

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Dr. Juan Miguel Castagnino†

Utilidad de la determinación del perfil de ácidos grasos

► Anabel Impa Condori^{1a}, Inés Fernandez^{2a}, María Silvia Giacomino^{1b}, Néstor Pellegrino^{3b}, Nora Slobodianik^{4a}, María Susana Feliu^{2a*}

¹ Bioquímica.

² Doctora de la Universidad de Buenos Aires. Área: Nutrición.

³ Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

⁴ Doctora en Ciencias Químicas.

^a Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

^b Cátedra de Bromatología. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

Al tener en cuenta las consecuencias de los desequilibrios nutricionales en el desarrollo de las enfermedades, se considera importante determinar el perfil de ácidos grasos (AG) en dietas con distintas fuentes lipídicas y su impacto sobre los AG del suero de ratas. Se prepararon dietas con distintas fuentes lipídicas y completas en el resto de los nutrientes. Las fuentes lipídicas fueron: manteca, aceite de oliva, aceite de girasol alto oleico, aceite de girasol y aceite de soja (control). Los animales recibieron las dietas durante 10 días. Se determinó el perfil de AG de las dietas y del suero de las ratas por cromatografía gaseosa. Los cambios en el perfil de AG en suero se producen en función de la fuente lipídica aportada por la dieta. Por ende, es importante esta determinación como diagnóstico de la deficiencia de ácidos grasos esenciales, EPA y DHA, cuyas funciones son fundamentales para el funcionamiento del organismo.

Palabras clave: Ácidos grasos; Cromatografía gaseosa; Lípidos; Dieta

Usefulness of the determination of the fatty acids profile

Abstract

Taking into account the consequences of nutritional imbalances in the development of diseases, it is considered important to determine the profile of fatty acids (FA) in diets with different lipid sources and their impact on serum FA of growing rats. Diets with different lipid sources and complete in the rest of the nutrients were prepared. The lipid sources used were butter, olive oil, high oleic sunflower oil, sunflower oil, and soybean oil (control). Animals were fed with experimental and control diets for 10 days. The FA profile of the diets and of rat serum was determined by gas chromatography (GC). Changes in FA profile in serum occur depending on the source of fat provided by the diet. Therefore, the determination of fatty acids is of utmost importance, as a diagnosis of the deficiency of essential fatty acids, EPA and DHA, whose functions are essential for the proper functioning of the body.

Keywords: Fatty acids; Gas chromatography; Lipids; Diet

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Utilidade da determinação do perfil de ácidos graxos

Resumo

Tendo em conta as consequências dos desequilíbrios nutricionais no desenvolvimento das doenças, considera-se importante determinar o perfil de ácidos graxos (AG) em dietas com diferentes fontes lipídicas e o seu impacto nos AG do soro de ratos. Foram elaboradas dietas com diferentes fontes lipídicas e completas no restante dos nutrientes. As fontes lipídicas utilizadas foram: manteiga, azeite, óleo de girassol alto oleico, óleo de girassol e óleo de soja (controle). Os animais foram alimentados com dietas por 10 dias. O perfil de AG das dietas e o soro dos ratos foi determinado por cromatografia gasosa. Alterações no perfil de AG em soro ocorrem dependendo da fonte lipídica fornecida pela dieta. Por isso, esta determinação é de extrema importância, como diagnóstico da deficiência de ácidos graxos essenciais, EPA e DHA, cujas funções são essenciais para o funcionamento do organismo.

Palavras-chave: Ácidos graxos; Cromatografia em fase gasosa; Lipídios; Dieta

Introducción

Durante los últimos años, a nivel mundial, han aumentado rápidamente los síntomas de enfermedades no transmisibles (ENT) como consecuencia de la alimentación poco saludable y la falta de actividad física. Las ENT representan uno de los mayores desafíos del siglo XXI para la salud y el desarrollo, tanto por el deterioro humano que provocan como por las desventajas que ocasionan en el entramado socioeconómico de los países.

La Argentina no está exenta de la problemática mundial, según datos de la Dirección de Estadísticas e Información en Salud del Ministerio de Salud de la Nación; de acuerdo a lo informado en la 4ta. Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2018, un 61,6% de la población tiene exceso de peso, un 25,4% presenta obesidad sumado a un 64,9% que no realiza suficiente actividad física. Estos resultados son estadísticamente superiores a los observados en la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2013 (1). En este panorama actual, la alimentación cumple un papel fundamental. Desde hace tiempo los lípidos fueron identificados como un componente fundamental de la dieta y deben ser consumidos en la proporción adecuada. Además de ser la fuente de energía más concentrada, un adecuado perfil de ácidos grasos en la dieta es importante para el crecimiento y para mejorar la calidad de la misma en los individuos. Los ácidos grasos esenciales (AGE), como el ácido linoleico (AL) y el ácido α -linolénico (AAL), que deben ser incorporados por la dieta, presentan numerosas funciones importantes: forman parte de la estructura celular, les dan plasticidad y fluidez a las membranas, favorecen el metabolismo de las grasas y son sustratos para la síntesis de sustancias vitales para el organismo. El AL, perteneciente a la familia

$\omega 6$, es precursor de otros ácidos grasos como el araquidónico (AA), mientras que el AAL, perteneciente a la familia $\omega 3$, da origen a los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) (2) (3).

Los ácidos grasos de la familia $\omega 3$ son considerados protectores de la salud cardiovascular al disminuir los niveles plasmáticos de triglicéridos y colesterol, previniendo la agregación plaquetaria, las arritmias y mejorando la microcirculación (4) (5).

Por otra parte, la formación de eicosanoides es una función biológica importante de los $\omega 6$ y $\omega 3$. El AA y el EPA participan en la producción de eicosanoides biológicamente más activos e importantes. Cada uno de ellos da lugar a una serie diferente de eicosanoides (proinflamatorios y antiinflamatorios, respectivamente). El AA y el EPA compiten por las mismas enzimas y, por lo tanto, los niveles relativos de los productos formados dependen de sus concentraciones en la membrana celular. Los eicosanoides derivados del AA y del EPA, así como los docosanoideos derivados del DHA, están involucrados en varios procesos biológicos entre los que se incluyen la modulación de la inflamación, la agregación plaquetaria, la respuesta inmune, el crecimiento y la proliferación celular (6) (7).

Los ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ resultan determinantes en el desarrollo cerebral, hasta tal punto que pueden ayudar a prevenir el desarrollo de enfermedades como el Alzheimer y/o la esquizofrenia (8).

Las familias de ácidos grasos $\omega 3$, $\omega 6$ y $\omega 9$ comparten la misma ruta biosintética utilizando las mismas enzimas (desaturasas y elongasas). De las tres, la serie $\omega 3$ es la que presenta la mayor afinidad por las mismas; sin embargo, altos niveles de AL pueden inhibir la conversión de AAL en EPA y DHA. La FAO-OMS recomienda que por cada parte de ácidos grasos $\omega 3$ aportados por la dieta, deberían consumirse de 5 a 10

partes de $\omega 6$ (9). En la mayoría de los países industrializados de occidente, como es el caso de la Argentina, se consume una dieta muy desequilibrada en favor de los ácidos grasos $\omega 6$ (relación $\omega 6/\omega 3 = 20:1$). Cuanto más distorsionada sea la relación $\omega 6/\omega 3$, más elevados serán los niveles de lipoproteínas aterogénicas que incrementarán significativamente el riesgo coronario. Además, la Estrategia Mundial sobre Régimen Alimentario, Actividad Física y Salud, las *Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk* y la Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Argentina de Lípidos sobre Diagnóstico y Tratamiento de las Dislipemias en Adultos 2019 proponen, con respecto a los lípidos de la dieta, lograr un equilibrio energético y un peso normal, limitar la ingesta energética procedente de las grasas, sustituir las grasas saturadas por grasas insaturadas y tratar de eliminar los ácidos grasos trans (10) (11) (12).

La calidad y la cantidad de grasas en la dieta afectan significativamente el metabolismo de todas las lipoproteínas plasmáticas y probablemente constituyen los determinantes dietéticos más significativos de los niveles de las mismas.

Los cambios en la ingesta de ácidos grasos afectan la distribución del colesterol de las lipoproteínas LDL y HDL. La reducción en el consumo de ácidos saturados es la forma más eficaz de reducir el nivel de colesterol LDL en suero. El efecto reductor del colesterol sérico total de los ácidos grasos poliinsaturados se produce como resultado de la disminución del nivel de colesterol LDL.

Los ácidos grasos $\omega 3$ tienen poderosas propiedades antiinflamatorias. Los ácidos grasos de la dieta determinan fuertemente la susceptibilidad de las lipoproteínas a la oxidación, lo que también tiene un impacto en la activación de las moléculas de adhesión y otros factores inflamatorios. También modulan ciertos aspectos de la función plaquetaria, la coagulabilidad de la sangre y la actividad fibrinolítica asociada con el riesgo cardiovascular.

Teniendo en cuenta las consecuencias de los desequilibrios nutricionales en el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, se consideró importante determinar el perfil de AG en dietas con distintas fuentes lipídicas y su impacto sobre el perfil de los AG del suero de ratas en período de crecimiento activo. El estudio en un modelo experimental permite fijar una única variable en la dieta, en este caso las distintas fuentes lipídicas.

Materiales y Métodos

En todas las experiencias se utilizaron ratas de la cepa Wistar, de ambos sexos, bien nutridas durante la lactancia (6-8 crías por madre), las cuales se destetaron

al llegar a un peso entre 35-40 gramos (21-23 días de edad). Las mismas pertenecieron a la colonia cerrada del bioterio de la Cátedra de Nutrición de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

En las experiencias se controlaron las condiciones ambientales del bioterio a lo largo de todo el período experimental; la temperatura se mantuvo a 21 ± 1 °C mediante equipos de aire acondicionado y estufas. Se proporcionó un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad mediante un interruptor automático, la humedad promedio registrada fue de aproximadamente 65-70%.

El loteo se realizó siguiendo el método de guarda griega, asegurando un peso promedio parecido entre todos los lotes (6-8 ratas).

Las ratas utilizadas se alojaron individualmente en jaulas de acero galvanizado de piso de malla y cada grupo se distribuyó en forma vertical en las estanterías para independizar el consumo alimenticio de los animales de la influencia de la temperatura a las diferentes alturas de las jaulas. El agua y las dietas se administraron *ad libitum*. En los lotes experimentales se determinó el consumo de dieta cada dos días.

Se prepararon dietas con F%=15 (F%=kcal lipídicas/100 kcal totales) y completas en el resto de los nutrientes, según recomendaciones internacionales, utilizando una dieta de crecimiento (AIN-93) (13).

Las fuentes lipídicas utilizadas fueron las siguientes: manteca (Dieta M); aceite de oliva (Dieta O); aceite de girasol alto oleico (Dieta AO); aceite de girasol (Dieta G); aceite de soja (Dieta Control C).

Se determinó el perfil de ácidos grasos de las dietas por cromatografía gaseosa (GC) y se calcularon las relaciones $\omega 6/\omega 3$ y ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados (AGPI/AGS).

Los animales fueron alimentados con dietas experimentales y control durante 10 días.

Al finalizar todas las experiencias, se mantuvo a las ratas en ayuno por 3-4 horas, luego fueron pesadas y posteriormente sacrificadas, previa anestesia con ketamina/clorhidrato de xilazina.

Se recogió sangre entera por punción venosa y el suero se separó por centrifugación.

Este protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité de Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina, bajo el N° 0047154.

El perfil de ácidos grasos en suero se determinó en un cromatógrafo gaseoso Clarus 500 marca Perkin Elmer (Shelton, EE.UU.). A 200 μ L de suero se le adicionaron 2 mL de mezcla metanol/tolueno (4:1); luego se le agregaron 0,2 mL de cloruro de acetilo. Se incubó a 100 °C durante una hora. Luego se agregaron 5 mL de carbonato de potasio al 6% y se centrifugaron las muestras. Se inyectó 1 μ L de la capa superior en el cro-

matógrafo. Los ácidos grasos se identificaron de acuerdo a su tiempo de retención. Los resultados obtenidos se expresaron en porcentajes de ácidos grasos totales, tomándose como límite de cuantificación un valor de 0,05% (14).

El análisis de la información obtenida se realizó utilizando el programa Graph PAd InStat aplicando: análisis de varianza (ANOVA) seguido por el *test* de Dunnett. Se consideraron significativas las diferencias con el grupo control cuando $p < 0,01$ (15).

Resultados

En la Tabla I se presenta la concentración de los ácidos grasos palmítico, esteárico, oleico, AL y AAL de las dietas utilizadas. Con los datos obtenidos por cromatografía gaseosa se calcularon la relación $\omega 6/\omega 3$ (valor normal 10:1) y la relación AGPI/AGS (valor normal $>1,5$).

Se puede observar que, dependiendo de la fuente de lípidos utilizada, las dietas aportan diferentes cantidades de ácidos grasos. La dieta M ofrece un mayor aporte de ácido palmítico en comparación con las otras dietas. Las dietas O y AO contienen un alto porcentaje

de ácido oleico, y el porcentaje en la dieta AO es aún mayor. La dieta G es aportadora de AL.

La relación $\omega 6/\omega 3$ se encuentra por encima del rango normal en las dietas O, AO y G y las dietas M, O y AO tienen disminuida la relación AGPI/AGS.

No se hallaron diferencias significativas en el consumo, Δ peso y en los pesos de los diferentes órganos, expresados en gramos, cuando se compararon los resultados de los grupos experimentales con el control.

En la Tabla II se presentan los datos del perfil de ácidos grasos.

En suero, el grupo M presentó un aumento significativo en la concentración de palmítico y oleico acompañado con una disminución de AL y AAL con respecto a C. Los grupos O y AO mostraron un aumento de ácido oleico y una disminución de AL y AAL con respecto a C. El grupo G presentó una disminución de AAL con respecto a C.

Discusión y Conclusiones

Los grupos M, O y AO presentaron en suero, niveles mayores de ácido oleico con disminución de los ácidos grasos esenciales; esto podría ser consecuencia de que la

Tabla I. Perfil de los principales ácidos grasos de las dietas (% área)

% área	Dieta M	Dieta O	Dieta AO	Dieta G	Dieta C
Palmítico	26,38	8,00	3,62	6,6	10,51
Esteárico	10,82	2,67	2,95	3,2	4,1
Oleico ($\omega 9$)	20,88	69,13	85,27	28,2	22,78
Linoleico ($\omega 6$)	2,69	15,89	5,99	57,5	53,31
Linolénico ($\omega 3$)	0,48	0,32	0,07	0,23	5,92
Relación $\omega 6/\omega 3$	5,6	49,6	86	250	9
AGPI/AGS	0,05	1,36	0,72	5,35	3,89

Dieta M: fuente lipídica manteca; Dieta O: fuente lipídica aceite de oliva; Dieta AO: fuente lipídica aceite de girasol alto oleico; Dieta G: fuente lipídica aceite de girasol; Dieta C: fuente lipídica aceite de soja; Relación AGPI/AGS: relación ácidos grasos poliinsaturados/ácidos grasos saturados.

Tabla II. Perfil de ácidos grasos en suero (% área media \pm DE)

Grupo	Palmitico	Oleico	AL	AAL	AA	EPA	DHA
C	17,30 \pm 1,39	10,60 \pm 2,01	18,66 \pm 2,72	0,92 \pm 0,34	9,01 \pm 1,72	0,80 \pm 0,23	1,33 \pm 0,19
M	22,77 \pm 1,83*	18,18 \pm 1,5*	7,70 \pm 1,94*	0,37 \pm 0,11*	10,91 \pm 1,85	0,91 \pm 0,13	1,79 \pm 0,19
O	20,17 \pm 2,56	20,38 \pm 2,60*	12,44 \pm 1,85*	0,34 \pm 0,06*	13,18 \pm 2,55	0,65 \pm 0,17	1,79 \pm 0,39
AO	19,77 \pm 1,52	27,73 \pm 2,49*	7,89 \pm 1,36*	0,22 \pm 0,03*	13,09 \pm 2,88	0,82 \pm 0,14	1,82 \pm 0,36
G	19,08 \pm 1,10	8,91 \pm 1,04	19,49 \pm 3,94	0,20 \pm 0,07*	14,04 \pm 5,69	0,65 \pm 0,07	1,31 \pm 0,11

* $p < 0,01$ con respecto al control (C)

Dieta C: fuente lipídica aceite de soja; Dieta M: fuente lipídica manteca; Dieta O: fuente lipídica aceite de oliva; Dieta AO: fuente lipídica aceite de girasol alto oleico; Dieta G: fuente lipídica aceite de girasol; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico

vía de la familia omega 9 estaría favorecida por contener la dieta un alto aporte de ácido oleico y además de ácido palmítico y esteárico (dieta M) que por acción de elongasas se convierte en ácido esteárico y luego las desaturasas lo transforman en ácido oleico. En el caso de las dietas O y AO se debería al alto aporte de ácido oleico por parte de las mismas y el bajo contenido de ácidos grasos esenciales.

El perfil lipídico de los animales que recibieron dieta cuya fuente fue aceite de girasol, fue diferente a los otros grupos. En esas experiencias se modificaron principalmente los ácidos grasos de la familia $\omega 3$. El porcentaje de ácido linoléico fue menor en el grupo G que en el grupo C.

Los cambios en el perfil de ácidos grasos en suero se producen en función de la fuente aportada por la dieta, ya que son un reflejo de la dieta consumida.

Trabajos previos de este grupo, en este mismo modelo experimental, demostraron que no existen diferencias estadísticas en los niveles séricos de colesterol total, HDL y LDL ni triglicéridos cuando se administraban estas dietas durante 10 días (16).

Analizando estos resultados, queda demostrado en forma concluyente que la composición lipídica de los alimentos influye en corto tiempo sobre el perfil de ácidos grasos séricos, previo a la modificación de los niveles de colesterol y triglicéridos.

Dado que el diseño experimental utilizado es un buen modelo para el estudio de ácidos grasos, los resultados obtenidos en ratas en período de crecimiento activo, podrían ser una herramienta útil para explicar observaciones no elucidadas hasta la fecha, de los ácidos grasos esenciales.

El análisis integral de los resultados obtenidos demuestra la influencia de la alimentación sobre el perfil de ácidos grasos en suero y su posible incidencia sobre ciertos factores de riesgo de enfermedades crónicas. Por ello, no sólo es importante considerar el porcentaje de lípidos de las dietas consumidas, sino también el perfil de ácidos grasos de las mismas.

Por esto es imprescindible reforzar la educación alimentaria y disponer de diversas estrategias con el objetivo de modificar estos patrones de alimentación, para poder lograr la reducción del contenido de lípidos dietarios y sobre todo la elección de fuentes lipídicas más adecuadas.

Por ende, es de suma importancia la determinación de los ácidos grasos en el laboratorio, como diagnóstico de la deficiencia de ácidos grasos esenciales, EPA y DHA, cuyas funciones son fundamentales para el buen funcionamiento del organismo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Paula Perris por su colaboración en los resultados y a la Técnica de bioterio María Cecilia Mambrín por su participación en el cuidado de los animales de laboratorio.

Fuentes de financiación

Este trabajo ha sido financiado por la Universidad de Buenos Aires, UBACYT N°20020190100093BA

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. MARÍA SUSANA FELIU
Cátedra de Nutrición. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Universidad de Buenos Aires. Junín 956 - 2do piso (CP 1113)
CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES, Argentina.
Correo electrónico: msfelu@ffyb.uba.ar

Referencias bibliográficas

1. ENFR (Encuesta Nacional de Factores de Riesgo) 2018. www.msal.gov.ar
2. Burdge GC, Calder PC. Introduction to fatty acids and lipids. *World Rev Nutr Diet* 2015 Nov; 112: 1-16.
3. Calder PC. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. *Eur J Lipid Sci Technol* 2014; 116 (10): 1280-300.
4. Rizos EC, Ntzani EE, Eftychia B, Kostapanos MS, Elisaf MS. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2012 Sep; 308 (10): 1024-33.
5. Yanai H, Masui Y, Katsuyama H, Adachi H, Kawaguchi A, Hakoshima M, *et al.* An improvement of cardiovascular risk factors by omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Clin Med Res* 2018 Apr; 10 (4): 281-9.
6. de Batlle J, Sauleda J, Balcells E, Gomez FP, Mendez M, Rodriguez E, *et al.* Association between omega3 and omega6 fatty acid intakes and serum inflammatory markers in COPD. *J Nutr Biochem* 2012 Jul; 23: 817-21.
7. Allaire J, Couture P, Leclerc M, Charest A, Marin J, Lépine MC. A randomized, crossover, head-to-head comparison of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid supplementation to reduce inflammation markers in men and women: the Comparing EPA to DHA (ComparED) Study. *Am J Clin Nutr* 2016 Aug; 104 (2): 280-7.
8. Wu K, Gao X, Shi B, Chen S, Zhou X, Li Z, *et al.* Enriched endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids alleviate cognitive and behavioral deficits in a mice model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2016 Oct; 333: 345-55.
9. FAO/WHO. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. Interim summary of conclusions and dietary recommendations on total fat & fatty acids. 2008 Nov.

10. Organización Mundial de la Salud. Estrategia Mundial sobre Régimen Alimentario, Actividad Física y Salud. OMS. 2004 May; (WHA57.17).
11. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2019 Nov; 290: 140-205.
12. Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Argentina de Lípidos sobre Diagnóstico y Tratamiento de las Dislipemias en Adultos, 2019.
13. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993 Nov; 123 (11): 1939-51.
14. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in one-step reaction. *J Lipid Res* 1986 Jan; 27 (1): 114-20.
15. Kuehl RO. Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Segunda Edición. México: Thomson Learning. 2001.
16. Perris P. Impacto de dietas con diferentes fuentes de lípidos. Estudio en ratas en período de crecimiento activo. [Tesis doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires]; 2017.

Recibido: 27 de mayo de 2022

Aceptado: 19 de octubre de 2022