



Universidad de Valladolid

ESCUELA DE FISIOTERAPIA

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA
MOLECULAR y FISIOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL:

**Efecto del calcio de la dieta sobre el
peso corporal y características del perfil
energético y mineral en ratones**

**Presentada por Marta Gómez Sánchez para
optar al grado de
doctora por la Universidad de Valladolid**

**Dirigida por:
Lucía Pérez Gallardo y Francisca Serra Vich**

***Efecto del calcio de la dieta
sobre el peso corporal y
características del perfil
energético y mineral en ratones***

Marta Gómez Sánchez

Universidad de Valladolid
Escuela de Fisioterapia de Soria
Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Fisiología
Curso: 2009-2010

“Que tu alimento sea tu medicina”
Hipócrates.

Agradecimientos

Sin ninguna duda la elaboración de esta tesis doctoral ha supuesto un gran reto personal y profesional y ha sido una experiencia muy enriquecedora no solo por los conocimientos adquiridos sino también por las personas con las que he tenido el privilegio de trabajar y tratar. Por este motivo, antes de comenzar su desarrollo me gustaría dedicar unas breves aunque sentidas líneas de agradecimiento a todos aquellos sin cuya ayuda, sugerencias y apoyo no hubiera sido posible terminar este proyecto en el que he puesto tanto esfuerzo.

Esta tesis representa el fruto del trabajo realizado durante varios años en el Campus Universitario de Soria donde he tenido la suerte y satisfacción de conocer a Lucía Pérez Gallardo, directora de mi tesis, a quien no solo quiero expresar mi agradecimiento sino también mi mas profunda admiración. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado durante estos años, por tu intensa colaboración, por el tiempo que has invertido en este proyecto y por la amistad que me has brindado. No puedo olvidarme de Rosa quien me ha prestado un apoyo inestimable en el trabajo realizado en el laboratorio, gracias por tu paciencia y propuestas llenas de experiencia. No solo queda en mi memoria el recuerdo del trabajo realizado sino también los ratitos de descanso compartidos tomando café con todas vosotras junto a Paco, Pilar, Lourdes y Angelines. Aprovecho esta oportunidad para recordar a Bea con quien comencé este proyecto y he compartido muchas y agradables horas de trabajo. Fue estupendo el tiempo que trabajamos juntas aunque decidieras optar por otro camino, siempre queda la amistad.

Llevar a cabo un proyecto como este es difícil y costoso por eso también quiero agradecer profundamente toda la ayuda recibida por parte del personal de la Universidad de las Islas Baleares ya que sin ella este trabajo tampoco hubiera sido posible. Muchas gracias a Francisca Serra Vich, codirectora de mi tesis, por tus buenos consejos y el material prestado y a Juana por tu ayuda con en el sacrificio de los ratones.

Este proyecto lo he realizado como actividad extralaboral lo que ha supuesto menos dedicación y atención a mi familia. Es por eso que quiero dedicar esta tesis a Luis por su comprensión, ayuda y paciencia. A Iker por todos esos ratos en los que en vez de jugar contigo estuve trabajando y a Aitana porque cuando nazcas te explicaré como terminé y defendí esta tesis. Tampoco quiero olvidar a mi padre y hermana por su constante estímulo que tanto me ha ayudado.

Gracias a todos y cada uno de vosotros. Este trabajo también os pertenece.

Índice

Índice	05
1. Introducción	08
1.1. La obesidad	09
1.1.1. La obesidad, un problema de salud pública	09
1.1.2. Mecanismos fisiológicos para mantener el peso constante	13
1.2. Integración del metabolismo energético: visión global	30
1.2.1. Adquisición y transformación de los nutrientes	30
1.2.2. Integración de las rutas metabólicas energéticas ..	35
1.2.3. Abastecimiento de energía: el tejido adiposo	41
1.3. Dieta y salud	48
1.3.1. Nuevas estrategias en el diseño de alimentos para reducir el peso corporal-	48
1.3.2. La leche, un alimento funcional	54
1.4. Minerales	62
1.4.1. El calcio	62
1.4.2. El calcio y la obesidad	72
1.4.3. Magnesio	79
1.4.4. El zinc	85
1.4.5. El zinc y la obesidad	89
2. Objetivo	92

3. Material y métodos -----	95
3.1. Material -----	96
3.1.1. Animales -----	96
3.1.2. Dietas -----	97
3.1.3. Condiciones ambientales -----	97
3.1.4. Recogida de datos y muestras -----	97
3.1.5. Sacrificio -----	98
3.1.6. Ética -----	98
3.2. Métodos -----	101
3.2.1. Procesado y determinación del glucógeno hepático ---	101
3.2.2. Procesado y determinación de proteínas en hígado y heces -----	104
3.2.3. Procesado y determinación de lípidos en hígado, tejido adiposo y heces -----	107
3.2.4. Procesado y análisis de minerales -----	114
3.2.5. Procesado y determinación de la humedad en heces --	119
3.2.6. Procesamiento de los resultados y análisis estadístico -----	120
4. Resultados -----	121
4.1. Ingesta de pienso y consumo de agua -----	122
4.1.1. Ingesta de pienso -----	122
4.1.2. Consumo de agua -----	122
4.2. Antropometría -----	123
4.2.1. Peso corporal total -----	123
4.2.2. Peso de los distintos órganos y tejidos -----	124
4.3. Concentración de metabolitos y minerales hepáticos -----	125
4.3.1. Metabolitos hepáticos -----	125
4.3.2. Minerales hepáticos -----	125

4.4. Concentración de metabolitos en el tejido adiposo epididimal -----	127
4.5. Concentración de minerales en fémur -----	128
4.6. Concentración de metabolitos, minerales y humedad en heces -----	129
4.6.1. Metabolitos en heces -----	129
4.6.2. Minerales en heces -----	130
4.6.3. Humedad en heces -----	131
4.7. Concentración de minerales en orina -----	133
5. Discusión -----	134
5.1. Posibles mecanismos de acción del calcio en el control del peso corporal -----	135
5.1.1. El calcio y el peso corporal -----	135
5.1.2. El calcio y los productos lácteos en la regulación de la ingesta -----	138
5.1.3. El calcio y la absorción de nutrientes -----	141
5.1.4. El calcio y el metabolismo energético -----	144
5.1.5. El calcio y el control del gasto energético -----	148
5.2. Biodisponibilidad de calcio magnesio y zinc y su relación con la concentración ósea -----	153
5.3. Aspectos metodológicos -----	156
5.3.1. Modelos animales -----	156
5.3.2. Dietas -----	158
5.3.3. Otros factores -----	161
6. Conclusiones -----	162
7. Bibliografía -----	164
Anexo I: abreviaturas -----	181
Anexo II: Congresos y Publicaciones -----	183

1. Introducción

1.1. La obesidad

1.1.1. La obesidad: un problema de salud pública

La obesidad es una enfermedad crónica que se caracteriza por un aumento de peso corporal originado por el incremento de las reservas energéticas en forma de grasa. Uno de los parámetros más empleados para medir y clasificar el estado ponderal de una persona es el IMC o índice de Quetelet que se define como la razón entre el peso de un individuo (expresado en Kg) y la altura (expresada en m) elevada al cuadrado (1). En base a este parámetro, la SEEDO establece los puntos de corte expresados en la tabla 1 para definir el sobrepeso y obesidad. Cuando el IMC es igual o superior a 30 kg/m² se considera que una persona padece obesidad (2).

Tabla 1.: Clasificación del estado ponderal de las personas atendiendo al IMC según el Consenso SEEDO 2000.

Fte.: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (2).

	Definición	I.M.C. (Kg/m ²)
Peso insuficiente	Infrapeso	< 18,5
Peso adecuado	Normopeso	18,5-24,9
Sobrepeso	Sobrepeso grado I	25-26,9
Preobesidad	Sobrepeso grado II	27-29,9
Obesidad	Obesidad tipo I	30-34,9
Obesidad severa	Obesidad tipo II	35-39,9
Obesidad mórbida	Obesidad tipo III	40-49,9
Obesidad extrema	Obesidad tipo IV	>50

La OMS estima que más de 1000 millones de personas en el mundo padecen sobrepeso y al menos 300 millones sufren obesidad y es que desde hace varias décadas la prevalencia de esta enfermedad está experimentando un fuerte aumento (3). El estudio NHANES 1999-2000 computó que el 33,6% de la población estadounidense presentaba sobrepeso (IMC de 25 a 29,9 Kg/m²), el 32,2% obesidad (IMC >30 Kg/m²) y el 5,0% obesidad mórbida (IMC >40 Kg/m²) mientras que el estudio

NHANES 2005-2006 estimó que el 30,9% de la población padecía sobrepeso, el 35,1% obesidad y el 6,2% obesidad mórbida (4). En Europa los datos no son más esperanzadores. Según el estudio paneuropeo promovido por el IEFS en 1997, para determinar la proporción y características de la población obesa adulta de los quince estados miembros mostró, según se puede ver en la figura 2, que Reino Unido poseía la mayor tasa de obesidad (12%), seguido de España (11%), observándose una menor prevalencia en Italia, Francia y Suecia (7%) (5).

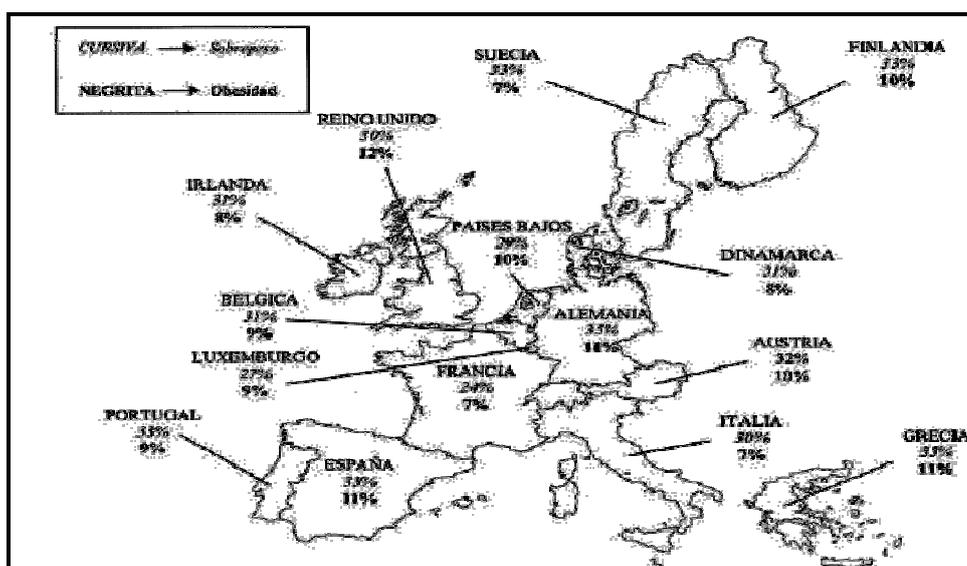


Fig. 1.: Distribución geográfica de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en los quince Estados Miembros de la Unión Europea según el estudio IEFS. Fte.: Modificado de Martínez y col. (5).

La situación en España también es preocupante; el estudio SEEDO 2003 puso de manifiesto que el 38% de la población adulta presentaba sobrepeso y el 15,35% obesidad como muestra la tabla 2 (sobrepeso se definió con un valor de IMC iguales o superior a 25 y obesidad se definió con un valor de IMC superior a 30) (6) y el estudio enKid (1998-2000), diseñado para evaluar los hábitos alimentarios y el estado nutricional de la población infantil y juvenil (tabla 3), taso la prevalencia de sobrepeso en el 12,4% y la prevalencia de obesidad en el 13,9% (sobrepeso y obesidad se definieron como valores del índice de masa corporal iguales o superiores a los valores de los percentiles 85 y 97 respectivamente de las tablas de referencia españolas de Hernández et al. (1988) (7)

Tabla 2.: Tabla de la prevalencia de la obesidad en la población española con una edad comprendida entre 25 y 60 años según el estudio SEEDO 2003.

Fte.: Aranceta y col. (6).

Estudio Seedo, 2003		
Zona	Varones %	Mujeres %
Noroeste	19,07	21,78
Norte	11,46	16,52
Noreste	8,53	13,77
Centro	9,31	13,82
Sur	18,51	19,42
Levante	12,46	16,2
Canarias	14,21	22,22

Tabla 3.: Tabla de la prevalencia de la obesidad en la población infantil y juvenil española según el estudio enKid 2000.

Fte.: Serra y col. (7).

Estudio enKid 1998-2000				
C.C.A.A.	Población con una edad comprendida entre 6 y 10 años		Población con una edad comprendida entre los 11 y 15 años	
	Niños %	Niñas %	Niños %	Niñas %
Galicia	16	9	18	11
Castilla y León	15	12	13	11
Extremadura	15	11	17	13
Murcia	16	10	18	12
Andalucía	16	9	18	11
Canarias	12	14	15	20

Este hecho, que afecta tanto a individuos adultos como a niños y adolescentes, hace que la obesidad sea considerada una epidemia global, que plantea un grave problema de salud pública (3). Las causas que han provocado este fuerte incremento en el número de casos de sobrepeso y obesidad son complejas. Por un lado es conocido el hecho de que la herencia genética es un factor que condiciona fuertemente la composición corporal y tiene un papel decisivo en la determinación del *set point individual*, pero no explica completamente este incremento tan exacerbado. Determinados cambios en los hábitos de vida de la población como el aumento del sedentarismo y la variación de la dieta hacia el consumo de alimentos ricos en hidratos de carbono de sabor dulce y grasas con un elevado contenido calórico, también son factores que desempeñan un importante papel (2, 8). El sobrepeso forma parte del cuadro de síntomas que componen el síndrome metabólico o síndrome de Reaven, y predispone a padecer patologías tan graves como la cardiopatía isquémica, accidentes cerebro-vasculares, diabetes, insuficiencia respiratoria, cáncer... Sin olvidar que en muchos casos, puede ir acompañado de problemas psicológicos importantes y limitaciones en la actividad física que dificultan las acciones cotidianas. Por otro lado, el arsenal terapéutico y los tratamientos existentes en la actualidad para tratar esta enfermedad son poco efectivos, por lo que la importancia de este problema está fuera de toda duda (8).

1.1.2. Mecanismos fisiológicos para mantener el peso constante

Hasta hace relativamente poco tiempo se pensaba que la composición corporal solamente dependía de la correlación entre la ingesta alimenticia y el trabajo físico realizado pero actualmente este punto de vista se considera insuficiente. El peso corporal, pese a las fluctuaciones diarias en el balance energético, tiende a permanecer constante a lo largo del tiempo, poniendo de manifiesto la existencia de mecanismos de control que lo mantienen más o menos invariable y, al igual que otros mecanismos homeostáticos del organismo, utiliza un complicado sistema de ajuste en el que están implicados diversos órganos y tejidos y modulado tanto por señales nerviosas como hormonales y metabólicas. Finalmente este sistema se sostiene sobre una importante base genética con una temprana modulación fenogénica. En definitiva, el control del peso corporal recae en factores de gran complejidad que poseen un complejo sistema de ajuste y cuya actividad está perfectamente coordinada, involucrando para ello desde altos centros cortico-cerebrales hasta niveles celulares más sencillos como los adipocitos (9).

En este marco, se puede considerar que el control del peso corporal depende de tres factores fundamentales que son independientes pero que interaccionan entre sí: **la ingesta**, que modula a grandes trazos la disponibilidad energética, **el gasto energético**, que depende a su vez de la termogénesis, el ejercicio físico realizado y el metabolismo basal y **las reservas adiposas** (fig.2). La interacción de estos tres factores permite tanto la regulación de la ingesta según el grado de gasto energético y las reservas energéticas como la regulación del gasto energético conforme a la ingesta y las reservas. En último grado estos tres ejes también están condicionados por la genética del individuo y los factores ambientales a los que esté sometido (10).

El conocimiento de las moléculas que participan en la regulación del peso corporal se está incrementando constantemente, y existen evidencias científicas que señalan una posible relación entre determinados minerales como el calcio, ó el zinc y la patogenia de la obesidad (11, 12).

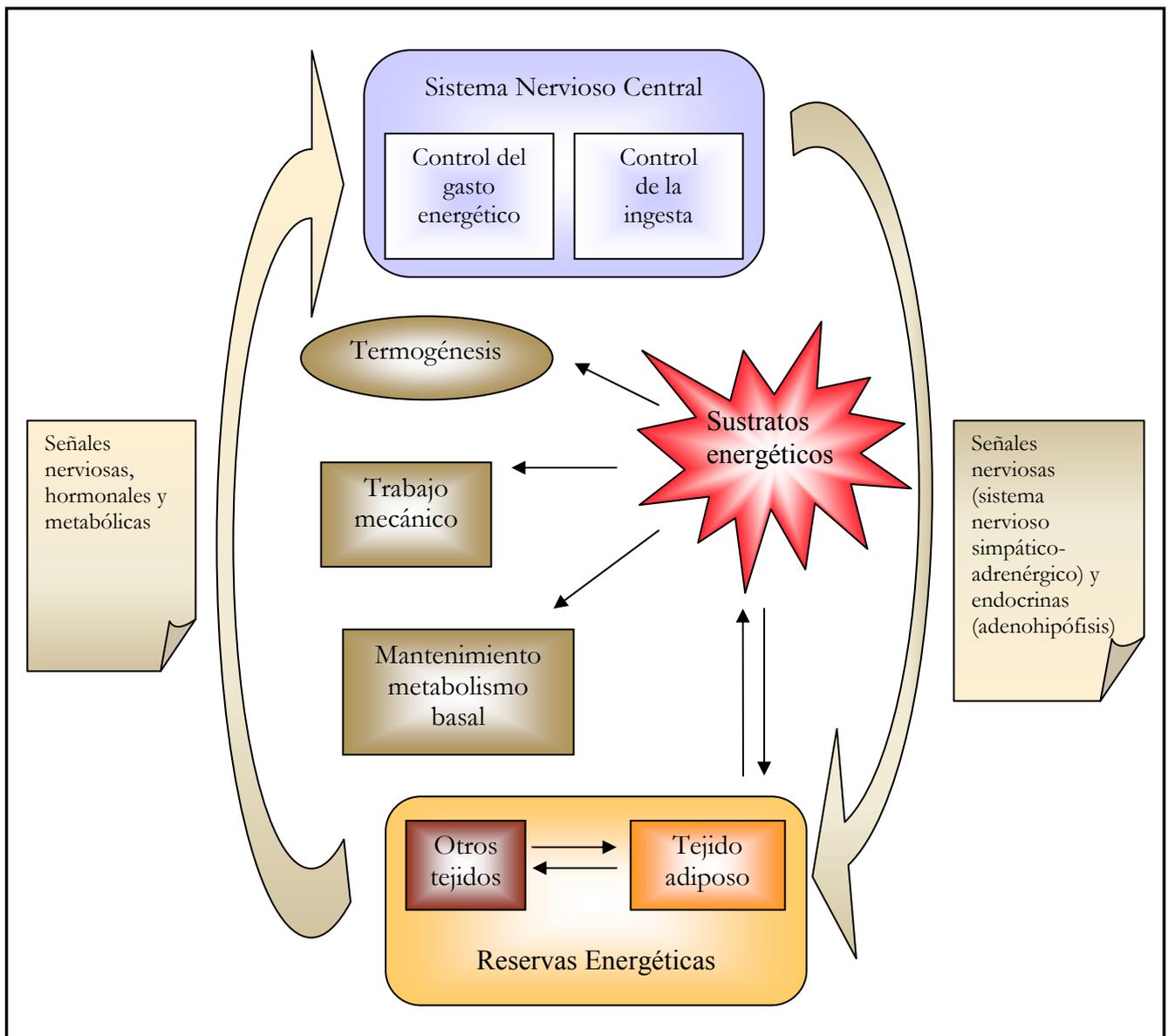


Fig. 2.: Mecanismos implicados en el control del peso corporal.
 Fte.: Modificado de Milagro y col. (13).

Los tres mecanismos propuestos para la modulación del peso corporal pese a ser independientes, se superponen e interrelacionan entre si:

- Mecanismos que tienden a mantener constantes las reservas energéticas: señales de adiposidad.
- Mecanismos que regulan el paso de energía química a energía física: gasto energético.
- Mecanismos celulares que regulan la creación y el recambio de los depósitos grasos: adipocitogénesis, lipólisis y lipogénesis (10).

a. Mecanismos que tienden a mantener constantes las reservas energéticas: señales de adiposidad

La homeostasis de las reservas energéticas se realiza mediante dos sistemas superpuestos: la regulación a corto y largo plazo. La regulación a corto plazo se ocupa principalmente de los factores que rigen el hambre y la saciedad y organiza el gasto energético desde una ingesta a otra. Se ha visto que para contrarrestar el efecto producido por el ayuno o el consumo de dietas hipocalóricas, se atenúa el metabolismo basal, y tras el consumo de una comida copiosa, aumenta el gasto energético. Por otro lado, la regulación a largo plazo, trata de modular las reservas adiposas para afrontar las diferentes situaciones y estados del ciclo vital como el embarazo, la enfermedad, el crecimiento... sin que varíe la homeostasis energética (13). Según explica la teoría lipostática propuesta por Kennedy (1953), este tipo de regulación se basa en la generación de señales aferentes que parten de las propias reservas energéticas e interaccionan en lugares del sistema nervioso específicos que responden mediante vías eferentes para ejercer una marcada influencia sobre la ingesta, el gasto energético y las reservas energéticas durante periodos largos de tiempo. Los mecanismos y moléculas implicados en este complejo sistema son un amplio y heterogéneo conjunto que aún no se han podido establecer plenamente (10).

a.1. Mediadores aferentes

A corto plazo, la presencia o ausencia de alimentos en el tracto gastrointestinal y la densidad energética de los mismos genera señales que son captadas por los quimiorreceptores y mecanorreceptores existentes en el tubo digestivo. Esta información que llega vía nerviosa (nervio vago) y humoral al sistema nervioso central, está involucrada en la inducción de la sensación de hambre o saciedad. De este modo, distintos nutrientes como la glucosa o los ácidos grasos libres y pequeños péptidos como la enterostatina, la ghrelina, la bombesina o la CCK segregados por el tubo digestivo pueden afectar a la ingesta energética (14). Se ha descrito una mutación en sujetos obesos donde está disminuida la expresión del receptor para la CCK, afectándoles negativamente a la sensación de saciedad (15). Las ratas *OLEFT* que carecen de estos tipo receptores son obesas, diabéticas e hiperfágicas (16).

Desde el punto de vista del almacenamiento de las reservas energéticas, la principal hormona anabólica es la insulina cuya secreción se ve favorecida por el sistema nervioso parasimpático que a su vez también estimula el peristaltismo intestinal. Como consecuencia provoca que la absorción de nutrientes, sobre todo de glucosa, tenga lugar en un tiempo corto, generando picos de concentración en plasma elevados, paralelos a la secreción de insulina. Además esta proteína también potencia la captación de glucosa por los tejidos para su degradación intracelular (glucólisis) y activa la lipogénesis, de modo que en conjunto, estimula la deposición de triacilglicéridos (17). Han podido aislarse receptores en el sistema nervioso central para la insulina en aquellos núcleos hipotalámicos que regulan el balance energético, donde se comporta como un inhibidor de la expresión de péptidos orexigénicos como el NPY y la galanina y estimula la de anorexigénicos como la CCK, lo que ha llevado a considerar que la resistencia a la insulina está en la base de una buena parte de los efectos patogénicos de la obesidad. Se ha visto que en ayuno los niveles de insulina aumentan proporcionalmente con el grado de obesidad (18). Sin embargo, para producir cambios en el balance energético en periodos largos de tiempo las señales que actúan a corto plazo no son suficientes (10).

Tanto a corto como a largo plazo, el papel que desempeña el tejido adiposo en el control del metabolismo y las reservas energéticas está fuera de toda duda. Para ello se sirve de un extenso grupo de mediadores y posee una amplia gama de receptores que le permiten la comunicación con otros tejidos, acumulando o movilizandolos triacilglicéridos según las diversas circunstancias metabólicas (10, 13). Una de las hormonas más estudiadas ha sido la leptina. Esta proteína codificada por el gen *ob* o el gen *lep*, se sintetiza y se segrega principalmente aunque no de modo exclusivo, por el tejido adiposo blanco aunque de una forma más intensa, en el tejido adiposo blanco subcutáneo que en el visceral. Actúa como una importante señal adipostática negativa, frenando el apetito a nivel central, estimulando la lipólisis y aumentando el gasto energético (10). La carencia de esta hormona en ratones (*ob/ob*) causa hiperfagia, obesidad, diabetes e infertilidad (19). Se han descrito dos tipos de receptores para la leptina que están codificados por el gen *db*: el ratón *db/db* y la rata *fa/fa* (rata Zucker) poseen una mutación en este gen y son hiperleptinémicos, y en consecuencia también padecen obesidad (10). Los niveles circulantes de leptina son proporcionales al estado nutricional del individuo, al tipo de nutrientes contenido en la dieta, (el metabolismo de la glucosa es determinante para su secreción) y a la composición corporal. Estos niveles

responden a un ritmo de secreción circadiano: el nivel máximo se produce por la mañana y el mínimo al atardecer. El ayuno, los agonistas α -adrenérgicos y posiblemente también los andrógenos los disminuye mientras que la realimentación, la insulina, los glucocorticoides y los estrógenos los incrementa sin que varíe la masa de grasa corporal. A igualdad de masa de grasa, la concentración en mujeres es más alta que en varones, aunque en ambos casos, la pérdida del 10 % del tejido adiposo blanco puede provocar una caída de más del 50 % en los niveles circulantes de leptina. Los sujetos con obesidad extrema presentan hiperleptinemia lo que causa la resistencia de los tejidos a esta proteína. Este rasgo es heredable (10).

El tejido adiposo blanco también sintetiza y libera otro tipo de péptidos como la adiponectina que tiene capacidad para activar la oxidación de ácidos grasos disminuyendo los niveles plasmáticos de triacilglicéridos, o la resistina que modula la resistencia celular a la insulina. Estas moléculas podrían actuar como emisarios metabólicos en otros órganos como el páncreas, el hígado y el músculo (20). Otras moléculas como los ácidos grasos no esterificados también pueden comportarse como mediadores modulando los efectos de los glucocorticoides (10). Para finalizar, el adipocito además es una importante fuente de citoquinas. La producción de IL-6 está positivamente correlacionada con el índice de masa corporal. Se ha observado que un tercio de la concentración de IL-6 circulante es secretada por el tejido adiposo, por lo que se piensa que esta molécula podría comportarse como un regulador autócrino y parácrino de la función adipocitaria. La grasa peritoneal produce tres veces más IL-6 que el tejido adiposo subcutáneo, como el drenaje del tejido adiposo peritoneal llega directamente al hígado, el impacto metabólico de la liberación de esta molécula podría estar asociado directamente a la secreción de los depósitos de triacilglicéridos hepáticos. Los niveles de IL-6 están modulados por el TNF- α cuya expresión a su vez está inducida por los triacilglicéridos y los ácidos grasos libres, mientras que los glucocorticoides y las catecolaminas lo disminuyen. El TNF- α produce una regulación decreciente de la expresión de muchas proteínas específicas del adipocito como la *LPL*, la *ácido-graso-sintasa*, o la *acetil-CoA-carboxilasa* (21).

a.2. Sistema nervioso central

La región cerebral más importante relacionada con la homeostasis del peso corporal y la estabilidad de las reservas energéticas se encuentra en el hipotálamo, especialmente en el núcleo arcuatus. Se expresa mediante dos vías neuronales con efectos antagónicos, donde están implicados un buen número de neurotransmisores: la vía anabólica u orexigénica que promueve el ingreso alimentario y reduce el gasto energético y la vía catabólica o anorexigénica que procesa los efectos contrarios instaurando la sensación de saciedad (13). En la vía anabólica, además de estar comprometidos los neurotransmisores serotonina, dopamina y noradrenalina, que tienen un papel decisivo en la sinapsis de todo el sistema nervioso, también interviene el NPY que promueve la hiperfagia y disminuye el gasto energético o la proteína AGRP. Se han descrito diferentes mutaciones dominantes en ratones que producen la sobre-expresión ectópica de la AGP. Éstas ocasionan pelo amarillo, obesidad y diabetes. En la vía catabólica o anorexigénica intervienen en gran medida la proopiomelanocortina, que es un péptido cuyo procesamiento postraslacional da origen a múltiples hormonas y neurotransmisores (10). Estas vías neuronales del núcleo arcuatus se proyectan hacia otras regiones del hipotálamo (núcleo paraventricular, región lateral, área perifornical) que finalmente conectan con las neuronas caudales del tronco cerebral y el núcleo del tracto solitario donde llega las señales mecánicas y químicas del aparato gastrointestinal que regulan el comienzo y el fin de una comida, el hambre y la saciedad. Cabe señalar que hay un importantísimo componente cortical en la modulación de la ingesta, de modo que a menudo es muy difícil deslindar los efectos culturales y de aprendizaje de los que son determinados por los mecanismos básicos (13).

En la actualidad hay identificadas un extenso conjunto de moléculas (principalmente péptidos como la galanina, ghrelina, leptina, ect.), que son liberadas por distintos órganos como el aparato digestivo o tejidos como el tejido adiposo blanco atendiendo a estímulos de origen tanto externo (ambientales) como internos, que son capaces de interactuar con los centros neuronales de control del apetito y del gasto energético y que informan al cerebro sobre el estado metabólico corporal (13). Durante mucho tiempo los mecanismos que regulaban la ingesta alimentaria eran considerados el punto clave para el control del peso corporal, pero hoy en día estos factores se consideran importantes, pero no más que el resto de los sistemas (10, 21).

a.3. Mediadores eferentes

Los mediadores eferentes son fundamentalmente los glucocorticoides y el sistema simpático adrenérgico (10). Los glucocorticoides causan un incremento de la ingesta y evitan la producción de cambios importantes en las reservas energéticas, participando tanto en el mantenimiento de los niveles circulantes de los substratos energéticos como en el de los metabolitos almacenados. Esta acción, clave por tanto, contempla la preservación de los triacilglicérolos, el aumento de la disponibilidad de glucosa y el amortiguamiento de las variaciones drásticas en los procesos fisiológicos, lo que a menudo lleva a la inducción de “resistencia” a factores hormonales, como es el caso de la resistencia a la insulina. La acción glucocorticoide también afecta al metabolismo mineral, provocando, a menudo, la retención de agua así como la pérdida de proteínas y minerales. Estos efectos se complementan con la activación de los procesos de defensa del organismo afectando también al funcionamiento global del sistema inmune y los procesos inflamatorios (17).

Por otro lado, los tejidos también responden a los neurotransmisores del sistema nervioso autónomo y a los niveles sanguíneos de adrenalina y noradrenalina secretados por la médula adrenal, por lo que el sistema simpático-adrenal constituye uno de los mecanismos determinantes tanto en la regulación de las rutas metabólicas energéticas como en la termogénesis no facultativa mediada por proteínas desacoplantes en el tejido adiposo pardo y posiblemente también en el músculo. La activación del sistema simpático adrenal inhibe la secreción pancreática de insulina y estimula la liberación de glucagón, produciendo una importante movilización hepática de glucosa, mediante la activación de la gluconeogénesis y la glucogenólisis en los hepatocitos, al mismo tiempo que en el músculo esquelético se estimula la glucogenólisis y la síntesis de lactato. Esta reducción en la secreción de insulina también afecta al metabolismo lipídico, aumentando la lipólisis en tejido adiposo y la tasa de ácidos grasos libres y reduciendo la absorción de los triacilglicérolos circulantes en sangre. En general, la estimulación simpática-adrenal, se asocia a una disminución en la utilización de glúcidos y un incremento en la oxidación de lípidos (13).

b. Mecanismos que regulan el paso de energía química a energía física: el gasto energético

La energía química generada tras el consumo y digestión de los nutrientes tiene dos posibles destinos metabólicos, bien es almacenada, bien es transformada en trabajo definido como gasto energético. Bajo este concepto se incluyen un amplio conjunto de actividades como el ejercicio físico que desempeñe el individuo, el crecimiento o el metabolismo basal encargado del mantenimiento de las funciones orgánicas y celulares inherentes a la vida y que supone más del 70% del consumo de energía total en condiciones normales. El concepto de gasto energético también incluye la producción de calor. Existen dos tipos de termogénesis: al calor generado como subproducto de la mayoría de las reacciones bioquímicas que constituyen el metabolismo basal se le denomina termogénesis obligatoria. Se produce en todos los órganos y está regulada por las hormonas tiroideas. Al calor producido como respuesta al frío o una dieta hipercalórica por el tejido adiposo pardo y el músculo esquelético principalmente o mediante el desarrollo de ciclos fútiles, se le denomina termogénesis adaptativa o facultativa y se le atribuye una función compensadora de las diferencias energéticas producidas entre la ingesta y el gasto energético, que serviría para amortiguar el exceso calórico ante una ingesta masiva, modulando así el gasto energético. De este modo, excesos alimentarios eventuales podrían ser disipados en forma de calor, haciendo partícipe al tejido adiposo pardo en la regulación del peso corporal y las reservas energéticas (22).

b.1. Proteínas desacoplantes

Pese a que los procesos lipolíticos y lipogénicos son similares en el tejido adiposo blanco y el tejido adiposo pardo, éste último tiene unas características metabólicas únicas. El tejido adiposo pardo posee un elevado número de mitocondrias pero sin embargo, aunque es muy eficaz en la generación de calor, es poco eficiente en la producción de energía (17). La síntesis de ATP se realiza en la matriz mitocondrial (fosforilación oxidativa), aprovechando el flujo de protones obtenidos a partir de los metabolitos reducidos derivados del metabolismo de la glucosa y los ácidos grasos para la conversión de ADP en ATP, en presencia de oxígeno, por el enzima *ATP-sintasa*. La última etapa de la fosforilación oxidativa (etapa IV), se caracteriza porque puede producir calor

desacoplando la reacción de oxido-reducción y la fosforilación del ADP mediante pérdida del gradiente de concentración de protones (fig. 3) cuando este tejido es estimulado por el sistema nervioso simpático mediante el frío o tras el consumo de una excesiva ingestión de alimentos. Esta característica, otorga una serie de ventajas al sistema: permite mantener la cadena respiratoria sin saturación, disminuye la generación de radicales superóxido (ROS) y es una forma indirecta de regular la concentración de NADH, factor determinante para el control de la cetogénesis y lipogénesis (23).

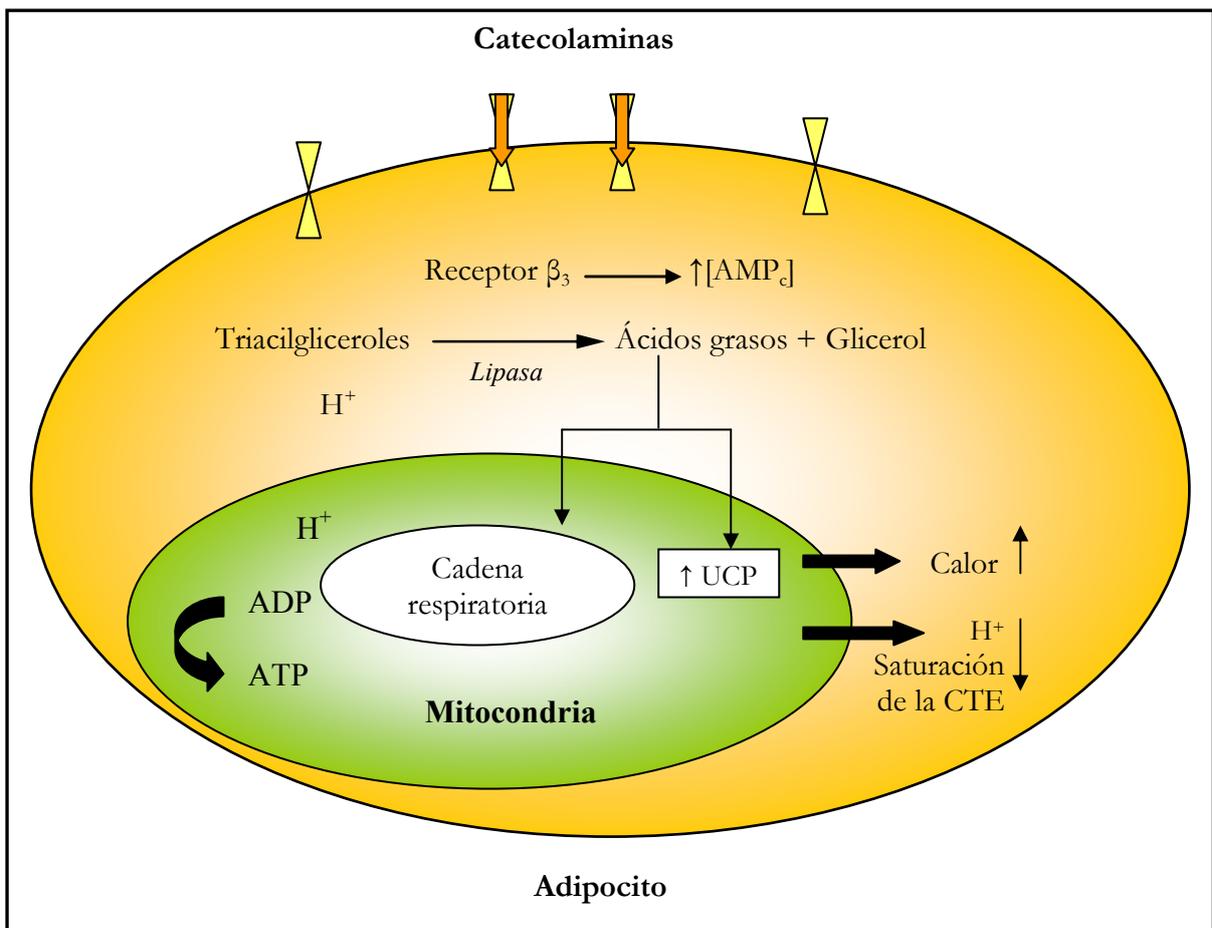


Fig 3.: Mecanismo de acción y regulación de la fosforilación oxidativa en el TAP.
Fte.: Modificado de Aguilar Salinas (22).

A finales de los años 70 se descubrió una proteína denominada UCP-1, localizada en la membrana interna mitocondrial, con la capacidad de desacoplar la cadena de transporte de electrones de la generación de energía. Estudios posteriores han puesto de manifiesto la existencia de una familia de proteínas desacoplantes que puede albergar a más de 29 miembros aunque la estructura, función y regulación de algunas de ellas son todavía desconocidas (24).

La proteína UCP-1 se expresa solamente en el tejido adiposo pardo y utiliza la ubiquinona (coenzima Q) como cofactor. Es altamente termogénica y desempeña un papel fundamental en la lucha contra el enfriamiento de los neonatos. La importancia de la proteína UCP-1 se determinó al comprobar que ratones transgénicos *KO* cuyo tejido adiposo pardo era deficiente en esta molécula presentaban obesidad, hiperfagia e hipotermia, mientras que los ratones transgénicos que la sobre-expresaban, no aumentaban de peso incluso tras ser alimentados con una dieta rica en grasa (22). Se ha comprobado que la concentración de las UCP-1 en el tejido adiposo pardo aumenta con el frío y diversos mediadores como las catecolaminas, los agonistas β_3 , las hormonas tiroideas, la leptina, la insulina y los retinoides y puede ser bloqueada por minerales como el cadmio o el zinc. Aunque aún no se ha podido determinar completamente su mecanismo de acción, se sabe que los ácidos grasos resultan imprescindibles para su activación y puede ser inhibida por diversos nucleótidos (25). El interés por las proteínas UCP ha ido en aumento al observar que el desacople entre la cadena de transporte de energía y la producción de ATP también puede producirse en otros tipos de células. Esto explicaría porqué los hepatocitos pueden perder hasta el 26% de la energía mediante procesos distintos a la generación del ATP y el músculo esquelético hasta el 52% (26).

Las proteínas UCP-2 Se encuentran en múltiples tejidos (pulmón, corazón, riñones, TAP, TAB, músculo esquelético, hígado, cerebro, monocitos, macrófagos, páncreas...) Su expresión aumenta con el frío y las hormonas tiroideas y en el músculo esquelético también durante el ayuno o el consumo de dietas hipocalóricas, situaciones en las que la tasa metabólica basal está disminuida. Además la concentración de las UCP-2 está aumentada en el tejido adiposo y el hígado de ratones obesos *db/db*, fenómeno que ha sido interpretado como un intento de compensación para inducir pérdida de energía. Sin embargo, su expresión en el cerebro no se modifica por la exposición al frío y no existe correlación entre la pérdida del gradiente de protones y la actividad de esta proteína. El ratón UCP-2 *Ko* (deficiente en UCP-2) no es obeso, no muestra resistencia al acumulo de grasa inducido por la dieta, presentan una buena tolerancia al ejercicio y la termogénesis inducida por el frío es normal (22). Estos datos, junto con el hecho de que su activación presenta mucha menos dependencia de los ácidos grasos que las UCP-1 sugieren que las proteínas UCP-2 tienen otras funciones distintas como la regulación de la secreción de insulina por el páncreas o la protección en los hepatocitos frente a los efectos de los ROS (24).

Las proteínas UCP-3 solamente se expresan en el músculo esquelético y en el tejido adiposo pardo y el hecho de que la tiroxina incremente su síntesis, hace suponer que una de sus funciones sea regular la acción de las hormonas tiroideas (24). Como ambos tejidos presentan un metabolismo altamente dependiente de la oxidación de los ácidos grasos, y determinados metabolitos como los ácidos grasos o el acil-CoA también inducen su síntesis, se planteó la posibilidad de que las proteínas UCP-3 podían tener cierta relevancia en el balance energético y el metabolismo lipídico (27). Los roedores con sobre-expresión de las UCP-3 aunque presentan hiperfagia, también sufren pérdida de peso. Por otro lado, el déficit en la expresión de estas proteínas, no afecta ni al peso corporal ni a la regulación de la temperatura, aunque si ocasiona un aumento en la producción de radicales libres. La respuesta fisiológica de la expresión de las UCP-3 frente al frío en el tejido adiposo pardo es similar a la de las UCP-1, aunque en la musculatura esquelética no se modifica su concentración. El ayuno reduce la expresión muscular de estas proteínas pero cuando si eleva la concentración plasmática de ácidos grasos también aumenta su expresión pese a la inanición (22).

Algunos autores piensan que la función de las UCP-2 y las UCP-3 estaría mas bien relacionada con la regulación del ATP disponible en el interior de la célula, constituyendo un sistema de ajuste para que la célula tenga la cantidad de ATP requerido según la demanda formando parte de un mecanismo de compensación para inducir pérdidas de energía. Este sistema tendría importancia en tejidos como el músculo, donde la demanda de energía se puede producir de forma brusca. Estudios realizados en ratones muestran que cuando los animales realizaban ejercicio, y aumentaba el consumo de ATP, incrementaban de 14 a 18 veces la cantidad de UCP-3 (27).

Recientemente se han incluido dos nuevas proteínas transportadoras de aniones mitocondriales. Las UCP-4 que se localizan solamente en el cerebro, y su expresión aumenta con el frío, por lo que se piensa que están involucradas en la regulación de la termogénesis a nivel del sistema nervioso central, y las UCP-5 (BMCP 1) que aunque originalmente se pensó que solamente se expresaban en el cerebro, estudios recientes también las han localizado aunque en menor concentración, en hepatocitos, testículos y otros tipos de células. Su expresión disminuye en el ayuno y aumenta mediante el consumo de dietas ricas en grasa y el frío (22).

b.2. Ciclos fútiles

Otra estrategia empleada por el organismo de los mamíferos para adaptarse a desbalances energéticos eventuales son los ciclos fútiles o ciclos de sustrato. Mediante estos procesos se podría transformar en calor hasta el 25% del exceso del ingreso alimentario sin modificar el volumen de los tejidos implicados. En el desarrollo de los ciclos fútiles participan un buen número de órganos y tejidos destacando la importante participación del músculo y el hígado. Básicamente consisten en reacciones enzimáticas de vías o ciclos metabólicos irreversibles, catalizados por diferentes enzimas o diferentes formas de una misma enzima, que son reguladas independientemente, de forma que un metabolito se transforma en otra molécula y esta última nuevamente en la primera, manteniéndose por tanto su concentración constante pero sin embargo, durante el desarrollo de estas reacciones se necesita energía y se produce calor. En los mamíferos, los ciclos fútiles son numerosos y pueden producirse bien en células pertenecientes al mismo tejido como las reacciones fructosa-6-fosfato/fructosa 1-6-difosfato o glucosa/glucosa-6-fosfato o entre células pertenecientes a tejidos distantes como el ciclo de Cori (glucógeno hepático- glucosa circulante -glucógeno muscular - ácido láctico circulante). Además de liberar calor los ciclos fútiles son sistemas que aumentan la sensibilidad y amplifican las señales metabólicas (28).

c. Mecanismos celulares que regulan la formación y recambio de los depósitos grasos: lipólisis, lipogénesis y adipocitogénesis

c.1. Lipólisis/Lipogénesis

El volumen del tejido adiposo está en equilibrio dinámico y se modula mediante la variación de la velocidad de la lipólisis, proceso metabólico responsable de desdoblar los triacilgliceroles en ácidos grasos y glicerol y la lipogénesis que es la ruta metabólica que conduce a su formación. Ambas vías se producen de forma simultánea en los adipocitos, hepatocitos y células de las glándulas mamarias, y el predominio de una u otra define la dirección del metabolismo lipídico (23).

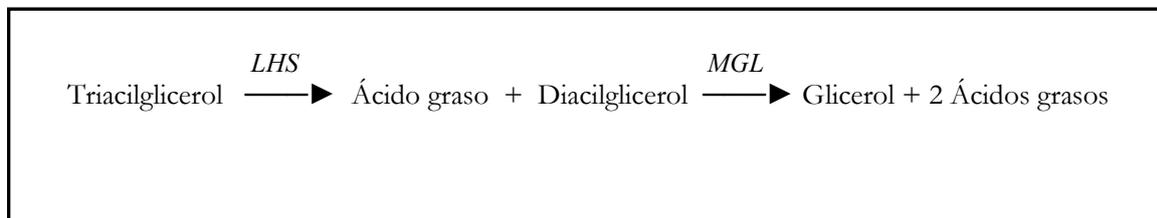


Fig. 4.: Esquema de las distintas etapas que forman parte de la lipólisis.
Fte.: Modificado de Voet: *Bioquímica*. (23)

La lipólisis (fig. 4) se estimula principalmente por el frío, el ejercicio y la hipoglucemia. La LHS inicia el proceso catalizando la hidrólisis del primer ácido graso de los triacilgliceroles, que es el paso limitante de la vía. Después los diacilgliceridos son hidrolizados por la monoacil-glicerol-lipasa hasta glicerol y ácidos grasos y finalmente, los ácidos grasos gracias a una proteína transportadora atraviesan la membrana citoplasmática y unidos a la albúmina, se desplazan por el torrente sanguíneo para poder ser utilizados por otras células como fuente de energía. Los ácidos grasos son combustibles preferentes para el hígado, riñones, músculo esquelético y miocardio (23).

La LHS está fuertemente regulada por los niveles intracelulares de AMPc mediante receptores acoplados a proteínas G. Cuando el receptor se une a un ligando lipolítico se activa, eximiendo la subunidad α de la proteína y activando a la adenilato-ciclase que a su vez produce un aumento en el nivel intracelular de AMPc. Si el receptor se une a un sustrato antilipolítico la proteína G libera la subunidad β , que tras unirse a la subunidad α , impide la actividad del enzima. El AMPc formado activa al enzima kinasa-A quien cataliza a su vez la fosforilación de otra familia de proteínas Kinasas y en consecuencia se

amplifica substancialmente la señal inicial (amplificación en cascada). Las proteínas *kinasas* fosforiladas son activas y capaces de fosforilar a la *LHS* que finalmente es activada de este modo (29). Las catecolaminas tras unirse a los receptores adrenérgicos β_1 , β_2 y quizás los β_3 , el glucagón y otros mediadores como la hormona del crecimiento, la ACDH y los corticosteroides provocan un aumento de los niveles intracelulares de AMPc activando a la *LHS* y por consiguiente, estimulando la lipólisis. Sin embargo, la insulina que mediante la activación de la *fosfodiesterasa III*, inactiva a la *adenilato-ciclasa*, el estímulo de los receptores α_2 -adrenérgicos y los receptores de adenosina inhiben la ruta (30). Es preciso señalar que la velocidad a la que puede desarrollarse la lipólisis varía según la localización del tejido adiposo: es menor en el TAB subcutáneo periférico, aumenta en el TAB subcutáneo abdominal y en el TAB visceral es donde ocurre con más celeridad. Este hecho permite una rápida llegada de ácidos grasos al hígado para poder superar aquellas situaciones, como por ejemplo la producida con el ejercicio físico intenso, donde puede producirse “urgencia de combustible” (29).

A la ruta metabólica contraria, mediante la cual los ácidos grasos previamente activados son esterificados con el glicerol-fosfato para formar triacilgliceroles se denomina lipogénesis como muestra la figura 5 (23).

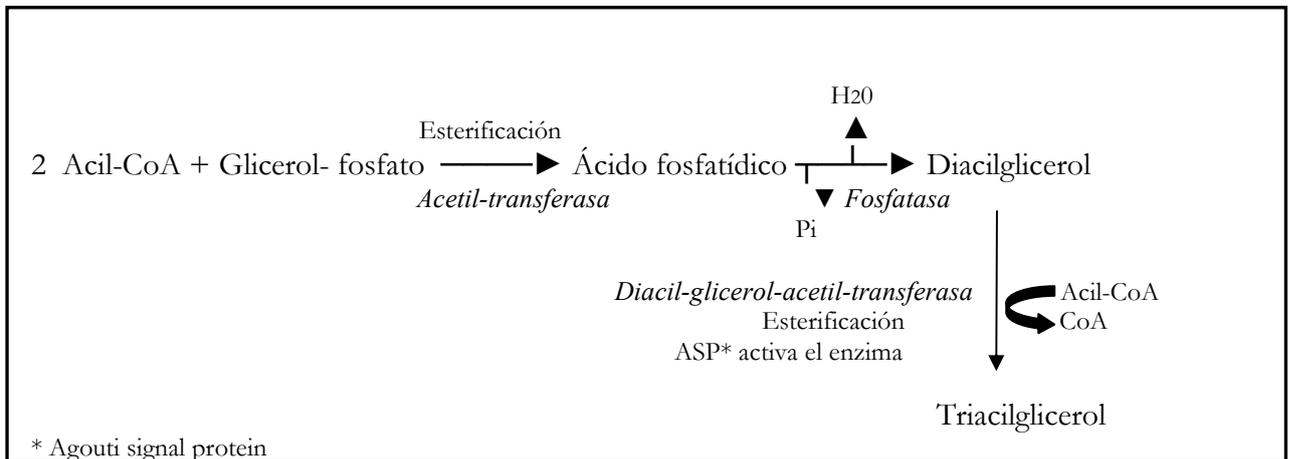


Fig. 5.: Esquema de las distintas etapas que forman parte de la síntesis de triacilgliceroles.

Fte.: Modificado de Voet: Bioquímica. (23).

El origen del glicerol-fosfato es diferente en cada tejido. En el hígado el glicerol puede ser fosforilado por el enzima *glicerol-kinasa* y por tanto no depende exclusivamente del metabolismo glucídico, sin embargo, en el tejido adiposo se origina vía glucolítica. El metabolismo de la glucosa es de suma importancia para la actividad lipogénica adipocitaria, hasta tal punto que el tejido adiposo blanco es el responsable de la captación del 5 al 20% de la glucosa insulina dependiente (31). El ingreso de glucosa a las células se produce a través de transportadores de naturaleza proteica (GLUT) localizados en la membrana plasmática. Los GLUT tienen varias isoformas distribuidas desigualmente en los tejidos y sometidas a diferente regulación, los más abundantes en el tejido adiposo son los GLUT-4 que son estimulados principalmente por la insulina. Este hecho es el responsable de que el déficit de insulina altere la síntesis de triacilgliceroles en el tejido adiposo: si disminuye la glucolisis se genera menos cantidad de glicerol fosfato, por tanto disminuye la síntesis de triacilgliceroles prevaleciendo la lipólisis sobre la lipogénesis y provocando la salida de ácidos grasos del adipocito (32).

Los ácidos grasos también pueden tener distinto origen según el momento metabólico y el tejido considerado. En estado post-prandial, al hígado le llegan los ácidos grasos que cuentan en su estructura química con más de 10 átomos de carbonos procedentes de la dieta bajo la forma de quilomicrones y vía porta cuando poseen menos de 10 átomos de carbono, ya que éstos son hidrosolubles. En estado de ayuno los ácidos grasos procedentes del tejido adiposo son trasladados vía arterial unidos a la albúmina al resto de los tejidos o también pueden ser sintetizados a partir de glucosa mediante un proceso conocido como síntesis “de novo”. Al músculo y al tejido adiposo sin embargo, le llegan los ácidos grasos vía sanguínea transportados en los triacilgliceroles de las lipoproteínas ó unidos a la albúmina (31). En la pared de los capilares del tejido adiposo y del tejido muscular, se encuentra la *LPL* que libera a los ácidos grasos las lipoproteínas para que puedan penetrar dentro de estas células. Éste es un enzima “marcapaso” en la provisión de ácidos grasos a los tejidos ya que cataliza el paso limitante de la ruta metabólica por lo que determina la velocidad de la síntesis de triacilgliceroles. La mitad de los ácidos grasos liberados junto con todo el monoacil-glicérido generado ingresan en los adipocitos y en los miocitos bien mediante difusión pasiva, bien con la ayuda de transportadores específicos. Los ácidos grasos no ingresados, son transportados por el torrente sanguíneo hasta que llegan al hígado unidos a la albúmina (29).

La actividad de la LPL se regula modificando la velocidad catalítica del enzima (activación/inhibición), y mediante cambios en la concentración de esta proteína (inducción/represión). La insulina y los glucocorticoides son importantes inductores especialmente en el tejido adiposo visceral. Se ha observado que tras las comidas aumenta la actividad del LPL en el tejido adiposo y disminuye en el músculo esquelético, y sin embargo durante el ayuno y el ejercicio, ocurre justo lo contrario. Esta regulación inversa en respuesta a la alimentación y el ejercicio es debida a los desiguales efectos que produce la insulina en el tejido adiposo y en el tejido muscular, que sirve para maximizar los depósitos de energía en momentos de abundancia y en periodos de carencia, poder abastecer de energía al músculo (30). La actividad de la LPL está aumentada durante la obesidad aunque paradójicamente también lo hace durante la pérdida de peso. Este hecho sugiere que el enzima podría comportarse como regulador del “*set point*” graso adipocitario. El aumento de LPL en respuesta a la alimentación se debería a un mecanismo tipo postransaccional, mientras que el debido a la pérdida de peso se debería a un aumento de la síntesis del enzima. (33).

c.2. Adipocitogénesis

La formación del tejido adiposo blanco comienza antes del nacimiento aunque su desarrollo es un proceso continuo que se produce a lo largo de toda la vida. La totalidad de los depósitos de grasa pueden sufrir grandes variaciones a lo largo de la vida, permitiendo así abordar diferentes circunstancias fisiológicas. Esta variabilidad es posible gracias a que los adipocitos, que pueden almacenar grasa en cantidades próximas al 80-95% de su volumen, tienen la capacidad de aumentar (hipertrofia) y disminuir de tamaño debido a la gran elasticidad de su membrana citoplasmática, y además pueden aumentar en número (hiperplasia) (1). Aunque en obesidades tempranas se produce mayor aumento de la celularidad, la capacidad hiperplásica parece conservarse siempre, parece ser que en todas las especies estudiadas, la hipertrofia es un proceso que ocurre con más rapidez que la hiperplasia. Como la formación de nuevos adipocitos es un proceso irreversible, cuando se produce una reducción de peso corporal disminuye el tamaño de las células mas no su cantidad (34).

Cuando los adipocitos superan un “tamaño crítico” se pone en marcha el complejo mecanismo de reproducción. El estímulo proliferativo parte de los propios adipocitos aunque también podrían estar implicados otros tejidos. Durante este proceso, las células del soporte fibroblástico-vascular del tejido adiposo, coincidiendo con un fuerte aumento de su nivel de *LPL*, sufren un proceso de diferenciación convirtiéndose en adipoblastos. Posteriormente estas células tras adquirir enzimas y receptores específicos se transforman en pre-adipocito. Para llevar a cabo este proceso de diferenciación es necesario un superávit energético y la acción de diferentes factores capaces de interferir con el medio como la insulina, la hormona del crecimiento, prostaglandinas, glucocorticoides etc. que pueden actuar bien a nivel de receptores de membrana bien a nivel de receptores nucleares. En los preadipocitos también existe un receptor para ácidos grasos involucrado en el proceso de síntesis de las enzimas necesarias para la diferenciación celular, estableciéndose así una relación entre factores alimentarios y la activación de las células preadiposas. El último paso consiste en la incorporación de nuevos receptores y enzimas para la síntesis de ácidos grasos y triacilglicérolos hasta alcanzar el estado de adipocito maduro (21).

1.2. Integración del metabolismo energético: visión global

1.2.1. Adquisición y transformación de la energía: digestión y absorción de nutrientes

Las células para poder desempeñar todas las funciones inherentes a la vida necesitan un aporte continuo de energía que se obtiene mediante un conjunto de reacciones bioquímicas que transforman los nutrientes adquiridos del entorno en metabolitos energéticos y metabolitos estructurales. El encargado de desdoblar los alimentos en sus constituyentes elementales para poder abastecer al organismo de los nutrientes, el agua, los electrolitos y las vitaminas necesarias es el aparato digestivo (1). La digestión es un proceso complejo cuyo control recae sobre el sistema nervioso, el sistema endocrino y en el que interviene la propia composición de la dieta. Para su correcto desarrollo necesita de la participación de un conjunto extenso y variado de enzimas y secreciones, que son sintetizadas y liberadas por varios órganos y cuyo objetivo es producir la ruptura de los enlaces que componen los distintos macronutrientes mediante reacciones de hidrólisis hasta la obtención de un “papilla” llamada quimo que contiene los nutrientes de tal forma que puedan ser absorbidos (17).

El intestino delgado es la parte del tubo digestivo preparada para la absorción de los nutrientes por excelencia debido a sus numerosos pliegues, a su larga extensión y a que su superficie está tapizada por millones de pequeñas vellosidades cuyas células se caracterizan por tener un borde en forma de cepillo que hace protusión hacia el quimo. Como ocurre en otras membranas celulares aquí se producen varios mecanismos de transporte, entre los que cabría destacar el transporte activo, la difusión simple, la difusión facilitada y en menor medida también la pinocitosis. La clave para entender la absorción de nutrientes radica en la estructura general de las vellosidades intestinales, donde se observa la ventaja que proporciona la disposición del sistema vascular para la absorción de las sustancias hacia la vena porta, así como la disposición del quilífero central para la absorción hacia los vasos linfáticos (17).

Los principales productos obtenidos tras la hidrólisis de los glúcidos: la glucosa, la fructosa (procedente de la hidrólisis de la sacarosa) y la galactosa (procedente de la hidrólisis de la lactosa, un azúcar especialmente abundante en la leche), pese a poder atravesar el epitelio intestinal por difusión simple, debido a la lentitud a la que se produce este mecanismo de transporte son absorbidos por co-transporte mediado por proteínas transportadoras específicas saturables e inhibibles. Tan sólo una porción glucídica muy poco relevante se absorbe en forma de disacáridos o moléculas de mayor tamaño. Aunque estos monosacáridos pueden participar en las rutas catabólicas o anabólicas de los enterocitos (particularmente la fructosa puede ser transformada en sorbitol) su principal destino es alcanzar la circulación porta-hepática y finalmente es en el hígado donde se determina la dirección de su metabolismo. Tanto la digestión como la absorción de los nutrientes de naturaleza glucídica es muy eficiente y es extraña la existencia de estas moléculas en la composición fecal incluso podría afirmarse, que su presencia puede ser considerada como un indicio de enfermedad (31).

Debido a su naturaleza apolar y a la escasa o nula capacidad que presentan los lípidos para disolverse en solventes acuosos, la absorción de estos macronutrientes es la más compleja. El colesterol tras ser hidrolizado, las vitaminas liposolubles, los ácidos grasos y monoacilgliceroles liberados tras la hidrólisis de los triacilgliceroles son introducidos principalmente, aunque no de forma exclusiva, en el interior de unos complejos formados con las sales biliares denominadas micelas. Estos complejos facilitan el transporte de las moléculas hidrófobas a través del soporte acuoso de la luz intestinal hacia la membrana de las células del borde en cepillo donde las grasas son solubles y pueden difundir al interior de la célula. Una vez liberado el componente lipídico emulsionado la micela regresa a la luz intestinal para ser reutilizada (23). Cuando ha concluido su función la mayor parte de las sales biliares son reabsorbidas en el íleon terminal mediante transporte activo y se dirigen de nuevo hacia el hígado a través del sistema portal (circulación entero-hepática) para volver a formar parte de la secreción biliar. Aquellas moléculas que no son absorbidas se eliminan junto con las heces. Se ha observado que la composición de la dieta influye en la proporción de sales biliares que son reabsorbidas o eliminadas (17).

Una vez dentro de los enterocitos el glicerol, los monoacilglicéridos y los ácidos grasos de cadena larga son captados por el retículo endoplasmático liso y en él se re-esterifican para volver a formar “nuevos” triacilglicéridos y estas estructuras junto con los fosfolípidos, el colesterol y las vitaminas liposolubles se combinan con las apolipoproteínas (apoA-I, apoA-IV y apoB-48) para formar glóbulos que son excretados por exocitosis hacia el espacio intercelular llamados quilomicrones. Desde las caras laterales de las células epiteliales los quilomicrones pasan a través de la membrana basal hacia el quilífero central de la vellosidad y son vertidos a los conductos linfáticos donde son impulsados hasta el conducto torácico y a la altura de la vena subclavia son vertidos a la circulación periférica (23) que los transporta por el organismo a medida que éstos los van haciéndose más pequeños y menos densos. En el endotelio capilar la *LPL* libera a los ácidos grasos de los quilomicrones y son captados por el tejido adiposo, el hígado y en caso de necesidad metabólica por el tejido muscular para su oxidación y transformación en energía. A medida que ocurre este hecho también cambian las apolipoproteínas que conforman su estructura de modo que se enriquecen en apoE y se empobrecen en apoA. Estas moléculas resultantes se denominan quilomicrones residuales y su principal destino es el hígado. Aproximadamente entre el 80 y el 90% de los ácidos grasos absorbidos en el intestino utilizan este mecanismo de transporte sin embargo, pequeñas cantidades de ácidos grasos de cadena corta (C8–C10) debido a su naturaleza hidrosoluble, son absorbidos directamente hacia la sangre portal como se ha mencionado anteriormente (29).

Las proteínas conforme van siendo desnaturalizadas liberan a la luz intestinal los aminoácidos que las constituyen que penetran en las células enterales mediante transporte activo secundario (31). Dentro de los enterocitos, estos nutrientes además de actuar como señales para el control del metabolismo (especialmente la leucina) pueden intervenir en distintos procesos bioquímicos como la síntesis de los quilomicrones, la síntesis de proteínas como las enzimas... Además los enterocitos utilizan principalmente la glutamina como sustrato energético. No obstante, una buena parte de los aminoácidos son transportados vía porta al hígado donde participan en rutas biosintéticas o catabólicas según la demanda celular. El resto de los aminoácidos viaja vía sistémica para ser captado por otros órganos y tejidos (17).

Algunos pequeños péptidos, sobre todo aquellos di y tripeptidos cuyo grupo amino está bloqueado, pueden escapar a la acción de las peptidasas y alcanzar el torrente sanguíneo. Este suceso cuantitativamente poco relevante no está exento de importancia ya que es el responsable de ciertas alergias alimentarias y constituye la vía de entrada de algunas moléculas que forman parte de los alimentos funcionales permitiendo establecer una base nada despreciable para el diseño de nuevas estrategias alimentarias (35).

El tubo digestivo además proporcionar los precursores de los metabolitos energéticos también es el encargado de aportar al organismo otro tipo de nutrientes como las vitaminas o los minerales (1). Estas moléculas son necesarias para la supervivencia celular y algunas de ellas, especialmente en el caso de los cationes, intervienen en las rutas metabólicas actuando como catalizadores (28). El mecanismo de absorción de los minerales es complejo y se lleva a cabo en tres etapas: la primera etapa o etapa de liberación consiste en diversas reacciones químicas producidas en el estómago e intestino cuyo fin es liberar los cationes y aniones de las moléculas y estructuras que los contienen. La liberación de los cationes está fuertemente condicionada por el pH del entorno y la composición del alimento que les acompaña sin embargo, a los aniones no parece influirles tanto estos factores o al menos, no del mismo modo. La segunda etapa o etapa de translocación consiste en el paso de estas sustancias a través de la membrana epitelial de las células intestinales. En general los aniones pequeños son transportados por difusión simple mientras que los cationes utilizan la difusión facilitada o el transporte activo. En cualquier caso, es posible que para muchos minerales opere más de un sistema de transporte e incluso podría afirmarse que los iones monovalentes se absorben con facilidad y en grandes cantidades y sin embargo los iones bivalentes se absorben en pequeñas cantidades. En esta etapa, posiblemente como reflejo de una falta de especificidad por los transportadores, los cationes interaccionan fuertemente entre si produciendo fenómenos de competencia, desplazamiento y saturación. Para finalizar en la tercera etapa o de movimiento los iones migran a través de la superficie serosa de las células intestinales hacia el torrente sanguíneo y generalmente este paso se realiza con el concurso de proteínas transportadoras (1).

El último paso de la digestión consiste en el vaciamiento del contenido de la ampolla rectal. La composición de las heces es muy variable y depende en gran medida de la composición de la dieta y de como se haya producido el proceso de digestión. En general se establece que el agua es el componente mayoritario de las heces aunque en ellas también se encuentra una extensa población bacteriana junto a residuos procedentes de la dieta y del proceso de digestión y desechos celulares. En general podría establecerse que en los mamíferos entre el 10 y 15% de la materia fecal es grasa, entre el 10 y el 20% sustancias inorgánicas, principalmente carbonatos y fosfatos, entre el 2 y 3% proteínas y el 30% restante fibra no digerida y componentes de los jugos digestivos como las sales biliares, la bilirrubina y sus metabolitos. La excreción fecal también sirve para eliminar desechos orgánicos y excesos eventuales de determinados nutrientes que pueden resultar tóxicos y que llegan al intestino grueso mediante la circulación entero-hepática aunque ésta no sea la vía más importante de eliminación (17).

1.2.2. Integración de las rutas metabólicas energéticas

El metabolismo está constituido por un amplio conjunto de procesos bioquímicos interrelacionados entre sí mediante los cuales los seres vivos adquieren y transforman la energía, acoplando las reacciones exergónicas de oxidación-reducción a los distintos procesos endoergónicos necesarios para acometer las distintas actividades celulares. En los mamíferos los órganos y tejidos se han especializado para desempeñar una serie de funciones fisiológicas específicas, y llevan a cabo un conjunto de rutas metabólicas con un propósito fisiológico determinado sin embargo, trabajan de manera conjunta y coordinada para mantener la homeostasis calórica definida como la presencia constante de metabolitos energéticos en sangre. El metabolismo debe ser entendido de forma global e integral y las distintas rutas metabólicas que lo componen, aunque se desarrollen en un modelo orgánico compartimentalizado, están estrechamente reguladas, interconectadas y ordenadas. Por otro lado el metabolismo energético también se caracteriza por la capacidad que presenta para utilizar un gran número de moléculas (glúcidos, lípidos y proteínas) y obtener intermediarios comunes que pueden ser oxidados para producir energía. Por otro lado, los distintos tipos de células poseen un conjunto de enzimas comunes a las principales rutas metabólicas pero utilizan, almacenan y exportan diferentes metabolitos energéticos (31).

Entre todos el órgano que más destaca por su alto poder metabólico y su gran versatilidad es el hígado. Constituye una gran reserva química de metabolitos ya que almacena temporalmente los nutrientes procedentes de la dieta gracias a que anatómicamente cuenta con un sistema porta-venoso y una posición privilegiada y además en él se desarrolla una buena parte del metabolismo intermediario transformando dichos nutrientes en combustibles y precursores biosintéticos necesarios para otros tejidos y cuyas necesidades varían con la actividad del organismo. En este sentido el hígado tiene una gran flexibilidad metabólica para adaptarse a las distintas circunstancias que le permite intercambiar sustratos y energía con otros sistemas, condición indispensable para mantener los niveles adecuados de metabolitos energéticos en sangre. Por tanto, el hígado contribuye de una forma importante en el mantenimiento de la glucemia respondiendo a los niveles de insulina, glucagón, adrenalina, y en contraste a las células del músculo y el tejido adiposo, a los propios niveles plasmáticos de glucosa, así como al desarrollo del metabolismo energético lipídico ya que casi todos estos procesos ocurren en este órgano con mayor celeridad (17).

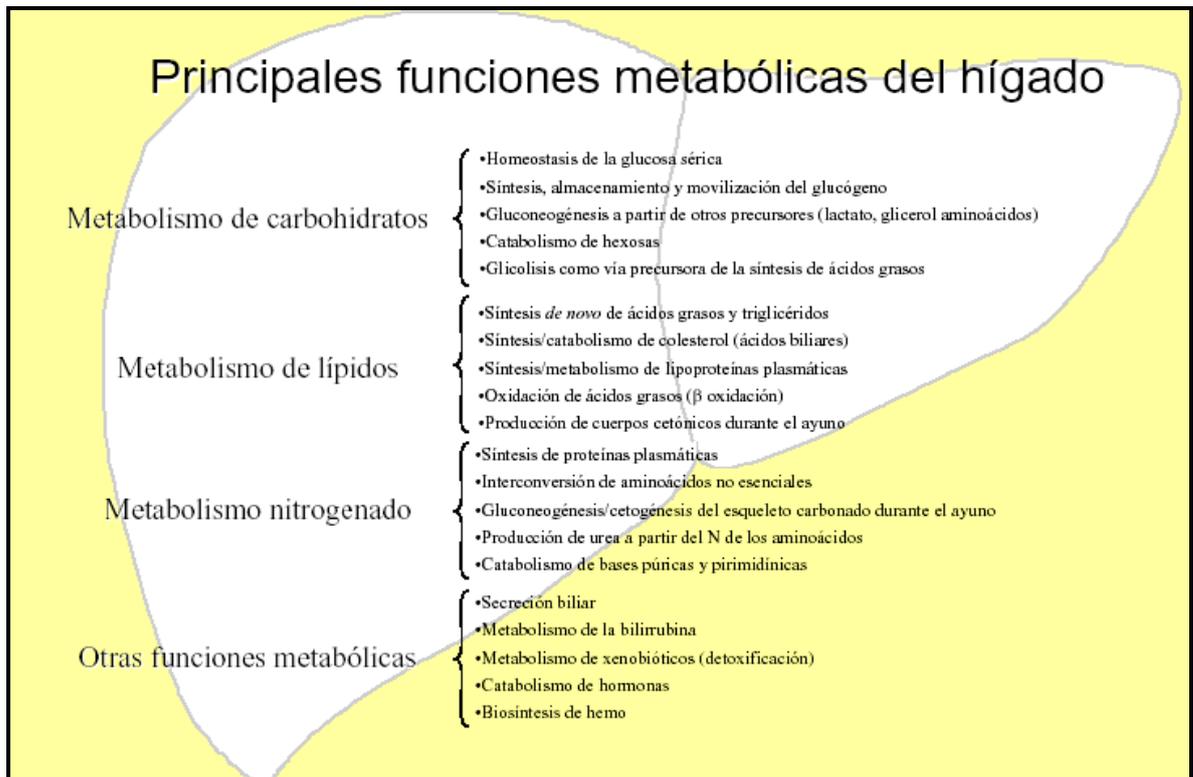


Fig. 6.: Resumen de las principales funciones metabólicas del hígado.
 Fte.: Modificado de Fauci: *Principios de medicina interna* (42).

En estado de post-absorción (fig. 6) la mayor parte de los azúcares y parte de los aminoácidos son transportados desde la membrana basolateral de los enterocitos por la sangre venosa portal hacia los sinusoides hepáticos. En este punto, las células reticulo-endoteliales y parenquimatosas del hígado absorben y almacenan temporalmente entre la mitad y las tres cuartas partes de dichos nutrientes dependiendo de la composición de la dieta y el intervalo de tiempo transcurrido entre una ingesta y otra. Recordemos que a este órgano también le llegan vía porta los ácidos grasos de cadena corta y vía sistémica los quilomicrones compuestos por triacilgliceroles y otras moléculas de naturaleza lipídica procedente de la dieta (31).

Una vez dentro de los hepatocitos la glucosa que ha sido previamente absorbida como tal o procedente de la transformación de otras hexosas se fosforila rápidamente gracias a la acción de la glucokinasa para dar glucosa-6-fosfato que puede participar en distintas rutas metabólicas según las necesidades orgánicas. La liberación de insulina por el páncreas junto con la abundancia de glucosa-6-fosfato y de ATP motiva en el hígado la activación de la síntesis de glucógeno que es una forma de almacén de glucosa fácilmente movilizable localizado en el citoplasma celular en forma de gránulos junto con las enzimas que participan en su síntesis y degradación (glucogeno-sintasa y glucógeno-fosforilasa). Cuando se requiere ATP o esqueletos carbonados para la biosíntesis de otros compuestos, la glucosa-6-fosfato se oxida vía glucolítica hasta piruvato o se convierte en ribosa-5-fosfato. El piruvato a su vez puede ser carboxilado por medio de la piruvato-carboxilasa para obtener los esqueletos carbonatados intermediarios del ciclo del krebs (oxalacetato) o puede ser descarboxilado por la piruvato-deshidrogenasa hasta acetyl-CoA. Los aminoácidos que en los hepatocitos no son utilizados para la síntesis de proteínas, también pueden ser utilizados como precursores de piruvato u otros metabolitos intermediarios del ciclo de Krebs (28).

El catabolismo glucídico y proteico convergen en acetyl-CoA que además de poder ser oxidado completamente hasta CO₂ para producir ATP es el precursor de la síntesis de ácidos grasos y colesterol lo que permite derivar parte de los metabolitos glucídico y proteicos hacia la síntesis lipídica. Esta interesante molécula también puede ser obtenida a partir de la degradación de los ácidos grasos que son el sustrato energético preferido de los hepatocitos (29). En estado posprandial, cuando la demanda energética es pequeña, el excedente de ácidos grasos tanto de origen endógeno como exógeno existente en estas células, es incorporado a estructuras lipídicas complejas como los triacilgliceroles que constituyen una reserva energética de utilización lenta. A su vez los triacilgliceroles se combinan con apoproteínas específicas para formar lipoproteínas como las VLDL que son liberadas en el torrente sanguíneo para su posterior distribución y almacenamiento en el tejido adiposo. Los hepatocitos también son responsables del catabolismo y la síntesis de otras moléculas lipídicas como los fosfolípidos, las sales biliares y parte de las hidroxilaciones que sufre la vitamina D (28, 29).

En estado de ayuno (fig. 7) se produce un descenso en los niveles de glucosa en sangre que motiva la liberación de glucagón dirigiendo el metabolismo celular de los distintos órganos y tejidos hacia aquellas rutas que aseguren el suministro continuo de glucosa y metabolitos energéticos. En los hepatocitos se activa la glucogenólisis pero la cantidad de glucógeno almacenado sólo abastece las necesidades orgánicas de glucosa durante un periodo de 10 a 18 horas aproximadamente. Si las necesidades persisten el hígado puede obtener glucosa a partir de otros precursores como la mayoría de los aminoácidos, el lactato, el glicerol, algunos intermediarios del ciclo de Krebs y el piruvato, activando la vía gluconeogénica. El hígado también constituye un pequeño almacén de ácidos grasos de rápida utilización que, junto con los ácidos grasos que se movilizan del tejido adiposo, constituyen una buena fuente energética que se utilizará con preferencia a la glucosa en la mayoría de los tejidos y que aportará la mayor parte del ATP necesario para la gluconeogénesis. Solamente una pequeña parte del acetil-CoA que se libera tras la β -oxidación de los ácidos grasos entra en el ciclo del ácido cítrico para su completa oxidación, el destino principal de esta molécula, es la formación hepática de cuerpos cetónicos que se liberan a sangre para ser captados por aquellos tejidos que pueden utilizarlos como fuente energética. Los hepatocitos no cuentan con el enzima 3-cetoacil-CoA-transferasa, por tanto, no pueden utilizar los cuerpos cetónicos como fuente de ATP (28, 31).

Las proteínas también pueden ser utilizadas como fuente de energía puesto que, al menos en el hígado, los aminoácidos que las componen pueden ser degradados dando lugar a una gran variedad de intermediarios metabólicos. Estas rutas casi siempre comienzan con la transaminación del aminoácido a su α -cetoácido correspondiente con la transferencia del grupo amino a la urea (ciclo de la urea). La mayoría de los aminoácidos, todos excepto la leucina y la lisina que sólo pueden convertirse a acetil-CoA o acetoacetato y por tanto son cetogénicos, son glucogénicos y se pueden convertir en piruvato o en algún intermediario gluconeogénico, y parte de ellos también son cetogénicos y pueden ser utilizados para la síntesis de cuerpos cetónicos (31).

Metabolismo energético en estado de post-absorción

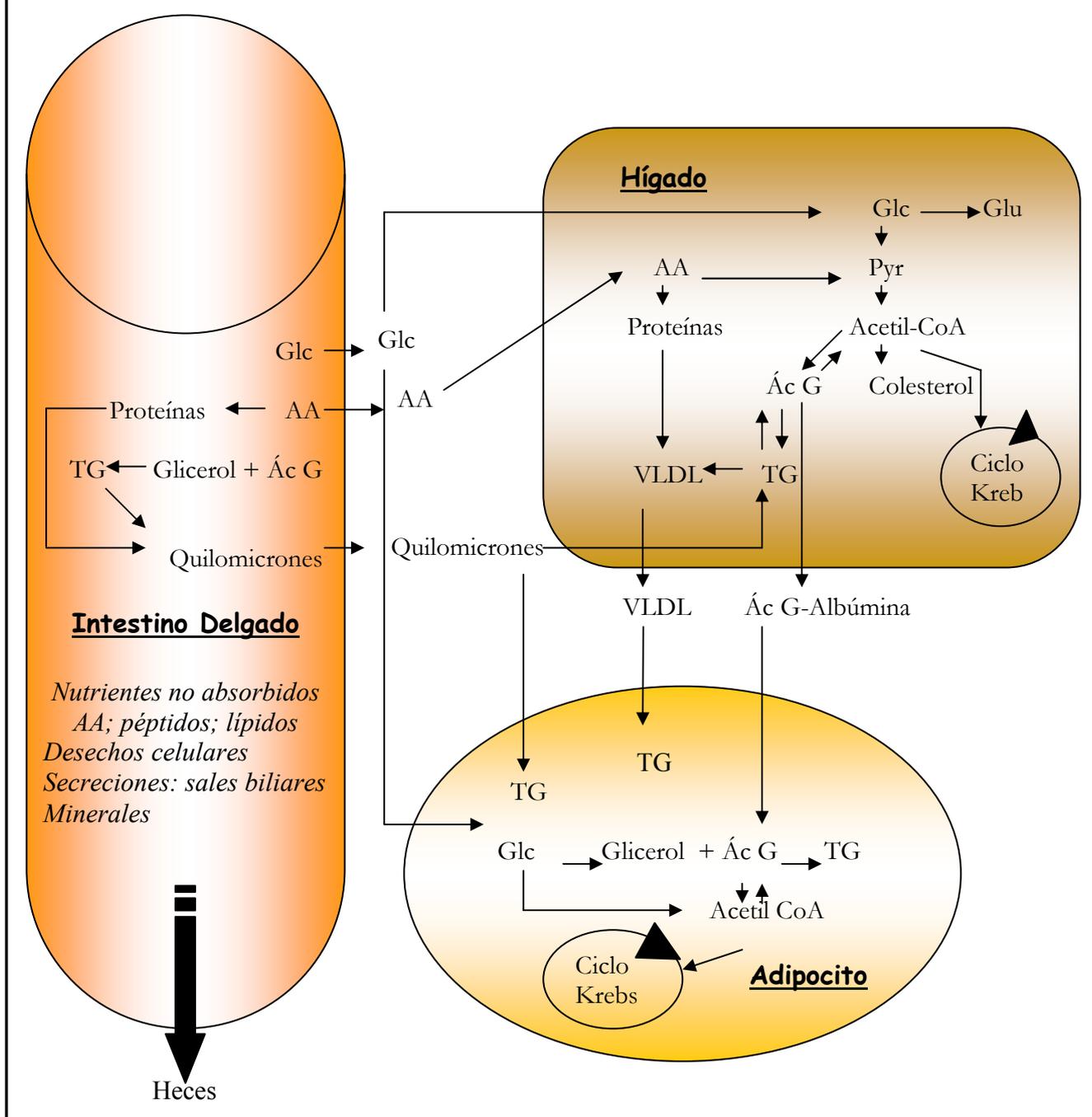


Fig 6.: Principales rutas energéticas en estado de post-absorción.
 Fte.: Modificado de Linder; Nutrición: aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos (31).

1.2.3. Abastecimiento de energía: el tejido adiposo

El tejido adiposo es un órgano difuso ampliamente representado en los mamíferos. Se estima que la adiposidad apropiada para el cuerpo de una mujer oscila entre el 20 y el 27% de su peso corporal total y aproximadamente el 12% es grasa esencial, localizada en sitios específicos como la médula ósea, el corazón, el hígado etc, imprescindible para la supervivencia. Para los hombres la adiposidad adecuada oscila entorno al 12 y el 15% de su peso corporal total y del orden del 4 al 7% es grasa esencial (1). Los adipocitos contienen el mayor almacén corporal de energía en forma de triacilgliceroles que sirve para abastecer al organismo de metabolitos energéticos en respuesta a las diversas situaciones fisiológicas pero el tejido adiposo es algo más que un tejido de reserva pasivo. Posee una tasa metabólica elevada ya que de hecho, el trabajo conjunto que realiza en completa coordinación e interconexión con el hígado, es de fundamental importancia para el mantenimiento de la homeostasis calórica y produce un buen número de moléculas necesarias para el correcto desarrollo metabólico orgánico (20). El tejido adiposo también se encarga de transformar en calor excesos energéticos eventuales como por ejemplo los que se producen tras una comida copiosa (19).

Atendiendo a su coloración el tejido adiposo se clasifica como tejido adiposo blanco y tejido adiposo pardo o marrón (fig. 8) y pese tener un origen mesenquimático común poseen profundas diferencias que afectan tanto a su morfología, como a su distribución, expresión génica y función (17).

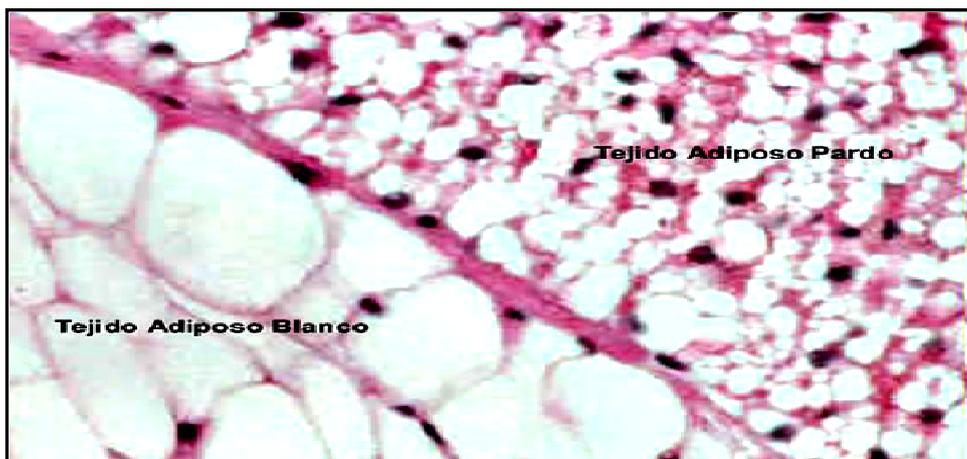


Fig. 8.: Aspecto histológico del TAB y TAP. (H-E 200X).
Fte.: Young B. Wheater's Histología funcional: Texto y atlas en color (36).

a. El tejido adiposo blanco

El tejido adiposo blanco está constituido por adipocitos uniloculares cuyo citoplasma está ocupado por una sola gota de grasa que desplaza al núcleo y el resto de las organelas celulares hacia las regiones periféricas. Los adipocitos que lo constituyen poseen mitocondrias pero éstas son menos numerosas que las que poseen los adipocitos del tejido adiposo pardo como muestra la figura 8 (36). El estudio de la composición celular de sujetos delgados muestra que el 80% de su peso está constituido por triacilglicérol, el 18% por agua y el 2% por proteínas. En los sujetos obesos el contenido graso aumenta a medida que disminuye proporcionalmente el contenido acuoso. Anatómicamente el tejido adiposo blanco se clasifica como superior e inferior. Esta diferenciación coincide con su distinto comportamiento metabólico y biológico. La grasa de localización superior a su vez puede dividirse en abdominal y torácica atendiendo al siguiente esquema (37):

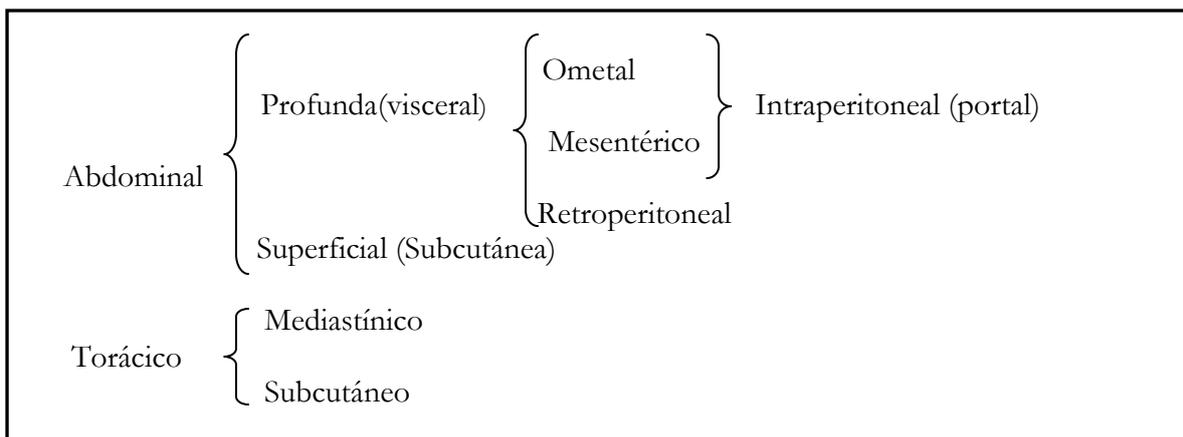


Fig. 9.: Clasificación del tejido adiposo blanco en humanos.
Fte.: Modificado de Vague; Obesity (37).

El tejido adiposo blanco proporciona a los mamíferos una barrera mecánica que protege a los órganos de posibles traumatismos, es un buen aislante térmico que ayuda a conservar el calor corporal, constituye la principal reserva energética de triacilglicérol y aunque tal vez sea menos conocido pero no por eso menos importante, participa ampliamente en las funciones metabólicas orgánicas destacando ampliamente el papel que realiza en el control del peso corporal y la homeostasis de las reservas energéticas así como en el correcto funcionamiento del sistema inmune, la función vascular y la función reproductora (17, 20).

Para que todas estas funciones se desarrollen satisfactoriamente, el tejido adiposo blanco está generosamente irrigado e innervado y posee receptores para múltiples estímulos como muestran la tabla 4 que le sensibilizan tanto a las señales hormonales como nerviosas y metabólicas permitiéndole una rápida adaptación a los cambios que se producen en el organismo (38). Además posee actividad endocrina (autocrina e intracrina) por lo que sintetiza y libera múltiples mediadores como la leptina, el TNF- α , la angiotensina o los estrógenos al torrente circulatorio que entre otras funciones modulan el metabolismo (21, 39) como muestra la tabla 5.

Tabla 4.: Distintos receptores aislados en el tejido adiposo blanco.
Fte.: Modificado de Gómez y col. (20) y Arner y col. (38)

Receptor	Ligando	Actividad	Mecanismo
Insulina	Insulina	Antilipolítica	Disminución nivel de AMPc.
Adrenérgicos:	Catecolaminas		Activación proteínas G.
α 1A, α 1B, α 1C		Antilipolítica	
β 1, β 2, β 3		Lipolíticos	
Glucocorticoides	Glucocorticoides	Grasa periférica: Lipólisis	Modifican la respuesta de otros receptores a sus sus hormonas efectoras.
		Grasa central: Lipogénesis	
Acoplados a Gi	Adenosina	Antilipolítico	GTP.
	Prostaglandinas (E2)		
	Polipéptido YY		
	Neuropéptido Y		
Hormona estimulante del tiroides	TSH	Lipolítica	Desconocido.
Hormona del crecimiento	STH	Lipolítica	Modifican la respuesta de otros receptores.
Hormonas tiroideas	T3 y T4	Lipolíticos	Aumento respuesta β adrenérgica
Hormonas sexuales	Andrógenos	Desarrollo adipocitario	Adipocitogénesis.
	Estrógenos		
Miscelánea	IGF I y II	Desconocido	Desconocido.
	Colecistokina	Desconocido	
	Glucagón	Desconocido	
	ACTH	Desconocido	

Tabla 5.: Distintos mediadores segregados por el tejido adiposo blanco.
 Fte: Modificado de Moreno y col. (21) y Nedergaard y col. (39).

Mediador	Secreción	Acción
Acrp30/Adipo Q/ Adiponectina	Activa: Insulina, IGF-1, PPAR-G, LRH-1	Músculo esquelético: ↑ sensibilidad a insulina; ↑ la captación de glc; ↑ producción lactato; ↑ oxidación de ácidos grasos.
	Inhibe: TNF- α , resistina, glucocorticoides	Hígado: inhibe gluconeogénesis.
	leptina, ghrelina	TAB: Activa la LPL.
Resistina	↑ tras la ingesta ↓ Ayuno	Antagoniza a insulina; ↓ la captación de glc; ↑ producción hepática de glc; ↓ la adipogénesis.
Leptina	Activa: glucocorticoides, IL-1, TNF- α , IGF-1 Insulina y el metabolismo de la glc	SNC: Informa sobre el estado de reservas adiposas. y produce hiperfagia.
		Hígado: ↓ Lipogénesis ↑ β -oxidación => ↓ [AGL]
	Inhibe: Testosterona y las hormonas tiroideas	TAB: ↓ Lipogénesis; ↑ lipólisis.
		Páncreas: ↓ Secreción de insulina. Intestino: Estimula la captación de glc. M.E: ↑ captación de glc.
Adipsina/ASP	Secreción regulada por insulina y glucocorticoides	Captar y esterificar los AG hidrolizados de los triglicéridos por LPL-1 en estado posprandial.
IL-1	Respuesta a la inflamación de un tejido	Media respuesta inflamatoria; induce la secreción de otras citoquinas, quimioquinas y TNF.
IL-6	TNF- α	Disminuye la producción de LPL Aumenta la secreción hepática de triglicéridos.
TNF-a	Inductor: triacilgliceroles y AG libres	Regula la captación de glc y la oxidación de AGL; estimula la lipólisis y disminuye los niveles de LPL;
	Inhibe: glucocorticoides y catecolaminas	↓ la expresión de GLUT 4; resistencia a la insulina; regula expresión de enzimas específicas del adipocito.
IGF-1		Interviene en la expansión del tejido adiposo
Angiotensinógeno/ PAI-1	Regulación nutricional y hormonal	Inhibición de la fibrinólisis. Estimula la diferenciación del TAB. Acciones lipogénicas.
Estrógenos		Acción exacerbada en obesidad.

En estado post-prandial en el tejido adiposo blanco predomina la ruta lipogénica lo que le responsabiliza de la captación de una buena parte de glucosa insulino-dependiente procedente de la dieta. Como los adipocitos no poseen el enzima glicerol-kinasa, el glicerol-fosfato necesario para esterificar los ácidos grasos que llegan procedentes de los quilomicrones, las VLDL o unidos a la albúmina se obtiene del catabolismo de la glucosa. Si la concentración de glucosa es elevada los adipocitos pueden oxidar completamente este metabolito hasta acetil-CoA que finalmente es utilizado para la biosíntesis de ácidos grasos.

En estado de ayuno el descenso en la concentración plasmática de glucosa provoca la liberación de glucagón. Este cambio en la relación de los niveles de insulina/glucagón dirige el metabolismo hacia el suministro de metabolitos energético, por lo que en el tejido adiposo se activa la ruta lipolítica y en consecuencia se degradan los triacilgliceroles liberando ácidos grasos y el glicerol. Esta movilización de los ácidos grasos es una buena fuente de energía que se utilizará con preferencia a la glucosa en la mayoría de los tejidos y que además en el hígado puede ser utilizada como sustrato cetogénico (29).

b. El tejido adiposo marrón

El tejido adiposo pardo o marrón, existe en una gran cantidad de mamíferos pero sólo parece relevante para los neonatos y animales que hibernan. Representa entre el 1 y el 5% del peso corporal total (1). Está constituido por adipocitos poligonales de tamaño inferior a los del tejido adiposo blanco y son multiloculares: poseen numerosas gotas de lípidos en su citoplasma (fig. 8). Su contenido en triacilgliceridos varía entre el 30 y el 70% de su masa. El núcleo es esférico y se localiza en una posición central y sus células presentan abundantes mitocondrias y citocromos lo que le otorga esa coloración parda (36). Su localización es estratégica, se encuentra tanto en zonas superficiales como profunda como se aprecia en la figura 10 (37).

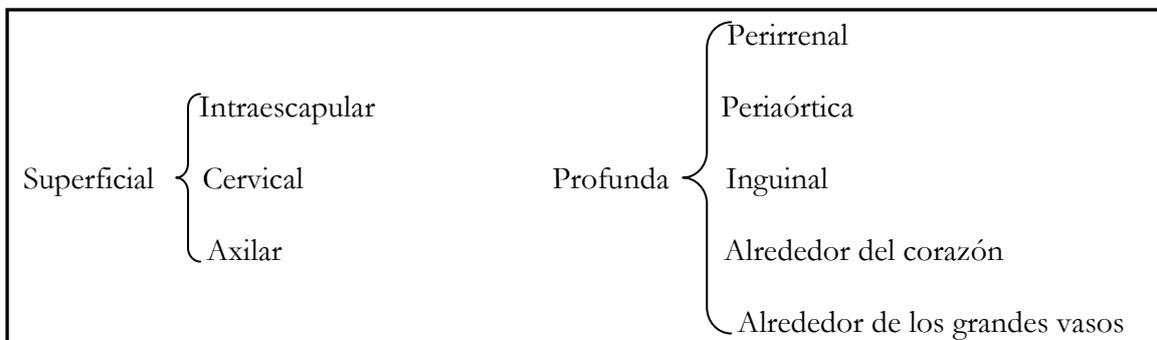


Fig. 10.: Clasificación del tejido adiposo pardo en humanos.
Fte.: Modificado de Vague; Obesity (37).

El tejido adiposo marrón está abundantemente vascularizado e innervado presentando muchos más capilares que el tejido adiposo blanco y también posee una elevada tasa metabólica (36). Pese a que los procesos lipolíticos y lipogénicos desarrollados en este tejido son similares a los desarrollados en el hígado o el tejido adiposo blanco, el tejido adiposo marrón tiene unas características metabólicas únicas ya que aunque posee un elevado número de mitocondrias, es poco eficiente en la producción de ATP y sin embargo es muy eficaz en la generación de calor. De hecho, su principal misión es calentar los órganos vitales generando “calor esencial” mediante la termogénesis acoplada a ciclos fútiles. Esto explicaría la relevancia que presenta este tejido para los neonatos, donde constituye entre el 2-5% del peso corporal total. Su actividad sería necesaria para superar la hipotermia postnatal (17).

En los adultos esta forma de termogénesis es menos importante ya que la aclimatación al frío puede resolverse mediante otras estrategias como el temblor o la actividad tiroidea. Durante mucho tiempo se tuvo por cierto que el tejido adiposo marrón en humanos después del nacimiento se iba atrofiando hasta su completa transformación en tejido adiposo blanco en cuanto a su aspecto, función e inervación no obstante, evidencias científicas más recientes apuntan que este tejido está presente y es funcional en personas adultas (40). En roedores se ha demostrado que el tejido adiposo marrón, que está bajo el control del sistema nervioso simpático, juega un papel en la protección contra la obesidad y recientes publicaciones atribuyen a este tipo de termogénesis una función compensadora de las diferencias energéticas producidas entre la ingesta y el gasto energético que serviría para amortiguar el exceso calórico ante una ingesta masiva modulando así el gasto energético en los mamíferos (41).

1.3. Dieta y salud

1.3.1. La leche un alimento funcional

Hasta hace relativamente poco tiempo se pensaba que los alimentos eran exclusivamente una fuente de energía y de elementos estructurales y se consideraba que una dieta era adecuada cuando proporcionaba los elementos necesarios para satisfacer las necesidades metabólicas básicas asegurando la supervivencia de los individuos y complaciendo la sensación de hambre. Hoy en día este concepto es insuficiente y ha evolucionado contemplando la posibilidad de que algunos alimentos puedan mejorar nuestra salud y reducir el riesgo a desarrollar determinadas enfermedades. Algunos nutrientes han demostrado ser una fuente de moléculas bioactivas, con capacidad de interactuar con el genoma, proteínas u otras biomoléculas implicadas en el metabolismo animal, capaces de producir cambios bioquímicos o adaptaciones en los organismos poniendo de manifiesto esta relación directa entre dieta y salud. En este contexto se definen los alimentos funcionales como aquellos que demuestran científicamente beneficiar a una o varias funciones orgánicas, mejorando el estado general de salud o reduciendo el riesgo de padecer determinadas enfermedades, en las cantidades normalmente consumidas en la dieta (35).

La leche y los productos lácteos son buenos ejemplos de alimentos funcionales ya que a su capacidad nutricional se le yuxtaponen un amplio y heterogéneo conjunto de propiedades. En su composición existe una gran variedad de constituyentes (tabla 6) que además son susceptibles de sufrir modificaciones tanto a nivel bioquímico durante la digestión como a nivel industrial mediante su procesado (66).

Tabla 6.: Composición química de la leche entera de vaca.
Fte.: Modificado de Horton y col. (66).

	Glúcidos	Proteínas	Lípidos	Agua
g/ 100 g de alimento	5	3,3	3,8	87,5
Minerales mayoritarios	Sodio	Potasio	Calcio	Cloro
mg/ L de alimento	505,4	1567,7	1277,3	1031,4
	Magnesio	Zinc	Fósforo	Hierro
	138,2	3,9	963,3	0,5
Minerales minoritarios	Yodo	Cobre	Flúor	Manganeso
µg/ L de alimento	237,2	100	20	40
Vitaminas hidrosolubles	B1 (Tiamina)	B2 (Riboblavina)	B3 (Niacina)	B6 (Piridoxina)
µg/ L de alimento	390	1670	870	430
	B12(Cianocovalamina)	C(ácido ascórbico)	Folatos	Biotina
	3680	9690	61,57	19,6
				Pantotenatos
				3240
Vitaminas liposolubles	A (Retinol)	D (Colecalciferol)	E (Tocoferol)	K
UI ó µg/ L de alimento	1299,5 UI	41,25 UI	1,54 UI	41,25 µg
Energía	67 Kcal/ 100 g de alimento			

Fracción glucídica: aproximadamente el 5% del peso total de la leche son glúcidos cuyo hidrato de carbono mayoritario es la lactosa. Este disacárido compuesto por glucosa y galactosa está siendo utilizado ampliamente en la industria alimentaria para la fabricación de prebióticos debido a que con gran facilidad puede ser transformado en otros compuestos como lactulosa, lactitol etc. En la última década se han desarrollado nuevas líneas de investigación que muestran un aspecto menos conocido de la lactosa en las que se aprecia un efecto sinérgico que mejora la absorción del calcio (67).

Fracción lipídica: la porción grasa de la leche es variable y suele oscilar entre el 3 y el 6%. Su componente mayoritario (90%) son los triacilgliceroles que están constituidos en su mayor parte por ácidos grasos saturados de cadena media como el esteárico (12%), palmítico (25-30%) y mirístico (11%), junto con una porción nada despreciable de ácidos grasos insaturados y poliinsaturados de cadena media como el oleico (23%), linoleico (2%) y α -linolénico (0,5%) (67). En la actualidad se están realizando múltiples estudios para valorar las propiedades de estas moléculas puesto que existen fuertes indicios que asocian el consumo de ácidos grasos insaturados con el aumento de los niveles plasmáticos de HDL-colesterol y la reducción de los niveles de LDL-colesterol (35).

Otros estudios también relacionan el consumo de ácido α -linolénico con la reducción del peso corporal (68). La leche además contiene un pequeño porcentaje (1%) de ácidos grasos de cadena corta como el ácido butírico que podría aportar cierta protección frente al cáncer de colon (67). Otros constituyentes funcionales de naturaleza lipídica como muestra la tabla 7 están siendo sometidos a estudio.

Tabla 7.: *Lípidos funcionales derivados de la leche.*

Fte.: Modificado de Hernandez y col. (12).

Nutriente funcional	Propiedad asociada
Ácido gamma amino butírico	Antihipertensivo
Ácido butírico	Prevención cáncer de colon
Ácidos grasos omega 3	Prevención aterosclerosis e hipertensión
	Desarrollo de la retina y el cerebro
	Prevención de desórdenes autoinmunes
	Prevención de distintos tipos de cánceres
Ácidos grasos conjugados	Reducción del peso corporal.
Esfingolípidos	Regulación del comportamiento celular
	Reducción de LDL-colesterol y aumento HDL-colesterol
Fosfolípidos	Protección frente a ulceración gástrica

Fracción proteica: la porción proteica de la leche constituye el 3% del peso total y constituye una importante fuente de moléculas con propiedades bioactivas (tabla 8). Esta capacidad puede ser debida bien a que algunas proteínas posean ciertas propiedades intrínsecas beneficiosas para la salud bien a que determinadas secuencias peptídicas, que se encuentran de forma inactiva dentro de la proteína que las contiene debido a distintas modificaciones producidas durante el proceso de digestión en el tubo digestivo como la hidrólisis o ciertos cambios producidos durante el procesado del alimento, hacen posible su liberación activando así su propiedad funcional (69).

La caseína es la proteína mayoritaria de la leche (80% del contenido proteico total) y es la responsable de que la leche cuaje. Posee un alto valor nutritivo puesto que contiene un buen número de aminoácidos esenciales. También destaca por la capacidad que presenta para formar un sistema micelar que integra en su seno al calcio y al fósforo manteniendo a estos minerales en suspensión y por tanto facilitando su disolución. Puesto que las sales derivadas del calcio son muy poco solubles la caseína puede ser considerada un biotransportador natural que mejora la solubilidad y la absorción de estos minerales en el organismo mejorando notablemente su biodisponibilidad. Por otro lado, la caseína puede ser hidrolizada proporcionando una buena fuente de péptidos. Dentro de este grupo heterogéneo de moléculas destacan por su actividad los casein-fosfopéptidos que tienen capacidad para secuestrar calcio y posiblemente a otros minerales actuando también como biotransportadores o el péptido FM del que se piensa que puede inhibir el depósito de grasa procedente de la leche y alterar el metabolismo lipídico (35).

El resto de la fracción proteica de la leche (20%) lo forman un grupo muy heterogéneo de moléculas de naturaleza muy diversa y con distintas propiedades que también son susceptibles de sufrir modificaciones. Cabe destacar la lactoferrina que ciertos estudios la presentan como una proteína transportadora de hierro y otros iones (35). También se han publicado estudios científicos que le atribuyen un posible papel en la supresión del apetito y el aumento de la producción de CCK. Otra molécula interesante es la β -lactoglobulina por su capacidad para unirse al retinol y a determinados ácidos grasos pudiéndose comportar como un transportador natural (69).

Tabla 8. Proteínas y péptidos funcionales derivadas de la fracción proteica de la leche.
Fte.: Modificado de Jelen y col. (35), Hernandez y col. (67) y Baró y col. (69).

Precursor	Proteína/ péptido bioactivo	Propiedades
Caseína		
α y β - Caseína	Casokininas	Incrementa el flujo sanguíneo al epitelio intestinal.
		Inhibición de la ACE.
	Péptido Glutámico	Mantenimiento del sistema inmune.
		Regula el desdoblamiento proteico y el reemplazo de glu.
	Péptido FM	Inhibe el depósito de grasa dietética y altera el metabolismo lipídico.
	Caseinfosfopéptidos	Transporte de minerales; Facilitan la absorción y biodisponibilidad del Ca, Fe, Zn.
	Casomorfinas	Agonistas opioides: Disminuyen la motilidad gástrica.
Incrementan la actividad inmune estimulando la capacidad fagocítica.		
Inmunopéptidos	Inmunoestimulante.	
α - caseína	Casoxinas	Antagonistas opioides.
	Caseinmacropéptido	Immunomodulador.
		Regula la motilidad gastrointestinal. Liberación de hormonas.
	Casoplatelinas	Antitrombótico.
Proteínas del suero		
α - lactalbúmina	α - lactalbúmina	Inmunomodulador.
		Anticancerígeno.
	Lactokinas	Inhibidor de la ACE.
β - lactoglobulinas		Agonista opioide.
		Transporte de retinol.
		Transporte de ácidos grasos.
		Inhibidor de la ACE.
Seroalbúmina	Serofina	Promotor de la inmunidad.
		Antagonista opioide.
		Prevención del cáncer.
	Lactoferrina	Transporte del Fe y otros iones.
		Inmunoestimulante.
		Supresión del apetito.
		Aumento de producción de colecistokinas.
		Antiinflamatorio
Crecimiento y diferenciación celular: anticancerígeno		
Lactoferricina		Antimicrobiano.
Inmunoglobulinas	Ig G, Ig A	Inmunidad pasiva.
Lactoperoxidasa		Antibacteriana.
Factores de crecimiento	GF 1, GF b	Crecimiento y diferenciación celular: anticancerígeno. Reparación de la mucosa intestinal.

Otros componentes: Vitaminas y minerales: la leche cuenta en su composición tanto con vitaminas liposolubles, destacando su alto contenido en vitaminas A y D como hidrosolubles, con una amplia representación de las vitaminas del grupo B y ácido fólico. Además cuenta con un heterogéneo contenido mineral destacando su concentración en iones calcio, potasio, fósforo, sodio, cloro, magnesio y zinc que suelen encontrarse en forma de sales (66).

1.3.2. Nuevas estrategias en el diseño de alimentos para reducir el peso corporal

El hecho de que la obesidad haya alcanzado proporciones epidémicas, junto con la dificultad que supone para un buen número de personas el seguimiento de los tratamientos convencionales para reducir el peso corporal, está propiciando la aparición de nuevas pautas en el comportamiento alimentario y el desarrollo de nuevos alimentos diseñados para el control de peso y la pérdida de grasa específica. Aunque este tipo de estrategias no pueden ser utilizadas como sustitutos de los tratamientos convencionales basados en la restricción calórica y el aumento de la actividad física que, por otro lado, suponen cambios en los hábitos de vida difíciles de establecer y mantener, si pueden servir de ayuda complementaria a la hora de facilitar la consecución de un balance energético negativo o la pérdida específica de grasa sin comprometer en ningún caso la salud de las personas. Así pues, la base para el desarrollo de nuevas estrategias para reducir la grasa corporal debe ser el conocimiento tanto a nivel fisiológico como a nivel molecular del sistema que regula el peso corporal y el modo en que determinados componentes de la dieta inciden sobre él. Una de las dificultades que supone el empleo de estas técnicas nuevas es que todavía quedan incógnitas sobre muchos de los aspectos concernientes a los componentes de los alimentos, sus efectos e interacciones por lo que todavía es necesaria una importante labor de investigación al respecto (43). Dentro de la gran variedad de estrategias que han surgido con este objetivo destacan:

a. Reducción del contenido calórico de la ingesta: Alimentos y dietas con menos densidad energética

Una de las estrategias más utilizadas para la reducción del peso corporal es el diseño de dietas con alimentos que proporcionen menos energía. Existen diversas posibilidades para reducir la composición calórica de la dieta que comprenden desde una menor ingesta de nutrientes como los glúcidos o las grasas, hasta la manipulación del contenido de macronutrientes. El objetivo es obtener nuevos alimentos en los que se han sustituidos aquellos nutrientes con mayor contenido calórico por otras moléculas con similares características organolépticas pero con menor aporte energético (44).

a.1. Reducción del contenido de hidratos de carbono de la dieta

Se conoce desde hace tiempo que las alteraciones en el patrón y grado de incremento de glucosa en sangre pueden causar anomalías metabólicas que favorecen el sobrepeso. La elevación excesiva de glucosa en sangre en fase post-prandial puede provocar un desequilibrio entre la insulina y las hormonas antagonistas y en consecuencia puede causar un aumento tardío de ácidos grasos libres que finalmente podría conducir a una falta en la sensación de saciedad a la que seguiría el consumo de alimentos (45). Observaciones de este tipo han provocado la aparición de un buen número de dietas con bajo contenido glucídico para combatir la obesidad. Sin embargo el contenido de hidratos de carbono recomendado en la dieta es el mismo ahora que en el que se ingería en el paleolítico (46). En el tracto gastrointestinal los carbohidratos (excepto la manosa y en parte la fructosa) antes de ser metabolizados se convierten en glucosa. Ésta fuente de energía, que es la única utilizada por el cerebro, cubre aproximadamente la mitad de las necesidades energéticas diarias en condiciones dietéticas normales (150-300 moles/día). Como el almacén de glucosa es limitado, la dieta es una fuente importante de este metabolito energético y por ello la variación en la ingesta de carbohidratos produce un fuerte impacto en el metabolismo animal por lo que un ingreso insuficiente podría tener consecuencias negativas para la salud (47).

Por otro lado, los desórdenes en la dieta que afectan a la ingesta de carbohidratos suelen cursar con obesidad (45). Entre el 60 y el 80% del exceso de la energía que acompaña a una dieta rica en glúcidos puede ser almacenada y se ha visto que las dietas que contienen un alto porcentaje de energía en forma de hidratos de carbono pueden provocar una elevación en los niveles de triacilglicérolos circulantes. Este hecho es debido en parte a que el exceso de carbohidratos de la dieta que no son utilizados ni almacenados en forma de glucógeno pueden convertirse en lípidos a través de la vía metabólica “lipogénesis de nuevo” aunque esta ruta sea costosa energéticamente y poco activa en humanos (48) junto a que el incremento producido en la oxidación de carbohidratos, debido a un mayor empleo de estos metabolitos como fuente de energía, conlleva una menor utilización de la grasa de la dieta (49).

a.2. Sustitución de los glucidos y las grasas de la dieta

En los últimos años se han desarrollado un buen número de nuevos alimentos cuya fracción glucídica y/o grasas ha sido sustituida por otras moléculas que se caracterizan por aportar menos calorías que sus homólogos convencionales pero que poseen similar sabor, textura y características organolépticas que éstos (50):

a.2.1. Sustitutos de los azúcares: Aunque originalmente esta estrategia se desarrollo para elaborar alimentos aptos para diabéticos, hoy en día la demanda de productos “sin azúcar” se ha incrementado considerablemente ya que también son consumidos por aquellas personas que buscan perder peso. Existen un buen número de sustitutos para los glúcidos de sabor dulce tanto de origen natural (xilitol, sorbitol, lactitol etc.) como edulcorantes de síntesis (acesulfamo potásico, aspartamo, ciclamato, sacarina etc.) que aportan este sabor a los alimentos pero su contenido calórico útil es mucho menor (51). El aspartamo es una molécula especialmente interesante porque yuxtapone a su capacidad edulcorante, un efecto reductor del apetito ya que favorece la concentración circulante de fenil-alanina (52).

Otra posible alternativa es la sustitución de la sacarosa de la dieta por fructosa. Este azúcar, que es de origen vegetal, tiene un bajo índice glicémico y su metabolismo difiere bastante al de la glucosa. El aumento de los niveles de fructosa en sangre no estimula la secreción de insulina y su catabolismo está catalizado por enzimas de fosforilación específicos (*fructo-kinasa* y *aldolasa-B*), que permite la entrada del metabolito en la vía glucolítica evitando dos de sus pasos limitantes por lo que las rutas metabólicas degradativas son dirigidas hacia vías diferentes de la síntesis de reservas de glucógeno (53). Sin embargo, este hecho, junto a la capacidad de activar enzimas que catalizan la síntesis de ácidos grasos y producir glicerol-3-fosfato, favorece la conversión de fructosa en lípidos. Puesto que estos procesos ocurren mayoritariamente en el hígado, el consumo excesivo de fructosa puede ir asociado a un aumento de las VLDL, al acúmulo de triacilglicérols hepáticos y a un aumento de la síntesis de moléculas derivadas del metabolismo lipídico como el diacilglicérol (54). Otra consecuencia negativa del consumo excesivo y desequilibrado de fructosa es la alteración de la relación glucosa/insulina en periodos pre y post-prandiales que puede provocar una ruptura de la relación leptina/ghrelina y por tanto la señalización de hambre/saciedad podría verse afectada causando un aumento de la ingesta (55).

a.2.2. Sustitutos de las grasas: Una de las sustancias más empleadas como sustituto de las grasas de la dieta es la olestra que es un poliéster derivado de la sacarosa cuya molécula contiene entre 6 y 8 ácidos grasos. Esta molécula ni se hidroliza por las lipasas digestivas ni se absorbe por tanto, no aporta calorías a la dieta aunque le confiere unas características organolépticas similares a las de las grasas. Sin embargo, su ingesta crea una película que impermeabiliza el intestino y altera la absorción de vitaminas liposolubles y otros nutrientes lipofílicos esenciales, lo que supone una desventaja para su uso (56).

Otra posible alternativa, es la sustitución de parte de la porción lipídica de la dieta por Salatrimas (short-and-long-chain-acyl-triglyceride molecules) que son derivados de los triacilgliceroles cuya estructura presenta una mezcla de ácidos grasos de cadena larga (principalmente esteárico) y de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico). Las saltarimas aportan menos energía que las grasas que habitualmente forman parte de los productos de repostería, panadería y pastas que es donde está permitida su aplicación (57).

a.3. Alimentos con elevado poder saciante

El control del comportamiento alimentario es extraordinariamente complejo. En él influyen un buen número de factores tanto fisiológicos como no fisiológicos que incluye las características hedónicas de los alimentos, los factores sociales y psicológicos etc. que condicionan en gran medida la extraordinaria variabilidad de respuestas interindividuales. Toda la información que se genera, incluida aquella que proporcionan las señales metabólicas que informan sobre el gasto energético y el estado de las reservas adiposas, es integrada por el sistema nervioso central que mediante un cambio en el nivel de los neurotransmisores oxigénicos y anorexigénicos produce respuestas que cursan con la sensación de hambre o de saciedad (52). Sin embargo raciones isoenergéticas de diferentes alimentos pueden diferir ampliamente en su índice de saciedad y la frecuencia y tamaño de los episodios de comida depende de varios los factores entre los que cabe destacar los siguientes:

a.3.1. Composición en macronutrientes: Muchos estudios coinciden en señalar que las proteínas son los macronutrientes con mayor capacidad saciante aunque no se han descrito diferencias remarcables entre los distintos tipos seguidas de los hidratos de carbono, las grasas y el alcohol. La propiedad de suprimir el apetito de las **proteínas** deriva en parte, de la capacidad que poseen estas moléculas para inducir la secreción de péptidos gastrointestinales saciantes como la CCK junto al hecho de que ciertos aminoácidos como la fenil-alanina o el triptófano y pequeños péptidos como el aspartamo pueden inhibir el apetito por si mismos ya que son precursores de los neurotransmisores que participan en el control de la ingesta a nivel del sistema nervioso central (44). Últimamente están apareciendo en el mercado una serie de alimentos que contienen químicos dietéticos o fotoquímicos que, mediante un mecanismo similar, son capaces de instaurar la sensación de saciedad aunque este tipo de ingredientes podrían clasificarse más bien como fármacos más que como alimentos (58). Las comidas ricas en hidratos de carbono también poseen un elevado índice de saciedad que podría justificarse, al menos en parte, a que tras su ingesta se produciría una inhibición de la producción de ghreina gástrica más persistente que la ocasionada tras el consumo de otros nutrientes como por ejemplo las grasas (59).

En general las comidas ricas en grasas son más atractivas pero tienen escasa capacidad de inhibir el apetito. En cualquier caso, su capacidad saciante depende de su digestibilidad y composición particular de ácidos grasos. Si el proceso de digestión no ha causado una excesiva degradación de la grasa y ésta llega al intestino delgado más o menos intacta, puede ser efectiva instaurando la sensación de saciedad debido a que la presencia en el íleon de nutrientes no absorbidos retrasa el vaciado gástrico (freno ileal). Se ha observado que los triacilglicérols ricos en ácidos grasos de cadena media (6 a 12 átomos de carbono) y/o en ácidos grasos poliinsaturados tienen mayor poder saciante que los compuestos por ácidos grasos de cadena larga y/o ácidos grasos saturados. El contenido en fibra de la dieta también puede contribuir a instaurar la sensación de saciedad puesto que favorece la distensión gástrica y reduce la absorción intestinal por consiguiente, retrasa el vaciado gástrico (44). Es muy habitual en los tratamientos para el control de peso administrar dietas con alto contenido en fibra, especialmente la compuesta por oligosacáridos no digeribles como la inulina y el fructano, ya que además de aportar pocas (o ninguna) calorías también puede provocar la liberación de hormonas gastrointestinales saciantes (60).

a.3.2. Peso, densidad energética y estado físico de los alimentos: Estudios a corto plazo en humanos señalan que la inhibición del apetito se regula más bien por la cantidad de comida ingerida (peso) que por el contenido calórico de los alimentos de modo que, para sentirnos saciados por un periodo determinado de tiempo, debemos ingerir una cantidad determinada de alimentos. Así la ingesta energética es tanto mayor cuanto mayor es la densidad energética de los alimentos que componen la dieta. El hecho de que la regulación de la ingesta se deba en parte al peso de los alimentos consumidos contribuiría a explicar el porqué del escaso poder saciante de determinados macronutrientes como las grasas que sin embargo aportan una elevada densidad energética. También hay evidencias científicas de que los alimentos sólidos poseen mayor índice de saciedad que los alimentos líquidos, en este sentido numerosos estudios señalan una asociación entre el consumo de bebidas endulzadas con azúcar y el desarrollo de sobrepeso y obesidad (61).

b. Aumento del gasto energético: Alimentos que potencian la termogénesis adaptativa

La termogénesis comprende un conjunto de mecanismos no del todo bien conocidos pero en el que intervienen proteínas desacoplantes que permiten la generación de calor a partir de la oxidación de los combustibles celulares, particularmente de ácidos grasos. La posibilidad de activar la termogénesis mediante el consumo de determinados nutrientes resulta muy atractiva para el diseño de nuevos alimentos funcionales de este modo, parte de la energía consumida podría ser disipada en forma de calor. Existe un componente térmico obligatorio para los distintos alimentos que depende de su composición, pero no todos los macronutrientes inducen la misma respuesta termogénica. El procesado de las proteínas es energéticamente “caro” y en general su efecto térmico representa entre el 20 y el 35% de la energía ingerida mientras que las grasas, que son nutrientes más fáciles de digerir, tienen un efecto térmico que oscila entre el cero y el 3% de la energía ingerida como tal grasa. El efecto térmico de otros nutrientes como los hidratos de carbono varía entre el 5 y el 15% y el alcohol entre el 10 y el 30% (41). Determinados componentes de la dieta como la vitamina A, los carotenoides, los PUFA... son nutrientes particularmente activos en la regulación de la expresión génica que estimula la expresión de proteínas desacoplantes en distintos tejidos responsables de

la generación de calor, por lo que el consumo habitual de estas sustancias podría estar asociado a la pérdida de peso gracias a la activación de la termogénesis adaptativa (62).

c. Nutrientes que disminuyan el depósito de las grasas

El mayor conocimiento que se tiene en la actualidad de la base molecular implicada en la regulación del peso corporal, así como de las vías metabólicas y señales bioquímicas está haciendo posible el diseño de nuevos alimentos funcionales capaces de modificar el complicado sistema que regula la síntesis, almacenamiento y distribución de los metabolitos energéticos. Existe un importante campo de investigación cuyo objetivo es analizar cómo distintos componentes alimentarios pueden interactuar con los procesos bioquímicos que regulan la adiposidad corporal y el almacén de reservas energéticas para, a través de ellos, poder alterar los mecanismos implicados en la deposición de nutrientes y reducir el depósito de metabolitos energéticos, más concretamente de grasa corporal. Es de especial interés la relación observada entre la ingesta de PUFA de cadena larga (20-22 carbonos, tanto n-6 como n-3) y los efectos producidos en el metabolismo lipídico puesto que se asocia el consumo de estas moléculas con cambios en el nivel de expresión y actividad de factores de transcripción (SREBP-1, PPAR- α) críticos para la expresión de genes codificadores de enzimas del metabolismo lipídico que conducirían a la represión de la lipogénesis en el hígado y el tejido adiposo y el estímulo de la oxidación de ácidos grasos tanto en el hígado como en el tejido adiposo y muscular (43). Por otro lado también se ha sugerido que estos nutrientes podrían causar un aumento de la expresión de proteínas desacoplantes en diferentes tejidos como el hígado, el músculo, el tejido adiposo blanco o el tejido adiposo pardo además de mejorar los niveles de triacilgliceroles y/o el colesterol circulantes que son factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares. Estudios en roedores y algunos estudios de intervención en humanos han demostrado que el consumo de una dieta rica en PUFA puede causar una reducción de la adiposidad, especialmente de la adiposidad visceral, aunque no se produzcan grandes cambios en el peso corporal (63).

Otros tipos de ácidos grasos como los CLA que son una colección de isómeros del ácido linoleico con dobles enlaces conjugados, también han demostrado poder reducir en roedores y en menor medida también en humanos, la grasa corporal y aumentar la masa magra aunque de forma modesta posiblemente por su capacidad de inhibir la LPL del tejido adiposo (64). Los triacilgliceroles cuya estructura cuenta con ácidos grasos de cadena media (6 a 12 carbonos) también pueden ser interesantes en el diseño de nuevas estrategias para el control del peso corporal ya que a diferencia de los ácidos grasos de cadena larga no son utilizados por los enterocitos para la re-síntesis de triacilgliceroles a empaquetar en los quilomicrones sino que pasan directamente al hígado vía porta. De este modo eluden el efecto de la LPL y su deposición en el tejido adiposo. Además estos ácidos grasos entran en las mitocondrias por un sistema independiente a la carnitina por lo que su oxidación es más directa y fácil (62). Otro procedimiento planteado, es sustituir los triacilgliceroles de la dieta cuya digestión rinde ácidos grasos y 2-monoacil-glicerol que es absorbido como tal y sirve para la re-síntesis de “nuevos” triacilglicéridos en los enterocitos por diacilgliceroles cuya digestión rinde junto a los ácidos grasos 1-monoacil-glicerol que no sirve para este fin (65).

1.4. Minerales

1.4.1. Metabolismo del Calcio

1.4.1.1. El Calcio

El calcio es el quinto elemento químico en orden de abundancia en el organismo, **constituye** el 2% del peso corporal y el 40% del contenido mineral total. El 99% se **localiza** en los huesos y dientes y tan solo el 1% se encuentra en la sangre, líquidos extracelulares y dentro de las células de tejidos blandos donde está implicado en múltiples procesos biológicos (31). Cabe destacar que la concentración de calcio extracelular (10^{-3}M), es mucho más alta que la intracelular (10^{-7}M) por lo que siempre existe un gradiente de concentración favorable a la entrada del mineral a la célula (17). Dentro de éstas el calcio se encuentra bien unido a macromoléculas con carga negativa como proteínas, fosfolípidos de membrana y grupos fosfato o compartimentalizado dentro de las mitocondrias, los microsomas y el retículo endoplasmático. El citoplasma presenta una concentración inferior al 1% y pese a que se mantiene constante gracias a diversos mecanismos como el secuestro del mineral por diversas áreas de almacenamiento celulares, se ha visto que es diferente según el tejido de donde proceda la célula (5).

La concentración sanguínea de calcio en humanos es por término medio de 2,35 m mol/L con variaciones normales entre 2,22 y 2,50 m mol/L. En el plasma el calcio puede encontrarse bien de forma ionizada (50%) que es la forma biológicamente activa, formando quelatos con distintos aniones como grupos fosfato, bicarbonato, citrato etc. (10%) que permiten que el calcio pueda difundir a través de las membranas capilares aunque no sea biológicamente activo o bien unido a proteínas (40%) principalmente a la albúmina y otras globulinas que no es ni difundible ni biológicamente activo. El pH y la concentración de albúmina influyen de modo importante en el equilibrio entre las distintas fracciones (31).

La mayor **reserva orgánica** de este mineral se localiza en los huesos y dientes. En estos tejidos el calcio se distribuye entre un fondo relativamente no intercambiable que es estable y no está disponible para la regulación de la homeostasis a corto plazo y un fondo de rápido intercambio que puede participar en las actividades metabólicas. El ritmo de fijación del calcio al esqueleto varía con la edad. Los neonatos poseen una baja concentración en su esqueleto que poco a poco va aumentando hasta la finalización del crecimiento. Durante los años posteriores el ritmo de fijación de calcio al hueso es similar al de resección hasta la edad madura, superada esta barrera, la masa ósea va disminuyendo de modo gradual en los hombres y de forma abrupta en las mujeres en torno a una década (hasta que finaliza la menopausia) entonces el ritmo de decrecimiento en ambos sexos es similar (1).

En los mamíferos el calcio realiza importantes **funciones**:

- Es el principal componente estructural del tejido óseo, proporcionando fuerza y rigidez a huesos y dientes (17).

- Inicia la coagulación sanguínea estimulando la liberación de tromboplastina y es un cofactor necesario en la conversión de protrombina a trombina (17).

- Estabiliza el medio interno ya que está implicado en el mantenimiento del equilibrio ácido-base (28).

- Es imprescindible para la transmisión del impulso nervioso ya que inicia el mecanismo sináptico en el axon neuronal, y está implicado en la liberación de neurotransmisores en las uniones sinápticas y el control de la irritabilidad nerviosa. Además constituye el factor de acoplamiento excitación-contracción en todos los músculos participando en la conservación del tono muscular y la regulación del latido cardíaco (17).

- Participa en la liberación y modulación de la actividad de diversas enzimas tanto intracelulares como extracelulares y está implicado en la secreción y mecanismo de acción de diversas hormonas citosólicas (29).

- Proporciona estabilidad a las membranas plasmáticas gracias a las uniones que establece con los fosfolípidos, regula el movimiento de los orgánulos intracelulares, interviene en los procesos de transporte ayudando a regular la permeabilidad celular para el sodio y otros iones, y es un importante mediador intracelular que participa en la transducción de señales actuando como segundo mensajero (23).

Para que el calcio pueda desempeñar sus funciones con normalidad, la **calcemia** debe mantenerse dentro de unos límites muy estrechos por lo que los niveles de calcio en sangre están estrechamente regulados mediante los siguientes mecanismos:

a. Calcio intercambiable: Las sales de calcio, (fosfato cálcico principalmente), fijadas de manera poco firme al hueso están en equilibrio reversible con los iones calcio del líquido extracelular. Estas sales presentan gran facilidad bien para fijarse al hueso bien para disolverse de nuevo en el líquido extracelular. Este tipo de reacciones son tan rápidas que basta con que la sangre con exceso de calcio pase sólo una vez por el hueso para que el mineral sobrante se deposite en él. La biodisponibilidad de la totalidad de las sales cálcicas del hueso oscila entre el 0,5 y el 1,0% pero además las mitocondrias de los tejidos corporales, especialmente las del hígado e intestino, también contienen calcio intercambiable que proporciona un sistema amortiguador adicional pero de menor importancia (17).

b. Regulación hormonal: Existen dos importantes sistemas hormonales que contribuyen a la regulación de la calcemia: La hormona paratiroidea (PTH)/vitamina D y la calcitonina. Ambos sistemas empiezan a actuar al mismo tiempo que el mecanismo intercambiable de calcio:

b.1. Sistema PTH / Vitamina D: una ligera disminución de la concentración del calcio iónico en los líquidos extracelulares produce el aumento del ritmo de secreción de PTH por la glándula paratiroidea. La PTH actúa junto con la vitamina D para lograr, siempre que sea preciso, un aumento de la calcemia en sangre implicando para ello la acción de distintos órganos. La activación de este sistema hormonal produce en los huesos la resorción de calcio y fosfato mediante dos efectos diferentes: el primero de acción muy rápida, que tiene lugar en minutos produciendo una remoción de las sales óseas desde la matriz ósea en la vecindad de osteocitos que se encuentran dentro del propio hueso y en la vecindad de los osteoblastos a lo largo de la superficie ósea; el segundo mecanismo necesita para su desarrollo varios días, produce una activación de los osteoclastos existentes y posteriormente un aumento en la formación de nuevas células osteoclásticas (17).

En los riñones la PTH aumenta la velocidad de hidroxilación del 25-OH-Calciferol (Vitamina D inactiva) a 1,25-(OH)₂-Calciferol (Vitamina D activa), aumenta la reabsorción tubular de calcio y disminuye la reabsorción de fosforo. En el intestino delgado se produce un aumento de la absorción de calcio debido al incremento en la formación renal de vitamina D activa (31).

b.2. Calcitonina: esta hormona de naturaleza proteica es secretada por el tiroides y ejerce el efecto contrario a la PTH. Actúa mediante dos tipos de acciones: de forma inmediata produce una disminución en la actividad de los osteoclastos y probablemente también un efecto osteolítico en la membrana osteocítica, desplazando el equilibrio a favor del depósito de calcio en el sistema de sales óseas de rápido intercambio; y un efecto más prolongado reduciendo la formación de nuevos osteoclastos. Durante periodos de exceso o déficit prolongado de calcio, sólo la PTH parece tener una importancia real en el mantenimiento de la calcemia (17).

La hipocalcemia y la hipercalcemia tienen diversas manifestaciones en los mamíferos. El **déficit** de calcio cursa con tetania, hiperexcitabilidad de las fibras nerviosas, convulsiones, anormalidades en la estructura ósea (osteoporosis, osteomalacia y raquitismo) y en animales de experimentación a los que se les sometió a concentraciones extraordinariamente bajas se pudo observar dilatación del corazón, cambios en la actividad de enzimas celulares y alteraciones en la coagulación sanguínea. La **hipercalcemia** produce una inhibición del sistema nervioso disminuyendo la actividad refleja junto con una disminución en el intervalo QT del electrocardiograma. También produce estreñimiento, pérdida de apetito, cálculos renales y una calcificación excesiva de los huesos y tejidos blandos (1, 31).

1.4.1.2. Absorción del Calcio

La absorción de calcio se lleva a cabo mediante tres pasos consecutivos: en primer lugar el calcio atraviesa la membrana apical de los enterocitos cruzando el borde en forma de cepillo que poseen las microvellosidades intestinales, después difunde por el citoplasma desde la membrana apical hasta la barrera basolateral que es el paso limitante del proceso y finalmente, atraviesa la membrana basolateral para salir de la célula a la lámina propia y alcanzar el torrente sanguíneo. En condiciones normales, cuando la dieta proporciona una ingesta del mineral adecuada, el principal mecanismo por el cual el calcio penetra dentro de la célula es la difusión pasiva. Pese a que la principal función de las membranas plasmáticas es separar dos compartimentos diferentes algunas pequeñas moléculas e iones como el Ca^{2+} y el Mg^{2+} pueden atravesar directamente estas barreras y penetrar en las células a favor de gradiente de concentración, sin producir gasto de energía (17). Este tipo de transporte puede darse a lo largo de todo el intestino delgado, ciego y colon ascendente pero debido a la escasa solubilidad de las sales del calcio y la fuerte influencia que ejerce el pH del entorno, la principal zona donde ocurre es en la parte alta del duodeno (70). Caber destacar que el epitelio celular del intestino tiene una permeabilidad selectiva y puede variar el paso para más o menos solutos según las circunstancias orgánicas. Este hecho es debido en gran parte a las *tight junctions*, que son un conjunto de diversos tipos de proteínas intermembrana como diversas inmunoglobulinas, la ocludina o la claudina, que se encuentran en la barrera apical de los enterocitos sobre todo del yeyuno e íleon, que permiten el paso selectivo de solutos además de desempeñar una función estructural (71).

El mecanismo de acción de estas moléculas aún no está del todo claro, mientras que para algunos autores estas proteínas son una especie de canales que permiten el paso del agua, otros investigadores piensan que su comportamiento es similar al de los canales iónicos cuya actividad puede ser modificada gracias a la fosforilación producida por proteínas *kinasas*. En cualquier caso, es la diferencia en el gradiente electroquímico de concentración la responsable del movimiento de solutos de modo que, todos los factores que modifiquen este gradiente como las citoquinas, diversas hormonas ó toxinas bacterianas, pueden modificar la entrada de iones por difusión simple. Quizá determinadas enfermedades como la hipertensión podrían estar causadas por mutaciones que afectan a estas proteínas y en consecuencia se produciría un cambio en la entrada de iones sobre todo de calcio y magnesio a las células (71).

El calcio también puede penetrar a los enterocitos por transporte activo en la parte alta del duodeno y en el colon ascendente a través de los canales iónicos TRPV-5 y 6. Ambos canales además de expresarse en el intestino delgado, también se localizan en otros tipos de células como las nefronas renales. Podría decirse que los TRPV5 se localizan mayoritariamente en el túbulo distal y los TRPV6 en la membrana en borde de cepillo del duodeno (72). La función básica de estas proteínas es regular la entrada de calcio al interior de la célula participando en los procesos de (re)absorción y ayudar en el mantenimiento del correcto balance del catión. La polarización de la membrana es imprescindible para el buen funcionamiento de los canales aunque de un modo diferente a la difusión pasiva. La diferencia en el gradiente electroquímico de concentración es la responsable de la discriminación que se produce para que la entrada de calcio se produzca por la parte apical y la salida por la basolateral (71). Aunque estos canales poseen una marcada selectividad hacia el Ca^{2+} , cuando la concentración en el medio de este mineral es escasa, permiten el paso de otros iones como el Mg^{2+} y en ausencia de cationes divalentes también contemplan la entrada de cationes monovalentes (72). Su estructura consiste en un tetrámero con seis dominios diferentes donde se localizan los lugares de regulación de la actividad del canal. Se ha visto que dicha actividad está sujeta tanto a la fosforilación mediada por la *Kinasa-A* y la *Fosfo-Kinasa-C* que a su vez son activadas por la PTH y a la acción de nucleótidos como el GMPc y el AMPc. Estos canales se inhiben por el propio Ca^{2+} mediante un mecanismo *feed-back*, los H^+ y el Mg^{2+} . Los canales TRPV-5 lo hacen en una fase y de un modo rápido mientras que los TRPV-6 se inhiben en dos fases más lentamente (71).

Aunque para la correcta regulación de la entrada y salida del mineral a las células es importante la concentración de Ca^{2+} intracelular, se ha comprobado que estos canales también se abren cuando la concentración intracelular del ión es elevada, incluso puede afirmarse que el gradiente de concentración no explica completamente el transporte del mineral. Esto hecho es debido a la existencia de unas proteínas localizadas en el citoplasma celular cuya misión es comportarse como un transportador facilitando la difusión del Ca^{2+} a través del citosol desde la parte apical del enterocito hasta la membrana basolateral, y que además podrían proteger a la célula durante aquellos procesos donde se produce una entrada de calcio elevada (71, 72).

Se han aislado dos proteínas codificadas por distintos genes con estas propiedades: la calbindina-D_{28K} localizada en el intestino delgado y la calbindina-D_{9K} localizada tanto en el intestino delgado, como en los riñones y otros órganos. Estas moléculas se comportarían como un almacén intermedio del mineral permitiendo el aumento del contenido de calcio intracelular sin modificar la concentración de Ca²⁺ libre. Se ha visto que la síntesis de estas proteínas es completamente dependiente de la vitamina D por tanto, esta vitamina tiene un papel fundamental en el transporte intracelular de calcio. En ausencia de vitamina D la concentración intracelular de calbindina-D_{9K} cae drásticamente y este proceso resulta completamente ineficiente (71, 72).

Otro modelo propuesto para explicar el mecanismo mediante el cual los enterocitos pueden soportar concentraciones de calcio intracelular tan elevados es el modelo vesicular. Se basa en la formación de vesículas tras la entrada del Ca²⁺ a la célula por los canales mediante un mecanismo similar a la endocitosis; estas vesículas secuestrarían al mineral protegiendo a la célula de niveles tóxicos del mismo y ayudadas por los microtúbulos citoplasmáticos migrarían hasta los lisosomas. Durante este proceso la calmodulina, otra proteína implicada en la absorción del calcio, podría inhibir el canal impidiendo más entrada del ión y ayudaría en el transporte de las vesículas hacia los lisosomas (71).

El último paso de la absorción consiste en la extrusión del Ca²⁺ por la membrana basolateral del enterocito. Este paso se realiza mediante la intervención de bombas *Ca-ATPasa* responsables de la salida de más del 80% del Ca²⁺ intracelular cuya actividad también está modulada por la vitamina D y el intercambiador Na/Ca que causa la salida del 20% restante del ion aunque este mecanismo mucho más frecuente en las nefronas. Pese a que este paso se produce contra gradiente de concentración no es el principal punto de control del proceso (17).

El proceso de absorción del calcio está ampliamente condicionado por la vitamina D de hecho, se ha observado que dietas con bajo contenido en calcio o situaciones fisiológicas como la lactancia en las que las necesidades del mineral son más elevadas aumenta de modo considerable la concentración plasmática de vitamina D. Esta vitamina puede inducir cambios tanto en la estructura como en la función del epitelio intestinal

aumentando en un periodo de tiempo corto (min/h) la absorción del calcio. Cuando interacciona con su receptor localizado en el núcleo celular (VDR) se pone en marcha la transcripción de las proteínas que van a formar los canales TRPV-5 y 6, la calbindina- D_{28K} , las bombas *Ca-ATPasa* y el intercambiador Na/Ca (72) incluso cabe la posibilidad de que aumente la síntesis de las proteínas que forman las *tight junctions*. La calbindina- D_{9K} es independiente de la acción de la vitamina D (71).

La absorción de calcio es errática y solamente se absorbe entre el 20 y el 50% de la cantidad total ingerida. Para que el calcio pueda ser absorbido debe encontrarse en forma iónica pero en general las sales cálcicas son poco solubles y precipitan con gran facilidad. Podría decirse que los compuestos formulados como citrato, lactato ó gluconato presentan más facilidad para disolverse por lo que su biodisponibilidad es mayor que otras sales como los carbonatos que precipitan más rápidamente (72). El pH es un factor a tener en cuenta en la absorción del calcio. Mientras que un entorno ácido mejora la disolución del mineral facilitando la absorción el medio alcalino provocan la precipitación del mismo. Otros factores fisiológicos como el peristaltismo intestinal y un tiempo largo de vaciado gástrico mediado por ejemplo por una dieta rica en grasas o una ingesta abundante también mejoran la biodisponibilidad del calcio (70).

El modo en el que afectan los distintos nutrientes que componen la dieta a la absorción del calcio es controvertido pero en general podría afirmarse que aquellos elementos capaces de desplazar el equilibrio de disociación hacia la forma iónica del mineral como los hidratos de carbono, especialmente la lactosa, ciertos aminoácidos y fosfopéptidos mejoran la absorción mientras que otras moléculas como el ácido fítico y el ácido oxálico presentes en los vegetales, capaces de formar hidróxidos u otros complejos con el calcio y la fibra, podrían actuar como resinas de intercambio iónico reduciendo la biodisponibilidad. Las interacciones más discutidas son las que produce el calcio con la fracción lipídica de la dieta. Mientras que para algunos autores (70, 72) el efecto de estas moléculas sobre la absorción de calcio es despreciable para otros (70, 72, 74) los ácidos grasos y las sales biliares presentes en la luz intestinal tienen la capacidad de acomplejar al calcio disminuyendo su absorción afirmando que, las dietas ricas en triacilglicérols sintéticos o en ácido palmítico son capaces de aumentador la eliminación fecal del mineral y por tanto reducen su absorción, incluso ciertos estudios (74) relacionan la esteatorrea que producen este tipo de dietas con la baja absorción de calcio.

Otros minerales como el fósforo, el magnesio o el zinc también pueden interactuar con el calcio, disminuyendo su absorción por lo que las relaciones Ca/P, Ca/Mg y en general Ca/cación divalente, en la dieta es un factor a considerar (72).

1.4.1.3. Excreción de Calcio

El principal órgano encargado de la excreción del calcio es el riñón aunque este mineral también puede ser eliminado por las heces. Hay que destacar que la concentración fecal de calcio está relacionada con la ingesta del mineral mientras que la concentración urinaria de calcio es un reflejo de la cantidad de calcio absorbido en el tracto digestivo que no tiene porqué ser necesariamente el reflejo del calcio ingerido (31). En condiciones normales los riñones filtran grandes cantidades de Ca^{2+} que posteriormente son recuperadas gracias a un eficiente mecanismo de reabsorción aunque en caso de necesidad puede hasta quintuplicarse la eliminación para mantener la calcemia. El proceso de reabsorción tiene lugar en distintos puntos de la nefrona y emplea varios mecanismos diferentes (17).

En el túbulo proximal se reabsorbe entre el 60 y el 70 % del Ca^{2+} ultrafiltrado por el glomérulo. Pese a ser la zona donde se produce la mayor reabsorción del ion, éste no es el principal punto de control del proceso. Aquí el 80% del Ca^{2+} es reabsorbido mediante mecanismos paracelulares pasivos; bien mediante el arrastre producido por el agua a través de poros junto con el sodio y el cloro (arrastre por solvente) bien por difusión pasiva a favor de gradiente electroquímico debido al elevado coeficiente de permeabilidad que posee la pared tubular para el calcio, que no producen gasto de energía. El 20% restante es reabsorbido mediante transporte activo mediante un mecanismo saturable que aún no está del todo estudiado pero que consume energía (17). Se ha visto que la entrada de Ca^{2+} a la célula en el segmento S1 está acoplada a la entrada de Na^+ pero sin embargo en el segmento S3 es independiente. También existen dudas sobre cómo se produce la extrusión del ion, ya que en esta zona no existe una marcada actividad de la Ca-ATPasa ni del cotransportador Na/Ca (71).

La reabsorción de Ca^{2+} no se produce en el segmento delgado del asa de Henle pero si ocurre en el segmento grueso ascendente donde aproximadamente se reabsorbe el 20% del ion mediante mecanismos no del todo establecidos (17). Se piensa que en la parte cortical, gracias a la diferencia de potencial electroquímico existente, la reabsorción del mineral se produce mediante movimientos paracelulares y en la zona medular la reabsorción se realiza mediante transporte activo. La calcitonina regula la reabsorción de calcio a este nivel (17).

En el túbulo contorneado distal sólo se produce el 10% de la reabsorción de Ca^{2+} , pero éste es el principal punto de control. En esta zona prácticamente es nulo el transporte pasivo de Ca^{2+} y la reabsorción se produce mediante transporte activo. En primer lugar el Ca^{2+} atraviesa la membrana luminal a través de canales voltaje dependiente y una vez dentro de la célula, éste difunde gracias a la calbindina-D9K. La vitamina D también resulta indispensable para su reabsorción. El último paso consiste en la extrusión del ion por la membrana basolateral para ello el Ca^{2+} utiliza la bomba *Ca-Atpasa*. La PTH regula el proceso de reabsorción a este nivel. Cuando la hormona se une a su receptor activa la proteína G que lleva acoplada y en consecuencia aumenta la concentración intracelular de AMPc que conduce a la apertura de los canales de la parte apical de la célula aumentando la concentración de Ca^{2+} (71).

En el túbulo colector también se puede producir la reabsorción de Ca^{2+} pero de en esta zona tan sólo se absorbe entre el 3 y el 10 % por lo que este proceso es bastante ineficiente (71).

1.4.2. El Calcio y el control del peso corporal

A finales de los años 80 se observó por casualidad revisando el estudio epidemiológico NHANES I realizado en por The US Department of Agricultura sobre los hábitos de consumo de la población estadounidense una relación inversa entre la ingesta de calcio y el peso corporal. Curiosamente en este trabajo se reflejaba que las personas de raza negra no hispánica se distinguían por presentar la mayor tasa de obesidad y un consumo de calcio inferior a 592 mg/día mientras que los sujetos caucásicos, que poseían la menor tasa de sobrepeso, consumían más de 765 mg/día (75). Esta hipótesis también fue constatada por McCarron y col (76) que evaluando los posibles efectos que producía el consumo de lácteos sobre la hipertensión apreciaron la misma correlación y posteriormente Zemel y col. (77) estudiando los datos del NHANES III observaron que el riesgo relativo de pertenecer al cuartil más alto de peso corporal estaba relacionado con la baja ingesta de calcio en la dieta tanto en el conjunto de la población femenina como masculina e infantil. Por otro lado Davies y col. (78) revisando los resultados de cinco estudios clínicos diseñados para evaluar los efectos del consumo de calcio sobre la mineralización del hueso en la población femenina, también observaron una interesante asociación inversa entre la ingesta de calcio y la reducción del peso corporal sugiriendo que la ingesta de 1000 mg de Ca/día podría explicar la pérdida de 0,325 Kg/año, lo que supondría hasta el 3% de las variaciones del peso corporal total.

La hipótesis de que el calcio procedente de la dieta pueda desempeñar un papel en la regulación del peso corporal ha suscitado gran interés y cierta controversia como se demuestra en varios trabajos realizados tanto en seres humanos (tablas 9 y 10) como en modelos animales de experimentación (tabla 11). Los estudios epidemiológicos observacionales realizados en seres humanos (tabla 9) y diseñados con el objetivo de examinar este supuesto, revisados en este trabajo, no muestran resultados concluyentes. Mientras que investigadores como Barba y col. (79) tras analizar el consumo de calcio en la población infantil italiana y Loss y col. (80) tras revisar los datos del *Heritage'S study*, han encontrado una clara asociación inversa entre la ingesta de calcio y el peso corporal reforzando esta hipótesis, otros trabajos realizados por investigadores como por Snijder y col. (81) con los datos del *Hoorn's study*, y Murakami y col. (82) tras analizar los hábitos alimentarios y los parámetros antropométricos de la población universitaria japonesa no

advirtieron ninguna diferencia en el IMC de los individuos mayores y menores consumidores de calcio.

Los estudios intervencionales revisados en seres humanos (tabla 10) tampoco son concluyentes. Jensen y col. (83) tras administrar a un grupo de mujeres obesas una dieta hipocalórica con distinto nivel de Ca (800 mg/día vs 1800 mg/día) no observaron una diferencia significativa en la pérdida de peso producida en ambos grupos sin embargo Zemel y col. (84), tras someter a un grupo de individuos afro-americanos a una dieta hipocalórica con distinta concentración de calcio (500 mg Ca/día vs 1000 mg Ca/día), observaron una pérdida de peso un 50% mayor en el grupo que había ingerido mayor cantidad de calcio proponiendo la existencia de un valor umbral mínimo en el consumo de este mineral por debajo del cual no se aprecia ningún efecto en la regulación del peso corporal (85). Otros investigadores como Lorenzen y col. (86) que no encontraron ninguna relación entre el consumo de calcio y el IMC tras someter durante un año a una población de niños de 12 años con una dieta que contenía 700 ó 1200 mg Ca/día afirman que, los efectos advertidos en la variación de la masa corporal podrían estar causados por un aumento del consumo de proteínas capaz de aumentar el nivel de hormonas anabólicas como la insulina que están implicadas en la regulación del apetito.

Varios estudios (84, 85) apuntan a que cuando el calcio de la dieta procede de la leche y los productos lácteos los efectos producidos sobre el peso y la grasa corporal son más notables. Moore y col. (87) revisando los datos del *Framingham Children's Study* encontraron una asociación en la población infantil que presentaba mayor consumo de leche y productos lácteos con un peso corporal más saludable y Marques-Vidal y col. (88) tras analizar los datos del *National Health Interview Survey* (Portugal, 1998 y 1999) determinaron que aquellos individuos que consumían más lácteos poseían un menor IMC. La leche y los productos lácteos cuentan en su composición con un amplio abanico de componentes bioactivos con capacidad de producir cambios bioquímicos en el organismo animal y tal vez, alguna de estas moléculas, pudiera intervenir en el control del peso corporal posiblemente actuando sinérgicamente con el calcio. A este respecto Zemel y col. (85) comparando los efectos que producía sobre el IMC de mujeres obesas varias dietas con distinta concentración (500 mg/día vs 1000 mg/día) y procedencia de calcio advirtió que, aquellas personas que habían consumido una dieta rica en lácteos sufrieron una mayor reducción en su peso corporal que las alimentadas con una dieta con alto

contenido en calcio procedente de otras fuentes. Al finalizar el tratamiento, las señoras fueron sometidas a Rx para examinar la variación de sus depósitos grasos corporales. Todos los individuos presentaron una clara disminución del tejido adiposo pero aquellas que habían sido alimentadas con una dieta rica en lácteos experimentaron una pérdida de grasa en la zona abdominal superior a las alimentadas con los otros alimentos sugiriendo que, la leche y los productos lácteos podrían influir en la distribución de los depósitos grasos. Similares conclusiones fueron observadas por Azadbakht y col. (89) tras realizar un estudio longitudinal sobre la población femenina iraní con una edad comprendida entre 40 y 60 años.

En cuanto a los estudios realizados con modelos animales de experimentación (tabla 11) reseñados en este trabajo, destacan las aportaciones realizadas por Stern y col. (90) que tras evaluar el efecto que producían los lácteos sobre ratas Wistar-Kyoto con hipertensión espontánea, encontraron una menor ganancia de peso corporal en el grupo de animales alimentados con un pienso con alto nivel de calcio (2,8%) comparado con el grupo cuyo pienso contenía un nivel estándar de calcio (0,4%). En otros estudios realizados con ratones transgénicos con sobre-expresión del gen agouti en los adipocitos como el realizado por Zemel y col. (77) cuyo objetivo, además de examinar el papel que podría realizar el calcio de la dieta sobre el peso corporal también fue intentar explicar los posibles mecanismos implicados en este proceso, observaron tras alimentar a dos grupos de ratones con un pienso hipocalórico pero con distinta concentración de calcio (4 mg/Kg pienso vs 12 mg /Kg pienso) que el grupo alto calcio presentó al finalizar el tratamiento una menor ganancia de peso corporal, una drástica reducción de los depósitos grasos, un aumento de la temperatura corporal y un aumento de la concentración de las proteínas UCP2 y UCP3. Además los adipocitos de estos animales presentaban una reducción de la expresión y de la actividad del enzima ácido graso síntasa, un aumento de la lipólisis basal, y una disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo que hace suponer que el Ca^{2+} intracelular podría ser un importante mediador de los efectos observados (91). Sin embargo Pilvi y col.(93) tras someter a tres grupos de ratones C57Bl/6J respectivamente, a un tratamiento con tres dietas bien con alto contenido en calcio (1,8%) y alto nivel de caseína (20%), con bajo contenido en calcio (0,4%) y alto nivel de caseína (20%) o alto contenido en calcio (1,8%) y alto nivel de proteínas lácticas excluida la caseína (20%) observaron que no se produjo ninguna diferencia en el peso corporal entre los animales de los grupos alimentados con distinto

nivel de calcio e igual nivel de caseína, pero sin embargo el grupo de roedores alimentado con elevado contenido en calcio y el resto de proteínas lácticas si presentó menor ganancia de peso sugiriendo que, realmente la pérdida de peso corporal observada en este tipo de roedores estaba causada por la fracción proteica de la leche obtenida tras aislar la casina y no por el calcio. A este respecto Shi y col. (91) alimentando a cuatro grupos de ratones con cuatro dietas que contenían distinta concentración y procedencia del calcio (Carbonato cálcico vs productos lácticos) observaron que, en todos los grupos de roedores se había producido una menor ganancia de peso y de masa grasa respecto al grupo control pero además aquellos animales cuyo pienso estaba compuesto por el calcio procedente de la leche la reducción de su masa corporal fue más notable sugiriendo que, la leche y los productos lácteos actúan sinérgicamente con el calcio aumentando los efectos advertidos en el peso corporal (77).

Tabla 9.: Estudios epidemiológicos realizados en seres humanos sobre el consumo de calcio y el peso corporal.

Diseño del estudio	Población y fuente de datos	Conclusiones	Ref. Bibliográfica
Cohorte prospectivo	n=852 ♂ y 1044 ♀ (50-75 años) Países Bajos. Hoorn's study.	No asociación entre el consumo de Ca y el peso corporal.	Snijder y col. (81) 2007
Transversal retrospectivo	n=1771 ♀ postmenopáusicas Italia.	Asociación inversa entre el consumo de productos lácteos y el peso corporal.	Varena y col. (93) 2007
Transversal	n= 926 ♀ (40-60 años) Irán.	Asociación inversa entre el consumo de productos lácteos y la grasa abdominal.	Azadbakht y col. (89) 2007
Transversal	n=17771 ♂ y 19742 ♀ (18 años) National Health Interview Survey. 1998-1999 Portugal.	A mayor consumo de productos lácteos menor IMC.	Marques-vidal y col. (88) 2006
Transversal	n=1896 ♀ (18-20 años) Estudiantes japonesas.	No asociación entre el consumo de Ca y productos lácteos y el peso corporal.	Murakami y col. (82) 2006
Longitudinal (7 años)	n=56 ♂ y 36 ♀ (3-6 años) USA. Framingham children's study.	A menor consumo de leche mayor IMC.	Moore y col. (87) 2006
Longitudinal (12 años)	n=19615 ♂ (40-75 años) USA. Health Professionals Follow-up study.	No asociación entre el consumo de Ca y productos lácteos y el peso corporal.	Rajpathak y col. (94) 2006
Longitudinal (9 años)	n=19352 ♀ (40-55 años) Swedish mammography cohort.	Asociación inversa entre el consumo de productos lácteos y el peso corporal.	Rosell y col. (95) 2006
Transversal	n=223 ♂ y 239 ♀ (16 años) Iran.	Asociación inversa entre el consumo de productos lácteos y el peso corporal.	Mirmiran y col. (96) 2005
Cohorte	n=900 ♂ y ♀ (5 -11 años) Población infantil italiana.	A mayor consumo de Ca menor IMC.	Barba y col. (79) 2005
Longitudinal (3 años)	n=12829 ♂ y ♀ (9-14 años) Población infantil USA.	No asociación entre el consumo de productos lácteos y el peso corporal.	Berkey y col. (97) 2005
Longitudinal (7 años)	n=240 ♂ y 219 ♀ (40-75 años) USA.	A mayor consumo de lácteos menor IMC.	Newby y col. (98) 2004
Transversal	n= 245 ♀ pre y post-menopáusicas.	La ingesta adecuada de Ca ayuda a mantener un peso corporal adecuado.	Choquette y col. (99) 2004
Transversal	n=582 ♂ y ♀.	A mayor consumo de Ca menor percentil de grasa corporal.	Martin y col. (100) 2004
Transversal	n=1701 ♂ y ♀ Niños en edad escolar.	Asociación entre obesidad y bajo consumo de productos lácteos.	Olivares S. y col (101) 2004
Transversal	n= 800 (♂ y ♀) HERITAGE'S study.	A mayor consumo de Ca menor IMC.	Loos y col. (80) 2003
Longitudinal (6 años)	n=112 ♂ y 136 ♀ (18-65 años) Quebeck family study.	Asociación inversa entre el consumo de lácteos y un peso corporal saludable.	Drapeau y col. (102) 2004
Observacional	n= 3000 ♂ y ♀ (18-30 años) USA. CARDIA'S study.	El incremento de productos lácteos reduce la grasa corporal.	Pereira y col. (103) 2002
Longitudinal (96 meses)	n= 29 ♂ y 24 ♀ (2 años) USA.	A mayor consumo de Ca menor incidencia en sobrepeso.	Carruth y col. (104) 2001
Transversal	n=780 ♀ USA.	Una ingesta superior a 1000mg Ca/día se asocia a un menor IMC.	Davies y col. (78) 2000
Transversal	n=7000 ♂ y ♀ USA. NHANES III.	Asociación inversa entre el consumo de Ca y el peso corporal.	Zemel y col. (77) 2000
Transversal	n=10000 ♂ y ♀ (18-74 años) USA. NHANES I.	Relación inversa entre el consumo de Ca y el peso corporal.	McCarrony col. (76) 1984

Tabla 10.: Estudios de intervención realizados en seres humanos sobre el consumo de calcio y el peso corporal.

Población	Dieta	Conclusiones	Ref. Bibliográfica
n=110 (♀) 12 años	Grupo Control: 700 mg Ca/día Grupo Calcio: 1200 mg Ca/día Dieta habitual; duración: 1 año	El suplemento de CaCO ₃ administrado en la dieta no modificó el peso corporal.	Lorenzen y col. (86) 2006
n=34 Adultos obesos	Grupo Control: 500-600 mg Ca/día Grupo Calcio: 1000-1100 mg Ca/día Dieta hipocalórica 500Kcal/día Duración: 12 semanas	Mayor pérdida de peso y de grasa abdominal en el grupo calcio que en el grupo control.	Zemel y col. (85) 2005
n=29 Afro-americanos obesos	Grupo Control: 500 mg Ca/día Grupo Calcio: 1000 mg Ca/día Dieta ligeramente hipocalórica Duración: 24 semanas	La pérdida de peso de los sujetos del grupo calcio fue el doble que la pérdida de peso experimentada en los sujetos del grupo control.	Zemel y col. (105) 2005
n=155 (♀) entre 18-30 años normopeso	Grupo Control: 800 mg Ca/día Grupo Medio Ca: 1000 mg Ca/día Grupo Alto Ca: 1300 mg Ca/día Dieta habitual; Duración: 12 meses	No se produjo una diferencia significativa en el peso corporal de los individuos de ambos grupos.	Gunther y col. (106) 2005
n=72 (♂ y ♀) obesos	Grupo Control: 800 mg Ca/día Grupo Medio lácteo: 1000 mg Ca/día Grupo Alto lácteo: 1400 mg Ca/día Dieta hipocalórica; duración: 48 semanas	No se produjo una diferencia significativa en el peso corporal los individuos de ambos grupos.	Thompson y col. y col. (107) 2005
n=44 Estudiantes	Grupo Control: 400-500 mg Ca/día Grupo Calcio: 1200-1400 mg Ca/día Dieta hipocalórica Duración: 12 meses	No se produjo una diferencia significativa en el peso corporal de los individuos de ambos grupos.	Harvey-Berino y col. y col. (108) 2005
n=32 Adultos obesos	Grupo Control: 400-500 mg Ca/día Grupo Calcio: 800 mg Ca/día Grupo Lácteo: 1200-1300 mg Ca/día Dieta hipocalórica; duración 24 semanas	Pérdida peso grupo control 6,4% Pérdida peso grupo Calcio 8,6% Pérdida peso grupo lácteo 10,9% y mayor pérdida de grasa abdominal.	Zemel y col. (109) 2004
n=59 (♀)	Grupo Calcio: 1500 mg Ca/día + 150 Kcal. Grupo Control: 900mg Ca/día Duración: 4 años	No se produjo una diferencia significativa en el peso corporal de los individuos de ambos grupos.	Lappe JM. y col. (110) 2004
n=35 (♂ y ♀) Adultos normopeso	Grupo Control: 650 mg Ca/día Grupo Calcio: 1200 mg Ca/día Dieta normocalórica; duración 24 horas	El grupo control presentó una menor tasa de oxidación de las grasas durante el sueño.	Melanson y col. y col. (111) 2003
n=57 (♀) obesas	Grupo Control: 800 mg/Ca día Grupo Calcio: 1800 mg Ca/día Dieta hipocalórica; duración: 3 meses	No se produjo una diferencia significativa en el peso corporal de los individuos de ambos grupos.	Jensen y col. (83) 2001

Tabla 11.: Estudios realizados en modelos animales de experimentación sobre el consumo de calcio y el peso corporal.

Especie animal	Tratamiento	Conclusiones	Ref. Bibliográfica
Ratón ♂ C57Bl/6J (n=12) Edad: 5 semanas	Grupo Control: 4 mg Ca/Kg pienso Grupo Calcio: 12mg Ca /kg pienso Dieta hiperlipídica; <i>ad. lib.</i> Duración tratamiento: 8 semanas.	Mayor pérdida de peso corporal en el grupo Calcio que en el control.	Parra y col. (112) 2008
Ratón ♂ C57Bl/6J (n=30) Edad: 9 semanas	Grupo I: 1,8% Ca+ 20 % Caseína Grupo II: 1,8% Ca+ 20% otras proteínas lácticas Grupo III: 0,4% Ca +20% caseína Duración del tratamiento: 21 semanas; <i>ad. lib.</i>	Grupo II menor peso y grasa corporal que grupo I y III. Grupo II y III no diferencia ni en peso ni en grasa corporal.	Pilvi y col.(92) 2007
Ratón ♂ Sobre-expresión proteína agouti (n=60)	Grupo Control: 4 mg Ca/Kg pienso Grupo Calcio: 12 mg Ca/Kg pienso Dieta hipocalórica; <i>ad. lib.</i> Duración del tratamiento: 6 semanas.	Grupo Calcio presentó ↓ peso corporal ↑ (UCP2)↑ (UCP3) ↑ T ^a corporal ↓ actividad y síntesis ácido graso sintasa.	Sun y col. (113) 2004
Ratón ♂ C57Bl/6J (n=12) Edad: 5 semanas	Durante tres meses dieta hiperlipídica hasta conseguir obesidad, después durante 1 mes: Grupo Control: Dieta hipocalórica + 4 % Ca <i>ad. lib.</i> Grupo Calcio: Dieta hipocalórica +12% Ca <i>ad. lib.</i>	Mayor pérdida de peso corporal en el grupo Calcio que en el control.	Serra y col. (114) 2004
Ratón ♂ Sobre-expresión proteína agouti (n=60)	Grupo I: 0,4% Grupo II: 1,2% procedente CaCO ₃ Grupo III: 1,2% procedente leche Grupo IV: 2,4% procedente leche Duración tratamiento: 6 semanas; <i>ad. lib.</i>	A mayor consumo de Ca menor peso corporal. Grupo III y IV mayor pérdida de peso que grupo II.	Shi y col. 2002 (91)
Ratón ♂ Sobre-expresión proteína agouti	Grupo Control: 4 mg Ca/Kg pienso Grupo Calcio: 12 mg Ca/Kg pienso Dieta ↑ grasa y ↑ sacarosa; <i>ad. lib.</i> Duración tratamiento: 6 semanas.	G. Calcio presentó ↓ PC ↓ (Ca++) intracelular en adipocito ↓ Actividad ácido graso sintasa ↑ lipólisis.	Zemel y col. (77) 2000
Rata ♂ Wistar Kyoto (n=17) Edad: 4 semanas	Grupo Control: 2% Ca Grupo Calcio: 4% Ca Dieta normocalórica; <i>ad. lib.</i> Duración tratamiento 11 semanas.	Mayor pérdida de peso corporal en el grupo Calcio que en el control.	Metz y col. (115) 1988
Ratas ♂ Wistar-Kyoto (n=30) Edad: 5 semanas	Grupo Control: 0,4% Ca Grupo Calcio: 2,8 % Ca Dieta normocalórica; <i>ad. lib.</i> Duración tratamiento: 4 semanas.	Mayor pérdida de peso corporal en el grupo Calcio que en el control.	Stern y col. (90) 1984

1.4.3. Metabolismo del Magnesio

1.4.3.1 El Magnesio

El Magnesio constituye el 0,05 % del peso corporal total de los mamíferos. El 65% se **localiza** en los huesos y aproximadamente el 27% en los músculos. En el resto de los tejidos se distribuye el 8% de magnesio restante y tan solo el 1% se localiza en la sangre (31). El magnesio es un mineral fundamentalmente intracelular de hecho, diversos tipos de células como los hepatocitos poseen mecanismos de transporte activo del ion hacia su interior contra gradiente de concentración (116). Dentro de las células la distribución de este mineral es heterogénea; es alta en las membranas, mitocondrias, microsomas y en el núcleo y es baja en el citosol y dentro de los orgánulos celulares. En cualquier caso, la mayor parte del magnesio está unido al ATP y la tasa Mg-ATP está en equilibrio con los niveles de Mg^{2+} (31).

El tejido óseo constituye la gran **reserva** de magnesio. Observaciones realizadas en animales de experimentación muestran que los tratamientos que producen un déficit prolongado de magnesio conllevan a una disminución del mineral en el hueso aunque en otros tejidos su concentración sufra pocas variaciones. En el tejido óseo el magnesio se localiza en los cristales de apatita pero repartido en dos compartimentos diferentes. Entre el 20-30% se encuentra en la superficie de los cristales en forma de hidróxido constituyendo la forma lábil del mineral. En esta forma química el magnesio es soluble, fácilmente intercambiable, posee una gran actividad metabólica y le afectan los cambios bruscos en la concentración. También se distingue un segundo compartimento en los huesos largos donde el magnesio se encuentra íntimamente ligado a los cristales de apatita en forma de fosfato, por lo que no es tan fácilmente intercambiable. Para producir la movilización de magnesio en esta forma cristalina deben activarse los mecanismos de reabsorción ósea (118).

La **concentración plasmática** de magnesio se mantiene constante entre 0,75 y 1,1 m mol/L. El 32 % del magnesio plasmático total está ligado a proteínas sobre todo a la albúmina aunque también puede unirse a otras globulinas. El 13 % se encuentra acomplejado a otras sustancias como iones citrato o fosfato y el 55 % restante se encuentra de forma libre que es la forma biológicamente activa. Al igual que ocurre con el

calcio, una disminución en la concentración de albúmina plasmática o variaciones en el pH producen cambios en el nivel de magnesio total pero el porcentaje de Mg^{2+} puede mantenerse invariable (31). Dada la similar conducta del calcio y el magnesio en la formación de complejos con las proteínas plasmáticas se piensa que ambos minerales pueden unirse a los mismos sitios, alrededor de los grupos carboxilo compitiendo entre ellos en la formación de complejos. En cualquier caso la concentración de magnesio plasmático es un mal reflejo de la concentración de magnesio corporal total y de la concentración de magnesio intracelular (118).

El magnesio está relacionado con una gran variedad de procesos bioquímicos y fisiológicos y desempeña un **papel** esencial en numerosas funciones celulares básicas:

- Tal vez sea el mineral más importante involucrado en la estabilización de estructuras. Se conocen muchas proteínas, especialmente dentro del grupo de las enzimas, que precisan de este catión para la estabilización de su estructura final. Los ribosomas utilizan el Mg^{2+} para mantener su estabilidad física y es imprescindible en la formación de las cadenas polipeptídicas donde estabiliza los complejos de RNA. En el núcleo celular el Mg^{2+} es necesario para el mantenimiento de la integridad de la doble hélice de DNA, facilita la formación de RNAm y es necesario para mantener la estructura de los cromosomas. En las células más de la mitad del magnesio se encuentra formando complejos con los ácidos nucleicos que son de mayor flexibilidad que los formados con el calcio y los mononucleótidos. En las membranas celulares el Mg^{2+} también forma complejos con los fosfolípidos reduciendo la fluidez de las mismas y ayudando en el mantenimiento de la polarización que ordena la permeabilidad celular. Un descenso de magnesio induce cambios en los niveles iónicos celulares y como consecuencia, se incrementa el nivel citosólico de sodio y se modifica la distribución de calcio, mediante la salida del ion de las mitocondrias y el aumento de la permeabilidad en la membrana citoplasmática (120).

- Posee un importante papel metabólico en el almacenamiento y transformación de la energía. En primer lugar este mineral interviene en la respiración celular a nivel de la fosforilación oxidativa manteniendo fuertemente acopladas las funciones de la mitocondria en la síntesis de ATP. Además es necesario para la síntesis de compuestos con enlaces ricos en energía como el enlace anhídrido fosfórico presente en el ATP, el

fosfamida de la fosfocreatina, el 1,3-difosfoglicérico, el fosfoenol del fosfoenolpiruvato, o el enlace entre un ácido y un grupo tiol como el acetil-CoA ó succinil-CoA. También se precisa magnesio para la síntesis de nucleótidos difosforilados (NAD) y trifosforilados (NADP) y en la formación de flavin nucleótidos (FMN y FAD). El magnesio interviene en todas aquellas reacciones químicas (tanto de transferencia como de hidrólisis) en las que estén involucrados estos compuestos. Como la mayor parte del magnesio en las células está unido al ATP y la tasa Mg-ATP está en equilibrio con los niveles de Mg^{2+} existen razones para pensar que el magnesio pudiera ser un regulador esencial en el ciclo celular ejerciendo un papel clave en aquellas rutas metabólicas donde el paso limitante sea una reacción de fosforilación. En cualquier caso, como el magnesio es un importante cofactor de diversos metaloenzimas y participa en aquellas reacciones en las que interviene el ATP estabilizando las cargas negativas de los trifosfatos, está implicado en el metabolismo glucídico, lipídico y proteico e interviene en la síntesis y duplicación de ácidos nucleicos. Pese a que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} son cationes divalentes que muchas veces interaccionan entre si, su papel regulador debe ser distinto puesto que la concentración y distribución intracelular de ambos minerales es claramente diferente (31).

- Actúa como segundo mensajero de múltiples procesos celulares. Es un elemento necesario para el crecimiento y mineralización del hueso así como para la formación del colágeno y mucopolisacáridos. Refuerza los mecanismos inmunitarios mediados por fagocitosis y estimula el complemento (1). Actúa sobre la excitabilidad de las neuronas y la trasmisión del impulso nervioso produciendo un efecto sedante en todo el sistema nervioso. Participa en la relajación muscular y actúa en el control del ritmo cardíaco disminuyendo la conductividad y la irritabilidad en el miocardio (Ca-agonista) (17). El magnesio es el bloqueador natural de los canales de calcio en las células musculares. Además es un vasodilatador que actúa inhibiendo la contracción de la musculatura lisa vascular y modificando el sistema renina-angiotensina (30). A nivel renal parece necesario para la conservación del fósforo, potasio y aminoácidos como la taurina e interviene en la respuesta renal a la ADH (17). Existe una relación inversa entre el magnesio sérico y la presión arterial. El magnesio tiene propiedades antiaterogénicas ya que previene la formación de depósitos cálcicos y es un anticoagulante sanguíneo (30).

La **magneemia** caracterizada por su gran constancia está sometida a mecanismos de control muy sensibles pero no totalmente conocidos. La homeostasis del magnesio depende básicamente del balance entre la absorción intestinal y la excreción renal y solamente en aquellos casos de intensa deficiencia se movilizan los depósitos óseos (31). Se ha intentado establecer una relación entre el magnesio sanguíneo y la PTH pero se ha comprobado que si bien la concentración sérica de magnesio influye en la secreción de PTH mediante un comportamiento bifásico ya que tanto un aumento brusco como una caída de los niveles de magnesio plasmático producen la secreción de PTH, la respuesta hormonal no es capaz de regular la magneemia. No obstante la PTH es capaz de producir un incremento en la absorción de magnesio (119).

La **hipomagneemia** produce fatiga, contracciones musculares acompañadas de dolor, tetania similar a la causada por la hipocalcemia, hipertensión aumento de la coagulación sanguínea, arritmias cardíacas, anorexia y falta de crecimiento. La **hipermagneemia** cursa con torpeza mental, debilidad muscular y problemas respiratorios (1).

1.4.3.2. Absorción de Magnesio

La **absorción** de magnesio aunque puede darse a lo largo de todo el intestino delgado se produce mayoritariamente en el íleon y en el yeyuno proximal debido a que el pH de esta zona del intestino es el más apropiado. No obstante, al intestino también le llega cierta cantidad de magnesio endógeno cuya absorción se produce sobre todo en el colon y recto (121). Los mecanismos implicados en la absorción del magnesio no son del todo conocidos aunque se han evidenciado dos procesos: un mecanismo de difusión pasiva, no saturable, a favor de gradiente de concentración y otro de transporte activo, saturable, a través de canales específicos para el magnesio (TRPM6) que constituye el principal punto de regulación (72). Dada la similitud química existente entre el calcio y el magnesio se ha contemplado la posibilidad de que la vitamina D también pudiera regular la absorción de magnesio y aunque los estudios publicados no son concluyentes parece que tan solo grandes cambios en la concentración de esta vitamina causarían alteraciones en la absorción de magnesio (72).

La biodisponibilidad del magnesio también puede verse influenciada por otros componentes de la dieta como los grupos fosfato, el ácido oxálico y fítico que pueden formar complejos con este catión, la fibra que puede comportarse como una resina de intercambio iónico y los ácidos grasos libres que pueden unirse al magnesio produciendo reacciones de saponificación disminuyendo la absorción. Por otro lado este ion puede formar quelatos con determinados aminoácidos que mejoran la solubilidad aumentando la biodisponibilidad. El magnesio en el tubo digestivo también puede interactuar con otros minerales. El efecto que produce el calcio sobre la absorción de magnesio es discutible, ambos minerales parecen utilizar distintos transportadores durante su absorción pero estudios realizados en ratas muestran que el aumento de calcio produce una reducción en la absorción de magnesio, posiblemente producido por modificaciones en la permeabilidad de las uniones intercelular que modificarían el movimiento paracelular de magnesio. Otros minerales como el zinc también pueden causar una reducción en la absorción de magnesio (1).

1.4.3.3. Excreción de Magnesio

Los riñones además de ser la principal vía de **eliminación** de magnesio son el principal órgano implicado en la homeostasis del mineral siendo muy eficientes en la conservación del catión cuando su ingesta es baja. Para explicar la reabsorción de magnesio se han descrito procesos paracelulares y transcelulares proponiendo la existencia de un mecanismo de transporte activo que actuaría en condiciones extremas y afectarían a la eliminación de magnesio sin modificar la absorción de otros minerales (31).

La mayor parte del magnesio se reabsorbe en el asa de Henle (50-60%) mediante difusión pasiva a favor de gradiente de concentración sin producir gasto energético. Este proceso es parcialmente específico; es muy permeable para el magnesio, un poco menos para el calcio y casi impermeable para el agua. En esta zona pueden producirse interacciones entre el calcio y el magnesio lo que explicaría porqué en condiciones fisiológicas la absorción renal del magnesio es inversamente proporcional a la de calcio. Ambos minerales pueden alterar su reabsorción mediante dos procesos diferentes, uno menos específico controlado por receptores localizados en la zona peritubular de las células del asa de Henle que detectarían el aumento de las concentraciones de magnesio ó de calcio y como consecuencia se modificaría la permeabilidad produciendo la inhibición de la reabsorción y aumentando la excreción de estos iones y otro mediado por

receptores de la superficie de las células de esta zona para diversas hormonas como la PTH, calcitonina o aldosterona que aumentarían el flujo paracelular (17).

El túbulo contorneado distal reabsorbe una cantidad de magnesio menor (5-10%) pero no por eso es menos importante. En este punto la reabsorción del catión es contra gradiente de concentración y utiliza mecanismos de transporte activo mediado por canales específicos para el magnesio e independientes a la reabsorción de calcio produciendo gasto de energía. Este es el principal punto de control para la reabsorción del magnesio que puede ser modificado hormonalmente o mediante otros factores que influyen en el manejo tubular renal como el equilibrio ácido base, la concentración de otros minerales como el sodio o potasio y la vitamina B6 cuyo déficit está relacionado con un aumento de la excreción de magnesio (17).

1.4.4. Metabolismo del Zinc

1.4.4.1 El Zinc

El zinc es el oligoelemento intracelular más abundante. Prácticamente se localiza en el citoplasma de todas las células animales aunque de forma heterogénea y su concentración varía según el tipo de tejido. El músculo esquelético y los huesos contienen el 80% de la cantidad orgánica total de zinc y son los órganos más ricos en este mineral junto con la próstata, el hígado, los riñones y la retina. El 0,5% se localiza en sangre principalmente en los hematíes formando parte de la *anhidrasa-carbónica* y la *superóxido-dismutasa* mientras que el suero tan solo presenta una concentración inferior al 0,01% que experimenta oscilaciones circadianas y está sometida a depresiones postprandiales transitorias como las causadas por el estrés (31). Los dos tercios del zinc plasmático total son transportados por la albúmina el resto, viaja unido a otras proteínas como la α 2-macroglobulina, la transferrina y la metalotioneína y solamente una pequeña fracción circula de forma iónica (0,2 m mol/l). No existe un **reservorio** de zinc en el organismo pero en caso de necesidad puede ser reutilizado el ubicado en los músculos y el tejido óseo. Tanto los pulmones, como el encéfalo, los músculos y el corazón poseen unas concentraciones de zinc relativamente estables y no responden a las variaciones del contenido del mineral en la dieta sin embargo, otros tejidos como el hueso, los testículos, el pelo y la sangre si tienden a reflejar la ingesta dietética (17). La **homeostasis** del zinc se realiza mediante cambios en el índice de absorción y eliminación intestinales (31).

Aunque aún no se han resuelto muchos de sus aspectos la ubicua distribución de este mineral indica que está implicado en multitud de procesos metabólicos. Podría decirse que el zinc realiza **acciones** catalíticas, reguladoras y estructurales:

- **Función catalítica:** Participa en múltiples vías metabólicas relacionadas con la síntesis y degradación de múltiples metabolitos mayores como la glucólisis, la síntesis de glucógeno y ácidos nucleicos, la lipogénesis, la hidrólisis de proteínas y grupos fosfato... Se han descrito más de 300 metaloenzimas, la mayoría localizadas en el hígado, cuyo cofactor es el zinc. También está implicado en la conversión de retinol a retinal en la retina y participa a nivel hepático en el metabolismo de la vitamina A por lo que interviene en el mantenimiento de la función ocular normal, especialmente en la visión nocturna (122).

- **Función reguladora:** El zinc participa en la regulación de distintos procesos relacionados con el crecimiento y la división celular y la activación o inhibición de factores de transcripción responsables de la expresión génica. También participa tanto en la activación como en la proliferación y apoptosis de las células linfoides y es un importante agente inmunomodulador puesto que regula la acción de distintos mediadores como las citoquinas. Este mineral es imprescindible en el desarrollo y crecimiento de los mamíferos ya que es un activador de varios metaloenzimas localizados en la zona de demarcación de la estructura cristalina de la matriz ósea y modula la actividad de otros enzimas implicados en la función reproductora y maduración sexual. El zinc además está involucrado en la regulación de la liberación de hormonas tan importantes como la insulina y la prolactina. Puede activar algunos sistemas de transporte transcelulares y es un neuromodulador de la sinapsis neuronal. Se ha observado que juega cierto papel en la neurología del gusto y del apetito ya que su déficit ocasiona disgeüsia y disismia (122).

- **Función estructural:** El zinc forma parte de la estructura terciaria de diversas proteínas (metaloproteínas) proporcionándoles estabilidad como es el caso de la insulina y ciertas proteínas de la cromatina relacionadas con la transcripción y transducción de varias apoenzimas. También ayuda a estabilizar la estructura de los ácidos nucleicos y las membranas celulares y en el mantenimiento de la integridad de los orgánulos celulares. Es un constituyente de la estructura de determinados receptores de membrana y factores de transcripción denominada dedos de zinc constituidas por un complejo tetraédrico que forma el catión con cuatro residuos de cisteína (122).

El **déficit** de zinc cursa con diversas manifestaciones clínicas las más importantes son anorexia, hipogüsia, ceguera nocturna, disminución del crecimiento, alteraciones en la madurez sexual (hipogonadismo) y en la capacidad reproductiva, alteraciones esqueléticas, disminución de la masa magra corporal, retraso en la cicatrización de heridas junto con lesiones eccematosas en la piel, alopecia, infecciones recurrentes producidas por la depresión del sistema inmune, diarrea, y cambios en la conducta. El principal **efecto tóxico** del zinc parece derivar de su interferencia con el metabolismo del cobre ya que son minerales antagónicos causando anemia por déficit de este otro mineral. La toxicidad causada por el zinc también causa erosiones gástricas, depresión del sistema inmune y aumento del colesterol plasmático. Se reportan efectos tóxicos como náuseas, vómitos, diarreas, fiebre, letargia, y alteraciones del sistema nervioso central (1).

1.4.4.2. Absorción de Zinc

La absorción de zinc se lleva a cabo en todo el intestino delgado pero es especialmente importante en el duodeno distal y en el yeyuno proximal. El Zn^{2+} penetra en los enterocitos mediante difusión pasiva a favor de gradiente de concentración y transporte activo. Este último mecanismo está mediado por transportadores que son saturables y produce gasto de energía y funciona más eficientemente cuando las concentraciones orgánicas de zinc son bajas. Una vez en el interior de la célula el ion se une a las metaloproteínas u otras proteínas del citoplasma celular que lo transportan hasta el extremo basolateral del enterocito donde mediante un mecanismo de transporte activo se produce su paso a la sangre portal (72).

La absorción de zinc depende de varios factores como el pH, el tiempo de vaciado gástrico, la concentración corporal del mineral y la composición y concentración de zinc de la dieta. Valores elevados del pH aumentan su capacidad para unirse a ligandos orgánicos de bajo peso molecular mejorando su biodisponibilidad. Las dietas ricas en proteínas, sobre todo aquellas que proporcionen aminoácidos sulfurados, la glucosa, la lactosa y determinados ácidos orgánicos como el ácido cítrico también aumentan la absorción de zinc gracias a la formación de complejos solubles. Sin embargo otras sustancias como la fibra, el ácido fítico y oxálico son capaces de secuestrar al mineral disminuyendo su biodisponibilidad (123).

A su vez el zinc puede interactuar con otros iones como el Fe^{2+} y el Cu^{2+} . Estos tres iones compiten durante el proceso de absorción por el mismo tipo de transportador por lo que el exceso de zinc en la dieta puede ocasionar un déficit en la absorción de estos cationes. El Ca^{2+} y el Zn^{2+} utilizan distintos transportadores para ser absorbidos y no suelen interactuar entre sí a este nivel pero sin embargo sí pueden formar complejos Ca-Zn-fitato en el intestino que dificultan la absorción de ambos minerales (31).

Tras el proceso de absorción el zinc viaja vía porta hasta el hígado unido a la albúmina por lo que la cantidad de zinc que pasa a sangre depende tanto de la concentración intracelular del mineral en el enterocito como de la cantidad de albúmina disponible (123). Posteriormente desde el hígado es distribuido al resto del organismo no obstante, la concentración hepática de zinc también puede ser modificada mediante la acción de diversas hormonas como la insulina el glucagón y los glucocorticoides (17).

1.4.4.3. Excreción de Zinc

Cuando en el organismo se genera un exceso de zinc es eliminado mediante diversos mecanismos. Por un lado el zinc circulante que no es captado por las células del organismo puede volver al intestino como un componente de las metalotioneínas o junto con las secreciones pancreáticas y biliares para ser excretado con las heces. Existen al menos catorce transportadores diferentes de Zn^{2+} en el epitelio intestinal que regulan la entrada y salida de este elemento de las células que se agrupan en dos familias: las ZnT y las Zip. Estas proteínas parecen tener funciones opuestas; los transportadores ZnT reducen la concentración de zinc intracelular favoreciendo su salida de la célula o almacenándolo en vesículas intracelulares mientras que las proteínas Zip aumentan la concentración intracelular promoviendo la entrada del zinc extracelular o su liberación desde las vesículas almacén (72). El zinc también puede ser eliminado vía urinaria aunque este tipo de mecanismo juega un papel menos importante y tan solo se elimina por esta vía el 2% del zinc corporal total (17).

1.4.5. El Zn en la regulación del peso corporal

En varios trabajos científicos (124-127) publicados recientemente se plantea la posibilidad de que el sobrepeso podría estar asociado con la reducción de los niveles orgánicos de zinc atribuyendo a este mineral un posible papel en los mecanismos que regulan la sensación de hambre y saciedad de tal modo que, el descenso en los niveles circulantes de zinc podría originar un déficit en la liberación y sensibilidad de los tejidos a la insulina y en consecuencia provocarían una caída de los niveles de leptina circulante. Los mamíferos poseen receptores para la leptina tanto en la barrera hematoencefálica como en el hipotálamo lo que le permitiría actuar interaccionar con los centros reguladores del apetito (124). Por otro lado, la relación entre la insulina y el zinc se conoce desde hace varias décadas destacando que este mineral resulta esencial tanto para la síntesis como para el almacenamiento y la liberación de dicha hormona (28).

Gómez y col. (124) comparando las concentraciones séricas de zinc de un conjunto de hombres obesos (IMC >27) y un grupo de hombres delgados (IMC < 23) con una edad comprendida entre 21 y 30 años observaron que la concentración sérica de este mineral en los sujetos delgados era un 44% superior ($p < 0,05$) que en los sujetos obesos. En un intento de esclarecer esta hipótesis posteriormente separaron al azar a los individuos obesos en dos grupos iguales y a un grupo le fue administrada una cápsula diaria con 100 mg de sulfato de zinc mientras que al otro grupo se le administró una cápsula idéntica pero con 100 mg de un placebo durante 30 días. Al inicio y al final del tratamiento a cada sujeto, previo ayuno de 12 horas, se le realizó una pinza euglicémica-hiperinsulinémica y se determinó la concentración sérica de zinc, leptina, glucosa e insulina. Cuando concluyó el estudio observaron que el grupo que había recibido el suplemento de zinc presentaba un incremento en las concentraciones plasmáticas tanto de zinc como de leptina aunque ni la glucemia ni la sensibilidad a la insulina se vieron modificadas.

Siguiendo esta misma línea de investigación, Christos y col. (125) trataron a una población de hombres de 30 años de edad con una dieta deficiente en zinc ($12,5 \pm 0,08$ mg/día) durante 20 semanas y posteriormente con una dieta rica en Zn ($60 \pm 0,07$ mg/día) durante 12 semanas. Antes del tratamiento y tras el consumo de la dieta con depleción y suplemento de zinc fue medido el peso corporal, la masa grasa y las

concentraciones plasmáticas de zinc, insulina y leptina. Al finalizar cada periodo no se advirtieron modificaciones ni en el peso corporal, ni en la masa grasa, ni en la concentración plasmática de insulina de los individuos pero sin embargo tras el periodo de restricción de zinc si se produjo una reducción significativa en los niveles circulantes tanto del zinc plasmático como de leptina.

Investigaciones llevadas a cabo con roedores también muestran interesantes resultados. Lee y col. (126) sometieron a un grupo de ratas macho Sprague-Dawley a tres dietas con distinto contenido en zinc. Durante la primera semana, los roedores fueron alimentados con un pienso que contenía un nivel adecuado de Zn (30 mg/Kg pienso), las dos semanas siguientes las ratas ingirieron un pienso con depleción de este mineral (1 mg/Kg de pienso) y las dos últimas semanas el pienso contenía exceso de zinc (50mg/Kg de pienso). Al finalizar el tratamiento se observó que durante el periodo en que los animales habían sufrido la restricción de zinc se había producido una disminución del 10% en la ingesta de pienso. Al término de cada periodo fueron sacrificados un tercio de los animales y tras analizar el contenido de zinc en los distintos tipos de tejidos se advirtió que durante el periodo en el que los roedores consumieron el pienso con déficit de zinc se produjo una reducción de este mineral tanto en los niveles plasmáticos como hepáticos y un aumento en la expresión del gen *ob* (*ob RNAm*) que codifica la leptina en el tejido adiposo blanco inguinal y abdominal ($p < 0,05$). Curiosamente, este aumento en el tejido adiposo inguinal coincidió con la caída plasmática de la concentración de zinc mientras que en el abdominal se produjo en paralelo a la disminución del apetito.

Estos datos sugieren que el zinc podría desempeñar cierto papel en la regulación del apetito mediado quizá por el aumento de los niveles de leptina circulantes. La alteración en la expresión y liberación de leptina en el tejido adiposo blanco podría modificar el metabolismo de los neurotransmisores hipotalámicos aumentando la concentración de NP-Y que es un importante agente anorexiantes que a su vez ocasionaría una disminución en la ingesta y el peso corporal (124, 126).

A este respecto, Ott y col. (127) observaron que este mismo tipo de ratas alimentadas ad libitum con un pienso que contenía un nivel estándar de Zn durante 21 días presentaban mayor peso corporal que el mismo tipo de roedores alimentados con un pienso deficiente en ($p < 0,05$). Tras analizar los niveles de este mineral en el fémur no advirtieron una diferencia significativa entre ambos grupos pero sin embargo tanto los niveles de *ob RNAm* en el tejido adiposo inguinal como la concentración de leptina plasmática fueron superiores en el grupo zinc deficiente ($p < 0,05$).

Sin embargo Bribiescas y col. (128) tras administrar a un grupo de hombres adultos un suplemento de 50 mg Zn/día o un placebo durante 10 días no encontró ninguna asociación significativa entre el consumo de zinc y los niveles plasmáticos de leptina afirmando que el aumento observado por otros investigadores en los niveles circulantes de leptina podría estar causado por una disminución de los triacilglicéridos de los depósitos grasos. Aresenault y col. (129) tampoco encontraron diferencias en la ingesta, la composición corporal o los niveles séricos de leptina tras administrar un suplemento de 3 mg Zn/día a un grupo de niños peruanos con una edad comprendida entre 6 y 8 meses durante 6 meses y compararlo con otro grupo al que no se le administró ningún suplemento y para finalizar, Weisstaub y col. (130) que administraron a niños con una edad comprendida entre 18 y 36 meses un suplemento de 6 mg Zn/día tampoco advirtieron una correlación entre las concentraciones plasmáticas de zinc, el peso corporal, la circunferencia de la cintura o las concentraciones plasmáticas de leptina.

2. Objetivo

Tanto en humanos (81-111) como en modelos animales de experimentación (77, 90-92, 112-115) se ha observado una fuerte asociación inversa entre el peso corporal y la ingesta de calcio. Estos y otros datos epidemiológicos han puesto en evidencia el importante papel que tiene el calcio de la dieta en la regulación de la cantidad de tejido adiposo (85, 89) sobre todo si el calcio procede de la leche (85). En la literatura se han descrito alguno de los mecanismos de acción del calcio sobre la regulación del peso corporal (147, 154, 155) así como de la interacción existente entre el calcio y otros nutrientes (macronutrientes o minerales) a nivel de absorción intestinal (147, 148). Por otro lado, los lácteos además de ser una fuente importante de calcio aportan otros nutrientes y minerales que podrían tener efectos positivos en la regulación del peso corporal (66, 67, 69).

Hasta el momento no se ha visto el efecto de una dieta enriquecida en calcio procedente de la leche e hiperlipídica (propia de los países desarrollados) sobre el perfil energético y mineral en hígado o sobre la absorción de macronutrientes y minerales y su posible implicación en la reserva mineral ósea. Por todo esto, el objetivo general del presente trabajo es profundizar en el mecanismo de acción del calcio sobre la regulación del peso corporal y, en particular estudiar los efectos derivados del calcio procedente de la leche sobre la absorción de metabolitos energéticos y minerales en ratones macho de la cepa C57BL/6J.

Los objetivos específicos que se propone alcanzar este trabajo son los siguientes:

1. Observar la evolución en la ganancia de peso de los ratones a lo largo del experimento y la ingesta de agua y alimento.
2. Explorar la repercusión final de la suplementación de calcio en la dieta sobre el peso de distintos órganos y tejidos: corazón, hígado, riñones, estómago, longitud del intestino delgado, tejido adiposo blanco (epididimal, inguinal, mesentérico, y retroperitoneal) y tejido adiposo marrón interescapular.

3. Examinar el efecto de la suplementación de calcio en la dieta sobre la concentración hepática de glucógeno, proteínas, lípidos totales, triacilgliceroles, colesterol, calcio, magnesio, magnesio ultrafiltrable y zinc y de triacilgliceroles y lípidos totales en tejido adiposo epididimal.

4. Evaluar el efecto de la suplementación de calcio en la dieta sobre la concentración en heces de proteínas, lípidos totales, triacilgliceroles, colesterol, calcio, magnesio, zinc y agua y de calcio, magnesio y zinc en orina.

5. Analizar el impacto de una dieta suplementada con calcio sobre la concentración de calcio, magnesio y zinc en fémur.

3. Material y Métodos

3.1. Material

3.1.1. Animales

Para llevar a cabo esta investigación se seleccionaron 12 ratones macho de la cepa C57BL/6J, procedentes de Charles River, España (fotografías 1 y 2). Los animales fueron recibidos con una edad comprendida entre 36 y 45 días y con un peso que oscilaba entre 19 y 21 g.



Fotografía 1.: Ratón macho de la cepa C57BL/6J. **Fotografía 2.:** Ratón macho de la cepa C57BL/6J.

Transcurrida la primera semana (semana de adaptación), en la cual los ratones permanecieron todos juntos en una jaula y se alimentaron con pienso de mantenimiento estándar para roedores, los animales se alojaron al azar dentro de cuatro jaulas metabólicas en grupos de tres ratones. A continuación se definieron dos grupos: control y calcio, compuestos cada uno por los ratones contenidos en dos jaulas metabólicas (n=6).

3.1.2. Dietas

Durante las ocho semanas que duró la experiencia, todos los ratones se alimentaron “ad libitum” con una dieta isocalórica (3,87 kcal/g) e hiperlipídica, (43% de la energía total procedente del aceite de soja y manteca de cerdo). La única diferencia existente entre los piensos de ambos grupos radicaba en su contenido en calcio (tabla 12). El pienso del grupo control contenía una cantidad de calcio estándar, 4g/Kg de pienso y procedía del Carbonato Cálcico exclusivamente, mientras que el pienso del grupo calcio contenía una cantidad de calcio de 12g/Kg de pienso y procedía de leche desnatada y deshidratada (95%) y del Carbonato Cálcico (5%). La tabla 13 refleja la composición mineral distinta al calcio del pienso suministrado a los dos grupos dado el particular interés de este trabajo por el metabolismo mineral.

3.1.3. Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales en las que se mantuvieron los animales en la sala de experimentación a lo largo de todo el estudio fueron constantes. Gozaban de doce horas de luz, (desde las 8 a las 20 horas) y doce de oscuridad, (desde las 20 a las 8 horas), la temperatura fue de 22° C y un grado de humedad del 75%.

3.1.4. Recogida de datos y muestras

Durante el tiempo que duró el tratamiento con una frecuencia semanal se midió la variación del peso corporal que experimentaban los animales y la cantidad de pienso y agua ingerida por los mismos. Dichas medidas se realizaron utilizando una balanza calibrada de precisión Mettler-PJ 3000, y el método que se utilizó fue la diferencia de pesada. También se procedió, con la misma frecuencia, una vez cada siete días, a la recogida de muestras de heces y orina. Estas muestras se almacenaban a -80° C. para su posterior análisis.

3.1.5. Sacrificio

Transcurridos cincuenta y seis días los animales se sacrificaron por decapitación a primera hora del inicio del ciclo de luz en una sala diferente a la que residían. La sangre del cuerpo se drenó y se extrajeron los distintos órganos y tejidos motivo de estudio: corazón, hígado, riñones, estómago, intestino delgado, tejido adiposo blanco epididimal, inguinal, mesentérico y retroperitoneal y tejido adiposo marrón intraescapular. Las muestras tisulares tras limpiarlas con solución salina, se pesaron, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80° C para su posterior estudio.

3.1.6. Ética

El protocolo de experimentación al que fueron sometidos los animales se diseñó conforme a la normativa para el uso de animales de experimentación existente en Castilla y León (ley 5/1997 del 24 de abril de protección de los animales) (131) y los procedimientos éticos de la Universidad de Valladolid.

Tabla 12.: Composición de las dietas suministradas a los dos grupos de animales utilizados para llevar a cabo la investigación.

Fte.: Research Diets Inc, (New Brunswick, U.S.A.).

Ingredientes	Grupo Control (g/1000 g de alimento)	Grupo Calcio (g/1000 g de alimento)
Caseína, 80 Mesh	212	50
DL-Metionina	3	3
Sacarosa	350	142
Celulosa	50	50
Aceite de soja	66	62
Manteca de cerdo	120	120
t-ButilHidroquinona	0,014	0,014
Mezcla mineral S10022B	7	7
Carbonato cálcico	10,0	17,4
Fosfato potásico	8	0
Citrato potásico * 1 H ₂ O	1,6	1,6
Mezcla vitamínica V10037	10	10
Butarato de colina	2,5	2,5
Leche desnatada y deshidratada	0	400
Compuestos de calcio totales		
Compuestos de calcio totales	4,0	12,0
Compuestos de magnesio totales		
Compuestos de magnesio totales	71,4	136,0
Compuestos de Zinc totales		
Compuestos de Zinc totales	4,3	6,6
Proteínas: g/1000 g de pienso		
Proteínas: g/1000 g de pienso	189,6	191,8
g (%)	22,6%	22,2%
Glúcidos: g/1000 g de pienso		
Glúcidos: g/1000 g de pienso	360	360
g (%)	42,9%	41,6%
Lípidos: g/1000 g de pienso		
Lípidos: g/1000 g de pienso	186	185,2
g (%)	22,1%	21,4%
Fibra: g/1000 g de pienso		
Fibra: g/1000 g de pienso	50	50
g (%)	6%	5,8%
Proteínas: kcal/1000 g de pienso		
Proteínas: kcal/1000 g de pienso	758	767
Kcal (%)	19,6%	19,8%
Glúcidos: kcal/1000 g de pienso		
Glúcidos: kcal/1000 g de pienso	1440	1440
Kcal (%)	37,2%	37,2%
Lípidos: kcal/1000 g de pienso		
Lípidos: kcal/1000 g de pienso	1674	1667
Kcal (%)	43,2%	43,0%
Total: kcal/1000 g de pienso		
Total: kcal/1000 g de pienso	3872	3874
Kcal (%)	100%	100%

Tabla 13.: Composición mineral de las dietas suministradas a los dos grupos de animales utilizados para llevar a cabo la investigación.
 Fe.: Research Diets Inc, (New Brunswick, U.S.A.).

Mezcla mineral S10022B	g /200g de alimento		g / 7g de alimento
Sulfato Potásico	46,6000	K	0,73
		S	0,30
Oxido de Magnesio	24,0000	Mg	0,50
Cloruro Sódico	74,0000	Na	1,00
		Cl	1,60
Carbonato cúprico	0,3000	Cu	6,00
Yodato Potásico	0,0100	I	0,20
Citrato Férrico	6,0600	Fe	45,00
Carbonato de manganeso	0,6300	Mn	10,50
Selenato Sódico	0,0102	Se	0,20
Carbonato de Zinc	1,6500	Zn	30,00
Sulfato de Cromo . 12 H2O	0,2750		
Molibdamato Amónico . 4 H2O	0,0079		
Silicato Sódico . 9 H2O	1,4500		
Cloruro de Litio	0,0174		
Ácido Bórico	0,0815		
Fluoruro Sódico	0,0635		
Carbonato de Niquel	0,0318		
Vanadato Amónico	0,0066		

3.2. Métodos

3.2.1. Procesado y determinación del glucógeno hepático

a. Preparación de las muestras

Las muestras problema se procesaron según el método descrito por Carroll y col. (1955) que consta de dos etapas consecutivas: aislamiento del glucógeno y transformación en glucosa (132). En primer lugar se procedió a **aislar el glucógeno** de las muestras de tejido hepático cuyo peso oscilaba entre 60 y 1300 mg (Mettler-H10W) mediante una digestión básica en caliente. La digestión se realizó añadiendo a las muestras 1,0 ml de una disolución de hidróxido potásico al 30% e introduciéndolas en un baño de agua en ebullición (Unitronic-OR-Selecta) durante 15 minutos. En estas condiciones los enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$ y $\alpha(1\rightarrow6)$ que unen a las moléculas de glucosa y componen el glucógeno son estables. Acto seguido, los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos (Mixtasel-selecta) para poder eliminar con facilidad los restos de tejido no digerido y rescatar el sobrenadante. Posteriormente, las moléculas de glucógeno fueron precipitadas introduciendo los tubos en un baño de hielo durante 30 minutos tras añadir a cada muestra 0,1 ml de sulfato sódico al 15% y 2,0 ml de etanol absoluto. Transcurrido este tiempo, se pudo apreciar en cada tubo, un precipitado de color blanquecino que se aisló centrifugando los tubos durante 7 minutos a 4500 rpm.

En segundo lugar el glucógeno aislado fue **transformado en glucosa** realizando una hidrólisis ácida en caliente. Para ello a cada tubo se le añadió 1,0 ml de ácido sulfúrico 5N y se introdujeron en un baño de agua en ebullición durante 30 minutos tapados con

papel de filtro. Una vez terminado este proceso y tras dejar enfriar los tubos, se añadió a cada muestra 2,0 ml de agua destilada, 2 ó 3 gotas de fenoftaleína y 1,0 ml de hidróxido sódico 5N obteniendo así una disolución de glucosa básica de color rosa, que se neutralizó añadiendo a cada tubo la mínima cantidad de ácido sulfúrico 1N necesaria para que el colorante indicador virara de color. Para finalizar a cada tubo se le añadió 0,5 ml de tampón fosfato salino.

b. Cuantificación de la glucosa

La glucosa presente en las disoluciones obtenidas fue cuantificada basándonos en el método enzimático-colorimétrico descrito por Trinder y col. (1969) de la *glucosa-oxidasa* (133). Este método se fundamenta en la producción de una serie de reacciones enzimáticas en cadena cuyo objetivo final es la producción de un compuesto coloreado proporcional a la concentración de glucosa de la muestra. Para ello se produce la oxidación de las moléculas de glucosa libre a ácido glucónico por acción de la *glucosa-oxidasa*. Esta reacción a su vez genera proporcionalmente peróxido de hidrógeno que en presencia de una *peroxidasa* reacciona con el ácido 4-hidroxibenzoico y la 4-aminoantipirina produciendo una quinonaimina coloreada. La intensidad del color de este compuesto puede medirse leyendo la absorbancia a 520 nm.

Finalmente, para cuantificar la glucosa de las disoluciones problema se tomaron alícuotas de 250 µl de las muestras anteriormente procesadas y se les añadió 1,0 ml del reactivo Glucose Liquid Stable Reagent-2810 (Biotécnica 2000 S.L.) que cuenta en su composición con todas las moléculas necesarias para producir la cascada de reacciones enzimáticas y 1,0 ml de tampón fosfato salino. Posteriormente, los tubos se incubaron durante 10 minutos en un baño de agua a 37° C. Transcurrido este tiempo se pudo apreciar en cada tubo un compuesto de color rojo proporcional a la concentración de glucosa y cuya intensidad permanecía estable durante 30 minutos. La concentración de glucosa se cuantificó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia de las muestras a 520 nm (Cecil-2021), con la ayuda de una recta patrón (fig. 11) realizada simultáneamente al procesado de las muestras, con cuatro disoluciones de una concentración de glucosa conocida que oscilaba entre 0,2 y 0,5 m mol/L (tabla 14). La concentración de la disolución madre de glucosa a partir de la cual se realizó la recta patrón fue de 10 m mol/L, (Merck). La linealidad para la determinación de glucosa con este método se extiende desde 0,0 hasta 24,8 m mol/L.

Tabla 14.: Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón en la determinación de glucosa en hígado.

	Blanco	Punto 1	Punto2	Punto3	Punto4
Disolución patrón de glucosa (µl)	0	20	30	40	50
Tampón fosfato salino (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Kit reactivo (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Concentración (m mol/L)	0	0,2	0,3	0,4	0,5

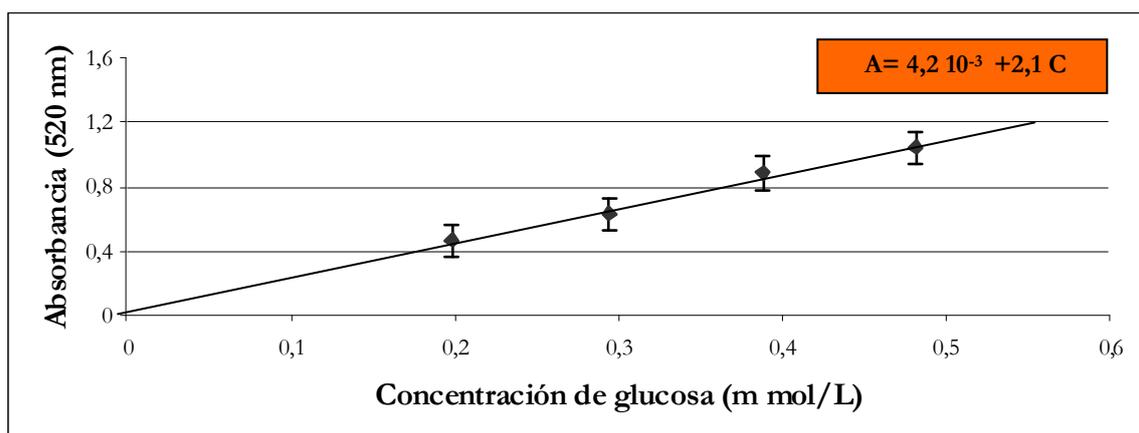


Fig. 11.: Recta patrón utilizada para la determinación de glucosa ($r = 0,996159\dots$) en hígado.
A = Absorbancia a 520 nm.; C = Concentración de glucosa (m mol/L).

3.2.2. Procesado y determinación de proteínas en hígado y heces

a. Preparación de las muestras

Para la extracción de proteínas, tanto las muestras hepáticas como las muestras fecales, se sometieron a un proceso de **homogeneización**. Este proceso se realizó de forma manual, con un homogeneizador de vidrio, utilizando como solvente un *buffer* fosfato-salino de 10 m mol/L (pH 7,4), (1:3 w/v), en un baño de hielo (134). Las muestras, cuyos pesos oscilaban entre 200 y 1250 mg, se machacaron con un volumen de solvente comprendido entre 3,0 y 5,0 ml hasta su completa desnaturalización. Posteriormente los homogeneizados se purificaron mediante centrifugación a 8000 rpm durante 20 minutos.

b. Cuantificación de las proteínas

Para cuantificar las proteínas de las muestras problema nos basamos en el método de Bradford y col. (135) Éste es un método colorimétrico que aprovecha la observación realizada por Wilson (1979) de la capacidad que tiene el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 para cambiar de color según su estado de ionización. La forma catiónica del colorante es de color rojo-marrón, la forma neutra es de color verde y la forma aniónica presenta una coloración azul intensa. Cada especie química posee un coeficiente de absorción molar diferente presentando un espectro de absorción característico según su estado de ionización. Cuando el reactivo se une de modo no covalente a grupos catiónicos, como por ejemplo el grupo NH_3^+ que presentan las cadenas laterales de los aminoácidos arginina y lisina, se desplaza el equilibrio que establece el colorante de su forma neutra a su forma aniónica, observando un cambio de coloración de verde a azul intenso, siendo este proporcional a la cantidad de proteína de la muestra. Estas reacciones tardan tan solo dos minutos en producirse y el complejo coloreado obtenido se mantiene estable durante una hora.

Para preparar el **reactivo de Bradford**, se disolvieron 5,0 mg del colorante Coomassie Brilliant Blue-G-250 (Sigma Chemical Co.) en 2,5 ml de etanol (96%) y 5,0 ml de ácido ortofosfórico (85%). A esta mezcla se le agregó agua destilada hasta obtener un volumen de 50 ml que tras reposar 24 horas en oscuridad, se filtró dos veces. El reactivo obtenido, se conservó en una botella oscura durante un periodo máximo de 15 días.

Para **cuantificar el contenido de proteínas** se tomaron alícuotas de 50,0 μ l de cada homogenizado y se añadieron 2,0 ml de tampón fosfato salino y 2,0 ml de reactivo de Bradford. Transcurridos dos minutos en cada tubo apareció una coloración azul intensa proporcional a la concentración de proteínas de las muestras que se cuantificó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia que presentaban las muestras a una longitud de onda de 595 nm, con ayuda de una recta patrón (fig. 12) realizada con seis disoluciones que contenían concentraciones conocidas de albúmina sérica bobina que oscilaban entre 10 y 100 mg/L (tabla 17), realizada en paralelo a la determinación de proteínas. La disolución madre a partir de la cual fueron preparadas el resto de las disoluciones se realizó disolviendo 50 mg de albúmina sérica bobina, (Chemical Co.), en 500 ml de agua destilada. La linealidad de este procedimiento se extiende desde 0,0 hasta 1400 mg/L.

Tabla 15.: Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón en la determinación de proteínas en hígados y heces .

	Blanco	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6
Tampón fosfato-salino (µl)	200	180	160	120	80	40	0
Disolución de albúmina (µl)	0	20	40	80	120	160	200
Reactivo de Bradford (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Concentración (mg/L)	0	10	20	40	60	80	100

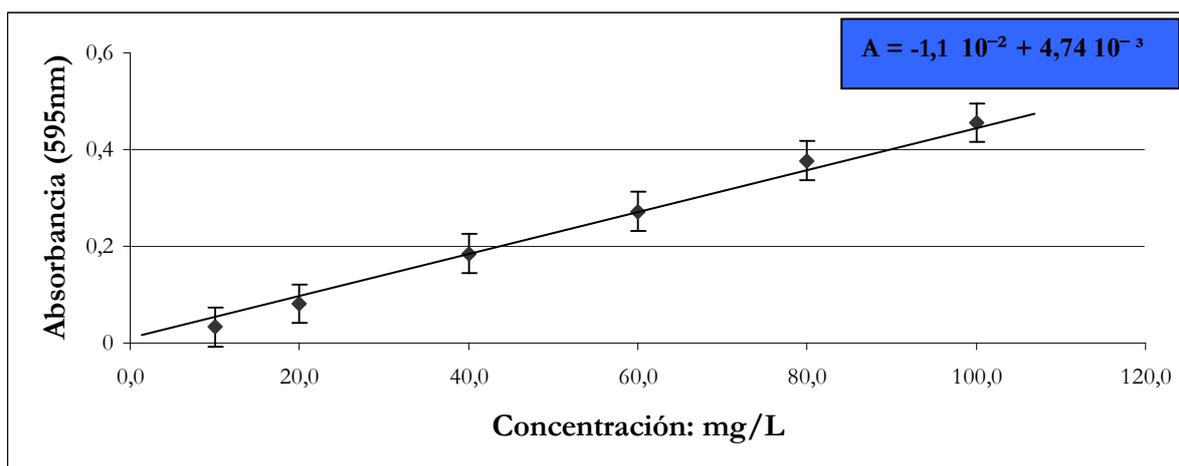


Fig. 12.: Recta patrón utilizada para la determinación de proteínas ($r = 0,999255\dots$) en hígado y heces.
A = Absorbancia a 595 nm.; C = Concentración de albúmina bobina (mg/L).

3.2.3. Procesado y determinación de lípidos en hígado, tejido adiposo y heces

a. Preparación de las muestras: Extracción

Para cuantificar los lípidos totales, el colesterol y los triacilgliceroles fue necesario extraer las moléculas lipídicas de las muestras problema. Estas extracciones se realizaron según el procedimiento descrito por Folch y col. (1951), que se fundamenta en la propiedad que tienen las moléculas lipídicas para disolverse en solventes apolares. Al extracto obtenido al final del proceso se le denomina extracto de Folch (136). En primer lugar, tanto las muestras de hígado como las de tejido adiposo y heces, cuyo peso oscilaba entre 50 y 150 mg **se homogeneizaron** manualmente con un homogenizador de vidrio utilizando como solvente entre 3,0 y 5,0 ml de una mezcla de cloroformo-metanol 2:1 (v/v). Terminada la homogenización se realizó la **extracción lipídica** mediante agitación y tras este proceso, los tubos permanecieron en reposo y en la oscuridad durante un periodo de 24 horas. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos para separar la fase líquida donde se encontraban las moléculas lipídicas de la fase sólida que se despreció.

La segunda parte del proceso consistió en la **purificación** del sobrenadante obtenido mediante la adición de 4,0 ml de NaCl 0.05 N a cada muestra. Tras agitar los tubos, éstos se colocaron en reposo y en la oscuridad durante 24 horas lo que permitió apreciar la aparición de dos fases en cada tubo: La fase inferior o fase oleosa donde se encontraban las moléculas de naturaleza apolar objeto de estudio y la fase superior o fase acuosa donde se hallaban las moléculas de naturaleza polar separadas por una interfase (“fluff”) en la que se localizaban las moléculas de naturaleza anfipática. Una vez retirada la fase acuosa, se añadió a cada tubo la mínima cantidad de etanol para obtener un líquido transparente. El último paso consistió en **rescatar** las posibles sustancias que hubieran podido disolverse en la fase acuosa anteriormente retirada añadiendo 3,0 ml de la mezcla de cloroformo-metanol a cada tubo y agitando. Para finalizar, los tubos permanecieron en reposo y en la oscuridad durante 24 horas para poder aislar la fase oleosa y la interfase que se adicionó a la que anteriormente habíamos conseguido. Este proceso de rescate fue realizado dos veces.

b. Cuantificación de los lípidos totales

Para la determinación de lípidos totales en los extractos de Folch nos basamos en el método descrito por Frings y col. (1970-1972) (137), basado en la capacidad observada por Chabrol y Charonat (1937), que poseen las moléculas de naturaleza lipídica para reaccionar con la vanilina en un medio fuertemente ácido formando un compuesto coloreado (8). Con el objetivo de inducir la formación de carbocationes en las insaturaciones de las moléculas de naturaleza lipídica, a cada alícuota de 1,0 ml. del extracto de Folch se le añadió 2,5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Después los tubos fueron incubados en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos. Para producir la reacción de los carbocationes formados con el ester fosfórico de la vanilina, una vez enfriados los tubos, fueron tomadas alícuotas de 150 μ l de cada muestra y se mezclaron con 850 μ l de suero fisiológico y 2,5 ml del reactivo Lipid Liquid STABLE Reagen-3530 (Biotecnica 2000, S.L.) compuesto por vanilina (7,8 m mol/L) y ácido fosfórico (12 m mol/L). Para finalizar las muestras permanecieron a temperatura ambiente (20-25° C) durante 20 minutos y tras este tiempo y durante los 30 minutos siguientes, se pudo observar un compuesto de color rosa, estable, cuya intensidad era proporcional a la cantidad de lípidos de la muestra.

Los lípidos totales se cuantificaron leyendo la absorbancia de las muestras a 520 nm con la ayuda de una recta patrón (fig. 13) realizada en paralelo con cuatro disoluciones que contenían concentraciones conocidas de colesterol que oscilaban entre 115 y 285 mg/L según se indica en la tabla 16. La concentración de la disolución madre de colesterol a partir de la cual se realizó la recta patrón fue de 800 mg/L, (Biotecnica 2000, S.L.). La linealidad de este método se extiende desde 0,0 hasta 6000 mg /L.

Tabla 16.: Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón en la determinación de lípidos totales en hígado, WATE y heces.

	Blanco	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4
Disolución patrón de colesterol (µl)	0	50	75	100	125
Suero fisiológico(µl)	900	950	925	900	875
Kit reactivo (ml)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Concentración (mg/L)	0	115	170	230	285

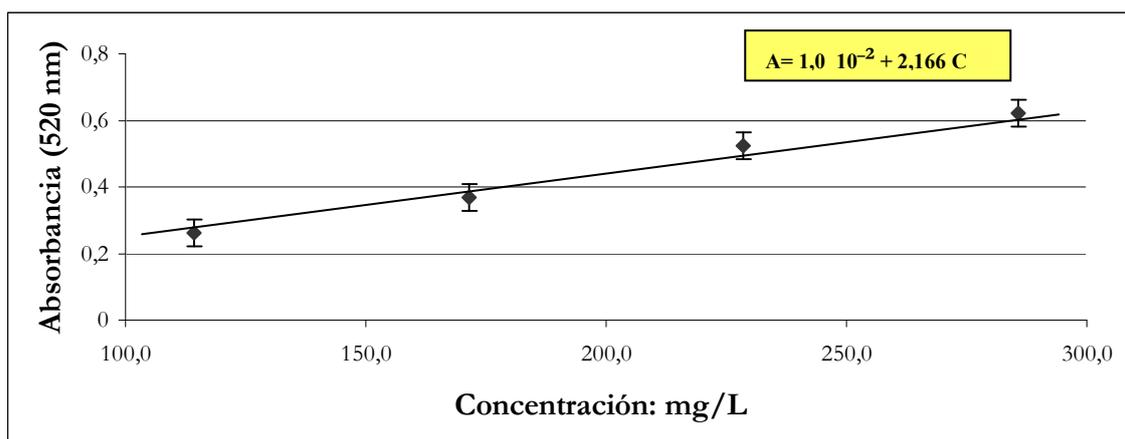


Fig. 13.: Recta patrón utilizada para la determinación de lípidos totales ($r = 0,99638\dots$) en hígado, WATE y heces.
A = absorbancia a 520 nm; C = concentración de lípidos (mg/L).

c. Cuantificación del colesterol

Para analizar el colesterol presente en los extractos de Folch nos basamos en el método enzimático-colorimétrico descrito por Allain y col. (1974) (138). Este método se caracteriza por la producción de una cadena de reacciones químicas catalizadas por enzimas cuyo objetivo es obtener como producto final un compuesto coloreado proporcional a la concentración de colesterol de la muestra (139). En primer lugar mediante una reacción de hidrólisis catalizada por la colesterol-esterasa (EC 3.1.1.13) se eximen los posibles ácidos grasos que pudiera tener esterificados el colesterol, liberando el grupo hidroxilo de la molécula. A continuación este grupo hidroxilo, por acción de la colesterol-oxidasa, se oxida a colest-4-en-3-ona con la producción simultánea de peróxido de hidrógeno, el cual se une con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de una peroxidasa para producir un complejo coloreado que presenta un máximo de absorción a 520 nm.

Para la valoración de colesterol de las muestras problema se tomaron alícuotas del extracto de Folch cuyo volumen oscilaba entre 200 y 750 µl y mediante el paso de una corriente de nitrógeno, se evaporó el disolvente del extracto puesto que las enzimas que catalizan las reacciones químicas implicadas en el análisis se desnaturalizan en dicho solvente. Después el residuo obtenido se reconstituyó con 1,0 ml de suero fisiológico. En estas condiciones, a cada muestra se le añadió 1,0 ml del reactivo Colesterol Liquid STABLE Reagen-2501, (Biotécnica 2000 S.L), donde se encontraban todos los reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones enzimáticas. Para finalizar los tubos se incubaron durante 10 minutos en un baño de agua a 37° C. Como resultado final se obtuvo un complejo coloreado que permaneció estable durante 30 minutos. Durante este tiempo se midió la absorbancia a 520 nm frente al reactivo blanco y con ayuda de una recta patrón (fig.14) realizada en paralelo con seis disoluciones que contenían concentraciones conocidas de colesterol que oscilaban entre 2 y 19 mg/L, según se indica en la tabla 17, se determinó la concentración de colesterol en las muestras problema. La concentración de la disolución madre de colesterol a partir de la cual se realizó la recta patrón fue de 800 mg/L, (Biotecnica 2000, S.L.). La linealidad para la determinación de colesterol con este método se extiende desde 0,0 a 6000 mg /L.

Tabla 17.: Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón en la determinación de colesterol en hígado y heces.

	Blanco	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6
Disolución patrón de colesterol (µl)	0	5	10	20	30	40	50
Suero fisiológico (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Kit reactivo (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Concentración (mg/L)	0,0	2,0	4,0	7,8	11,6	15,34	19,0

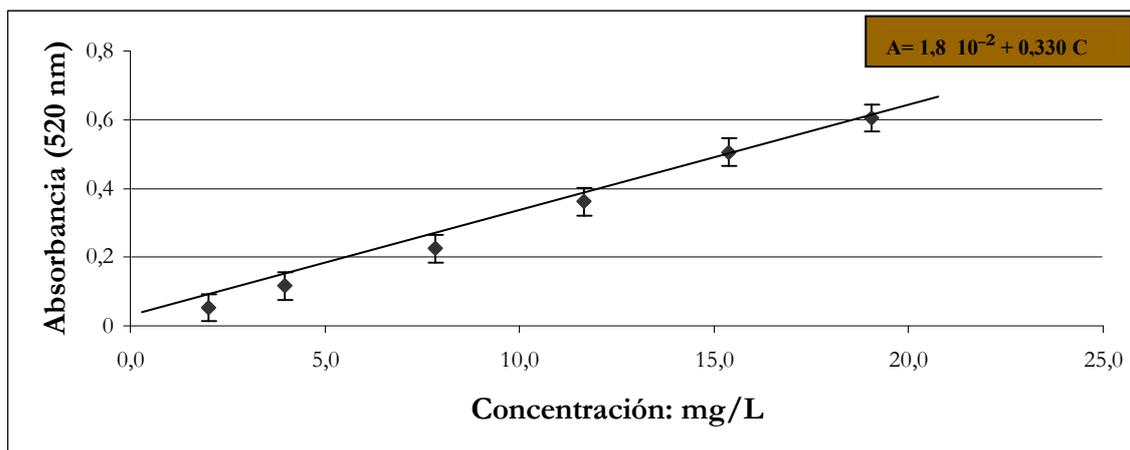


Fig. 14.: Recta patrón utilizada para la determinación de colesterol ($r=0,9936\dots$) en hígado y heces. A = absorbancia a 520 nm; C = concentración de colesterol (mg/L).

d. Cuantificación de los triacilgliceroles

Para el análisis de triacilgliceroles de los extractos de Folch fue elegido el método enzimático-colorimétrico descrito por Eagle y col. (140) que se basa en la producción una serie de reacciones químicas catalizadas por enzimas y finaliza con la producción de un complejo coloreado proporcional a la cantidad de triacilgliceroles de las muestras. En primer lugar mediante una reacción de hidrólisis catalizada por una *lipasa* se eximen los ácidos grasos del glicerol, dejando libre los grupos hidroxilo de esta molécula. Después, el glicerol se fosforila gracias al ATP en presencia de una *glicerol-kinasa* para producir glicerol-3-fosfato y adenosina-5-difosfato. El glicerol-3-fosfato se oxida produciendo dihidroxiacetona fosfato y peróxido hidrogenado por acción de la *glicerol-fosfato-oxidasa*. El peróxido hidrogenado reacciona entonces con 4-aminoantipirina y el ácido 3-hidroxi-2,4,6-tribromobenzoico en una reacción catalizada por una *peroxidasa* para producir un compuesto de color rojo, que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 540 nm.

Para la cuantificación de triacilgliceroles en los extractos de Folch de nuestras muestras problema, se tomaron alícuotas cuyo volumen oscilaba entre 0,1 y 1,0 ml y se sometieron a una corriente de nitrógeno para evaporar el disolvente. Después cada muestra se reconstituyó añadiendo 1,0 ml de suero fisiológico. Para producir la cascada de reacciones enzimáticas a cada muestra se le añadió 1,0 ml del reactivo Triglycerides Liquid Stable Reagent-3411 (Biotécnica 2000 S.L), y se incubaron en un baño de agua a 37° C durante 10 minutos, tiempo necesario para la obtención de los complejos coloreados que permanecieron estables durante 30 minutos. Para finalizar se leyó la absorbancia en las muestras a 520 nm y con ayuda de una recta patrón (fig. 15) realizada simultáneamente, con seis disoluciones que contenían concentraciones conocidas de glicerol que oscilaban entre 2,7 y 18,0 mg/L (tabla 18), se cuantificó la concentración de triacilgliceroles. La concentración de la disolución madre de glicerol a partir de la cual se realizó la recta patrón fue de 500 mg/L, (Biotecnica 2000, S.L.). La linealidad para la determinación de triacilgliceroles con este método se extiende desde 0,0 hasta 1250 mg/L

Tabla 18.: Reactivos utilizados en la realización de la recta patrón para la determinación de triacilgliceroles en hígado, WATE y heces.

	Blanco	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6
Disolución de glicerol (μl)	0	3	5	7	10	15	20
Suero fisiológico(ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Kit reactivo (ml)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Concentración (mg /L)	0,0	2,7	4,6	6,4	9,1	13,6	18,0

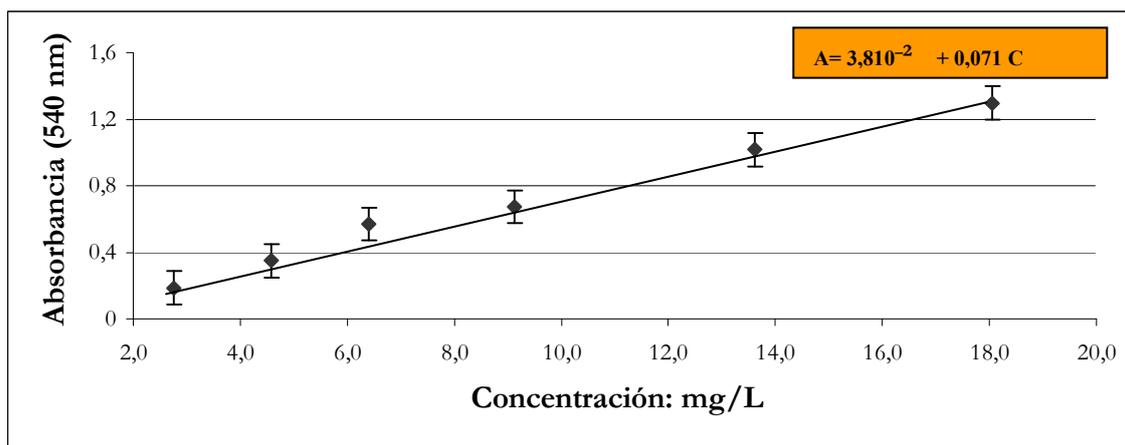


Fig. 15.: Recta patrón utilizada para la determinación de triacilglicéridos ($r=0,99364\dots$) en hígado, WATE y heces.

A= absorbancia a 540 nm; C = concentración de triacilglicéridos (mg/L).

3.2.4. Procesado y análisis de minerales

a. Procesado de las muestras

Como el método seleccionado, la absorción atómica, sólo permite la valoración de la concentración de los elementos metálicos en muestras líquidas y sin ningún tipo de partícula en suspensión, previamente a la cuantificación de minerales, las muestras problema tuvieron que ser procesadas atendiendo a su naturaleza.

a. 1. Procesado de las muestras de hígado y de heces

Nos basamos en el método descrito por McDonald et al. (141) que se fundamenta en la realización de una digestión de las muestras en caliente en un medio fuertemente básico. En este caso a cada muestra cuyo peso oscilaba entre 70 y 1300 mg, se le añadió 5,0 ml de una disolución de Na(OH) 5M y se introdujeron en un baño de agua en ebullición durante 30 minutos donde ocasionalmente se agitaron manualmente. Transcurrido este tiempo las muestras se dejaron enfriar y se sometieron un proceso purificación mediante centrifugación durante 60 minutos a 8000 rpm.

Como en las muestras hepáticas también se cuantificó la concentración de magnesio ultrafiltrable, del sobrenadante obtenido tras procesar las muestras hepáticas, se tomaron alícuotas de 0,3 ml. Posteriormente estas disoluciones se ultracentrifugaron (Tomy Seiko Hf-120 co.) durante 60 minutos. El líquido ultrafiltrado se rescató con 1,0 ml de agua destilada para su posterior valoración.

a.2. Procesado de las muestras óseas

Para llevar a cabo este análisis nos basamos en el método descrito por Raschka y col. (142) que consiste en la conversión del hueso en cenizas sometiendo a las muestras a altas temperaturas. En primer lugar se separaron muestras de fémur con un peso comprendido entre 300 y 700 mg y se incineraron a una temperatura de 580° C durante 48 horas en una mufla (Heron 12-PR/200). Posteriormente las cenizas de cada muestra se disolvieron en 4,0 ml de una disolución de HCl 6M. Para finalizar, las muestras se purificaron gracias a un proceso de filtración seguido de otro proceso posterior de centrifugación a 8000 rpm.

a.3. Procesado de las muestras de orina

Como las muestras de orina son líquidas, simplemente fue necesario someterlas a un proceso de purificación mediante centrifugación a 8000 rpm durante 60 minutos.

b. Determinación del contenido de minerales

El método utilizado para la determinación del contenido de calcio, magnesio y zinc de las muestras problema fue la absorción atómica ya que es un método sencillo y preciso para la cuantificación de metales pesados. Para ello a cada muestra se le añadió 1,0 ml de una disolución de Óxido de Lantano-EDTA (1:10) para eliminar las posibles interferencias que pueden producir otros metales pesados como el Al ó moléculas como el grupo fosfato que también pueden estar presentes en las muestras. Para realizar los análisis se utilizó un espectrofotómetro de llama aire/acetileno, (Perkin-Elmer 272), con lámparas de cátodo hueco, que sometía a las muestras a altas temperaturas tras absorberlas por un capilar.

b.1. Cuantificación del contenido de Calcio

Una vez procesadas las muestras se tomaron alícuotas de 2,0 ml y se introdujeron en el espectrofotómetro calibrado a una longitud de onda de 422,7 nm donde se determinó su absorbancia. Cuando la concentración de minerales de la muestra era muy elevada y resultaba comprometida la linealidad del proceso, las alícuotas se diluyeron convenientemente con agua destilada. Para poder relacionar la lectura de la absorbancia con la concentración de calcio existente en las muestras problema, paralelamente a la valoración de este mineral, se realizó una recta patrón (fig. 16) con seis disoluciones de un tris de calcio de concentración conocida que oscilaba entre 1,0 y 5,0 mg/L. Estas disoluciones se realizaron a partir de un estándar de calcio (109943 Trisol Calcium-Standard 1000 mg Ca in 1000 ml) suministrado por Merck como muestra la tabla 19. La linealidad del proceso se extiende desde 0,0 hasta 5,0 mg/L.

Tabla 19.: Reactivos utilizados para la realización de la recta patrón en la determinación de calcio en hígado, fémur, heces y orina.

	Blanco	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6
Tris de Calcio (ml)	0,0	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0
Agua destilada (ml)	10,0	9,8	9,6	9,5	9,4	9,2	9,0
Concentración (mg/L)	0,0	1,0	2,0	2,5	3,0	4,0	5,0

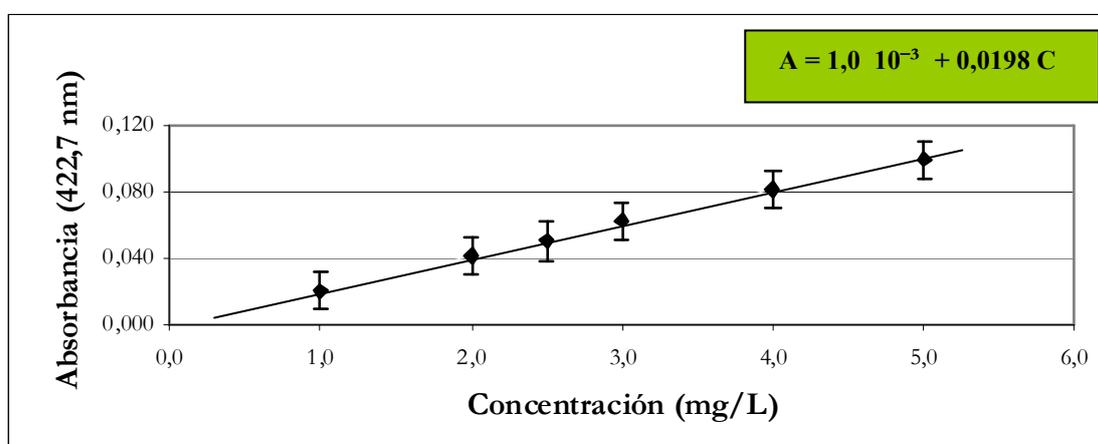


Fig. 16.: Recta patrón utilizada para la determinación de calcio ($r = 0,9993528...$) en hígado, fémur, heces y orina.
A = Absorbancia a 422,7 nm; C = Concentración de calcio (m /L).

b.2. Cuantificación del contenido de magnesio

Tras separar alícuotas de 1,0 ml de las muestras anteriormente procesadas, se procedió a medir la absorbancia de las mismas calibrando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 285,2 nm. Aquellas muestras cuya concentración sobrepasaba la linealidad del procedimiento se disolvieron convenientemente con agua destilada. Simultáneamente a la lectura de la absorbancia de las muestras problema se realizó una recta patrón, (fig. 17) con seis disoluciones de concentración conocida de un tris de magnesio que oscilaba entre 0,05 y 0,50 mg/L. Estas disoluciones se realizaron a partir de un estándar de magnesio (109949 Trisol Magnesium-Standard 1000 mg Mg in 1000 ml), suministrado por Merck como muestra la tabla 20. La linealidad del proceso se extiende desde 0,0 a 0,5 mg /L.

Tabla. 20.: *Reactivos utilizados en la realización de la recta patrón para la determinación de magnesio en hígado, fémur, heces y orina.*

	Blanco	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6
Tris de Magnesio (µl)	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50
Agua destilada (ml)	10,00	9,95	9,90	9,80	9,70	9,60	9,50
Concentración (mg/L)	0,00	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50

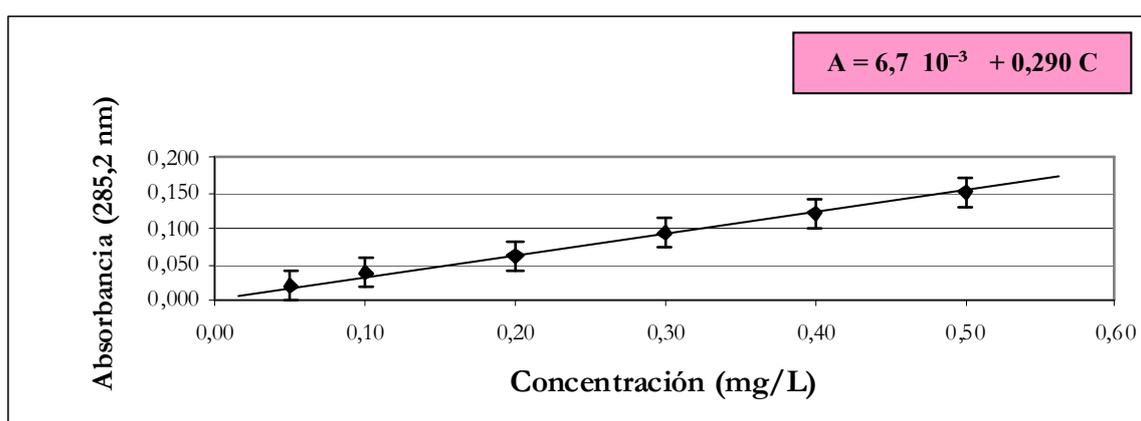


Fig. 17.: *Recta patrón utilizada para la determinación de magnesio ($r = 0,9995364...$) en hígado, fémur, heces y orina.*

A = Absorbancia a 285,2 nm; C = Concentración de magnesio mg/L.

b.3. Determinación del contenido de zinc

Tras tomar alícuotas de 1,0 ml de las muestras anteriormente procesadas, se midió la absorbancia de los tubos calibrando el espectrofotómetro a una longitud de onda de 213,9 nm. Aquellas muestras cuya concentración resultaba demasiado alta y comprometía la linealidad de procedimiento se disolvieron con agua destilada. Simultáneamente se realizó una recta patrón (fig. 18) con seis disoluciones de un tris de zinc de concentración conocida que oscilaban entre 0,1 y 1 mg/L. Estas disoluciones se prepararon a partir de un estándar de zinc (109953 Trisol Zinc-Standard 1000 mg Zn in 1000 ml suministrado por Merck como muestra la tabla 21. La linealidad del proceso se extiende desde 0,0 hasta 1,0 mg/L.

Tabla 21.: Reactivos utilizados en la realización de la recta patrón para la determinación de Zinc en hígado, fémur, heces y orina.

	Blanco	Punto 1	Punto 2	Punto 3	Punto 4	Punto 5	Punto 6
Tris de Zinc (ml)	0,0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1,0
Agua destilada (ml)	10,0	9,9	9,7	9,5	9,3	9,1	9,0
Concentración (mg /L)	0,0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1,0

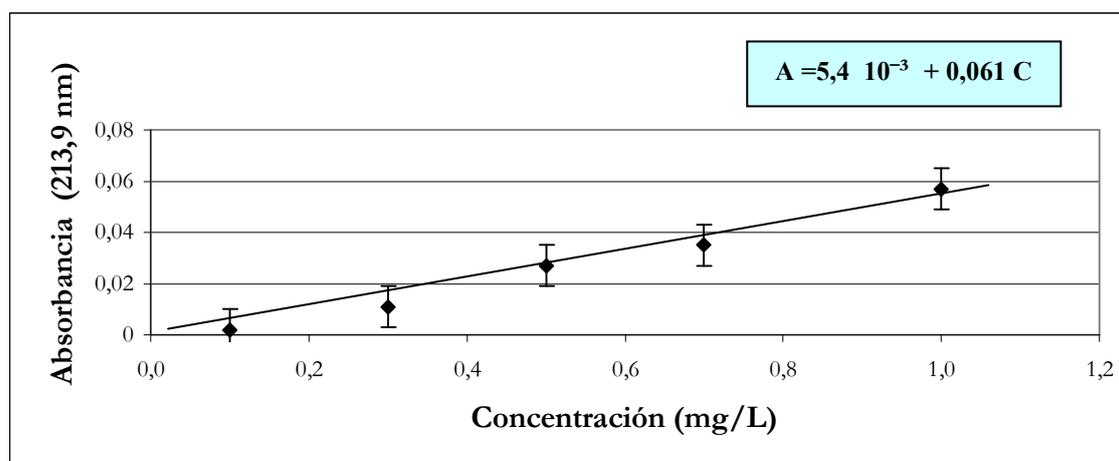


Fig. 18.: Recta patrón utilizada para la determinación de zinc ($r = 0,9995620\dots$) en hígado, fémur, heces y orina.
A = Absorbancia a 213,9 nm; C = Concentración de zinc (mg /L).

3.2.5. Procesado y determinación de la humedad en heces

Para la determinación del grado de humedad en las muestras de heces nos basamos en el método de desecación o secado al horno (143), el cual define el contenido de humedad de una muestra como la pérdida de masa que experimenta la misma en determinadas condiciones de temperatura, presión y tiempo. En primer lugar las muestras se pulverizaron de modo manual hasta obtener partículas inferiores a 1700 μm con la ayuda de un mortero. Después se pesaron por primera vez y se introdujeron en la mufla, donde se les aplicó una temperatura de 130° C. bajo presión de una atmósfera, durante un periodo de hora y media. Para finalizar, las muestras se dejaron enfriar y una vez alcanzada la temperatura ambiente, se pesaron por segunda vez. Al analizar los pesos obtenidos se observó una diferencia de masa definida como el contenido de humedad.

3.2.6. Procesamiento de los resultados y análisis estadístico

Los resultados se presentan como media \pm error típico. El tratamiento estadístico de los datos obtenidos durante la experimentación se realizó con el programa **SPSS** para Windows (SPSS 13, Chicago, IL) y consistió en el cálculo del contraste de hipótesis sobre la diferencia de medias aritméticas de dos muestras independientes, aplicando la prueba τ para dos muestras independientes. Previamente a la realización de esta operación se comprobó los requisitos de independencia de la población, aplicando la prueba de rachas y normalidad de la población, aplicando la prueba de Kolmogorov–Smirnov en ambos grupos.

4. Resultados

4.1 Ingesta de pienso y consumo de agua

4.1.1. Ingesta de pienso

La ingesta de pienso en el grupo control ($19,03 \pm 2,1$ g ratón/semana) y en el grupo calcio ($19,74 \pm 2,5$ g ratón/semana) fue constante y equivalente a lo largo de todo el tiempo que duró el tratamiento, como muestra la figura 19.

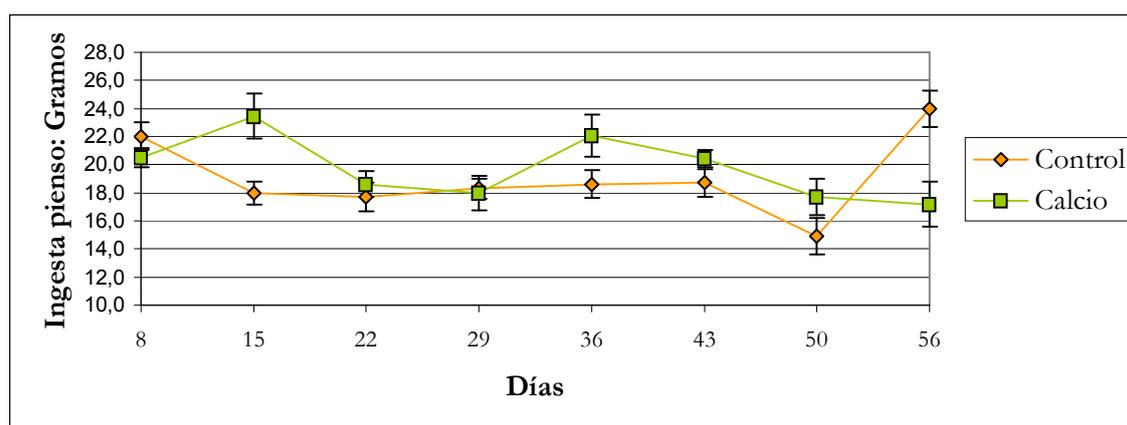


Fig. 19.: Ingesta de pienso a lo largo del tratamiento: ($X \pm ET$) ratón /semana correspondiente a los grupos control ($n=6$) y calcio ($n=6$).

4.1.2. Consumo de agua

El consumo de agua entre el grupo control ($30,0 \pm 5,4$ ml ratón/semana) y el grupo calcio ($31,0 \pm 1,3$ ml ratón/semana) también fue constante y equivalente a lo largo de toda la experiencia como refleja la figura 20.

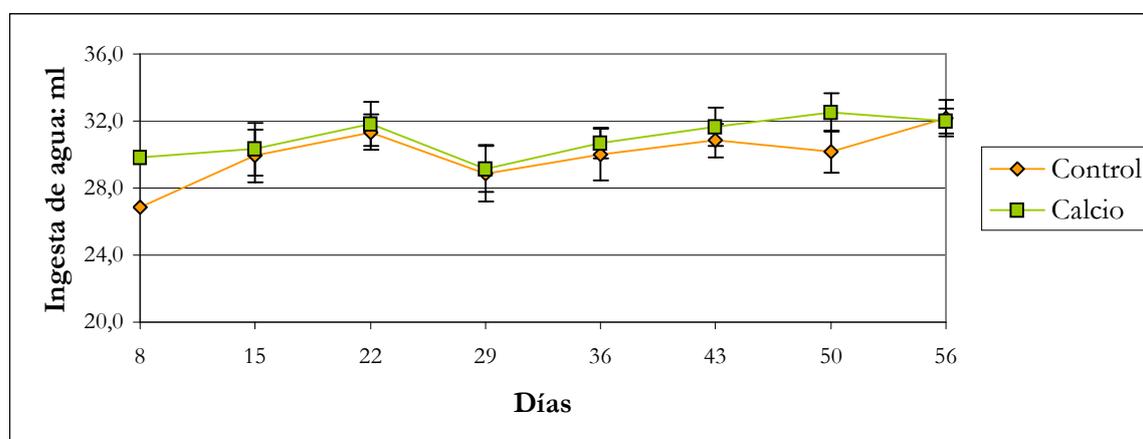


Fig. 20.: Ingesta de agua a lo largo del tratamiento: ($X \pm ET$) ratón/semana correspondiente a los grupos control ($n=6$) y calcio ($n=6$).

4.2. Antropometría

4.2.1. Peso corporal total

Los ratones escogidos para iniciar la experiencia poseían un peso lo más homogéneo posible ($21,9 \pm 0,7$ vs $21,9 \pm 0,6$ g). Durante las cinco primeras semanas de tratamiento la masa corporal de los roedores de ambos grupos fue aumentando de forma similar y no se apreció una diferencia destacable entre ellos. A partir de la semana número cinco, se advirtió una menor ganancia de peso en los ratones que integraban el grupo calcio (fig. 21). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al aplicar la prueba τ para dos muestras independientes, a partir del día 50 de tratamiento. Durante el tiempo restante esta diferencia en el peso de los ratones de ambos grupos se fue haciendo cada vez mayor y al finalizar el tratamiento esta diferencia en el peso corporal de los roedores ($28,3 \pm 0,8$ vs $25,5 \pm 0,3$ g) fue estadísticamente significativa para $p < 0,01$.

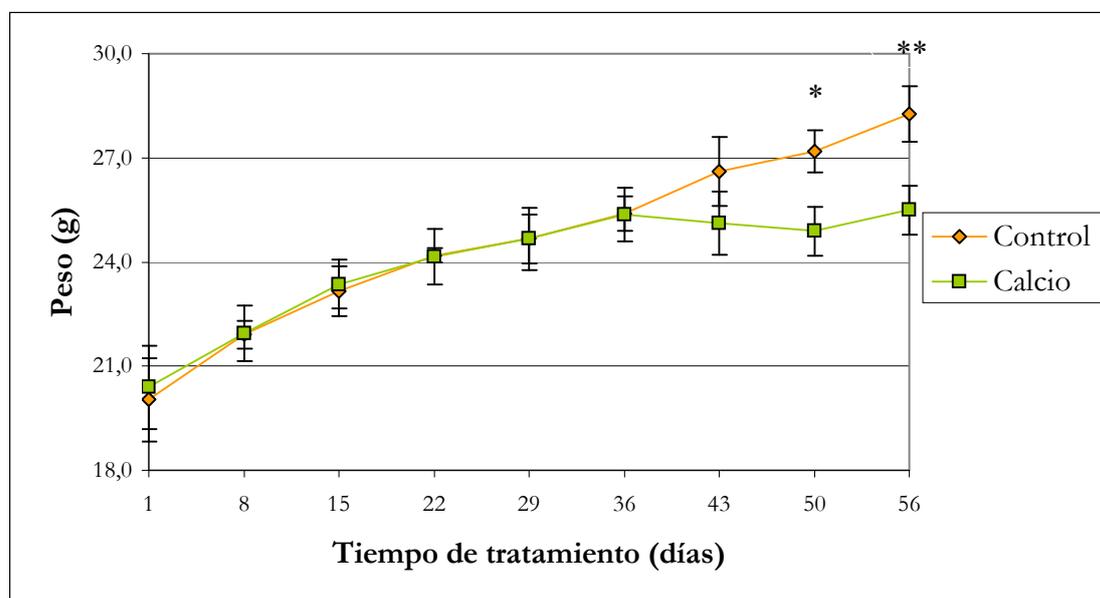


Fig. 21.: Variación del peso corporal de los animales sometidos a tratamiento expresado como ($X \pm ET$) ratón /semana correspondientes a los grupos control ($n=6$) y calcio ($n=6$).
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.2.2. Peso de los distintos órganos y tejidos

Como muestra la tabla 22 que recoge el peso de los distintos órganos y tejidos tras el sacrificio de los ratones, la dieta no afectó al peso del corazón, ni hígado y riñones, sin embargo si produjo un aumento en la longitud del intestino delgado del 22% ($p < 0,01$) y del estómago del 30% ($p < 0,05$). Además en todos los distintos tipos de tejido adiposo estudiados se observó una pérdida de peso en el grupo calcio respecto al control (fig. 22). La menor diferencia se advirtió en el tejido adiposo pardo que fue un 40% menor en el grupo calcio respecto al control ($p < 0,01$) mientras que la mayor diferencia se produjo en el retroperitoneal que se vio reducido un 69% respecto al control ($p < 0,01$).

Tabla 22.: Peso de los distintos órganos y tejidos expresado como ($X \pm ET$)/ratón correspondientes a los grupos control ($n=6$) y calcio ($n=6$).
N.S.: Diferencia no significativa.

Órgano/Tejido	Grupo control	Grupo calcio	Significado	Porcentaje
Corazón (mg)	136,4 \pm 5,9	143,8 \pm 9,8	N.S.	
Hígado (mg)	1153,1 \pm 70,9	1186,2 \pm 20,6	N.S.	
Riñones (mg)	157,4 \pm 4,8	176,6 \pm 8,4	N.S.	
Estómago (mg)	124,5 \pm 3,3	148,9 \pm 8,7	P<0,05	30%
Intestino delgado (cm)	33,4 \pm 0,5	40,7 \pm 0,7	P<0,01	22%
WATE (mg)	826,1 \pm 130,4	381,2 \pm 9,8	P<0,01	54%
WATI (mg)	533,0 \pm 55,1	221,7 \pm 9,6	P<0,01	58%
WATM (mg)	301,8 \pm 42,5	150,8 \pm 15,4	P<0,05	50%
WATR (mg)	267,7 \pm 33,4	81,2 \pm 6,9	P<0,01	69%
BATI (mg)	85,7 \pm 6,4	51,3 \pm 3,9	P<0,01	40%

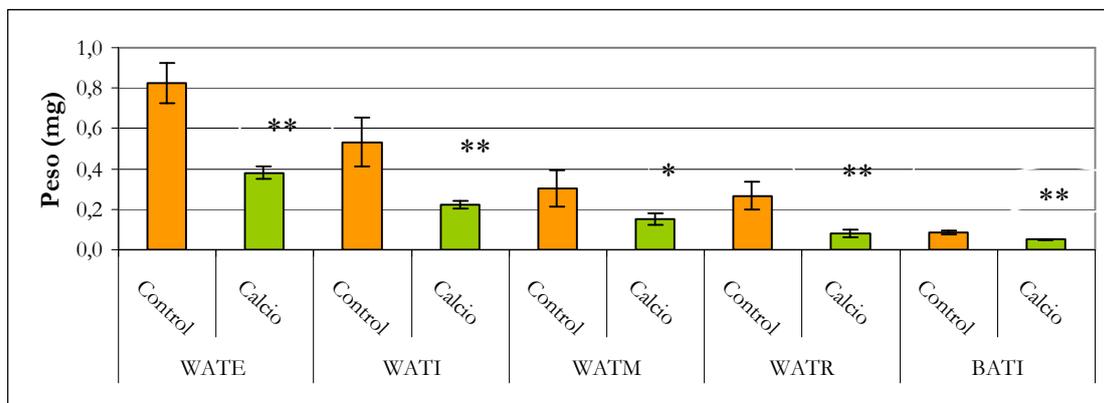
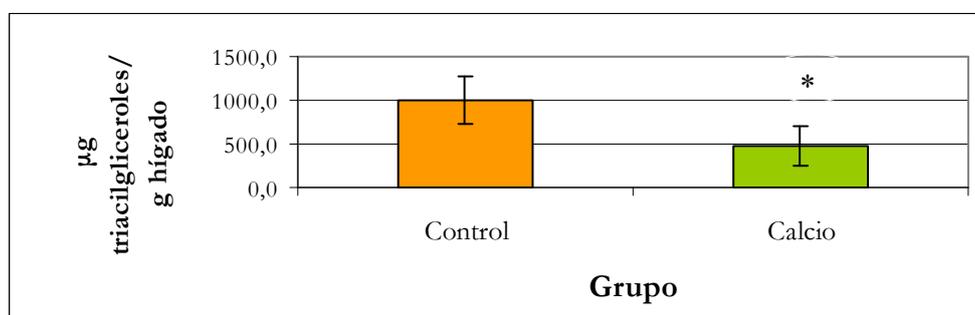


Fig. 22.: Peso de los distintos tipos de tejido adiposo: ($X \pm ET$) /ratón correspondientes a los grupos control ($n=6$) y calcio ($n=6$).
** $p < 0,01$.

4.3. Concentración de metabolitos y minerales hepáticos

4.3.1. Metabolitos hepáticos

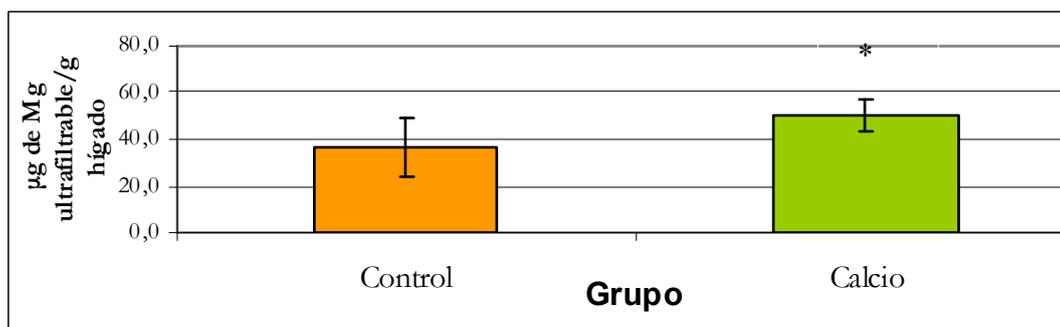
No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en las concentraciones hepáticas de glucógeno, proteínas totales, lípidos totales y colesterol (tabla 23). Sin embargo la concentración de triacilgliceroles fue un 52% mayor en el grupo control ($994,7 \pm 110,4 \mu\text{g/g}$ de tejido) que en el grupo calcio ($473,6 \pm 91,4 \mu\text{g/g}$ de tejido) como muestra la figura 23.



*Fig. 23.: Concentración de triacilgliceroles expresado como ($X \pm ET$) /g de tejido correspondientes a los grupos control ($n=6$) y calcio ($n=6$).
** $p < 0,01$.*

4.3.2. Minerales hepáticos

Tampoco se advirtieron diferencias significativas entre el grupo control y calcio (tabla 23) en las concentraciones hepáticas totales de calcio, magnesio y zinc. Sin embargo, el contenido en magnesio ultrafiltrable fue un 34% mayor en el grupo control ($36,5 \pm 5,2 \mu\text{g/g}$ de tejido) que en el grupo calcio ($50,0 \pm 2,9 \mu\text{g/g}$ de tejido) como indica la figura 24.



*Fig. 24. Concentración de magnesio ultrafiltrable ($X \pm ET$) /g de tejido correspondientes a los grupos control ($n=6$) y calcio ($n=6$).
* $p < 0,05$.*

Tabla 23.: Concentración de los distintos metabolitos y minerales en hígado ($X \pm ET$)/g de tejido para los grupos control (n=6) y calcio (n=6).
N.S.: Diferencia no significativa.

Metabolito / mineral	Grupo control	Grupo calcio	Significado	Porcentaje
Glucógeno (mg/g hígado)	20,3 \pm 1,3	18,0 \pm 1,9	N.S.	
Proteínas (mg/g hígado)	49,0 \pm 4,1	49,5 \pm 3,9	N.S.	
Lípidos totales (mg/g hígado)	6,4 \pm 0,5	6,2 \pm 0,5	N.S.	
Colestero (μ g/g hígado)	175,3 \pm 11,5	180,9 \pm 15,3	N.S.	
Triacilgliceroles (μ g/g hígado)	994,7 \pm 110,4	473,6 \pm 91,4	P<0,01	52%
Calcio (μ g/g hígado)	49,7 \pm 16,5	63,2 \pm 13,4	N.S.	
Magnesio (μ g/g hígado)	131,2 \pm 13,5	219,8 \pm 78,2	N.S.	
Magnesio ultrafiltrable (μ g/g hígado)	36,5 \pm 5,2	50,0 \pm 2,9	P<0,05	34%
Zinc (μ g/g hígado)	10,5 \pm 0,9	12,1 \pm 0,9	N.S.	

4.4. Concentración de metabolitos en el tejido adiposo epididimal (WATE)

Como recoge la tabla 24 los resultados del análisis de la concentración de lípidos totales y triacilgliceroles en el tejido adiposo blanco epididimal correspondientes al grupo control y calcio no muestran una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 24.: *Concentración de los distintos metabolitos en tejido adiposo epididimal expresado como $(X \pm ET)$ /g de tejido para los grupos control (n=6) y calcio (n=6). N.S.: Diferencia no significativa.*

Metabolito	Grupo control	Grupo calcio	Significado
Lípidos totales (mg/g de tejido)	$38,6 \pm 1,1$	$41,9 \pm 1,6$	N.S.
Triacilgliceroles (mg/g de tejido)	$29,1 \pm 2,0$	$31,5 \pm 2,1$	N.S.

4.5. Concentración de minerales en el fémur

No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y calcio en la concentración tanto de calcio, como de magnesio y zinc de las muestras de tejido óseo analizadas como resume la tabla 25.

Tabla 25.: Concentración de los distintos minerales en fémur expresados como $(X \pm ET)/g$ de tejido para los grupos control ($n=6$) y calcio ($n=6$).
N.S.: Diferencia no significativa.

Mineral	Grupo control	Grupo calcio	Significado
Calcio (mg /g de tejido)	$362,3 \pm 39,8$	$374,5 \pm 23,9$	N.S.
Magnesio (mg /g de tejido)	$1,8 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	N.S.
Zinc (mg /g de tejido)	$5,1 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,3$	N.S.

4.6. Concentración de metabolitos, minerales y humedad en heces

4.6.1. Metabolitos en heces

Al aplicar la prueba τ para dos muestras independientes a la concentración de proteínas de las muestras de heces analizadas se advirtió que el grupo calcio ($2,8 \pm 0,6$ mg proteínas ratón/g heces) presentaba una concentración media de proteínas superior a la del grupo control ($2,0 \pm 0,4$ mg proteínas ratón/g heces) como muestra la figura 25. Esta diferencia fue significativa ($p < 0,01$) a lo largo de todo el tratamiento. Sin embargo las concentraciones tanto de lípidos totales como de colesterol y triacilglicérolos no se vieron afectadas por la dieta (tabla 26).

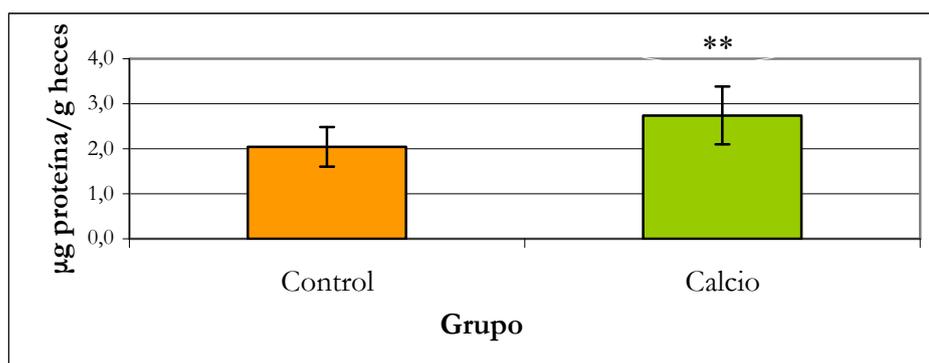


Fig. 25.: Concentración de proteínas expresado como ($X \pm ET$) ratón/g heces correspondientes a las muestras tomadas a lo largo del tratamiento en los grupos control ($n=16$) y calcio ($n=16$).
** $p < 0,01$.

4.6.2. Minerales en heces

a. Calcio

Como se aprecia en la figura 26 la concentración de calcio en heces fue un 150% inferior en el grupo control ($20,5 \pm 6,7 \mu\text{g Ca ratón/g heces}$) que en el grupo calcio ($111,8 \pm 13,4 \mu\text{g Ca ratón/g heces}$). Esta diferencia fue significativa ($p < 0,01$) durante todo el tiempo que duró el tratamiento (tabla 26).

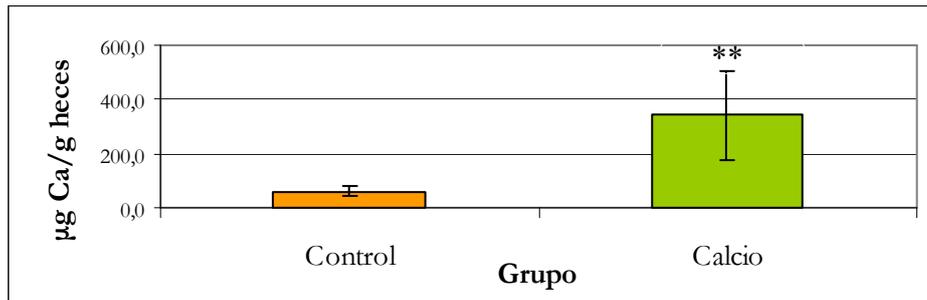


Fig. 26.: Concentración de calcio expresado como ($X \pm ET$) ratón /g heces correspondientes a las muestras tomadas a lo largo del tratamiento en los grupos control ($n=16$) y calcio ($n=16$).
** $p < 0,01$.

b. Magnesio

La concentración de magnesio en heces fue similar para ambos grupos hasta la tercera semana de tratamiento. A partir del día 22 la concentración de magnesio en el grupo calcio ($19,4 \pm 13,5 \mu\text{g Mg ratón/g heces}$) fue aumentando progresivamente y superó a la del grupo control ($6,6 \pm 1,1 \mu\text{g Mg ratón/g heces}$). Esta diferencia que fue estadísticamente significativa entre ambos grupos ($p < 0,01$) a partir del día 29 de la experiencia se mantuvo hasta el final del estudio como muestra la figura 27.

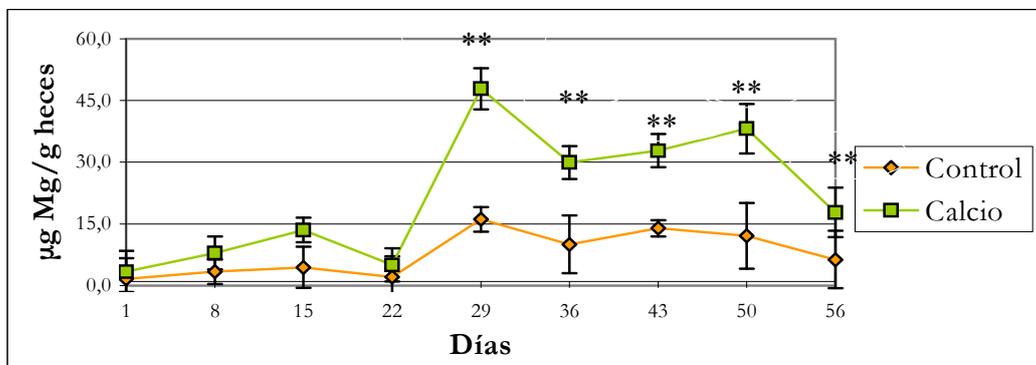


Fig. 27.: Concentración de Magnesio por gramo de heces expresado como ($X \pm ET$) ratón /semana correspondientes a los grupos control ($n=6$) y calcio ($n=6$) a lo largo de la experiencia.
Diferencia significativa para $p < 0,01$.

c. Zinc

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de zinc en heces entre el grupo control ($41,9 \pm 12,9 \mu\text{g Zn ratón/g heces}$) y el grupo calcio ($39,5 \pm 16,8 \mu\text{g Zn ratón/g heces}$) a lo largo de todo el tratamiento como muestra la figura 28.

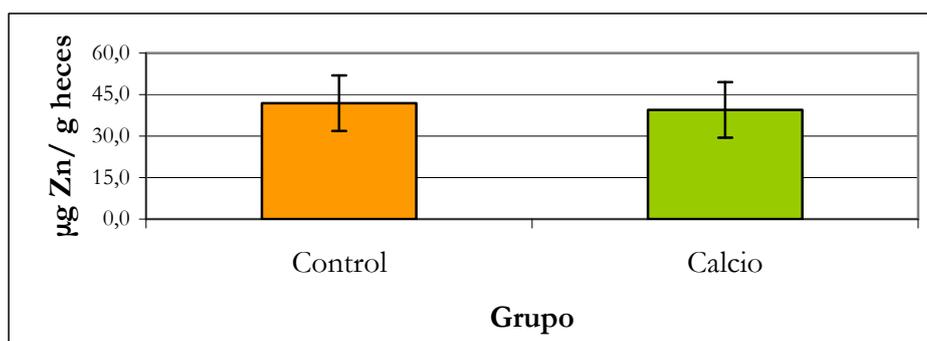


Fig. 28.: Concentración de zinc expresado como ($X \pm ET$) ratón /g heces correspondientes a las muestras tomadas a lo largo del tratamiento en los grupos control ($n=16$) y calcio ($n=16$).

4.6.3 Humedad en heces

La cantidad de agua por gramo de heces, como muestra la figura 29, fue un 55% menor en el grupo control ($49,8 \pm 11,9 \text{ mg agua ratón/g heces}$) que en el grupo calcio ($109,3 \pm 32,2 \text{ mg agua ratón/g heces}$) ($p < 0,01$). Las heces del grupo calcio presentaron desde el inicio del tratamiento mayor proporción de agua y esta diferencia se mantuvo a lo largo de todo el tiempo que duró la experiencia

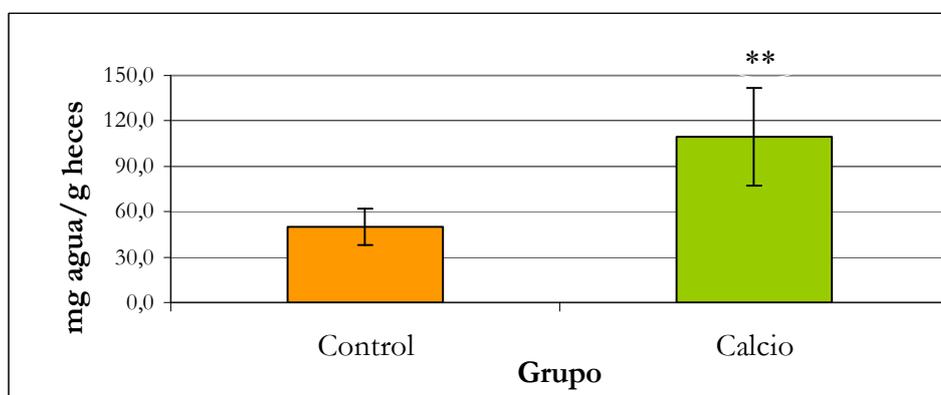


Fig. 29.: Contenido de humedad fecal expresado como ($X \pm ET$) ratón /g heces correspondientes a las muestras tomadas a lo largo del tratamiento en los grupos control ($n=16$) y calcio ($n=16$).
** $p < 0,01$.

Tabla 26.: Concentración de los distintos metabolitos y contenido de humedad fecal expresado como ($X \pm ET$) ratón/g de heces para los grupos control ($n=16$) y calcio ($n=16$).
N.S.: Diferencia no significativa.

Metabolito/mineral	Grupo control	Grupo calcio	Significado	Porcentaje
Proteínas (mg/g heces)	$2,0 \pm 0,4$	$2,8 \pm 0,6$	$p < 0,01$	34%
Lípidos totales (mg/g heces)	$11,6 \pm 5,4$	$9,3 \pm 3,1$	N.S.	
Colesterol (μ g/g heces)	$110,5 \pm 4,5$	$109,1 \pm 4,0$	N.S.	
Triacilgliceroles (μ g/g heces)	$59,4 \pm 2,4$	$60,4 \pm 2,9$	N.S.	
Calcio (μ g/g heces)	$20,5 \pm 6,7$	$111,8 \pm 13,4$	$p < 0,01$	150%
Magnesio (μ g/g heces)	$6,641 \pm 1,093$	$19,394 \pm 13,499$	$p < 0,01$	73%
Zinc (μ g/g heces)	$41,9 \pm 12,9$	$39,4 \pm 16,798$	N.S.	
Humedad (mg/g heces)	$49,8 \pm 11,9$	$109,3 \pm 32,2$	$p < 0,01$	55%

4.7. Concentración de minerales en orina

Como muestra la tabla 27 la concentración urinaria tanto de calcio ($18,3 \pm 6,7$ vs $2111,72 \pm 669,7$ $\mu\text{g Ca ratón/ml orina}$), como de magnesio ($12,3 \pm 4,1$ vs $1538,2 \pm 512,0$ $\mu\text{g Mg ratón/ml orina}$) y zinc ($7,4 \pm 1,2$ vs $32,4 \pm 4,3$ $\mu\text{g Zn ratón/ml orina}$) fue superior en el grupo calcio respecto al control ($p < 0,01$) durante todo el tratamiento (fig. 30).

Tabla 27.: Concentración de los distintos minerales en orina expresado como ($X \pm ET$) ratón/ml de orina para los grupos control ($n=16$) y calcio ($n=16$).

Mineral	Grupo control	Grupo calcio	Significado	Porcentaje
Calcio ($\mu\text{g/ml orina}$)	$18,3 \pm 6,7$	$2111,7 \pm 669,7$	$P < 0,01$	3000%
Magnesio ($\mu\text{g/ml orina}$)	$12,3 \pm 4,1$	$1538,2 \pm 512,0$	$P < 0,01$	3100%
Zinc ($\mu\text{g/ml orina}$)	$7,4 \pm 1,2$	$32,4 \pm 4,3$	$P < 0,01$	23%

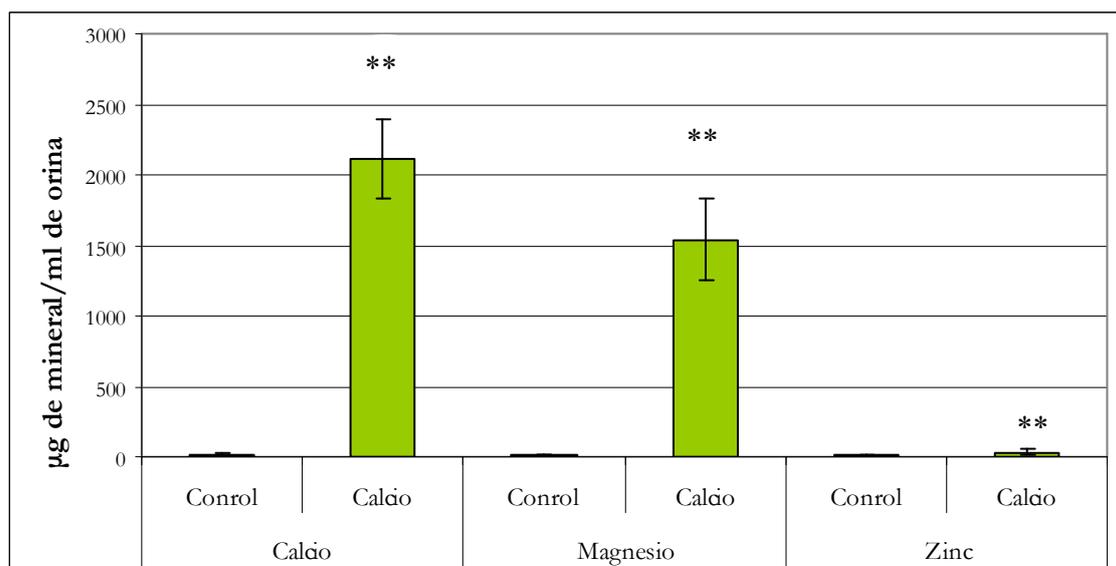


Fig. 30.: Concentración de minerales en orina expresado como ($X \pm ET$) ratón/ml orina correspondientes a las muestras tomadas a lo largo del tratamiento en los grupos control ($n=16$) y calcio ($n=16$).
** $p < 0,01$.

5. Discusión

5. 1. Posibles mecanismos de acción del calcio en el control del peso corporal.

5.1.1. El calcio y el peso corporal

En la última década varios estudios y trabajos experimentales (144-146) han puesto de manifiesto una posible relación entre el cuadro de síntomas que componen el síndrome metabólico y el consumo de calcio en la dieta planteando la hipótesis de que este mineral pueda estar implicado en la regulación del peso corporal y los depósitos grasos (75-115). Uno de los objetivos de este trabajo fue valorar el efecto que produce sobre el peso corporal y el peso de distintos órganos y tejidos de ratones de la cepa C57BL/6J la ingesta de una dieta normocalórica e hiperlipídica con alto contenido en calcio (12 mg /Kg de pienso). Al finalizar el tratamiento, el análisis estadístico de los resultados obtenidos con los datos antropométricos de los roedores mostró que el peso corporal de los animales integrantes del grupo calcio presentaba una clara reducción del 9,9% ($p < 0,01$) respecto al peso de los animales del grupo control.

Estos resultados concuerdan con las conclusiones obtenidas en otros trabajos realizados con modelos animales de experimentación como las aportadas por Sun y col. (91) que tras evaluar el efecto que producían dos dietas normocalóricas con distinto nivel de calcio (4 g/kg pienso vs 12g/ Kg pienso) sobre ratones transgénicos con sobre-expresión de la proteína *agouti* observaron que, cuanto mayor era la ingesta de calcio se producía una menor ganancia de peso corporal. Metz y col. (115) tras someter a un tratamiento normocalórico con alto contenido en calcio (4 g/Kg pienso) a ratas Wistar Kyoto durante once semanas también encontraron una asociación entre el alto nivel de calcio de la dieta y la reducción del peso corporal de los animales, y Stern y col. (90) trabajando con el mismo tipo de roedores alimentados también con una dieta normocalórica con alto contenido en calcio (2,8 g/kg pienso) durante cuatro semanas

apreciaron una menor ganancia de peso en el grupo cuyo pienso estaba enriquecido con este mineral.

Siguiendo esta misma línea de investigación pero con seres humanos en un buen número de estudios epidemiológicos y trabajos experimentales de intervención también se ha encontrado esta interesante asociación inversa entre el consumo de calcio en la dieta y el peso corporal. Zemel y col (105) tras someter a un grupo de personas a una dieta ligeramente hipocalórica con distinto contenido en calcio (500 mg/día vs 1000 mg/día) observaron que, todas las personas sufrieron una reducción de peso esta reducción era mas acusada en el grupo de individuos con mayor concentración de calcio en la dieta. McCarron y col. (76) revisando los datos del NHANES I sobre los hábitos de consumo de la población estadounidense, encontraron una asociación inversa entre el mayor consumo de calcio y el valor de peso corporal de la población. Loos y col. (80) analizando los datos del HERITAGE'S study también apreciaron esta misma correlación y más recientemente, Barba y col. (79) estudiando los hábitos alimentarios de la población infantil italiana encontraron una asociación entre el consumo de calcio y un menor IMC. Sin embargo otras publicaciones muestran resultados discordantes. Gunther y col. (106) tras someter a tres grupos de sujetos a un tratamiento con distinto contenido en calcio (800, 1000, y 1300 mg de Ca/día respectivamente) no encontraron diferencias significativas en el peso corporal de los individuos. Lappe y col. (110) tras administrar a dos grupos de personas una dieta con distinto contenido en calcio (900 vs 1500 mg de Ca/día) tampoco advirtieron ninguna diferencia en el peso de los sujetos y Snijder y col. (81) tras revisar los datos del HOORM'S study tampoco encontraron ninguna asociación entre el peso corporal y la ingesta de calcio.

Este hecho podría ser debido a la existencia de un valor umbral en la ingesta de calcio procedente de la dieta por debajo del cual este mineral no afectara al peso corporal de los mamíferos (155) y una ingesta de calcio por encima de la cual este nutriente no ejerciera un efecto más intenso.

Con el fin de establecer el origen de la reducción de peso corporal observada en los ratones tratados en este estudio, se realizó un análisis de los datos antropométricos de distintos órganos y tejidos de los animales obtenidos post-mortem observando que, el tratamiento no había afectado a la masa del corazón, hígado y riñones sin embargo, sí causó una reducción significativa en todos los depósitos grasos. En el peso del tejido adiposo epididimal se produjo una reducción del 54% en el grupo calcio respecto al control, en el del tejido adiposo retroperitoneal del 69%, en el del tejido adiposo inguinal del 58%, en el del tejido adiposo mesentérico del 50%, y en el tejido adiposo marrón intraescapular del 40%. En otros trabajos de investigación como el realizado por Parra y col. (112) con el mismo tipo de roedores que los empleados en este estudio pero de menor edad y un pienso con el mismo nivel de calcio, también se han obtenido resultados similares. Martín y col. (100) tras realizar un estudio transversal sobre una población (n=582) de hombres y mujeres observaron que las personas que se encontraban en los menores percentiles de grasa corporal para su grupo de edad y sexo se caracterizaban por presentar un mayor consumo de calcio. Investigadores como Zemel y col. (85) señalan incluso que esta reducción de los depósitos grasos causada por una dieta rica en calcio es más pronunciada en el tejido adiposo abdominal que la producida en otras localizaciones. A este respecto, Azadbakht y col. (89) también encontraron una asociación entre una dieta rica en lácteos y un menor contenido de grasa abdominal.

La mayor o menor acumulación de grasa en unas zonas determinadas del organismo viene determinada por las distintas variaciones regionales en el balance de los procesos de movilización o almacenamiento de triacilgliceroles causadas en parte por diferencias en el flujo de la lipólisis y la lipogénesis entre la grasa visceral y la subcutánea. En última instancia, el balance lipolítico-lipogénico es consecuencia de la actividad de la *LPL* y *LHS* cuya modulación está condicionada por múltiples factores. Sin embargo éstos no tienen la misma influencia en todos los territorios adiposos. Frente a los mismos estímulos unas demarcaciones son más sensibles que otras determinando diferencias en la respuesta. Recientes estudios muestran que la mayor velocidad de recambio o “*turn-over*” de triacilglicéridos se produce en la grasa visceral (34).

5.1.2. El calcio y los productos lácteos en la regulación de la ingesta.

Las hipótesis planteadas para intentar esclarecer las posibles causas que explicarían la reducción del peso corporal observada tras el consumo de una dieta rica en calcio y productos lácteos son muy heterogéneas. Ciertas líneas de investigación abiertas (91, 92) proponen que el origen de esta reducción de peso podría encontrarse en una reducción de la ingesta de alimento planteando la posibilidad de que estos productos afectaran al complejo mecanismo que regula la sensación de hambre y saciedad. Un factor a considerar es que la mayoría de los trabajos experimentales realizados con el objetivo de estudiar como afecta el calcio de la dieta al peso corporal han sido diseñados administrando leche y productos lácteos como fuente del mineral (79, 154, 158). Se conoce desde hace tiempo que los lácteos pueden yuxtaponer a su aporte nutricional la capacidad de interactuar con el metabolismo animal y producir cambios o adaptaciones en los mamíferos puesto que cuentan en su composición con un conjunto significativo de moléculas bioactivas (35). A este respecto, Shi y col. (91) observaron tras administrar a ratones P2-agouti varias dietas que se diferenciaban en la concentración y procedencia del calcio (Carbonato cálcico vs leche y productos lácteos) que la asociación inversa que relaciona el consumo de calcio con la reducción del peso corporal y los depósitos grasos era mayor cuando el calcio procedía de la leche y los productos lácteos (91).

Por otro lado Pilvi y col. (92) no encontraron diferencias significativas ni en la pérdida de peso corporal, ni en el peso del tejido adiposo tras someter al mismo tipo de ratones que los utilizados en este trabajo bien a una dieta con alto contenido en calcio y alto contenido en caseína, bien a una dieta con un nivel estándar de calcio y alto nivel de caseína sin embargo, si observaron que se producía una pérdida de peso significativa cuando la diferencia en las dietas radicaba en la concentración de proteínas procedentes de la leche de tal modo que, un tratamiento con alto nivel de calcio y alto contenido en proteínas lácticas si producía una reducción de peso corporal mientras que un tratamiento con alto nivel de calcio y bajo contenido en este tipo de proteínas no afectaba al peso de los roedores proponiendo que, una de las posibles causas que justificaría la reducción de peso advertida sería la capacidad que presentan estos alimentos para estimular los mecanismos reguladores de las señales de saciedad (92).

La regulación del inicio y la finalización de la ingesta y el lapso de tiempo que transcurre desde una comida a otra están mediados por la generación de señales a corto plazo y podría resumirse que la sensación de saciedad se genera mediante la integración en el sistema nervioso central, principalmente en el núcleo del tracto solitario y el telencéfalo, de la información mecánica producida por la distensión gástrica y la presión que ejerce la entrada de alimento al estómago junto con la información que mandan los osmosensores situados en el intestino delgado en respuesta a los ácidos grasos, los aminoácidos y los azúcares derivados de la digestión de los alimentos y las señales químicas originadas por hormonas como la CCK, la gastrina y otras sustancias secretadas en respuesta al alimento en el tracto gastrointestinal o el aumento postprandial de glucemia (10). Las proteínas mediante un mecanismo que aún no está del todo esclarecido, instauran el efecto de saciedad de una forma más acentuada que otros componentes de la dieta como los glúcidos o las grasas suprimiendo el apetito y reduciendo la ingesta de alimentos más rápidamente que otros nutrientes (22). Además algunos estudios (147, 161) afirman que la leche y los productos lácteos además de ser una fuente de proteínas de alta calidad, podrían establecer de forma más rápida y duradera en el tiempo la sensación de saciedad que la producida mediante el consumo de otro tipo de proteínas como la albúmina o las proteínas de la soja (147).

Aunque la fracción proteica que compone la leche esta constituida por un dispar grupo de moléculas destaca su alto contenido en caseína (80% del contenido proteico total) cuya cadena polipeptídica es especialmente rica en los aminoácidos leucina, valina e isoleucina. Estos aminoácidos cuando alcanzan el torrente circulatorio tras la degradación de la estructura primaria de los péptidos que los contienen pueden causar el estímulo de la secreción de hormonas gastrointestinales como la CCK o la insulina. La acción conjunta de todas estas moléculas puede instaurar la sensación de saciedad reduciendo la ingesta de alimentos (162). La caseína es un prótido de digestión lenta es decir, los aminoácidos que la componen son liberados al torrente circulatorio a una velocidad menor que la velocidad a la que se vierten los aminoácidos que componen otro tipo de proteínas como la albúmina o el resto de las proteínas lácticas, produciendo un efecto denominado “*efecto post-absorción*”. Estos aminoácidos aparecen en plasma transcurridos 30-40 minutos tras el consumo de los productos lácteos y se mantienen aproximadamente durante dos horas por lo que aunque la sensación de saciedad no se instaura de una forma rápida sino lentamente y mantenida en el tiempo (163).

El resto de las moléculas que contiene la fracción proteica de la leche es decir, aquellos prótidos que permanecen en el suero una vez que ha precipitado la caseína, son de digestión rápida y producen “*efecto pre-absorción*”. Los aminoácidos que conforman estas proteínas aparecen en el torrente sanguíneo rápidamente en forma de pico instaurando con celeridad la sensación de saciedad (163). La leche y los productos lácteos aportan al metabolismo animal ambos tipos de proteínas. En consecuencia estas moléculas podrían actuar sinérgicamente por lo que el consumo de este tipo de alimentos instaure de modo rápido la sensación de saciedad y además mantenido en el tiempo (162).

En este trabajo de investigación el consumo tanto de agua como de pienso durante todo el tratamiento fue similar en ambos grupos por lo que al menos en este caso, la composición de los piensos no parece afectar, o tienen el mismo efecto sobre ambos grupos en los mecanismos implicados en la generación de las señales de hambre o saciedad. Este hecho podría ser debido a que si bien es verdad que el pienso del grupo calcio estaba enriquecido con leche deshidratada para alcanzar el nivel deseado de calcio al pienso del grupo control también le fue añadida cierta cantidad de caseína para que la fracción proteica de ambos grupos fuera heterogénea. No obstante, si hay que considerar el hecho de que este aporte de leche deshidratada con el que fue enriquecido el grupo calcio además de proteínas supuso un suplemento de otros nutrientes y minerales como el magnesio, el fósforo o el zinc que a su vez también podrían intervenir en los procesos implicados en la regulación del peso corporal y los depósitos grasos (168).

5.1.3. El calcio y la absorción de nutrientes.

Otra posible hipótesis planteada para justificar la reducción de peso corporal y la merma del tejido adiposo observada tras el consumo de una dieta enriquecida con calcio se basa en que la ingesta elevada del mineral podría afectar a la absorción de nutrientes en el intestino delgado disminuyendo su biodisponibilidad (148-153). Los nutrientes en el tubo digestivo pueden interactuar entre si y debe ser considerado el efecto modulador que pueden ejercer los distintos componentes de la dieta y observar como actúa el producto alimentario en el contexto de un perfil nutricional global. Este tipo de reacciones son particularmente importante cuando lo protagonizan los minerales puesto que poseen una elevada capacidad para interactuar con un heterogéneo grupo de moléculas desencadenando fenómenos de precipitación y desplazamiento además de otro tipo de reacciones químicas (31, 70, 72). Con esta base se plantea la posibilidad de que el alto nivel de calcio que contenía el pienso con el que fueron alimentados los ratones podría ser el responsable de interacciones tanto con aquellas moléculas implicadas en el proceso de digestión como los ácidos biliares como con los distintos tipos de nutrientes que forman parte de la dieta que podrían conducir a una reducción de la absorción de determinados nutrientes y finalmente, este hecho se vería reflejado en el peso corporal.

A este respecto, las interacciones que pueden producir cambios en la absorción de lípidos son las que más interés suscitan ya que estas moléculas poseen una elevada capacidad energética. Algunos investigadores (148-153) defienden la hipótesis de que el calcio de la dieta podría formar complejos insolubles o “jabones” con la fracción grasa de la dieta impidiendo tanto la absorción del catión como de los ligandos acomplejados. El “secuestro” de estos nutrientes iría acompañado de un incremento en la concentración lipídica de las heces y una reducción del peso corporal. Papakonstantinou y col. (148) observaron tras finalizar su estudio en el que fueron alimentadas durante 85 días un grupo de ratas Wistar macho con un pienso con un contenido en calcio del 2,4% y en el que el 25% del aporte energético procedía de la grasa y el 14% de la caseína, un descenso en el peso corporal de los animales del 29% y un aumento en el contenido graso de las heces del 4%. Similares conclusiones obtuvo Jacobsen y col. (149) que tras incrementar el consumo de lácteos a un grupo de personas de 400 a 1300 mg/día percibieron un aumento en el contenido graso fecal de los individuos. Shahkhalili y col. (150) advirtieron tras comparar las heces de un grupo de hombres a los que durante dos semanas les habían

suministrado un suplemento de chocolate enriquecido con 900 mg de calcio frente al grupo control que durante el mismo periodo de tiempo habían ingerido la misma cantidad de chocolate pero sin el suplemento de calcio que la fracción lipídica fecal de los componentes del grupo calcio era el doble que la del grupo control. Tras analizar el tipo de lípidos que contenían las heces precisaron que estaban compuestas mayoritariamente por ácidos grasos, especialmente palmítico y esteárico, y Denke y col. (151) observaron tras administrar a un grupo de hombres durante 10 días una dieta con un nivel de calcio de 2200 mg/día donde el 34% de la energía procedía de la grasa que, el contenido de lípidos fecales era el doble que el del grupo control cuya ingesta de calcio fue 410 mg Ca/día.

Sin embargo, al comparar los resultados del análisis de la fracción lipídica de las heces del grupo calcio y el grupo control en este trabajo de experimentación no se observó ninguna diferencia en la concentración de lípidos totales, colesterol y triacilglicérol. Este hecho podría ser debido a que las interacciones que producen los componentes de la dieta entre si y/o con las moléculas implicadas en los proceso de digestión en el intestino delgado y que pueden condicionar el proceso de absorción están condicionadas por la naturaleza y propiedades fisicoquímicas de estas sustancias. Ciertos nutrientes como el calcio van a acomplejar preferentemente a aquellas moléculas que posean un fuerte grado de ionización y por tanto, las grasas neutras que son las que componen mayoritariamente el pienso con el que fueron tratados los animales, no resultan afectadas. A este respecto Welberg y col. (153) observaron tras incrementar la ingesta de calcio de 0,2 a 0,4 g/día a un grupo de personas (n=24) que el contenido de ácidos grasos de sus heces aumentaba de forma dosis dependiente a la concentración de calcio de la dieta sin afectar a la concentración de las grasas neutras fecales. Park y col. afirman que los ácidos grasos de cadena larga y los ácidos grasos insaturados se absorben mejor e interaccionan menos que los ácidos grasos saturados, y que la posición donde esté esterificado el ácido graso con el glicerol también puede influir en la biodisponibilidad de la molécula de tal modo que los 2-monoacilglicéridos se absorben mejor que los 1 ó 3-monoacilglicérols (152).

Por otro lado, esta hipótesis si explica tanto el aumento de la concentración de proteínas como el incremento en el grado de humedad de las heces del grupo calcio respecto al control (fig. 31). Estas moléculas poseen un fuerte grado de ionización que les dota de cierta carga negativa y facilita las interacciones con otras moléculas que posean carga positiva como por ejemplo el Ca^{2+} . El resultado de este tipo de reacciones sería la formación de complejos o quelatos insolubles que dificultarían la absorción de estos nutrientes y serían eliminados junto con las heces. No obstante, el aumento de la concentración de proteínas en las heces del grupo calcio aunque sea el reflejo de un menor índice de absorción de estos nutrientes, no justifica completamente la desaceleración en la ganancia del peso corporal observada en este grupo respecto al grupo. Los aminoácidos en el organismo de los mamíferos tienen una función principalmente estructural y su oxidación aunque aporta energía, ésta no es tan elevada como la que produce la degradación de otras moléculas de naturaleza glucídica o lipídica como los triacilglicerolos (31).

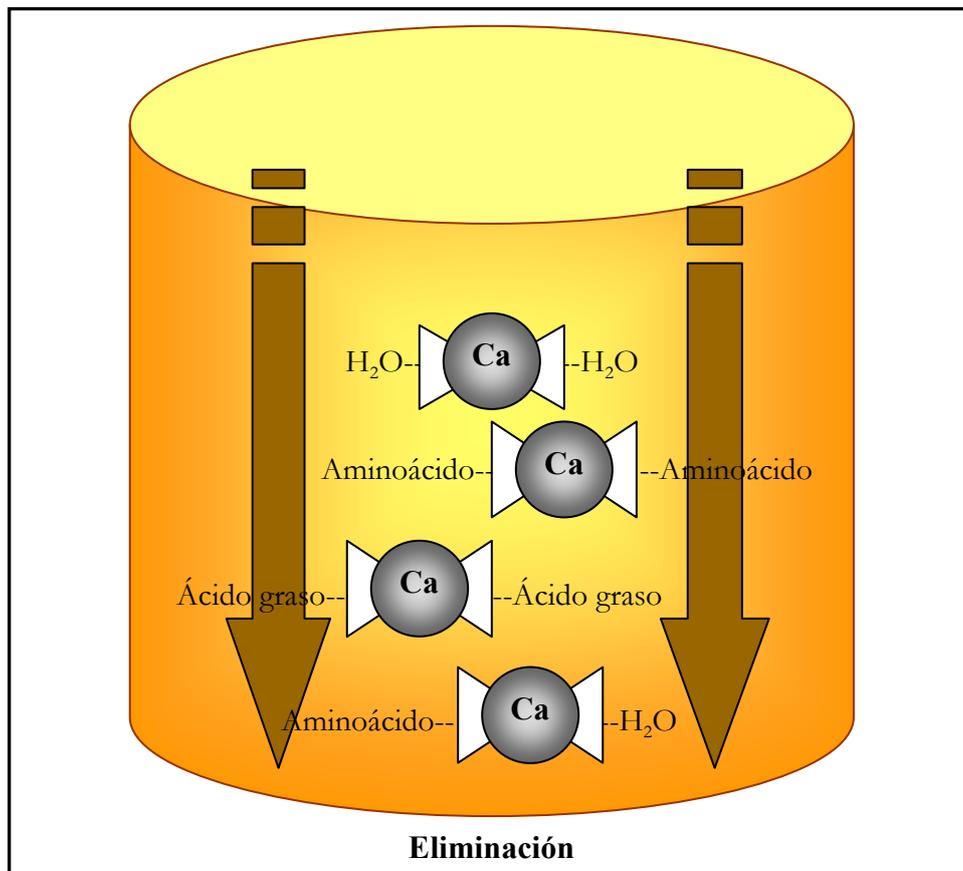


Fig. 31.: Posibles interacciones del calcio con distintos nutrientes de la dieta que conduciría a la formación y precipitación de complejos insolubles modificando el proceso de absorción.
 Fte.: Boner y col. (70)

5.1.4. El calcio y el metabolismo energético.

El calcio es un elemento esencial para la vida ya que es imprescindible para que un buen número de procesos biológicos puedan desarrollarse con normalidad, sin embargo aún no están plenamente discernidas todas sus funciones (154). La mayor parte del calcio en el organismo está localizado en los huesos y los dientes y solamente el 1% se distribuye por el resto de los órganos y tejidos aunque esta fracción del mineral desempeña funciones de gran importancia (31). Destaca el hecho de que el Ca^{2+} es necesario para que la actividad varias hormonas citosólicas se desarrolle adecuadamente y es un importante mediador intracelular que participa en la transducción de señales actuando como segundo mensajero (23). Para que el calcio pueda llevar a cabo su actividad con normalidad y no se produzca la apoptosis celular, es necesario que exista un gradiente electroquímico de concentración que se genera mediante la heterogénea distribución del ion. La concentración citoplasmática de Ca^{2+} es muy baja mientras que es más elevada la concentración extracelular (17).

En el mantenimiento de este gradiente de concentración están implicadas un buen número de moléculas de naturaleza muy diversa como varias proteínas transmembrana, proteínas transportadoras (bomba *Ca-ATPasa*, intercambiador *Na/Ca*), diversos enzimas que catalizan un buen número de reacciones químicas y varias secreciones hormonales como la PTH, el calcitriol y la calcitonina (17). Un ligero descenso en la concentración plasmática de Ca^{2+} hace que la paratiroides libere PTH quien a su vez, rápidamente, activa la síntesis renal de $1\alpha, 25\text{-dihidroxivitamina-D}_3$, y en consecuencia se produce un aumento de la calcemia previa activación de los mecanismos de resorción ósea, el aumento de la reabsorción renal y la absorción intestinal de Ca^{2+} debida, en gran parte, a la síntesis de calbindina. Ambas moléculas también modulan la actividad del intercambiador *Na/Ca* y la entrada directa del mineral a través de las membranas citoplasmáticas tanto por difusión simple como a través de canales específicos. Se ha comprobado que la forma activa de la vitamina D_3 permite el ingreso de Ca^{2+} a la célula mediante un mecanismo distinto a la interacción con su receptor nuclear, vía proteínas MARRS (71).

Zemel y col. (154) observaron tras realizar varios estudios en cultivos celulares de líneas adipocitarias humanas (3T3-L1 y L1-UCP2) que la 1,25-dihidroxyvitamina-D provocaba la entrada de Ca^{2+} a las células de modo dosis dependiente donde este mineral se comportaba como una llave reguladora del metabolismo energético. Un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular promovía el acúmulo de triacilgliceroles en los adipocitos estimulando tanto la expresión como la actividad del enzima ácido-graso-sintasa e inhibiendo la lipólisis mediante la activación de la fosfodiesterasa-3B que a su vez causaba una caída en los niveles intracelulares de AMPc. En consecuencia, la sensibilidad celular hacia aquellos efectores cuyo mecanismo de acción dependía de enzimas fosforilativas, como el de la LHS se reducía inhibiendo la vía metabólica lipolítica (155) (fig. 32).

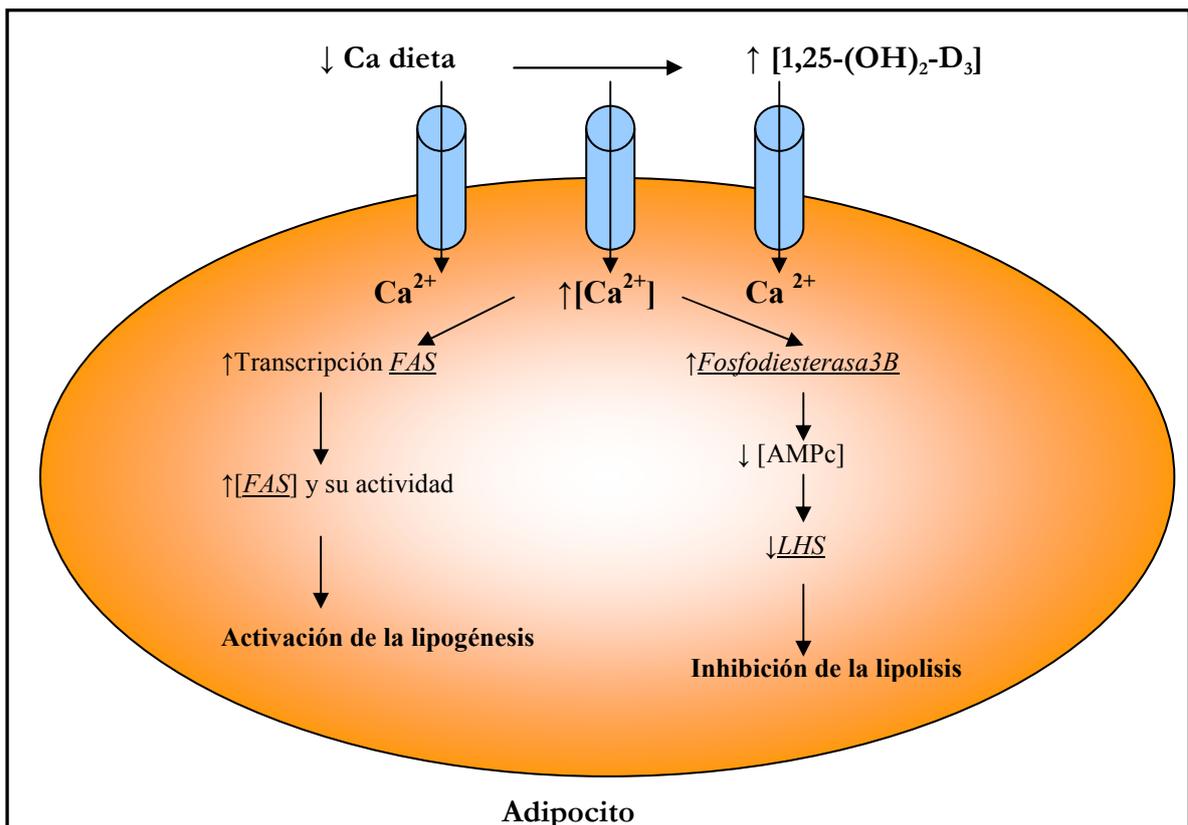


Fig 32.: Posible mecanismo de acción mediante el cual el calcio de la dieta podría modificar el metabolismo energético activar la lipogénesis e inhibiendo la lipólisis.
Fte.: Modificado de Parikh y col. (155).

Según las conclusiones de estos estudios el consumo de una dieta con bajo contenido en calcio podría causar un aumento en los niveles circulantes de 1,25-dihidroxyvitamina-D que derivaría en un incremento del Ca^{2+} intracelular en los adipocitos y en consecuencia se activaría la lipogénesis e inhibiría la lipólisis conduciendo a un aumento de los depósitos de triacilgliceroles mientras que el consumo de una dieta con elevado contenido en calcio, como la ingerida por los ratones en este trabajo, podría causar un descenso en los niveles circulantes de calcitriol que conducirían a un descenso en la concentración intracelular de Ca^{2+} en los adipocitos que activaría la vía lipolítica y deprimirían la ruta lipogénica y en consecuencia se reduciría el acúmulo de triacilgliceroles en estas células produciendo una reducción del tejido adiposo y por tanto del peso corporal (154, 155).

La revisión de los datos obtenidos en este trabajo tras el análisis de los metabolitos energéticos hepáticos mostró que aunque la fracción de glúcidos, proteínas, lípidos totales y colesterol fue similar en ambos grupos, la concentración de triacilgliceroles en el grupo calcio fue un 52% menor que la del grupo control ($p < 0,01$). Como el origen de los ácidos grasos que componen los triacilgliceroles hepáticos puede ser tanto endógeno como exógeno, el tratamiento al que fueron sometidos los animales si pudo haber ocasionado un cambio en el control del metabolismo lipídico hepático y en consecuencia haber causado un aumento de la lipogénesis y un receso de la lipólisis similar al observado por Zemel y col. en los adipocitos sustentando la hipótesis de que una dieta con alto contenido en calcio podría causar un descenso en los niveles circulantes de la forma activa de la vitamina D_3 que produciría una disminución en la concentración de Ca^{2+} intracelular tanto de los adipocitos como de los hepatocitos donde este catión se comportaría como una llave reguladora del metabolismo lipídico energético promoviendo el empleo de los triacilglicéridos como fuente de energía (147).

El catabolismo de los triacilgliceroles además de energía genera como subproducto metabólico una cantidad considerable de agua. Mientras que la degradación de un gramo de glúcidos produce 0,41 g de agua y 0,60 g la degradación de un gramo de proteínas, la oxidación de un gramo de lípidos genera 1,07 g de agua (28). En este trabajo no se produjo una diferencia significativa en la ingesta de agua entre el grupo control y el grupo calcio pero el grado de humedad de las heces del grupo calcio fue un 55% mayor que en el grupo control grupo control ($p < 0,01$). Al no observarse tampoco una diferencia

significativa en la cantidad de heces excretada entre ambos grupos se podía deducir que la absorción relativa de agua en el grupo calcio fue menor que en el grupo control. La producción de energía a partir de la β -oxidación de los ácidos grasos, al ir asociada a la producción de agua metabólica, podría justificar en parte esta diferencia en la absorción relativa de agua secundando la teoría propuesta por Zemel y col. (154) que afirma que el alto contenido de calcio en la dieta activa la lipólisis y por lo tanto la disponibilidad de ácidos grasos.

Los resultados obtenidos tras el análisis de la fracción mineral del tejido hepático también son interesantes. Si bien es verdad que no se encontró una diferencia significativa en la concentración total de calcio, magnesio y zinc, si se advirtió una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la concentración de magnesio ultrafiltrable que es la fracción del mineral biológicamente activo. Los niveles de este catión fueron más altos en el grupo calcio que en el control. Tal vez este incremento pueda estar causado por un descenso en los niveles intracelulares de Ca^{2+} que a su vez causara el desplazamiento del equilibrio de disociación del magnesio hacia la forma iónica del mineral y la extrusión del Mg^{2+} de las mitocondrias, ocupando así los “huecos” originados por el Ca^{2+} . La importancia del magnesio para el almacenamiento y la transformación de la energía está fuera de toda duda (31) y tal vez las variaciones en la concentración de las distintas formas en las que se puede presentar este mineral, a su vez causadas por el descenso de los niveles de calcio, también pudieran estar implicadas en los efectos observados en la variación de peso corporal y utilización de energía de los animales sometidos a tratamiento.

El origen de los ácidos grasos hepáticos también puede ser exógeno es decir al hígado también le llegan los ácidos grasos que forman parte de la dieta. Curiosamente los ácidos grasos de cadena corta, al ser hidrosolubles, no suelen formar parte de los quilomicrones sino que llegan directamente vía porta a este tejido (29). El calcio de la dieta podría interaccionar con estos nutrientes puesto que poseen carga negativa formando con ellos complejos insolubles que se eliminarían junto con las heces (147). Este descenso en su absorción podría causar una disminución en la concentración de triacilglicerol de los hepatocitos. Sin embargo la dieta con la que fueron tratados los roedores de este estudio cuenta en su composición con un escaso porcentaje de este tipo de ácidos grasos por lo que un déficit en la absorción de estas moléculas tampoco explicaría completamente la reducción en los niveles de triacilglicerol hepáticos advertida.

5.1.5. El calcio y el control del gasto energético.

Otra importante hipótesis propuesta que trata de explicar el mecanismo de acción mediante el cual la alta concentración de calcio de la dieta interviene en el control del peso corporal se sustenta en que parte de la energía ingerida en vez de ser almacenada podría ser transformada en calor mediante un mecanismo de acción en el que intervendrían las proteínas UCP. Sun y col. (156) tras realizar varios trabajos con líneas celulares adipocitarias humanas (3T3-L1 y L1-UCP2) observaron que la forma activa de la vitamina D₃, previa interacción con su receptor nuclear, modulaba la expresión de las proteínas UCP en las mitocondrias de modo que, una dosis fisiológica de 1,25-dihidroxyvitamina-D₃ (0,1-10 nM) producía un efecto protector sobre los adipocitos y permitía la transcripción de las proteínas UCP protegiendo a la mitocondria ante un potencial de membrana peligrosamente elevado mientras que una dosis farmacológica (≥ 100 nM) causaban la apoptosis celular (158).

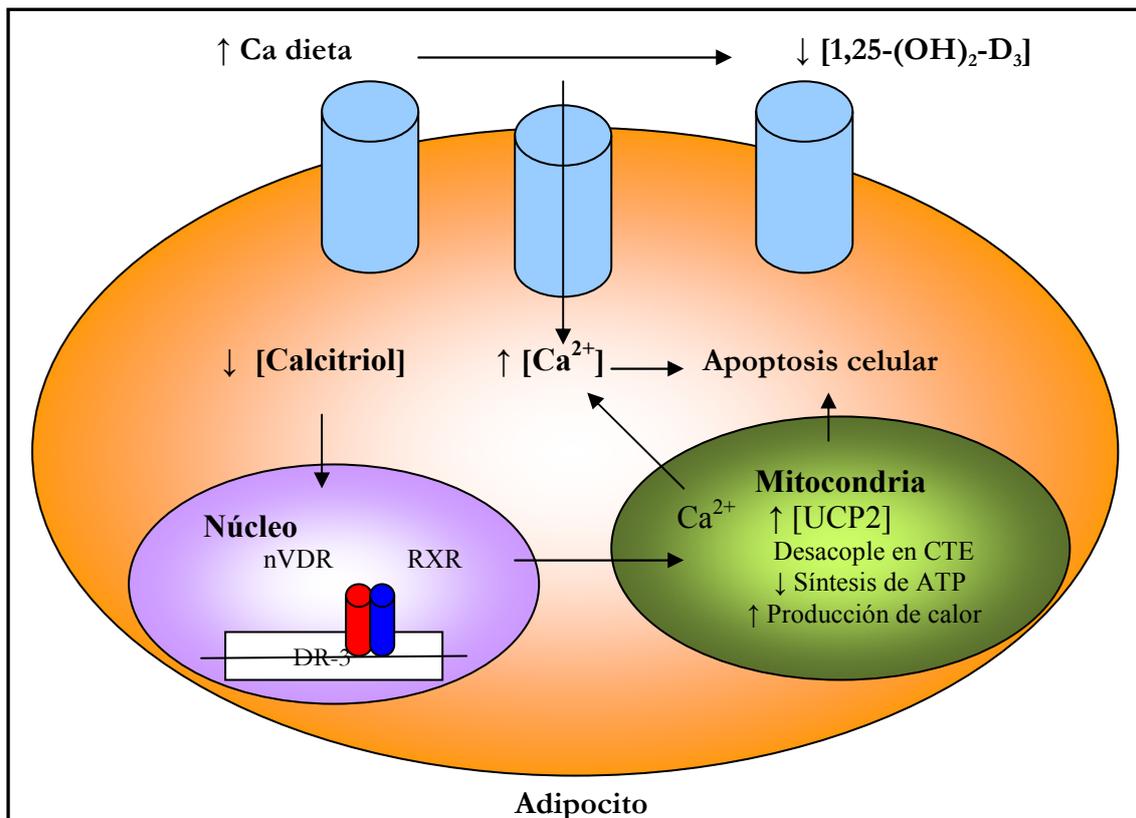


Fig.: 33. Posible mecanismo de acción mediante el cual el calcio de la dieta podría modificar el gasto energético aumentando la termogénesis adaptativa e incluso causar la apoptosis celular.

nVDR: Receptor nuclear para la vitamina D; RXR: Receptor nuclear para el ácido retinoico;
DR-3: Promotor DR-3; CTE: cadena de transporte de electrones

Fte.: Modificado Zemel y col. (158).

Una dieta con alto contenido de calcio podría causar un descenso en los niveles circulantes de la forma activa de la vitamina D₃ y en consecuencia, al menos en las mitocondrias adipocitarias, aumentaría la concentración de proteínas UCP. Como estas proteínas tienen la capacidad de producir durante la respiración celular el desacople en la cadena de transporte de electrones entre el gradiente electroquímico de concentración de protones y la síntesis de ATP, parte de la energía obtenida durante la oxidación de los triacilgliceroles podría ser liberada en forma de calor aumentando el gasto energético (113, 158). Por otro lado, la concentración de Ca²⁺ intracelular está relacionada de forma dosis-dependiente con los niveles circulantes de vitamina D. El calcitriol puede causar tanto la entrada del catión a través de la membrana citoplasmática como la salida del mismo de los orgánulos celulares como el retículo endoplasmático y las mitocondrias. Una dosis fisiológica de 1, 25-dihidroxyvitamina-D₃ cursa con la reducción del 50% de la concentración mitocondrial del ion mientras que una dosis farmacológica causa un aumento del 25% en la misma. Como es imprescindible para la supervivencia celular que los niveles citoplasmáticos de Ca²⁺ se mantengan dentro de unos límites muy estrechos, un cambio importante en la concentración del catión mediado por esta variación en los niveles plasmáticos de calcitriol e inducido por el alto nivel de calcio de la dieta, podría causar la apoptosis celular actuando sinérgicamente con el efecto provocado por las proteínas UCP (147) como muestra la figura 33.

Shi y col. (91) observaron tras inducir obesidad a un grupo de ratones transgénicos (P2-agouti) y someterlos a un tratamiento posterior con una dieta hipocalórica y un contenido en calcio del 1,3%, durante 6 semanas que al finalizar el tratamiento los roedores habían sufrido además de una mayor pérdida de peso que el grupo control, un aumento del 80% en la concentración de la proteína UCP-2 del tejido adiposo y de la proteína UCP-3 muscular y un aumento de la temperatura corporal afirmando que, al menos en este tipo de ratones, el calcio de la dieta podría estar implicado en la regulación del gasto energético disminuyendo la eficacia en la degradación de los triacilgliceroles mediante el aumento de la concentración de las proteínas UCP-2 y UCP-3 mitocondriales. En definitiva, parte de la energía se podría haber “disipado” en forma de calor desacoplando en la cadena de transporte de electrones el gradiente de concentración de protones y la síntesis de ATP (91, 158).

Otras publicaciones (157, 158) justifican la reducción de los depósitos grasos observada tras el consumo de una dieta con alto nivel de calcio basándose en la capacidad que poseen las proteínas UCP para transportar los ácidos grasos dentro de las mitocondrias que es el orgánulo celular donde se produce su oxidación. Se han propuesto dos posibles mecanismos que tratan de explicar el modo en que las proteínas UCP actúan como transportadores. Por un lado el modelo flip-flop postula una posible unión de la proteína UCP con el ácido graso permitiendo así su transporte a través de la membrana mitocondrial hacia el interior (157) mientras que para otros autores las proteínas UCP realmente se comportarían como canales que permiten la entrada de los ácidos grasos (158). Una dieta con bajo contenido en calcio podrían originar una reducción en los niveles circulante de 1,25-dihidroxyvitamina-D₃, disminuyendo la expresión de las proteínas UCP y en consecuencia, el transporte de ácidos grasos a la mitocondria se vería afectado descendiendo por tanto la oxidación de estos metabolitos y produciendo un mayor acúmulo de triacilgliceroles en los adipocitos.

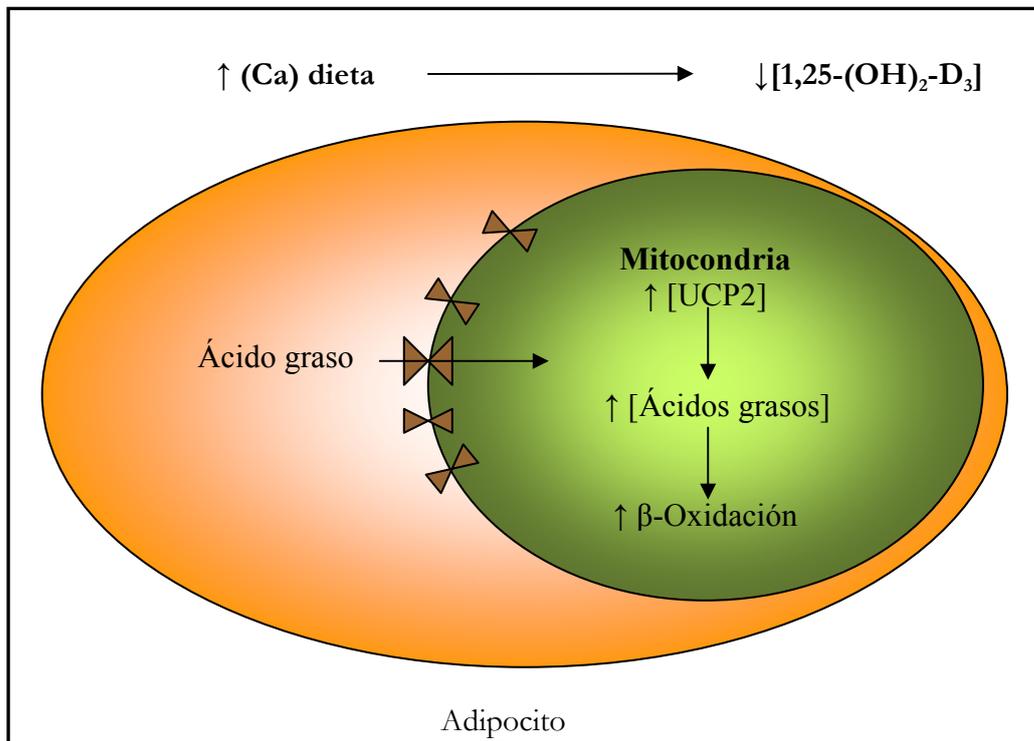


Fig.: 34 Posible mecanismo de acción mediante el cual el calcio de la dieta podría modificar la entrada de ácidos grasos a las mitocondrias disminuyendo su oxidación.
Fte.: Schrauwen y col. (157) y Zemel y col. (158).

Melanson y col. (111) tras medir en una sala térmica calorimétrica la tasa de oxidación lipídica de un conjunto de personas con normopeso que habían ingerido una dieta con distinta concentración de calcio detectaron que, la ingesta de calcio estaba directamente relacionada con el grado de oxidación lipídica ocasionando una variación de hasta el 10% en la misma. Siguiendo esta misma línea de investigación en otro proyecto (111) en el que sometieron a diez individuos a una dieta hipocalórica (600 Kcal/día) bien con elevado contenido en calcio (1400 mg/día) bien con bajo contenido en calcio (500 mg/día) observaron que, los individuos que habían ingerido la dieta rica en calcio presentaban una tasa de oxidación lipídica un 28% mayor que los sujetos que habían ingerido la dieta con menos calcio. Cummings y col. (159) comparando el efecto que producían en humanos tres menús con distinto contenido en calcio sobre la oxidación de las grasas percibieron que se producía una mayor tasa de oxidación lipídica y un menor nivel de ácidos grasos libres no esterificados cuando se ingería mayor concentración de calcio en la dieta. Gunther y col. (106) investigando como afectaba la ingesta de calcio a la oxidación de las grasas trataron a un grupo de mujeres con una dieta que contenía un nivel de calcio de 1000-1400 mg de Ca/día frente al grupo control que ingería 800 mg de Ca/día durante un año advirtieron que, aunque al principio del tratamiento no se percibió una diferencia significativa entre ambos grupos al final el mismo el grupo calcio presentó mayor tasa de oxidación lipídica que el grupo control.

Sin embargo Jacobsen y col. (149) no encontraron diferencias significativas tras evaluar la tasa de oxidación lipídica producida en un conjunto de personas a las que les fue administrada una dieta con un alto nivel de calcio durante una semana y Boon y col. (160) que valoraron como afectaba el consumo de tres dietas con distinto contenido en calcio durante una semana a la oxidación de las grasas tampoco advirtieron diferencia alguna.

Este trabajo se realizó en colaboración con el equipo de investigación del departamento de Biología Molecular, Nutrición y Biotecnología de la Universidad de las Islas Baleares donde fueron enviadas parte de las muestras del tejido adiposo intraescapular y músculo esquelético extraídas tras el sacrificio de los animales para valorar el contenido de proteínas UCP-1 y UCP-3. Los resultados obtenidos mostraron que la concentración en el grupo control y el grupo calcio tanto de proteínas UCP-1 del tejido adiposo ($100 \pm 12,2$ vs $110 \pm 15,4$) como de proteínas UCP-3 de la musculatura

esquelética ($100 \pm 10,5$ vs $89,1 \pm 11,7$) fue similar lo que hace suponer que, al menos en este caso, la reducción del peso corporal y los depósitos grasos observada no está causada por un aumento de la termogénesis adaptativa (168). Pese a que pueda resultar muy interesante la hipótesis que relaciona la modulación de la expresión de las proteínas UCP con la regulación de los depósitos grasos y el gasto energético, lo cierto es que la función de estas proteínas en el control de la termogénesis aún no está del todo esclarecida. Por otro lado este tipo de termogénesis en los seres humanos es un proceso cuantitativamente poco importante y sólo parece realmente relevante en los neonatos (17).

5.2. Biodisponibilidad de Calcio, Magnesio y Zinc y su relación con la concentración ósea

La mayoría de los estudios epidemiológicos y trabajos de experimentación realizados hasta ahora sobre la ingesta de calcio (144-147) han tenido como finalidad evaluar los efectos que puede causar el consumo de este mineral sobre el peso y la composición corporal y esclarecer el posible papel que podría desempeñar este mineral en el control de la ingesta alimentaria, el control de distintas rutas metabólicas como la lipogénesis, la lipólisis y la termogénesis así como evaluar las posibles interacciones que podría causar este catión con otros macronutrientes, especialmente sobre las sustancias de naturaleza lipídica y con las diversas moléculas implicados en el proceso de digestión en el intestino delgado (147, 154). Sin embargo existen muy pocos datos disponibles sobre el efecto del calcio de la dieta en la absorción, el metabolismo y la eliminación de otros minerales esenciales así como de las posibles interacciones que puede provocar este catión con otros iones divalentes. En este trabajo también se ha pretendido evaluar los posibles efectos que una dieta enriquecida con calcio (12 mg/Kg de pienso) pudiera ocasionar sobre la biodisponibilidad de otros minerales como el magnesio o el zinc, comparada con un estándar de calcio (4 mg/Kg de pienso), en ratones. Para ello, durante las ocho semanas que duró el tratamiento, fueron cuantificadas las concentraciones urinarias y fecales de calcio, magnesio y zinc y tras el sacrificio de los roedores se cuantificó la concentración de estos minerales en el fémur.

El análisis estadístico realizado de la concentración fecal y urinaria de calcio en ambos grupos puso de manifiesto que durante todo el tiempo que duró el tratamiento la concentración fecal de calcio fue un 150% mayor en el grupo calcio y la concentración urinaria un 100% mayor en el grupo calcio que en el grupo control. Este hecho podría ser debido a que por un lado no se absorbiera toda la fracción de este mineral presente en el

pienso puesto a que su concentración era muy elevada y que pese a todo, para contrarrestar la alta ingesta del mineral que se pudo producir aumentara su excreción.

El análisis de la concentración de magnesio en heces puso de manifiesto que al finalizar el estudio, la excreción fecal de magnesio en el grupo calcio fue un 73% mayor que en el grupo control. Sin embargo sorprende el hecho de que durante el tratamiento el contenido fecal de este mineral fue variando de tal modo que hasta el día 22 no se encontró una diferencia significativa en este parámetro entre ambos grupos pero a partir de este momento en el grupo calcio se produjo un aumento importante en la concentración fecal de magnesio y esta diferencia se mantuvo hasta el final del tratamiento. Por otro lado, la concentración urinaria de magnesio fue 100 veces superior en el grupo calcio que en el control durante todo el tiempo que duró el estudio. Las causas que justificarían este incremento en la excreción de magnesio y la forma en que se produjo no son muy claras. Si bien es verdad que al pienso de ambos grupos les fue añadida la misma cantidad de mezcla mineral S10022B (7 g de mezcla mineral S10022B/Kg de pienso), también hay que considerar el hecho de que al añadir el complemento de leche desnatada y deshidratada al pienso del grupo calcio se le incrementó tanto su contenido en calcio como su contenido en otros minerales entre ellos magnesio y zinc. Sin embargo este suplemento en la fracción mineral del pienso, que se produjo desde el inicio del tratamiento y no a partir del día 22 del mismo, no permite explicar el comportamiento bifásico hallado en la excreción de magnesio.

Trabajos publicados sobre las posibles interacciones que puede ocasionar el consumo de calcio y magnesio como el de Seeling y col. afirman que el consumo conjunto de ambos minerales no causa un efecto negativo que comprometa la biodisponibilidad de alguno de ellos (165) y aunque la relación en la dieta calcio/magnesio ha sido propuesta como un factor de riesgo para explicar la hipomagnesemia (166), se ha comprobado que las dietas con alto contenido en calcio a largo plazo, no parecen afectar a la retención de magnesio (167). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de investigación plantean la posibilidad de que el alto nivel de calcio de la dieta si podría causar una reducción en los niveles orgánicos de magnesio, tal vez debido a que la ingesta elevada de calcio mantenida en el tiempo podría reducir la discriminación de calcio y magnesio a nivel de sus transportadores en epitelio intestinal modificando su selectividad y finalmente podría originar un déficit en la absorción de magnesio.

Otro dato interesante que no se aprecia en otros trabajos de experimentación realizados con animales y que quizá pudiera estar relacionado con el comportamiento bifásico producido en la excreción de magnesio es el aumento observado del 30% en la masa del estómago vacío ($p < 0,05$) y el alargamiento en la longitud del intestino delgado del 22% ($p < 0,01$). Tal vez una ingesta elevada de calcio, como la que tenía el pienso con el que fueron alimentados los ratones de este trabajo, y mantenida en el tiempo podría causar un déficit en la biodisponibilidad de algún nutriente esencial como el magnesio originado, bien por un aumento de su excreción, bien por un receso en su absorción y en consecuencia para intentar contrarrestar este déficit, se produjera la hipertrofia de esta porción del tubo digestivo.

En cuanto al zinc, durante todo el tiempo que duró el tratamiento no se encontró una diferencia significativa en la concentración fecal de este mineral entre ambos grupos pero la concentración urinaria fue un 23% mayor en el grupo calcio que en el grupo control. En este caso, el aumento observado en la eliminación de zinc en el grupo calcio podría estar justificado por la composición del pienso. Como anteriormente se ha mencionado el pienso del grupo calcio fue enriquecido con un aporte de leche deshidratada que supuso un incremento de determinados nutrientes minerales. Este aumento de la excreción renal del mineral podría ser el resultado de un aumento en la ingesta que como consecuencia pondría en marcha los mecanismos homeostáticos (absorción/eliminación) que mantienen constante la concentración orgánica de zinc.

Para finalizar, otro aspecto a considerar sería si la alta concentración de calcio de la dieta pudo afectar a la mineralización del hueso debido a que estas alteraciones observadas en la absorción y eliminación de calcio, magnesio y zinc pudieron reducir la biodisponibilidad de estos micronutrientes. El tejido óseo constituye el mayor reservorio orgánico tanto de calcio como de magnesio que puede ser utilizado en caso de un déficit prolongado de estos minerales (31) y pese a que realmente no existe un reservorio orgánico de zinc, en caso de necesidad biológica, puede ser utilizada la fracción mineral localizada en el músculo o en el hueso (17). Los resultados obtenidos tras analizar la concentración de calcio, magnesio y zinc en el fémur fueron similares en ambos grupos por lo tanto, al menos en los huesos largos, no parece que esta dieta cause depleción de la masa ósea sin embargo, también debería ser analizada la concentración mineral de huesos cortos como vértebras o costillas.

5.3. Aspectos metodológicos

En la actualidad, no está completamente aclarado el mecanismo de acción mediante el cual el calcio de la dieta puede intervenir en la regulación del peso corporal y los depósitos grasos y las hipótesis planteadas al respecto (92, 147, 154) no son concluyentes. Este hecho podría estar originado en parte porque al comparar los resultados obtenidos en distintos trabajos experimentales se observa una disparidad en los resultados obtenidos. Una de las posibles causas que justificaría estas discrepancias podría ser la falta de homogeneidad en los aspectos metodológicos empleados. El tipo de animales y las dietas escogidas para llevar a cabo los diversos estudios que han sido revisados se caracterizan por su heterogeneidad condicionando los resultados que son comparados posteriormente.

5.3.1. Modelos animales

Para llevar a cabo la mayoría de los trabajos experimentales se han utilizado roedores como modelo animal de experimentación sin embargo, la especie seleccionada es distinta según el estudio al que se haga referencia. Algunos investigadores han optado por modelos animales como la rata Wistar (90, 115) o ratones C57B1/6J (92, 112) como los empleados en este trabajo. Estos tipos de animales presentan la ventaja de ser especies “más fisiológicas” ya que no han sido modificadas genéticamente para causar fenotipos obesos y su genética no interfiere, o al menos interfiere lo menos posible, en el modo en cómo se produce la acumulación de grasa en el organismo sin embargo hay que utilizar otras estrategias para inducirles sobrepeso (169).

Otros investigadores (75, 113) han optado por escoger animales genéticamente modificados para obtener aumento de peso con celeridad. Frecuentemente se utilizan ratones con sobre-expresión de la proteína *agouti* en el tejido adiposo (P2-*agouti*) (77, 91). Esta especie de roedor presenta una mutación genética dominante que causa la sobre-expresión ectópica de la proteína *agouti* (AGP) que es un antagonista endógeno de los receptores de melaocortina y por tanto compite con la α -MSH produciendo fenotipos de pelo amarillo, obesos, diabéticos y con mayor susceptibilidad a padecer tumores. La obesidad se produce como consecuencia de la competencia en el sistema nervioso central (núcleo Arquatus) a nivel del receptor MC4 del neuropéptido AGPR con las melanocortinas inhibiendo por tanto su acción anorexiantes y causando hiperfagia. Estas neuronas hipotalámicas co-expresan los neuropéptidos NPY y AGPR y su liberación causa un aumento del *feed-back* de la leptina ya que la señal orexigénica del NPY que es más potente resulta disminuida y la señal anorexigénica del AGPR que es más persistente aumentada (10). Se ha comprobado que cuando este tipo de roedores son alimentados con un pienso rico en grasa y sacarosa sufren un rápido aumento de peso más rápido, que el ocasionado cuando ratones de la cepa salvaje se somete a la misma dieta pese a que si los roedores son tratados con pienso estándar, no padecen obesidad (169).

Otros modelos animales genéticamente modificados y ampliamente empleados para realizar estudios sobre la obesidad son las especies de ratones *ob/ob* y *db/db* (10). Estas especies presentan un defecto cromosómico heredable en el cromosoma 6 o en el cromosoma 4 respectivamente que les hace padecer bien un déficit en niveles circulantes de leptina, bien resistencia a la misma y en consecuencia, padecen hiperfagia asociada a un aumento del peso corporal y los depósitos grasos marcada tanto por la hipertrofia como la hiperplasia del tejido adiposo. Además estos roedores poseen menor temperatura corporal puesto que presentan una disminución en la termogénesis adaptativa, diabetes y un menor consumo tisular de oxígeno. Otro aspecto a tener en cuenta es que esta mutación genética produce alteraciones en los canales iónicos de diversos tejidos (169).

La rata Zucker (*fa/fa*) también empleada con este objetivo (10) posee un alelo recesivo para el receptor de la leptina que le hace padecer hiperfagia, obesidad, con un marcado acumulo de grasa abdominal y subcutánea, hipertriglicerinemias, hipercolesterolemia, hepatomegalia, aumento de la LPL y de la concentración de ácidos grasos libres, disminución de la termogénesis post-prandial y diabetes que se manifiesta

con la resistencia a la insulina a nivel de la musculatura esquelético aunque no a nivel del tejido adiposo (169).

Si bien es verdad que la selección de estas especies de roedores para llevar a cabo ciertos trabajos sobre el estudio de la obesidad facilitan la obtención de sobrepeso con celeridad también es verdad que su base genética podría condicionar la distribución de la grasa corporal, determinados aspectos de la termogénesis adaptativa y cambios en el metabolismo energético glucídico o lipídico por tanto, determinadas diferencias encontradas en los resultados de algunos trabajos revisados podrían tener su origen en la elección de la especie animal utilizada. Otro factor a considerar es el sexo y la edad de los roedores escogidos en el diseño de los diversos estudios de investigación, ya que estos factores también pueden influir notablemente en los resultados. En general podría considerarse que las hembras son más susceptibles a padecer obesidad que los machos y que los animales viejos también son más susceptibles que los jóvenes (169).

5.3.2. Dietas

a. Macronutrientes

La composición de los macronutrientes de la dieta es un factor fundamental para el desarrollo del trabajo de experimentación puesto que define el poder calórico del tratamiento al que van a ser sometidos los animales. La influencia que tiene este factor sobre el peso corporal y el metabolismo animal está fuera de toda duda y lógicamente es un elemento determinante que condiciona fuertemente los resultados. Un buen número de trabajos (77, 112) utilizan piensos especiales, generalmente hipercalóricos, para provocar más rápidamente obesidad en la población animal y con este fin la composición estándar del pienso es modificada de diversos modos.

Una posible alternativa es aumentar la fracción lipídica de la dieta (92, 112) ya que es bien conocido que un aumento por encima del 30% del aporte calórico en forma de grasa hace que el animal se vuelva obeso. Sin embargo existe cierta susceptibilidad genética en las distintas especies experimentales de tal modo que la misma dieta, dependiendo de la carga genética del animal, induce distinto grado de obesidad y diferente forma de acumular la grasa corporal (169).

El tipo de lípidos que compongan la dieta también puede influir en la forma en que se produzca la variación de peso corporal. En general podría decirse que los ácidos grasos saturados producen una ganancia de peso mayor y una mejor eficacia energética que los ácidos grasos poliinsaturados, y que los piensos cuya fracción grasa está compuesta por triacilglicérolos en cuya estructura predominan los ácidos grasos de cadena larga ocasionan una ganancia de peso más rápida que los compuestos por triacilglicérolos en cuya estructura predominan los ácidos grasos de cadena media o corta (169).

Otra alternativa utilizada para aumentar el peso corporal de los animales sometidos a tratamiento es aumentar el contenido de hidratos de carbono, especialmente de sacarosa, en la dieta. Esta estrategia supone que el efecto conseguido sobre el peso y las reservas energéticas de los mamíferos es independiente del tipo de hidrato de carbono empleado para enriquecer el pienso (91), sin embargo la sacarosa es un glúcido ampliamente cuestionado ya que el consumo excesivo de este nutriente además de producir un rápido aumento de peso también puede causar retención de líquidos, hipertensión y la degradación de la función hepática debido a una disminución de la respiración mitocondrial (15, 29).

Otra posibilidad es la de aumentar tanto la fracción lipídica como la fracción glucídica del pienso (77) pero los efectos que producen este tipo de dietas sobre el peso corporal y el metabolismo animal aún no están del todo esclarecidos (169). Si bien es verdad que con este tipo de prácticas se provoca la ganancia de peso en los animales de experimentación rápidamente también hay que considerar, que estos piensos podrían ocasionar cambios en el metabolismo animal que no afectarían, o que afectarían de distinto modo a las diferentes especies de mamíferos. Estas diferencias podrían verse reflejadas finalmente en los resultados de los estudios.

b. Micronutrientes: Fracción mineral

La mayoría de los tratamientos a los que han sido sometidos los animales de experimentación (77, 90, 115) añaden al pienso una concentración de calcio extremadamente elevada con el objetivo de que los posibles efectos que pueda causar este mineral sobre los mamíferos se produzcan de forma clara y rápida por tanto, la dosis de mineral administrada es mucho más exacerbada que el consumo real de calcio en la población. Sin embargo cabe la posibilidad de que la ingesta de una dosis tan elevada de calcio pueda tener consecuencias a nivel de la absorción, metabolismo o eliminación de otros nutrientes, particularmente de otros minerales o incluso tener efectos tóxicos que el consumo habitual de calcio, por muy alto que sea, no causaría (168). Al comparar los resultados obtenidos en trabajos realizados con modelos animales de experimentación y los resultados obtenidos en trabajos llevados a cabo con seres humanos se debería tener en cuenta no sólo que la diferente especie elegida para llevar a cabo el estudio podría condicionar los resultados sino también que esta diferencia en la dosis consumida de calcio podría verse reflejada en ellos justificando en parte determinadas discrepancias.

Otra práctica habitual es enriquecer el pienso de los animales de experimentación con leche y productos lácteos con el objetivo de aumentar el contenido de calcio de la dieta (91, 92). Sin embargo, no siempre se tiene en cuenta que esta práctica también lleva asociada el enriquecimiento del pienso con un buen número de sustancias, especialmente péptidos con propiedades bioactivas que podrían interferir en el metabolismo animal y con una cantidad considerable de minerales que podría influir en la biodisponibilidad de otros componentes de la dieta (66). Parte de las discrepancias en los resultados obtenidos podrían estar justificados por el consumo de estos nutrientes que incluso tal vez podrían actuar sinérgicamente con el calcio potenciando sus efectos.

5.3.3. Otros factores

Aunque el diseño de los trabajos de investigación revisados e incluso el diseño de este mismo trabajo se ha efectuado con el objetivo de valorar como influye un tratamiento sobre el peso corporal y/o el almacenamiento de la energía en los mamíferos, debido a la propia complejidad de los procesos que pueden intervenir, existen factores que no se han tenido en cuenta y que podrían afectar a los resultados. La variación del peso corporal además de depender de la ingesta y las rutas metabólicas implicadas en la distribución de la energía también depende del trabajo físico realizado sin embargo la actividad que realizaban los animales durante el tratamiento en la mayoría de los casos no ha sido valorada. Aunque evaluar el ejercicio físico que realizan los animales es difícil debido a las propias limitaciones de las especies seleccionadas además de económicamente caro pues supone el empleo de jaulas metabólicas especiales, suponer que un tratamiento no influye, o influye igualmente en el grupo(s) sometido (s) a estudio del mismo modo que en al grupo control podría ser inexacto. Este factor que cuanto menos es tan importante como el resto de los factores considerados a menudo resulta omitido lo que podría suponer un sesgo que afectara a los resultados.

En este trabajo de experimentación no pudo ser valorada la actividad física de los ratones de forma objetiva pero durante el tiempo que los animales permanecieron en el animalario se observó aunque de forma subjetiva el ejercicio realizado. Si bien es verdad que los roedores del grupo sometido a tratamiento no parecían mostrar mayor actividad éstos, si parecían más excitables que los roedores del grupo control.

6. Conclusiones

El objetivo de este trabajo fue valorar los efectos que produce una dieta enriquecida con calcio sobre el desarrollo de obesidad inducida con un pienso hiperlipídico y sobre el metabolismo mineral en ratones macho de la cepa C57BL/6J. Los resultados obtenidos permiten concluir que:

1. La ingesta *ad libitum* de una dieta hiperlipídica enriquecida con calcio (12g/kg de pienso) se acompaña de una menor ganancia de peso corporal respecto a animales control alimentados con una dieta de la misma composición pero con una concentración de calcio estándar (4g/kg de pienso).

2.- La menor ganancia de peso que acompaña la suplementación de la dieta con calcio promueve una menor deposición de grasa que se refleja en un peso reducido de los depósitos de tejido adiposo blanco (epidídimal, inguinal, mesentérico y retroperitoneal) y también del marrón interescapular. La determinación de la composición del tejido adiposo epidídimal muestra que no se produce una alteración en la concentración de los lípidos totales o de triacilglicerol. En conjunto estos resultados indican que la suplementación con calcio se asocia a una menor masa adiposa sin alterarse su composición lipídica.

3.- No se observan alteraciones notables en el peso de otros órganos principales (corazón, hígado o riñón) y, de acuerdo con ello, la composición hepática se conserva inalterada (glucógeno, proteínas y lípidos totales) si bien disminuyó la concentración de triacilgliceroles que se asociaría a una menor lipogénesis hepática de acuerdo también con la menor acreción lipídica en tejido adiposo. Tampoco se halla alterada la concentración mineral total en el hígado (Ca, Mg y Zn) aunque se presenta una reducción en la concentración de magnesio ultrafiltrable hepático que podría indicar una reducción en los niveles intracelulares de calcio ultrafiltrable.

4.- Tampoco se observan alteraciones en el nivel de proteínas UCP-1 en el tejido adiposo marrón ni en el nivel de proteínas UCP-3 de la musculatura esquelética por lo que el aumento de la ingesta de calcio no parece causar un aumento del gasto energético estimulando la termogénesis adaptativa.

5.- Si bien no se detectan alteraciones en la ingesta energética, se observan ciertas adaptaciones a nivel del sistema gastrointestinal que implican una mayor masa estomacal y un alargamiento en la longitud del intestino delgado que potencialmente pueden sugerir un aumento de la capacidad absorptiva.

6.- Los animales suplementados con calcio presentan un aumento en la excreción mineral en orina y en heces. Estos resultados concuerdan con una mayor absorción mineral en los animales suplementados lo cual, junto con la preservación del contenido mineral en fémur (Ca, Mg y Zn), nos indica que no se halla comprometida la deposición mineral ósea en los animales suplementados.

En definitiva, la suplementación de una dieta con calcio procedente de la leche contribuye a contrarrestar el desarrollo de obesidad inducida por un pienso hiperlipídico en ratones y se acompaña de un aumento en la excreción mineral que, en todo caso, no compromete la deposición ósea y podría formar parte intrínseca del mecanismo de acción subyacente.

7. Bibliografía

1. Krause M. Nutrición y dietoterapia. Interamericana – McGraw – Hill 1992; 18:319-337.
2. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. Med Clin (Barc) 2000; 115: 587-597.
3. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation on obesity. Report series. Ginebra: World Health Organization, 2000.
4. Ogden CL, Yanovski SZ, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. Gastroenterology. 2007; 132(6):2087–102. Review.
5. Martínez JA, Kearney LM, Kafatos A, Paquet S, Martínez-González MA. Variables independently associated with self-reported obesity in the European Union. Public Health Nutr 1999; 2: 125-133.
6. Aranceta J, Pérez Rodrigo C, Serra majen Ll, Ribas Barba L, Quiles Izquierdo J, Vioque J, Turí Marí J, Mataix Verdú J, Llopis González J. y el grupo colaborativo para el Estudio de la Obesidad en España. Prevalencia de la obesidad en España: resultados del estudio SEEDO 2000. Med Clin (Barc) 2003;120(16):608-12.
7. Serra-Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, Pérez Rodrigo C, Saavedra Santana P, Peña Quintana L. Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del estudio enKid (1998-2000). Med Clin (Barc).2003;121:725-327.

8. Salas-Salvadó J, Rubio MA, Barbany M, Moreno B y Grupo Colaborativo de la SEEDO. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med Clin (Barc)* 2007; 128: 184-96.
9. JÉQUER E, TAPPY L. Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* 1999;79:451-480.
10. Borrajo E. Aspectos actuales de la obesidad. *An. Esp. Pediatr.* 2002; 56(4):1-11
11. Gianvencenzo B, Russo P. Dairy foods, dietary calcium and obesity: a short review of the evidence. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Di.* 2006; 16:445-51
12. Gómez García A, Hernández Salazar E, González Ortiz M, Martínez Abundis E. Effect of oral zinc administration on insulin sensitivity, leptin and androgens in obese males. *Rev. Med. Chile.* 2006; 134:279-284.
13. Milagro F, Marques-Lopes I. Nervous System and obesity. *ANALES. Sis San Navarra* 2002; 25(1):41-52.
14. Strader A.D, Woods S. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 2005; 128:175-191.
15. Marchal-Victorion S, Vionnet N, Escricut C et al. Genetic and functional analysis of cholecystokinin and cholecystokinin-2-receptor polymorphism in type 2 diabetes and obese patients. *Pharmacogenetics* 2002;12:23-30.
16. Moos AB, McLaughlin CL, Baile CA. Effects of CCK on gastrointestinal function in lean and obese Zucker rats. *Peptides* 1982; 3:619-22.
17. Guyton Ac. *Tratado de fisiología médica.* Interamericana- McGraw-Hill 1995; 79:907-23.
18. WEBBER J, MACDONALD IA. Signalling in body-weight homeostasis: neuroendocrine efferent signals. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 397-404.

19. HAVEL PJ. Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance. *Proc Nutr Soc* 2002; 59: 359-371.
20. Gómez R, Conde J. Gómez Reino, Lago F y Gualillo O. Adipocytokines: emerging mediators of the immune response and inflammation. *Reumatol Clin.* 2009;5(S1):6–12.
21. Moreno MJ, Martínez JA. Adipose tissue: a storage and secretory organ. *ANALES Sis San Navarra* 2002; 25 (1):29-39
22. Aguilar SC. Uncoupling proteins in the pathogenesis obesity. *Rev. Endocrinol. Nutr.* 2002; 10(3):165-170.
23. Voet D. 1990. Metabolismo lipídico. En Voet D. (ed). *Bioquímica. Omega*; 19:545-579.
24. Zaninovich AA. Role of uncoupling proteins UCP1, UCP2 and UCP3 in energy balance, type 2 diabetes and obesity. Synergism with the thyroid. *Medicina* 2005; 65(2):163-169.
25. Jezek P, Engstova H, Zackova M, et al. Fatty acid cycling mechanism and mitochondrial uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998; 1365:319-27.
26. Cheng G, Polito CC, Haines JK, et al. Decrease of intracellular ATP content downregulated UCP2 ex-pression in mouse hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 308: 573-80.
27. Vidal-Puig AJ, Grujic D, Zhang Chen Yu, et al. Energy metabolism in uncoupling protein-3 gene knockout mice. *J.Biol. Chem.* 2000;275:16258-66.
28. Lehninger A, Nelson DL, Cox M. Principles of Biochemistry. En Omega (ed), 1997; 15:500-577.
29. Rawn JD. 1995. Metabolismo lipídico. En Rawn JD (ed) *Bioquímica Interamericana – McGraw – Hill*; 16:421-455.
30. Florez J. 1997 Hormonas, metabolismo y vitaminas. En *Farmacología humana.* Florez J. (ed). Mason; 55:945-963.

31. Linder M.C. 1988 Nutrición y metabolismo de los elementos mayoritarios, en Linder MC. (ed) Nutrición: aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos ENUSA 1988; 6:169-187.
32. Garvey TW. Glucose Transport and NIDDM. Diabetes Care. 1992; 15(3):1367-1374.
33. Kern PA. High adipose tissue lipoprotein lipase activity plays a causal role in the aetiology of obesity. Progress in Obes Res 1996; 7:305-308.
34. Björntorp P. Liver triglycerides and metabolism. Int. J. Obes. 1995; 19:839-40.
35. Jelen P, Lutz S. Functional foods, Biochemical y Processing aspects. Lancaster, Basel: Technomic Publishing CO., Inc. 1998:357-380.
36. Young B, Hecht J.W. Wheater's Histología funcional: Texto y atlas en color. Ed Jims Barcelona 2000; 4: 127.
37. Vague J, Libbey M. Obesity. Solal (ed). 1991; 21:72-98.
38. Arner P. Receptors in human adipose tissue. Prog. Obes. Res. 7.ed A. Angel y col. J. Libbey. 1996.
39. Hauner H. Adipocytes as a source and target of hormones: recent developments in adipose tissue physiology. Int Mon on EP & WC. 1996.
40. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. Am J Physiol Endocrinol Metabol 2007; 293:E444-452.
41. Lowell BB, Spiegelman BM. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. Nature 2000; 404: 652-660.
42. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher K, Wilson JD, Martin B, Kasper DL, Hauser SL, Lango DL Principios de Medicina Interna MC.GrawHill-Interamericana (14 ed). 1998;1432 -44.
43. Picó C, Oliver P, Priego T, Sanchez J, Palau A. Alimentos funcionales y obesidad: estrategias, eficacia y seguridad. Rev Esp Obes 2006; 4:156-174.

44. Blundell JE, King N, Halford JCG. Appetite control system and functional foods, for the control of the energy intake. En Palau A, Bonnet ML, Serra F. ed. Study on "Obesity and Funcional Foods In Europe". Luxemburgo: European Commission, 2002: 302-316.
45. Ludwig DS. The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *JAMA*. 2002; 287(18):2414-2423.
46. Susan JF, Human nutrition and food reseach: opportunities and challenges in the post-genomic era. *Phil. Trans. R. Soc. B*. 2003; 358:1709-1727.
47. Horton HR, Moran LA, Ochs RS, Rawn J, Scrimgeour KG. "Bioquímica" Ed. Prentice Hall hispanoamericana SA, 1995.
48. Acheson KJ, Schutz Y, Bessard T, Anantharaman K, Flatt JP, Jequier E. Glycogen storage capacity and de novo lipogenesis during massive carbohydrate overfeeding in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 1988;48(2):240-247.
49. Roberts R, Bickerton AS, Fielding BA, Blaak EE, Wagnrmakers AJ, Chong MF, Gilbert M, Krape F, Frayn KN. Reduced oxidation of dietary fat after a short term high-carbohydrate diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87(4):824-31.
50. Bellisle F, Pérez C. Low-energy substitutes for sugars and fats in the human diet: impact of nutritional regulation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1994; 18:197-205
51. Sandrou Dk, Arvanitoyannis IS. Low fat/calorie foods: current state and perspectives. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 2000; 40:427-447.
52. Hack WL, Millward DJ, Rogers PJ, MorganLM. Physiological mechanisms mediating aspartame-induced satiety. *Physiol. Behav.* 2003; 78:557-562.
53. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr. Opin. Lipidol.* 2008; 19(1):16-24.

54. Swarbrick MM, Stanhope KL, Elliott SS, Graham JL, Krauss RM, Christiansen MP, Griffen SC, Keim NL, Havel PJ. Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women. *Br. J. Nutr.* 2008; 1-6.
55. Teeff KL, Elliott SS, Tschop M, Kieffer TJ, rader D, Heiman M, Townsend RR, Keim NL, D'Alessio D, Havel PJ. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(6):2963-2972.
56. Eldridge AL, Cooper DA, Peters JC. A role for olestra in body weight management. *Obes. Rev.* 2002; 3:17-25.
57. Sorensen LB, Cueto HT, Andersen MT, Bitz C, Holst JJ, Rehfeld JF, Astrup A. The effect of salatin, a low calorie modified tryacylglycerol, on appetite and energy intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87:1163-1169.
58. MacLean DB, Luo LG, Increased ATP content/production in the hypothalamus may be a signal for energy-sensing of satiety: studies of the anorectic mechanism of a plant steroidal glycoside. *Brain Res* 2004; 1020:1-11.
59. Sánchez J, Oliver P, Palau A, Pico C. The inhibition of gastric ghrelin production by food intake in rats is dependent on the type of macronutrient. *Endocrinology* 2004; 145:5049-5055.
60. Slavin JL, Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 2005; 56:368-377.
61. Rolls BJ, Bell EA, Dietary approaches to the treatment of obesity. *Med Clin North Am* 2000; 84:401-418.
62. Palau A, Bonet ML. Controlling thermogenesis and lipogenesis and the use of ergogenic acids for weight control. In: Henry CJK (ed.). *Novel food ingredients for weight control*. Woodhead publishing: Abington, 2007; 58-103.
63. Summers Lk, Fielding BA, Bradshaw HA, Ilic V, Beisen C, Clark MI, Moore NR, Frayn KN. Substituting dietary saturated fat with polyunsaturated fat changes abdominal fat distribution and improves insulin sensitivity. *Diabetologia* 2002; 45:369-377.

64. Wang YW, Jones PJ. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 941-955.
65. Yanai H, Tomono Y, Ito K, Furutani N, Yoshida H, Tada N. Diacylglycerol oil for the metabolic syndrome. *Nutr J* 2007; 6:43.
66. Horton B. Commercial utilization de minor milk components in the health and food industries. *J Dairy Sci* 1995;78:2584-2589.
67. Hernandez ER, Silva y VERDALET GUZMAN, Iñigo. Revisión: alimentos e ingredientes funcionales derivados de la leche. *ALAN*, dic. 2003, vol.53, no.4, p.333-347. ISSN 0004-0622.
68. Gaullier JM, Halse J, Hoye K, Kristiansen K, Fagertum H, Vik H, Gudmundsen O. Conjugated linoleic and supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. *Am J Clin Nutr* 2004;79:1118-25.
69. Baró L, Jiménez J, Martínez-Férez A, Bouzza JJ. Bioactive milk peptides and proteins. *Ars pharmaceutica* 2001; 42:135-145.
70. Bronner F, Pansu D.: Recent advances in nutritional science: Nutritional aspects of calcium absorption. *The journal of nutrition* vol 129 n° 1 1999; 9-12.
71. Hoenderop J, Nilius B, Bindels R. Calcium absorption across epithelia. *Physiol rev* 2005;85:373-422.
72. Pérez AV, Picotto G, carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa de talamoniNG. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption . *Digestion* 2008; 77:22-34.
73. Lucas A, Quintan P, Abrams S, Ryan S, Meah S, Lucas PJ. Randomised controlled trial of a syntetic triglyceride milk formula for preterm infants. *Arch. Dis. Child.* 1997; 77:178-184.
74. Buziano EF, Almeida RN, Mazeto GM. Bioavilability of dietary calcium. *Arq Bras Endocrinol. Metabol* 2006;50:852-861.
75. Anonymus. Optimal calcium intake. NIH Consensus Statement. Bethsada, MD: National Institute of Health, 1994.

76. McCarron DA. Calcium and magnesium nutritum in human hypertension. *Ann Intern Med* 1983;98:800-5.
77. Zemel MB, Shi H, Greer B, Diriezo D, Zemel PC, Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J* 2000;14:1132-8.
78. Davies KM, Heaney RP, Recker RR, et al. Calcium intake and body weight *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4635-8.
79. Barba G, Troiano E, Russo P, Venezia A, Siani A. Inverse association between body mass and frequency of milk consumption in children. *British Journal of Nutrition*. 2005; 93(1):15-19.
80. Loos R, et al. Calcium intake and body composition in the HERITAGE Family Study. *Obesity Research*. 2003; 11(S):597-P.
81. Snijder MB, Van Der Heijden AA, Van Dam RM, Stehouwer CD, Hiddink GJ, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Dekker JM. Is higher dairy consumption associated with lower body weight and fewer metabolic disturbances? TheHoorn Study. *Am J Clin Nutr* 2007; 85; 989-995.
82. Murakami K, OkuboH, Sasaki S. No relation between intakes of calcium and dairy products and body mass index in Japanese women aged 18 to 20 y. *Nutrition* 2006;22; 490-495.
83. Jensen LB, Kollerup G, QuaadeF, Sorensen OH. Bone minerals changes in obese women during a moderate weight loss whit and whitout calcium supplementation. *J Bone Miner Res* 2001;16:141-7.
84. Zemel MB, Thompson W, Zemel P, et al. Dietary calcium and dairy products accelerate weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Am J Clin Nutr*. 2002; 75 (suppl):342S.
85. Zemel, M B, Richards J, Mathis S, Milstead A, Gebhardt L and Silva E. Dairy augmentation of total and central fat loss in obese subjects *Int J Obes*; 2005 29(4): 391-7.

86. Lorenzen JK, Molgaard C, Michaelsen KF, Astrup A. Calcium supplementation for one year does not reduce body weight or fat mass in young girls. *Am Clin Nutr* 2006;83:18-23.
87. Moore LL, Singer MR, Bradlee ML, Gao DI, Hood M, Ellison RC. Low intakes of dairy products in early childhood may increase body fat acquisition. *Obesity Research*. 2003; 11(S): 130-OR.
88. Marques-Vidal P, Goncalves A, Dias CM. Milk intake is inversely related to obesity in men and in young women: data from the Portuguese Health Interview Survey 1998-1999. *International Journal of Obesity*. 2005.
89. Azadbakht L, Mirmirram P, Esmailzadeh A, azizi F. Dairy consumption is inversely associated with the prevalence of the metabolic syndrome in Tehranian adults. *Am. J. Clin.Nutr* 2005; 82:523-530.
90. Stern N, Lee DB, Silis V, et al. Effects of high calcium intake on blood pressure and calcium metabolism in young SHR. *Hypertension* 1984;6:639-46.
91. Shi H, Diriezo D, Zemel MB. Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice. *FASEB J* 2001;15:291-3
92. Pilvi TK, Korpela R, Huttunen M, Vapaatalo H, Mervvaala EM. High calcium diet with whey protein attenuates body weight gain in high fat fed C57B1/6J mice. *Br. J. Nutr.* 2007; 98:900-907.
93. Varena M, Binelli L, Casari S, Zucchi F, Sinigaglia L. Effects of dietary calcium intake on body weight and prevalence of osteoporosis in early postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 639-644.
94. Raipatankrajpathak SN, Rimm EB, Rosner B, Willett WC, Hu FB. Calcium and dairy intakes in relation to long-term weight gain in US men. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:559-566.
95. Rosellrosell M, Hakansson NN, Wolk A. Association between dairy food consumption and weight change over 9 y in 19,352 perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2006 , 84: 1481-1488.

96. Mirmiran P, et al. Dairy consumption and body mass index: An inverse relationship. *International Journal of Obesity*. 2005; 29:115-121.
97. Berkey CS, Helain RS, Willett WC, Colditz GA. Milk, dairy fat, dietary calcium, and weight gain: A longitudinal study of adolescents. *Archives of Adolescent and Pediatric Medicine*. 2005; 159:543-550.
98. Newby PK, et al. Dietary patterns and changes in body mass index and waist circumference in adults. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2003; 77:1417-1425.
99. Choquette S, et al. The effect of calcium intake on body weight, weight regain and insulin resistance. *Obesity Research*. 2004; 12(10): A170; 667-P.
100. Martin G, et al. Calcium intake is correlated with percent body fat and percent trunk fat, but not serum lipids, in the Newfoundland population. *Obesity Research*. 2004; 12(10): A217; 851-P.
101. Olivares S, Kain J, Lera L, Pizarro F, Vio F, Moro'n C. Nutritional status, food consumption and physical activity among Chilean school children: A descriptive study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2004. 58:1278-1285.
102. Drapeau G, et al. Modifications in food-group consumption are related to long-term body-weight changes. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004; 80: 29-37.
103. Pereira MA, Jacobs DR, Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS. Dairy consumption, obesity and the insulin resistance syndrome in young adults: the cardia study. *JAMA* 2002;287:2081-9.
104. Carrur BR, Skinner JD, The role of dietary calcium and other nutrients in moderating body fat in preschool children. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001;25:559-66.
105. Zemel MB, Richards J, Milstead A, Campbell P. Effects of calcium and dairy on body composition and weight loss in African-American adults. *Obesity Research*. 2005; 13(7):1218-1225.

106. Gunther CW, Legowski PA, Lyle RM, McCabe GP, Eagan MS, Peacock M, Teegarden D. Dairy products do not lead to alterations in body weight and fat mass in young women in a one year intervention. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2005. 81(4): 751-6.
107. Thompson WG, Holdman NR, Janzow DJ, Slezak JM, Morris KL, Zemel MB. Effect of energy-reduced diets high in dairy products and fiber on weight loss in obese adults. *Obesity Research*. 2005; 13:1344-1353.
108. Harvey-Berino J, et al. The impact of dairy product consumption on weight loss. *Obesity Research*. 2005;13:1720-1726.
109. Zemel MB, Thompson W, Milstead A, Morris K, Campbell P. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obesity Research*. 2004. 12(4): 582-590.
110. Lappe JM, Rafferty KA, Davies KM, Lypaczewski G. Girls on a high-calcium diet gain weight at the same rate as girls on a normal diet: A pilot study. *Journal of the American Dietetic Association*. 2004; 104:1361-1367.
111. Melanson EL, Sharp TA, Schneider J, Donahoo WT, Grunwald GK, Hill JO. Relation between calcium intake and fat oxidation in adult humans. *International Journal of Obesity*. 2003; 27: 196-203.
112. Parra P, Bruni G, Palou A, Serra F. Dietary calcium attenuation of body fat gain during high-fat feeding in mice. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 109-117.
113. Sun X, Zemel MB. Calcium and dairy products inhibit weight and fat during ad libitum consumption following energy restriction in Ap2-agouti transgenic mice. *J Nutr* 2004; 134(11):3054-60.
114. Serra F, et al. Dietary calcium helps to counteract obesity. Presented at the 13th European Congress on Obesity. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 2004; Supplement 1 (28):S146.
115. Metz JA, Karanja N, Torok J, McCarron DA. Modification of total body fat spontaneously hypertensive rats and wistar-kyoto rats by dietary calcium and sodium. *Am J Hypertens* 1988:1-58-60.

116. Yiquin S, Manson J.E, Boring J, Simin L. Dietary magnesium intake in relation to plasma insulin levels and risk of type 2 diabetes in wom Diabetes care 2004; 27(1):59-65.
117. Alfrey Ac, Miller NI, and Butkus D.: Evaluation of body magnesium stores. L Lab Clin Med 1974; 84:153-162.
118. Pedersen K.O.: Protein-bound calcium in human serum. Quantitative examination of binding and its variables by a molecular binding model and clinical chemical implications for measurement of ionized calcium. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1982; 30:321-329.
119. Rude RK, Oldham SB, Sharp CF, et al. Parathyroid hormone secretion in magnesium deficiency. J CLIn. End Metab. 1985;47:800-806.
120. Baehler RW, Work J, Kcychen TA, McMorrow G, Guthrie G. Studies of the pathogenesis os Bartter´s syndrome. Am J. Med;1980; 59:933-938
121. Ekmekcioglu E. Intestinal bioability of minerals and trace elements from milk and beerages in humans. Nahrung. 2000; 6(s): 390-397.
122. Stefanidou M., maraveliasC, Dona A, Spiliopoulus C Zinc: a multipurpose trace element. Arch Toxicol. 2006; 80:1-9
123. Yonekura L, Suzuki H. Effects of dietary zinc levels, phitic acid and resistant starch on zinc bioability in rats. Eur J Nutr 2005; 44: 384-391.
124. Gómez García A, Eduardo Hernández Salazar E, González Ortiz M, Martínez Abundis E. Effect of oral zinc administration on insulin sensitivity, leptin and androgens in obese males Rev Méd Chile 2006; 134: 279-284.
125. Christos S. Mantzoros, MD, Ananda S. Prasad, MD, MACN, Frances W.J. Beck, PhD, Susan Grabowski, PhD, Joseph Kaplan, MD, Connie Adair, RD and George J. Brewer, MD, FACN Zinc May Regulate Serum Leptin Concentrations in Humans Journal of the American College of Nutrition. 1998;(17) 3:270-275.

126. Lee S.L, Kwak E. H, Kim Y.A, Choi J. Y, Kwon S.T, Beattie J.H, Kwun I.S.
Leptin Gene Expression and Serum Leptin Levels in Zinc Deficiency:
Implications for Appetite Regulation in Rats *J. Med.* 2003, 6(4): 281-289.
127. Elizabeth S. Ott* and Neil F. Shay Zinc Deficiency Reduces Leptin Gene
Expression and Leptin Secretion in Rat Adipocytes *Experimental Biology and
Medicine* 2001; 226:841-846.
128. Bribiescas R.G, Effects of oral zinc supplementation on serum leptin levels in
Ache males of eastern Paraguay *Am. J. Hum. Biol.* 2003;15:681-687.
129. Arsenault J. E, Lopez de Romaña D, Penny M.E, Van Loan M.D, Brown K. H.
Additional Zinc delivered in a liquid supplement, but not in a fortified porridge,
increased fat-free mass accrual among young peruvian children with mild-to-
moderate stunting. *JJ. Nutr.* 2008; 138 (1):108-114.
130. Weisstaub G, Hertrampf E, López de Romaña D, Salazar G, Burgueño C,
Castillo duran C. Plasma Zinc concentration, composition corporal and physical
activity in obese preschool children. *J Nutr.* 2005; 135(3):646S-652.
131. BOE n° 81 del 30 de Abril 1997 Ley 5/1997 de 24 de abril de protección de los
animales
132. Kunst A, Draeger B, and Ziegenhorn J., *Methods of Enzymatic Analysis* H.U.
Bergmeyer, Ed1984;2:163-172.
133. Trinder P. *Ann Clin Biochem.* 1969; 6:24.
134. Morris A.J. Borges L. Martinez CE. Aspectos bioquímicos de la recuperación de
ratones malnutridos con hidrolizados proteicos. *Aliment nutr* 2002;16(1):5-12
135. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of
microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 1976; 72:248-254.
136. Gruyter W. *Clinical biochemistry principles and methods.* Lüderitz & Bauer
1978; 1019-1035.

137. Frings C.S, Fendley T.W, Dunn R.T, Queen C.A, Clinical Laboratory Biochemistry. Clin Chem. 1972;18:673
138. Allain C.C, Poon L.S, Chan C.S, Richmond W Clinical Chemistry. Clin Biochem 1974;12:226.
139. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry. Burtis CA and Ashwood ER 2nd Ed., W.B. Saunders Co., 1994.
140. Klotzsh, S.G. and McNamara R.J, Clinical laboratory Test. Clin Chem 1990;36:1605-13.
141. Perkin Elmer Corp. Analytical method for atomic absorption spectrophotometry. Perkin Elmer Corp. Norwalk C.T. 1971.
142. Association of Official Analytical Chemist. Official Methods of Analysis. Kenneth Helrich (ed). Virginia, 1994; 1(4):469-79.
143. AOAC. Oficial Methods of análisis . Association of official analytical chemists Washington D.C. 1980.
144. McCarron DA, Morris CD, Henry HJ, Stanton JL. Blood pressure and nutrient intake in the United States. Science 1984; **224**: 1392-1398.
145. Pittas AG, wson-Hughes B, Li T, van Dam RM, Willett WC, Manson JE, Hu FB. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. Diabetes Care 2006; **29**: 650–656.
146. Lorenzen JK, Nielsen S, Holst JJ, Tetens I, Rehfeld JF, Astrup A. Effect of dairy calcium or supplementary calcium intake on postprandial fat metabolism, appetite, and subsequent energy intake. Am J Clin Nutr 2007; **85**: 678–687.
147. Major G.C., Chaput J.P., Ledoux M., St-Pierre S., Anderson G.H., Zemel M.B., Tremblay A., Recent developments in calcium-related obesity research. Obesity reviews 2008; 9 428-445.
148. Papakonstantinou E, Flatt W.P., Huth P.J., Harris R.B., High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. Obes. Res. 2003; 11:387-394.

149. Jacobsen R., Lorenzen JK, Toubro S, Krong-Mikkelsen I, Astrup A. Effect of short-term high dietary calcium intake on 24h-energy expenditure, fat oxidation, and fecal fat excretion. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2005; 29: 292-301.
150. Shahkhalili Y, Murset C, Meirim I, Duruz E, Guinchard S, Cavadini C, Acheson K. Calcium supplementation of chocolate: effect on cocoa butter digestibility and blood lipids in humans. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 246–252.
151. Denke MA, Fox MM, Schulte MC, Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat content and reduces serum lipids in men. *J. Nutr.* 1993; 123:1047-105.
152. Park Y, Albright KJ, Storkson J, Cook ME, Pariza MW. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids.* 1997;32:853–858.
153. Welweg JW, Monkelbaan JF, Vriesw EG, MuskietFA, Cats A, Oremus ET, Boersma –van Ek W, van Rijsbergen H, Meer R, Mulder NH. Effects of supplemental dietary calcium on quantitative and qualitative fecal fat excretion in man. *Ann. Nutr. Metab.* 1994; 38:185-191.
154. Zemel MB. Symposium: Dairy product components and weight regulation. Mechanisms of dairy modulation of adiposity. *J. Nutr.* 2003; 133:252S-256S.
155. Parikh SJ, Yanovski JA. Calcium intake and adiposity. *Am J Clin Nutr* 2003;77:281-7.
156. Sun X, Zemel MB. Role of uncoupling protein 2 (UCP2) expression and 1 alpha, 25-hydroxyvitamin D3 in modulating adipocyte apoptosis. *FASEB. J.* 2004; 18(12):1430-2.
157. Schrauwen P, Hesselink M, Vaartjes I, Kornips E, Saris W, Giacobino J, Russell A. Effect of acute exercise on uncoupling protein 3 is a fat metabolism-mediated effect. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 282: E11-E17.
158. Zemel MB. Role of calcium and Dairy products in energy partitioning and weight management. *Am J Clin Nutr.* 2004; 79:907S-12S.

159. Cummings NK, James AP, Soares MJ. The acute effects of different sources of dietary calcium on postprandial energy metabolism. *Br J Nutr* 2006; **96**: 138–144.
160. Boon N, Hul GB, Viguerie N, Sicard A, Langin D, Saris WH. Effects of 3 diets with various calcium contents on 24-h energy expenditure, fat oxidation, and adipose tissue message RNA expression of lipid metabolism-related proteins. *Am J Clin Nutr* 2005; **82**: 1244–1252.
161. Anderson GH, Tecimer SN, Shah D, Zafar TA. Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men. *J Nutr* 2004; **134**: 3011–3015.
162. Luhovyy B, Akhavan T, Anderson GH. Whey proteins in the regulation of food intake and satiety, in press. *J Am Coll Nutr* 2007; **26**: 704S–712S.
163. Anderson GH, Moore SE. Dietary proteins in the regulation of food intake and body weight in humans. *J Nutr* 2004; **134**: 974S–979S.
164. Nilsson M, Holst JJ, Bjorck IM. Metabolic effects of amino acid mixtures and whey protein in healthy subjects: studies using glucose-equivalent drinks. *Am J Clin Nutr* 2007; **85**: 996–1004.
165. Seelig, M S. Consequences of magnesium deficiency on the enhancement of stress reactions; preventive and therapeutic implications (a review) *J Am Coll Nutr* 1994; **13**(5): 429-4.
166. Kelleher, S L and B Lonnerdal. Zinc transporters in the rat mammary gland respond to marginal zinc and vitamin A intakes during lactation. *J Nutr* 2002; **132**(11): 3280-5.
167. Whiting, S J, R Wood and K Kim. Calcium supplementation *J Am Acad Nurse Pract.* 1997; **9**(4): 187-92.
168. Perez Gallardo L, Gómez M, Parra P, Sánchez J, Palau A, Serra F. Effect of calcium-enriched high-fat diet on calcium, magnesium and zinc retention in mice. *Br. J. Nutr.* 2009; **101**, 1463-1446.

169. Soriguer Escofet F. La obesidad: monografías de la sociedad española de endocrinología. Ed Diez Santos 1994;8:119-149.

Anexo I: abreviaturas

A: Absorbancia	IEFS: Institute of European Food Studies
AA: Aminoácido	IG-F: Inmunoglobulina-F
Ác G: Ácido graso	IL-1: Interleucina-1
ACTH: Corticotropina	IL-6: Interleucina-6
ADP: Adenosin-difosfato	IMC: Índice de Masa Corporal
AGP : Proteína agouti	Kcal: Kilocaloría
AGRP: Neuropeptido agouti	LHS: Lipasa hormona sensible
AMPc: Adenosin-monofosfato ciclico	LPL: Lipoprotein-lipasa
ASP: Adipsina	Mg: Magnesio
ATP: Adenosin-trifosfato	mg: Miligramo
C: Concentración	MGL: mono-glicerol-lipasa
Ca: Calcio	Min: Minuto
CCAA: Comunidades Autónomas	MSH- α : Melanocortina- α
CCK: Colecistoquina	NADH: Nicotinamida-adenina-dinucleotido
CLA: Ácido linoleico conjugado	NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey
CO ₂ : Dióxido de carbono	NPY: Neuropeptido-Y
COA: Coenzima-A	NS: Diferencia no significativa
Col: Colaboradores	OMS: Organización Mundial de la Salud
CTE: Cadena de transporte de electrones	PG-2: Prostaglandina-2
ET: Error típico	PTH: Hormona paratiroidea
FAS: Ácido graso sintasa	PUFA: Ácidos grasos poli-insaturados
Fig: Figura	PYR: Piruvato
Fte: Fuente	ROS: Radicales super-oxido
g: Gramo	rpm: Revoluciones por minuto
Glc Glucosa	SEEDO: Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad
Glu: Glucogeno	STH: Hormona del crecimiento
GMPc: Guanosin-monofosfato ciclico	
H: horas	

T3: Triyodotironina

T4: Tetrayodotironina

TAB: Tejido adiposo blanco

TAP: Tejido adiposo pardo

TG: Trtiacilglicerido

TNF- α : Factor de necrosis tumoral- α

TSH: Hormona estimulante del tiroides

Zn: Zinc

Anexo II: Congresos y publicaciones

I World Congress of Public Health Nutrition and the
VII Congreso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
September, 28-30th, 2006. Barcelona (SPAIN)

EFECTO DE UNA DIETA RICA EN CALCIO SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL HÍGADO DE RATÓN.

¹Pérez Gallardo L, ¹Diez B, ¹Gómez M, ²Sánchez J, ²Palou A, ²Serra F
¹Universidad de Valladolid, ²Universidad de las Islas Baleares



Introducción

Existen evidencias científicas que demuestran que el calcio de la dieta promueve una menor ganancia de peso y masa grasa en ratones alimentados con una dieta hiperlipídica. El objetivo del presente trabajo ha sido analizar el papel de una dieta hiperlipídica (43% en calorías) enriquecida en calcio sobre la composición hepática, en particular en su contenido lipídico así como en micronutrientes, en ratones; y determinar si el efecto del calcio es dependiente de la edad de los animales.

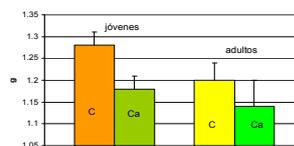


Fig 1. Peso de hígados de los grupos control (C) y calcio (Ca) de ratones jóvenes y adultos.

Metodología

Se han utilizado ratones macho (C57BL/6J), alimentados con una dieta rica en grasa (43% de la energía total) a partir de las 5 semanas de edad (grupo A) o de los 2 meses de edad (grupo B). Animales de ambos grupos de edad fueron alimentados con una dieta con un contenido en calcio estándar (4g/kg) (grupo Control) o enriquecida con calcio (12 g/kg) (grupo Calcio). El tratamiento dietario fue seguido durante 60 días por el grupo A y durante 50 días por el grupo B.

Al finalizar el tratamiento, los animales fueron decapitados, la sangre drenada y el hígado extraído, pesado y congelado a -80°C para las determinaciones posteriores. Mediante ensayos específicos se determinaron los niveles de: glucógeno (Gg), triacilglicéridos (Tg), lípidos totales (LT), proteínas (P) y colesterol (C). Por espectrofotometría de absorción atómica se determinaron las concentraciones de: Ca, Mg, Mg ultrafiltrable (MgU) y Zn. A efectos de comparar ambos grupos de edad, los resultados de los grupos alimentados con dieta enriquecida con calcio se presentan como % de sus respectivos controles. Se ha realizado el análisis estadístico mediante una t de Student siendo * $p < 0.05$.

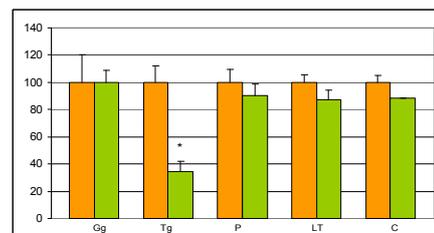


Fig 2: Concentración de glucógeno (Gg), Triacilglicéridos (Tg), Proteínas (P), Lípidos totales (LT) y colesterol los animales jóvenes alimentados con la dieta rica en calcio (■) en relación a los animales control (100%) (□).

Resultados

Los ratones de ambos grupos (A y B) alimentados con la dieta hiperlipídica rica en calcio aumentaron menos de peso corporal que sus correspondientes controles. En concreto, un 10,3 % ($p < 0.05$) menos el grupo A, en fase de crecimiento y un 13 % ($p < 0.01$) menos los del grupo B, en edad adulta. Que va en paralelo al menor peso hepático en el grupo Calcio de ambos grupos de edad, si bien no llegan a ser estadísticamente significativos (Fig 1).

El análisis de los macronutrientes mostró que no había diferencias significativas en el contenido de Gg, LT, P o C por g de hígado, entre los subgrupos control y calcio de ambos grupos. Sin embargo, el contenido de Tg/g de tejido disminuyó en un 34,5% en el grupo A (joven) y en un 47,5 % en el grupo B (adulto), respecto a sus respectivos subgrupos control (Fig 2 y 3).

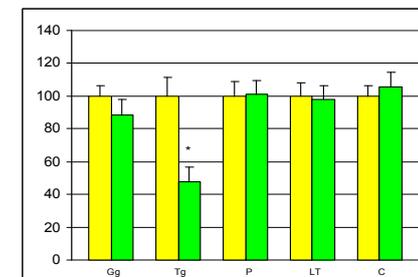


Fig 3: Concentración de glucógeno (Gg), Triacilglicéridos (Tg), Proteínas (P), Lípidos totales (LT) y colesterol de los animales adultos alimentados con la dieta rica en calcio (■) en relación a los animales control (100%) (□).

Los resultados obtenidos no reflejan diferencias significativas en el contenido de Ca, Mg o Zn por g de hígado entre los animales calcio y control de ambos grupos de edad (A o B). Es destacable que el Mg fisiológicamente activo (MgU) aumentó en los animales del grupo Calcio de ambos grupos de edad (A y B) respecto de sus correspondientes controles. El grupo A, en fase crecimiento presentó unos valores del 209% de sus controles y el grupo adulto del 137%, alcanzando significación estadística en el grupo joven (Fig 4A y 4B).

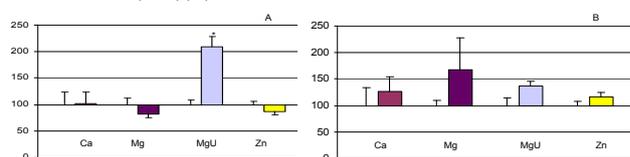


Fig 4: Concentración de minerales en hígado de los animales del subgrupo calcio (relativa a los animales control, 100%) en ratones jóvenes (A) y adultos (B).

Conclusiones

Una dieta hiperlipídica enriquecida con Ca puede producir efectos beneficiosos no solo en cuánto a facilitar un menor acúmulo de grasa corporal sino también a nivel de composición hepática, ya que parece contribuir a:

1. Disminuir el contenido hepático de triacilglicéridos
2. Mantener un buen estado de Mg fisiológicamente activo

XXXVI International Congress of Physiological Sciences
 Function of Life: Elements and Integration
 July 27-August 1, 2009. Kyoto (Japan)

P4PM-6-2

EFFECT OF CALCIUM-ENRICHED HIGH-FAT DIET ON CALCIUM, MAGNESIUM AND ZINC RETENTION IN MICE.

Lucía Pérez-Gallardo¹, María Gómez¹, Pilar Parra², Juana Sánchez², Andreu Palou² and Francisca Serra²
¹Department of Biochemistry, Molecular Biology and Physiology, University of Valencia, Campus de Burjassot, Sra 46104, Spain
²Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), University of the Balearic Islands, Ctra. de Valldemorsa km 7.6, Palma de Mallorca 07122, Spain



Introduction

Observational and epidemiological data have shown that a low-Ca diet may be a risk factor for obesity development, and several key aspects of milk components in relation to osteoporosis are gaining strength, even though intervention trials have yielded inconclusive results to date. Moreover, it has been suggested to biochemically modulate cardiovascular factors. However, there are few data available concerning dietary mineral retention. The aim of the present work was to assess the effects of a high-fat diet enriched in Ca on body fat and mineral bone retention, particularly on Ca, Mg and Zn, as well as to assess the potential involvement of adipose thermogenesis mechanism in mice.

Experimental methods

Twelve male mice (C57BL/6J) (Charles River, Spain) weighing approximately 21 g were housed in groups of three and kept in a single metabolic cage throughout the experiment under control conditions. Mice were fed ad libitum a high-fat (43%) diet with a Ca content of 4 g/kg from calcium carbonate (control group) or 12 g/kg (43% from milk powder and the rest from calcium carbonate) (Ca group) for 56 d. Body weight, food intake and urine were periodically collected. Urine samples were collected when the mice were voided and the composition was determined.

Adipose tissue samples and a portion of urine were measured after appropriate dilution by flame atomic absorption spectrometry. Liver glycogen was extracted and the released glucose was determined by enzymatic assay. Lipids were extracted and TAG and cholesterol content was determined using commercial kits from Biolab (Spain). Liver protein content was determined from homogenized samples in PBS. Expression of uncoupling proteins was determined by Western Blotting. Mineral content was measured by flame atomic absorption spectrometry.

The effect of Ca treatment on body weight was assessed by ANOVA followed by post hoc analysis. Comparison between control and Ca-enriched diet for the rest of the variables was assessed by Student's t-test. The analysis was performed using the SPSS program for Windows version 14 (SPSS, Chicago, IL, USA). Urine mineral data from control and Ca-enriched diet were analyzed on each day of treatment and differences were observed throughout the period, and therefore data are presented as the average of 4 samples collected. The level of significance was set at P<0.05. Data are presented as means with their standard errors.

Results

Body weights were significantly different between groups from week 5 onwards (P<0.01) and, by the end of the study, Ca-fed animals weighed less than controls (28.3 vs 31.1 g). During the treatment, the control group gained 7.61 (SEM 0.75) g, whereas animals fed the high-Ca diet gained 4.41 (SEM 0.21) g (P<0.001).

Adipose tissue weights were significantly smaller in mice fed the high-Ca diet than in controls, since tails was the least affected (50%) and the retroperitoneal the highest (88%) compared with controls (Fig 2).

Uter weight was not affected by dietary treatment and the same was seen for glycogen, protein, cholesterol and cholesterol concentrations in liver. However, TAG levels were reduced by 50% in the Ca group (Fig 3).

UCP-1 levels in BAT were not different between control and Ca-fed animals (100 (SEM 11.2) % in control group vs 110 (SEM 15.4) % in Ca group). The same pattern was seen in muscle UCP-1 levels (100 (SEM 10.5) % in control vs 110 (SEM 11.7) % in Ca group).

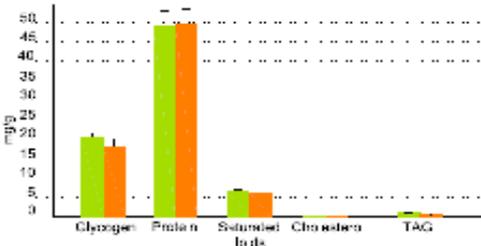


Fig. 3. Liver composition in mice fed either the control or the high-calcium diet for 56 d (Mean values with their standard errors) * p<0.05

Conclusion

In conclusion, the present results support a lower body weight gain and lower body fat accretion in adult mice fed a high fat diet enriched with dietary Ca with respect to those fed with standard Ca levels. This could not be attributed to a lower gross energy intake or to a reduced rate of thermogenesis in BAT or muscle.

Although a gain point of mineral loss was found in Ca-fed animals, the presence of dietary Ca was accompanied by preservation of mineral deposits in bone. Further characterization of cellular metabolism of these minerals would be necessary to define their composition and their role in determining fat accretion. Nevertheless, the present data support the fact that adding more Ca to the diet, using a combination of milk powder containing among other things higher Zn and Mg, can cause to combined clearly and improve both mineral and high-fat diet intake.

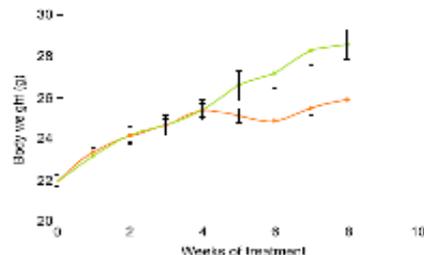


Fig. 1. Body weight evolution of animals fed either the control (W) or the high-calcium (X) diet for 56 d. Values are means with their standard errors depicted by vertical bars (gls in male for each group). Body weights were significantly different from week 5 onwards (P<0.017), determined by repeated measures ANOVA.

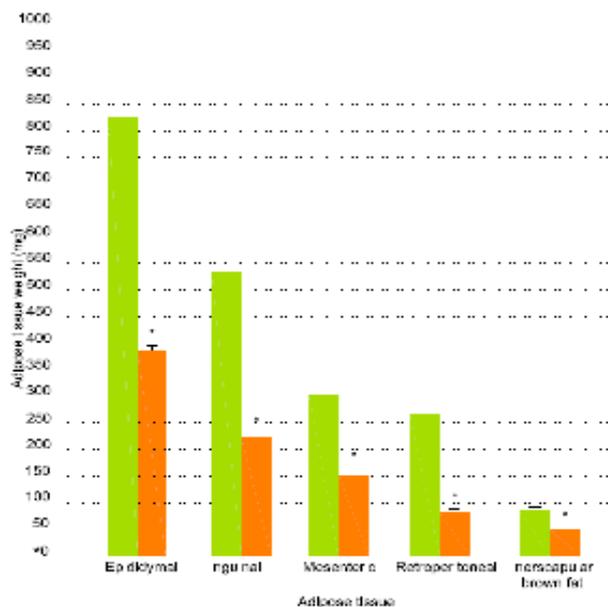


Fig 2. Fat depot weights in mice fed either the control or the high-calcium diet for 56 d (Mean values with their standard errors) * p<0.05

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Government [AGL2004-07408 and AGL2006-04067] and European Commission (European Nanigenome of Deposition), MDS01-05-002007. Anaïs García Pérez contributed to poster design.

Effect of calcium-enriched high-fat diet on calcium, magnesium and zinc retention in mice

Lucía Pérez-Gallardo^{1*}, Marta Gómez¹, Pilar Parra², Juana Sánchez², Andreu Palou² and Francisca Serra²

¹Department of Biochemistry, Molecular Biology and Physiology, University of Valladolid, Campus de Soria, Soria 42004, Spain

²Laboratory of Molecular Biology, Nutrition and Biotechnology, CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), University of the Balearic Islands, Cra. de Valldemossa km 7.5, Palma de Mallorca 07122, Spain

(Received 6 May 2008 / Revised 14 August 2008 / Accepted 2 September 2008 / First published online 6 November 2008)

The aim of this work was to assess the effects of a high-fat diet enriched in Ca, which accompanies lower body fat deposition, on mineral depots, as well as to assess the potential role of adaptive thermogenesis in mice. Male mice were fed *ad libitum* a high-fat (43%) diet with a Ca content of 4 g/kg from calcium carbonate (control group) or 12 g/kg (42% from milk powder and the rest from calcium carbonate) (Ca group) for 56 d. Body weight, food intake and urine were periodically collected. Tissue samples were collected when the mice were killed and the composition was determined. Expression of uncoupling proteins was determined by Western blotting. Mineral content was measured by flame atomic absorption spectrometry. Lower body weight gain and fat accretion was found in the Ca group. This could not be attributable to lower gross energy intake or to activation of adaptive thermogenesis. Although significant urine mineral loss was found in the Ca group, preservation of mineral depots in bone was observed. Our data support the fact that adding more Ca to the diet, using a combination of calcium carbonate plus milk powder containing among other things higher Zn and Mg, contributes to counteracting obesity and improving lipid metabolism.

Dietary calcium: Zinc: Magnesium: Obesity

Observational and epidemiological data have shown that a low-Ca diet may be a risk factor for obesity development, and beneficial aspects of milk components on metabolic syndrome are gaining strength^(1,2), even though intervention trials have yielded inconsistent results to date⁽³⁾.

The molecular mechanisms responsible for the impact of dairy products on body weight and fat have been studied in animal models with important contributions from the group of Zemel⁽⁴⁾. Using a transgenic animal model (over-expressing agouti protein under the control of the *aP2* promoter), Zemel and co-workers showed that dietary Ca could influence fat deposition by direct modulation on adipocyte metabolism, increasing thermogenesis and lipolysis and decreasing lipogenesis following a high-Ca diet^(5,6). However, in normal mice, activation of thermogenesis does not seem to be responsible for the lower rate of weight gain seen with a high-fat diet enriched with dairy Ca⁽⁷⁾.

Minerals have been suggested to beneficially modulate cardiovascular risk factors^(8,9). However, there are few data available concerning dietary mineral interactions. The aim of the present work was to assess the effects of a high-fat diet enriched in Ca on body fat and mineral bone retention, particularly on Ca, Mg and Zn, as well as to assess

the potential involvement of adaptive thermogenic mechanisms in mice.

Experimental methods

Animals and diets

Twelve male mice (C57BL/6J) (Charles River, Spain) weighing approximately 21 g were housed in groups of three and kept in a single metabolic cage throughout the experiment under controlled conditions. After a 1-week adaptation, mice received *ad libitum* either a control diet or a high-Ca diet (Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA) for 56 d. Both diets provided the same digestible energy content (19 kJ/g), 20% kJ as protein (casein) and 43% kJ as fat (lard and soyabean oil). In addition, the high-Ca diet supplied 1.2% (w/w) in Ca (from calcium carbonate and milk powder), three times higher than control group (0.4% w/w, exclusively from calcium carbonate). High-Ca diet was aimed to supply 42% Ca from non-fat dry milk which also provided higher levels of Mg (1.09 g/kg) and Zn (0.05 g/kg) than the control diet (Mg, 0.57 g/kg; Zn, 0.03 g/kg). Food and water intake and body weight were recorded weekly.

Abbreviations: BAT, brown adipose tissue; UCP, uncoupling protein.

* Corresponding author: Dr Lucía Pérez Gallardo, fax +34 975 129401, email llpegall@bio.uva.es

All experimental procedures were performed according to the national and institutional guidelines for animal care and use at the university.

Sampling

Urine was collected twice a week from each cage, and measured and stored at -20°C for posterior analysis. Animals were killed by decapitation at the end of the experiment; tissues were dissected, weighed, rinsed with saline containing 0.1% diethyl pyrocarbonate (Sigma, Madrid, Spain), frozen with nitrogen liquid and stored at -70°C until analysis.

Analytical procedures

Ashed femur samples and aliquots of urine were measured after appropriate dilution by flame atomic absorption spectrometry (Perkin-Elmer 272). Liver glycogen was extracted⁽¹⁰⁾ and the released glucose was determined by enzymatic assay⁽¹¹⁾. Lipids were extracted⁽¹²⁾ and TAG and cholesterol content were determined using commercial kits from Biotécnica 2000. Liver protein content was determined from homogenised samples in PBS⁽¹³⁾.

Muscle and brown adipose tissue (BAT) proteins were extracted using Tripure reagent (Roche, Barcelona, Spain). Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid assay (Pierce) using a bovine serum albumin standard. Uncoupling protein 1 (UCP-1) in BAT and UCP-3 in muscle were determined by Western blotting⁽⁷⁾. β -Actin was determined in representative gels to confirm equal protein load charge between samples. The immunocomplexes were revealed using an enhanced chemiluminescence detection system (ECLTM; Amersham Biosciences, Barcelona, Spain) and visualised by exposure to sensitive films (HyperfilmTM ECL; Amersham Biosciences). The films were scanned in a ChemiGenius (SynGene) using the software GeneSnap version 6.03, and the bands were quantified using GeneTools version 3.04 (SynGene).

Statistical analysis

The effect of Ca treatment on body weight was assessed by ANOVA followed by *post hoc* analysis. Comparison between control and Ca animals for the rest of the variables was assessed by Student's *t* test. The analysis was performed using the SPSS program for Windows version 14 (SPSS, Chicago, IL, USA). Urine mineral data from control and Ca animals were analysed on each day of treatment; no differences were observed throughout the period, and therefore data are presented as the average of all samples collected. The level of significance was set at $P < 0.05$. Data are presented as means with their standard errors.

Results

Food consumption did not differ between groups during the period studied 52.3 (SEM 1.7) kJ/d in the control group and 53.1 (SEM 2.1) kJ/d in the Ca group. The amount of food eaten implies an intake of 10.8 (SEM 0.3) mg Ca/d, 1.5 (SEM 0.04) mg Mg/d and 0.08 (SEM 0.002) mg Zn/d in the control group and 46.8 (SEM 1.2) mg Ca/d, 4.2 (SEM 0.1) mg

Mg/d and 0.2 (SEM 0.05) mg Zn/d in the Ca group. No difference in water consumption was seen between groups 4.27 (SEM 0.08) ml/d in controls and 4.42 (SEM 0.05) ml/d in the Ca group.

Body weights were significantly different between groups from week 6 onwards ($P = 0.017$) and, by the end of the study, Ca-fed animals weighed less than control mice (Fig. 1). During the treatment, the control group gained 7.61 (SEM 0.7) g, whereas animals fed the high-Ca diet gained 4.41 (SEM 0.2) g ($P = 0.003$).

Adipose tissue weights were significantly smaller in mice fed the high-Ca diet than in controls, mesenteric was the least affected (50%) and the retroperitoneal the highest (69%) compared with controls. BAT was also 40% lower in the Ca group than in the control group (Table 1). Saturated lipid concentration and TAG were determined in epididymal adipose tissue and were not different between the control and Ca group (data not shown).

Liver weight was not affected by dietary treatment and the same was seen for glycogen, proteins, saturated lipid and cholesterol concentrations in liver. However, TAG levels were reduced by half in the Ca group.

UCP-1 levels in BAT were not different between control and Ca-fed animals (100 (SEM 11.2) % in control group; 110 (SEM 15.4) % in Ca group). The same pattern was seen in muscle UCP-3 levels (100 (SEM 10.5) % in control; 89.1 (SEM 11.7) % in Ca group).

No significant differences were observed with respect to the volume of urine eliminated daily (control 0.77 (SEM 0.05) v. Ca 0.89 (SEM 0.07) ml/d, $P = 0.19$). However, Ca (control 5.18 (SEM 1.0) v. Ca 603 (SEM 79) $\mu\text{g/d}$, $P = 2.3 \times 10^{-5}$), Mg (control 0.50 (SEM 0.1) v. Ca 494 (SEM 70) $\mu\text{g/d}$, $P = 5.3 \times 10^{-6}$) and Zn (control 21.5 (SEM 1.7) v. Ca 89.2 (SEM 6.0) $\mu\text{g/d}$, $P = 3.6 \times 10^{-5}$) urine excretion were significantly higher in the Ca group than in controls. To assess mineral deposition, femur composition was analysed and no statistically significant effects either on femur weight or on Ca, Mg or Zn content at the end of treatment were found (data not shown).

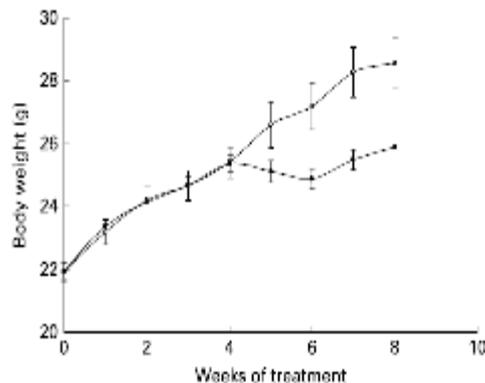


Fig. 1. Body weight evolution of animals fed either the control (○) or the high-calcium (●) diet for 8 weeks. Values are means with their standard errors depicted by vertical bars (six animals for each group). Body weights were significantly different from week 8 onwards ($P = 0.017$), determined by repeated-measures ANOVA.

Table 1. Fat depot weights and liver weight and composition in mice fed either the control or the high-calcium diet for 56 d*
(Mean values with their standard errors)

	Control diet (n 8)		Calcium diet (n 6)		P†
	Mean	SEM	Mean	SEM	
Adipose tissue weight (mg)					
Epididymal	826	130	381	9.7	0.009
Inguinal	533	55	222	9.3	0.002
Mesenteric	302	42	151	15	0.015
Retroperitoneal	287	33	81	6.9	0.002
Interscapular brown fat	85	8.5	51	2.4	0.001
Liver weight (g)	1.15	0.07	1.19	0.02	0.86
Glycogen (mg/g)	20.3	1.3	18.0	1.9	0.33
Protein (mg/g)	49.0	4.1	49.5	3.0	0.93
Saturated lipids (mg/g)	6.36	0.5	6.20	0.5	0.85
Cholesterol (μ g/g)	175	12	180	15	0.77
TAG (μ g/g)	995	11	473	91	0.006

*For details of procedures and diets, see Experimental methods.

†Statistically significant differences between groups were determined by Student's *t* test.

Discussion

The aim of the present work was to assess the effects of high-fat diet enriched in Ca, which has been previously associated with a lower body fat deposition, on Ca, Mg and Zn bone retention, as well as on thermogenic capacity in normal mice.

In accordance with previous results⁽⁷⁾, a reduction in body weight gain (by 12.7%) was observed following the treatment with a high-Ca diet, which was also accompanied by lower fat deposition affecting all the adipose depots. In addition, hepatic lipid profile was not altered in the Ca group and the lower TAG content, associated with diminished hepatic lipogenesis, was in accordance with the lower fat accretion seen in adipose tissues.

No differences in food intake and in the expression of UCP-1 in BAT or in muscle UCP-3 were found, indicating that lower fat accretion in high-Ca-fed animals was not accompanied by lower energy intake either by activation of BAT or muscle thermogenesis, in accordance with results previously found in normal animals^(7,14) but not in a largely characterised transgenic model⁽¹⁵⁾.

Urine mineral excretion (Ca, Mg and Zn) was increased in the Ca group and, to a certain extent, this could contribute to compromised mineral bioavailability. For example, high Ca to Mg dietary ratio has been proposed to pose a risk for Mg deficiency⁽¹⁶⁾ although, in practice, high-Ca diets have not been demonstrated to affect Mg retention in the long term⁽¹⁷⁾. Furthermore, Ca, especially in the presence of phytate, may have an inhibitory effect on Zn absorption⁽¹⁸⁾ and a reduction in tibia Zn content has been reported in rats fed on high-Ca diet⁽¹⁹⁾, interestingly this does not seem to happen in the present experimental conditions. The preservation of Ca, Mg and Zn content in femur, despite the higher urine excretion, supports the fact that body levels of these minerals are not compromised in the Ca group, at least during the period studied.

In conclusion, the present results support a lower body weight gain and lower body fat accretion in adult mice fed a high-fat diet enriched with dairy Ca with respect to those fed with standard Ca levels. This could not be attributable to

a lower gross energy intake or to activation of thermogenesis in BAT or muscle. Although significant urine mineral loss was found in Ca-fed animals, the presence of dairy Ca was accompanied by preservation of mineral depots in bone. Further characterisation of cellular metabolism of these minerals would be necessary to attain total comprehension of their role in diminishing fat accretion. Nevertheless, the present data support the fact that adding more Ca to the diet, using a combination of milk powder containing among other things higher Zn and Mg, contributes to counteract obesity and improves lipid metabolism in high-fat-fed mice.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Government (AGL2004-07496 and AGL2006-04887) and European Commission (European Nutrigenomics Organisation, NUGO-FP6-506360). CIBER de 'Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición' is an initiative of ISCIII. P. P. is a recipient of a fellowship from the Spanish Government. M. G. took care of animal handling, sample collections and analytical determinations. J. S. contributed to animal dissection and tissue sample collection. P. P. performed protein extraction and Western determinations. A. P., F. S. and L. P.-G. equally contributed to the conception and design of the study, interpretation of data and drafting of the manuscript. The authors declare no conflict of interest.

References

- Barba G & Russo P (2006) Dairy foods, dietary calcium and obesity: a short review of the evidence. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16, 445–451.
- Pfeuffer M & Schrezenmeier J (2007) Milk and the metabolic syndrome. *Obes Rev* 8, 109–118.
- Majur GC, Chapur JP & Ledoux M, et al. (2008) Recent developments in calcium-related obesity research. *Obes Rev* 9, 428–445.
- Zemel MB (2005) Calcium and dairy modulation of obesity risk. *Obes Rev* 13, 192–193.
- Zemel MB, Shi H, Greer B, et al. (2000) Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J* 14, 1132–1138.
- Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, et al. (2001) Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB J* 15, 2527–2529.
- Parra P, Bruni G, Palou A, et al. (2008) Dietary calcium attenuation of body fat gain during high-fat feeding in mice. *J Nutr Biochem* 19, 109–117.
- Scholz-Ahrens KE & Schrezenmeier J (2000) Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides. *Br J Nutr* 884, Suppl. 1, S147–S153.
- Vaskonen T (2003) Dietary minerals and modification of cardiovascular risk factors. *J Nutr Biochem* 14, 492–506.
- Carroll NV, Tongley RW & Roe JH (1956) The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J Biol Chem* 220, 583–593.
- Trinder P (1969) Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Pathol* 22, 158–161.
- Folch J, Lees M & Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497–509.

13. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
14. Papakonstantinou E, Flatt WP, Huth PJ, *et al.* (2003) High dietary calcium reduces body fat content, digestibility of fat, and serum vitamin D in rats. *Obes Res* 11, 387–394.
15. Sun X & Zemel MB (2003) Effects of mitochondrial uncoupling on adipocyte intracellular Ca^{2+} and lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 14, 219–226.
16. Seelig MS (1994) Consequences of magnesium deficiency on the enhancement of stress reactions; preventive and therapeutic implications (a review). *J Am Coll Nutr* 13, 429–446.
17. Whiting SJ & Wood RJ (1997) Adverse effects of high-calcium diets in humans. *Nutr Rev* 55, 1–9.
18. Lommerdal B (2000) Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr* 130, 1378S–1383S.
19. Forbes RM (1960) Nutritional interactions of zinc and calcium. *Fed Proc* 19, 643–647.