hace presente también a nivel de los cambios en el tejido adiposo. En ratas, la inclusión de CLA en la dieta en algunos trabajos redujo el peso del tejido adiposo, pero esta disminución no fue tan marcada como la observada en ratones (Yamasaki y col, 2003). En cerdos, Dugan y col (1997) demostraron que los depósitos grasos eran menores, favoreciendo el incremento de la masa magra, pero sin alcanzar la magnitud observada en ratones. El hecho que el ratón posea una mayor tasa de recambio de grasa que otras especies

puede explicar por qué los CLA son más efectivos en ratones. Por ejemplo, la tasa metabólica es 7 veces superior a la de los humanos (Terpstra y col, 2001).

## **2.- EFECTO DE LOS CLA SOBRE EL METABOLISMO DE LÍPIDOS**

### **2.A.- EFECTO DE LOS CLA SOBRE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS**

En nuestro modelo con ratones CF-1 alimentados con alto contenido de grasa dietaria se evaluaron los efectos de la ingesta de CLA sobre los niveles de **lípidos plasmáticos**. La concentración de colesterol no se vio afectada por la adición de CLA, como así tampoco había sido alterada por el nivel de grasa dietaria. A diferencia de estos resultados, los niveles de TG plasmáticos tuvieron un transiente pero no significativo incremento por efecto de la ingesta de altos niveles de grasa dietaria y fueron significativamente reducidos por la adición de CLA, alcanzando niveles aun inferiores a los controles con normal cantidad de grasa dietaria. En distintas especies animales en condiciones normales, los CLA mostraron un efecto hipolipémico. En este sentido, Corino y col (2002) reportaron una reducción de los niveles de colesterol, y otros autores, una disminución del contenido de TG (Faulconnier y col, 2004; Stangl y col, 2000). Liu y col (2007) y Gavino y col (2000) también observaron menores niveles de TG plasmáticos administrando CLA a elevados niveles de grasa dietaria, en ratones y en hamsters respectivamente. Otras experiencias en ratones alimentados con CLA a niveles normales de grasa dietaria no encontraron variaciones en los niveles de TG ni de colesterol (Warren y col 2003, Javadi y col 2004), mientras que Lee y col (2005) hallaron una fuerte disminución en ambos parámetros. En animales hipercolesterolémicos los efectos de los CLA también fueron controvertidos. En hamsters (deDeckere y col, 1999), tanto la mezcla de CLA como el isómero *t10,c12*-CLA disminuyeron los niveles de LDL-C e incrementaron los de VLDL-TG, mientras que en un modelo similar, Zabala y col

(2006a) no encontraron alteraciones en los niveles de TG como consecuencia de la ingesta de *t10,c12*-CLA. La diferencia podría deberse a la diferente cepa de hamster utilizada en ambos estudios. Como hemos visto, se han observado diversos efectos de los CLA sobre los lípidos plasmáticos en distintas especies, y las discrepancias observadas podrían deberse en parte al tipo de isómero utilizado, ya que la mayoría de los estudios han sugerido que el descenso de los niveles de lípidos plasmáticos se debería a la acción del isómero *t10,c12*-CLA. Los efectos de los CLA observados principalmente en ratones son mas controvertidos como así también escasos, en relación a estudios realizados en humanos. Algunas experiencias hallaron menores niveles de lípidos plasmáticos (Noone y col, 2002), otras no observaron ningún efecto benéfico sobre perfil lipídico (Petridou y col, 2003) y otros reportaron incluso efectos perjudiciales. Particularmente, Smedman y Vessby (2001) observaron que la ingesta de CLA incrementó los niveles de colesterol total y LDL-C, y Riserus y col (2002) hallaron que el isómero *t10,c12*-CLA disminuyó la concentración de HDL-C.

## **2.B.- EFECTO DE LOS CLA SOBRE LOS LÍPIDOS HEPÁTICOS**

La marcada hepatomegalia observada en nuestro modelo se asocia a un incremento en el contenido de **TG hepáticos**. Estos resultados coinciden con los de otros autores: Belury y Kempa-Stecko (1997) demostraron que ratones hembras de la cepa SENCAR alimentados con una dieta conteniendo 0,5% de una mezcla equimolecular de los isómeros *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA (similar a la utilizada en este trabajo de tesis) durante 6 semanas incrementó el contenido de lípidos hepáticos. Takahashi y col (2003) hallaron un mayor contenido hepático de TG en ratones de las cepas ICR y C57BL/6J alimentados con 0,4% del isómero *t10,c12*-CLA durante 4 semanas. Nuestros resultados demostraron un aumento del contenido de TG hepáticos en un 168%, también concordando con los resultados de Liu y col (2007), quienes hallaron un aumento del contenido de TG y acumulación



de grasa observada en cortes histológicos en un modelo dietario de ratones C57BL/6J alimentados con niveles de grasa dietaria semejantes al nuestro. DeLany y col (1999) también reportaron acumulación de grasa en el hígado mediante análisis histológico en ratones de la cepa AKR/J alimentados con un 1% de mezcla de CLA por 40 días.

Nakanishi y col (2004) encontraron una relación inversa entre la acumulación de TG en el hígado inducida por los CLA y la reducción de los niveles de PGE<sub>2</sub>. Estos resultados son absolutamente compatibles con una alteración de la biosíntesis de PUFAs de cadena larga y de la producción de eicosanoides. Los CLA podrían, por competencia de sustrato con el ácido linoleico (Banni y col, 2004) y posiblemente a través de alteraciones enzimáticas, afectar la biosíntesis de eicosanoides derivados de la serie n-6, como así también desequilibrar las proporciones de eicosanoides derivados de las series n-3 y n-6.

En el siguiente esquema se pueden observar las alteraciones halladas en la primera parte de este trabajo de tesis como consecuencia de la ingesta de CLA.

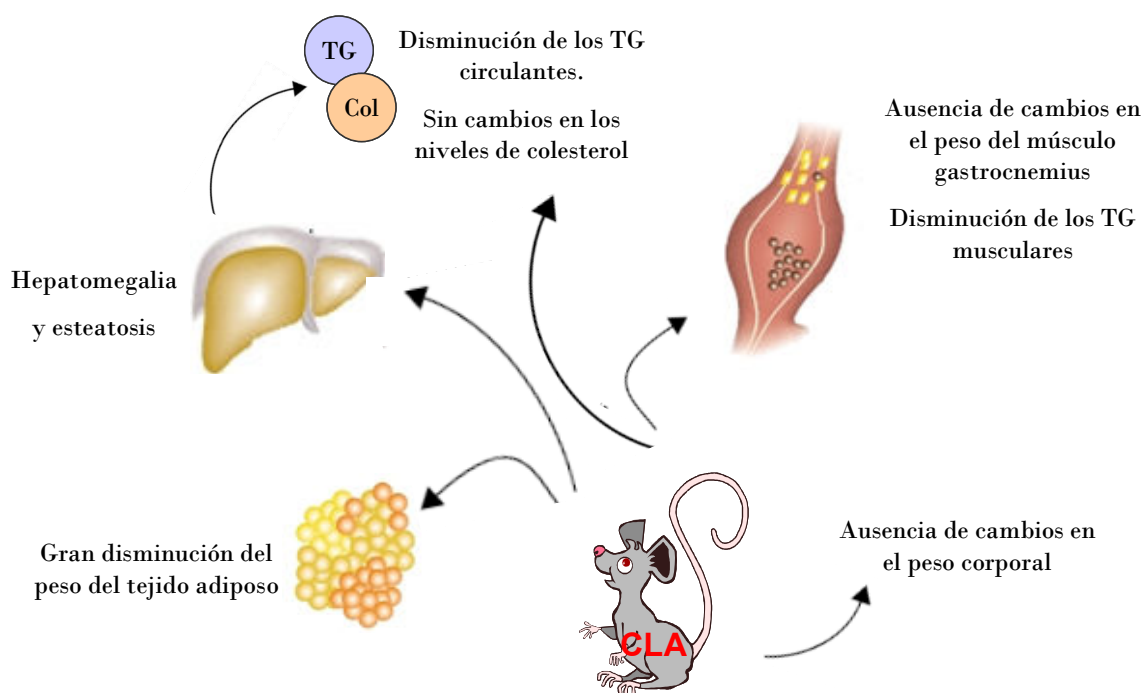


Figura 43: efectos de la ingesta de CLA a elevados niveles de grasa dietaria observados en nuestro modelo experimental.

## 2.C.- MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LAS ALTERACIONES DEL METABOLISMO LIPÍDICO

Las variaciones de los TG circulantes y tisulares pueden ser explicadas, entre otros factores, por alteraciones en la síntesis y secreción hepática de TG-pre- $\beta$ -lipoproteínas, como también en la remoción periférica de los TG circulantes.

El leve aumento de TG plasmáticos inducido por la ingesta de elevadas cantidades de grasa dietaria podría estar relacionado a la elevada velocidad de secreción de TG (VSTG) observada, la cual fue parcialmente compensada por una mayor clarificación de los TG por el músculo. La adición de CLA a altos niveles de grasa dietaria redujo abruptamente los niveles circulantes de TG, asociado a un

moderado descenso de la VSTG. Esto, a su vez, podría promover el acúmulo exacerbado de lípidos hepáticos que caracteriza a estos isómeros y que hemos observado en nuestro modelo dietario.

La enzima lipoproteína lipasa (LPL) hidroliza los TG de las lipoproteínas plasmáticas (VLDL y quilomicrones) para la incorporación de AG a los tejidos. En músculo, la ingesta de CLA disminuyó la actividad LPL que había sido incrementada por el consumo de altos niveles de grasa dietaria. Este hallazgo concuerda con la normalización del contenido de TG musculares, incrementados por la ingesta de elevadas cantidades de grasa dietaria. Estos resultados coinciden con los de Zabala y col (2006a), quienes observaron que la ingesta de dietas aterogénicas con un 1% de *tl0,c12*-CLA, además de disminuir el contenido muscular de TG, disminuye la actividad LPL en un modelo de hamsters. Por otro lado, la actividad enzimática no alcanza a decaer hasta valores observados en el grupo control, y el contenido de TG decrece hasta niveles incluso inferiores. Esta reducción a valores tan bajos de TG podría estar relacionada a otros factores, entre ellos, un incremento en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial. Aunque este parámetro no fue medido en nuestro trabajo, Zabala y col (2006a) determinaron la actividad de la enzima Carnitin-Palmitoil-Transferasa-1 (CPT-1), responsable del transporte de AG a través de la membrana de la mitocondria para su oxidación muscular. Esta actividad fue aproximadamente 70% superior en los animales alimentados con CLA, indicando que el isómero *tl0,c12*-CLA puede aumentar la eficiencia del músculo para oxidar los AG libres. Evidencias similares fueron encontradas por Park y col (1997) en ratones alimentados con CLA. Así, la disminución en la captación de AG y el aumento en la oxidación contribuirían al menor contenido de TG musculares observado en los animales alimentados con CLA.

Otro factor involucrado en la disminución de los TG circulantes puede estar relacionado a un cambio en la actividad de la LPL en tejido adiposo. Si bien la actividad por gramo de tejido adiposo epididimal fue incrementada por la ingesta de CLA, la disminución del 85% del peso genera una menor contribución total del

tejido a la remoción de los TG plasmáticos. Estos resultados no explicarían totalmente la disminución de los TG circulantes, por lo que otros mecanismos podrían jugar un rol clave. Nuestros resultados concuerdan con los hallados en adipocitos 3T3-L1 de cultivo incubados con CLA (Park y col, 1997). Mediante diferentes metodologías se ha evaluado la actividad LPL y en la mayoría de los casos se ha encontrado una disminución en la misma. Xu y col (2003) hallaron una menor actividad LPL en el tejido adiposo parametrial en ratones hembra alimentados con CLA durante sólo 4 días. Kang y col (2003) demostraron que es el isómero *t*10,*c*12-CLA el que inhibe la expresión de LPL en adipocitos de cultivo, y corroboraron este hecho con una disminución de los niveles de mRNA de LPL en tejido adiposo epididimal. Otros autores (Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000), también han encontrado bajos niveles de mRNA en el tejido adiposo de ratones alimentados con niveles normales y elevados (Tsuboyama-Kasaoka y col, 2003; Liu y col, 2007) de grasa dietaria.

Aunque en menor cuantía otras LPL contribuyen a la remoción de los TG circulantes, en este trabajo focalizamos el estudio en dos tejidos representantes de la mayor contribución. No obstante, Degrace y col (2003) encontraron que las actividades en músculo cardíaco e hígado no fueron alteradas. Los resultados de estos autores son inconsistentes con la mayor VSTG y menor nivel de TG circulantes presentados en el mismo trabajo.

Como el tejido adiposo es uno de los órganos más importantes en la clarificación de TG, numerosos mecanismos podrían estar interrelacionados. Así, la elevada actividad LPL expresada por gramo de tejido y el escaso tamaño del mismo podrían estar relacionados a un muy pequeño tamaño celular. Numerosos factores podrían contribuir a este hecho, entre ellos la apoptosis del adipocito, las alteraciones en la proliferación y diferenciación de los preadipocitos y los cambios en la  $\beta$ -oxidación en este tejido.

La inducción de la **apoptosis** del adipocito es un proceso importante que puede estar asociado a la reducción de la deposición grasa inducida por los CLA.

Tsuboyama-Kasaoka y col (2000) señalaron que una mezcla de CLA al 1% producía apoptosis en el tejido adiposo de ratones. Otros autores demostraron (Brodie y col, 1999; Hargrave y col, 2002) que el isómero *t10,c12*-CLA fue el responsable de la inducción de apoptosis en adipocitos de cultivo. Evidencias *in vitro* (Evans y col, 2000) e *in vivo* (Xu y col, 2003) indicarían que los CLA inducen apoptosis en preadipocitos, y este efecto también se observaría en cultivos de adipocitos humanos (Brown y col, 2003 y 2004). Así, la inducción de apoptosis por parte de los CLA puede depender del isómero en cuestión. Un potencial mecanismo de apoptosis en el tejido adiposo está relacionado con el TNF- $\alpha$  (Tsuboyama-Kasaoka y col 2000, Prins y col 1997). La ingesta de CLA incrementó los niveles de mRNA de TNF- $\alpha$  en adipocitos de ratones, y este hecho coincidió con una elevada tasa de apoptosis (Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000). Se necesitan mayores estudios para identificar claramente esta relación causa-efecto, dado que evidencias en ratas (Yamasaki y col, 2003) y ratones (Akahoshi y col, 2002, Bhattacharya y col, 2005) mostraron cantidades disminuidas de TNF- $\alpha$  en suero de animales alimentados con CLA y que mantuvieron una deposición grasa normal. En contraste a estos resultados, Azain y col (2000) reportaron que la ingesta de CLA en ratas reduce el tamaño de las células pero no el número, lo cual hablaría de que en ambas especies los mecanismos que cobran importancia son diferentes.

La **proliferación de los preadipocitos** también podría ser otro de los mecanismos afectados por los CLA. Cuando la ingesta energética es abundante y excede los requerimientos inmediatos, los depósitos grasos se incrementan, con un aumento en el número de adipocitos maduros. Los adipocitos diferenciados no proliferan, pero los preadipocitos pueden proliferar y tienen el potencial de diferenciarse en adipocitos maduros, llenando su citoplasma con lípidos. Este resultado se visualiza como depósitos grasos expandidos. Diferentes autores han reportado, sobre todo en estudios *in vitro*, los efectos antiproliferativos de los CLA sobre los preadipocitos, lo cual podría impedir la expansión de los depósitos grasos (McNeel y col, 2003; Azain y col, 2004). El isómero *t10,c12*-CLA es considerado

responsable de este efecto (Satory e Smith, 1999) en adipocitos 3T3-L1 de cultivo. Por el contrario, Ding y col (2002) no hallaron reducción en la proliferación celular en preadipocitos porcinos tratados con CLA, y Poulos y col (2001) no observaron proliferación luego de la administración de CLA dietarios en ratas. No cabe duda de que para explicar estos resultados discordantes se deben tener en cuenta diferencias entre las especies estudiadas, y las diferentes condiciones *in vivo* e *in vitro*.

Los posibles efectos del isómero *t10,c12*-CLA sobre la **diferenciación de los preadipocitos** todavía no están completamente aclarados. La diferenciación de los preadipocitos es mediada por una serie de cambios programados en la expresión génica de proteínas específicas como la enzima LPL, y es regulada por factores de transcripción, de los cuales el receptor activado por proliferadores peroxisomales- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) es uno de los principales. Los CLA son ligandos naturales de los PPAR- $\gamma$  (Brown y col, 2003). Varios autores han demostrado que el isómero *t10,c12*-CLA inhibe la diferenciación de los preadipocitos a través de un mecanismo que involucra la disminución del mRNA de PPAR- $\gamma$  (Granlund y col, 2005; Evans y col, 2001; Kang y col, 2003; Zabala y col, 2006b). Además, se ha reportado una menor lipogénesis *in vivo* e *in vitro* (Evans y col, 2002; Brown y col, 2003), por efecto del isómero *t10,c12*-CLA, reflejada por una reducción en la actividad Acetil-CoA Carboxilasa (ACC) (Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000). Sin embargo, Zabala y col (2006b) evaluaron los efectos de este isómero en tejido adiposo de hamsters y hallaron un incremento en la actividad de enzimas involucradas en la lipogénesis: ACC y sintetasa de AG (FAS), contrastante con una disminución de sus niveles de mRNA, acompañada de una menor expresión de los factores de transcripción como la proteína ligadora de elementos reguladores de esteroides-1 (SREBP-1) y el PPAR- $\gamma$ . De esta manera, la diferenciación de preadipocitos en adipocitos maduros es un paso esencial para comprender el comportamiento de las células maduras. Los preadipocitos pueden ser objeto de una inhibición de la diferenciación, en la cual los CLA causen una disminución en el número de células potencialmente capacitadas para convertirse en adipocitos maduros, y así disminuir la masa grasa de un

organismo. En particular el isómero *t10,c12*-CLA sería capaz de impartir su efecto delipidatorio tanto a través del metabolismo como del control del ciclo celular. Se necesitan mayores estudios para dilucidar completamente estos aspectos.

También hay ciertas evidencias que indican que los CLA podría aumentar la **lipólisis**. Park y col (1999 y 2004) y Perez-Matute y col (2007) encontraron aumentada la tasa de lipólisis en células 3T3-L1 casi al doble que en las células controles.

Además, la **oxidación de AG por parte del tejido adiposo** puede verse afectada por la acción de los CLA. La actividad de la enzima CPT-1 se encontró aumentada en tejido adiposo blanco y marrón de ratas (Rahman y col, 2001) y ratones (Park y col, 1997) alimentados con CLA. Además de la  $\beta$ -oxidación mitocondrial, otro mecanismo importante es la oxidación de AG producida en los peroxisomas, los cuales son afectados por los CLA, pero existen muy pocas evidencias acerca de la  $\beta$ -oxidación en el tejido adiposo, por lo que mayores estudios deberían ser llevados a cabo para dilucidar este mecanismo.

También cabe destacar la posibilidad de que no todos los adipocitos respondan de la misma manera a las señales moleculares. Los adipocitos no están confinados a un tejido específico, y cada vez hay mayor evidencia de que la localización del tejido adiposo en el organismo es un determinante importante de las funciones del adipocito, Así es posible que los efectos de los CLA varíen según la localización, microambiente y función fisiológica de cada adipocito (Pariza y col, 2001).

El **hígado** es un órgano blanco de la acción de los CLA, los que conducen a un acúmulo muy significativo de TG acompañado de hepatomegalia. Dentro de los mecanismos que podrían estar involucrados en la inducción de la acumulación de lípidos, además de los discutidos previamente, podemos mencionar: alteraciones en la síntesis y oxidación de AG, en el ensamble de pre- $\beta$ -lipoproteínas, regulación de

la expresión de factores de transcripción, captación de lípidos, etc. Varios autores han reportado que la ingesta de mezcla de CLA en ratones incrementa la actividad y expresión de las enzimas involucradas tanto en la **síntesis de AG** como en la  **$\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal** (Takahashi y col, 2002; Ide y col, 2005). Además, Degrace y col (2004) reportaron que la incrementada  $\beta$ -oxidación hepática hallada en ratones podría ser inhibida *in vivo* por las elevadas cantidades de malonil-CoA encontradas en hígado. Javadi y col (2004), en una experiencia similar, reportaron que la actividad de las enzimas hepáticas relacionadas a la síntesis de AG (ACC, FAS) se encontraba más incrementada que la actividad de las enzimas encargadas de la oxidación, contribuyendo así a la esteatosis hepática el proceso de síntesis mucho más que la oxidación. Martin y col (2000) evaluaron el efecto de los CLA como mezcla y como isómeros individuales sobre diferentes sistemas enzimáticos en rata. Sus resultados no fueron tan marcados como los observados en ratón, ya que no se apreciaron cambios en las enzimas ACO y CPT-1, lo que sugeriría una menor susceptibilidad de esta especie. La expresión génica de casi todas las enzimas involucradas en la oxidación de los lípidos hepáticos y en la captación hepática de AG son reguladas por los PPAR- $\alpha$  (Jump y col, 1997; Kota y col, 2005). Moya Camarena y col (1999) demostraron que los CLA son potentes ligandos y activadores de estos receptores nucleares, siendo el isómero *c9,t11*-CLA ligeramente más potente que el *t10,c12*-CLA. Así, a través de la unión y activación a los PPAR- $\alpha$ , la ingesta de CLA resulta en un aumento del mRNA de enzimas como ACO y la proteína ligadora de AG (FABP), entre otras. Sin embargo, Peters y col (2001) demostraron que la ingesta de CLA incrementa los niveles de mRNA no sólo de ACO, CPT-1, sino también de FAS, Esteroil-CoA Desaturasa-1 (SCD-1) y FABP en el hígado de ratones *wild type* pero no PPAR- $\alpha$  *null*, lo cual indicaría que los CLA aumentan la expresión génica de enzimas relacionadas al metabolismo hepático de AG a través no solo de mecanismos dependientes de PPAR- $\alpha$  sino también independientes. Aunque en el hígado se expresa mayoritariamente la variedad  $\alpha$  de los PPAR, bajo determinados estímulos puede incrementarse la



expresión de la variedad  $\gamma$ , que en condiciones normales es casi exclusiva del tejido adiposo y está fuertemente involucrada en la diferenciación del adipocito y la síntesis de sus lípidos. Varios autores (Liu y col, 2007; Poirier y col, 2005) encontraron un aumento en la expresión de PPAR- $\gamma$  en hígado de animales alimentados con CLA a normales y elevados niveles de grasa dietaria. Así podría plantearse que en el hígado los CLA aumentan la expresión de PPAR- $\gamma$ , estimulando la síntesis de lípidos, mientras que a través de la inducción de la expresión de PPAR- $\alpha$  estimularían su oxidación. También hay que tener en cuenta la acción de los SREBPs, factores de transcripción también involucrados en la regulación de las enzimas que participan en la síntesis de lípidos hepáticos, cuya expresión es aumentada por la ingesta de CLA (Clement y col, 2002).

Por otro lado, el ensamble de las VLDL previo a su secreción es otro posible punto de acción de los CLA. Pal y col (2005) reportaron que en hepatocitos de cultivo, la secreción de apoproteína B 100 (apoB100) se vio significativamente disminuida en presencia de CLA. Esto estaría relacionado con reducidas cantidades de colesterol en las células, necesario para la producción de apoB100. Así, los bajos niveles plasmáticos de VLDL se podrían correlacionar con la menor producción de apoB100.

También la acumulación de lípidos hepáticos se relaciona con la expresión de diversos receptores como el receptor de LDL (LDL-R) y el transportador de AG FAT/CD 36, entre otros. Degrace y col (2004) observaron que los CLA inducen la expresión del LDL-R, aumentando la capacidad hepática de remover lípidos plasmáticos. Por otro lado, Liu y col (2007) observaron que la ingesta de CLA en animales alimentados con elevados niveles de grasa dietaria aumentó los niveles de expresión de FAT/CD 36, aumentando así la captación de AG por el hígado.

### 3.- CLA Y SÍNDROME LIPODISTRÓFICO

Las alteraciones metabólicas descritas a nivel de hígado y tejido adiposo generadas por la ingesta de CLA pueden ser enmarcadas dentro del **síndrome lipodistrófico**. Generalmente, la drástica disminución en el peso del tejido adiposo y la esteatosis hepática son acompañadas por resistencia insulínica e hiperinsulinemia (Clement y col, 2002; Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000). Poirier y col (2005) hallaron un gran incremento en la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos aislados de ratones alimentados con un 1% de CLA. Además, el análisis morfométrico del tejido pancreático demostró que los CLA incrementan el número y tamaño de las células  $\beta$  pancreáticas, indicando que la elevada secreción de insulina se debe a una hiperplasia de las células  $\beta$ . Un posible origen de estas alteraciones podría ser una disminución en la expresión de PPAR- $\gamma$  en páncreas (Rosen y col, 2003). Este síndrome lipodistrófico mediado por los CLA está relacionado al isómero *t10,c12*-CLA (Clement y col, 2002), y los mecanismos que lo caracterizan se desarrollan en un orden cronológico. El tejido adiposo parece ser el primer blanco de los CLA. Según Xu y col (2003), dos días de tratamiento con CLA son suficientes para alterar el perfil génico de este tejido, y 4 días para disminuir la actividad LPL, sin detectarse cambios a esta altura en el hígado. Así, surge la pregunta acerca de la relación entre la disminución del tejido adiposo, las alteraciones en la insulina y la esteatosis hepática. Es interesante comentar que en ratones A-ZIP/F-1, en los que se observa lipodistrofia, el cuadro es revertido mediante el trasplante de tejido adiposo (Gavrilova y col, 2003). Este efecto puede ser, al menos en parte, mediado por el restablecimiento de la producción de adipocitoquinas por el tejido transplantado. Tsuboyama-Kasaoka y col (2000) reportaron que tanto la hiperinsulinemia como la esteatosis hepática son parcialmente revertidas cuando la hipoleptinemia generada por la falta de tejido adiposo, es normalizada mediante la infusión de leptina en los ratones lipodistróficos. Así, estos datos sugieren que la deficiencia de leptina y adiponectina

(Warren y col, 2003) contribuyen a la hiperinsulinemia, resistencia insulínica e hígado graso observados en ratones alimentados con CLA. De esta manera, los CLA podrían producir primeramente un marcado incremento de TNF- $\alpha$  que lleva a una drástica reducción en la reservas de grasa a través de la apoptosis, regulación de genes responsables del destino metabólico de los AG en el adipocito y otros mecanismos. A su vez, la disminución de la masa grasa está asociada a una reducción en los niveles de adiponectina y leptina (Perez-Matute y col, 2007). Luego, la resistencia insulínica dispara una hiperplasia de las células  $\beta$  que contribuye al aumento en los niveles plasmáticos de insulina. Finalmente, la hiperinsulinemia crónica aumenta la deposición grasa en el hígado a través de una inducción de la captación de AG y de la lipogénesis. Este último evento constituye una protección a corto plazo contra una resistencia insulínica aun más severa al limitar daños debidos a deposición de grasa periférica.

En el siguiente esquema se pueden observar los mecanismos asociados a las alteraciones del metabolismo lipídico generados por los CLA.

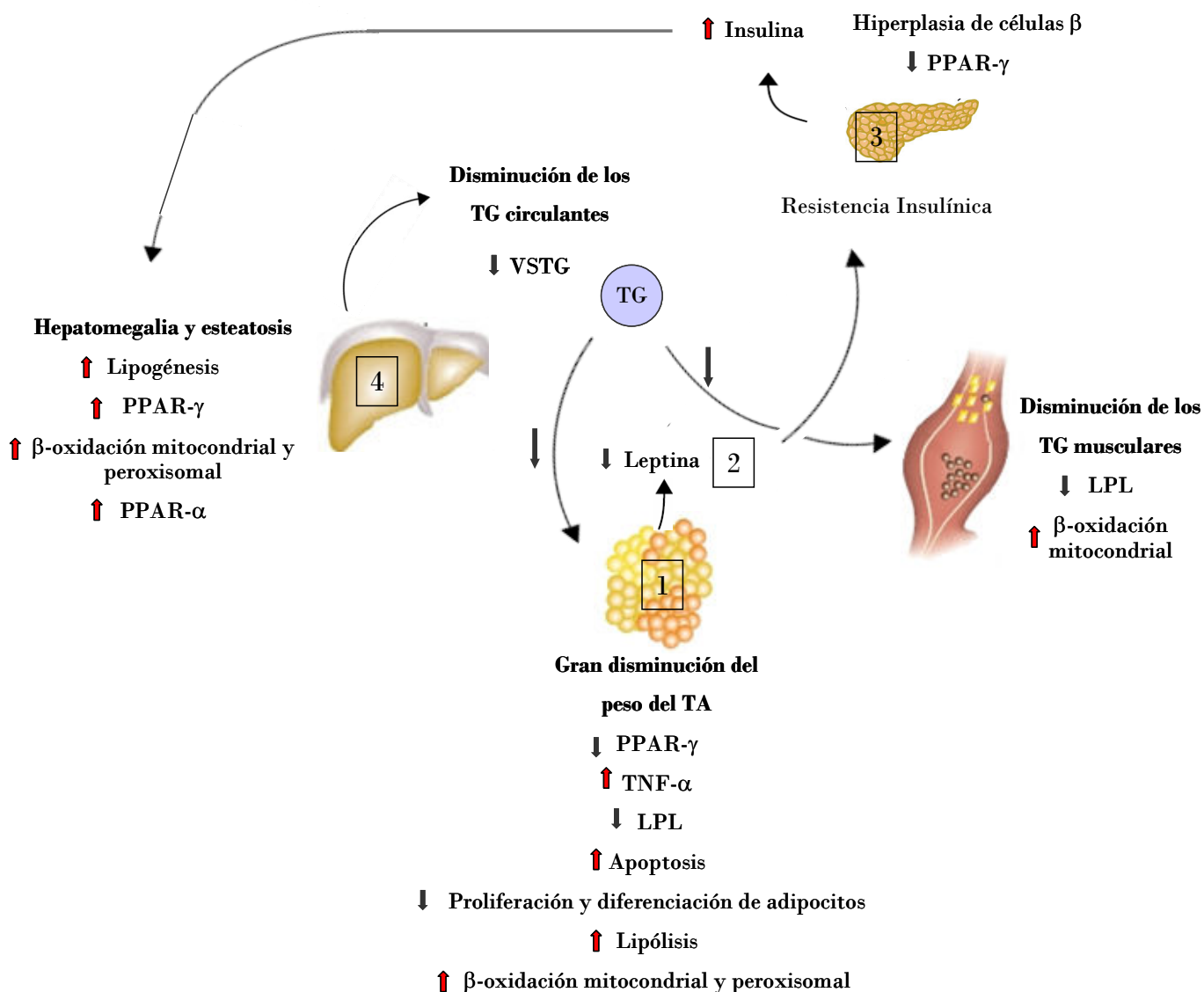


Figura 44: mecanismos asociados a las alteraciones del metabolismo lipídico y modelo cronológico (indicado por los números correspondientes) de la lipodistrofia generada por los CLA (basado en Poirier y col, Biochimie 2005 y en nuestros resultados).

En el caso de nuestro modelo dietario, no se observó un cuadro de lipodistrofia tan marcado como el descrito por otros autores. Esto puede deberse a diferencias en la cepa, sexo, tipo de isómero, contenido de grasa dietaria y duración del tratamiento. El cuadro más marcado de lipodistrofia fue observado por Tsuboyama-Kasaoka y col (2000), cuyo modelo dietario difería del nuestro: se trataba de ratones hembra de 7 semanas de edad al principio del tratamiento, de la cepa C57BL/6J, alimentados con una mezcla de CLA muy similar a la nuestra durante 14 semanas.

#### **4.- CLA Y METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO**

Las mencionadas lipodistrofia e hiperinsulinemia podrían estar asociadas a alteraciones en el metabolismo de la glucosa. En este sentido, muy pocos datos hay referidos a los efectos de los CLA sobre los niveles de glucosa y su regulación. La glucemia no mostró variaciones consecuentes a la ingesta de elevadas cantidades de grasa dietaria ni a la adición de CLA. Varios autores han reportado ausencia de cambios en los niveles de glucemia acompañados de altos valores de insulina plasmática y un abrupto descenso de los niveles de leptina y adiponectina en modelos de ratón alimentados con CLA (Ide 2005; Tsuboyama-Kasaoka y col, 2000; Clement y col, 2002; Liu y col, 2007).

El metabolismo de la glucosa, evaluado a través del contenido de distintos intermediarios relacionados a la utilización y metabolización de la misma en hígado y músculo gastrocnemius, mostró importantes alteraciones inducidas por elevados niveles de grasa dietaria y por la inclusión de CLA. Al menos a nuestro conocimiento, no hay datos bibliográficos sobre este tema con los que podamos contrastar nuestros resultados.

A nivel hepático, las principales alteraciones observadas en el metabolismo de la glucosa estuvieron asociadas a una marcada disminución en el flujo de

sustratos a través de la enzima FosfoFructo-Kinasa-1 $\alpha$  (PFK-1 $\alpha$ ) como lo demuestra la reducción en la relación F-1,6-P<sub>2</sub>/F-6-P, tanto por la ingesta de elevada cantidad de grasa dietaria como por el consumo de CLA. Esta posible inhibición de la PFK-1 $\alpha$  podría estar asociada al contenido de citrato, que fuera más de tres veces incrementado por la ingesta de altas cantidades de grasa dietaria. Si bien los CLA redujeron parcialmente los niveles de citrato hepático, pareciera que los mismos permanecieron lo suficientemente altos para mantener la inhibición de la PFK-1 $\alpha$ . No obstante, esta ligera alteración de los niveles de citrato podría estar asociada a un incremento en la expresión del transportador mitocondrial de citrato (CIC) por efecto de los CLA, como fuera reportado por Ferramosca y col (2006). El CIC exporta el citrato formado en la matriz mitocondrial hacia el citosol, suministrando así las unidades de carbono necesarias para la lipogénesis. Así, estos aumentos de los niveles de citrato podrían estar relacionados a la mayor disponibilidad de lípidos hepáticos. El citrato es también un modulador alostérico de la enzima ACC, cuya expresión génica se encuentra incrementada por efecto de los CLA (Javadi y col, 2004), lo que conduciría a una mayor síntesis de AG hepáticos. Estos mecanismos explicarían parcialmente el mayor incremento de la lipogénesis hepática producida por la adición de CLA, conduciendo a la esteatosis hepática. A diferencia de las alteraciones observadas en la vía glucolítica a nivel hepático en este trabajo, Choi y col (2004) no hallaron alteraciones en la actividad de enzimas hepáticas relacionadas tanto a la glucólisis como a la gluconeogénesis en un modelo de ratas alimentadas con CLA a elevados niveles de grasa dietaria. Específicamente, estos autores no encontraron diferencias como consecuencia de la ingesta de CLA en las actividades Glucokinasa, G-6-Fosfatasa y Fosfoenolpiruvato-Carboxi-Kinasa (PEPCK). Asimismo, Giudetti y col (2005) no encontraron alteraciones en la actividad de la enzima PFK-1 $\alpha$  en hígado de ratas alimentadas con CLA. Es de destacar que estos trabajos fueron realizados en modelos experimentales diferentes al nuestro, los cuales son menos susceptibles a alteraciones en el metabolismo lipídico e hidrogenado.

Otro hallazgo notable fue el incremento del contenido hepático de lactato. Si bien no existen datos en este sentido, una posible hipótesis consideraría que la ingesta de CLA afecte la función mitocondrial (Kramer y col, 1998); así la oxidación de piruvato se podría ver comprometida, y éste sería convertido en lactato, ya que esta sería la única reacción posible fuera de la mitocondria (derHofstede y col, 2004; Brinkman y col, 1998). De esta manera, el aumento del lactato en el hígado estaría relacionado a un desbalance del estado energético, que conduciría a una alteración del estado rédox citoplasmático. Además, aumentos del lactato a nivel hepático podrían conducir a un incremento del lactato en suero, el cual es considerado un marcador relacionado a la lipodistrofia (Haugaard y col, 2006).

Además de las alteraciones denotadas en la vía glucolítica, encontramos que la ingesta de elevadas cantidades de grasa dietaria, como también la adición de CLA, incrementaron el contenido de glucógeno hepático. Nuestros hallazgos, aunque son compatibles con una derivación del metabolismo de la glucosa hacia la síntesis de glucógeno, no fueron sustentados por otros autores. Javadi y col (2004) no hallaron diferencias en el contenido hepático de glucógeno en ratones alimentados con CLA a elevados niveles de grasa dietaria durante 3 ni 12 semanas, y Ohnuki y col (2001) tampoco, en un estudio similar. Cabe aclarar que estos autores no evaluaron la vía glucolítica.

En forma semejante a los hallados en el hígado, el músculo gastrocnemius mostró alteraciones en el metabolismo de la glucosa. No obstante, este tejido pareciera ser menos afectado y los mecanismos involucrados podrían ser diferentes. La ingesta de elevados niveles de grasa dietaria disminuyó el flujo a través de la enzima PFK-1 $\alpha$ , y la adición de CLA acentuó esta inhibición. Si bien inesperadamente los niveles de citrato muscular no difirieron entre los grupos experimentales, es posible interpretar la inhibición de la PFK-1 $\alpha$  a través de la elevada disponibilidad de lípidos musculares observada como consecuencia del consumo de elevados niveles de grasa dietaria y a través de un incremento en la  $\beta$ -oxidación muscular reportada por otros autores (Zabala y col, 2006a; Park y col,

1997) por la adición de CLA. Metabolitos reguladores no evaluados por nosotros, como los niveles de F-2,6-P<sub>2</sub>, entre otros, podrían también estar involucrados.

En forma semejante a lo ocurrido en el hígado, la inhibición de la vía glucolítica podría derivar hacia una mayor síntesis de glucógeno muscular, pero la misma no es acentuada por la inclusión de CLA en la dieta. Estos resultados son coincidentes con los de Zabala y col (2006a), quienes no encontraron diferencias inducida por la ingesta de CLA en un modelo animal de hamsters alimentados con niveles normales de grasa dietaria. En congruencia con los resultados mencionados, Ryder y col (2001) tampoco hallaron diferencias en el contenido de glucógeno muscular en ratas diabéticas alimentadas con CLA, aunque la actividad glucógeno sintasa estuvo aumentada. Cabe destacar que en nuestro trabajo, aunque se evaluó la vía glucolítica y los depósitos de glucógeno en hígado y músculo gastrocnemius, no se estudiaron diversos mecanismos que podrían afectar a la misma a distinto plazo, como ser cambios hormonales y de sensibilidad a diversas hormonas, alteraciones en sistemas de *feedback* negativo del sistema endócrino, composición lipídica de los tejidos, estado rédox citoplasmático y mitocondrial, etc.

Por otro lado, hay evidencias de alteraciones en el metabolismo de la glucosa en otros tejidos como consecuencia de la ingesta de CLA. En adipocitos, Xu y col (2003) reportaron una disminución en la incorporación de los átomos de carbono provenientes de la glucosa, tanto en el glicerol como en los AG, y Perez-Matute y col (2007) encontraron un incremento en el porcentaje de átomos de carbono provenientes de la glucosa metabolizados a lactato relacionado a una baja producción de leptina, lo que indicaría la interrelación entre la vía glucolítica y las alteraciones en la producción de adipocitoquinas. A su vez, Tsuboyama-Kasaoka y col (2000), Takahashi y col (2002) y Kang y col (2003) han hallado una disminución de la expresión de GLUT-4 ligado a un incremento en la producción de TNF- $\alpha$  en tejido adiposo, y un incremento en el mRNA de GLUT-4 en músculo, factores relacionados con la resistencia periférica a la insulina. Al incrementar la cantidad de grasa dietaria manteniendo la ingesta de CLA, Tsuboyama-Kasaoka y col (2003)



hallaron que tanto estos parámetros como los niveles plasmáticos de insulina y leptina eran parcial o totalmente normalizados. Estas observaciones nos llevan a deducir que el elevado contenido de grasa de nuestras dietas podría parcialmente evitar el desarrollo de un marcado cuadro de lipodistrofia asociado a grandes alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono. Por otro lado, Choi y col (2004) reportaron que la ingesta de ambos isómeros CLA, juntos o por separado, en un modelo de ratas alimentadas con elevados niveles de grasa dietaria, disminuye la resistencia insulínica, posiblemente debido a un incremento en la oxidación grasa y en el gasto energético reflejado por un incremento en la actividad de la enzima ACO en hígado y músculo esquelético. Estas diferencias podrían ser parcialmente explicadas por la distinta susceptibilidad de las especies.

También se cuantificaron los niveles de **metabolitos energéticos** en hígado y músculo gastrocnemius. Aunque no se observaron alteraciones en los niveles de ATP hepático ni muscular, la ingesta de altas cantidades de grasa dietaria incrementó los niveles de creatina-P y disminuyó los de creatina, incrementando así la relación creatina-P/creatina en un 90%. Si bien estos resultados no son acordes a otros encontrados previamente en ratas alimentadas con dieta rica en grasa (Bernal y col, 2006), es posible hipotetizar que en los ratones la mayor disponibilidad de lípidos musculares encontrada en los animales alimentados con elevados niveles de grasa, o la mayor  $\beta$ -oxidación observada por otros autores en animales alimentados con CLA podrían inducir una mayor interconversión de creatina a creatina-P.

## 5.- CLA Y STRESS OXIDATIVO

La marcada esteatosis hepática observada en nuestro modelo experimental, potencialmente incrementa la cantidad de sustrato disponible para la **peroxidación lipídica**. Los PUFAs son muy susceptibles a la peroxidación espontánea, formándose así hidroperóxidos y aldehidos reactivos. Al mismo tiempo, el

contenido de AG en los hepatocitos incrementa los niveles de PPAR $\alpha$ , lo cual aumenta la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal, resultando en la generación de especies reactivas al oxígeno.

Los resultados observados en hígado indicarían que una dieta rica en grasas insaturadas induce stress oxidativo, reflejado por elevados valores de lipoperoxidación (LPO). Si bien muchos factores podrían estar involucrados en esta alteración, nuestros resultados son compatibles con una inhibición de la enzima catalasa. La adición de CLA a la dieta rica en grasa previno la aparición de stress oxidativo. Un mecanismo compensador implicado podría ser mediado por el incremento del contenido de glutathion reducido (GSH), dado que las actividades de las enzimas protectoras catalasa y glutathion peroxidasa (GSH-Px) son aún más bajas que aquellas observadas con dieta grasa rica en ácido linoleico. La esteatosis hepática se asocia frecuentemente al stress oxidativo dentro de sus causas etiológicas. Varios autores han encontrado resultados semejantes a los nuestros al administrar dietas con alto contenido de grasa. Sailaja y col (2004) hallaron incrementados niveles de LPO asociados a un fuerte descenso en varios sistemas enzimáticos a nivel hepático, mientras que Lin y col (2008) y Yang y col (2006) reportaron resultados similares, acompañados por un descenso de los niveles de GSH, no observado por nosotros. La suma de esteatosis hepática causada por el consumo de elevadas cantidades de grasa y stress oxidativo debido a la aparición de especies reactivas al oxígeno puede llevar a la progresión de una simple esteatosis en esteatohepatitis no alcohólica, fibrosis o cirrosis (Mehta y col, 2002).

La capacidad de los CLA de prevenir el incremento de los niveles hepáticos de LPO fue hallada también por Livisay y col (2000), quienes reportaron que la habilidad de los CLA de disminuir la formación de los mismos sin afectar otros marcadores de oxidación sugiere que la menor generación de stress oxidativo sería el resultado de una disminución en el contenido de PUFAs de las membranas. Aunque los CLA no actúen en forma directa como antioxidantes, su habilidad de alterar la composición de AG de membrana podría disminuir la formación de

productos citotóxicos. Este resultado puede relacionarse al potencial efecto antioxidante de los CLA que Yu y col (2001) evaluaron *in vitro*, sugiriendo que podrían ejercer un efecto de *quenching* sobre los radicales libres, protegiendo así contra los efectos deletéreos de los peróxidos. Otro posible mecanismo relacionado a la ingesta de CLA podría ser un incremento de los niveles de GSH, hallazgo reportado también por Arab y col (2006), quienes demostraron que los CLA son los únicos PUFAs capaces de generar este efecto. En este estudio en células de cultivo que involucra solamente al isómero *c9,t11*-CLA, el incremento en los niveles de GSH fue independiente de la aparición de stress oxidativo. El contenido hepático de GSH es mantenido mediante la reducción del glutation oxidado por medio la enzima glutation reductasa y la síntesis de novo por acción de la enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteína ligasa ( $\gamma$ -GCL). Los principales inductores de esta enzima son los niveles de LPO y la acción de los PPAR- $\gamma$ . Ya que, como se vio anteriormente, los CLA inducen la expresión de PPAR- $\gamma$  en el hígado (Liu y col, 2007, Poirier y col, 2005), el incremento de los niveles de GSH podría ser una de las tantas acciones de los CLA mediada por estos receptores. En el mismo estudio se sugiere que la conformación espacial que presentan los CLA, de tipo hairpin, es la que permite interacciones hidrofóbicas específicas con las proteínas, y puede explicar su interacción con los PPAR. Kim y col (2005) también evaluaron el potencial poder antioxidante de los CLA, pero en este estudio en un modelo de ratas se administraron dietas carentes de vitamina E. En este caso, los CLA alteraron la composición lipídica de la membrana celular, disminuyendo los niveles de AG susceptibles a la oxidación tales como ácido linoleico, linolénico y araquidónico, lo que se relacionó con una disminución en los niveles de LPO con respecto al grupo alimentado sin vitamina E. Otros autores (Santos Zago y col, 2007), trabajando con ratas alimentadas con mezcla de CLA a niveles normales de grasa dietaria, observaron una leve disminución de los niveles de LPO acompañada de menores valores de actividad catalasa en suero, pero la comparación de los resultados con los nuestros fue muy dificultosa por las diferencias entre los modelos utilizados.

Por otro lado, Bergamo y col (2004) demostraron que los CLA ejercen un efecto proapoptótico al generar radicales libres en células de cultivo. Estas evidencias se corresponden con los hallazgos de Devery y col (2001), que explican que un aumento en la LPO generado por la presencia de CLA puede contribuir a los efectos citotóxicos en células tumorales, mecanismo que explicaría, al menos en parte, la acción anticancerígena de este compuesto. Por otro lado, Riserus y col (2002) evaluaron marcadores de stress oxidativo como prostaglandina  $\text{PGF}_2$  y sus metabolitos en humanos que consumen de CLA, encontrando niveles elevados. Tantos resultados discordantes entre sí merecen mayores estudios.

## 6.- CLA Y REPRODUCCIÓN

En esta parte del estudio evaluamos el efecto de los CLA a elevados niveles de grasa dietaria sobre parámetros reproductivos de ratones machos y hembras en la primera y segunda generación. Los resultados mostraron que en ratones hembra, tanto el nivel de grasa dietaria como la presencia de CLA, así como el momento en que estos parámetros fueron evaluados (primera o segunda generación) influenciaron la tasa de resorción y la expresión de diferentes citoquinas que podrían jugar un rol importante en los mecanismos inmunológicos involucrados en la viabilidad fetal. En ratones macho, la cantidad de grasa dietaria y la presencia de CLA afectaron algunos de los parámetros analizados.

Los efectos de la ingesta de elevados niveles de grasa dietaria no han sido bien descriptos anteriormente. Se ha reportado que dietas grasas reducen la tasa de concepción y la sobrevivencia de la cría en el período perinatal (Shaw y col, 1997). Concordando con estos resultados, observamos que las hembras que ingirieron altos niveles de grasa dietaria presentaron resorciones en ambas generaciones evaluadas y que los machos mostraron menor tasa de reacción acrosomal en la primera generación. La ingesta de CLA no modificó la tasa de resorciones ni el recuento y

motilidad de los espermatozoides, sin embargo, se observó una menor tasa de reacción acrosomal en la segunda generación.

Es muy conocido que las citoquinas juegan un rol importante en la preñez. El paradigma Th1/Th2/Th3 propone que un balance entre las citoquinas del tipo Th1 y las del tipo Th2/Th3 es crítico para una preñez exitosa. En los mamíferos se ha demostrado que la producción de citoquinas Th2 y Th3 (IL-4, IL-10 y TGF- $\beta$ ) en la interface feto-materna favorece el mantenimiento y la inmunoregulación de la preñez (Simon y col, 1995, Wegmann y col, 1993), así como la implantación del embrión y el desarrollo de la placenta. En contraste, un patrón predominante Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) se asocia a muerte fetal. Sin embargo, en la actualidad ciertos autores cuestionan este paradigma, ya que las interacciones de las citoquinas que gobiernan la regulación inmune son mucho más complejas (Chaouat y col, 2002). En este trabajo analizamos el efecto de elevados niveles de grasa dietaria y de la presencia de CLA en la expresión placentaria de IL-4, TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . Los resultados nos muestran que altos niveles de grasa disminuyeron la expresión de IL-4 sólo en la primera generación, mientras que la presencia de CLA la redujo en ambas experiencias. Con respecto a la expresión de TNF- $\alpha$ , en la segunda generación la ingesta de elevados niveles de grasa dietaria incrementó su expresión, mientras que la de CLA la normalizó. Esto indicaría que la presencia de CLA podría ejercer un efecto atemperador en la expresión de esta citoquina proinflamatoria. Estos resultados coinciden con los de Song y col (2005) y Changhua y col (2005). Estos autores observaron que los CLA disminuyen los niveles de mRNA de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) inducidos por la inyección de lipopolisacárido (LPS), e incrementa la expresión de IL-10. Con respecto a la expresión de TGF- $\beta$ , ésta fue disminuida por la presencia de CLA en ambas generaciones estudiadas. Estos resultados nos muestran que los fetos resorbidos hallados en la primera generación en los animales alimentados con elevados niveles de grasa dietaria se correlacionan con una disminución en la expresión de IL-4, mientras que los observados como consecuencia de la ingesta de

CLA coinciden con la menor expresión de IL-4 y de TGF- $\beta$ . Los resultados de la segunda generación concuerdan con el paradigma Th1/Th2 ya que las resorciones observadas en los animales que recibieron altos niveles de grasa se correlacionaron con un incremento en la expresión de una citoquina proinflamatoria como es el TNF- $\alpha$ , mientras que los hallados en los animales que ingirieron CLA concuerdan con una baja expresión de citoquinas protectoras (IL-4 y TGF- $\beta$ ), ya que los niveles de TNF- $\alpha$  fueron normales. Resumiendo, nuestros resultados sugieren que tanto los altos niveles de grasa dietaria como la presencia de CLA en la dieta podrían afectar la performance reproductiva en ratones. En los machos, una hipótesis sería que podría estar afectada la funcionalidad de la membrana de los espermatozoides, mientras que en las hembras, posibles alteraciones en la producción de citoquinas en la interface feto-materna podría disminuir la viabilidad fetal, llevando a un mayor número de fetos resorbidos.