

Artículo de investigación

NIVELES DE DIENOS CONJUGADOS Y MALONDIALDEHIDO EN HÍGADO DE RATAS CON SÍNDROME METABÓLICO EXPERIMENTAL

Levels of malondialdehy and conjugated dienes in liver of rats with experimental metabolic syndrome.

Flores C^{1*}, Corro A., Meléndez C¹, Matheus N¹, Márquez Y¹, López-Ortega AA¹

¹Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales Dr. Haity Moussatché (UNIHM) del Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centrocidental "Lisandro Alvarado" (UCLA), Barquisimeto (Lara, Venezuela). Tel. 0251-2592630. E-mail: caf06@hotmail.com

RESUMEN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de anomalías metabólicas, la cual cursa con hepatoesteatosis que se ha asociado con estrés oxidativo hepático. En este estudio se determinaron niveles de dienos conjugados (DC) y malondialdehído (MDA) hepáticos en SM experimental. Para ello, se utilizaron ratas machos adultas Sprague Dawley y se realizó inducción del SM con fructosa al 10% en el agua de bebida por 15 días, al finalizar este tiempo se obtuvo muestra de sangre en ayunas para determinar la química sanguínea (glucosa, triglicéridos y colesterol) mediante kits comerciales e insulina por ELISA competitivo. Las muestras de hígado se homogenizaron para cuantificar los niveles de DC (extracción por isopropanol) y MDA (TBARS). El grupo con SM mostró elevación de los niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol e insulina de manera significativa ($p \leq 0,05$) con respecto al grupo control. En cuanto a los niveles de DC hepático se observó un ligero aumento en el grupo con SM ($0,0014 \pm 0,00016$ moles/mg PT) al compararlo con el grupo control ($0,0012 \pm 0,00014$ moles/mg PT) sin alcanzar diferencia significativa, por su parte los niveles de MDA el grupo control ($1,8 \pm 0,15$ nmoles/mg PT) posee niveles más altos que los animales con SM ($1,5 \pm 0,08$ nmoles/mg PT) sin diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Conclusión: La fructosa fue efectiva como inductor de SM. Los niveles de DC y MDA no se encuentran elevados, lo que pudiera estar relacionado con la capacidad que tienen las células para activar mecanismos antioxidantes (Mn-SOD y NADPH) ante la presencia de los radicales libres a los 15 días de la inducción de SM.

Palabras Clave: Síndrome metabólico, MDA, dienos conjugados, hígado.

ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) is a cluster of metabolic abnormalities, which presents with hepatosteatosis associated with hepatic oxidative stress. In this study, hepatic level of conjugated dienes (DC) and malondialdehyde (MDA) in experimental SM were determined. Adult male Sprague Dawley rats were used and induction of SM was performed with 10% fructose in drinking water for 15 days, at the end of this time Fasting blood sample was obtained to determine blood chemistries (glucose, triglycerides and cholesterol) by commercial kits and insulin by competitive ELISA. Liver samples were homogenized to quantify levels of DC (isopropanol extraction) and MDA (TBARS). The SM group showed elevated levels of glucose, triglycerides, cholesterol and insulin significantly ($p \leq 0,05$) relative to the control group. As regard the levels of liver DC a slight increase in the group with MS (0.0014 ± 0.00016 mol / mg PT) when compared with the control group (0.0012 ± 0.00014 mol / PT mg) was observed without reaching significant difference, meanwhile MDA levels of the control group (1.8 ± 0.15 nmol / mg PT) has higher levels than the animals with SM (1.5 ± 0.08 nmol / mg PT) no significant differences ($p \leq 0,05$). Conclusion: Fructose was effective to induce SM. The levels of DC and MDA are not high, which could be related to the ability of cells to activate antioxidant mechanisms (Mn-SOD and NADPH) in presence of free radicals within 15 days of SM induction.

Key Words: Metabolic syndrome, MDA, conjugated dienes, liver.

INTRODUCCIÓN

Al síndrome metabólico (SM), se le considera como una serie de mediciones corporales no saludables y de resultados anormales en el análisis de laboratorio que ponen a las personas que lo presentan en alto riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y Diabetes Mellitus [1]. De acuerdo a los Criterios propuestos por la OMS los parámetros principales para el diagnóstico del síndrome metabólico, son: glucemia en ayuno >110 mg/dl, hipertensión arterial: $\geq 140/90$ mm Hg, elevación de triglicéridos sanguíneos, obesidad abdominal o elevación del índice de masa corporal (IMC), además, microalbuminuria (≥ 20 μ g albúmina /min) [2].

Para comprender los procesos fisiopatológicos y establecer nuevas terapias, los modelos animales constituyen una valiosa herramienta [3], los hidratos de carbono refinados (fructosa y sacarosa), son utilizados como inductores de SM, por causar aumento de la masa corporal, de los niveles de triglicéridos en circulación y desarrollar resistencia a la insulina en los animales, lo que puede ser usado como referencia en humanos [4].

En la actualidad se ha observado a nivel mundial un incremento de aproximadamente de 24% en la prevalencia de SM [5], con una mayor incidencia en varones asimismo, es más frecuente en individuos mayores de 60 años (40%) y en todos los casos existe mayor susceptibilidad a presentar cardiopatía isquémica (13,9%) incluso más elevada que en pacientes con diabetes mellitus (DM) sin SM (7,5%) [6]. Dentro de la fisiopatología del SM se encuentra la acumulación progresiva de ácidos grasos en los hepatocitos (hepatoesteatosis) como consecuencia de la resistencia a la insulina [7]. La hepatoesteatosis experimental y la diabetes mellitus se han relacionado con elevación de biomarcadores de estrés oxidativo (dienes conjugados y MDA), acompañado de aumento en las transaminasas [8, 9]. Con el fin de conocer aún más sobre la fisiopatología de la enfermedad, este estudio busca determinar si el síndrome metabólico experimental inducido por fructosa, cursa con estrés oxidativo hepático.

MATERIALES Y MÉTODO

Diseño de experimento

La investigación realizada es de tipo experimental con un diseño controlado, Se realizó en la Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales “Dr. Haity Moussatché” (UNIHM) del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado (UCLA). Se utilizaron 10 ratas machos adultas de la cepa Sprague Dawley provenientes del Bioterio Central de la UCLA y fueron

mantenidas bajo condiciones estandarizadas de luz, agua y alimentación, siguiendo lo establecido en el Código de Ética para la Vida de la República Bolivariana de Venezuela (2010) en su segunda parte capítulo 3. Los animales fueron divididos de manera aleatoria en dos grupos: control y experimental, a éste último grupo se le realizó inducción del síndrome metabólico con fructosa al 10% en agua de bebida por 15 días *ad libitum* [10]. La determinación del SM se estableció por la modificación en ayunas de los parámetros séricos de: glucosa, triglicéridos, colesterol e insulina, cuya elevación nos corroboró el cuadro de SM en las ratas del grupo experimental.

Determinación de parámetros sanguíneos

Para la toma de muestra de sangre los animales se encontraban en ayunas desde la noche anterior. El procedimiento de eutanasia fue realizado mediante decapitación, previa sedación de las unidades experimentales con éter, la muestra fue colectada en tubos de vidrio sin anticoagulante. Los niveles séricos de glucosa (Qualitest), triglicéridos (Bioscience) y colesterol (Wiener) se cuantificaron mediante kits comerciales a través de técnicas fotocolorimétricas mediante la metodología de Trinder (1969) y los resultados fueron presentados en mg/dL. En el caso de la insulina fue cuantificada en U/ml, mediante la técnica de ELISA competitiva (ELISAc). Para ello se utilizó el Kit DRG Diagnostic (DRG Instrument GmbH, Alemania) con un coeficiente de variación intraensayo de 1,8% e interensayo de 2,9%.

Determinación de indicadores hepáticos de lipoperoxidación

Para cuantificar los valores de DC y MDA, las muestras de hígado fueron homogenizadas con tris-sacarosa en una proporción de 1:3.

En el caso de los DC se realizó la extracción con 900 μ l de isopropanol, [11] en 100 μ l de muestra diluida (1:40), para un volumen final de 1 ml, que luego fue mezclado en un vortex (Termolyne) durante dos minutos y centrifugadas a 5500 x g, durante 5 minutos a 15 °C en microcentrífuga refrigerada Eppendorf 5402 ® (Westbury, NY, USA). Las muestras fueron leídas a 232 nm en espectrofotómetro Genesys 10 ® (Rochester, NY, USA). Para los cálculos, se utilizó el coeficiente de extinción molar de 27000 M⁻¹ cm⁻¹ y expresadas las concentraciones, en moles de DC por mg de proteínas.

Por su parte, el MDA se cuantificó mediante el test para sustancias reaccionantes con el ácido 2- tío barbitúrico (TBARS), según la técnica de Okawa et al. [12], para ello se utilizó 100 μ l de muestra y se agregó de manera

Estrés oxidativo hepático en síndrome metabólico experimental

sucesiva 1.5 ml de ácido acético glacial al 20% (pH 3.5), 200 µl dodecil sulfato de sodio (SDS) al 8.1% y 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.8%. Los tubos con tapa sin enroscar se incubaron a 95 °C durante 60 minutos y se enfriaron por 8 minutos en agua a 18 °C, posteriormente se agregó 1 ml de agua destilada y 5 ml de butanol, para luego ser centrifugados a 3000 xg durante 10 minutos. El sobrenadante fue leído en un espectrofotómetro GENESYS 10 a 532 nm. Para realizar los cálculos se utilizó una curva estándar con el 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) como patrón. La concentración de MDA se expresó en nmoles de malondialdehído (MDA) por mg de proteína.

Las proteínas totales se determinaron mediante el kit Bio Rad (Richmond, CA, USA) basado en el método de Bradford [13].

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante prueba t, con el paquete estadístico SPSS versión 15.0 para Windows, con una $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Luego de 15 días de consumo de fructosa al 10 % en el agua de bebida, se pudo observar un aumento significativo en los parámetros de química sanguínea (glucosa, triglicéridos y colesterol) en los animales con SM comparados con el grupo control ($p \leq 0,05$). Por su parte, los niveles de insulina presentaron cambios significativos entre los grupos en estudio, donde se evidencia una tendencia al aumento de la concentración de esta hormona en el grupo de animales que se les indujo síndrome metabólico a través del consumo de fructosa (ver Tabla 1).

Con respecto a los parámetros de estrés oxidativo (EO), en este estudio se encontró que los niveles de DC hepáticos del grupo con síndrome metabólico experimental fueron más elevados que en el grupo control (ver Figura 1) sin alcanzar la significancia ($p \leq 0,05$), por su parte en los niveles de MDA el grupo control exhibió concentraciones más elevadas que el grupo con SM (ver Figura 2), sin diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Tabla I.- MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE PARÁMETROS SANGUÍNEOS DE RATAS SPRAGUE DAWLEY CON SÍNDROME METABÓLICO (SM) EXPERIMENTAL.

Grupo	Glucosa (mg/dL)	Triglicéridos (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Insulina (U/mL)
Control (n=4)	61,5±3,80	38,8± 4,86	40,4±2,90	10,30±0,8
SM (n=7)	144,9±10,39*	209,0± 28,31*	60,9±6,62*	13,1±1,2*

*indica diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con SM. Prueba t ($p \leq 0,05$).

Figura 1.- MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE NIVELES DE DC HEPÁTICOS EN RATAS CON Y SIN SÍNDROME METABÓLICO (SM) EXPERIMENTAL. Los grupos no presentaron diferencias significativas. Prueba t ($p \leq 0,05$). La extracción de DC fue realizada con isopropanol.

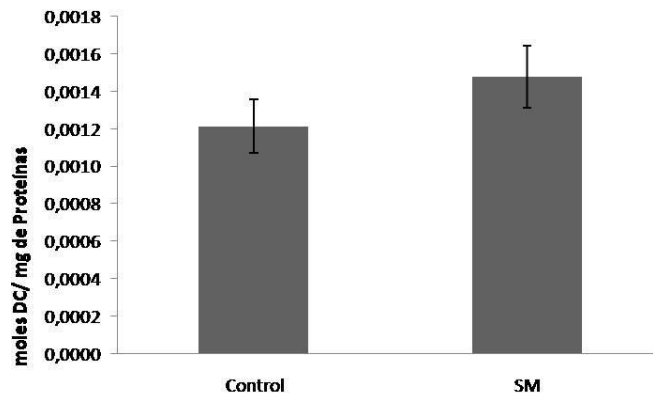
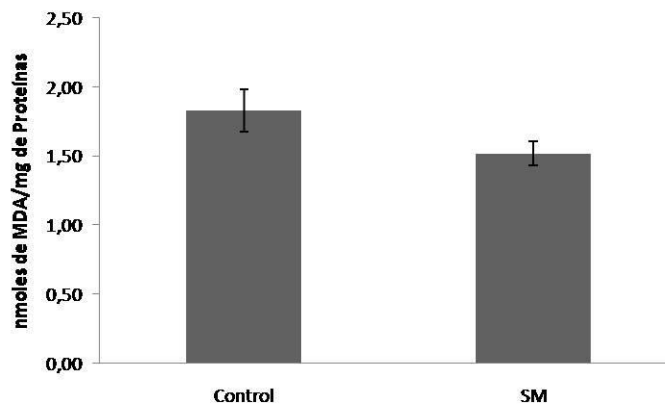


Figura 2.- MEDIA Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE NIVELES DE MDA HEPÁTICOS EN RATAS CON Y SIN SÍNDROME METABÓLICO (SM) EXPERIMENTAL. Los grupos no presentaron diferencias significativas. Prueba t ($p \leq 0,05$). La determinación de MDA fue realizada con TBARS



DISCUSIÓN

El aumento en el consumo de la dieta occidental, rica en hidratos de carbono, es responsable del espectacular aumento del síndrome metabólico [14]. La etiología, que es multifactorial, se ve influida tanto por el medio ambiente como por la genética. El estrés oxidativo, que resulta de la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS), es un importante evento que ocurre en etapas tempranas del síndrome metabólico [15].

Según Vincent y Taylor [16], el estrés oxidativo exagera factores del síndrome metabólico, tales como resistencia a la insulina, hipertrigliceridemia, disminución de la lipoproteína de alta densidad (HDL) y la hipertensión. En este estudio se encontró que luego de 15 días de consumo de fructosa al 10 % en el agua

de bebida los animales presentaron un aumento significativo en la concentración sanguínea de glucosa, triglicéridos y colesterol, así como de la insulina.

Erol [17] y Bloch-Damti et al. [18], reportaron que durante el metabolismo de la glucosa se produce mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), capaces de estimular las respuestas protectoras contra el daño oxidativo mediante el incremento en la expresión de proteínas y agentes antioxidantes [19] por activación de la quinasa Jun-N-terminal de respuesta al estrés oxidativo (JNK) que promueve la translocación nuclear de las proteínas FOXO para la expresión de algunos genes diana importantes, incluyendo la resistencia al estrés oxidativo. Además, la JNK es capaz de fosforilar en los residuos de serina a los receptores de insulina y el sustrato del receptor de insulina (IRS), lo que pudiera acelerar la degradación

de IRS, llevando a la resistencia de la insulina, como mecanismo de defensa. [20], para disminuir la producción de ROS por metabolismo glucolítico [17], lo que explicaría la tendencia al aumento en la concentración sérica de insulina encontrados en este estudio. La asociación del aumento de los ROS con la resistencia a la insulina, no se limita a esta, sino también en pacientes con resistencia a la insulina en la diabetes tipo 2, en los individuos obesos no diabéticos, lo que ofrece una explicación atractiva para la base molecular de la resistencia a la insulina inducida por el estrés oxidativo [18, 20].

Como consecuencia de la resistencia a la insulina, en el SM se desarrolla la acumulación progresiva de ácidos grasos en los hepatocitos (hepatoesteatosis) [7, 21]. La hepatoesteatosis experimental y la diabetes mellitus se han relacionado con aumento de los niveles de dienos conjugados y MDA, sin embargo, en esta investigación se pudo observar que los animales que se les indujo síndrome metabólico por consumo de fructosa *ad libitum* al 10% y por 15 días, presentaron aumento (aunque no estadísticamente significativos) en los niveles de Dienos Conjugados y disminución en los niveles de MDA, como biomarcadores del proceso oxidativo en los lípidos poliinsaturados de la membrana celular de los hepatocitos.

Estudios realizados en espermatozoides donde se utilizó fructosa como fuente energética, se pudo constatar, el aumento de la concentración de ROS [22], este evento pudiera estar relacionado con disminución en la producción de agentes reductores (NADPH) por la vía de las pentosas fosfato. Esta misma condición, se pudiera estar presentando en el modelo experimental utilizado en este estudio, al administrar fructosa por tiempo prolongado como inductor de SM, aumentar las concentraciones de ROS en la primera etapa, que conllevaría a la sobre expresión de mecanismos antioxidantes en el hepatocito. La tendencia al incremento del daño oxidativo en los lípidos de la membrana del hepatocito en SM puede ser un efecto a largo plazo, por lo que se requiere mayor tiempo de ingesta de fructosa en el modelo experimental para manifestar las lesiones en las membranas celulares o una sobre expresión de los mecanismos antioxidantes.

AGRADECIMIENTO

Los investigadores agradecen al CDCHT-UCLA por el financiamiento del proyecto 007-VE-2012 necesario para la realización de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Torpy JM, Lynn C, Glass R. El Síndrome metabólico. JAMA 2006; 295(7):723-850.

[2] López ME, Sosa MA, Paulo N, Labrousse M. Síndrome metabólico. Rev PosgradoVI Cátedra Med 2007; 174:12-15.

[3] Ayala De La Peña I, Cámara P, Fernández Pardo J, Flores I, Cascales AI, Gutiérrez Panizo C, Valdés M, Castells Mora MT, García Pérez B. Modelos animales experimentales de enfermedad de hígado graso y síndrome metabólico. Anal Vet (Murcia) 2008; 24:5-16.

[4] Angelova P, Boyadjiev N. A review on the models of obesity and metabolic syndrome in rats. Trakia J Sci 2013; 1:5-12.

[5] Lizarzaburu JC. Síndrome metabólico: concepto y aplicación práctica. Anales Fac Med, USM 2013; 74(4):315-320.

[6] Cordero A, Alegría E, León M. Prevalencia de síndrome metabólico. Rev Esp Cardiol Supl 2005; 5(D):11-15.

[7] Ferretti SE, Tanno ME, Vorobioff JD. Hígado graso, resistencia insulínica y síndrome metabólico. Anuario Fundación Dr. J. R. Villavicencio 2004; XII: 084-086.

[8] Mendoza C, Márquez YC, Matheus N, Aranguren A, El Abed Y, López-Ortega AA. Correlación entre la concentración de glucosa, hígado graso y estrés oxidativo hepático en Diabetes Mellitus. Gaceta Cs Vet 2010; 15(2):58-63.

[9] López-Ortega AA, Aranguren AJ, Plaza MA, Murillo M.D. Estrés oxidativo y alteraciones de la funcionalidad hepática en ratones hembras con hígado graso experimental. Rev vet 2014; 25(1):7-11

[10] Roglans N, Vilá L, Farré M, Alegret M, Sánchez RM, Vazquez-Carrera M and Laguna JC. Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPAR activity in fructose-fed rats. Hepatology 2007; 45(3):778-788.

[11] Wallin B, Rosengren, B, Shertzer H, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. Anal Biochem. 1993; 208:10-15.

[12] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95:351-358.

[13] Bradford M.A. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram of protein utilizing the

principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-254.

[14] Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sánchez-Lozada LG. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86:899-906.

[15] Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci.* 2009; 84:705-712.

[16] Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes* 2006; 30:400-418.

[17] Erol A. Insulin resistance is an evolutionarily conserved physiological mechanism at the cellular level for protection against increased oxidative stress. *Bioessays* 2007; 29(8):811-818.

[18] Bloch-Damti A, Bashan N. Proposed mechanisms for the induction of insulin resistance by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2005; 7(11-12):1553-1567.

[19] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82(1):47-95.

[20] Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7(7-8):1040-1052.

[21] Buqué P, Ochoa B. Fundamento molecular de la esteatosis hepática asociada a la obesidad. *X Rev Esp Enferm Dig.* 2008; 100(9):565-578.

[22] Goodson G, Qiu Y, Sutton A, Xie G, Jia W, O'Brien A. Metabolic substrates exhibit differential effects on functional parameters of mouse sperm capacitation. *Biol Reprod* 2012; 87(3):1-15.