

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en
Ciencias Biológicas

INTERACCIONES BIOQUÍMICO-NUTRICIONALES DEL $c9,t11$ -CLA Y DE LA MEZCLA $c9,t11$ -CLA + $t10,c12$ -CLA CON ACEITES RICOS EN ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS DE LAS SERIES n-3, n-6, y n-9 EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Bioquímica María Victoria Scalerandi

Director de Tesis: Dr. Claudio A. Bernal

Co-director de Tesis: Dra. Marcela A. González

Cátedra de Bromatología y Nutrición – Departamento de Ciencias Biológicas – FBCB – UNL

-2013-

*A Dios,
por brindarme el privilegio de
poder estudiar, y acompañarme
con su luz y fortaleza a lo largo
de este camino.*

*A mamá y papá,
por estar siempre a mi lado
brindándome todo su apoyo
y comprensión.*

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis, fue llevada a cabo en la Cátedra de Bromatología y Nutrición de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina, bajo la dirección de Dr. Claudio A. Bernal y la co-dirección de la Dra. Marcela A. González.

Quiero agradecer de manera especial a todos los que han colaborado en la realización de este trabajo de tesis:

En primer lugar, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por brindarme el espacio para formarme como profesional y como persona, y por darme además, la oportunidad de formar parte de ella como estudiante, investigadora y docente, durante los últimos doce años.

Al CONICET, por haberme otorgado la beca interna de posgrado que me permitió llevar a cabo el Doctorado, e iniciarme en la carrera científica.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica, Tecnológica y de Innovación (ANPCyT), que a través de su subsidio PICTO N° 36181 (2005) colaboraron para la realización de esta tesis.

Al programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CYTED), red temática 208RT0343 “Ácidos grasos isoméricos trans y CLA: intervención interdisciplinaria tendientes a reducir el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles”, por el particular enriquecimiento científico y humano que brindó cada uno de sus miembros.

Al proyecto FITS Agro Alimentos Funcionales # 001/2010 “Producción de lácteos de bajo riesgo para enfermedades crónicas no transmisibles y alto CLA natural”, por el apoyo económico y por la posibilidad de profundizar la temática en la cual se enmarca esta tesis.

A la empresa Lipid Nutrition B.V., por la gentil donación de las mezclas de CLA utilizadas en este trabajo.

A mi director, Claudio Bernal, por permitirme formar parte de su grupo desde que era estudiante de grado, y por conducirme y formarme día a día en este difícil y maravilloso camino de la ciencia. Además, quiero agradecer especialmente a él y a su familia por abrirme las puertas de su hogar, y por la ayuda incondicional que siempre me han brindado.

A mi co-directora, Marcela González, a quien agradezco por todo el apoyo que me brindó durante el trabajo de tesis, pero, especialmente, por ser como una mamá aquí en Santa Fe, por haberme escuchado, aconsejado y sobre todo, por haber estado siempre presente cuando necesite un abrazo o unas palabras de aliento.

A Juli y Ani, mis compañeras de box, mis amigas, mis confidentes, mis compinches, gracias por hacer que cada día tenga un chispa de alegría y por toda la ayuda que me brindaron para poder llegar hasta aquí. A Juli, por ser mi mano derecha en este trabajo de tesis, por dejar que le enseñe y por enseñarme, .y especialmente, por el espíritu y la garra que le puso y le sigue poniendo a cada cosa que hace, siempre con optimismo y energía. A Ani, por hacerme dudar de todo, lo que me exige a superarme siempre un poco más, y especialmente, por tener la palabra justa en esos momentos que más lo necesite.

A María Rosa y las “chiquitas”, Aine y Emilse, por toda la ayuda que me brindaron, y por todos los almuerzos llenos de anécdotas y alegría. A Jimena, Emilia, Mauricio, Marcela y Nora, por todo la ayuda ofrecida en estos años.

A Verónica Reus y Wilver Herrera Villadare, por su apoyo técnico histológico.

Al departamento de Ciencias Biológicas, a la Sección de Aguas, a la Cátedra de Química Biológica, y a los no docentes, que siempre han colaborado conmigo cuando los necesite.

A Flor, por haber sido mi gran “maestra” de laboratorio, por haberme enseñado con una enorme paciencia y cariño a dar mis primeros pasos en la investigación, por las horas de mesada compartidas, y por ser mi gran amiga.

A mis excelentes amigas de siempre, Sole, Fabi, Vale, Vane, Lauri, Emi, que me acompañaron y apoyaron durante estos años, colmándome de buenos momentos y alegría.

Finalmente, a mi familia, a mi papá Raúl, a mi mamá Chuchi y a mi hermano Esteban, por el apoyo y el amor incondicional de siempre.

PUBLICACIONES, PRESENTACIONES A CONGRESOS Y REUNIONES CIENTÍFICAS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis, han sido publicados en revistas científicas, y presentados en congresos y reuniones científicas de alcance nacional e internacional.

TRABAJOS PUBLICADOS

Scalerandi, María Victoria; González, Marcela Aída; Saín, Juliana; Fariña, Ana Clara; Bernal, Claudio Adrián. Effect of conjugated linoleic acid mixtures and different edible oils on body composition and lipid regulation in mice. *Nutrición Hospitalaria*. En prensa.

Scalerandi, María Victoria; González, Marcela Aída; Saín, Juliana; Reus, Verónica; Lavandera, Jimena; Bernal, Claudio Adrián. Efecto diferencial de la fuente de grasas dietarias sobre las alteraciones hepáticas inducidas por los conjugados del ácido linoleico en ratones. *Revista FABICIB* 2013. En prensa.

RESÚMENES PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS DE PUBLICACIÓN PERIÓDICA

Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity in mice fed with different source of dietary fat. "19th International Congress of Nutrition". Saín, J; Scalerandi, MV; González, M; Fariña, AC; Bernal, CA. *Annals of Nutrition & Metabolism*. 2009, 55 (Suppl 1): p166, 2009 P1-02. ISSN: 0250-6807. Bangkok, Thailand.

Efecto diferencial de c9,t11-CLA y mezcla de c9,t11-CLA + t10,c12-CLA sobre lípidos corporales y tisulares en animales de experimentación. Scalerandi, V; Saín, J; González, M; Fariña, AC; Bernal, CA. *Revista Chilena de Nutrición*. 2009, 36 (Supl. 1): p 526, Nov. 2009. N° 1284. ISSN 0716-1549. Santiago de Chile, Chile.

Eficiencia energética y digestibilidad aparente de grasas con diferentes ácidos grasos insaturados suplementadas con conjugados del ácido linoleico (CLA) en ratones. Saín, J; Scalerandi, MV; González, MA; Fariña, AC; Bernal, CA. Revista Chilena de Nutrición. 2009, 36 (Supl. 1): p 527, Nov. 2009. N° 1287. ISSN 0716-1549. Santiago de Chile, Chile.

Efecto diferencial de la interacción entre c9,t11-CLA y mezcla de c9,t11-CLA + t10,c12-CLA con ácidos grasos insaturados de las series n-3, n-6, n-9, sobre el estrés oxidativo hepático. Scalerandi, MV; González, M; Fariña, AC; Bernal, CA. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. 2010, Volumen 67/ Suplemento N° 2/ 2010. ISSN: 0014-6722. Pag. 21, Código NB 4. Córdoba, Argentina.

Influencia de los conjugados del ácido linoleico (CLA) sobre la biosíntesis de PUFAS en hígados de animales alimentados con dietas ricas en ácido linoleico y linolénico. Scalerandi, MV; González, M; Saín, J; Bernal, CA. INVENIO, Revista de Investigación Académica, Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Rosario. Argentina. 2011, Año 14. N° 26. Septiembre 2011. Suplemento especial. ISSN 0329-3475. Rosario, Argentina.

Influence of CLA on fatty acid composition in livers of animals fed diets rich in linoleic acid or oleic acid. Bernal, CA; Scalerandi, MV; Saín, J; González, M. European Journal of Lipid Science and Technology. 2011, 113 S1, 47-143. ISSN 1438-7697. Rotterdam, The Netherlands.

Natural and commercial relations of conjugated linoleic acids differentially affect fatty acids synthesis in liver of mice. Bernal, CA; Scalerandi, MV; González, M; Williner, MR; Antonacci, L; Gagliostro, G. Annals of Nutrition & Metabolism. 2013, 63 (suppl1) 1-1960 (2013). ISSN 0250-6807. e-ISSN 1421-9697. Granada. España.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Interacción nutricional entre los conjugados del ácido linoleico y ácidos grasos insaturados de las series n-3, n-6, n-9. Estudio de estrés oxidativo en hígado. Scalerandi, V; Sain, J; Gonzalez, M; Andreoli, F; Martinelli, M; Bernal, CA. Presentado en el “Congreso Internacional de Alimentos en el Siglo XXI avances en Latinoamérica” “XXXI Reunión Anual de CASLAN”. Mendoza. Argentina. Mayo de 2008.

Metabolismo Lipídico: efecto diferencial de c9,t11-CLA y mezcla de c9,t11-CLA + t10,c12-CLA. Scalerandi, V; Saín, J; González, M; Fariña, AC; Bernal, CA. Presentado en “Jornada Ibero-Americana sobre Isómeros de Ácidos Grasos”. Río de Janeiro. Brasil. Julio de 2009.

Interacción nutricional de los conjugados del ácido linoleico (CLA) y ácidos grasos insaturados (AGI) en ratones. Saín, J; Scalerandi, MV; González, MA; Fariña, AC; Bernal, CA. Presentado en “Jornada Ibero-Americana sobre Isómeros de Ácidos Grasos”. Río de Janeiro. Brasil. Julio de 2009.

Effect of Conjugated Linoleic Acid (CLA) on adiposity in mice fed with different source of dietary fat. Saín, J; Scalerandi, MV; González, M; Fariña, AC; Bernal, C. Presentado en “19th International Congress of Nutrition”. BITEC, Bangkok. Thailand. Octubre de 2009.

Efecto diferencial de c9,t11-CLA y mezcla de c9,t11-CLA + t10,c12-CLA sobre lípidos corporales y tisulares en animales de experimentación. Scalerandi, MV; Saín, J; González, M; Fariña, AC; Bernal, CA. Presentado en “XV Congreso Latinoamericano de Nutrición” “Nutrición, Alimentos y Desarrollo en América Latina”. Santiago. Chile. Noviembre de 2009.

Eficiencia energética y digestibilidad aparente de grasas con diferentes ácidos grasos insaturados suplementadas con Conjugados del Ácido Linoleico (CLA) en ratones. Saín, J; Scalerandi, MV; González, M; Fariña, AC; Bernal, CA. Presentado en XV Congreso Latinoamericano de Nutrición “Nutrición, Alimentos y Desarrollo en América Latina”. Santiago. Chile. Noviembre de 2009.

Efecto diferencial de la interacción entre c9,t11-CLA y mezcla de c9,t11-CLA + t10,c12-CLA con ácidos grasos insaturados de las series n-3, n-6, n-9, sobre el estrés oxidativo hepático. Scalerandi, MV; González, M; Fariña, AC; Bernal CA. Presentado en la “II Jornadas Internacionales de Actualización en Nutrición y Tecnología de Alimentos – CASLAN”. Córdoba. Argentina. Octubre de 2010.

Influencia de los conjugados del ácido linoleico (CLA) sobre la biosíntesis de PUFAS en hígados de animales alimentados con dietas ricas en ácido linoleico y linolénico. Scalerandi, MV; González, M; Saín, J; Bernal, CA. Presentado en la “XXX Reunión Anual del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN). III Jornadas Internacionales de Actualización en Nutrición y Tecnología de Alimentos”. Rosario. Argentina. Septiembre de 2011.

Influence of CLA on fatty acid composition in livers of animals fed diets rich in linoleic acid or oleic acid. Bernal, CA; Scalerandi, MV; Saín, J; González, M. Presentado en “9th Euro Fed Lipid Congress Oils, Fats and Lipids for a Healthy and Sustainable World”. Rotterdam. The Netherlands. Septiembre de 2011.

Incorporación de diferentes CLA dietarios en hígado de ratones y sus efectos sobre la regulación de triglicéridos. Scalerandi, MV; González, M; Lavandera, J; Bernal, CA. Presentado en “V Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas”. Buenos Aires. Argentina. Julio de 2012.

Incorporación de CLA dietarios en hígado de animales de experimentación y su potencial impacto sobre la regulación de triglicéridos. Scalerandi, MV; González, M; Lavandera, J; Bernal, CA. Presentado en “SLAN CUBA XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición. Promoción de Salud y Prevención de Enfermedades”. La Habana. Cuba. Noviembre de 2012.

Natural and commercial relations of conjugated linoleic acids differentially affect fatty acids synthesis in liver of mice. Scalerandi, MV; Gonzalez, MA; Williner, MR; Antonacci, L; Gagliotro, G; Bernal, C. Presentado en “IUNS 20th International Congress of Nutrition”. Granada. España. Septiembre de 2013.

Alteraciones hepáticas inducidas por los conjugados del ácido linoleico en ratones. Efecto diferencial de la fuente de grasas dietarias. Scalerandi, MV; González, M; Saín, J; Reus, V; Bernal, CA. Presentado en “XV Congreso y XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario”. Zavalla. Santa Fe. Argentina. Noviembre de 2013.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIV
ABREVIATURAS.....	XVII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN.....	7
1.-GRASA DIETARIA Y SALUD.....	7
2.- PRINCIPALES FUENTES DE GRASAS DIETARIAS.....	13
3.- ISÓMEROS DE ÁCIDOS GRASOS.....	15
4.- FUENTES Y ORIGEN DE CLA.....	18
5.- EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CLA.....	21
5.1- Efectos sobre la carcinogénesis.....	23
5.2- Efectos sobre el peso y composición corporal.....	24
5.3- Efectos sobre la diabetes y el metabolismo glucídico.....	27
5.4- Efectos sobre la salud cardiovascular y el metabolismo lipídico.....	28
5.5- Efectos sobre la respuesta inflamatoria y el sistema inmune.....	31
6.- INTERACCIÓN DE LOS CLA CON DISTINTAS GRASAS DIETARIAS	32
OBJETIVOS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1.- ANIMALES.....	35
2.- DIETAS.....	35
3.- GRUPOS EXPERIMENTALES Y PROTOCOLO DE TRABAJO.....	38
4.- DETERMINACIONES REALIZADAS.....	38
4.A.- ABSORCIÓN APARENTE DE PROTEÍNA DIETARIA.....	39
4.B.- ABSORCIÓN APARENTE DE LÍPIDOS DIETARIOS.....	39
4.C.- COMPOSICIÓN CORPORAL.....	40
4.C.1.- Determinación del contenido de agua.....	40
4.C.2.- Determinación del contenido de proteínas.....	40
4.C.3.- Determinación del contenido de grasa.....	41

4.D.- RETENCIÓN ENERGÉTICA CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA.....	41
4.D.1.- Retención energética corporal.....	41
4.D.2.- Eficiencia energética.....	41
4.E.- CUANTIFICACIONES EN SUERO/PLASMA.....	42
4.E.1.- Concentración de triglicéridos sérico.....	42
4.E.2.- Concentración de colesterol total sérico.....	42
4.E.3.- Concentración de fosfolípidos séricos.....	43
4.E.4.- Concentración de glucosa plasmática.....	43
4.E.5.- Cuantificación de la actividad de enzimas marcadoras de daño hepático	44
4.E.5.1.- Actividad de la enzima ASAT.....	44
4.E.5.2.- Actividad de la enzima ALAT.....	44
4.E.5.3.- Actividad de la enzima FA.....	44
4.E.6.- Perfil de ácidos grasos sérico.....	45
4.F.- CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS TISULARES.....	47
4.F.1- Concentración de triglicéridos tisulares.....	47
4.F.2- Concentración de fosfolípidos tisulares.....	47
4.F.3- Concentración de colesterol total tisular.....	48
4.F.4- Perfil de ácidos grasos tisular.....	48
4.G.- ANALISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO HEPÁTICO.....	49
4.H.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO LIPÍDICO...	49
4.H.1.- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa.....	49
4.H.1.1.- Actividad total de LPL en tejido adiposo epididimal.....	49
4.H.1.2.- Actividad total de LPL en músculo gastrocnemio.....	50
4.H.2.- Secreción hepática “ <i>in vivo</i> ” de TG-pre- β lipoproteínas.....	51
4.H.3.- Actividad de enzimas lipogénicas en hígado y tejido adiposo epididimal.....	52
4.H.3.1.- Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	52
4.H.3.2.- Actividad de la enzima málica.....	52
4.H.3.3.- Actividad de la enzima ácido graso sintasa.....	53
4.H.4.- Actividad de la enzima carnitina palmitoil-transferasa I en hígado y músculo.....	53

4.I.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO.....	54
4.I.1.- Determinación del grado de lipoperoxidación.....	54
4.I.2.- Determinación del contenido de glutatión reducido.....	54
4.I.3.- Medida de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas.....	55
4.I.3.1.- Determinación de la actividad de la enzima catalasa.....	55
4.I.3.2.- Determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa.....	55
5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
RESULTADOS.....	57
1.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO Y ENERGÍA.....	57
2.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA GANANCIA DE PESO.....	59
3.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL.....	62
4.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA RETENCIÓN ENERGÉTICA CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA.....	64
5.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL PESO DE HÍGADO, TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL Y MÚSCULO GASTROCNEMIO.....	67
6.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE TRIGLICÉRIDOS, FOSFOLÍPIDOS, COLESTEROL Y GLUCOSA.....	71
7.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL CONTENIDO HEPÁTICO DE TRIGLICÉRIDOS, FOSFOLÍPIDOS Y COLESTEROL.....	74
8.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL CONTENIDO MUSCULAR DE TRIGLICÉRIDOS Y FOSFOLÍPIDOS.....	76
9.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LOS LÍPIDOS TOTALES SÉRICOS, SECRETADOS POR EL HÍGADO Y	

EN LOS TEJIDOS HEPÁTICO Y ADIPOSO BLANCO.....	78
9.1.- Composición de ácidos grasos en los lípidos séricos.....	78
9.2.- Composición de ácidos grasos en los lípidos secretados por el hígado.....	81
9.3.- Composición de ácidos grasos en los lípidos hepáticos.....	84
9.4.- Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	93
10.- HISTOLOGÍA HEPÁTICA.....	97
11.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL NIVEL SÉRICO DE ENZIMAS MARCADORAS DE DAÑO HEPÁTICO: ASAT, ALAT, FA.....	100
12.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL ESTRES OXIDATIVO HEPÁTICO.....	102
13.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE PARAMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO LIPIDICO.....	105
13.1.- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos.....	105
13.2.- Remoción de triglicéridos séricos. Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio.....	106
13.3.- Síntesis de ácidos grasos en hígado y tejido adiposo.....	109
13.3.1.- Actividad hepática de la enzima sintasa de ácidos grasos.....	109
13.3.2.- Actividad hepática de la enzima málica.....	110
13.3.3.- Actividad hepática de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa.....	111
13.3.4.- Actividad en tejido adiposo epididimal de la enzimas: sintasa de ácidos grasos, enzima málica y glucosa-6-P-deshidrogenasa.....	112
13.4.- Capacidad de oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo esquelético.....	115
13.4.1.- Oxidación hepática de ácidos grasos.....	115
13.4.2.- Oxidación de ácidos grasos en músculo gastrocnemio.....	116
DISCUSIÓN.....	118
1.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA GANANCIA DE PESO, COMPOSICIÓN CORPORAL Y PESOS DE TEJIDOS.....	118
2.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE PARÁMETROS SÉRICOS.....	122

3.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LÍPIDOS HEPÁTICOS Y SU REGULACIÓN.....	124
3.1.- Contenido y retención de isómeros CLA en hígado.....	124
3.2.- Niveles de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos en hígado.....	127
3.3.- Lipogénesis y β -oxidación de ácidos grasos en hígado.....	128
3.4.- Biosíntesis de AGPI-CL en hígado.....	131
3.5.- Velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos.....	133
3.6.- Grado de lipoperoxidación e histología hepática.....	134
4.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO Y SU REGULACIÓN.....	138
4.1.- Contenido y retención de isómeros CLA en tejido adiposo epididimal.....	138
4.2.- Peso del tejido adiposo.....	139
4.3.- Captación de TG por el tejido adiposo epididimal.....	140
4.4.- Lipogénesis en tejido adiposo epididimal.....	142
5.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LOS NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS EN EL MÚSCULO GASTROCNEMIO Y SU REGULACIÓN.....	145
CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	151

ÍNDICE DE TABLAS

CONTENIDO	PÁGINA
Tabla 1. Contenido de total de CLA y <i>c9,t11</i> -CLA en diferentes alimentos*	21
Tabla 2. Composición de las dietas utilizadas (g/Kg dieta).....	36
Tabla 3. Composición de ácidos grasos de los aceites utilizados (%).....	37
Tabla 4. Consumo de alimento, ingesta energética y absorción aparente de grasa y proteína dietaria.....	58
Tabla 5. Composición corporal.....	63
Tabla 6. Composición porcentual de ácidos grasos en los lípidos séricos.....	79
Tabla 7. Composición porcentual de ácidos grasos secretados por el hígado en las VLDL.....	82
Tabla 8. Composición porcentual de ácidos grasos en hígado.....	88
Tabla 9. Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	PÁGINA
Figura 1. Representación esquemática de la vía metabólica de elongación y desaturación de los ácidos grasos insaturados n-9, n-6 y n-3*.....	11
Figura 2. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido dihomo- γ -linoleico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico*.....	13
Figura 3. Porcentaje de los tipos de ácidos grasos presentes en diferentes aceites de origen vegetal y animal*.....	15
Figura 4. Representación esquemática de la isomería geométrica de los ácidos grasos.....	16
Figura 5. Representación esquemática de la isomería posicional de los ácidos grasos.....	17
Figura 6. Estructura del ácido linoleico (inferior) y de de sus dos isómeros más importantes: <i>c</i> 9, <i>t</i> 11-CLA (medio) y <i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA (superior).....	17
Figura 7. Biosíntesis de CLA en rumen y tejidos*.....	19
Figura 8. Esquema de la reacción de isomerización e hidrogenación del ácido linoleico para la síntesis química de CLA*.....	20
Figura 9. Biosíntesis de ácidos grasos insaturados de cadena larga*.....	22
Figura 10. Representación esquemática del síndrome lipoatrófico inducido por el <i>t</i> 10, <i>c</i> 12-CLA en ratones.....	30
Figura 11. Evolución de la ganancia de peso diario.....	60
Figura 12. Ganancia de peso entre los días experimentales 0 y 30 (ΔP_{30-0}).....	61
Figura 13. Ganancia de peso entre los días experimentales 7 y 30 (ΔP_{30-7}).....	61
Figura 14. Retención energética total corporal diaria (RETC).....	65
Figura 15. Retención energética de grasa corporal diaria (REGC).....	65
Figura 16. Retención energética proteica corporal diaria (REPC).....	66
Figura 17. Eficiencia energética del alimento (EE).....	66
Figura 18. Peso absoluto del hígado.....	67
Figura 19. Peso del hígado relativo al peso corporal.....	68
Figura 20. Peso absoluto del tejido adiposo epididimal.....	69
Figura 21. Peso del tejido adiposo epididimal relativo al peso corporal.....	69

Figura 22. Peso absoluto del músculo gastrocnemio.....	70
Figura 23. Peso del músculo gastrocnemio relativo al peso corporal.....	70
Figura 24. Concentración de triglicéridos séricos.....	71
Figura 25. Concentración de fosfolípidos séricos.....	72
Figura 26. Concentración de colesterol sérico.....	73
Figura 27. Concentración plasmática de glucosa.....	73
Figura 28. Contenido hepático de triglicéridos.....	74
Figura 29. Contenido hepático de fosfolípidos.....	75
Figura 30. Contenido hepático de colesterol.....	76
Figura 31. Contenido muscular de triglicéridos.....	77
Figura 32. Contenido muscular de fosfolípidos.....	77
Figura 33. Retención porcentual de isómeros CLA en hígado.....	85
Figura 34. Relación porcentual producto/substrato: AA/AL en hígado.....	86
Figura 35. Relación porcentual producto/substrato: GLA/AL en hígado.....	87
Figura 36. Relación porcentual producto/substrato: AA/DGLA en hígado.....	87
Figura 37. Relación porcentual producto/substrato: DHA/ALN en hígado.....	90
Figura 38. Relación porcentual producto/substrato: ácido <i>cis</i> -vaccénico/ ácido palmitoleico en hígado.....	91
Figura 39. Relación porcentual producto/substrato: ácido palmitoleico/ ácido palmítico (16:1/16:0) en hígado.....	92
Figura 40. Relación porcentual producto/substrato: ácido oleico/ ácido esteárico (18:1/18:0) en hígado.....	92
Figura 41. Retención porcentual de isómeros CLA en tejido adiposo epididimal	93
Figura 42. Relación porcentual producto/ substrato: ácido palmitoleico/ ácido palmítico (16:1/16:0) en tejido adiposo epididimal.....	96
Figura 43. Relación porcentual producto/substrato: ácido oleico/ ácido esteárico (18:1/18:0) en tejido adiposo epididimal.....	97
Figura 44. Cortes histológicos hepáticos.....	99
Figura 45. Actividad de la enzima ASAT en suero.....	100
Figura 46. Actividad de la enzima ALAT en suero.....	101
Figura 47. Actividad de la enzima FA en suero.....	101
Figura 48. Grado de lipoperoxidación en hígado.....	102
Figura 49. Nivel de GSH en hígado.....	103

Figura 50. Actividad de la enzima catalasa en hígado.....	104
Figura 51. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en hígado.....	104
Figura 52. Velocidad de secreción hepática de triglicéridos.....	106
Figura 53. Actividad lipoproteína lipasa por gramo de tejido adiposo epididimal.....	107
Figura 54. Actividad lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal total.....	108
Figura 55. Actividad lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio.....	109
Figura 56. Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos en hígado.....	110
Figura 57. Actividad de la enzima málica en hígado.....	111
Figura 58. Actividad de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa en hígado.....	111
Figura 59. Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	112
Figura 60. Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal total.....	113
Figura 61. Actividad de la enzima málica en tejido adiposo epididimal.....	113
Figura 62. Actividad de la enzima málica en tejido adiposo epididimal total.....	114
Figura 63. Actividad de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa en tejido adiposo epididimal.....	114
Figura 64. Actividad de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa en tejido adiposo epididimal total.....	115
Figura 65. Actividad hepática de la enzima carnitin palmitoil transferasa-Ia.....	116
Figura 66. Actividad muscular de la enzima carnitin palmitoil transferasa-Ib....	117
Figura 67. Esquema representativo de los cambios metabólicos producidos por la suplementación con Mix a las distintas grasas dietarias.....	148
Figura 68. Esquema representativo de los cambios metabólicos producidos por la suplementación con AR a las distintas grasas dietarias.....	148

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- AA: ácido araquidónico
ACO: acil Co-A oxidasa
AG: ácido graso
AGI: ácido graso insaturado
AGMI: ácido graso monoinsaturado
AGPI: ácido graso poliinsaturado
AGPI-CL: ácido graso poliinsaturado de cadena larga
AGS: ácido graso saturado
AL: ácido linoleico
ALAT: alanina amino transferasa
ALN: ácido α -linolénico
ANOVA: análisis de la varianza, acrónimo del inglés “analysis of variance”
apo B-100: apolipoproteína B-100
AR: aceite enriquecido en ácido ruménico
ASAT: aspartato amino transferasa
c: cis
c9,t11-CLA: cis9,trans11-CLA
CAT: catalasa
*CLA: conjugados del ácido linoleico, acrónimo del inglés “conjugated linoleic acid”
Col: colesterol total
COX: ciclooxigenasa
CPT-Ia: carnitina palmitoiltransferasa-Ia
CPT-Ib: carnitina palmitoiltransferasa-Ib
ECNT: enfermedades crónicas no transmisibles
EE: eficiencia energética
EM: enzima mállica
FA: fosfatasa alcalina
FAS: sintasa de ácidos grasos, acrónimo del inglés “fatty acid synthase”
FL: fosfolípidos
*DGLA: ácido dihomo- γ -linolénico, acrónimo del inglés “dihomo- γ -linolenic acid”
*DHA: ácido docosahexaenoico, acrónimo del inglés “docosahexaenoic acid”
*EPA: ácido eicosapentaenoico, acrónimo del inglés “eicosapentaenoic acid”

G: grasa dietaria

*GLA: ácido γ -linolénico, acrónimo del inglés “ γ -linolenic acid”

G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GSH: glutatión reducido

GSH-Px: glutatión peroxidasa

HDL: lipoproteína de alta densidad, acrónimo del inglés “high density lipoprotein”

HMG-CoA: hidroxil-3-metil-glutaril-CoA

hsp 70: acrónimo del inglés “70-kD heat shock protein”

I: isómero

Ig: inmunoglobulinas

KJ: kilo joule

LDL: lipoproteína de baja densidad, acrónimo del inglés “low-density lipoprotein”

LFABP: proteína de unión de ácidos grasos hepática, acrónimo del inglés “liver-type fatty acid binding proteína”

LOX: lipooxigenasa

LPL: lipoproteína lipasa

LPO: lipoperoxidación

MDA: malondialdehído

Mix: aceite mixCLA

mixCLA: mezclas con cantidades equimoleculares de *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA

NAFLD: enfermedad del hígado graso no alcohólico, acrónimo del inglés “non-alcoholic fatty liver disease”

NI: no identificado

NS: no significativo

PGE: prostaglandina E

PPAR: receptor que activa la proliferación de peroxisomas, acrónimo del inglés “peroxisome proliferator-activated receptors”

REGC: retención energética de grasa corporal

REPC: retención energética proteica corporal

RETC: retención energética total corporal

S: significativo

SCD: esteroil-CoA desaturasa, acrónimo del inglés “stearoyl-CoA desaturase”

SEM: error estándar de la media, acrónimo del inglés “standard errors of mean”

SREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides, acrónimo del inglés “sterol regulatory element-binding protein”

t: *trans*

*t*10,*c*12-CLA: *trans*10,*cis*12-CLA

TAE: tejido adiposo epididimal

TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, acrónimo del inglés “thiobarbituric acid reactive substances”

TG: triglicéridos

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α , acrónimo del inglés “tumor necrosis factor alpha”

U: unidad de actividad enzimática

UCP: proteína desacoplante, acrónimo del inglés “uncoupling protein”

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad, acrónimo del inglés “very low-density lipoproteína”

VSTG: velocidad de secreción hepática de triglicéridos

(*) En inglés, debido a su reconocido empleo como acrónimo.

RESUMEN

Y

ABSTRACT

RESUMEN

Los conjugados del ácido linoleico (CLA) son un grupo de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico con dobles enlaces conjugados. Los principales orígenes de los CLA en la dieta habitual humana son los alimentos derivados de rumiantes, tales como lácteos y carnes, y en ellos predomina el isómero *c9,t11*-CLA (ácido ruménico) (> 80%), seguido de *t10,c12*-CLA (aproximadamente 10%) y otros en menor cantidad. Sin embargo, comercialmente hay disponibles suplementos dietarios y ayudas ergogénicas derivados de procesos de síntesis química, conteniendo cantidades equimoleculares de *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA (aproximadamente 35-45% de cada uno). Estudios nutricionales, principalmente desarrollados en modelos animales, han demostrado una variedad de efectos funcionales de los CLA sobre la salud, incluyendo efectos anticarcinogénicos, antiaterogénicos, antiobesogénicos, antidiabéticos, modulador de la respuesta inmune y, en general, del metabolismo intermedio. No obstante, en ratones ciertos efectos negativos también han sido observados, como hepatomegalia y esteatosis. Ambos tipos de isómeros poseen efectos específicos y diferenciales relacionados a numerosos factores, entre ellos: especie, condición fisiológica, tiempo y dosis administrada, como también del entorno metabólico-nutricional existente. Dentro de este último factor, las diferentes proporciones relativas de ácidos grasos insaturados (AGI) de las series n-9, n-6 y n-3 podrían ser fundamental para modular el efecto benéfico y/o deletéreo de los distintos isómeros CLA. En este sentido, diferentes mecanismos podrían sustentar esta hipótesis a nivel de los efectos sobre la adipocidad y metabolismo lipídico, dado que es factible postular, entre ellos, modificaciones a nivel de membranas celulares, en la síntesis y oxidación de lípidos, en la biosíntesis de las distintas familias de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y de sus derivados eicosanoides y, en factores de modulación bioquímica como citoquinas y hormonas.

Existen algunos estudios de interacción de los diferentes CLA con ciertos tipos de AGI, pero sólo investigando los potenciales efectos preventivos sobre la esteatosis hepática. No obstante, al menos a nuestro conocimiento, no existen estudios sistemáticos nutricionales relacionados con los efectos de la suplementación con diferentes tipos de CLA a dietas conteniendo distintas proporciones de AGI n-9, n-6 y n-3 sobre aspectos nutricionales y del metabolismo lipídico. Por lo tanto, el objetivo general de la tesis fue investigar algunos efectos metabólico-nutricionales potencialmente benéficos y/o adversos de las interacciones del *c9,t11*-CLA y de la mezcla equimolecular de *c9,t11*-CLA +

*t*10,*c*12-CLA con aceites ricos en diferentes tipos de AGI en un modelo experimental con ratones.

Para tal fin, ratones macho, jóvenes, de la cepa CF1 fueron alimentados con dietas conteniendo aceite de oliva (O), aceite de maíz (M) o aceite de canola (C), suplementadas con aceite rico en *c*9,*t*11-CLA (AR) o con una mezcla equimolecular de CLA (Mix) durante 30 días. Los distintos aceites contienen distintas relaciones de AGI n-9, n-6 y n-3 (ácido oleico/ ácido linoleico/ ácido α -linolénico en O: 55,2/17,2/0,7, M: 32,0/51,3/0,9 y C: 61,1/18,4/8,6), y representan patrones de dietas habituales. El trabajo se focalizó en aspectos nutricionales como ganancia de peso, eficiencias dietarias, cambios en la adiposidad y composición corporal, así como potencial desarrollo de hepatomegalia. Mientras que, en el metabolismo lipídico, se basó en la incorporación tisular de diferentes ácidos grasos (AG), en el contenido y retención de isómeros CLA, en los perfiles de lípidos plasmáticos y tisulares, en potenciales cambios histológicos y lipoperoxidativos a nivel hepático, y en diferentes mecanismos de regulación de AG y triglicéridos (TG) en tejidos metabólicamente claves para la homeostasis lipídica corporal.

Los resultados mostraron que, ratones alimentados con Mix presentaron una profunda disminución de la adiposidad visceral y de los depósitos grasos en músculo esquelético, asociado a hepatomegalia y esteatosis hepática. La reducida masa grasa estuvo asociada en el tejido adiposo, a una baja captación de AG, a bajos niveles de AG adipogénicos y a una reducción en la capacidad lipogénica expresada por el flujo a través de la enzima SCD-1. En cambio, la reducción en los TG musculares fue debida a una mayor oxidación mitocondrial de AG. Este cuadro lipoatrófico, fue acompañado de hipertrigliceridemia y modificaciones en el metabolismo de lípidos tisulares, los cuales fueron modulados por el origen de grasa dietaria. Los mecanismos involucrados en la hipertrigliceridemia estuvieron asociados a una reducida remoción de TG por el tejido adiposo, que en el caso de los animales alimentados C+Mix fue además relacionado con una mayor secreción de TG hepática que previno la esteatosis. Una elevada lipogénesis hepática en todos los animales suplementados con Mix, en conjunción a desequilibrios en la biosíntesis de AGPI de cadena larga de las familias n-6 y n-3 condujeron a un marcado cuadro inflamatorio hepático que se mostró más acentuado en los animales alimentados con aceite de maíz y atenuado en aquellos con aceite de canola.

Un cuadro metabólico muy diferente estuvo presente en los animales suplementados con AR, los cuales manifestaron efectos antiobesogénicos más atenuados, pero sin la esteatosis y hepatomegalia característica del síndrome lipoatrófico observada

por la suplementación con Mix. Estos efectos estuvieron presentes a pesar de una mayor lipogénesis en hígado y tejido adiposo epididimal, como de ciertas alteraciones histológicas en hígado. La mayor lipogénesis hepática fue compensada por una elevada secreción de TG que evitó la acumulación de lípidos en dicho tejido. En función de la composición de la grasa dietaria, diferentes mecanismos participaron en la modulación metabólica observada por la suplementación con AR. La mayor secreción de TG hepática inducida por el AR fue contrarrestada en el grupo C+AR, pero no en el M+AR, por una mayor remoción de TG a nivel muscular. Así en los animales alimentados con aceite de maíz se observaron los menores efectos benéficos por la suplementación con AR, dado que además, un significativo estado inflamatorio hepático con alteraciones histológicas estuvo presente. Si bien en el grupo C+AR se observó el mayor efecto antiobesogénico del AR, los animales alimentados con O+AR mostraron que la acción preventiva de la acumulación de grasa fue asociada a niveles normales de TG en suero, hígado y músculo esquelético. Así, en el modelo experimental de ratones se puede concluir: 1) los efectos antiobesogénicos y lipoatróficos del Mix, pueden ser modulados por la composición de la grasa dietaria; 2) si bien el AR posee menos acción funcional antiobesogénica que el Mix, los efectos negativos son escasos; y 3) los mejores efectos funcionales de los CLA, con menor grado de disturbios metabólicos han sido encontrados en los animales alimentados con aceite de oliva suplementados con AR.

A pesar que los resultados experimentales en modelos animales no pueden extrapolarse directamente a los seres humanos, el conocimiento de los mecanismos implicados en los efectos benéficos y/o deletéreos de la suplementación con una mezcla de CLA comerciales o enriquecida en ácido ruménico a aceites comestibles conteniendo diferentes proporciones de AGI, podría ser de gran utilidad para el desarrollo de alimentos funcionales y estrategias nutricionales eficaces para el tratamiento o prevención de patologías como la obesidad y otras enfermedades crónicas no transmisibles.

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is a collective term used to describe the mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid with conjugated double bonds. The major sources of CLA in the natural human diet are foods derived from ruminants, such as dairy products and beef, and in these products the predominant CLA isomer is c9,t11-CLA (rumenic acid) (> 80%), followed by t10,c12-CLA (10%) and other minor isomers. However, CLA are commercially available as dietary supplements and ergogenic aids derived from chemical synthesis processes, containing equimolecular proportions of c9,t11-CLA and t10,c12-CLA (approximately 35 - 45% of each). Nutritional studies, mostly developed in animal models have demonstrated a variety of beneficial health effects of CLA consumption, including anticarcinogenic, antiatherogenic, antiobesogenic, and antidiabetic effects. CLA consumption can also act as modulator of the immune response and the intermediary metabolism. However, certain negative effects have been observed in mice, namely hepatomegaly and steatosis. Both isomers have specific and differential effects related to numerous factors including species, physiological condition, time and doses of CLA administered as well as prevailing metabolic and nutritional environment. As regards the latter factor, the different proportions of unsaturated fatty acids (UFA) from series n-9, n-6 and n-3 may be very important for the modulation of the beneficial and/or deleterious effects of different CLA isomers. In this regard, different mechanisms might support this hypothesis about the effects on adiposity and lipid metabolism because it is possible to consider that certain modifications might take place at cell membrane level, in the synthesis and oxidation of lipids, in the biosynthesis of families of polyunsaturated fatty acids (PUFA) and their eicosanoid derivatives, and in biomodulator factors such as cytokines and hormones.

There are several studies about the interaction between different CLA with certain types of UFA, but them investigated only the potential preventive effects of different UFA on hepatic steatosis. However, at least to the best of our knowledge, there are no systematic nutritional studies relating the effects of supplementation with different types of CLA to diets containing variable proportions of UFA n-9, n-6 and n-3 on nutritional parameters and on lipid metabolism. Therefore, the aim of this doctoral thesis was to investigate some potential beneficial and/or adverse effects of the interactions of c9,t11-CLA and the equimolecular mixture of c9,t11-CLA+t10,c12-CLA with edible oils rich in different types of UFA in an experimental mouse model.

For this purpose, male CF1 mice were fed diets containing olive oil (O), corn oil (M) and canola oil (C), supplemented with c9,t11-CLA (RA) rich oil or with an equimolecular mixture of CLA (mix) for 30 days. The oils contain different relations of UFA from n-9, n-6 and n-3 series (oleic acid/ linoleic acid/ α -linolenic acid in O: 55.2/17.2/0.7, M: 32.0/51.3/0.9 and C: 61.1/18.4/8.6), and represent patterns of habitual diets. The research focused on nutritional parameters such as weight gain, dietary efficiencies, changes in adiposity and body composition, as well as potential hepatomegaly development. And, in the lipid metabolism, the study was based on the fatty acid (FA) incorporation into tissues, on the content and retention of CLA in tissues, on the lipid profiles of plasma and tissues, on the potential histological changes and lipoperoxidative status in the liver, and on the mechanisms involved on FA and triglycerides (TG) regulation in key tissues related to lipid homeostasis.

The results showed that mice fed the Mix formula decreased the visceral adiposity and fat depots in the skeletal muscle, associated with hepatomegaly and hepatic steatosis. The reduced fat mass was linked to low uptake of FA in adipose tissue, low levels of adipogenic FA and reduced lipogenic capacity, expressed by the flow through the SCD-1 enzyme. In contrast, the reduction of muscle TG was due to an increased mitochondrial oxidation of FA. This lipotrophic status was accompanied by hypertriglyceridemia and changes in lipid metabolism, which were modulated by the source of dietary fat. The mechanisms involved in hypertriglyceridemia were associated with a reduced TG removal by adipose tissue, which in the case of C+Mix fed animals was also associated with an increased TG secretion that prevented the hepatic steatosis. An elevated hepatic lipogenesis in all Mix-supplemented animals, and the imbalance of the n-6 and n-3 long chained PUFA biosynthesis led to a marked hepatic inflammatory state that was more pronounced in animals fed maize oil and attenuated in those animals fed canola oil.

A very different metabolic state was present in RA-supplemented animals, which showed attenuated antiobesogenic effects, but without the steatosis and the hepatomegaly observed by Mix supplementation. This metabolic state was present despite the increased lipogenesis in liver and epididymal adipose tissue, and certain changes in liver histology. The raised hepatic lipogenesis was balanced by an increased TG secretion that prevented lipid accumulation in this tissue. Depending on the composition of the dietary fat, different mechanisms induced by RA supplementation were involved in the metabolic modulation. The higher liver TG secretion induced by RA was balanced in the C+RA, but not in the

M+RA group, by an increased TG removal in muscle. Thus, in animals fed corn oil diets the lower beneficial effects by supplementation with RA were observed, since in addition, a significant hepatic inflammatory status with histological alterations was present as well. Even though the highest antiobesogenic effect of RA was observed in the C+RA group, the animals fed with O+RA showed that the preventive action on the fat accumulation was associated with normal levels of TG in serum, liver and skeletal muscle. Thus, in the experimental mouse model it can be concluded that: 1) the antiobesogenic and lipotrophic effects of the Mix can be modulated by the composition of the dietary fat, 2) although the RA has a smaller antiobesogenic effect than the Mix, the negative effects of RA are scarce, and 3) the best functional effects of CLA, with a lesser degree of metabolic disorders, have been found in animals fed olive oil supplemented with RA.

Even though experimental results in animal models cannot be directly extrapolated to humans, knowledge of the mechanisms involved in the beneficial and/or deleterious effects of the supplementation with a commercial CLA mixture or ruminic acid to edible oils containing different proportions of UFA could be useful for the development of functional foods, as well as for effective nutritional strategies employed for the treatment or prevention of diseases such as obesity and other chronic non-communicable diseases.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

1.-GRASA DIETARIA Y SALUD

En las últimas décadas, se ha producido un considerable incremento a nivel mundial en la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), incluyendo obesidad, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, y cáncer, entre otras. Muchos factores, entre ellos los antecedentes genéticos y medio-ambientales, pueden influir en el desarrollo de estas enfermedades, pero sin lugar a dudas, los cambios en el estilo de vida de la sociedad actual, reflejados en cambios en los hábitos alimentarios y de patrones de conducta habituales han sido de los más influyentes durante la “Transición Nutricional” (Satia, 2010). Así, desequilibrios nutricionales acompañados de un estilo de vida sedentario, han llevado a un incremento en la probabilidad de desarrollar desórdenes metabólicos que caracterizan las ECNT anteriormente citadas, como así también, a un aumento de la morbilidad y mortalidad asociada a las mismas en distintas etapas de la vida. Dentro de los desequilibrios nutricionales, un elevado consumo de dietas con alta densidad energética, con elevada carga glucémica o con desequilibrios en su perfil de ácidos grasos (AG) son las principales causas etiológicas dietarias (Eckel, 2005; Kant, 2010). En contraposición, la modificación no sólo del contenido de grasa total en la dieta, sino también de su perfil de AG constitutivos, puede conducir a cambios metabólicos beneficiosos para la prevención y tratamiento de dichas patologías.

Durante los últimos años, algunas recomendaciones de grasas dietarias han sido modificadas (Smit y col., 2009), y otras se encuentran en revisión (Lawrence, 2013). En este sentido, el contenido de grasa dietaria total, que años atrás se encontraba en un máximo de 30% del total de las calorías, ha sido extendido a 35% de la energía, dependiendo del balance energético (Diekman y col., 2009). Esta nueva recomendación se fundamenta en que las evidencias a través de estudios prospectivos observacionales no han encontrado, o han encontrado muy poca, relación entre la ingesta de grasa total y la obesidad, ganancia de peso, enfermedad cardiovascular y riesgo de cáncer (Beresford y col., 2006; Field y col., 2007; Howard y col., 2006) Asimismo, no se han encontrado beneficios de ingestas muy bajas en grasas en estudios controlados, dado que las mismas normalmente son acompañadas de altos niveles de carbohidratos (Appel y col., 2005; Gardner y col., 2007). No obstante, no se puede ignorar todas las evidencias preexistentes, en las cuales excesos de grasas dietarias tienen una directa correlación con la obesidad

(Bray y col., 2004), diabetes tipo 2 (Riccardi y col., 2003) y con otras alteraciones frecuentes en diferentes ECNT (Marshall y Bessesen, 2002; Cañete y col., 2007). Es interesante como Ceriello y Motz (2004) ilustran la íntima relación existente entre la constelación de alteraciones que caracterizan la ECNT; así por ejemplo, los autores describen que tanto la sobrecarga de glucosa, como de grasas en general en las células, pueden conducir a estrés oxidativo, el cual induce disfunción endotelial, alteraciones en la secreción de insulina e incremento del riesgo cardiovascular. Las alteraciones en la secreción de insulina pueden elevar más los niveles de glucemia post prandial exacerbando el estrés oxidativo y el “cluster” de factores de riesgo que contribuyen a producir las enfermedades cardiovasculares, la diabetes mellitus, el síndrome metabólico, entre otras.

Actualmente, los mayores inconvenientes en relación al consumo de grasa y la salud pública están centrados en el tipo de grasa ingerida (Zevenbergen y col., 2009). Respecto a las grasas saturadas, desde hace mucho tiempo es conocido que incrementan el colesterol total (Col) y el colesterol-LDL, teniendo un efecto diferencial los distintos AG individuales. Específicamente, una correlación positiva ha sido largamente reconocida (Katan y col., 1995; Mensink y col., 2003) entre el consumo de grasas ricas en ácido láurico, mirístico y palmítico y los niveles de colesterol-LDL conduciendo a un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria. En cambio, una ausencia de efecto se ha encontrado entre el consumo de ácido esteárico y los niveles de colesterol, siendo más desconocido el efecto en general de este AG sobre el riesgo cardiovascular (Sanders y col., 2003; Sanders y Berry, 2005). Otros autores han reportado que en general todas las grasas saturadas pueden incrementar el riesgo de obesidad (Hariri y col., 2010), y así a través de la misma conducir a un incremento en la liberación de distintas citoquinas proinflamatorias, incrementando el riesgo de otras patologías asociadas como la diabetes y ECNT, en general. También, han sido observadas otras asociaciones relacionadas a enfermedades del adulto, por ejemplo una correlación positiva entre el consumo de grasas saturadas y la declinación de la capacidad cognitiva en mujeres diabéticas tipo 2 (Devore y col., 2009), como también con el desarrollo de cáncer de mama (Binukumar y Mathew, 2005). No obstante, revisiones muy actuales como la de Lawrence (2013) ponen en discusión el efecto de las grasas saturadas, promoviendo que dichos estudios deben ser reevaluados. El citado autor fundamenta que las grasas saturadas, por ser menos susceptibles a la peroxidación que las insaturadas, no estarían directamente involucrados en el desarrollo de cuadros proinflamatorios, los cuales serían los que en la actualidad estarían más asociados a las ECNT.

Los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), componentes que caracterizan la dieta mediterránea, han mostrado efectos benéficos sobre el perfil de lípidos sanguíneos y factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares (Mensink y col., 2003; Appel y col., 2005). Estos efectos han conducido a que en las recomendaciones de grasas dietarias (Diekman y col., 2009), los niveles energéticos de dichas grasas sean el remanente del resultado de las recomendaciones de grasas totales (30-35% calorías), menos las saturadas (hasta 10% calorías) y poliinsaturadas (6-10% de energía); no existiendo niveles recomendados específicos de ingesta de grasas monoinsaturadas. Además de la regulación del perfil de lípidos sanguíneos, se ha descrito (Gillingham y col., 2011) que los AGMI modulan la presión sanguínea, mejoran la sensibilidad a la insulina y regulan los niveles de glucosa. Debido a su preferencial metabolismo y oxidación, los AGMI dietarios influyen en la composición corporal, reduciendo el riesgo de obesidad (Gillingham y col., 2011), así como también disminuyen el riesgo de ciertos tipos de cáncer (Binukumar y Mathew, 2005; Comba y col., 2010) y protegen contra el deterioro cognitivo relacionado con la edad y la enfermedad de Alzheimer (López-Miranda y col., 2010). Sin embargo, otros estudios epidemiológicos y de intervención sugirieron que, aunque la sustitución de la grasa saturada dietaria por alimentos ricos en AGMI puede potencialmente disminuir ciertos factores de riesgo cardiovascular, esta sustitución no disminuye la extensión de la aterosclerosis (Degirolamo y Rudel, 2010).

Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), el ácido linoleico (AL, n-6) y el ácido α -linolénico (ALN, n-3) son dos AG esenciales, por lo que, su consumo, es nutricionalmente necesario para la supervivencia. En este sentido, estos dos AG esenciales junto con el ácido araquidónico (AA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) juegan un rol muy importante en el crecimiento, en el desarrollo del cerebro y de la retina durante el desarrollo fetal y los primeros dos años de vida (Decsi y Koletzko, 2005). Este requerimiento va disminuyendo a lo largo de las distintas etapas de la vida, alcanzando niveles mínimos de ingesta de 2,5% de energía para el AL y 0,5% de energía para el ALN para prevenir síntomas de deficiencias en el adulto (Aranceta y Perez-Rodrigo, 2012). Mayores ingestas dentro del rango recomendado [6-10 % de Energía como AGPI (Diekman y col., 2009)], promueven efectos favorables sobre el perfil de lípidos sanguíneos y su asociación con un menor riesgo de eventos cardiovasculares y reducido riesgo de diabetes tipo 2 (Skeaff y Miller, 2009; Mozaffarian, 2005). Estos requerimientos dietarios están dados por la carencia de enzimas capaces de sintetizar los AG esenciales a

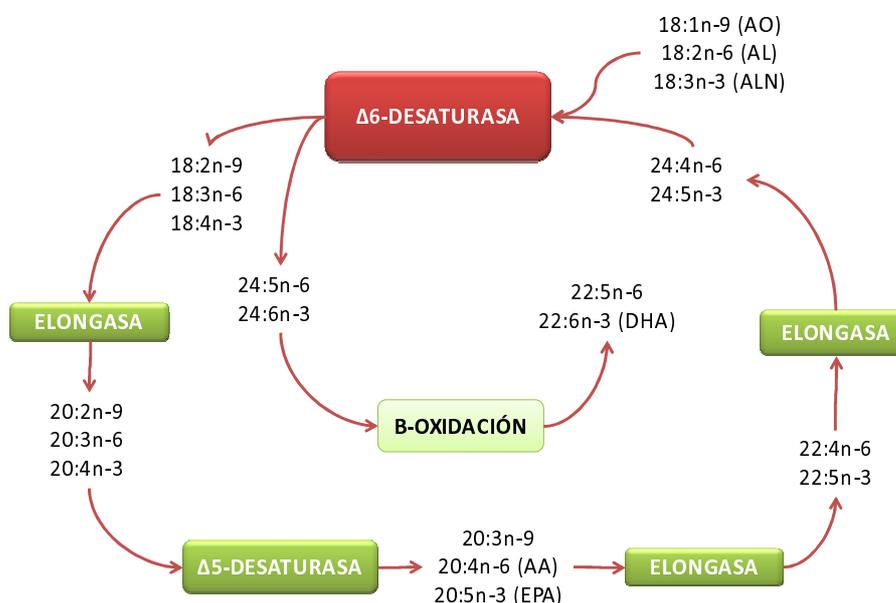
partir de distintos precursores, y debido a su demanda para las funciones normales del organismo.

Los AG de las familias n-3 y n-6 tienen reconocidos efectos favorables sobre el perfil de lípidos circulantes y sobre la presión arterial (Benatti y col., 2003; Mozaffarian, 2005). No obstante, excesos de AG n-6 o bajas relaciones AG n-3/n-6, contribuyen a la formación de trombos y ateromas, al desarrollo de desórdenes alérgicos e inflamatorios, y a la proliferación celular (El-Badry y col., 2007). Debido a su potencial acción proinflamatoria, ha sido observado, que dietas ricas en AGPI n-6 incrementan la susceptibilidad de las partículas de LDL a la oxidación, que a su vez conduce a aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (Reaven y col. 1993). Además, a través de diferentes mecanismos, los AGPI n-6 pueden incrementar el riesgo de ciertos tipos de cáncer y metástasis. Estos efectos negativos pueden ser contrarrestados por un equilibrio con los AGPI n-3, cuyos efectos derivan, en gran parte, de su acción antiinflamatoria (Benatti y col., 2003). Además, la mayoría de los efectos benéficos de los AGPI n-3 sobre la prevención y/o tratamiento de ECNT son atribuidos a los derivados de cadena larga: EPA y DHA, presentes principalmente en alimentos de origen marino. Entre los numerosos efectos benéficos del consumo de estos dos AGPI-CL n-3 se han demostrado acciones fisiológicas favorables sobre: presión sanguínea, perfil de lípidos plasmáticos, sensibilidad a la insulina y regulación de la glucosa, función cardíaca, función endotelial, procesos inflamatorios y obesidad. Todos estos procesos están involucrados en un efecto preventivo del riesgo y desarrollo de enfermedad cardiovascular, diabetes, cáncer y ECNT (Benatti y col., 2003; Mozaffarian y Rimm, 2006). En humanos, la conversión del ALN a EPA y DHA es relativamente baja (Burdge y col., 2003), y si bien, nuevos estudios experimentales y observacionales respaldan la opinión de que el consumo de ALN reduce la incidencia de enfermedad cardiovascular (Mozaffarian, 2005), en general la evidencia sigue siendo muy controvertida.

En términos generales, los mecanismos de acción (Schmitz y Ecker, 2008; Benatti y col., 2003) de los AGPI están relacionados, entre otros, a: 1) la formación de derivados eicosanoides con diferentes actividades biológicas; 2) alteración en la formación y funciones de otros mediadores como las citoquinas; 3) modificaciones en la composición y fluidez de las membranas celulares, influyendo en las propiedades físicas de las mismas, alterando de este modo la función y el tráfico de proteínas y vesículas, así como las interacciones hormona-receptor; 4) cambios en el perfil de lípidos y lipoproteínas circulantes; 5) la acción agonista o antagonista como ligando/moduladores de un número

de factores de transcripción, los cuales controlan varios genes de respuesta inflamatoria y del metabolismo lipídico y glucídico; y 6) la diferencial velocidad de oxidación de los ácidos grasos insaturados (AGI). Estos mecanismos de acción están asociados a las proporciones relativas de las distintas familias de AGI, cumpliendo la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) un rol muy importante. Así los AG, tanto el AL como el ALN pueden ser elongados y desaturados para formar AGPI-CL, y posteriormente dar lugar a la formación de distintos eicosanoides. Esta vía metabólica es parcialmente compartida por el ácido oleico, formando AGI de cadena larga de la familia n-9, la cual se encuentra exacerbada en situaciones de deficiencia de AG esenciales. El AA, principal producto de la familia n-6, se sintetiza a partir del AL mediante una secuencia alterna de desaturaciones y elongaciones (Figura 1). La misma vía metabólica es compartida por el ALN para producir ácido eicosapentaenoico (EPA) y DHA.

Figura 1. Representación esquemática de la vía metabólica de elongación y desaturación de los ácidos grasos insaturados n-9, n-6 y n-3*

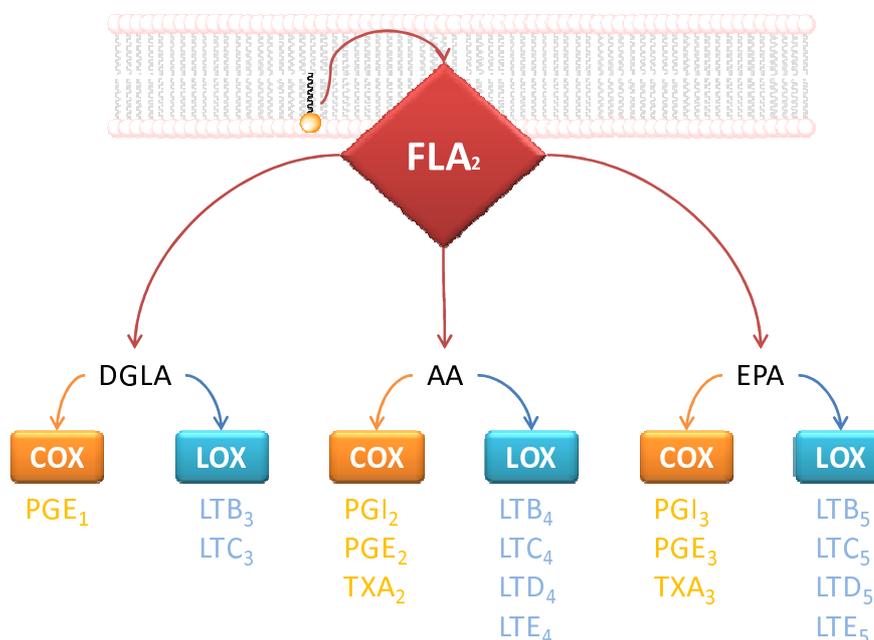


AO, ácido oleico; AL, ácido linoleico; ALN, ácido α -linolénico; AA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaenoico; DHA, ácido docosahexaenoico.*Adaptado de Gibson y col. (2013).

La primera desaturación es efectuada por la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, y es el paso limitante en la síntesis de los AGPI-CL, y su actividad sobre una determinada serie de AGI no sólo depende de la competición entre sustratos de distintas familias, sino también de una regulación “feed-back” mediada tanto, por los productos intermediarios, como finales de la misma, y de las otras series de AGI (Gibson y col., 2013).

Los AGPI-CL son incorporados en las membranas celulares, principalmente en la posición sn-2 de los fosfolípidos (FL), y por acción de la enzima fosfolipasa A2 son liberados de la misma. Estos AG sirven de sustratos para la biosíntesis de eicosanoides (Figura 2), dependiendo de la actividad de las enzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2), lipooxigenasas (5-LOX, 12-LOX, ó 15-LOX), o citocromo P450 monooxigenasa. Específicamente, la actividad de las enzimas COX sobre el AA, conduce a la síntesis de prostanooides de la serie 2 [prostaglandinas E₂ (PGE₂), prostaciclina I₂ y tromboxano A₂], mientras que la actividad de 5-LOX genera los leucotrienos de la serie 4. Las enzimas COX y LOX pueden también utilizar el ácido dihomo- γ -linolénico (DGLA) como sustrato, conduciendo a la síntesis de prostaglandinas de la serie 1 (PGE₁). El EPA es convertido por las mismas enzimas, COX y LOX, a prostanooides de la serie 3 (prostaglandinas E₃, prostaciclina I₃ y tromboxano A₃), y leucotrienos de la serie 5, respectivamente. El AA es un sustrato preferencial frente al EPA para la acción de las enzimas COX y LOX, sugiriendo que la actividad biológica de los eicosanoides derivados del EPA, dependerá estrictamente de su disponibilidad intracelular, en comparación con los compuestos derivados del AA presentes en mayores concentraciones (Jump, 2002). Las lipooxinas y resolvinas, derivados de los AGPI n-6 y n-3 respectivamente, son otros mediadores lipídicos antiinflamatorios formados a partir de los mismos y que modulan la respuesta fisiológica en una variedad de síndromes inflamatorios (Russo, 2009). Así, los eicosanoides formados a partir de las distintas familias de AGI, pueden ejercer una acción autócrina o parácrina diferencial influyendo en numerosas actividades fisiológicas. Específicamente los derivados de AGPI n-6 generan un estado fisiológico proinflamatorio y protrombótico con incremento en la viscosidad sanguínea, vasoespasmo y vasoconstricción; mientras que los derivados de los AGPI n-3 conducen a un estado antiinflamatorio, antitrombótico, vasodilatador e hipolipidémico (El-badry y col., 2007). Por lo tanto, los niveles y la relación de AGPI n-3 y n-6 pueden tener un significativo impacto en el desarrollo o prevención de alteraciones comunes a las ECNT.

Figura 2. Síntesis de eicosanoides a partir del ácido dihomo- γ -linoleico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico*



DGLA, ácido dihomo- γ -linoleico; AA, ácido araquidónico; EPA, ácido eicosapentaenoico; COX, ciclooxigenasas; LOX, lipooxigenasas; PG, prostaglandina; LT, leucotrienos; TX, tromboxano.

*Adaptado de El-Badry y col. 2007; Massaro y col. (2008).

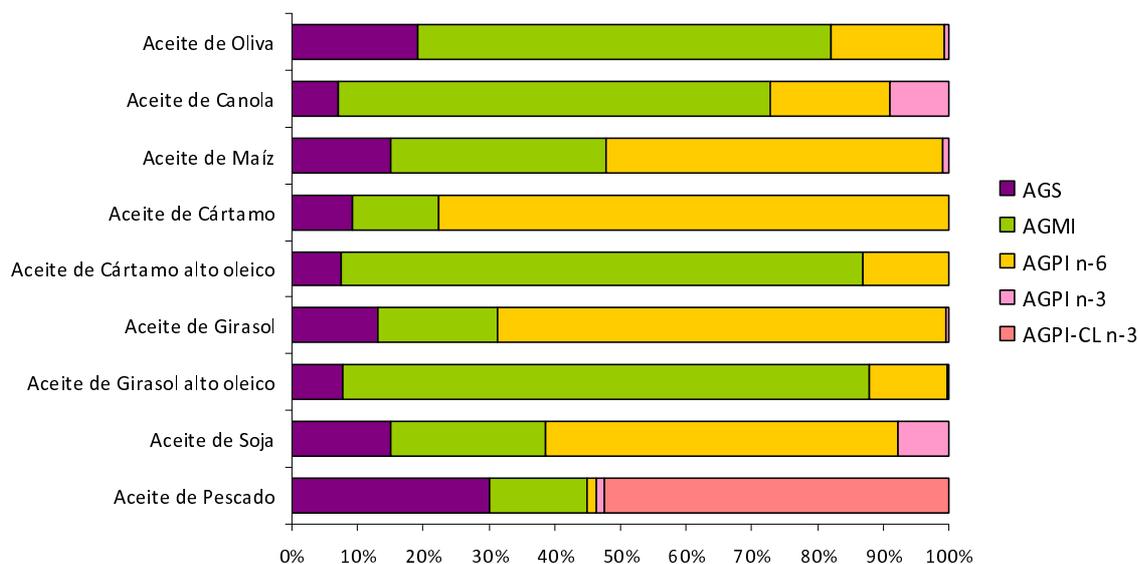
2.- PRINCIPALES FUENTES DE GRASAS DIETARIAS

El patrón de ingesta de los diferentes tipos de grasas dietarias, que en entre otros factores modula la tasa de morbi-mortalidad debida a ECNT, caracteriza distintas sociedades con diferentes problemáticas en el área de la Nutrición y Salud Pública. Así, por ejemplo, dos décadas atrás Keys (1995) mostró los beneficios sobre el riesgo de enfermedades cardiovasculares de la dieta mediterránea en comparación a la de los países de Europa septentrional y Norteamérica (dieta occidental), enfatizando la importancia del tipo de AG que caracterizaba las mismas. En referencia a la grasa dietaria, Keys (1995) mostró que mientras que en Estados Unidos y otros países occidentales consumían, principalmente grasas saturadas, la población mediterránea ingería una alta proporción de grasas monoinsaturadas (como aceite de oliva). En la actualidad, la sociedad occidental aumentó notoriamente el consumo de AGPI n-6 y disminuyó la cantidad de ALN, EPA y DHA, llevando a un desbalance en la relación de AGPI n-6/n-3, con relaciones que

alcanzan valores de hasta 50/1 (Simopoulos, 2003). Este patrón de alimentación es, asimismo muy diferente al observado en poblaciones orientales (como la dieta japonesa), que se caracteriza por el alto consumo de pescado y mariscos, presentando un mayor consumo de AGPI-CL n-3 y una mejor relación n-6/n-3.

Si bien en la dieta mediterránea se ha asociado como fuente tradicional de AGMI n-9 al aceite de oliva (Degirolamo y Rudel, 2010), por el desarrollo de la ingeniería genética y nuevas tecnologías en la industria de los alimentos, otras fuentes de ácido oleico están disponibles (Figura 3). Entre ellas encontramos el aceite de colza bajo en ácido erúico, y numerosas variantes alto oleico (ej: girasol alto oleico y cártamo alto oleico). Estas fuentes muy ricas en AGMI n-9 poseen una diferencia sustancial en el contenido y composición de otros AG presentes, como así también en la cantidad y tipo de compuestos fenólicos que, a su vez, han mostrado propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antiarrítmicas, antitrombóticas y vasodilatadoras, moduladoras del perfil de lípidos, y de la función endotelial, entre otras (Bogani y col., 2007; Peronay col., 2007). Los aceites vegetales líquidos como: aceite de soja, maíz, girasol y cártamo constituyen las principales fuentes dietarias de AGPI n-6, siendo el AL cuantitativamente el más importante. No obstante, algunos alimentos de origen animal como la yema de huevo, la carne y el hígado resultan fuentes alimenticias de ciertas cantidades, aunque minoritarias, de AA (Rodríguez-Cruz y col., 2005). Dentro de las principales fuentes de AGPI n-3 se dispone de algunos aceites vegetales, y los peces y animales marinos. Los aceites vegetales ricos en AGPI n-3, como el de lino, chía y canola, poseen principalmente AG de 18 átomos de carbono, siendo el ALN el mayoritario; en cambio en los peces de agua fría (salmón, trucha, arenque, etc.) y mariscos, abundan AGPI n-3 de 20 ó más átomos de carbono y con mayor número de insaturaciones (principalmente EPA y DHA) (Russo, 2009; Benatti y col., 2003).

Figura 3. Porcentaje de los tipos de ácidos grasos presentes en diferentes aceites de origen vegetal y animal*



AGS, ácidos grasos saturados; AGMI, ácidos grasos monoinsaturados; AGPI n-6, ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-6; AGPI n-3, ácidos grasos poliinsaturados de la familia n-3; AGPI-CL n-3, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga de la familia n-3. *Adaptado de Guillén y col. (2009).

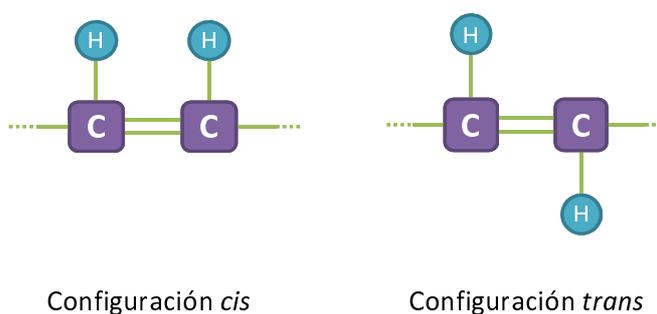
Otro grupo de grasas que ha llamado la atención durante las últimas décadas y puede tener una alta repercusión sobre el riesgo de ECNT son las grasas con isomerías geométricas y/o posicionales. Las mismas pueden tener un efecto *per se* o interactuar con los AG de otras fuentes de grasas dietarias interfiriendo el normal metabolismo.

3.- ISÓMEROS DE ÁCIDOS GRASOS

Los AGI pueden tener isomería geométrica y/o posicional. La gran mayoría de los AGI que se encuentran en la naturaleza poseen isomería *cis*, sin embargo en nuestra dieta habitual se consume una pequeña, pero no despreciable porción ($2,9 \pm 2,0$ g/día) de AG con isomería *trans* (Rothlisberger y col., 2011). Estos AG-*trans* provienen esencialmente de la manipulación tecnológica a la que son sometidas las grasas y aceites para modificarles sus propiedades fisicoquímicas y así sus aplicaciones, estabilidad y propiedades tecnológicas. En la configuración *cis*, los átomos de hidrógeno que posee cada

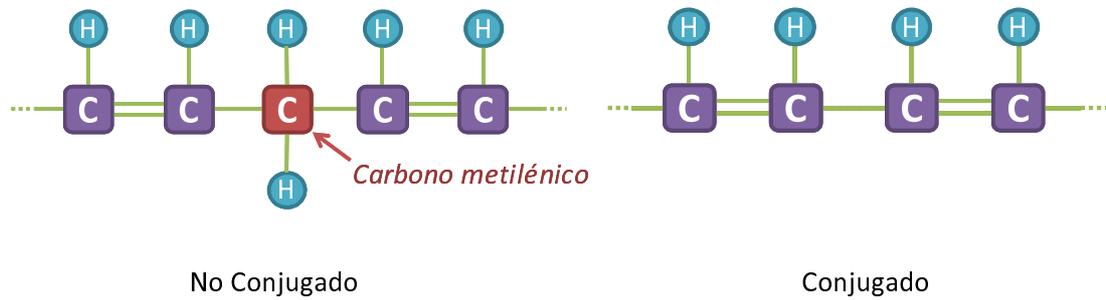
uno de los dos carbonos implicados en la insaturación están situados en el mismo plano referencial (Figura 4). En cambio, en la configuración *trans* los átomos de hidrógeno unidos a los carbonos involucrados en el doble enlace están situados en diferentes planos. Este cambio configuracional en el doble enlace, modifica no sólo las propiedades fisicoquímicas, sino que también tiene un impacto muy negativo sobre la salud y el riesgo de ECNT del consumidor (Mozaffarian y col., 2009).

Figura 4. Representación esquemática de la isomería geométrica de los ácidos grasos



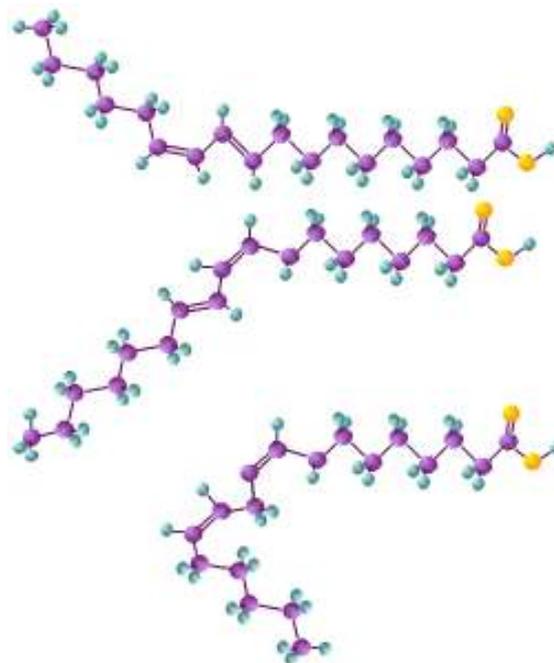
Otra isomería que pueden presentar los AGI es la posicional, donde las insaturaciones están localizadas en diferentes posiciones a lo largo de la cadena acíclica. La posición de los dobles enlaces de los AG naturales obedece a un patrón muy característico y conservado, y que en el caso de los AG di- o poli-enoicos, están siempre separados por un carbono metilénico intermedio que no participa de la estructura de insaturación “no conjugada” (Figura 5). Este es el caso de la estructura de la mayoría de los AGPI en su forma natural. Sin embargo, como consecuencia de la manipulación tecnológica de las grasas y aceites ya comentada, o en casos de la biohidrogenación que realizan los animales poligástricos en el rumen, es posible que un doble enlace cambie de posición, con la consiguiente desaparición del carbono metilénico intermedio y formación de una estructura “conjugada”. La conjugación de los dobles enlaces puede, además, ocasionar un cambio en la isomería configuracional del AG. Esto determina que, por ejemplo en un AG dienoico, cuyos dos dobles enlaces tienen isomería *cis* (*c*), uno de estos dobles enlaces, o ambos, pueden adoptar la isomería *trans* (*t*). Por lo cual podrán existir AG conjugados dienoicos con isomería *c,c* (poco probable); *c,t*; *t,c* ó *t,t* con distinto posicionamiento a lo largo de la cadena acíclica (Sanhueza y col. 2002).

Figura 5. Representación esquemática de la isomería posicional de los ácidos grasos



Los AG conjugados de mayor relevancia nutricional en la actualidad son los conjugados del ácido linoleico (CLA). Existen potencialmente numerosos isómeros CLA, pero los dos más importantes por su abundancia, importancia fisiológica y efectos metabólicos, tanto en animales de experimentación, como en humanos son: el isómero *cis9,trans11*-CLA (*c9,t11*-CLA), también conocido como “Ácido Ruménico”, y el isómero *trans10,cis12*-CLA (*t10,c12*-CLA) (Figura 6).

Figura 6. Estructura del ácido linoleico (inferior) y de de sus dos isómeros más importantes: *c9,t11*-CLA (medio) y *t10,c12*-CLA (superior)

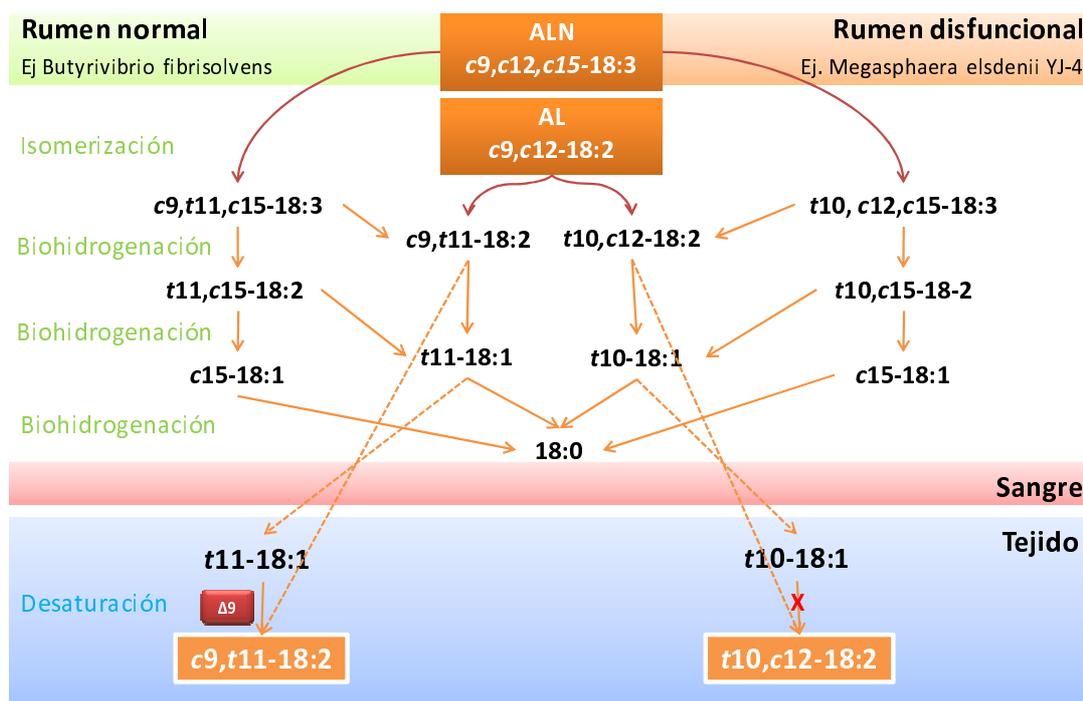


4.- FUENTES Y ORIGEN DE CLA

Los CLA de origen natural, están presentes en mayor concentración en los lípidos de la leche, productos lácteos y carne de rumiantes. El contenido de CLA en los productos lácteos varía aproximadamente entre 2,9 a 8,9 mg/g de grasa y en las carnes entre 1,2 a 6,2 mg/g de grasa, consistiendo aproximadamente 80% de *c9,t11*-CLA, 10% de *t10,c12*-CLA y otros AG conjugados minoritarios (Parodi, 1997). Los aceites vegetales y las grasas de los animales no rumiantes sólo contienen trazas de CLA.

En el rumen de los animales poligástricos (Figura 7), son producidos, durante la biohidrogenación de los AGPI, distintos isómeros CLA y AGMI como compuestos intermediarios (Kramer y col., 2004). Específicamente, en condiciones normales el *Butyrivibrio fibrisolvens* isomeriza el enlace *c12* a *t11*; mientras que el *Megasphaera elsdenii* en estados de disfunción isomeriza el enlace *c9* a *t10*. Normalmente los principales compuestos generados en este proceso son los isómeros *t11-18:1* (*trans*-vaccénico) y *c9,t11*-CLA y muy bajas cantidades de *t10,c12*-CLA. Sin embargo, existen diferentes factores que, afectando la población de las bacterias del rumen, pueden influir en la cantidad y proporción de los isómeros que se producen. Los AG formados, posteriormente pasan a circulación general, y se incorporan en los lípidos tisulares y en la grasa láctea. El ácido *trans*-vaccénico por acción de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa en diferentes tejidos, incluyendo la glándula mamaria, puede convertirse en ácido ruménico, mientras que el *t10-18:1* no puede hacerlo en *t10,c12*-CLA, por carencia de la enzima correspondiente. El equilibrio en la formación de diferentes isómeros puede modularse por la pastura y alimentación complementaria de los animales, como así también por el estado fisiológico del rumen de los mismos. Además, esta vía alternativa para la formación de *c9,t11*-CLA, puede ocurrir en el hígado y otros tejidos de no rumiantes, donde el ácido *trans*-vaccénico puede ser desaturado por la enzima $\Delta 9$ -desaturasa.

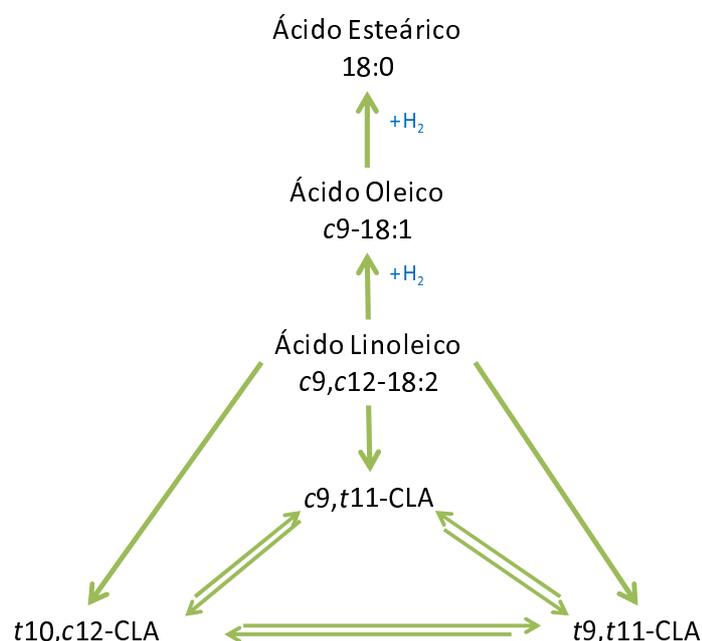
Figura 7. Biosíntesis de CLA en rumen y tejidos*



CLA, conjugado del ácido linoleico; ALN, ácido α -linolénico; AL, ácido linoleico; $\Delta 9$, $\Delta 9$ -desaturasa. *Adaptado de Kramer y col. (2004).

Dado las propiedades benéficas de los CLA, los mismos se comenzaron a preparar industrialmente para su comercialización, y el objetivo de la síntesis industrial es producir CLA de una composición característica y con máxima actividad biológica. Para ello, se han desarrollado métodos que permiten convertir el AL en una mezcla de CLA, conteniendo principalmente los isómeros $c9,t11$ -CLA y $t10,c12$ -CLA. Así, por isomerización alcalina (Figura 8) de aceites ricos en AL, como aceite de cártamo, girasol o maíz, se obtienen mezclas con cantidades equimoleculares de $c9,t11$ -CLA y $t10,c12$ -CLA (mixCLA) (aproximadamente 40% de cada isómero), y otros isómeros minoritarios (Pariza y col., 2001). Otro método para la obtención de CLA, incluye la isomerización del AL mediante la utilización de bacterias específicas (Kishino y col., 2003). Este método puede contribuir a la preparación de isómeros con mayor grado de pureza y máxima actividad biológica.

Figura 8. Esquema de la reacción de isomerización e hidrogenación del ácido linoleico para la síntesis química de CLA*



CLA, conjugado del ácido linoleico. *Adaptado de Bernas y col. (2003)

Es dable destacar que los niveles de CLA contenidos en los alimentos lácteos y cárnicos son muy inferiores (Tabla 1) que aquellos que se pueden obtener por suplementación con los CLA obtenidos de síntesis, y además es distinta la proporción relativa de sus constituyentes, por lo que los efectos biológicos que pueden ejercer son diferentes entre sí. En la actualidad, se han desarrollado alimentos suplementados con diferentes cantidades de CLA de síntesis, dentro del concepto de “alimentos funcionales”, como así también “suplementos dietarios” y “ayudas ergogénicas” para bajar de peso e incrementar la masa magra. También, se han desarrollado leches y derivados funcionales enriquecidos en ácido ruménico (Gagliostro, 2005; Gagliostro y Schroeder, 2007) los cuales podrían tener efectos benéficos para la prevención de ECNT.

Tabla 1. Contenido de total de CLA y *c9,t11*-CLA en diferentes alimentos*

Alimento	CLA Total (mg CLA/g grasa)	% <i>c9,t11</i>-CLA (mg <i>c9,t11</i>-CLA/100g CLA)
Grasa láctea	2,0 – 30,0	90
Manteca	9,4 – 11,9	91
Yogur	5,1 – 9,0	82
Helado	3,6	86
Queso procesado	3,2 – 8,9	17 – 90
Queso natural	0,6 – 7,1	17 – 90
Carne de vaca sin deshuesar (cocida)	4,7 – 9,9	65
Carne de vaca sin deshuesar (en bruto)	4,4 – 6,6	59
Carne de cerdo	0,6	82
Pollo	0,9	84
Salmón	0,3	nd
Aceites vegetales	0,2 – 0,7	38 – 47
Yema de huevo	0,6	82

CLA, conjugado del ácido linoleico; nd. No detectado. *Adaptado de Lawson y col. (2001), y Chin y col. (1992)

5.- EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CLA

El interés por los CLA comenzó a partir de que Pariza y su grupo descubrieran que dicho compuesto era el componente antimutagénico presente en la carne grillada (Pariza y Hargrave, 1985; Ha y col., 1987). Estudios posteriores por numerosos investigadores, han corroborado el potencial anticancerígeno de los CLA y han extendido sus efectos benéficos a otros estados fisiopatológicos relacionados con la obesidad, diabetes mellitus y ECNT, en general.

La mayoría de los efectos atribuidos a los CLA son causados principalmente por dos isómeros: el *t10,c12*-CLA y el *c9,t11*-CLA. Muchos de sus efectos biológicos son atribuidos a la acción directa de los mismos o al resultado de múltiples interacciones entre ellos ó con otras variables nutricionales. Las acciones diferenciales del *c9,t11*-CLA y

t_{10},c_{12} -CLA pueden ser consecuencia de la diferente estructura de dieno conjugado que presentan dichos isómeros y sus metabolitos, así como de su diferencial incorporación en las fracciones de lípidos tisulares y metabolización. En este sentido, los isómeros CLA pueden ser desaturados y elongados utilizando el mismo sistema enzimático que los AGI de las series n-3, n-6 y n-9, produciendo una variedad distinta de metabolitos (Figura 9).

Figura 9. Biosíntesis de ácidos grasos insaturados de cadena larga*



CLA, conjugado del ácido linoleico. *Adaptado de Banni y col. (2004a).

No obstante, a pesar de que en la Figura 9 se muestra la secuencia de desaturación y elongación completa para ambos isómeros, el t_{10},c_{12} -CLA parece ser más resistente a la formación de dieno conjugado de cadena larga como: los dienos conjugados del 20:3 y del 20:4, que el c_{9},t_{11} -CLA (Sébédio y col., 2001). Una posible explicación de esta diferencia podría radicar en que el dieno conjugado 18:3 formado a partir del t_{10},c_{12} -CLA sería más resistente a la elongación que aquel formado a partir del c_{9},t_{11} -CLA. Otra diferencia importante, es la incorporación diferencial de los isómeros y sus metabolitos en las distintas clases de lípidos tisulares. Específicamente el t_{10},c_{12} -CLA, el c_{9},t_{11} -CLA, y sus dienos conjugados del 18:3 y 20:3 son incorporados principalmente en lípidos neutros, mientras que el dieno conjugado 20:4 se incorpora primariamente en FL (Banni, y col.

2001). Además, el contenido de ambos isómeros, y de sus metabolitos de cadena larga en los lípidos tisulares, puede depender de la especificidad isomérica de los mismos sobre diferentes vías metabólicas, así, por ejemplo, ha sido observado que el isómero 10*t*,12*c*-CLA presenta una mayor capacidad de oxidación que el *c*9,*t*11-CLA (Martin y col., 2000; Banni y col., 2004a).

Otra particularidad con respecto a los efectos biológicos de los CLA, es que se ha observado una fuerte diferencia en la susceptibilidad a estos isómeros por parte de distintas especies. Así, los ratones son los que presentan mayor respuesta metabólica, seguida por los hamsters y luego por las ratas (Kim y col., 2002). Por otra parte, el sexo y la edad de los animales utilizados en los modelos experimentales puede ser otro factor importante en la respuesta a los CLA (Fernández-Quintela y col., 2004).

Los estudios de los efectos de los CLA sobre la salud humana son controversiales debido a los distintos tipos de CLA utilizados, las diferentes dosis, duración del tratamiento y características de los sujetos estudiados. Se han realizado estudios de corto y largo plazo, en adultos sanos y obesos, sedentarios o no. Algunos han mostrado efectos benéficos de los CLA sobre la grasa corporal, el perfil de lípidos plasmáticos, y la respuesta inmunológica; mientras que otros no han encontrado ningún efecto sobre estos parámetros, o incluso han hallado efectos adversos por la suplementación con CLA, como disminución de la sensibilidad a la insulina o aumento de marcadores de inflamación y estrés oxidativo (Bhattacharya y col., 2006; Miranda y col., 2013; Mele y col., 2013). A continuación se mencionan algunos de los principales efectos de los CLA.

5.1- Efectos sobre la carcinogénesis

Generalmente se ha asociado al *c*9,*t*11-CLA como el principal isómero con acciones benéficas frente a distintos tipos de cáncer (Ha y col., 1990). Otros autores (Ip y col., 2002; Masso-Welch y col., 2004), extendieron la efectividad a ambos isómeros y sobre la mayoría de las actividades anticancerígenas. En diferentes modelos animales y en humanos, las respuestas dependieron de la dosis de CLA utilizada, proporción de isómeros en la mezcla, forma de presentación, momento y duración del tratamiento, y tipo de tumor considerado (Bhattacharya y col., 2006; Oleszczuk y col., 2012). Específicamente, estudios en modelos animales reportaron que los CLA inhiben los tumores inducidos químicamente de glándula mamaria, piel, próstata y colon; así como la metástasis de los mismos

(Stachowska, 2008; Bialek y col., 2010; Eynard y Lopez, 2003). En contraposición a los efectos benéficos mencionados, Ip y col. (2007), observaron en ratones, que la suplementación con *t10,c12*-CLA estimuló el crecimiento y desarrollo del tumor mamario; y otros estudios con ratas, mostraron que los CLA no inhibieron el crecimiento y desarrollo de células tumorales de próstata, y más aún incrementaron el volumen del tumor (Cohen y col., 2003).

Existen pocos estudios que evaluaron la asociación entre la ingesta de CLA y el riesgo de cáncer en humanos. Un estudio prospectivo con mujeres entre 40 y 76 años de edad sugirió que una elevada ingesta de productos lácteos altos en grasa y CLA puede reducir el riesgo de cáncer colorrectal (Larsson y col., 2005). El estudio de Knekt y col. (1996) en mujeres sanas, mostró una relación inversa entre el consumo de leche y el riesgo de cáncer de mama, sugiriendo un efecto anticarcinogénico del CLA. En línea con este trabajo Aro y col. (2000), en mujeres postmenopáusicas con cáncer de mama hallaron una menor ingesta y concentración sérica de CLA comparado con aquellas mujeres sin el desarrollo de dicho tumor. Sin embargo, Larsson y col. (2009), en un estudio de cohorte en mujeres suecas, concluyeron que no existen claras evidencias de un efecto protector de los CLA contra el cáncer de mama.

Pese a que, por el momento, el mecanismo exacto mediante el cual los CLA ejercerían su efecto antitumoral permanece incierto, diferentes autores (Bhattacharya y col., 2006; Stachowska, 2008) proponen como potenciales mecanismos involucrados, una inhibición de la angiogénesis, interferencia con componentes del ciclo celular, alteración de la peroxidación de lípidos, alteración en el metabolismo de eicosanoides, cambios en la expresión génica, reducción de la proliferación celular, inducción de la apoptosis, entre otros.

5.2- Efectos sobre el peso y composición corporal

Park y col. (1997) fueron los primeros en reportar que los CLA dietarios podrían alterar la composición corporal en ratones. Los efectos de los CLA sobre la reducción del peso corporal fueron extendidos a distintos modelos animales (West y col., 1998; Park y col., 1999; Ostrowska y col., 1999; Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Sisk y col., 2001; Terpstra y col., 2002). A partir de ese momento, el efecto de los CLA sobre el peso y composición corporal ha sido una de las áreas temáticas más documentadas en la

investigación con CLA, llegando además, en muchos países, incluyendo la Argentina, a tener una alta repercusión como compuesto comercializado para bajar de peso. Esto es probablemente debido a que la obesidad es uno de los problemas más acuciantes en la salud pública. El efecto de los CLA sobre la reducción del peso y grasa corporal en roedores ha sido atribuida principalmente al isómero *t10,c12*-CLA (Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005a). Mientras que, muy pocos trabajos han reportado una disminución de los depósitos de grasa por la suplementación con *c9,t11*-CLA (Roos y col., 2005; Akahoshi y col., 2003).

La respuesta a los CLA sobre la grasa corporal mostró ciertas diferencias dependiendo de la especie, estado fisiológico y depósitos de grasa considerado. Los efectos del *t10,c12*-CLA sobre los cambios del tejido adiposo en distintas especies mostró una máxima reducción en ratones (60% - 80%), mientras que, modestos efectos fueron vistos en ratas, hamsters y cerdos (6% - 25%) (Andreoli y col., 2009; Purushotam y col., 2007; Miranda y col., 2009; Ostrowska y col., 1999). En ensayos clínicos en humanos, han sido reportadas inconsistentes respuestas al mixCLA y al *t10,c12*-CLA. Algunos autores han mostrado significativos efectos sobre la composición corporal, mientras que otros no observaron efecto alguno (Bhattacharya y col., 2006). La discrepancia entre los estudios humanos y animales no sólo parece estar centrada en la especie, sino que también en la dosis de CLA administrada. La dosis usada en estudios animales pudo ser hasta 20 veces mayor que la dosis usada en humanos (Nazare y col., 2007; Purushotham y col., 2007).

El efecto de los CLA y más específicamente del *t10,c12*-CLA de reducir la grasa corporal, ocurre como resultado de múltiples mecanismos. Ha sido sugerido que los CLA en animales de experimentación incrementan el gasto energético a través de un aumento en la tasa metabólica basal, en la termogénesis por aumento de la transcripción de proteínas desacoplantes, así como también en la oxidación de lípidos asociado a un incremento de la expresión de la enzima CPT-I, la cual está involucrada en la captación de AG por la mitocondria y cataliza el paso limitante de la oxidación de los mismos (LaRosa y col., 2006). Otro mecanismo involucrado en la reducción de la masa de tejido adiposo fue la inhibición de la lipogénesis (Brown y col., 2003, LaRosa y col., 2006). Específicamente, estos autores observaron una reducción de la actividad y/o expresión de las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS), y esteroil-CoA desaturasa (SCD). Una disminución de la actividad de la enzima LPL, clave en la captación de AG, contribuyó también a la reducción del tejido adiposo en roedores (Andreoli y col., 2009; Xu y col., 2003). Muchos de los mecanismos que subyacen a las modificaciones

enzimáticas indicadas en el tejido adiposo, y conducen al efecto antilipogénico en animales de experimentación, están relacionados a la capacidad de los CLA de inhibir factores de transcripción activadores de genes lipogénicos, como el receptor que activa la proliferación de peroxisomas- γ (PPAR- γ) y la proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides-1 (SREBP-1).

Por otro lado, efectos controversiales de los CLA han sido observados sobre la lipólisis en tejido adiposo. El tratamiento agudo con mixCLA o *t*10,*c*12-CLA, incrementó la lipólisis en adipocitos (Moon y col., 2006; Chung y col., 2005) y en tejido adiposo de ratones (Ippagunta y col., 2011, Ippagunta y col., 2013). En cambio, estudios en tejido adiposo de roedores alimentados a largo plazo con una mezcla comercial de CLA, no tuvieron efecto sobre dicho parámetro (Simón y col., 2005). La falta de un efecto crónico sobre la lipólisis puede ser debido a la depleción de los depósitos de TG en el tejido adiposo blanco, lo cual puede conducir a la acumulación ectópica de lípidos observado en el síndrome lipodistrófico.

Las alteraciones observadas en los mecanismos energéticos, oxidativos, lipogénicos y lipolíticos del tejido adiposo inducidas por la suplementación con CLA, ponen de manifiesto que estos isómeros de AG pueden reducir la acumulación de TG dentro del adipocito y, como consecuencia, disminuir su tamaño. Sin embargo, numerosos trabajos han demostrado que los CLA tienen también la capacidad de disminuir el número de células adiposas por supresión de la diferenciación y proliferación de los adipocitos, así como por una mayor apoptosis de los mismos. Estos efectos pueden ser mediados tanto por la acción antagonista de los CLA sobre el PPAR- γ , el cual cumple un rol clave en la conversión de preadipocitos a adipocitos, como por una mayor expresión del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), potente inductor de la apoptosis en tejido adiposo blanco (Kennedy y col., 2008, Poirier y col., 2006; Tsubuyama-Kasaoka y col., 2000).

Los cambios inducidos por los CLA en el tejido adiposo no solamente tienen un alto impacto en el almacenamiento de la energía, sino también pueden ser claves en diferentes mecanismos homeostáticos metabólicos. Así, modificaciones en el tejido adiposo, pueden conducir a alteraciones en la liberación de adipoquinas proinflamatorias afectando muchos procesos fisiológicos vinculados principalmente al metabolismo lipídico y glucídico. Por lo tanto, cambios en la grasa visceral se correlacionan con modificaciones en la respuesta inflamatoria, sensibilidad a la insulina, respuesta inmune y enfermedades cardiovasculares.

La reducción de la adiposidad, ha sido en algunos trabajos acompañada de un incremento de la masa muscular de animales de experimentación (Park y col., 1997; DeLany y col., 2000), humanos saludables (Thom y col., 2001) o con sobrepeso u obesos (Blankson y col., 2000). Pariza y col. (2000) propusieron que los CLA podrían prevenir el catabolismo proteico e incluso aumentar el tamaño muscular como consecuencias de cambios inducidos sobre la regulación y/o acción del TNF- α e interleuquina-1, citoquinas que afectan profundamente el catabolismo muscular y la respuesta inmune. Además, Butz y col (2006) demostraron que los CLA, afectando la producción de eicosanoides y citoquinas, también podrían prevenir la pérdida de peso y el catabolismo muscular que acompaña a la administración de endotoxinas y otras enfermedades. Así, estas evidencias indicarían una posible conexión entre cambios en la masa corporal magra y la respuesta inflamatoria.

5.3- Efectos sobre la diabetes y el metabolismo glucídico

El conocimiento de los efectos de los CLA sobre el metabolismo glucídico y la sensibilidad a la insulina es controversial y, en términos generales, la variabilidad en los resultados dependió de factores como: duración del estudio, estado metabólico (normal vs. diabético) y especie utilizada. En modelos de ratas obesas y diabéticas, se ha observado un efecto benéfico por la suplementación con mezcla equimolecular de CLA sobre la resistencia insulínica y los niveles de glucosa plasmática (Henriksen y col., 2003), y dicho efecto parece deberse a la acción del isómero *t10,c12*-CLA. En forma diferente, en ratones el *t10,c12*-CLA parece inducir insulino-resistencia con hiperinsulinemia y normo o hiperglucemia (Delany y col., 1999; Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000). La respuesta diferencial observada en el ratón, puede estar asociada con la marcada pérdida de grasa corporal, y la consecuente alteración de la concentración de adipoquinas plasmáticas.

Estudios en humanos bajo situaciones fisiológicas diferentes han aportado disímiles evidencias. Los CLA en sujetos sedentarios jóvenes en buen estado de salud mejoraron la sensibilidad insulínica (Eyjolfson y col., 2004). En estudios a corto (4 semanas) (Riserus y col., 2001) y largo plazo (1-2 años) (Gaullier y col., 2004; Gaullier y col., 2005) realizados en sujetos obesos o con sobrepeso, la suplementación con CLA no causó cambios en los niveles de insulina y glucosa plasmática. En cambio, en pacientes con alto riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, la suplementación con *t10,c12*-CLA o con *c9,t11*-

CLA durante 12 meses disminuyó la sensibilidad a la insulina (Riserus y col., 2002; Riserus y col., 2004), y la misma estuvo relacionada con el estrés oxidativo generado por los CLA.

5.4- Efectos sobre la salud cardiovascular y el metabolismo lipídico

No ha sido observada una respuesta unívoca de los CLA sobre la salud cardiovascular. Un efecto muy favorable ha sido reportado, tanto con la mezcla equimolecular de CLA, como con los isómeros individuales, sobre las lesiones ateroscleróticas en conejos y hamsters (Kritchevsky y col., 2000; Valeille y col., 2005). No obstante, el efecto de los CLA sobre el desarrollo y progresión de la lesión aterosclerótica en otros modelos, como por ejemplo en ratones, es controversial (Munday y col., 1999; Toomey y col., 2006). Asimismo, una variada respuesta sobre factores de riesgo aterogénico ha sido documentada en diferentes tipos de estudios. En este sentido, los CLA redujeron los niveles de Colesterol, TG y LDL-colesterol, y aumentaron o mantuvieron normales los de colesterol-HDL en un número de modelos animales (Baddini Feitoza y col., 2009; Bhattacharya y col., 2006). En hamsters, que son modelos experimentales muy apropiados para el estudio de aterosclerosis, la suplementación con *c9,t11*-CLA tuvo un efecto benéfico sobre los niveles de colesterol-HDL y sobre la relación colesterol-HDL/colesterol no HDL (Valeille y col., 2005). En cambio el mixCLA, y el *t10,c12*-CLA tuvieron una respuesta disímil. Gavino y col. (2000) encontraron, que el mixCLA disminuyó los niveles de TG, Colesterol total y colesterol no HDL; mientras que de Deckere y col. (1999) observaron que tanto el mixCLA como el *t10,c12*-CLA aumentaron las concentraciones séricas de TG, TG-VLDL y colesterol-VLDL. Es probable que los CLA ejerzan su función sobre las lipoproteínas plasmáticas mediante la modulación del metabolismo de los AG en el hígado, a través de la participación de reguladores, como: PPAR, SREBP y/o la SCD (Bhattacharya y col, 2006; Choi y col., 2001), y también mediante la regulación de la remoción de lipoproteínas ricas en TG (Andreoli y col., 2009).

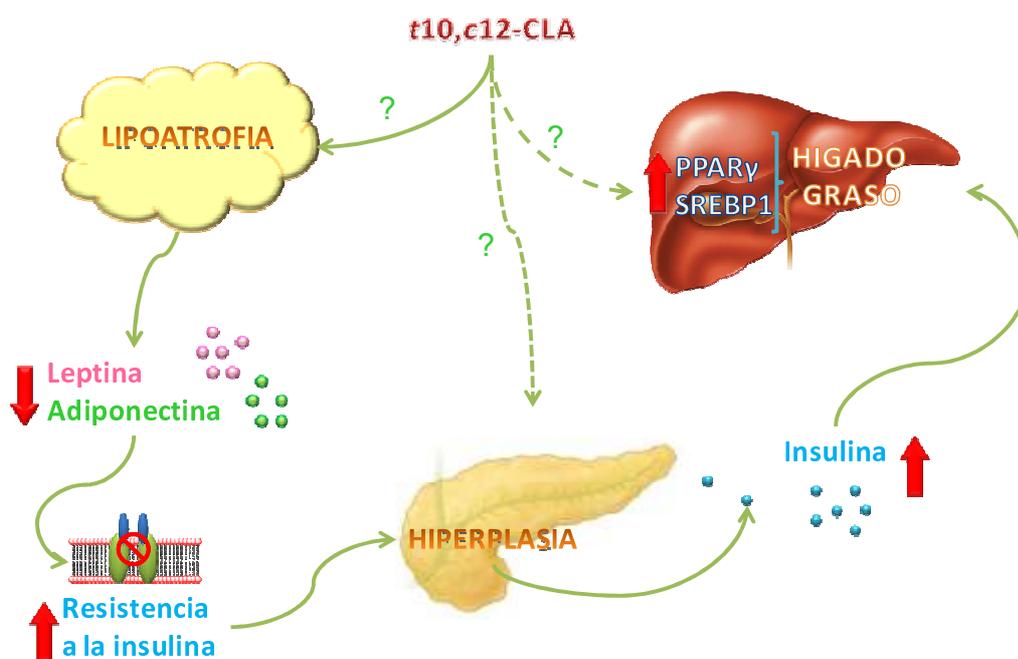
Los resultados de estudios en humanos no han reflejado en forma directa los efectos benéficos vistos por la ingesta de CLA en algunos modelos animales. Los datos reportados en humanos son principalmente sobre los niveles de lípidos y lipoproteínas aterogénicas, y existe una considerable variación entre los diferentes estudios. Mientras algunos autores no encontraron cambios en los niveles de lípidos y lipoproteínas plasmáticas por la

suplementación con CLA (especialmente con mixCLA y aceite enriquecido en *c9,t11*-CLA), tanto en voluntarios saludables (Smedman y Vessby, 2001; Mele y col., 2013), como con sobrepeso/obesidad (Riserus y col., 2004), otros investigadores reportaron que los CLA mejoraron el perfil lipídico en ambos tipos de pacientes (Gaulhier y col., 2005). En contraste, Tricon y col. (2004) en su estudio con hombres sanos, hallaron que la suplementación con *t10,c12*-CLA incrementó los niveles plasmáticos de TG y las relaciones colesterol-LDL/colesterol-HDL y colesterol total/ colesterol-HDL.

Los mecanismos de acción que conducen a diferentes efectos sobre los lípidos circulantes, son el resultado de acciones multifactoriales en diferentes tejidos. En este sentido, el hígado y el tejido adiposo, pueden ser los dos tejidos más importantes en el desarrollo de los efectos benéficos o deletéreos de los diferentes CLA. Los efectos en el metabolismo lipídico a nivel hepático en humanos, al menos a nuestro conocimiento, es desconocido; mientras que muy bien descritos son los efectos en modelos experimentales, fundamentalmente con *t10,c12*-CLA en ratones. En este sentido, existen suficientes evidencias que ratones alimentados con *t10,c12*-CLA desarrollan hepatomegalia y esteatosis hepática por redistribución de los depósitos de grasa (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002). Entre los mecanismos que conducen a la acumulación hepática de lípidos podemos considerar, incremento de la afluencia de AG, aumento de la lipogénesis, y una alterada oxidación de AG y secreción insuficiente de TG para impedir la acumulación de lípidos (Vyas y col., 2012). Probablemente, estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, y pueden actuar de manera coordinada para acelerar el desarrollo y la progresión al hígado graso. Muchos de los efectos del *t10,c12*-CLA sobre la acumulación de TG hepáticos, pueden ser mediados por la acción sobre diferentes factores de transcripción que regulan genes claves del metabolismo lipídico. Así, ha sido observado que el tratamiento con *t10,c12*-CLA produce un aumento en la expresión de SREBP-1c y del PPAR- γ a nivel hepático (Rasooly y col., 2007; Clément y col., 2002). En incremento en los factores de transcripción ha sido atribuido a la hiperinsulinemia generada por el *t10,c12*-CLA en ratones. Estas alteraciones son la resultante del cuadro lipoatrófico descrito por Poirier y col. (2005a), el cual pareciera tener su origen primario a nivel del tejido adiposo. Así, estos autores sostienen que la depleción de los depósitos de grasa inducidos por el *t10,c12*-CLA en los ratones, conducen a una reducción en la producción de adipoquinas (leptina y adiponectina), lo cual reduce la sensibilidad insulínica periférica. Esta alteración, conduce, a su vez, a hiperplasia de las células β -pancreáticas e hiperinsulinemia que incrementa la acumulación de lípidos en el hígado, a través de la

inducción de diferentes vías metabólicas. Además, la hiperinsulinemia es la responsable del incremento de la síntesis proteica e incremento del tamaño hepático (Figura 10). Estos mecanismos de acción responsables de las alteraciones lipídicas hepáticas, y en general del síndrome lipoatrófico, no son observados cuando los ratones fueron alimentados con dietas suplementadas solo con el isómero *c9,t11*-CLA (Clément y col., 2002). De igual forma, no se evidenció síndrome lipoatrófico en otras especies alimentadas con *t10,c12*-CLA (Purushotham y col., 2007; Faulconnier y col., 2004; Zabala y col., 2004).

Figura 10. Representación esquemática del síndrome lipoatrófico inducido por el *t10,c12*-CLA en ratones



*Adaptado de Poirier y col. (2005)

5.5- Efectos sobre la respuesta inflamatoria y el sistema inmune

Los cambios inducidos por los CLA en el metabolismo lipídico a nivel hepático y en tejido adiposo pueden estar asociados a modificaciones en la biosíntesis de eicosanoides, como también en la producción de citoquinas. Por otro lado pueden actuar modulando la respuesta inmune a través de la modificación en la producción de inmunoglobulinas (Ig) y proliferación celular. De esta forma pueden actuar mejorando procesos inflamatorios, como fue descrito por Changua y col. (2005), modulando la respuesta con positivas implicancias para la salud.

Dada las similitudes estructurales entre los isómeros CLA y el AL, parece probable que, al menos algunas de las actividades de los CLA puedan ser mediadas vía una modificación del metabolismo del AA, con el consecuente cambio en la síntesis de eicosanoides y otros mediadores lipídicos derivados del mismo (O'Shea y col., 2004). En este sentido, ha sido reportado que los CLA, pueden reducir la producción de prostaglandinas, particularmente PGE₂, en una variedad de condiciones metabólicas y en diferentes tejidos (Ogborn y col., 2003; Nakanishi y col., 2003). Alternativamente, los isómeros CLA podrían ser desaturados y elongados, y luego metabolizados para producir diferentes eicosanoides derivados de los CLA y otros mediadores que exhibirían actividades biológicas por sí mismos (Sébédio y col., 1997). Además, ha sido reportado que los CLA tienen la capacidad de modular la función de macrófagos, los cuales son responsables de la producción de la mayoría de las citoquinas inflamatorias.

Ha sido reportado que ambos isómeros CLA modulan positivamente la función inmune específica por incremento de la producción de IgG, IgM e IgA, y reducción de IgE (Yamasaki y col., 2003; Ramirez-Santana y col. 2011). Además, se ha observado un incremento en la proliferación de células TCD-8+ por los CLA (Yamasaki y col., 2003).

Estudios en humanos han demostrado que el efecto sobre la respuesta inmune por la suplementación con CLA, es semejante, en algunos casos, a la observada en modelos animales. Específicamente, el estudio de Albers y col. (2003) mostró que hombres sanos que consumieron mixCLA como suplemento dietario durante 12 semanas, alcanzaron niveles significativos de anticuerpos contra la hepatitis B comparado con el grupo control. Song y col. (2005) observaron que hombres y mujeres saludables suplementadas con mixCLA, incrementaron los niveles plasmáticos de IgA e IgM y disminuyeron los de IgE. Además, en los mismos pacientes, la suplementación con CLA también disminuyó los niveles de citoquinas proinflamatorias, TNF- α e IL-1 β , e incrementó los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10.

6.- INTERACCIÓN DE LOS CLA CON DISTINTAS GRASAS DIETARIAS

Los isómeros CLA pueden ser considerados como una "nueva" familia de AGPI. Los mismos pueden ser incorporados a los lípidos tisulares, tienen diferente velocidad de oxidación, pueden producir una variedad distinta de metabolitos, pueden alterar la biosíntesis de AGPI y eicosanoides, entre otros, y de esta manera producir diferentes cambios metabólico-nutricionales en humanos y animales de experimentación. No obstante, como se mencionó anteriormente, si bien los CLA tienen efectos biológicos específicos dependiendo del isómero que estemos considerando, las interacción con AGI de diferentes familias podrían potenciar, atenuar e incluso cambiar el efecto específico que *per se* cada uno de ellos posee.

En este contexto, algunos estudios han investigado el efecto de la suplementación simultánea de isómeros CLA con AGI n-3, n-6 y n-9, y la mayoría de ellos estuvo orientado a evaluar el potencial efecto benéfico que distintos AGI individuales pueden tener sobre las alteraciones presentes en el síndrome lipoatrófico generado por la suplementación con *t10,c12*-CLA o con mixCLA, en ratones. Específicamente, ratones alimentados con *t10,c12*-CLA y aceite de lino, mostraron que, una cantidad relativamente pequeña de ALN (0,3 g/100 g de dieta) previno completamente la insulino resistencia y, parcialmente, el hígado graso inducidos por el *t10,c12*-CLA, preservando el efecto antiobesogénico del mismo (Kelley y col., 2009). La suplementación con DHA a la dieta CLA atenuó el hígado graso inducido por el mixCLA en ratones, a través de la reducción de la síntesis hepática de AG (Yanagita y col, 2005). Fedor y col. (2012) mostraron que, el DHA evitó los cambios ocasionados por el *t10,c12*-CLA sobre la expresión de genes hepáticos involucrados en la síntesis y oxidación de AG, previniendo de esta manera la enfermedad del hígado graso (NAFLD) inducida por dicho isómero en ratones. Sin embargo, la magnitud del efecto protector del DHA fue dependiente de la dosis del mismo en la dieta (0,5% vs 1,5%). En concordancia con los trabajos anteriores, Ide (2005) observó también en ratones que la adición de distintas dosis de aceite de pescado (1,5%; 3% y 6%) a dietas conteniendo mixCLA, redujo en una manera dosis-dependiente parámetros lipogénicos, lo cual fue acompañado por una disminución de los niveles de TG en hígado. Estos cambios, a diferencia de los observados en trabajos anteriores, se produjo en paralelo con un aumento en la masa de tejido adiposo.

También se observaron efectos beneficios por la administración simultánea de CLA con AGI de la familia n-6 y n-9. En ratones, la suplementación con ácido γ -linolénico (GLA) ó AA a una dieta conteniendo mezcla equimolecular de *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA, evitó el hígado graso y mantuvo la reducción del tejido adiposo inducidos por el CLA. La prevención de la esteatosis por el GLA y el AA dependió, al menos en parte, del aumento en los niveles hepáticos de PGE₂ (Nakanishi y col., 2004; Oikawa y col., 2009). Respecto a los AG de la familia n-9, muy pocos trabajos han reportado sus efectos por la administración simultánea con CLA. No obstante, Reardon y col. (2012) mostraron que cuando adipocitos humanos tratados con *t10,c12*-CLA fueron suplementados con ácido oleico, este último disminuyó la expresión de genes inflamatorios en una manera dosis-dependiente, y restauró el contenido de lípidos en dichas células.

En virtud del empleo de CLA comerciales como ayudas ergogénicas y antiobesogénicos en humanos, y a pesar de que existen trabajos que muestran el efecto de la suplementación simultánea de la mezcla comercial de CLA con distintos AGI individuales en modelos animales, al menos a nuestro conocimiento, no existen estudios sistemáticos nutricionales sobre efectos benéficos y/o deletéreos de la suplementación con CLA natural ó comercial a aceites comestibles de uso habitual conteniendo diferentes proporciones de AG n-9, n-6 y n-3.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En función de todo lo anteriormente expuesto, se plantean los objetivos del trabajo de Tesis:

OBJETIVO GENERAL

Investigar algunos efectos metabólico-nutricionales potencialmente benéficos y/o adversos de las interacciones del *c9,t11*-CLA y de la mezcla *c9,t11*-CLA + *t10,c12*-CLA con aceites ricos en diferentes tipos de AGI en animales de experimentación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A- Determinar la eficiencia energética y nitrogenada de las dietas.
- B- Explorar las probables alteraciones en la composición corporal y retención nitrogenada corporal.
- C- Investigar las potenciales alteraciones en parámetros del metabolismo intermedio lipídico y glucídico en plasma, hígado y músculo.
- D- Analizar la composición de AG de los lípidos circulantes y tisulares, y correlacionarla con las potenciales alteraciones observadas.
- E- Estudiar los mecanismos regulatorios de los niveles de TG plasmáticos mediante: 1) secreción hepática de TG “*in vivo*”, y 2) remoción plasmática de TG pre- β -lipoproteínas.
- F- Cuantificar la actividad de enzimas lipogénicas (sintasa de ácidos grasos, enzima mállica y glucosa-6-P-deshidrogenasa) en hígado y tejido adiposo epididimal, y de la enzima clave de la β -oxidación, la carnitin palmitoil transferasa (CPT-I) en hígado y músculo gastrocnemio.
- G- Determinar el daño hepático a través del estudio de las enzimas marcadoras de daño hepático a nivel plasmático y análisis histológico.
- H- Evaluar el posible daño peroxidativo y defensas hepáticas antioxidantes.

MATERIALES
Y
MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- ANIMALES

Para profundizar la caracterización de los posibles efectos metabólico-nutricionales potencialmente benéficos y/o adversos de las interacciones del *c9,t11*-CLA y de la mezcla *c9,t11*-CLA + *t10,c12*-CLA con aceites ricos en diferentes tipos de AGI, se emplearon ratones macho de dos semanas post-destete de la cepa CF-1 provistos por el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, o propios reproducidos en las instalaciones de nuestro bioterio. Durante el período experimental fueron mantenidos en condiciones controladas (23 ± 2 °C y ciclo luz-oscuridad de 12 horas). Todos los estudios fueron programados según normas internacionales para el uso de animales de laboratorio (Guide to the Care and Use of Experimental Animals of Laboratory).

2.- DIETAS

Las dietas fueron elaboradas en base a las recomendaciones emanadas del comité *ad hoc* del “American Institute of Nutrition” para roedores en crecimiento – (AIN-93G, Reeves, 1993), conteniendo un 7% de grasa dietaria.

- **Oliva (O):** 7 % de aceite de oliva.
- **Maíz (M):** 7 % de aceite de maíz.
- **Canola (C):** 7 % de aceite de canola.
- **O+AR:** sustituye 1% del aceite de oliva de la dieta “Oliva” por 1% de aceite rico en Ácido Ruménico- *c9,t11*-CLA- (AR).
- **M+AR:** sustituye 1% del aceite de maíz de la dieta “Maíz” por 1% de AR.
- **C+AR:** sustituye 1% del aceite canola de la dieta “Canola” por 1% de AR.
- **O+Mix:** sustituye 1% del aceite de oliva de la dieta “Oliva” por 1% de aceite mixCLA- mezcla equimolecular de *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA- (Mix).
- **M+Mix:** sustituye 1% del aceite de maíz de la dieta “Maíz” por 1% de Mix.
- **C+Mix:** sustituye 1% del aceite canola de la dieta “Canola” por 1% de Mix.

Tabla 2. Composición de las dietas utilizadas (g/Kg dieta)

	O	O+AR	O+Mix	M	M+AR	M+Mix	C	C+AR	C+Mix
Almidón	529,5	529,5	529,5	529,5	529,5	529,5	529,5	529,5	529,5
Caseína	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Sacarosa	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Aceite de Oliva	70	60	60	-	-	-	-	-	-
Aceite de Maíz	-	-	-	70	60	60	-	-	-
Aceite de Canola	-	-	-	-	-	-	70	60	60
Aceite rico en AR	-	10	-	-	10	-	-	10	-
Aceite mixCLA	-	-	10	-	-	10	-	-	10
Fibra	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Minerales	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Vitaminas	10	10	10	10	10	10	10	10	10
L-Cisteína + L-Metionina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Energía (KJ/Kg)	16569	16569	16569	16569	16569	16569	16569	16569	16569

Se emplearon aceites de oliva, maíz y canola como fuentes representativas de aceites enriquecidos en AG n-9, n-6 y n-3, respectivamente. Específicamente la relación ácido oleico/AL/ALN en aceite oliva fue: 55,2/17,2/0,7, en el aceite de maíz: 32,0/51,3/0,9 y en el aceite de canola: 61,1/18,4/8,6. Los AG isoméricos fueron aportados por un aceite enriquecido en ácido ruménico, constituido principalmente por *c9,t11*-CLA (60,5%), *t10,c12*-CLA (17,8%); y una mezcla comercial de los isómeros *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA (39,0% y 38,8% respectivamente) gentilmente provistas por Lipid Nutrition B.V. Si bien los niveles de los isómeros individuales de CLA en productos lácteos son variables, el aceite rico en ácido ruménico empleado, contiene una relación de isómeros: *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA que tiende a mimetizar la relación o porcentaje de los mismos presentes en leches enriquecidas naturalmente con CLA (Mele y col., 2013; Choi y col., 2007; Anadón y col., 2010).

Todas las dietas cumplieron las recomendaciones de AG esenciales, para así evitar cualquier posible alteración como consecuencia de un déficit dietario de los mismos. La composición de AG de los aceites utilizados, como metil ésteres, fue determinada por cromatografía gaseosa (CG) con un cromatógrafo Shimadzu 2014 equipado con detector de ionización de llama. Los metil ésteres de AG fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de los estándares comerciales. La composición de AG de los aceites utilizados se muestra en la Tabla 3. Cada dieta fue ofrecida diariamente durante todo el período experimental.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos de los aceites utilizados (%)

	Aceite de Oliva	Aceite de Maíz	Aceite de Canola	AR	Mix
14:0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
16:0	17,1	12,2	4,0	3,9	5,9
<i>c</i> 9-16:1	2,0	0,1	0,2	0,0	0,0
17:0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
18:0	1,6	1,9	2,2	1,0	1,2
<i>c</i> 9-18:1	55,2	32,0	61,1	13,4	9,1
<i>c</i> 11-18:1	4,8	0,5	3,5	0,5	0,4
<i>c</i> 9, <i>c</i> 12-18:2	17,2	51,3	18,4	1,5	1,1
<i>c</i> 9, <i>t</i> 11-18:2	0,0	0,0	0,0	60,5	39,0
<i>t</i> 10, <i>c</i> 12-18:2	0,0	0,0	0,0	17,8	38,8
20:0	0,3	0,5	0,5	0,0	0,0
<i>c</i> 11-20:1	0,2	0,3	0,9	0,0	0,0
<i>c</i> 9, <i>c</i> 12, <i>c</i> 15-18:3	0,7	0,9	8,6	0,0	0,0
22:0	0,1	0,2	0,2	0,1	0,0
24:0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
Otros	0,7	0,0	0,2	1,2	4,7

3.- GRUPOS EXPERIMENTALES Y PROTOCOLO DE TRABAJO

Ratones CF-1 macho aclimatados durante dos semanas luego del destete en un ambiente con luz-oscuridad de 12 hs, a temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), con libre acceso al agua y a una dieta estándar de laboratorio, fueron distribuidos aleatoriamente en 9 grupos experimentales y alimentados durante 30 días con alguna de las dietas anteriormente mencionadas. Así, los grupos dietarios utilizados a lo largo del trabajo de tesis fueron identificados como: O, O+AR, O+Mix, M, M+AR, M+Mix, C, C+AR, C+Mix. Durante todo el tratamiento dietario se realizó el seguimiento de peso de los ratones. Al finalizar, los mismos fueron sacrificados (9.00 – 11.00 AM) bajo anestesia (1 mg acepromicina + 100 mg ketamina/Kg peso). Se extrajeron muestras de sangre por punción cardíaca con y/o sin anticoagulante según corresponda, y las mismas se centrifugaron a 4°C . Alícuotas de plasma y/o suero obtenidos fueron congeladas a -20°C hasta el momento de su valoración. Hígado, tejido adiposo epididimal (TAE) y músculo gastrocnemio fueron extraídos en forma completa, y muestras de cada uno de ellos fueron congeladas con una pinza enfriada en nieve carbónica, pesadas, morterizadas y conservadas en ultrafreezer (-80°C) hasta su procesamiento.

4.- DETERMINACIONES REALIZADAS

En las experiencias destinadas a evaluar la absorción aparente de proteína y grasa dietaria, la composición corporal y la eficiencia energética se procedió de la siguiente manera: diariamente se pesaron los animales, registrándose la ingesta de alimento y recolectando en forma separada la materia fecal y los restos de alimento. La totalidad de la materia fecal se recogió en recipientes metálicos que se colocaron en estufa a 60°C hasta peso constante. Alícuotas de esta materia fecal deshidratada se conservaron a -20°C para la posterior cuantificación de nitrógeno (N) y grasa. Para determinar el contenido de humedad, grasa y N del alimento, muestras de las distintas dietas se secaron hasta peso constante.

4.A.- ABSORCIÓN APARENTE DE PROTEÍNA DIETARIA

El contenido de proteína presente en el alimento y materia fecal de los animales se determinó mediante el método de Kjeldahl (Windham, 1999). Básicamente para ello, la muestra se digirió con H₂SO₄ concentrado con el fin de destruir oxidativamente la materia orgánica. De esta manera el N fue transformado en H₃N, el cual queda retenido como (H₄N)₂SO₄. El proceso fue acelerado mediante catalizadores como CuSO₄ y Se, y por elevación de la temperatura de ebullición del H₂SO₄ por el agregado de Na₂SO₄ o K₂SO₄ anhidro. Toda la materia orgánica fue transformada en CO₂ y H₂O, que se eliminó por calentamiento. El H₄N⁺ se transformó en H₃N por adición de una solución alcalina (NaOH concentrado). Este H₃N fue arrastrado por vapor de agua y recibido en un frasco colector conteniendo HCl 0,1N. El exceso de HCl que no reaccionó con el H₃N se tituló con NaOH 0,1N. Los miliequivalentes de N cuantificados corresponden a la diferencia entre los miliequivalentes de HCl totales presentes en el frasco colector y los miliequivalentes en exceso. El contenido total de N de la comida ingerida seca y de la materia fecal seca se multiplicó por 6,25 con el fin de estimar la cantidad de proteínas presentes (Rafecas y col, 1994). A partir del conocimiento de los mg proteína ingerido/24 hs y mg proteína excretados en materia fecal/24 hs, se calculó la absorción aparente de proteína dietaria, como el porcentaje de la proteína ingerida que no fue excretada en materia fecal;

$$\text{Absorción aparente de proteína (\%)} = \frac{\text{Proteína ingerida (mg/día)} - \text{Proteína fecal (mg/día)}}{\text{Proteína ingerida (mg/día)}} \times 100$$

4.B.- ABSORCIÓN APARENTE DE LÍPIDOS DIETARIOS

Ingestas y excretas diarias fueron llevadas a sequedad y posteriormente se realizó una extracción con éter de petróleo utilizando el extractor de Twysselman. La grasa extraída fue evaporada en estufa de vacío y la grasa total fue gravimétricamente medida (Windham, 1999).

La absorción aparente de grasa dietaria, como índice de biodisponibilidad, fue calculada como porcentaje de grasa ingerida que no fue excretada en materia fecal:

$$\text{Absorción aparente de grasa (\%)} = \frac{\text{Grasa ingerida (mg/día)} - \text{Grasa fecal (mg/día)}}{\text{Grasa ingerida (mg/día)}} \times 100$$

4.C.- COMPOSICIÓN CORPORAL

Animales de todos los grupos dietarios fueron anestesiados y eviscerados. Las carcasas se pesaron y colocaron en estufa a 60°C hasta peso constante, determinándose así el contenido de agua de las mismas. Cada una de las carcasa secas fueron trituradas hasta obtener una muestra homogénea, a partir de la cual, distintas alícuotas se utilizaron para la determinación del contenido de proteínas y grasa.

4.C.1.- Determinación del contenido de agua

El contenido de agua se determinó por secado térmico (Windham, 1999). Para ello, las carcasas fueron pesadas y colocadas en estufa a 60°C hasta peso constante. Los resultados se expresaron como g de agua/100 g de carcasa.

4.C.2.- Determinación del contenido de proteínas

La cuantificación de N en alícuotas de carcasas secas y trituradas se realizó mediante el método de Kjeldahl descrito anteriormente en el ítem 4.A. El contenido total de N de las carcasas secas se multiplicó por 6,25 con el fin de estimar la cantidad de proteínas presentes (Rafecas y col, 1994). Los resultados se expresaron como g de proteínas/100 g de carcasa.

4.C.3.- Determinación del contenido de grasa

La cuantificación del contenido de grasa total se realizó en alícuotas de carcasas secas mediante el método extractivo con solvente descrito en el ítem 4.B. Los resultados se expresaron como g de grasa/100 g de carcasa.

4.D.- RETENCIÓN ENERGÉTICA CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA

4.D.1.- Retención energética corporal

La retención de proteínas y grasa en carcasa se calculó como la diferencia entre la cantidad de proteínas ó de grasa, respectivamente, en carcasa de animales posterior al tratamiento dietario y previo al mismo en un grupo control de características semejantes al grupo de inicio experimental. Se emplearon los factores de conversión de Canolty (Canolty y col., 1976): 18,62 KJ/g de proteínas y 39,12 KJ/g de lípidos para transformar en energía (KJ) el contenido de proteínas y grasas. La retención energética total corporal diaria (RETC) en la carcasa se calculó en función de la ganancia diaria de peso como proteínas y como grasa de cada animal.

$$\text{RETC (KJ/día)} = \text{REPC (KJ/día)} + \text{REGC (KJ/día)}$$

Donde:

Retención Energética Proteica Corporal Diaria (REPC) = g proteína/día x 18,62 KJ/g proteínas

Retención Energética de Grasa Corporal Diaria (REGC) = g grasa/día x 39,12 KJ/g grasas

4.D.2.- Eficiencia energética

La eficiencia energética (EE) durante el período experimental se calculó mediante el cociente entre la RETC y la ingesta energética (IE) (Dulloo y Girardier, 1992; Bell y col,

1995; Specter y col, 1995). La IE se calculó multiplicando la cantidad de alimento consumido por el número de KJ aportados por gramo de dieta.

$$EE = \frac{\text{RETC (KJ/día)}}{\text{IE (KJ/día)}} \times 100$$

4.E.- CUANTIFICACIONES EN SUERO/PLASMA

4.E.1.- Concentración de triglicéridos sérico

La concentración de TG en suero se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (SB, Santa Fe, Argentina). El método se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los TG en glicerol y AG libres, por medio de una combinación especial de lipasas. El glicerol es fosforilado a glicerol-fosfato en presencia de glicerol quinasa y ATP, luego este derivado fosforilado, es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de la glicerol fosfato oxidasa. El indicador final de color es una quinoneimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La quinoneimina posee un pico de absorción a 510 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de TG presentes en la muestra. Los resultados se expresaron en mmol/L.

4.E.2.- Concentración de colesterol total sérico

La concentración de Col en suero se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (SB, Santa Fe, Argentina). El método se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los ésteres de Col por una colesterol esterasa liberando colesterol y AG. El Col producido en esta reacción, más el colesterol libre, es oxidado por acción de una colesterol oxidasa, con formación de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4-Aminofenazona/Fenol a un compuesto de color rojo. La quinoneimina roja formada posee un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de

color es directamente proporcional a la concentración de Col presente en la muestra. Los resultados se expresaron en mmol/L.

4.E.3.- Concentración de fosfolípidos séricos

El nivel de FL séricos se evaluó mediante el contenido de fósforo presente en un extracto de lípidos séricos obtenido mediante el método de Folch y col. (1957).

La extracción y purificación de los lípidos del suero se llevo a cabo mediante la homogenización de una alícuota de suero con la mezcla de solventes Cloroformo:Metanol 2:1 (v/v), en una proporción 1/20, y posterior lavado del extracto obtenido, por adición de un quinto de su volumen de agua o de una solución apropiada de sales. De la mezcla resultante se obtuvo un sistema bifásico. La fase superior que contiene todas las sustancias no lipídicas y solo cantidades insignificantes de otros lípidos, fue desechada. La fase inferior contiene esencialmente el total de los lípidos del suero. Una alícuota de la fase inferior fue transferida a un tubo de vidrio largo (20 mL) tapa a rosca y secada a 40 °C bajo corriente de N₂ gas para su posterior procesamiento.

La cuantificación del contenido de fósforo en el extracto lipídico obtenido, se llevó a cabo mediante el método estándar de reducción del complejo fosfomolibdato con ácido ascórbico (Chen y col. 1956). Específicamente, el ácido perclórico oxida el fósforo orgánico hasta fosfato inorgánico. Los iones fosfatos reaccionan con el molibdato de amonio en medio ácido para producir ácido fosfomolibdico, el cual es reducido a azul de molibdeno, de color intenso por acción del ácido ascórbico. La intensidad del color a 800 nm es proporcional a la concentración de fósforo de la muestra.

4.E.4.- Concentración de glucosa plasmática

La concentración de glucosa en plasma se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (SB, Santa Fe, Argentina). La glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este último en presencia de peroxidasa oxida al cromógeno 4-Aminofenazona /Fenol a una quinona de color rojo cuya intensidad se mide espectrofotométricamente a 505 nm y es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra. Los resultados se expresaron en g/L.

4.E.5.- Cuantificación de la actividad de enzimas marcadoras de daño hepático

En muestras de suero, se determinaron las actividades de enzimas marcadoras de daño hepático, aspartato amino transferasa (ASAT), alanina amino transferasa (ALAT) y fosfatasa alcalina (FA), utilizando kits comerciales.

4.E.5.1.- Actividad de la enzima ASAT

La enzima ASAT cataliza la siguiente reacción:



El oxalacetato formado es inestable y se transforma en piruvato, el cual reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505 nm. La intensidad de color obtenida es proporcional a la actividad ASAT. Los resultados se expresaron en U/L.

4.E.5.2.- Actividad de la enzima ALAT

La enzima ALAT cataliza la siguiente reacción:



El piruvato formado reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina produciéndose en medio alcalino un compuesto coloreado que se mide a 505 nm. La intensidad de color obtenida es proporcional a la actividad ALAT. Los resultados se expresaron en U/L.

4.E.5.3.- Actividad de la enzima FA

La enzima FA desdobla al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol. El fenol liberado se determina por reacción con 4-amino-antipirina y

ferricianuro como agente oxidante. El color desarrollado es directamente proporcional a la actividad enzimática y se mide a 520 nm. Los resultados se expresaron en U/L.

4.E.6.- Perfil de ácidos grasos sérico

La composición de AG de los lípidos circulantes se cuantificó mediante cromatografía gaseosa (CG), empleando un cromatógrafo gas-líquido marca Shimadzu (GC-2014), con detector FID y columna capilar CP-Sil 88 (100 mx 0,25 mm id x 20 mm de espesor). Los metil ésteres de los AG plasmáticos fueron identificados por comparación con los tiempos de retención relativos a estándares comerciales.

La identificación y cuantificación de ésteres metílicos correspondientes a AG presentes en materias grasas de origen animal por CG, requiere de tres etapas: obtención del extracto lipídico, derivatización de los AG, y corrida cromatográfica.

- La extracción de la materia grasa del plasma se realizó mediante el método de Bligh and Dyer (1959). Este método permite una rápida extracción de lípidos de tejidos o muestras que contienen una cantidad significativa de agua. El método se basa en la homogenización de la muestra con cloroformo, metanol y agua en proporciones 1:2:0,8 para que se forme una sola fase miscible con el agua de la muestra que extrae, tanto la grasa libre, como estructural. Luego se añaden alícuotas de cloroformo y agua para lograr la separación de fases. El material lipídico se encuentra en la fase orgánica, mientras que el material no lipídico se ubica en la fase acuosa. El volumen de plasma a utilizar para la extracción lipídica se ajusta a 0,8 mL de ser necesario (agregando la cantidad de agua necesaria), ya que el contenido de agua de la muestra es crítico para conservar la proporción de cloroformo, metanol y agua, que permite la formación del sistema homogéneo. En caso de tejidos sólidos, como hígado, tejido adiposo, etc, el método requiere determinar el contenido de humedad de la muestra para ajustarla posteriormente a 80%. La fase orgánica que alberga el material lipídico de la muestra se colocó en manta calefactora a 45°C, bajo corriente de N₂ gas, con el fin de evaporar los restos de solvente.

- Para la derivatización de los AG es importante considerar que, incluso al estado de vapor, los mismos se encuentran en forma de un dímero unidos por puente de hidrógeno. Esta estructura corresponde al doble de su peso molecular y se refleja en sus propiedades

físicas como el punto de ebullición. Así, los AG tienen sus puntos de ebullición anormalmente altos, lo cual impide su análisis directo por CG. Por esta razón los AG de los triglicéridos y los AG libres presentes en la muestra son convertidos en metil ésteres con KOH 2N, previa disolución del extracto lipídico en hexano calidad HPLC (ISO 5509:2000 (E)). Los ésteres metílicos formados tienen un peso molecular algo mayor que el respectivo ácido graso, pero al romperse el puente de hidrógeno, bajan su punto de ebullición a la mitad, pudiendo ser analizados perfectamente por CG ya que son volátiles a las temperaturas en que se manejan las fases líquidas para su análisis.

▪ En referencia a la “corrida cromatográfica”, resulta pertinente introducir que la cromatografía gaseosa es una técnica de partición que permite que todo compuesto químico que habitualmente es un gas o susceptible de ser transformado en un gas, pueda ser identificado y cuantificado por esta metodología. Así, la muestra en estado gaseoso se reparte entre dos fases no miscibles: 1- una gaseosa que corresponde al gas de arrastre o gas portador que es móvil, y 2- una fase líquida estacionaria. A medida que va pasando el gas portador con la muestra formada por “n” componentes, la separación de cada uno de ellos se efectúa de acuerdo a su propio coeficiente de reparto entre el gas portador y la fase líquida. Debe señalarse que todos los ésteres metílicos de los AG, de cualquier muestra de materia grasa, emergen como señales agudas denominadas picos, por lo tanto la identificación se basa en comparar el tiempo que se demora (tiempo de retención) en emerger un pico determinado y compararlo con el tiempo que demora en hacerlo en iguales condiciones, el éster metílico correspondiente al patrón conocido. El tiempo de retención del éster metílico de un AG en particular es característico para ese compuesto, que se ha analizado en una columna con una fase líquida específica, en condiciones estandarizadas de temperatura de la columna, temperatura del detector y del inyector, flujo del gas portador, iguales condiciones de partición de flujo conocido como “splits”. Este tiempo de retención total, se compara con el obtenido para el respectivo éster metílico de referencia, sometido a las mismas condiciones cromatográficas.

A partir del cromatograma obtenido, los resultados se expresaron como porcentaje relativo de cada área en función al total de áreas registradas (área %).

4.F.- CUANTIFICACIÓN DE LÍPIDOS TISULARES

- En muestras de hígado se determinaron las concentraciones de TG, FL y Col.
- En muestras de músculo gastrocnemius se determinaron las concentraciones de TG y FL. Se seleccionó para las cuantificaciones musculares el músculo gastrocnemio, ya que por su constitución en tipos de fibras, es representativo del tejido muscular total, el cual posee una elevada capacidad oxidativa y utilización de AG, como así también representa aproximadamente el 45 % del peso corporal.
- En muestras de hígado y TAE se analizó el perfil de AG.

4.F.1- Concentración de triglicéridos tisulares

Para cuantificar los niveles de TG tisulares (hígado y músculo), una cantidad determinada del tejido conservado a -80°C se homogenizó con un volumen apropiado de solución fisiológica fría (4°C).

El contenido de TG se determinó mediante la técnica propuesta por Laurell (1966). Los TG se extrajeron utilizando una mezcla éter isopropílico:etanol (95:5; v/v) y luego fueron saponificados con una solución de KOH 6N:etanol (0,5:9,5; v/v). El glicerol liberado fue cuantificado mediante su oxidación con peryodato generando un mol de ácido fórmico y dos moles de formaldehído para cada mol de sustrato. El formaldehído reacciona a 100°C con ácido cromotrópico para dar un compuesto violeta, cuya intensidad de color se mide a 570 nm y es proporcional a la cantidad de TG presente en la muestra. Los resultados se expresaron como $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo.

4.F.2- Concentración de fosfolípidos tisulares

Para cuantificar los niveles de FL tisulares, una cantidad determinada del tejido conservado a -80°C se homogenizó con un volumen apropiado de solución fisiológica fría (4°C) para obtener una dilución 1:2 en todas las muestras de hígado y una dilución 1:10 en las muestras de músculo gastrocnemio. Sobre alícuotas de estos homogenados se realizó la extracción lipídica siguiendo la técnica de Folch y col. (1957) anteriormente detallada y posterior cuantificación del contenido de fósforo presente en el extracto lipídico obtenido

mediante el método estándar de reducción del complejo fosfomolibdato con ácido ascórbico (Chen y col., 1956). Esta técnica fue descrita en detalle en el apartado 4.F.3.

4.F.3- Concentración de colesterol total tisular

Para cuantificar el contenido de Col en hígado, una cantidad determinada del tejido conservado a -80°C se homogenizó con un volumen apropiado de solución fisiológica fría (4°C) para obtener una dilución 1:2. Sobre alícuotas de estos homogenados se realizó la extracción lipídica siguiendo la técnica de Folch y col. (1957). Una porción del extracto lipídico obtenido fue transferida a otro tubo de extracción y secada a 40°C bajo corriente de N_2 gas. Sobre este extracto seco se cuantificó el Col según la técnica de Abell y col. (1952). Este método comprende: 1) tratamiento del extracto lipídico con KOH para liberar el colesterol y saponificación de los ésteres de colesterol; 2) extracción del colesterol en un volumen medido de éter de petróleo después de la dilución de la solución alcohólica con agua; y 3) medición del Col en una alícuota de la fase etérea por medio de la reacción de color de Liebermann-Burchard. Este método químico de Liebermann-Burchard para la determinación de Col en una muestra lipídica se basa en el desarrollo de una coloración verde en presencia de anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado con temperatura, después de 30 min de reacción. La intensidad de la coloración es medida en el espectrofotómetro a 620 nm. La intensidad del color tiene una relación lineal con la concentración de Col presente en el extracto lipídico.

4.F.4- Perfil de ácidos grasos tisular

La composición de AG de los lípidos tisulares (hígado y TAE) se obtuvo mediante GC, como fue descrito en el ítem 4.F.6, previa extracción de la materia grasa tisular mediante el método de Bligh y Dyer (1959).

4.G.- ANALISIS HISTOLÓGICO DEL TEJIDO HEPÁTICO

Porciones de hígado recién removidas (n=5 por grupo) fueron sometidas inmediatamente a un proceso de fijación mediante la inmersión directa de la muestra en formaldehído al 4% (fijador) tamponado con buffer fosfato (PBS, pH: 7,5). Finalizado el tiempo de fijación se realizaron dos lavados sucesivos, con agua corriente y PBS. Una vez eliminado el fijador, se deshidrató el tejido mediante la realización de pasajes sucesivos de las muestras por soluciones de etanol de concentración creciente (desde 70% hasta etanol puro-100%). Luego el etanol fue sustituido por xilol para el aclaramiento de las muestras y las mismas fueron impregnadas con parafina para la obtención del “taco”. Una vez obtenidos los tacos, se realizaron cortes seriados de los mismos de 5 micras de espesor, utilizando un micrótopo tipo Minot. Finalmente cada corte fue coloreado con Hematoxilina-Eosina. Esta coloración permite evidenciar detalles estructurales. La observación microscópica se realizó a los aumentos de 4X, 10X y 40X con microscopio óptico equipado con cámara fotográfica (García del Moral, 1993).

4.H.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO LIPÍDICO

4.H.1.- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa

4.H.1.1.- Actividad total de LPL en tejido adiposo epididimal

A pesar de que el tejido adiposo de la rata representa sólo un 7-10% de su peso corporal y que recibe menos del 5% del flujo sanguíneo, se ha demostrado que es el principal tejido responsable de la remoción de las lipoproteínas ricas en TG presentes en circulación. La actividad total de la LPL en tejido adiposo epididimal (TAE) se determinó empleando el método fluorimétrico descrito por Del Prado y col. (1994). Para tal fin, una cantidad de TAE se homogeneizó con buffer Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl) 0,2 M pH 8,2 a 4°C, en una proporción 0,2 g de tejido/ml de buffer y se homogeneizó en frío. Una alícuota del homogeneizado fue utilizada para la preparación de extracto enzimático “polvo de acetona” (Lutz y col., 1989). Esta preparación consiste en una doble extracción con acetona fría (dil. 1:4, -20°C) seguida de una doble extracción con éter dietílico frío (dil. 1:4, -20°C). El polvo de acetona obtenido se llevó a sequedad bajo

corriente de N₂ (1 hora a 4°C) y se resuspendió en 1 ml de Buffer NH₄Cl 25 mM pH 8,1 con 1 UI/ml de Heparina. La concentración de proteínas en el resuspendido se determinó mediante la técnica de Lowry (1979).

El método fluorimétrico para la determinación de la actividad de la enzima LPL descrito por Del Prado y col. (1994), utiliza di-butilil fluoresceína (DBF) como sustrato enzimático, el cual fue sintetizado a partir de la mezcla de 10 g de fluoresceína con 10 ml de piridina y 30 ml de anhídrido butírico. La mezcla fue almacenada a temperatura ambiente por 24 horas antes de la adición de 300 ml de etanol absoluto. Finalmente, la mezcla se guardó en freezer a -20°C por 18 horas. El DBF fue recristalizado en 95% de etanol sucesivas veces hasta remover las trazas de fluoresceína libre. La pureza del producto final se evaluó realizando un espectro de emisión, comprobando que no exista pico de excitación de fluoresceína a 490 nm.

La reacción enzimática se llevo a cabo a 37°C en un buffer fosfato 0,1 M, pH 8,0, conteniendo 5% de 2-etoxietanol, 10 mM de DBF y extracto enzimático resuspendido (teniendo en cuenta de no superar los 15 mg de proteínas en la mezcla de reacción). La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo por 5 min el aumento de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 530 \text{ nm}$) producto de la liberación de fluoresceína como consecuencia de la hidrólisis enzimática de DBF. Paralelamente, el mismo ensayo fue llevado a cabo en presencia de 1M NaCl para inhibir la actividad enzimática específica.

La actividad LPL en tejido adiposo se determinó sustrayendo la actividad lipolítica no específica (determinada en presencia de NaCl 1M) de la actividad lipolítica total (determinada en ausencia de NaCl 1M). Los resultados se expresaron como nmol de fluoresceína liberada por minuto por gramo de tejido (nmol de fluoresceína/min/g) y como nmol de fluoresceína/min/TAE, afectada por el peso del tejido adiposo.

4.H.1.2.- Actividad total de LPL en músculo gastrocnemio

El músculo gastrocnemio conservado a -80°C fue homogeneizado (dil 1:10) en una solución buffer NH₄Cl/NH₄OH – Heparina (50 mM, pH 8,6, conteniendo 4 UI/ml de heparina). Luego de reposar 15 min a 4°C los homogenados fueron centrifugados a 2600g a 4°C durante 15 min obteniéndose los extractos crudos frescos tisulares. La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo por 5 min el aumento de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} =$

490 nm; $\lambda_{\text{emisión}} = 530 \text{ nm}$) producto de la liberación de fluoresceína como consecuencia de la hidrólisis enzimática del DBF. La reacción se llevó a cabo a 37°C en un buffer fosfato 0,1 M, pH 8,0, conteniendo 5% de 2-etoxietanol, 10 mM de DBF y extracto enzimático (teniendo en cuenta de no superar los 15 mg de proteínas en la mezcla de reacción). La actividad medida fue expresada como nmol de fluoresceína liberada por minuto por gramo de músculo (nmol de fluoresceína/min/g).

4.H.2.- Secreción hepática “*in vivo*” de TG-pre- β lipoproteínas

Se determinó la velocidad de secreción de TG-pre- β lipoproteínas “*in vivo*” (VSTG) utilizando para tal fin la metodología propuesta por Otway y col. (1967) modificada por Bernal y col. (1989). La misma se fundamenta en la inhibición de la remoción intravascular de las lipoproteínas de $\delta < 1,006 \text{ g/ml}$ por la administración de Triton WR 1339, de modo que los TG se acumulan en el tiempo en el sistema vascular en forma proporcional a la velocidad con la que son secretados por el hígado.

En lotes de animales en los cuales se siguieron los mismos tratamientos dietarios, ayunados 12-18 hs y bajo anestesia, se administró vía endovenosa una solución de Triton WR 1339 al 10% (v/v) en cloruro de sodio 0,9% (dosis: 600 mg/kg peso). Se tomaron muestras de sangre para el dosaje de TG a tiempo 0 y 120 minutos (previo y dos horas posteriores a la administración de la droga). El volumen plasmático (Vp) se determinó en una experiencia paralela mediante la técnica de dilución del Azul de Evans (Wang y col., 1949).

La VSTG fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{VSTG (nmol/100g/min)} = \frac{([TG_{120}] - [TG_0]) \times V_p}{P \times t}$$

Siendo $[TG_{120}]$ y $[TG_0]$ las concentraciones de TG a tiempo 120 y 0 min de la administración del Triton WR 1339 y expresadas en $\mu\text{mol/ml}$; P, el peso en gramos del animal; Vp en ml y t en minutos.

En trabajos previos (Bernal y col., 1989) ha sido demostrado que en ratas la dosis elegida es la que provee la máxima inhibición de la clarificación de VLDL-TG y que bajo esas condiciones el acumulo de TG en el plasma es lineal hasta los 150 min, razón por la que sólo se cuantificaron los niveles de TG a los tiempos 0 y 120 min. Estas condiciones fueron corroboradas para asegurar que fueran las adecuadas en ratones.

4.H.3.- Actividad de enzimas lipogénicas en hígado y tejido adiposo epididimal

Las enzimas relacionadas con la actividad lipogénica en hígado y tejido adiposo se encuentran en la fracción citosólica celular. Para la determinación de la actividad de estas enzimas se homogeneizaron fracciones de hígado (0,5 g) y tejido adiposo (0,25 g) frescos en buffer pH 7,6 (KCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, N-acetil-cisteína 10 mM y ditioneitol 0,5 mM) en proporción 1:10 para hígado y 1:2,5 para tejido adiposo. Luego, se centrifugó el homogenado a 60.000 g a 4°C durante 90 minutos y se separó el sobrenadante el cual se almacenó a -80°C hasta la posterior determinación de la actividad de las enzimas. Por otro lado, una alícuota del sobrenadante se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas a través de la técnica de Lowry y col. (1979).

4.H.3.1.- Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, E.C. 1.1.1.49) se determinó espectrofotométricamente a través de la formación de NADPH durante 5 minutos a 37°C, medida por absorbancia a 340 nm, en buffer glicil-glicina 0,1 M, pH 8,0 en presencia de glucosa 1,2 mM, NADP 0,4 mM y MgSO₄ 12 mM. La actividad de G6PDH fue expresada como nmol de NADPH producidos por minuto por miligramo de proteína (nmol NADPH/min/mg prot.) (Kuby y Noltmann, 1966).

4.H.3.2.- Actividad de la enzima málica

La actividad de la enzima málica (EM, E.C. 1.1.1.40) se determinó espectrofotométricamente a través de la formación de NADPH durante 4 minutos a 37°C,

medida por absorbancia a 340 nm, en buffer trietanolamina 0,4 M, pH 7,4, en presencia de NADP 0,2 mM, MnCl₂ 4 mM y L-malato 0,5 mM. La actividad de EM fue expresada como nmol de NADPH producidos por minuto por miligramo de proteína (nmol NADPH/min/mg prot.) (Hsu y Lardy, 1969).

4.H.3.3.- Actividad de la enzima ácido graso sintasa

La actividad de la enzima ácido graso sintasa (FAS, E.C. 2.3.1.85) se determinó espectrofotométricamente a 340 nm, mediante la diferencia en la oxidación de NADPH en presencia de malonil-CoA y la oxidación de NADPH en ausencia de malonil-CoA. Para esta determinación, la enzima es incubada previamente a 37°C en buffer KH₂PO₄ 1 M, pH 6,5, en presencia de EDTA 2,5 mM, cisteína 10 mM, albúmina sérica bovina 0,3 mg/ml, acetil-CoA 0,06 mM y NADPH 0,15 mM. La reacción es iniciada con 20 µl de malonil-CoA 7 mM. La actividad de FAS fue expresada como nmol de NADPH consumidos por minuto por miligramo de proteína (nmol NADPH/min/mg prot.) (Lynen, 1969).

4.H.4.- Actividad de la enzima carnitina palmitoil-transferasa I en hígado y músculo

El proceso de β-oxidación de los AG se realiza en la matriz mitocondrial de las células, siendo una de las enzimas clave en este proceso la carnitina palmitoil-transferasa I (CPT-I). Esta enzima es la encargada de transportar los AG, que se encuentran en el citosol, hacia el interior de las mitocondrias. Para la determinación de la actividad de la enzima CPT-I se realizó un homogenado (relación 1:5) a partir de tejido congelado (-80°C), hígado y músculo, en solución de sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, fenil-metil-sulfonil fluoruro 0,2 mM, antipain 1 mg/l, aprotinin 1 mg/l, leupeptin 2 mg/l y pepstatin 0,7 mg/l. El homogenado se centrifugó a 300 g a 4°C durante 10 minutos y luego el sobrenadante se volvió a centrifugar a 12.000 g a 4°C durante 5 minutos, y este nuevo sobrenadante, que contenía un aislado de mitocondrias, se utilizó como fuente de enzima. La determinación de la actividad de la enzima mide la cantidad de coenzima A liberada a partir de palmitoil-CoA en presencia de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). Para esto, se incubó la fracción mitocondrial a 30°C durante 5 minutos en un medio conteniendo 800 µl de buffer Tris-HCl, pH 8, (Tris-HCl 116 mM, EDTA 2,5 mM, DTNB

0,11 mM, Triton X-100 0,2%), 75 µl de solución de homogenado, palmitoil-CoA 0,05 mM y L(-) carnitina 0,11 mM. La reacción fue iniciada con 25 µl de muestra y la actividad se determinó siguiendo la liberación del CoA (a través de la formación de CoASH) a 412 nm durante 3 minutos. Este resultado valora la actividad de un conjunto de enzimas que, al igual que la CPT-I liberan CoA, por lo que se determinó paralelamente la actividad en ausencia de L(-) carnitina para cuantificar la actividad de todas estas enzimas excepto la CPT-I. Para expresar el resultado se hizo una diferencia entre la actividad en presencia de L(-) carnitina y la actividad en ausencia de L(-) carnitina, y la actividad de la CPT-I se expresó como nmol de CoA liberados por minuto por miligramo de proteína (nmol/min/mg prot) (Bieber y col, 1972). La concentración de proteínas se estimó en el sobrenadante utilizando la técnica de Lowry y col. (1979).

4.I.- PARÁMETROS RELACIONADOS AL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO

4.I.1.- Determinación del grado de lipoperoxidación

El daño peroxidativo a nivel hepático fue evaluado a través del grado de lipoperoxidación (LPO), analizado mediante las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs). Para tal fin, los hígados fueron rápidamente removidos y lavados con solución salina enfriada a 4°C y conservados a -80°C. La determinación se realizó en homogenados hepáticos preparados en una proporción de 1 g de tejido con 9 ml de KCl 1,15 %, de acuerdo al método de Ohkawa y col. (1979). El método consiste en la reacción de ácido tiobarbitúrico con un producto secundario de la peroxidación lipídica, identificado como malondialdehído (MDA), formado durante la incubación de homogenados tisulares bajo condiciones aeróbicas, para producir en medio acético y en caliente, un cromógeno rojo con un pico de absorción espectrofotométrica a 532 nm. Los resultados se expresaron en nmol MDA/g de tejido.

4.I.2.- Determinación del contenido de glutatión reducido

La determinación de glutatión reducido (GSH) se realizó en homogenados hepáticos obtenidos en una proporción 1:4 con ácido tricloroacético al 5%. Se obtuvo el sobrenadante por centrifugación y se determinaron los niveles de GSH según la técnica de

Ellman (1979) utilizando como reactivo DTNB. Los resultados se expresaron en μmol GSH/g de tejido.

4.1.3.- Medida de la actividad de enzimas antioxidantes hepáticas

Para sus determinaciones se obtuvieron homogenados hepáticos con buffer fosfato 50 mM, pH 7,0 en una relación de 1g de tejido por 9 ml de buffer, los cuales fueron luego centrifugados a 4°C y 16000g durante 12 minutos. Las actividades de las enzimas mencionadas se determinaron en el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación. Para ambas enzimas, la concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col (1951).

4.1.3.1.- Determinación de la actividad de la enzima catalasa

La determinación de la actividad de la enzima catalasa (CAT) se fundamenta en la cantidad de H_2O_2 degradada por la enzima, medida en buffer fosfato 50 mM, pH 7,0, con Triton X 100 al 1%. La disminución en el contenido de H_2O_2 fue medida espectrofotométricamente a 240 nm durante 30 segundos. La actividad enzimática fue expresada como U/mg de proteína, siendo una U la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un μmol de sustrato por minuto (Aebi, 1984).

4.1.3.2.- Determinación de la actividad de la enzima glutatión peroxidasa

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) fue determinada utilizando H_2O_2 como sustrato y la reacción fue seguida espectrofotométricamente mediante el consumo de NADPH por acción de la enzima glutatión reductasa. La reacción fue llevada a cabo en buffer fosfato 50 mM, pH 7,0, con GSH 0,15 M, NADPH 8,4 mM y 0,46 U/ml de glutatión reductasa. Los cambios en la absorbancia fueron medidos durante 2 minutos a 340 nm. La actividad de GSH-Px fue expresada como mU/mg proteína (Paglia y Valentine, 1967).

5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm SEM y el número de muestras fue indicado en cada caso, siendo siempre igual o mayor a 5.

Los datos utilizados para comparar los efectos de las diferentes dietas fueron analizados mediante un 3x3 ANOVA, utilizando la suplementación o no con las distintas fuentes de CLA (ausencia de CLA, suplementación con AR, suplementación con Mix) y origen de grasa dietaria (aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de canola) como variables independientes. Las comparaciones post-hoc fueron realizadas utilizando el test de Tukey. En todos los casos, valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

RESULTADOS

En función de los objetivos planificados, las experiencias realizadas se describen en forma secuencial, considerando las dos variables independientes fijadas en el protocolo, específicamente: a) origen de la grasa dietaria (Oliva, Maíz y Canola) y b) presencia y/o fuente de Conjugados del Ácido Linoleico (ausencia de CLA, presencia de aceite enriquecido con *c9,t11*-CLA (AR), presencia de aceite enriquecido con mezcla comercial de CLA -Mix: *c9,t11*-CLA + *t10,c12*-CLA-).

1.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO Y ENERGÍA

Las dietas fueron aceptadas perfectamente por todos los grupos, sin manifestar ningún tipo de rechazo o resistencia a la ingesta de las mismas, lo cual puede ser constatado a través del equivalente consumo medio diario del alimento, que no mostró ninguna diferencia significativa tanto, por el origen de grasa dietaria, como por la presencia de isómeros CLA (Tabla 4). En virtud de este consumo y que las dietas fueron isocalóricas, la ingesta energética media tampoco ha mostrado diferencias estadísticas.

La absorción aparente de los macronutrientes energéticos, grasas y proteínas, no mostró ningún efecto por el origen de grasa dietaria o fuente de CLA. La elevada absorción aparente de todas las grasas, claramente nos manifiesta que los efectos metabólico-nutricionales de las dietas están relacionados al origen de grasa o la fuente de isómeros CLA, y no a alteraciones en la absorción de las mismas, ni de compuestos liposolubles que pudieran ser transportados por ellas. Estos resultados, junto con la absorción aparente de proteínas, nos permitieron excluir cualquier tipo de fenómeno de malabsorción de nutrientes que pudieran afectar los parámetros evaluados.

Tabla 4. Consumo de alimento, ingesta energética y absorción aparente de grasa y proteína dietaria

	O	O+AR	O+Mix	M	M+AR	M+Mix	C	C+AR	C+Mix
Consumo de Alimento (g/día)	3,6 ± 0,2	3,7 ± 0,3	3,7 ± 0,4	3,6 ± 0,3	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,4	3,5 ± 0,3
Ingesta Energética (KJ/día)	59,3 ± 4,0	61,6 ± 4,8	60,8 ± 7,1	58,9 ± 4,9	53,2 ± 2,3	56,0 ± 2,9	58,9 ± 3,6	58,8 ± 6,7	57,3 ± 4,2
Absorción aparente de grasa dietaria (%)	97,1 ± 0,6	97,9 ± 0,1	96,8 ± 0,8	95,0 ± 1,3	97,0 ± 0,2	96,9 ± 0,7	96,5 ± 0,4	97,9 ± 0,1	97,9 ± 0,1
Absorción aparente de proteína dietaria (%)	93,2 ± 0,4	93,7 ± 0,3	95,0 ± 0,3	92,8 ± 0,3	93,6 ± 0,5	93,9 ± 0,8	92,8 ± 0,5	93,9 ± 0,7	93,3 ± 0,5

Valores expresados como media ± SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$.

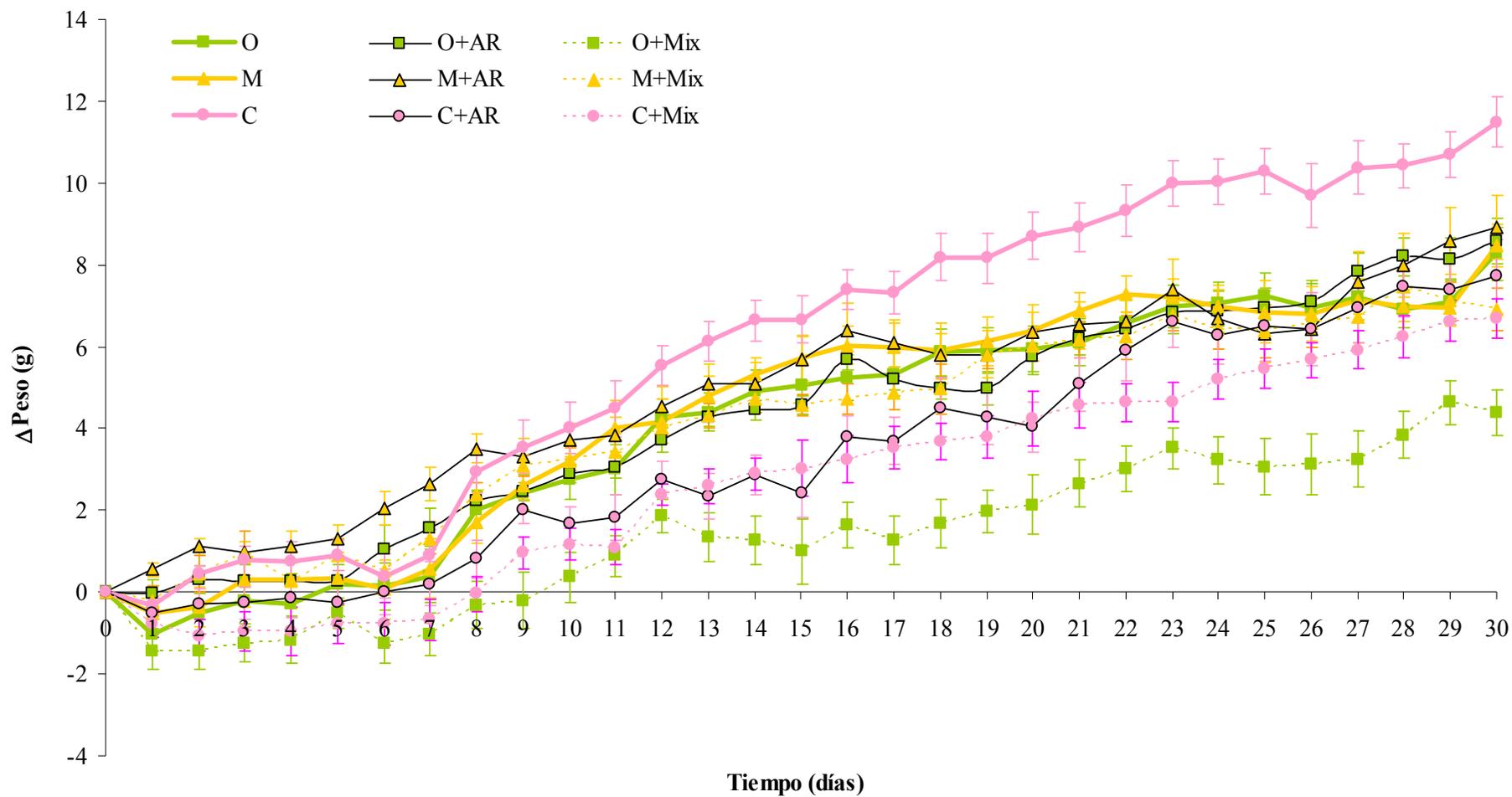
2.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA GANANCIA DE PESO

Dado que los ratones se encuentran durante el desarrollo de los experimentos en una etapa de pleno crecimiento, todos los animales pertenecientes a los distintos grupos dietarios manifestaron un aumento del peso corporal desde el inicio hasta el final del período experimental (Figura 11). La evolución del peso corporal mostró, en la mayoría de los animales experimentales, dos comportamientos diferentes: del día 0 al día 7 los ratones mantuvieron una exigua ganancia de peso, probablemente, debido a la adaptación de los mismos a la agrupación en la colonia, junto con el cambio de la formulación y presentación de la dieta. A partir del día 7 de la experiencia, la ganancia de peso fue mayor en todos los grupos, diferenciándose claramente el efecto por el origen de grasa dietaria, y más notablemente el efecto por la fuente de CLA utilizada. Por esta razón, en las Figuras 12 y 13 se muestran separadamente las ganancias de peso entre los días 0 y 30 (ΔP_{30-0}) y los días 7 y 30 (ΔP_{30-7}), respectivamente.

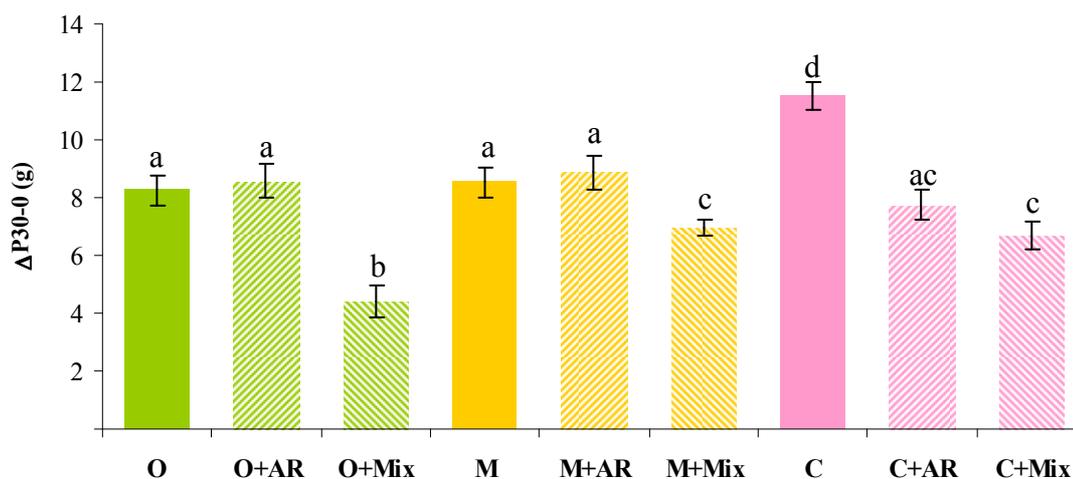
El análisis estadístico ANOVA (3x3) de la ganancia de peso en los 30 días de experiencia (ΔP_{30-0}), mostró diferencias significativas por el origen de grasa dietaria ($p = 0,002$) y la presencia de isómero CLA ($p < 0,001$), como también interacción entre las dos variables independientes ($p < 0,001$). Asimismo, contemplando la ganancia de peso entre los días 7 y 30, el efecto de las dietas es semejante a lo observado en el total de la experiencia, a excepción de la interacción de variables (ΔP_{30-7} ; origen de grasa dietaria: $p = 0,006$; presencia de isómero CLA: $p = 0,002$ e interacción origen de grasa x presencia de isómero: $p = 0,693$ –NS–).

La comparación individual en el incremento de peso entre los días 0 y 30, como entre los días 7 y 30 (ΔP_{30-0} y ΔP_{30-7}), mostró un efecto similar. Respecto al origen de grasa dietaria, en ausencia de isómeros CLA, los animales alimentados con dietas C presentaron una mayor ganancia de peso que los animales alimentados con dietas O y M. El AR sólo mostró descender la ganancia de peso de los animales cuando el origen de grasa dietaria fue aceite canola, mientras que el Mix mostró un descenso de dicha variable independientemente del origen de grasa dietaria.

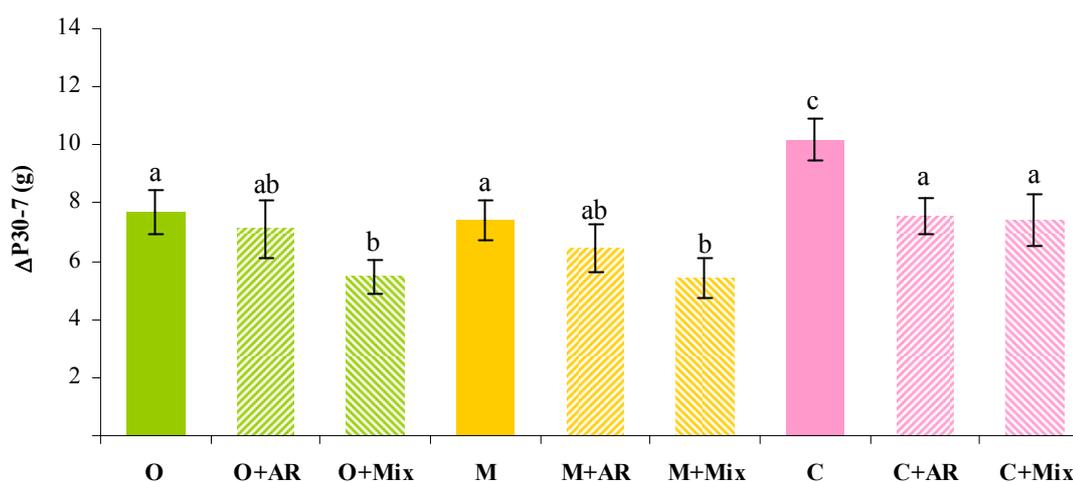
Figura 11. Evolución de la ganancia de peso diario



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo.

Figura 12. Ganancia de peso entre los días experimentales 0 y 30 (ΔP_{30-0})

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 13. Ganancia de peso entre los días experimentales 7 y 30 (ΔP_{30-7})

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

3.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA COMPOSICIÓN CORPORAL

Al final de los tratamientos dietarios, los cambios en la ganancia de peso se relacionaron a diferencias en el contenido graso corporal, más que a alteraciones en el crecimiento y desarrollo de los animales (Tabla 5). Es dable observar la magnitud de los cambios en el % grasa corporal debido tanto, al origen de grasa dietaria ($p < 0,001$), como a la fuente de isómero CLA ($p < 0,001$).

Los animales alimentados con dietas C presentaron un mayor contenido de grasa corporal que los animales alimentados con dietas O ó M. La suplementación con AR disminuyó el contenido de grasa corporal en los animales alimentados con C+AR, mientras que este efecto no fue observado en aquellos animales alimentados con O+AR ó M+AR. La mezcla equimolecular de CLA ocasionó un marcado efecto reductor de la grasa corporal, comparado a los animales que recibieron el mismo origen de grasa dietaria, tanto en ausencia de CLA, como con la suplementación con AR.

Si bien los cambios observados en el % de grasa corporal fueron muy significativos, el contenido porcentual de agua y proteínas que compensa dicho cambio no mostró diferencias estadísticas, dado que el orden de magnitud del cambio de estos dos parámetros fueron muy superiores al del % de grasa corporal.

Tabla 5. Composición corporal

	O	O+AR	O+Mix	M	M+AR	M+Mix	C	C+AR	C+Mix
% Agua	63,0 ± 1,0	64,5 ± 0,4	66,0 ± 0,3	63,2 ± 1,0	63,7 ± 0,3	67,0 ± 0,3	60,1 ± 0,7	63,2 ± 1,0	66,6 ± 0,3
% Proteína	24,9 ± 0,8	24,1 ± 0,1	25,3 ± 0,5	24,3 ± 0,4	25,1 ± 1,3	27,1 ± 1,0	23,1 ± 0,4	22,7 ± 0,6	24,2 ± 0,3
% Grasa	9,7 ± 1,2 ^a	8,0 ± 0,6 ^a	4,5 ± 0,4 ^b	9,3 ± 0,8 ^a	9,3 ± 0,6 ^a	3,9 ± 0,3 ^b	13,6 ± 1,0 ^c	10,4 ± 1,1 ^a	4,5 ± 0,2 ^b

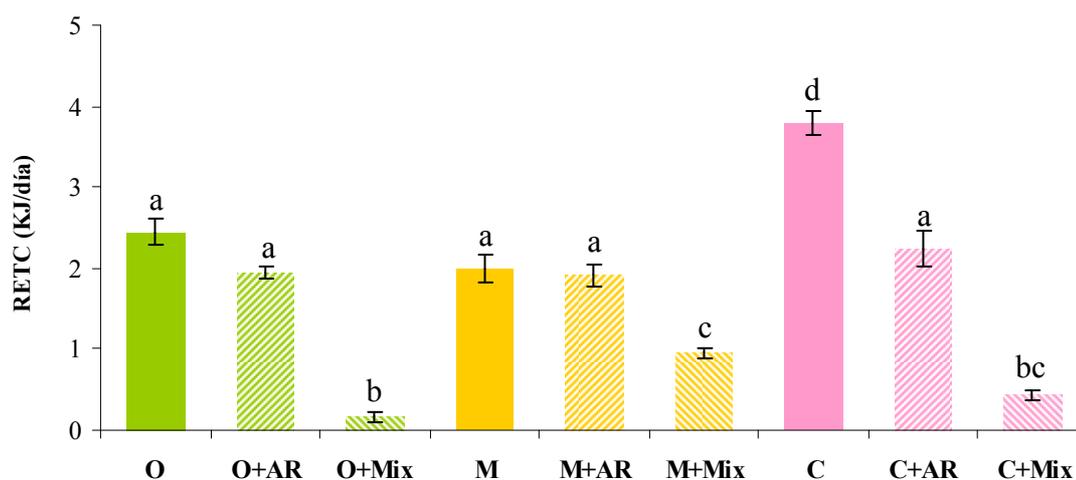
Valores expresados como media ± SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: p<0,05. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

4.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA RETENCIÓN ENERGÉTICA CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA

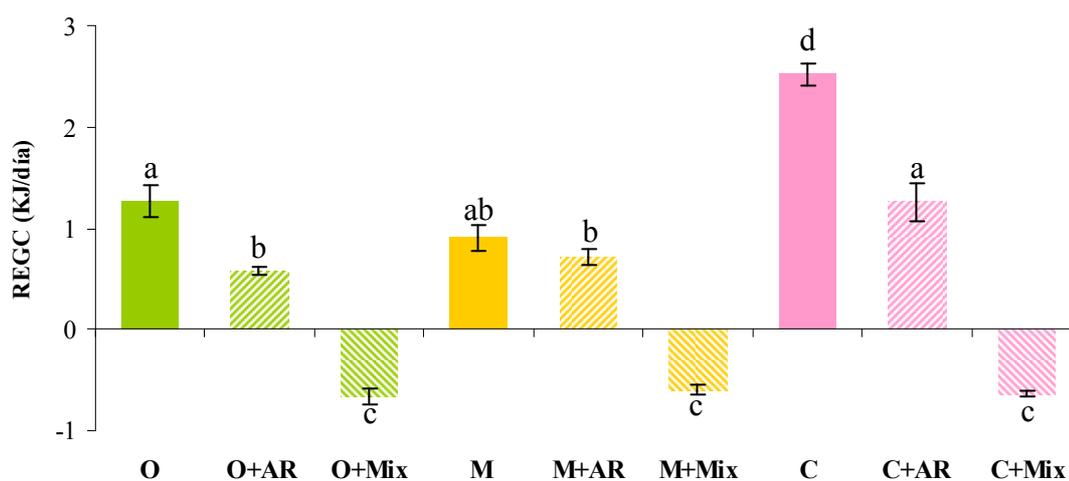
Los notables cambios en el peso y en la composición corporal de los animales por los tratamientos dietarios, adquieren mayor relevancia cuando se consideran los valores corporales al inicio de las experiencias. Por ello, profundizando el estudio composicional de los animales y relativizando por la ingesta de energía, podemos observar en la Figura 14, 15, 16 y 17 la RETC, REGC, REPC y EE del alimento.

El análisis estadístico (3x3 ANOVA) mostró un efecto diferencial por el origen de grasa dietaria ($p < 0,001$), por la fuente de isómero CLA ($p < 0,001$), como interacción entre ambas variables ($p < 0,001$), tanto en la RETC, como en la REGC y en la EE.

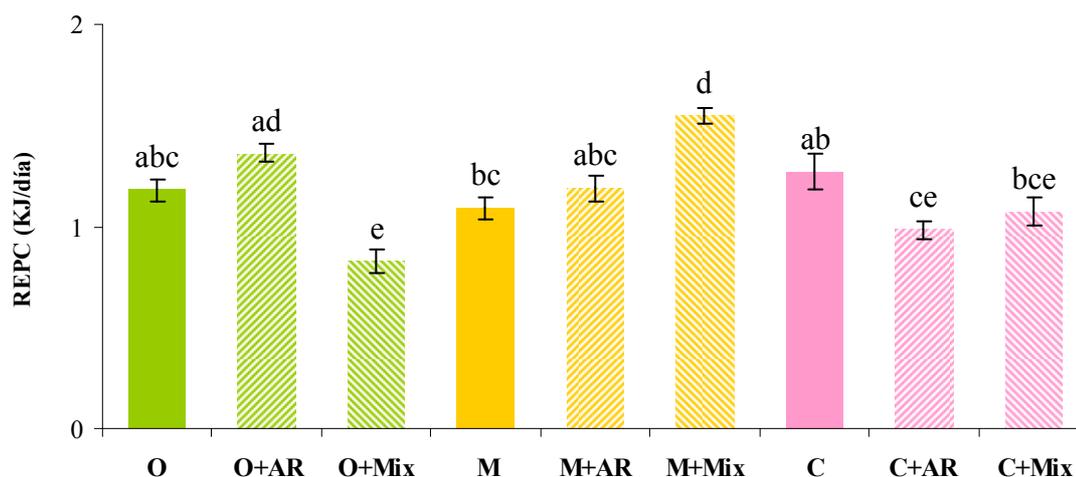
Las comparaciones no paramétricas mediante el test de Tukey, mostraron un paralelismo entre la RETC, la ganancia de peso y la EE, no obstante, es dable resaltar, que los cambios en la REGC no sólo presentaron diferencias muy significativas, sino que los valores adquirieron cifras negativas cuando las dietas fueron suplementadas con Mix. Este efecto, que muestra un menor contenido de grasa corporal que al inicio del tratamiento dietario, pese a que los animales se encuentran en un período de crecimiento y desarrollo, es independiente del origen de grasa dietaria. El AR, en menor grado que el Mix, mostró una reducción en la REGC en los animales alimentados con O+AR y C+AR. En el caso del grupo O+AR, se originó un ligero, pero no significativo, aumento en la REPC que mitigó una posible disminución en la RETC y en la EE. En cambio, en los animales alimentados con C+AR, por el descenso en la REPC, se observó una mayor reducción en la RETC y en la EE.

Figura 14. Retención energética total corporal diaria (RETC)

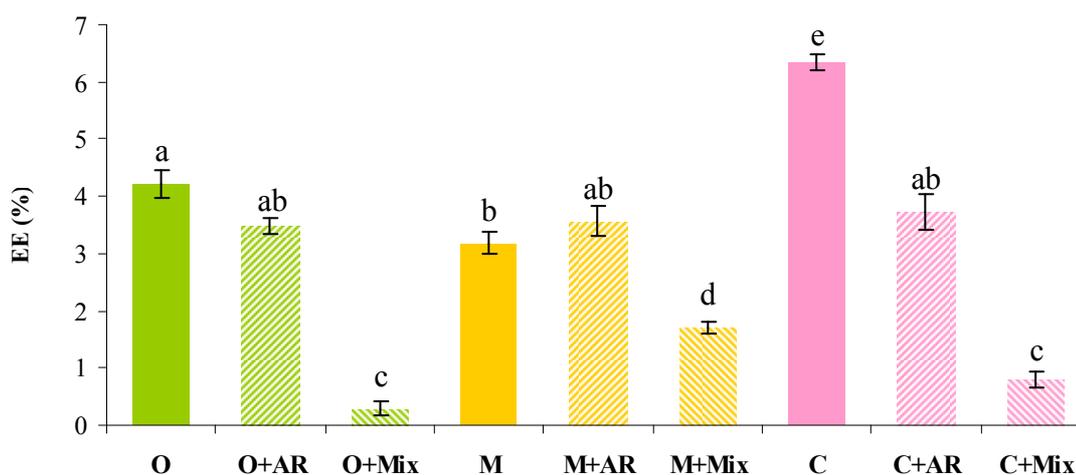
Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 15. Retención energética de grasa corporal diaria (REGC)

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 16. Retención energética proteica corporal diaria (REPC)

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 17. Eficiencia energética del alimento (EE)

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

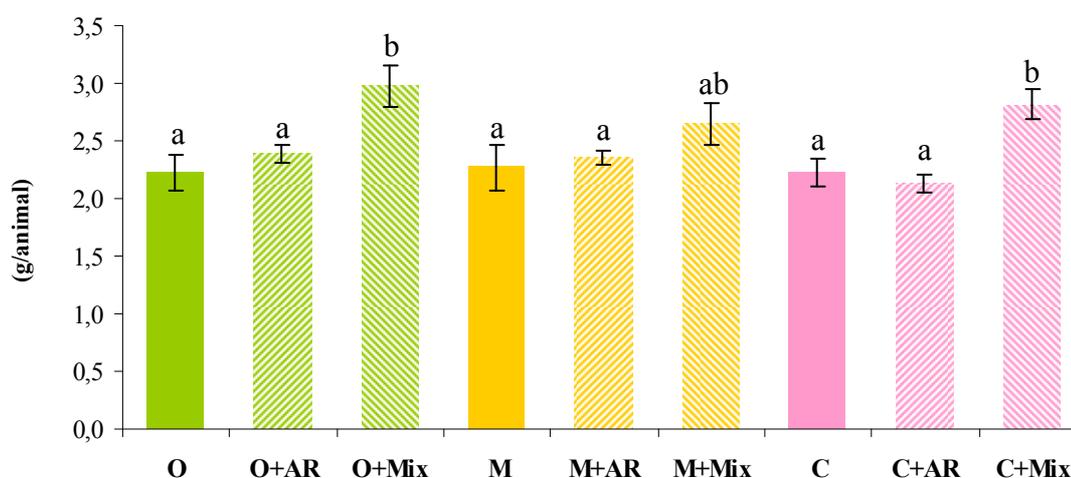
5.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL PESO DE HÍGADO, TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL Y MÚSCULO GASTROCNEMIO

Debido a la importancia del hígado, tejido adiposo y músculo esquelético en la regulación metabólica, y dado que dichos tejidos pueden ser modificados tanto por el origen de grasa dietaria, como por la fuente de CLA, se presentan los pesos del hígado, del TAE -como característico del tejido adiposo blanco-, y del músculo gastrocnemio -como representativo del músculo esquelético total-.

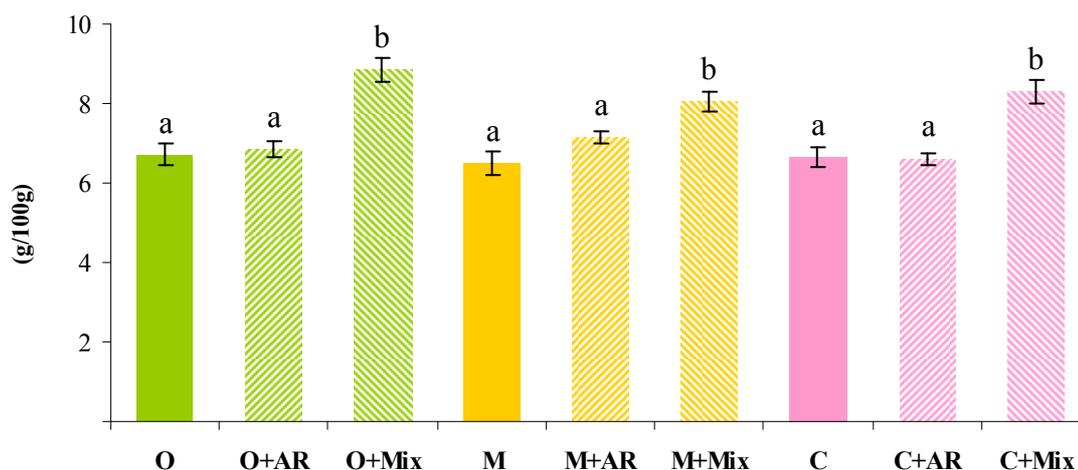
El análisis de variancia mostró que tanto el peso del hígado total, como el relativo al peso corporal, fueron significativamente afectados por la fuente de CLA ($p < 0,001$ en ambas expresiones), y no por el origen de grasa dietaria ($p = 0,446$ y $p = 0,322$; respectivamente).

El análisis individual de los efectos del tipo de CLA, mostró, que el peso del hígado en valor absoluto (g/animal), fue incrementado significativamente en los grupos O+Mix y C+Mix, mostrando sólo una tendencia no estadísticamente significativa en el M+Mix (Figura 18). En cambio, el Mix produjo un aumento significativo del peso relativo del hígado (g/100g peso corporal) independientemente de la grasa dietaria considerada (Figura 19). Además, el AR no causó diferencias en el peso hepático bajo ninguna de las expresiones antes mencionadas.

Figura 18. Peso absoluto del hígado



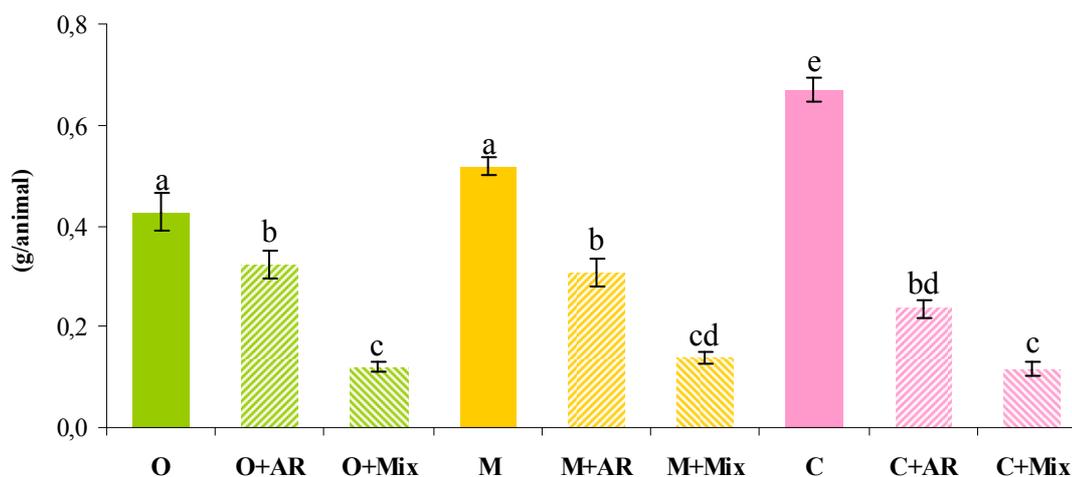
Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 19. Peso del hígado relativo al peso corporal

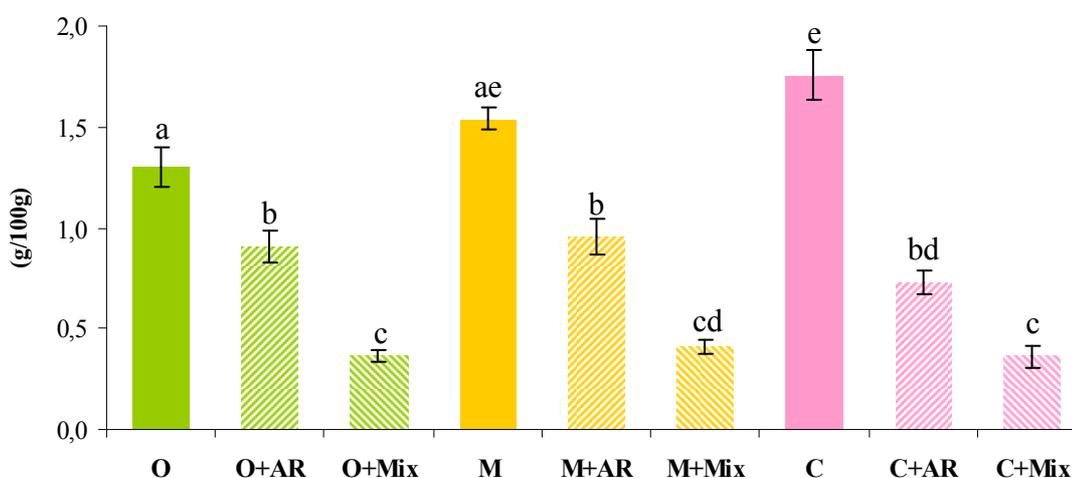
Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

El peso del TAE total (g/animal) mostró un efecto estadísticamente significativo por el origen de grasa dietaria ($p = 0,025$), el cual se normalizó al relativizarlo por el peso del animal ($p = 0,150$). Sin embargo, los efectos de la fuente de CLA sobre los pesos del TAE mostraron claras diferencias estadísticas independientes de la forma de expresión ($p < 0,001$).

En el análisis individual, respecto a la grasa dietaria en ausencia de CLA, los animales del grupo C mostraron un mayor peso del TAE (Figuras 20 y 21). La influencia de la fuente de CLA, demostró que ambos isómeros disminuyeron significativamente el peso del TAE independientemente de su forma de expresión y del origen de la grasa dietaria, siendo este efecto más acentuado en los animales alimentados con Mix.

Figura 20. Peso absoluto del tejido adiposo epididimal

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

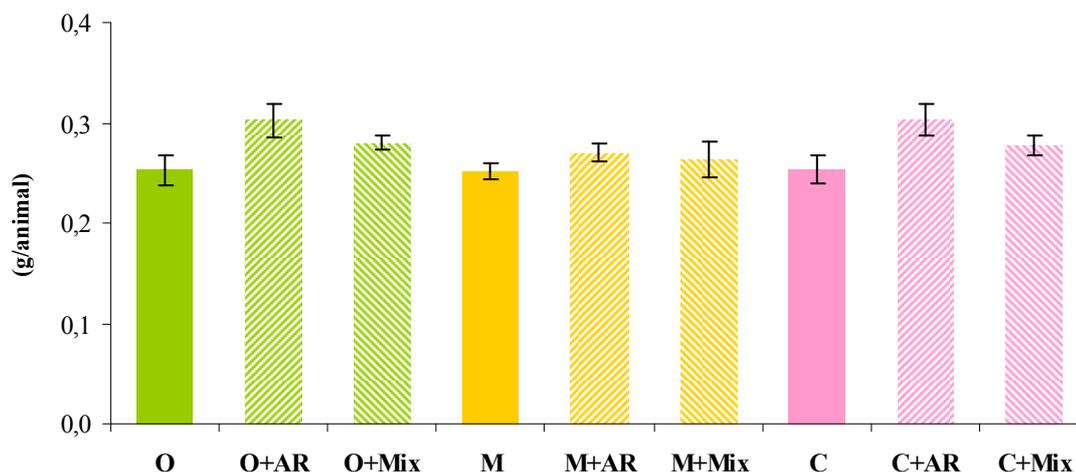
Figura 21. Peso del tejido adiposo epididimal relativo al peso corporal

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

El análisis estadístico 3x3 ANOVA demostró que la grasa dietaria no varió el peso muscular absoluto ($p = 0,206$), ni relativo ($p = 0,814$); mientras que los isómeros CLA aumentaron el peso del músculo, tanto en g/animal, como en g/100g peso corporal ($p = 0,002$ y $p = 0,016$ respectivamente). Pese a esto, los análisis individuales no paramétricos,

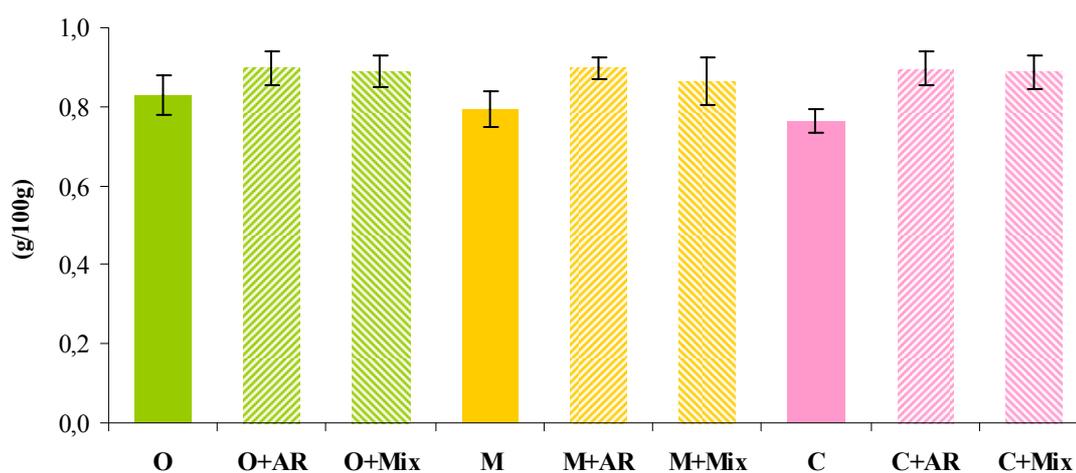
no presentaron ningún tipo de diferencias estadísticamente significativas en ambas expresiones (Figuras 22 y 23).

Figura 22. Peso absoluto del músculo gastrocnemio



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 23. Peso del músculo gastrocnemio relativo al peso corporal

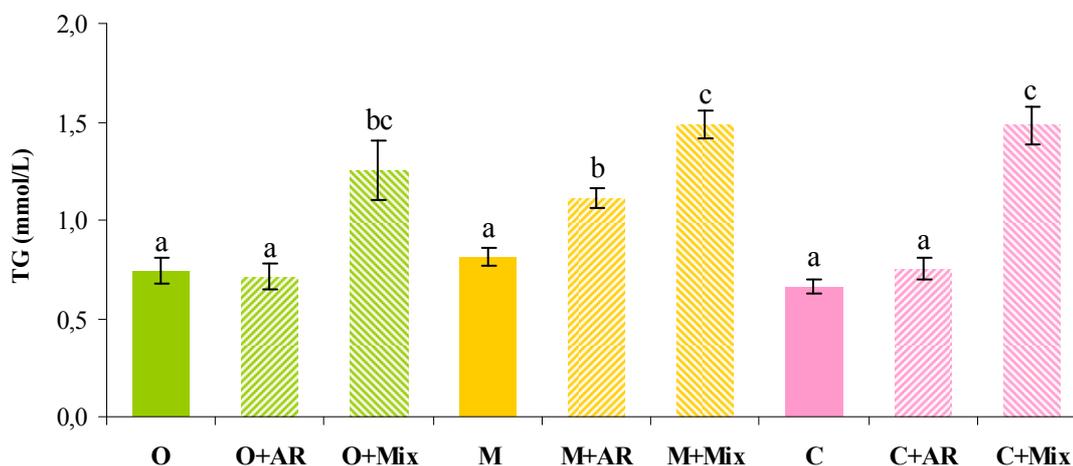


Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

6.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LAS CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE TRIGLICÉRIDOS, FOSFOLÍPIDOS, COLESTEROL Y GLUCOSA

Las concentraciones de TG séricos presentaron un efecto estadísticamente significativo por el origen de grasa dietaria ($p = 0,002$), pero mucho más acentuado ha sido observado el efecto por la fuente de isómero CLA suplementada a las dietas ($p < 0,001$). La significancia de la grasa dietaria, es debida al agrupamiento de los 3 tratamientos con aceite de maíz, que presentaron diferencias con las respectivas compilaciones de los 3 grupos que recibieron aceite de oliva o aceite de canola. No obstante, en las comparaciones individuales, el grupo M+AR fue el único grupo que manifestó un marcado aumento de este parámetro frente a O+AR y C+AR (Figura 24). Sin embargo, el cambio más notorio observado en las concentraciones de TG, ha sido debido al incremento que produjo el Mix, y este efecto fue independiente del origen de grasa dietaria.

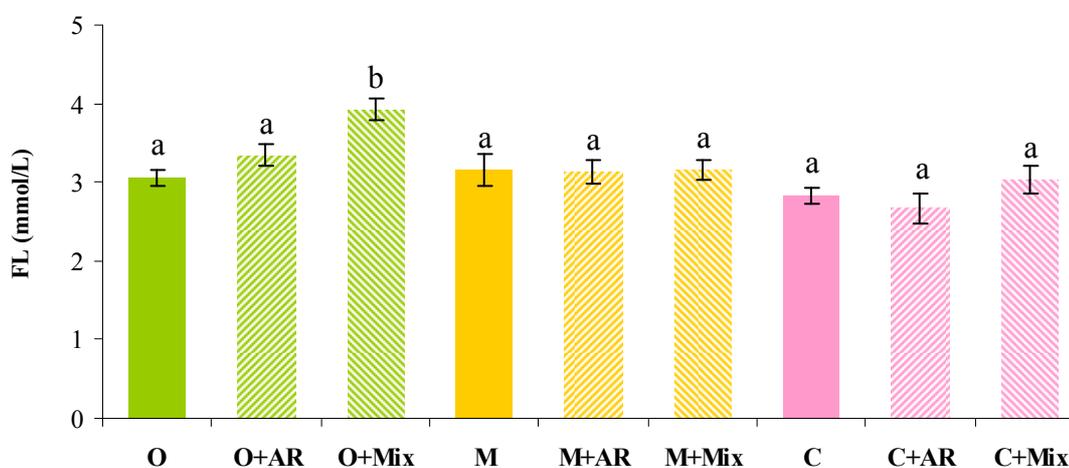
Figura 24. Concentración de triglicéridos séricos



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

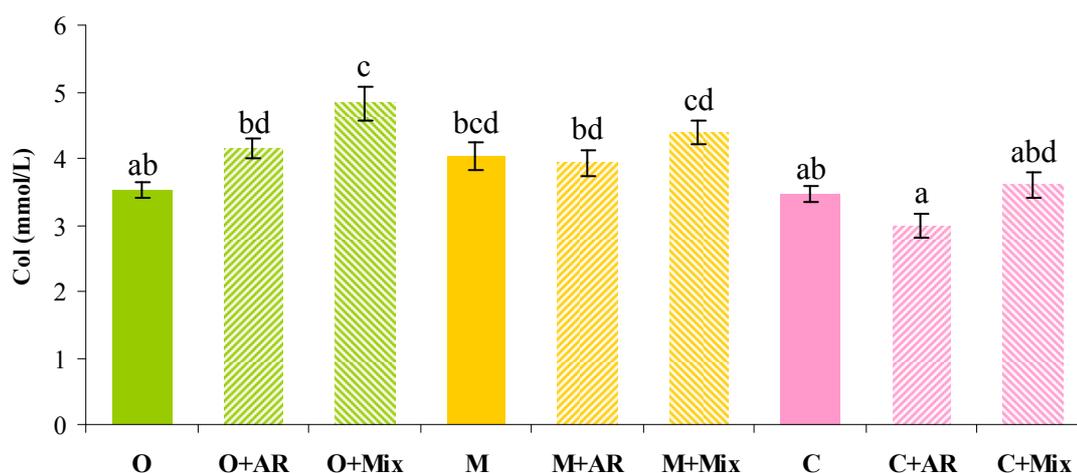
Las concentraciones de FL séricos mostraron diferencias estadísticas por el origen de grasa dietaria ($p < 0,001$) y por la fuente de CLA ($p = 0,009$). Dichos efectos, fueron debidos al incremento que produjo la presencia de Mix en los animales alimentados con aceite de oliva (Figura 25). Entre los demás grupos, no se observaron efectos por el origen de grasa, ni por la fuente de CLA.

Figura 25. Concentración de fosfolípidos séricos



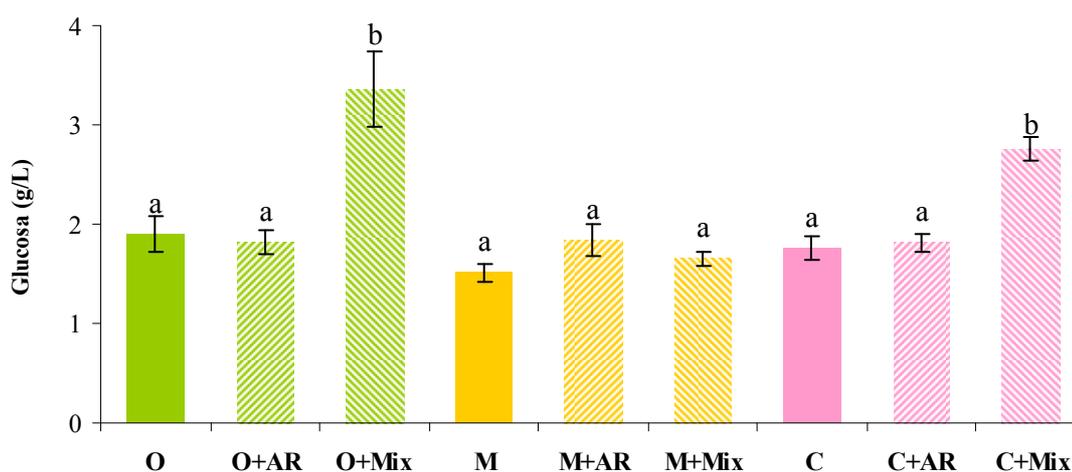
Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Un efecto semejante ha sido observado con las concentraciones de Col sérico, donde el análisis de variancia arrojó diferencias significativas por el origen de grasa dietaria ($p < 0,001$), y por la fuente de CLA ($p < 0,001$). Dichos cambios también fueron debido al efecto del O+Mix, que incrementó las concentraciones de Col (Figura 26).

Figura 26. Concentración de colesterol sérico

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

La concentración de glucosa en plasma fue modificada por el origen de grasa dietaria ($p < 0,001$) y por la fuente de CLA ($p < 0,001$). Los cambios más notorios en este parámetro fueron observados cuando se suplementó con Mix el aceite de oliva y el aceite de canola, frente a aquellos animales que recibieron la misma grasa dietaria sin suplementar con CLA, o con la adición de AR (Figura 27).

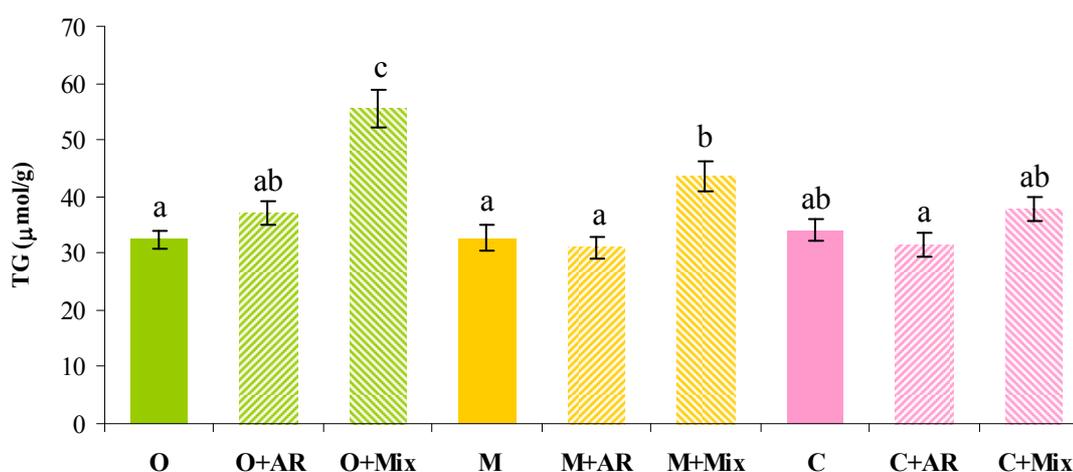
Figura 27. Concentración plasmática de glucosa

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

7.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL CONTENIDO HEPÁTICO DE TRIGLICÉRIDOS, FOSFOLÍPIDOS Y COLESTEROL

El análisis de variancia mostró que los tratamientos dietarios, condujeron a un efecto diferencial sobre el contenido de TG hepáticos, tanto por el origen de grasa dietaria ($p = 0,001$), como por la fuente de CLA ($p < 0,001$). La suplementación con Mix a la dietas conteniendo aceites de oliva o de maíz incrementó el contenido hepático de TG frente a aquellos sin suplementación de CLA o con suplementación de AR (Figura 28). Este cambio, fue más acentuado en el grupo O+Mix. La suplementación con AR no modificó el contenido hepático de TG con ninguna de las grasas dietarias.

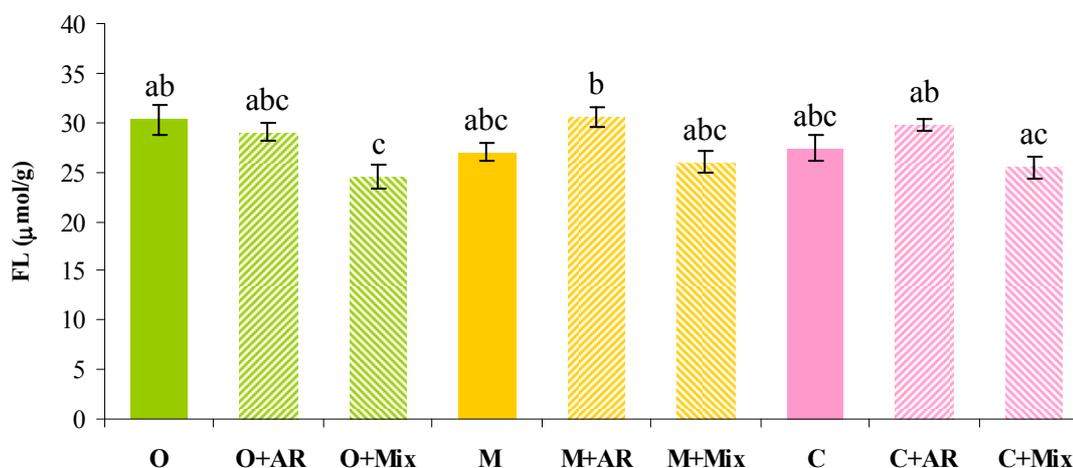
Figura 28. Contenido hepático de triglicéridos



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

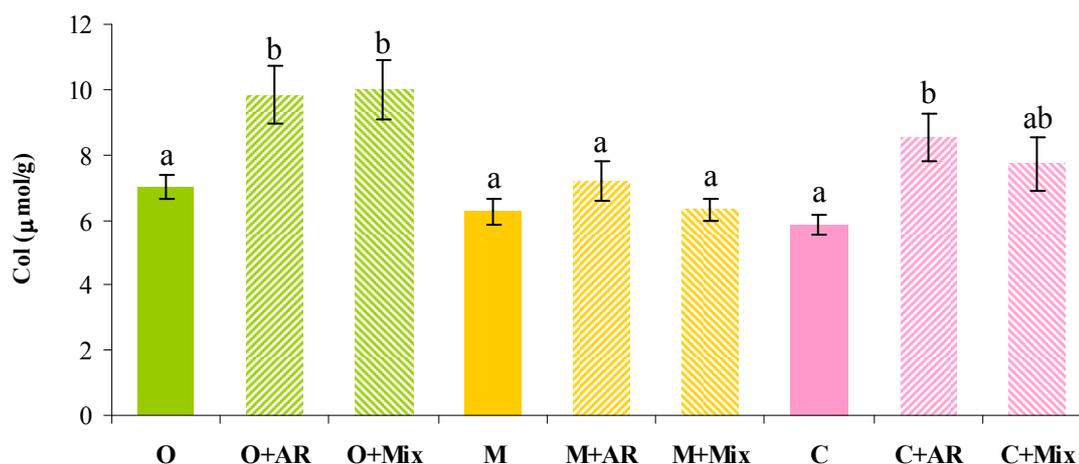
El contenido hepático de FL no fue afectado por el origen de grasa dietaria ($p = 0,897$), pero si por la fuente de CLA ($p < 0,001$). Dichos cambios, fueron atribuidos principalmente al descenso de los niveles hepáticos de FL por la suplementación con Mix, que alcanzó diferencias estadísticas en el grupo O+Mix (Figura 29).

Figura 29. Contenido hepático de fosfolípidos



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

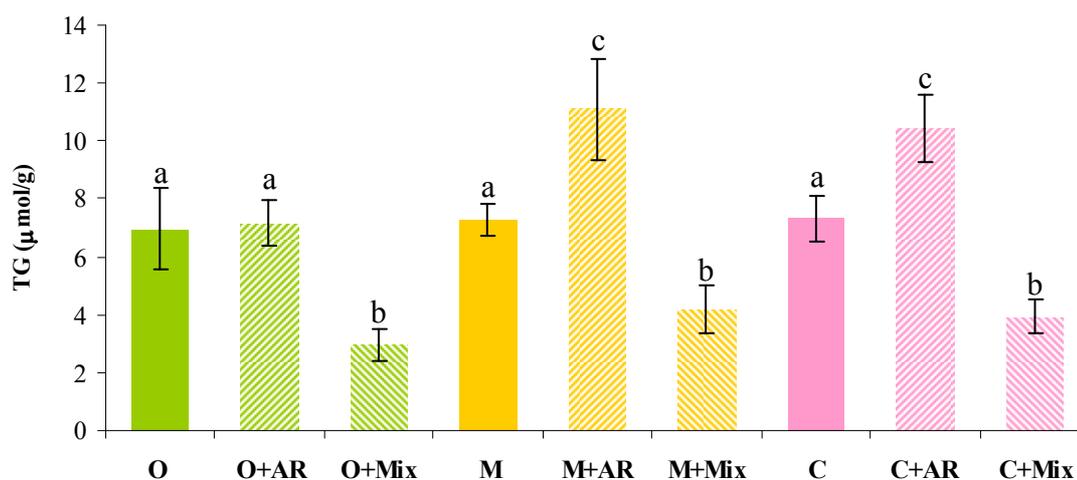
El análisis de las dos variables independientes para los niveles de Col hepático, mostró diferencias tanto por el origen de grasa dietaria ($p < 0,001$), como por la fuente de CLA utilizada ($p < 0,001$). Es dable destacar un efecto diferente de los CLA en función de la grasa dietaria (Figura 30). En los animales que recibieron aceite de oliva, la suplementación tanto con AR, como con Mix, aumentó los niveles de Col. En aquellos alimentados con aceite de canola, sólo la suplementación con AR incrementó significativamente dicho parámetro; mientras que en los alimentados con aceite de maíz ninguna de las dos fuentes de CLA modificaron este parámetro.

Figura 30. Contenido hepático de colesterol

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

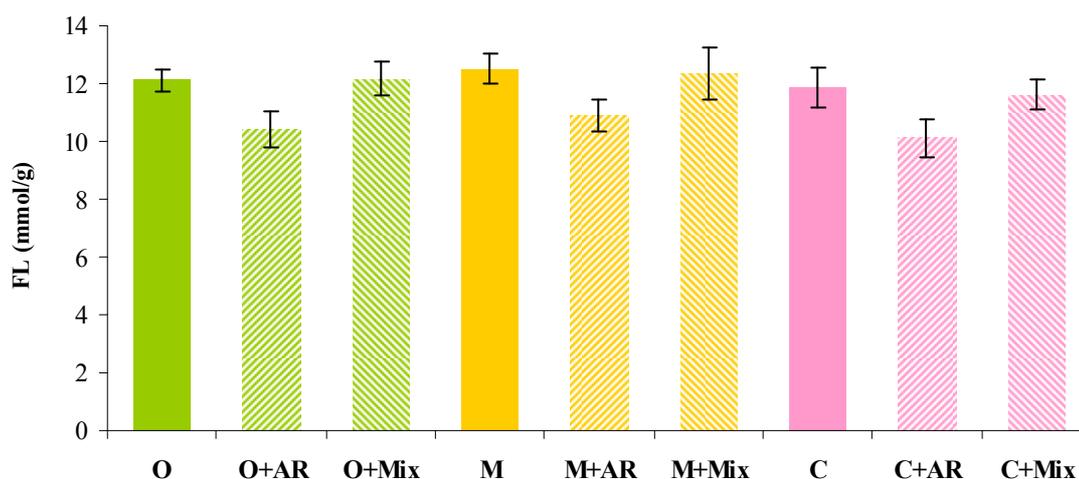
8.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL CONTENIDO MUSCULAR DE TRIGLICÉRIDOS Y FOSFOLÍPIDOS

El contenido muscular de TG fue modificado por la fuente de CLA suministrada a los animales ($p < 0,001$), pero no así por el origen de grasa dietaria ($p = 0,075$). La suplementación con Mix en todos los tratamientos redujo significativamente los niveles de TG, mientras que el AR mostró un efecto diferente. Específicamente, el AR en los grupos de animales alimentados con aceite de maíz y aceite de canola incrementó los depósitos de TG muscular (Figura 31),

Figura 31. Contenido muscular de triglicéridos

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

El análisis estadístico 3x3 ANOVA no mostró modificaciones significativas en el contenido muscular de FL por los tratamientos con diferentes grasas dietarias ($p = 0,355$), mientras que presentó cambios por la fuente de CLA ($p = 0,002$). No obstante, las comparaciones individuales no paramétricas no presentaron modificaciones entre los grupos (Figura 32).

Figura 32. Contenido muscular de fosfolípidos

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

9.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN LOS LÍPIDOS TOTALES SÉRICOS, SECRETADOS POR EL HÍGADO Y EN LOS TEJIDOS HEPÁTICO Y ADIPOSO BLANCO

En las Tablas 6, 7, 8 y 9 observamos que, tanto el origen de grasa dietaria, como la fuente de CLA, han producido numerosos cambios en el perfil de los AG en el suero post-prandial, suero post-inhibición de la remoción de las TG-VLDL, hígado y TAE. Dada la diversidad de AG que podemos identificar y cuantificar, se describen con mayor profundidad aquellos AG que tienen mayor relevancia cuantitativa y/o metabólica.

9.1.- Composición de ácidos grasos en los lípidos séricos

La composición de AG presentes en suero de animales en condiciones alimentadas, reflejan el “pool de AG” correspondiente a los lípidos de la dieta más aquellos procedentes de la metabolización de lipoproteínas a nivel de diferentes tejidos.

Los AGI, que fueron las variables de comparación entre los diferentes orígenes de grasa dietaria -reflejado por los AG: ácido oleico (*c9*-18:1), ácido linoleico (-AL- *c9,c12*-18:2), ácido α -linolénico (-ALN- *c9,c12,c15*-18:3); como asimismo, los niveles de los isómeros *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA, guardaron una proporción acorde con la ingesta de los mismos, ha excepción del grupo C+AR que presentó niveles mayores de *c9,t11*-CLA que los grupos O+AR y M+AR. No obstante, los cambios de dichos AG, indujeron modificaciones en forma significativa en los niveles de otros AG derivados o sustitutos de los mismos en los lípidos circulantes (Tabla 6).

Los ácidos grasos saturados (AGS), ácido palmítico (16:0) y ácido esteárico (18:0), mostraron cambios muy ligeros en sus niveles, tanto por el origen de grasa dietaria, como por la fuente de CLA. Específicamente, se notó un incremento en el contenido de ácido palmítico en los animales que consumieron aceite de maíz como fuente de grasa dietaria frente a aquellos que consumieron aceite de canola; y en el caso del ácido esteárico, este incremento no presentó diferencias significativas, llegando a mostrarse sólo como una tendencia. La suplementación con Mix sólo incrementó los niveles de ácido esteárico en aquellos animales alimentados con aceite de maíz.

Tabla 6. Composición porcentual de ácidos grasos en los lípidos séricos

	O	O+AR	O+Mix	M	M+AR	M+Mix	C	C+AR	C+Mix	ANOVA		
										G	I	GxI
16:0	24,97±1,20 ^{abc}	26,23±0,33 ^{ab}	23,76±0,80 ^{ac}	26,94±1,01 ^b	24,82±0,33 ^{abc}	24,27±0,21 ^{abc}	23,24±0,35 ^c	25,00±0,20 ^{abc}	24,51±0,38 ^{abc}	NS	NS	S
c9-16:1	1,04±0,07 ^a	0,99±0,06 ^a	0,82±0,06 ^{ab}	0,69±0,09 ^{bc}	0,55±0,04 ^{cd}	0,34±0,03 ^d	0,75±0,02 ^b	0,99±0,07 ^{ab}	0,51±0,02 ^c	S	S	S
18:0	8,78±0,55 ^a	9,73±0,26 ^{abc}	10,46±0,70 ^{abcd}	9,66±0,31 ^{abc}	11,41±0,14 ^{cd}	12,31±0,34 ^d	9,25±0,47 ^{ab}	8,87±0,15 ^a	11,09±0,53 ^{bcd}	S	S	NS
c9-18:1	22,87±0,75 ^a	19,65±0,22 ^a	19,80±1,06 ^a	13,64±1,42 ^b	10,92±1,01 ^b	10,75±0,44 ^b	23,11±0,54 ^a	23,38±0,53 ^a	22,11±0,59 ^a	S	S	NS
c11-18:1	2,89±0,14 ^{ab}	3,03±0,10 ^a	2,46±0,17 ^{bc}	1,20±0,04 ^{de}	1,33±0,11 ^{de}	1,10±0,11 ^d	2,04±0,05 ^{cf}	2,02±0,04 ^{cf}	1,62±0,08 ^{cf}	S	S	NS
c9,c12-18:2	18,35±0,25 ^a	18,27±0,15 ^a	18,84±1,19 ^a	29,84±0,63 ^b	27,80±0,40 ^b	28,24±0,71 ^b	20,32±0,45 ^a	18,52±0,10 ^a	18,48±0,45 ^a	S	S	NS
20:0	0,20±0,02 ^{ab}	0,23±0,00 ^{abc}	0,23±0,03 ^{abc}	0,19±0,06 ^a	0,36±0,03 ^{cd}	0,32±0,03 ^{bcd}	0,26±0,01 ^{abcd}	0,32±0,01 ^{abcd}	0,36±0,01 ^d	S	S	NS
c6,c9,c12-18:3	0,12±0,03 ^a	0,06±0,00 ^{ab}	0,00±0,00 ^c	0,23±0,04 ^d	0,11±0,01 ^a	0,08±0,01 ^{ab}	0,12±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b	0,08±0,01 ^b	S	S	S
c11-20:1	0,62±0,04 ^{ab}	0,53±0,02 ^{acd}	0,55±0,06 ^{acd}	0,44±0,04 ^{cd}	0,45±0,04 ^{cd}	0,38±0,02 ^d	0,73±0,02 ^b	0,58±0,02 ^{abc}	0,62±0,03 ^{ab}	S	S	NS
c9,c12,c15-18:3	0,12±0,01 ^a	0,09±0,01 ^a	0,12±0,02 ^a	0,16±0,02 ^a	0,12±0,01 ^a	0,11±0,01 ^a	1,25±0,03 ^b	1,18±0,03 ^b	1,11±0,13 ^b	S	NS	NS
c9,t11-18:2	0,00±0,00 ^a	1,30±0,04 ^b	0,85±0,12 ^c	0,00±0,00 ^a	1,31±0,07 ^b	0,86±0,05 ^c	0,00±0,00 ^a	1,66±0,05 ^d	0,93±0,11 ^c	S	S	S
t10,c12-18:2	0,00±0,00 ^a	0,28±0,01 ^b	0,70±0,07 ^c	0,00±0,00 ^a	0,31±0,02 ^b	0,84±0,04 ^c	0,00±0,00 ^a	0,32±0,02 ^b	0,79±0,06 ^c	NS	S	NS
c11,c14-20:2	0,20±0,02 ^a	0,34±0,03 ^{bc}	0,40±0,03 ^{bd}	0,28±0,03 ^{ac}	0,39±0,01 ^{bd}	0,46±0,03 ^d	0,23±0,01 ^a	0,31±0,02 ^{bc}	0,32±0,01 ^{bc}	S	S	NS
c8,c11,c14-20:3	1,87±0,10 ^{ab}	2,21±0,04 ^a	2,06±0,11 ^a	1,10±0,08 ^c	1,28±0,07 ^{cd}	1,36±0,03 ^{cd}	1,67±0,07 ^{bd}	1,85±0,03 ^{ab}	1,96±0,14 ^{ab}	S	S	NS
AA	8,77±0,49 ^a	8,80±0,32 ^a	8,69±0,40 ^a	9,85±0,78 ^{ab}	11,36±0,25 ^b	11,24±0,56 ^b	4,53±0,48 ^c	3,36±0,08 ^c	4,47±0,30 ^c	S	NS	NS
EPA	0,02±0,02 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,61±0,03 ^b	0,78±0,03 ^c	0,69±0,03 ^{bc}	S	S	S
DHA	2,60±0,15 ^{ab}	2,81±0,05 ^a	2,22±0,04 ^{ab}	1,81±0,16 ^b	2,14±0,19 ^{ab}	2,22±0,12 ^{ab}	5,53±0,34 ^c	5,71±0,31 ^c	6,01±0,13 ^c	S	NS	NS
Otros AGS	0,64±0,03	0,83±0,02	0,85±0,05	0,68±0,09	0,78±0,08	0,90±0,03	0,72±0,02	0,89±0,01	0,77±0,05			
Otros AGI	0,00±0,00	0,06±0,01	0,00±0,00	0,00±0,00	0,06±0,02	0,06±0,01	0,02±0,01	0,07±0,00	0,04±0,00			
NI	4,61±1,38	4,58±0,17	5,94±0,64	3,26±0,46	4,59±0,22	4,15±0,38	3,22±0,61	3,22±0,12	3,55±0,20			
Σ AGS	34,60±1,71	37,02±0,18	34,78±1,26	37,49±0,74	37,37±0,42	37,79±0,49	34,24±1,01	35,72±0,51	36,72±0,62	NS	NS	NS
Σ AGMI	27,42±0,82 ^a	24,20±0,37 ^a	23,62±1,18 ^a	15,98±1,47 ^b	13,25±1,14 ^b	12,58±0,50 ^b	26,49±0,64 ^a	26,85±0,59 ^a	24,86±0,70 ^a	S	S	NS
Σ AGPI	32,06±0,46 ^a	32,62±0,25 ^a	31,44±0,32 ^a	43,22±1,21 ^b	41,28±2,76 ^b	43,77±0,71 ^b	35,25±0,45 ^a	31,79±0,39 ^a	33,15±0,21 ^a	S	NS	NS
Σ CLA	0,00±0,00 ^a	1,58±0,03 ^{bc}	1,55±0,19 ^b	0,00±0,00 ^a	1,62±0,09 ^{bc}	1,71±0,10 ^{bc}	0,00±0,00 ^a	2,00±0,07 ^c	1,72±0,16 ^{bc}	NS	S	NS

AA: c5,c8,c11,c14-20:4. EPA: c5,c8,c11,c14,c17-20:5. DHA: c4,c7,c10,c13,c16,c19-22:6. “Otros AGS” y “Otros AGI” corresponden a la Σ de AGS y AGI, respectivamente cuyos niveles individuales son inferiores a 0,05%. NI: corresponde a la Σ de AG no identificados. Valores expresados como media ± SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA (indicado en las 3 últimas columnas), seguido del test de Tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Nivel de significancia: p < 0,05.

Los niveles de ácido palmitoleico (*c*9-16:1) fueron significativamente afectados por el origen de grasa dietaria, como por la fuente de CLA. En particular, los animales alimentados con aceite de oliva presentaron mayores niveles que aquellos que recibieron aceite de canola o de maíz. Además, la adición de Mix redujo los niveles de dicho AG, logrando significancia estadística en los grupos M+Mix y C+Mix versus sus respectivos controles. El contenido sérico de ácido *cis*-vaccénico (*c*11-18:1) fue en el grupo O > C > M y fueron paralelos a los niveles de los mismos en la grasa dietaria; mientras que los niveles de *c*11-20:1 fue en el grupo C > O > M a pesar de que el orden comparativo de los mismos en las grasas dietarias fueron diferentes (C > M = O). Las suplementaciones con ambas fuentes de CLA, en las comparaciones individuales, no mostraron diferencias estadísticas.

Los niveles del ácido γ -linolénico (-GLA- *c*6,*c*9,*c*12-18:3) fueron incrementados significativamente en los animales alimentados con aceite de maíz comparados con los que recibieron aceite de oliva o de canola y fueron disminuidos por la presencia, tanto de AR como de Mix. Sorprendentemente, los niveles del ácido dihomo- γ -linolénico (-DGLA- *c*8,*c*11,*c*14-20:3) mostraron un efecto opuesto a los niveles de GLA en los animales consumiendo aceite de maíz, y los isómeros CLA no tuvieron efecto significativo alguno. El ácido araquidónico (-AA- *c*5,*c*8,*c*11,*c*14-20:4) fue significativamente mayor en los grupos que consumieron aceite de maíz comparado a los que consumieron aceite de canola, pero no mostró diferencia frente a los que recibieron aceite de oliva. En concordancia con los niveles de DGLA, los de AA no fueron modificados por la suplementación con CLA. El AG *c*11,*c*14-20:2, como era de esperar, fue ligeramente incrementado por la dieta rica en AL; no obstante la suplementación con CLA aumentó significativamente los niveles de dicho derivado independientemente de la grasa dietaria.

Los AG de la familia n-3 derivados del ALN, mostraron un comportamiento altamente asociado a las modificaciones previstas por las grasas dietarias. Los animales alimentados con aceite de canola presentaron los mayores niveles de ácido eicosapentaenoico (EPA- *c*5,*c*8,*c*11,*c*14,*c*17-20:5) y ácido docosahexaenoico (DHA- *c*4,*c*7,*c*10,*c*13,*c*16,*c*19-22:6) frente a los respectivos controles alimentados con aceite de oliva y de maíz. Los CLA no mostraron efectos notorios en los niveles de ninguno de los dos AG mencionados.

9.2.- Composición de ácidos grasos en los lípidos secretados por el hígado

La composición de AG evaluada en suero de animales ayunados post-inyección de Triton WR 1339, refleja la composición de AG secretados por los TG-VLDL (Tabla 7).

Los niveles de los AG: ácido oleico, AL y ALN en las lipoproteínas secretadas por el hígado, presentaron perfiles relacionados a la ingesta de los mismos, y también fueron influenciados por la suplementación con CLA. Así, en orden de contenido, el ácido oleico fue: C > O > M, y mostró un descenso por la adición de Mix en los animales que fueron alimentados con aceite de canola. Los niveles de AL fueron significativamente mayores en los grupos de animales alimentados con aceite de maíz, y entre dichos grupos, no hubo diferencias por la adición de CLA. En cambio, en los animales que recibieron menores cantidades dietarias de este AG, la suplementación con Mix redujo los niveles de AL. Los niveles de ALN, como era de esperar, fueron mayores en los animales alimentados con aceite de canola; pero notoriamente, los CLA redujeron en forma significativa su contenido de modo dependiente del isómero considerado. Específicamente, el Mix redujo porcentualmente más los niveles de ALN que el AR.

El contenido de *c9,t11*-CLA se relacionó con los niveles ingeridos, pero fueron afectados por el origen de grasa dietaria en los grupos que recibieron dietas suplementadas con AR. El grupo C+AR presentó mayores niveles que el grupo M+AR. En cambio, en los animales que consumieron cantidades equimoleculares de *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA, los niveles de *c9,t11*-CLA no fueron influenciados por el origen de grasa dietaria. El contenido de *t10,c12*-CLA no mostró diferencias entre los grupos que consumieron cantidades equiparables de dicho isómero. Es dable notar que la relación *c9,t11*-CLA/ *t10,c12*-CLA secretados por las TG-VLDL fueron muy diferentes a las existentes en el suero post-prandial y, como se verá posteriormente, estuvieron en relaciones semejantes a las presentes en el hígado.

Tabla 7. Composición porcentual de ácidos grasos secretados por el hígado en las VLDL

	O	O+AR	O+Mix	M	M+AR	M+Mix	C	C+AR	C+Mix	ANOVA		
										G	I	GxI
16:0	24,53±0,52 ^{ab}	24,29±0,34 ^{ab}	24,57±0,73 ^{ab}	22,79±0,82 ^{ab}	22,04±1,12 ^a	22,15±1,07 ^a	21,95±0,15 ^a	22,46±0,04 ^{ab}	25,55±0,16 ^b	S	NS	S
c9-16:1	2,42±0,01 ^a	2,68±0,05 ^a	0,95±0,17 ^{bc}	2,46±0,12 ^a	1,43±0,23 ^b	0,72±0,05 ^c	2,74±0,08 ^a	2,63±0,09 ^a	0,99±0,05 ^{bc}	S	S	S
18:0	8,40±0,16 ^{ab}	6,72±0,45 ^a	7,39±0,54 ^{ab}	8,67±0,27 ^b	8,28±0,54 ^{ab}	8,75±0,46 ^b	7,24±0,17 ^{ab}	7,19±0,25 ^{ab}	7,94±0,38 ^{ab}	S	NS	NS
c9-18:1	24,41±0,39 ^a	26,37±0,93 ^{ab}	26,81±1,86 ^{ab}	15,52±0,45 ^c	15,54±1,38 ^c	13,38±1,55 ^c	30,28±0,02 ^b	27,16±0,52 ^{ab}	23,55±0,26 ^a	S	S	S
c11-18:1	2,17±0,04 ^a	2,74±0,05 ^b	2,96±0,14 ^b	0,97±0,09 ^c	1,05±0,06 ^c	1,07±0,09 ^c	1,92±0,13 ^{ad}	1,65±0,09 ^d	1,73±0,10 ^{ad}	S	S	S
c9,c12-18:2	18,00±0,26 ^a	16,55±0,36 ^{ab}	14,28±0,07 ^b	31,11±1,13 ^c	31,12±1,24 ^c	28,81±1,16 ^c	19,29±0,44 ^a	19,28±0,02 ^a	16,62±0,76 ^b	S	S	NS
20:0	0,00±0,00	0,07±0,03	0,21±0,03	0,14±0,04	0,16±0,01	0,20±0,02	0,28±0,07	0,25±0,14	0,20±0,10	S	NS	NS
c6,c9,c12-18:3	0,71±0,00 ^a	0,55±0,01 ^b	0,32±0,09 ^{ce}	1,10±0,05 ^d	0,69±0,06 ^a	0,48±0,05 ^b	0,53±0,06 ^b	0,39±0,02 ^c	0,24±0,01 ^e	S	S	S
c11-20:1	0,53±0,05 ^a	0,42±0,01 ^a	0,78±0,08 ^b	0,36±0,07 ^a	0,49±0,08 ^a	0,63±0,12 ^{ab}	0,62±0,02 ^{ab}	0,53±0,04 ^{ab}	0,58±0,02 ^{ab}	NS	S	S
c9,c12,c15-18:3	0,20±0,04 ^a	0,08±0,01 ^b	0,05±0,00 ^b	0,23±0,05 ^a	0,13±0,02 ^{ab}	0,09±0,01 ^b	1,54±0,05 ^c	1,14±0,02 ^d	0,71±0,06 ^e	S	S	S
c9,t11-18:2	0,00±0,00 ^a	1,62±0,03 ^{bc}	0,61±0,06 ^d	0,00±0,00 ^a	1,43±0,14 ^b	0,65±0,06 ^d	0,00±0,00 ^a	1,82±0,02 ^c	0,69±0,02 ^d	S	S	S
t10,c12-18:2	0,00±0,00 ^a	0,12±0,01 ^b	0,24±0,02 ^{cd}	0,00±0,00 ^a	0,13±0,02 ^b	0,30±0,01 ^d	0,00±0,00 ^a	0,18±0,01 ^{bc}	0,29±0,05 ^d	NS	S	NS
c11,c14-20:2	0,00±0,00 ^a	0,16±0,01 ^b	0,36±0,06 ^c	0,21±0,03 ^b	0,27±0,02 ^{bc}	0,36±0,02 ^c	0,13±0,02 ^{ab}	0,17±0,02 ^b	0,34±0,04 ^c	S	S	S
c8,c11,c14-20:3	0,68±0,07 ^{ab}	0,67±0,06 ^{ab}	0,89±0,07 ^{ac}	0,54±0,05 ^b	0,45±0,02 ^b	0,81±0,03 ^{ac}	0,62±0,08 ^{ab}	0,89±0,00 ^c	1,44±0,07 ^d	S	S	S
AA	11,44±0,33 ^a	9,68±0,95 ^a	10,90±0,75 ^a	10,02±0,91 ^a	9,59±1,24 ^a	12,83±1,40 ^a	4,65±0,07 ^b	4,71±0,35 ^b	7,78±0,41 ^c	S	S	NS
EPA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,02±0,01 ^a	0,00±0,00 ^a	0,01±0,01 ^a	0,01±0,01 ^a	0,33±0,01 ^b	0,40±0,03 ^{bc}	0,46±0,04 ^c	S	S	S
DHA	3,16±0,00 ^{ab}	3,18±0,05 ^{ab}	3,37±0,14 ^{ab}	2,39±0,34 ^a	2,54±0,27 ^a	2,97±0,30 ^{ab}	3,84±0,03 ^b	5,21±0,21 ^c	7,87±0,43 ^d	S	S	S
Otros AGS	0,70±0,00	0,95±0,09	0,84±0,02	1,00±0,16	1,03±0,06	0,85±0,03	1,17±0,18	1,04±0,02	0,95±0,05			
Otros AGI	0,00±0,00	0,06±0,00	0,01±0,01	0,00±0,00	0,09±0,02	0,20±0,04	0,06±0,04	0,18±0,10	0,06±0,04			
NI	2,65±0,00	3,16±0,12	4,45±0,19	2,48±0,10	3,54±0,23	4,73±0,58	2,30±0,08	2,82±0,20	2,17±0,15			
Σ AGS	33,63±0,36	32,03±0,48	33,00±1,22	32,60±0,70	31,52±1,48	31,95±1,48	30,65±0,06	30,93±0,04	34,64±0,51	NS	NS	NS
Σ AGMI	29,52±0,47 ^{ab}	32,67±1,26 ^{ac}	31,50±2,09 ^{abc}	19,30±0,41 ^d	18,50±1,47 ^d	15,80±1,78 ^d	35,61±0,07 ^c	31,97±0,73 ^{abc}	26,85±0,30 ^b	S	S	S
Σ AGPI	34,20±0,11 ^{ab}	31,68±0,59 ^c	30,20±0,76 ^c	45,61±0,52 ^d	44,88±0,57 ^d	46,56±0,58 ^d	31,36±0,25 ^c	32,28±0,50 ^{ac}	35,38±0,34 ^b	S	S	S
Σ CLA	0,00±0,00 ^a	1,74±0,03 ^{bc}	0,85±0,08 ^d	0,00±0,00 ^a	1,56±0,16 ^b	0,96±0,07 ^d	0,00±0,00 ^a	2,00±0,01 ^c	0,98±0,06 ^d	S	S	S

AA: c5,c8,c11,c14-20:4. EPA: c5,c8,c11,c14,c17-20:5. DHA: c4,c7,c10,c13,c16,c19-22:6. “Otros AGS” y “Otros AGI” corresponden a la Σ de AGS y AGI, respectivamente cuyos niveles individuales son inferiores a 0,05%. NI: corresponde a la Σ de AG no identificados. Valores expresados como media ± SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA (indicado en las 3 últimas columnas), seguido del test de Tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Nivel de significancia: p < 0,05.

Los niveles de ácido palmítico y ácido esteárico, si bien mostraron efectos en el análisis de variancia por el origen de grasa dietaria, las comparaciones no paramétricas no mostraron ningún efecto entre grupos. Estos AG son los principales contribuyentes a la sumatoria de los AGS y la ausencia de efecto está en concordancia con el resultado del análisis de la Σ AGS. La Σ AGMI, como la Σ AGPI mostró un correlato con el perfil de los mismos en las grasas dietarias, pero además fueron influenciados por la suplementación con CLA.

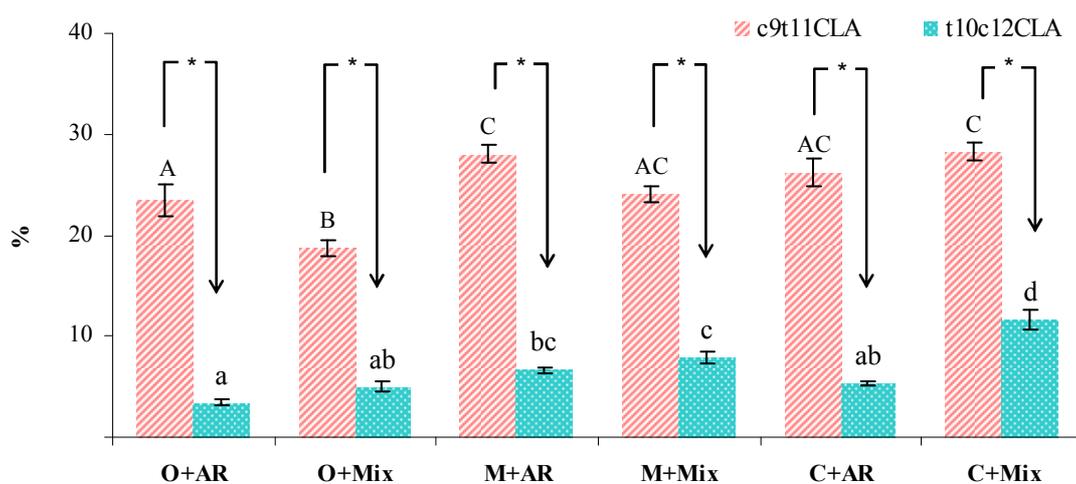
Respecto a los niveles de ácido palmitoleico, si bien el ANOVA mostró efecto por el origen de grasa dietaria, no existieron diferencias entre grupos individuales, pero la suplementación con Mix redujo los niveles del mismo con todas las grasas dietarias. La suplementación con AR sólo mostró el efecto antes mencionado en el grupo M+AR (vs. M) y en menor medida que el Mix. El contenido de ácido *cis*-vaccénico en los lípidos séricos secretados por el hígado fueron mayores en los grupos O y C frente al grupo M; y en el grupo de animales alimentados con aceite de oliva, la suplementación con AR o con Mix, incrementó los niveles de dicho AG.

El GLA tuvo niveles significativamente elevados por la dieta rica en AL, pero es de destacar que el AR, y en mayor medida el Mix, redujeron notoriamente el contenido de dicho AG. Otro producto intermediario en la vía de biosíntesis de AGPI n-6 es el *c11,c14-20:2* el cual, presenta también niveles superiores en los animales alimentados con aceite de maíz. Llamativamente, a diferencia del GLA, sus niveles fueron modificados por los CLA en el siguiente orden: Mix > AR > respectivos controles. El DGLA, si bien en el análisis de variancia (3x3 ANOVA) mostró relación con el origen de grasa dietaria y por la suplementación con CLA, no presentó diferencias estadísticas en las comparaciones individuales de O vs. M vs. C; no obstante los efectos de los CLA fueron: Mix > AR \geq respectivos controles. Los niveles de AA fueron significativamente reducidos en los animales alimentados con aceite de canola, y de este grupo, los animales suplementados con Mix, fueron los que tuvieron los mayores niveles (C+Mix vs. C+AR y C+Mix vs. C).

Los niveles de EPA y DHA fueron alterados por el origen de grasa dietaria, siendo los grupos alimentados con aceite de canola los que presentaron valores mayores. Sin embargo, cabe destacar que en los animales que consumieron aceite de canola, los niveles de ambos AG, es decir, EPA y DHA, fueron incrementados por los CLA, mostrando un mayor efecto por el Mix.

9.3.- Composición de ácidos grasos en los lípidos hepáticos

La composición de AG hepáticos (Tabla 8) mostró una importante dependencia de la composición de AG de la dieta consumida. No obstante, muchos de ellos provienen de la síntesis de novo de AG o son productos intermedios del metabolismo de los mismos. Los niveles hepáticos de *c9,t11*-CLA en los animales alimentados con grasas suplementadas con un aceite enriquecido en dicho isómero, fueron equivalentes independientemente del origen de grasa dietaria suministrada; mientras que en los animales alimentados con dietas suplementadas con un Mix de CLA, el contenido porcentual de *c9,t11*-CLA fue C+Mix > M+Mix > O+Mix. El contenido hepático de *t10,c12*-CLA tuvo importancia cuantitativa en los animales suplementados con Mix, cuyos niveles fueron dependientes de la grasa dietaria, siendo el contenido de los mismos en C+Mix > M+Mix > O+Mix. Cabe consignar que los animales suplementados con Mix recibieron cantidades equimoleculares de los isómeros *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA, lo cual no se reflejó en niveles hepáticos equivalentes. Así, podemos claramente observar en la Figura 33 que, independientemente de la relación *c9,t11*-CLA/ *t10,c12*-CLA ingerida, la retención de *t10,c12*-CLA fue notoriamente menor que la del *c9,t11*-CLA. Además, para cada isómero considerado, hubo diferencias significativas, tanto por el origen de grasa dietaria, como por la fuente de CLA. Los principales cambios fueron asociados a una reducción de la retención de ambos isómeros CLA en los grupos que recibieron aceite de oliva como fuente de grasa dietaria.

Figura 33. Retención porcentual de isómeros CLA en hígado

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. (*) Significa $p < 0,05$ por t-test entre los isómeros *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA. Letras distintas en mayúsculas o minúsculas indican $p < 0,05$ por test no paramétrico de Tukey luego del análisis de variancia para los isómeros *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA, respectivamente.

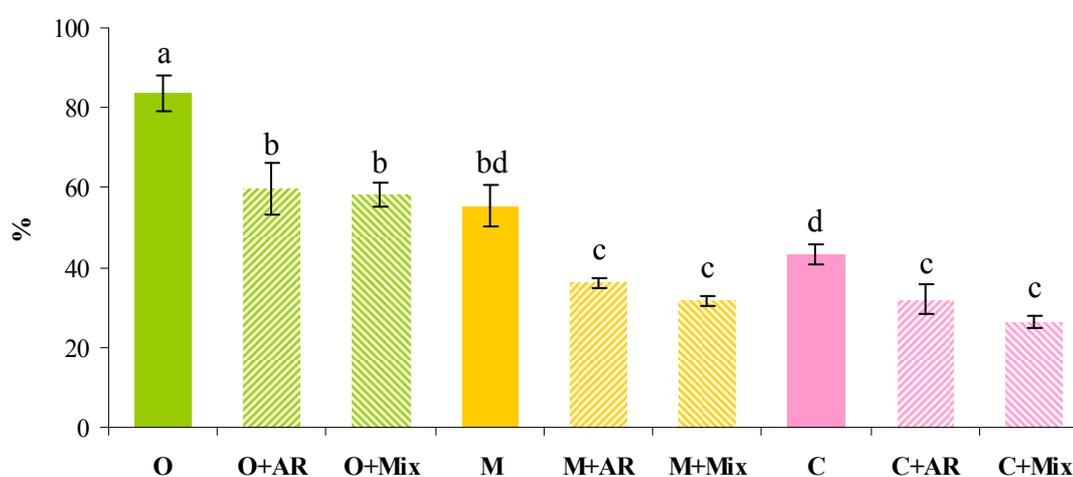
El contenido de ácido oleico, que en su orden de abundancia es aceite de canola > aceite de oliva > aceite de maíz, presentó niveles significativamente diferentes en los 3 grupos de grasas dietarias, siendo los niveles porcentuales de dicho AG en el grupo O > C > M. No se observó ningún efecto significativo por el tratamiento con las dos diferentes fuentes de CLA. Como se podía esperar, el contenido de AL y de ALN guardó una relación directa con los niveles dietarios, sin mostrar, a excepción de los niveles de ALN, en los grupos C+AR y C+Mix, ninguna variación por la suplementación con CLA.

Los productos derivados de la biosíntesis de AGPI-CL de la serie n-6 presentaron modificaciones por el origen de grasa dietaria y por la fuente de CLA. Específicamente, los niveles del GLA fueron significativamente mayores en el grupo M que en los grupos O y C, como asimismo en los respectivos grupos con CLA. Los niveles de GLA, independientemente del origen de grasa dietaria, fueron menores en los grupos tratados con Mix, mientras que con AR, solamente en el grupo C+AR. El contenido hepático del DGLA no presentó diferencias por los diferentes tratamientos de grasa dietaria y sólo en los animales tratados con aceite de maíz o con canola, la suplementación con Mix redujo significativamente los niveles de dicho AG. El AA mostró diferencias notorias, tanto por el tipo de grasa dietaria, como por la presencia de CLA. Los animales alimentados con aceite de maíz presentaron mayores valores de AA que los alimentados con aceite de oliva o

canola independientemente de la presencia o no de CLA. A excepción de O+AR, ambas fuentes de CLA redujeron los niveles hepáticos de AA, encontrándose un efecto mayor en aquellos suplementados con Mix.

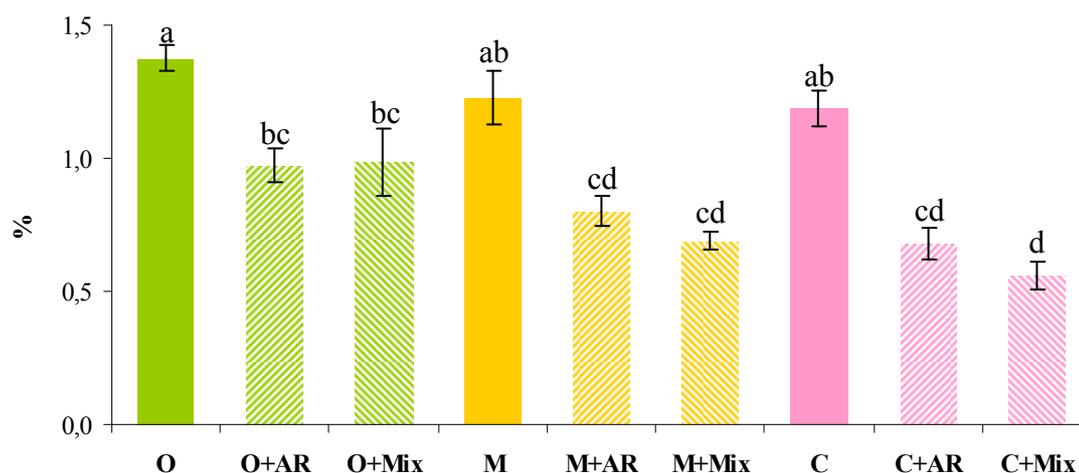
La biosíntesis de AGPI de la serie n-6, expresada por la relación porcentual producto/substrato (AA/AL) (Figura 34), mostró una dependencia del origen de grasa dietaria siendo $O > M > C$, y claramente una inhibición equivalente por la suplementación con AR o Mix.

Figura 34. Relación porcentual producto/substrato: AA/AL en hígado

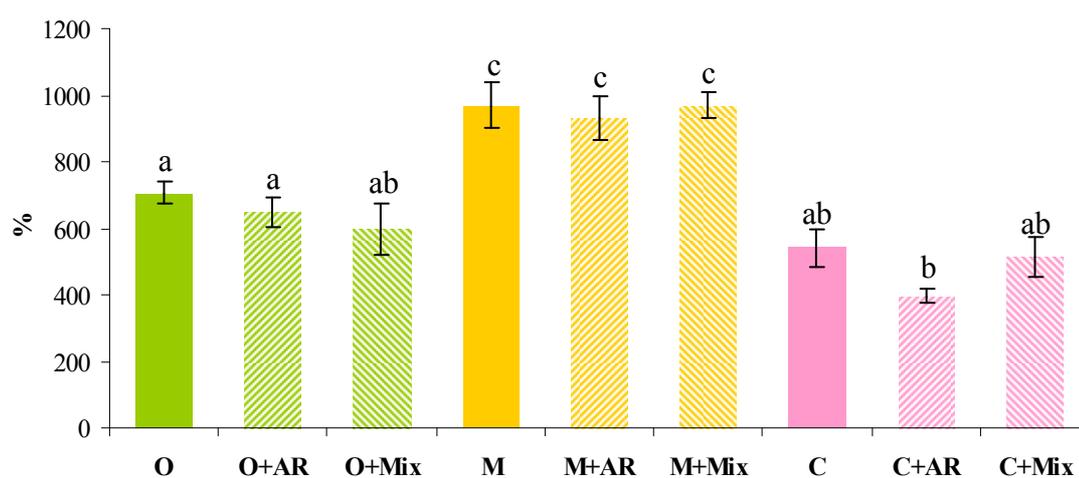


Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Dado que la enzima clave de la biosíntesis de AA es la $\Delta 6$ -desaturasa, en la Figura 35 se muestra la relación porcentual GLA/AL que representa el flujo de AL a través de dicha enzima. Es dable observar, que dicho parámetro no presentó modificaciones por el origen de grasa dietaria, pero fue significativamente reducido por la suplementación dietaria con AR o con Mix en equivalente proporción. Otra enzima importante en la biosíntesis de AGPI, es la $\Delta 5$ -desaturasa, cuyo flujo en la biosíntesis de AA puede ser representado por la relación AA/DGLA. Como puede observarse en la Figura 36, la misma sólo presentó dependencia del origen de grasa dietaria, pero no de la suplementación con AR o Mix.

Figura 35. Relación porcentual producto/substrato: GLA/AL en hígado

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 36. Relación porcentual producto/substrato: AA/DGLA en hígado

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Tabla 8. Composición porcentual de ácidos grasos en hígado

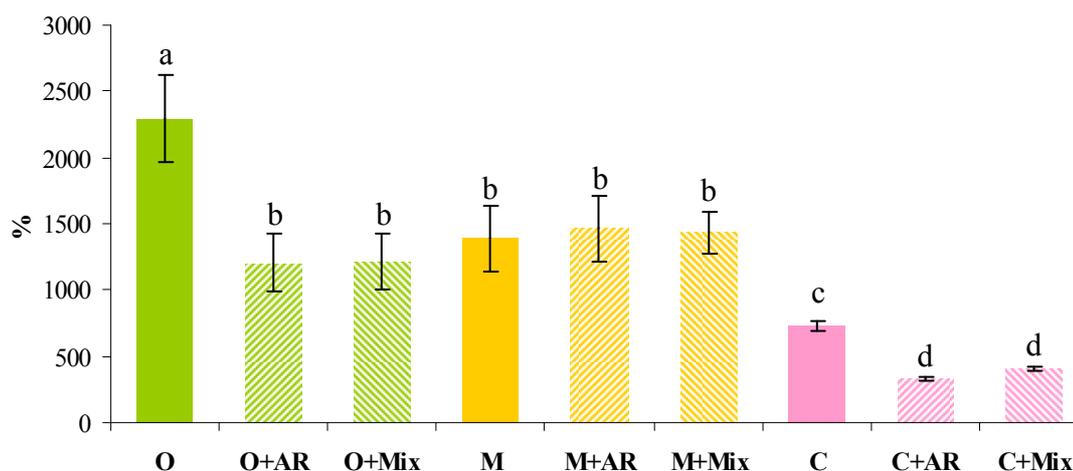
	O	O+AR	O+Mix	M	M+AR	M+Mix	C	C+AR	C+Mix	ANOVA		
										G	I	GxI
16:0	23,75±0,56 ^{ab}	24,24±1,06 ^{ab}	26,19±0,46 ^b	23,20±1,08 ^{ab}	23,07±0,59 ^{ab}	24,75±0,46 ^{ab}	22,78±0,72 ^a	22,44±0,35 ^a	22,28±0,70 ^a	S	NS	NS
c9-16:1	2,18±0,05 ^a	2,37±0,41 ^a	3,17±0,36 ^a	1,47±0,23 ^b	1,29±0,27 ^b	1,59±0,33 ^b	1,35±0,24 ^{bc}	1,62±0,17 ^b	0,91±0,13 ^c	S	NS	S
18:0	5,35±0,34 ^a	5,07±0,52 ^a	4,24±0,52 ^a	7,55±0,45 ^b	7,01±0,49 ^b	7,53±0,72 ^b	7,74±0,70 ^b	5,87±0,37 ^b	7,65±0,53 ^b	S	NS	NS
c9-18:1	36,50±2,00 ^a	36,68±1,19 ^a	40,49±0,99 ^a	22,20±1,75 ^b	20,17±1,65 ^b	22,05±1,50 ^b	29,38±1,81 ^c	33,45±1,30 ^c	32,40±1,08 ^c	S	NS	NS
c11-18:1	4,56±0,16 ^a	4,27±0,26 ^a	5,38±0,36 ^a	2,52±0,51 ^b	2,23±0,40 ^b	2,73±0,38 ^b	2,43±0,27 ^b	2,76±0,10 ^b	2,43±0,17 ^b	S	NS	NS
c9,c12-18:2	10,09±0,86 ^{ab}	10,80±1,13 ^{ab}	6,51±0,59 ^a	21,77±2,08 ^c	25,79±1,07 ^c	22,74±1,06 ^c	14,77±1,20 ^b	13,63±0,51 ^b	14,56±0,73 ^b	S	NS	S
c6,c9,c12-18:3	0,11±0,01 ^{ad}	0,10±0,01 ^{ad}	0,06±0,01 ^b	0,24±0,02 ^c	0,21±0,02 ^c	0,14±0,01 ^a	0,15±0,01 ^a	0,09±0,01 ^d	0,08±0,01 ^{bd}	S	S	NS
c11-20:1	1,26±0,07 ^a	1,05±0,04 ^{abc}	1,00±0,03 ^{abc}	0,76±0,09 ^{bcd}	0,68±0,03 ^d	0,75±0,03 ^{bd}	1,07±0,12 ^{ac}	1,01±0,03 ^{abc}	1,10±0,07 ^a	S	NS	NS
c9,c12,c15-18:3	0,12±0,01 ^a	0,15±0,02 ^a	0,12±0,00 ^a	0,22±0,04 ^a	0,14±0,02 ^a	0,13±0,01 ^a	1,06±0,09 ^b	1,53±0,04 ^c	1,50±0,06 ^c	S	S	S
c9,t11-18:2	0,00±0,00 ^a	2,02±0,14 ^b	1,04±0,04 ^c	0,00±0,00 ^a	2,43±0,07 ^b	1,34±0,04 ^d	0,00±0,00 ^a	2,27±0,11 ^b	1,57±0,05 ^e	S	S	S
t10,c12-18:2	0,00±0,00 ^a	0,09±0,01 ^b	0,28±0,02 ^c	0,00±0,00 ^a	0,17±0,01 ^d	0,46±0,04 ^e	0,00±0,00 ^a	0,14±0,01 ^f	0,64±0,06 ^g	S	S	S
c11,c14-20:2	0,16±0,01 ^a	0,18±0,04 ^a	0,13±0,02 ^a	0,38±0,04 ^b	0,55±0,04 ^c	0,61±0,05 ^c	0,19±0,01 ^a	0,17±0,01 ^a	0,21±0,03 ^a	S	S	S
c8,c11,c14-20:3	1,07±0,10 ^{ab}	0,96±0,08 ^{ab}	0,78±0,11 ^a	1,33±0,15 ^b	1,02±0,09 ^b	0,77±0,07 ^a	1,20±0,09 ^b	1,09±0,08 ^b	0,78±0,06 ^a	NS	S	NS
c11,c14,c17-20:3	0,03±0,01 ^a	0,02±0,02 ^a	0,02±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	0,02±0,01 ^a	0,01±0,01 ^a	0,06±0,02 ^a	0,13±0,01 ^b	0,14±0,02 ^b	S	NS	S
AA	7,76±0,60 ^a	6,23±0,61 ^a	3,68±0,48 ^b	11,62±0,58 ^c	9,37±0,66 ^d	7,81±0,71 ^{ad}	6,37±0,59 ^a	4,38±0,56 ^b	3,87±0,33 ^b	S	S	NS
EPA	0,10±0,02 ^a	0,01±0,01 ^a	0,04±0,02 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,89±0,07 ^b	0,67±0,01 ^c	0,61±0,04 ^c	S	S	S
DHA	2,19±0,18 ^{ac}	1,69±0,14 ^{abc}	1,14±0,15 ^b	2,61±0,24 ^a	2,17±0,19 ^{ac}	1,84±0,18 ^c	7,48±0,55 ^d	5,06±0,22 ^e	6,04±0,40 ^{de}	S	S	S
Otros AGS	0,95±0,07	0,99±0,07	0,92±0,04	0,89±0,04	0,98±0,05	1,14±0,04	1,07±0,09	1,07±0,05	1,11±0,07			
Otros AGI	0,00±0,00	0,02±0,01	0,03±0,02	0,00±0,00	0,03±0,01	0,01±0,01	0,00±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00			
NI	3,30±0,26	2,74±0,14	3,50±0,24	3,12±0,20	2,68±0,18	2,97±0,07	2,01±0,23	2,25±0,28	2,22±0,33			
Σ AGS	30,09±0,74 ^a	30,29±0,85 ^{ab}	31,09±0,19 ^{ab}	31,65±1,29 ^{ab}	31,06±0,65 ^{ab}	33,47±0,32 ^b	31,59±0,72 ^{ab}	29,38±0,47 ^a	31,04±0,55 ^{ab}	S	S	NS
Σ AGMI	45,80±1,77 ^{ab}	44,48±1,63 ^{abc}	50,81±1,32 ^a	27,00±2,44 ^{dc}	24,41±2,32 ^d	26,73±2,34 ^{de}	34,34±2,32 ^{ef}	38,94±1,37 ^{bcd}	36,76±1,47 ^{cf}	S	NS	NS
Σ AGPI	20,88±1,53 ^{abc}	19,18±1,42 ^{ab}	13,27±1,05 ^a	37,78±2,16 ^d	39,30±1,93 ^d	33,61±1,97 ^{de}	32,17±2,29 ^{de}	25,96±0,99 ^{bce}	27,80±1,52 ^{ce}	S	S	NS
Σ CLA	0,00±0,00 ^a	2,11±0,14 ^{bc}	1,32±0,06 ^d	0,00±0,00 ^a	2,60±0,07 ^e	1,78±0,05 ^b	0,00±0,00 ^a	2,40±0,11 ^{ce}	2,22±0,11 ^c	S	S	S

AA: c5,c8,c11,c14-20:4. EPA: c5,c8,c11,c14,c17-20:5. DHA: c4,c7,c10,c13,c16,c19-22:6. “Otros AGS” y “Otros AGI” corresponden a la Σ de AGS y AGI, respectivamente cuyos niveles individuales son inferiores a 0,05%. NI: corresponde a la Σ de AG no identificados. Valores expresados como media ± SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA (indicado en las 3 últimas columnas), seguido del test de Tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Nivel de significancia: p < 0,05.

Los AGPI-CL derivados de la serie n-3, como es lógico esperar, mostraron valores inferiores que aquellos procedentes de la serie n-6, llegando algunos de ellos a ser difíciles su detección, y en consecuencia, se presentan aquellos que mostraron niveles considerables y de importancia bioquímico-nutricional. El EPA mostró niveles considerables sólo en aquellos animales alimentados con aceite de canola, y los mismos fueron menores cuando se suplementó dicho aceite con AR o Mix. Por su parte, el DHA, estuvo elevado en los animales que ingirieron altos niveles de su precursor (ALN), y fueron influenciados por la suplementación con CLA. En este sentido, mientras que el AR decreció los niveles de DHA en aquellos animales que consumieron aceite de canola, el Mix redujo los niveles de DHA en todos los orígenes dietarios, alcanzando diferencias significativas en los grupos O+Mix y M+Mix.

La biosíntesis de AGPI de la serie n-3, expresada por la relación DHA/ALN (%), denotó una dependencia con el origen de grasa dietaria ($O > M > C$), y una diferente respuesta de los isómeros CLA en función de dicho origen de grasa (Figura 37). Así, mientras que el AR y el Mix, en igual proporción, redujeron la relación DHA/ALN en animales alimentados con aceite de oliva y de canola, no se observó efecto en aquellos alimentados con aceite de maíz. Por la escasa detección de algunos de los metabolitos intermediarios, los posibles efectos en los flujos parciales de sustratos a través de las diferentes enzimas participantes en la biosíntesis total de DHA, no fueron factibles de estimar.

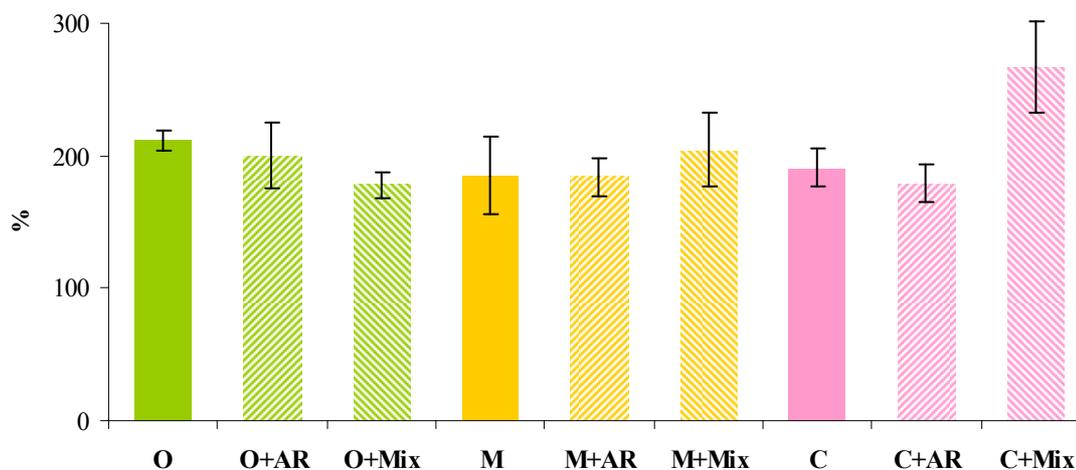
Sorprendentemente, los AG: $11c,14c-20:2$ y $11c,14c,17c-20:3$, productos secundarios de la elongación del AL y ALN respectivamente, mostraron niveles elevados en los animales alimentados con aceite de maíz o de canola. Dichos niveles fueron exacerbados en aquellos que, con dichos orígenes de grasas dietarias, recibieron AR o Mix.

Figura 37. Relación porcentual producto/substrato: DHA/ALN en hígado

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Los niveles de ácido palmitoleico y de ácido *cis*-vaccénico, intermediarios claves en la biosíntesis de novo, como procedentes de la dieta, fueron incrementados significativamente por el consumo de aceite de oliva, y en ninguno de los orígenes de grasa dietaria se observó efecto por la suplementación con AR o Mix. La relación entre ambos AG (ácido *cis*-vaccénico/ácido palmitoleico) (Figura 38), que refleja el flujo a través de la enzima elongasa en la serie n-7, no mostró efecto por el origen de grasa dietaria ($p = 0,144$), ni por la suplementación con CLA ($p = 0,061$). Los niveles de ácido gondoico (11*c*-20:1) estuvieron asociados a la ingesta de ácido oleico (grupos O y C), y no fueron influenciados por la suplementación con CLA.

Figura 38. Relación porcentual producto/substrato: ácido *cis*-vaccénico/ácido palmitoleico en hígado

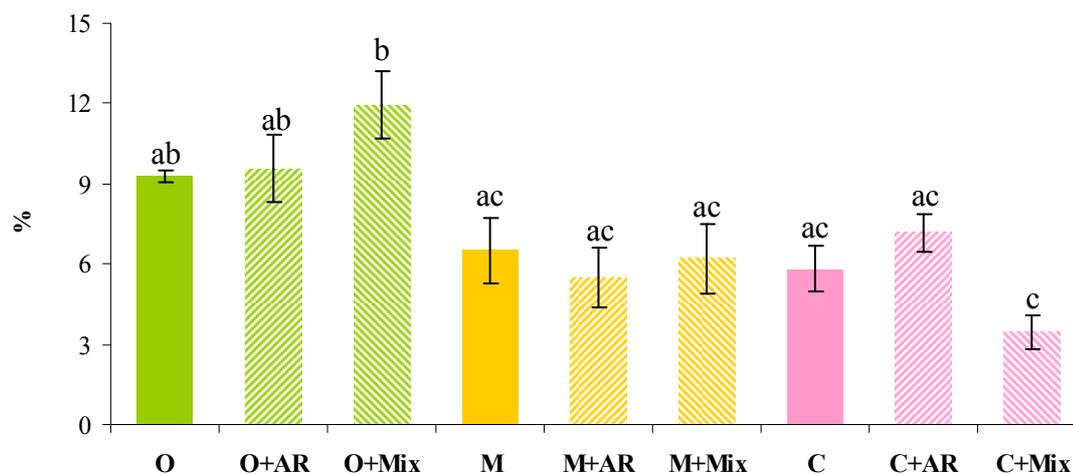


Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

La sumatoria de los niveles de AGS mostró diferencias, tanto por el origen de grasa dietaria, como por la presencia de CLA; sin embargo en el análisis estadístico individual no se observaron diferencias entre los grupos. La suma de AGMI mostró correlación con la ingesta de ácido oleico y con la síntesis de novo. Por ello, el contenido de AGMI fue $O > C > M$, y el mismo no fue influenciado por la presencia de isómeros CLA. Los AGPI mostraron una dependencia con el consumo de dichas grasas, y si bien la estadística grupal mostró significancia por el tratamiento con CLA, los análisis individuales entre grupos carecieron de diferencias estadísticas por la ingesta de dichos isómeros.

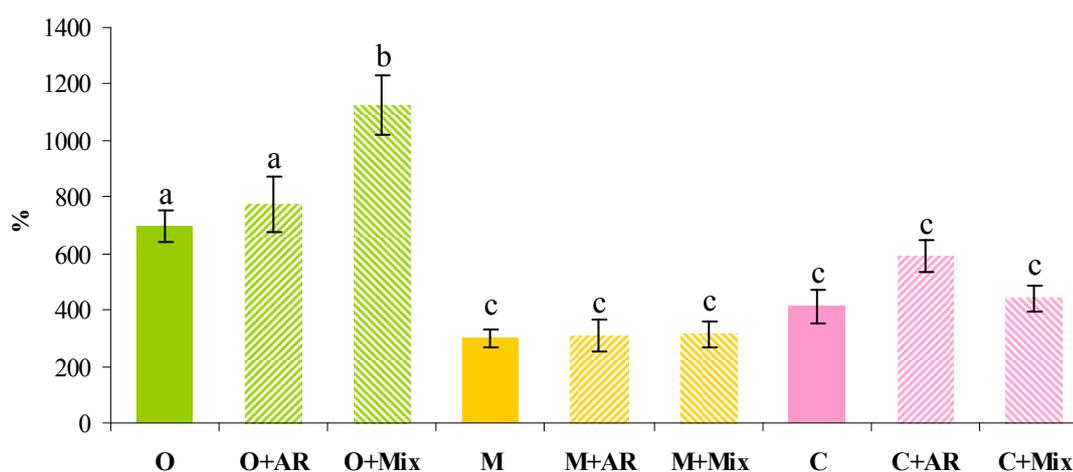
La relación entre AGMI y AGS, está influenciada por el tipo de AG proveniente de la dieta que es incorporado en el tejido, como también por el grado de desaturación de los AGS. Específicamente, las relaciones ácido palmitoleico/ácido palmítico (16:1/16:0) y ácido oleico/ácido esteárico (18:1/18:0), reflejan la conjunción de la contribución de los cuatro AG por el origen de grasa dietaria, junto con el flujo a través de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa (SCD-1). Por ello, focalizando el análisis en el tipo de isómero para cada origen de grasa dietaria suministrada, vemos (Figuras 39 y 40) que la suplementación con Mix incrementó el flujo de sustratos a través de la enzima SCD-1 en los animales que recibieron aceite de oliva alcanzando niveles significativos para la relación 18:1/18:0.

Figura 39. Relación porcentual producto/substrato: ácido palmitoleico/ ácido palmítico (16:1/16:0) en hígado



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 40. Relación porcentual producto/substrato: ácido oleico/ ácido esteárico (18:1/18:0) en hígado

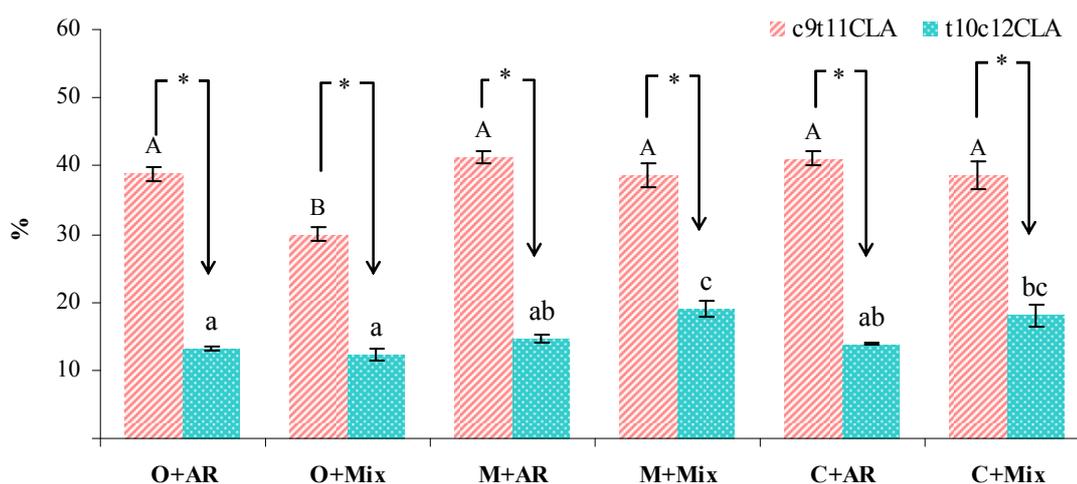


Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

9.4.- Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

Como puede observarse en la Tabla 9, los niveles de *c9,t11*-CLA en el TAE de los animales alimentados con grasas suplementadas con un aceite enriquecido en dicho isómero presentaron niveles equivalentes, independientemente del origen de grasa dietaria suministrada; mientras que con la suplementación con Mix, el contenido porcentual de *c9,t11*-CLA fue significativamente menor en los animales alimentados con dieta O+Mix que en aquellos alimentados con M+Mix ó C+Mix. El contenido de *t10,c12*-CLA, cuya ingesta en los grupos AR es baja, no mostró diferencias entre los distintos orígenes de grasa dietaria; mientras que en aquellos animales que recibieron Mix, los niveles de *t10,c12*-CLA fueron menores en el grupo O+Mix que en los grupos M+Mix o C+Mix. En la Figura 41 se observa que, independientemente del origen de grasa dietaria y de la fuente de CLA, la retención en el TAE de *c9,t11*-CLA es al menos el doble de la del isómero *t10,c12*-CLA. El análisis del origen de grasa dietaria y fuente de CLA muestra diferencias en la retención de ambos isómeros. No obstante, la modificación más notoria, estuvo asociada a la menor retención de los mismos en los animales del grupo O+Mix respecto a los de los grupos M+Mix y C+Mix.

Figura 41. Retención porcentual de isómeros CLA en tejido adiposo epididimal



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. (*) Significa $p < 0,05$ por t-test entre los isómeros *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA. Letras distintas en mayúsculas o minúsculas indican $p < 0,05$ por test no paramétrico de Tukey luego del análisis de variancia para los isómeros *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA, respectivamente.

Tabla 9. Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

	O	O+AR	O+Mix	M	M+AR	M+Mix	C	C+AR	C+Mix	ANOVA		
										G	I	GxI
14:0	1,10±0,02 ^{ab}	0,75±0,06 ^c	0,56±0,03 ^d	1,01±0,08 ^{ab}	0,65±0,02 ^{cd}	0,64±0,05 ^{cd}	1,21±0,20 ^b	0,67±0,02 ^{cd}	0,59±0,06 ^{cd}	NS	S	NS
c9-14:1	0,09±0,00 ^{ab}	0,02±0,01 ^{cd}	0,00±0,00 ^d	0,10±0,02 ^b	0,00±0,00 ^d	0,01±0,00 ^d	0,06±0,01 ^{ac}	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	S	S	NS
16:0	19,24±0,32 ^a	16,83±0,27 ^b	18,05±0,32 ^c	17,92±0,53 ^{ac}	15,78±0,45 ^d	18,19±0,49 ^{ac}	14,99±0,41 ^d	12,68±0,37 ^e	14,47±0,53 ^d	S	S	NS
c9-16:1	5,98±0,26 ^a	4,66±0,10 ^b	2,84±0,15 ^c	4,76±0,12 ^b	3,39±0,12 ^c	1,86±0,06 ^d	3,59±0,30 ^c	3,24±0,07 ^c	1,73±0,12 ^d	S	S	S
18:0	1,63±0,06 ^a	1,04±0,04 ^b	1,19±0,09 ^b	1,59±0,02 ^{ac}	1,43±0,09 ^c	1,77±0,12 ^a	1,87±0,12 ^a	1,12±0,04 ^b	1,44±0,09 ^c	S	S	S
c9-18:1	43,95±1,26 ^a	50,97±0,45 ^{bc}	54,87±0,51 ^{cd}	31,39±0,68 ^e	33,78±0,74 ^e	34,30±0,32 ^e	47,48±1,49 ^{ab}	52,81±0,76 ^{cd}	56,08±0,89 ^d	S	S	S
c11-18:1	3,50±0,19 ^a	3,87±0,08 ^a	3,91±0,11 ^a	1,62±0,06 ^b	1,83±0,11 ^b	1,69±0,10 ^b	2,60±0,07 ^c	2,77±0,10 ^c	2,96±0,09 ^c	S	NS	NS
c9,c12-18:2	19,36±1,14 ^a	14,48±0,56 ^b	12,56±0,71 ^b	37,18±0,38 ^c	35,39±0,34 ^d	34,79±0,54 ^d	21,19±0,86 ^a	17,36±0,42 ^e	14,09±0,69 ^b	S	S	S
20:0	0,11±0,00 ^{abc}	0,08±0,00 ^a	0,10±0,01 ^{abc}	0,11±0,01 ^{abc}	0,10±0,00 ^{abc}	0,10±0,01 ^{abc}	0,13±0,01 ^c	0,08±0,01 ^{ab}	0,13±0,01 ^{bc}	NS	S	NS
c6,c9,c12-18:3	0,09±0,01 ^a	0,01±0,01 ^b	0,02±0,01 ^b	0,14±0,01 ^c	0,07±0,00 ^d	0,04±0,01 ^d	0,07±0,01 ^{ad}	0,01±0,01 ^b	0,00±0,00 ^b	S	S	NS
c11-20:1	0,74±0,03 ^{abcd}	0,68±0,03 ^{abc}	0,77±0,04 ^{abd}	0,65±0,05 ^{ac}	0,61±0,01 ^c	0,61±0,04 ^c	0,89±0,02 ^d	0,81±0,03 ^{bd}	0,87±0,04 ^d	S	NS	NS
c9,c12,c15-18:3	0,92±0,12 ^a	0,38±0,04 ^b	0,26±0,02 ^b	0,98±0,14 ^a	0,43±0,02 ^b	0,47±0,04 ^b	3,57±0,17 ^c	2,11±0,04 ^d	2,01±0,11 ^d	S	S	S
c9,t11-18:2	0,00±0,00 ^a	3,36±0,09 ^b	1,67±0,06 ^c	0,00±0,00 ^a	3,57±0,07 ^b	2,15±0,10 ^d	0,00±0,00 ^a	3,55±0,08 ^b	2,15±0,12 ^d	S	S	S
t10,c12-18:2	0,00±0,00 ^a	0,33±0,01 ^b	0,69±0,05 ^c	0,00±0,00 ^a	0,37±0,02 ^b	1,06±0,07 ^d	0,00±0,00 ^a	0,35±0,01 ^b	1,00±0,10 ^d	S	S	S
c11,c14-20:2	0,09±0,00 ^{abc}	0,08±0,01 ^{ab}	0,07±0,01 ^{ab}	0,19±0,01 ^d	0,13±0,01 ^{ce}	0,17±0,01 ^{de}	0,13±0,02 ^{ce}	0,06±0,01 ^a	0,11±0,01 ^{bc}	S	S	S
c8,c11,c14-20:3	0,10±0,01 ^a	0,02±0,01 ^b	0,00±0,00 ^b	0,21±0,02 ^c	0,04±0,01 ^{ab}	0,04±0,01 ^{ab}	0,06±0,02 ^{ab}	0,01±0,01 ^b	0,01±0,01 ^b	S	S	S
AA	0,17±0,01 ^a	0,07±0,02 ^{bc}	0,10±0,01 ^b	0,38±0,07 ^d	0,09±0,01 ^b	0,15±0,01 ^{ab}	0,11±0,01 ^b	0,04±0,00 ^c	0,10±0,02 ^b	S	S	S
Otros AGS	0,68±0,03	0,38±0,02	0,33±0,02	0,58±0,04	0,42±0,02	0,40±0,02	0,76±0,15	0,34±0,02	0,40±0,04			
Otros AGI	0,02±0,01	0,21±0,01	0,13±0,01	0,01±0,01	0,23±0,01	0,15±0,02	0,03±0,03	0,21±0,01	0,12±0,02			
NI	1,48±0,04	1,81±0,12	1,86±0,11	1,17±0,04	1,55±0,08	1,42±0,12	1,31±0,04	1,76±0,09	1,76±0,15			
Σ AGS	22,40±0,19 ^a	19,06±0,27 ^{bcd}	20,24±0,41 ^{abc}	21,21±0,60 ^{ab}	18,38±0,55 ^{cd}	21,09±0,64 ^{ab}	18,95±0,75 ^{bcd}	14,89±0,41 ^e	17,01±0,63 ^{de}	S	S	NS
Σ AGMI	55,23±0,92 ^a	60,22±0,47 ^b	62,44±0,60 ^b	38,53±0,74 ^c	39,65±0,94 ^c	38,52±0,38 ^c	54,62±1,45 ^a	59,69±0,76 ^b	61,67±0,88 ^b	S	S	S
Σ AGPI	20,57±1,15 ^a	15,21±0,57 ^{bc}	13,10±0,74 ^b	39,08±0,53 ^d	36,24±0,31 ^{de}	35,76±0,56 ^e	25,12±0,81 ^f	19,75±0,41 ^a	16,41±0,68 ^c	S	S	S
Σ CLA	0,00±0,00 ^a	3,69±0,09 ^{bc}	2,35±0,10 ^d	0,00±0,00 ^a	3,95±0,08 ^b	3,21±0,17 ^{cc}	0,00±0,00 ^a	3,91±0,09 ^b	3,15±0,21 ^e	S	S	S

AA: c5,c8,c11,c14-20:4. “Otros AGS” y “Otros AGI” corresponden a la Σ de AGS y AGI, respectivamente cuyos niveles individuales son inferiores a 0,05%. NI: corresponde a la Σ de AG no identificados. Valores expresados como media ± SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA (indicado en las 3 últimas columnas), seguido del test de Tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Nivel de significancia: p < 0,05.

El contenido de AGMI totales y el del principal contribuyente en dicho grupo, el ácido oleico, fue dependiente del origen de grasa dietaria, siendo equivalente y significativamente mayor en los grupos O y C, respecto al grupo M. La suplementación con cualquiera de las dos fuentes de CLA, aumentó el contenido de ácido oleico en el TAE, alcanzando niveles significativos en los animales alimentados con aceite de oliva y de canola. Los contenidos de AL y ALN mostraron una dependencia con el origen de grasa dietaria, y ambas fuentes de CLA, disminuyeron los niveles de dichos AG. Los cambios de los AGPI totales fueron paralelos a aquellos observados en el AL, que es cuantitativamente el más importante.

Los AGPI-CL de la serie n-6 presentan niveles significativamente diferentes en función del origen de grasa dietaria y de la presencia, pero no de la fuente, de CLA. Específicamente, tanto los niveles de GLA, como los de DGLA, fueron significativamente mayores en los animales que recibieron aceite de maíz que en los que recibieron aceite de oliva o de canola, y fueron igualmente reducidos por la adición de AR o de Mix. Un comportamiento diferente fue observado en el derivado de la elongación del AL: *c*11,*c*14-20:2; el cual fue mayor en los grupos de animales alimentados con aceite de maíz o canola (vs. aceite de oliva); y en estos grupos la suplementación con AR redujo significativamente los niveles de dicho derivado. El AA también demostró dependencia del origen de la grasa dietaria y de la presencia de los CLA, mostrando, a excepción del grupo C+Mix, perfiles similares de reducción por los CLA que los observados en los dos AG precursores inmediatos en la vía principal de biosíntesis de AA (GLA y DGLA). En todos los grupos dietarios analizados, no se lograron obtener niveles cuantitativamente detectables de los intermediarios y producto final de los AGPI-CL de la serie n-3.

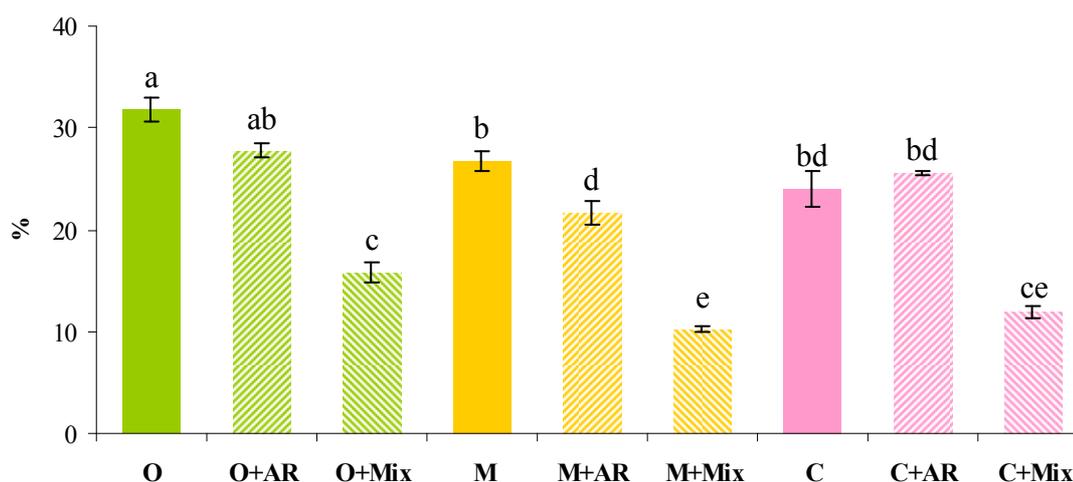
Los niveles de ácido mirístico (14:0) en TAE, no fueron afectados por los distintos orígenes de grasa dietaria. La suplementación con AR y Mix redujo el contenido de dicho AG independientemente del origen de grasa dietaria. El contenido de ácido miristoleico (*c*9-14:1) se vio afectado por los orígenes de grasa dietaria (M = O > C), alcanzando sólo diferencias significativas entre los grupos M y C. Pero más notoriamente, la suplementación con ambas fuentes de CLA, redujo el contenido de ácido miristoleico a niveles muy bajos. El contenido de ácido palmítico fue influenciado por el origen de grasa dietaria y por la fuente de CLA. Los principales efectos estuvieron asociados a la reducción de los niveles del mismo en los grupos suplementados con AR y en el grupo O+Mix. El contenido de ácido esteárico no fue afectado por el origen de grasa dietaria,

pero disminuyó con la suplementación de ambas fuentes de CLA a los aceites de oliva y canola.

Los niveles de ácido palmitoleico fueron afectados tanto por los orígenes de grasa dietaria, como por la suplementación con CLA. Así, el contenido de ácido palmitoleico en el TAE fue $O > M > C$, y a excepción de C+AR, la suplementación con AR, y en mayor medida con Mix, redujo los niveles de dicho AG. El contenido de ácido *cis*-vaccénico, fue dependiente del origen de grasa dietaria, siendo $O > C > M$, sin observarse efecto por la suplementación con AR o Mix.

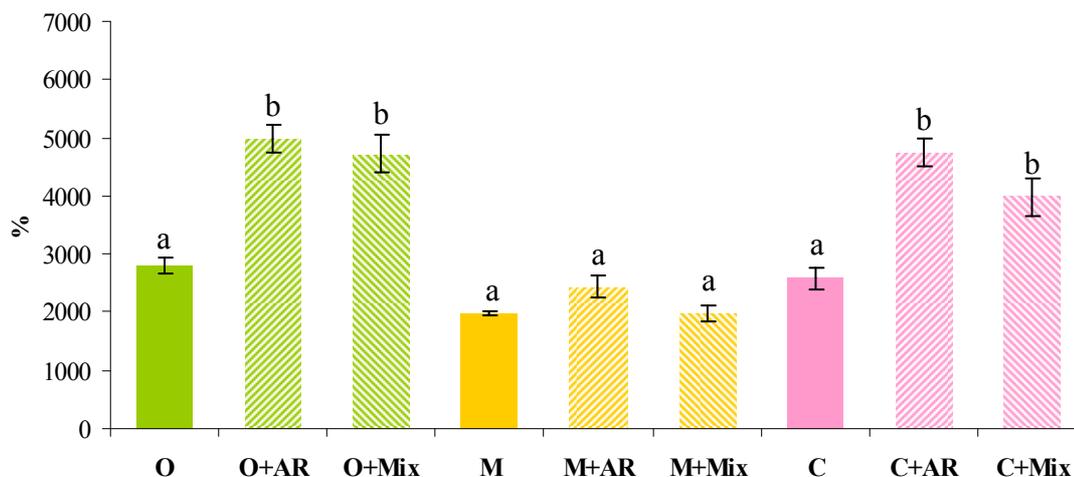
La relación ácido palmitoleico/ácido palmítico (16:1/16:0) fue ligeramente mayor en los animales alimentados con aceite de oliva que en aquellos con aceites de maíz o canola, y la suplementación con Mix redujo dicha relación independientemente del origen de grasa dietaria (Figura 42). El AR produjo una ligera reducción de la relación 16:1/16:0, logrando diferencias estadísticas sólo en los animales M+AR vs M. Por otra parte, la relación ácido oleico/ácido esteárico (18:1/18:0), no mostró ningún efecto por el origen de grasa dietaria y, sorprendentemente, un incremento ha sido observado en dicha relación por la suplementación con AR y Mix al aceite de oliva y canola (Figura 43).

Figura 42. Relación porcentual producto/ substrato: ácido palmitoleico/ ácido palmítico (16:1/16:0) en tejido adiposo epididimal



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 43. Relación porcentual producto/substrato: ácido oleico/ ácido esteárico (18:1/18:0) en tejido adiposo epididimal



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

10.- HISTOLOGÍA HEPÁTICA

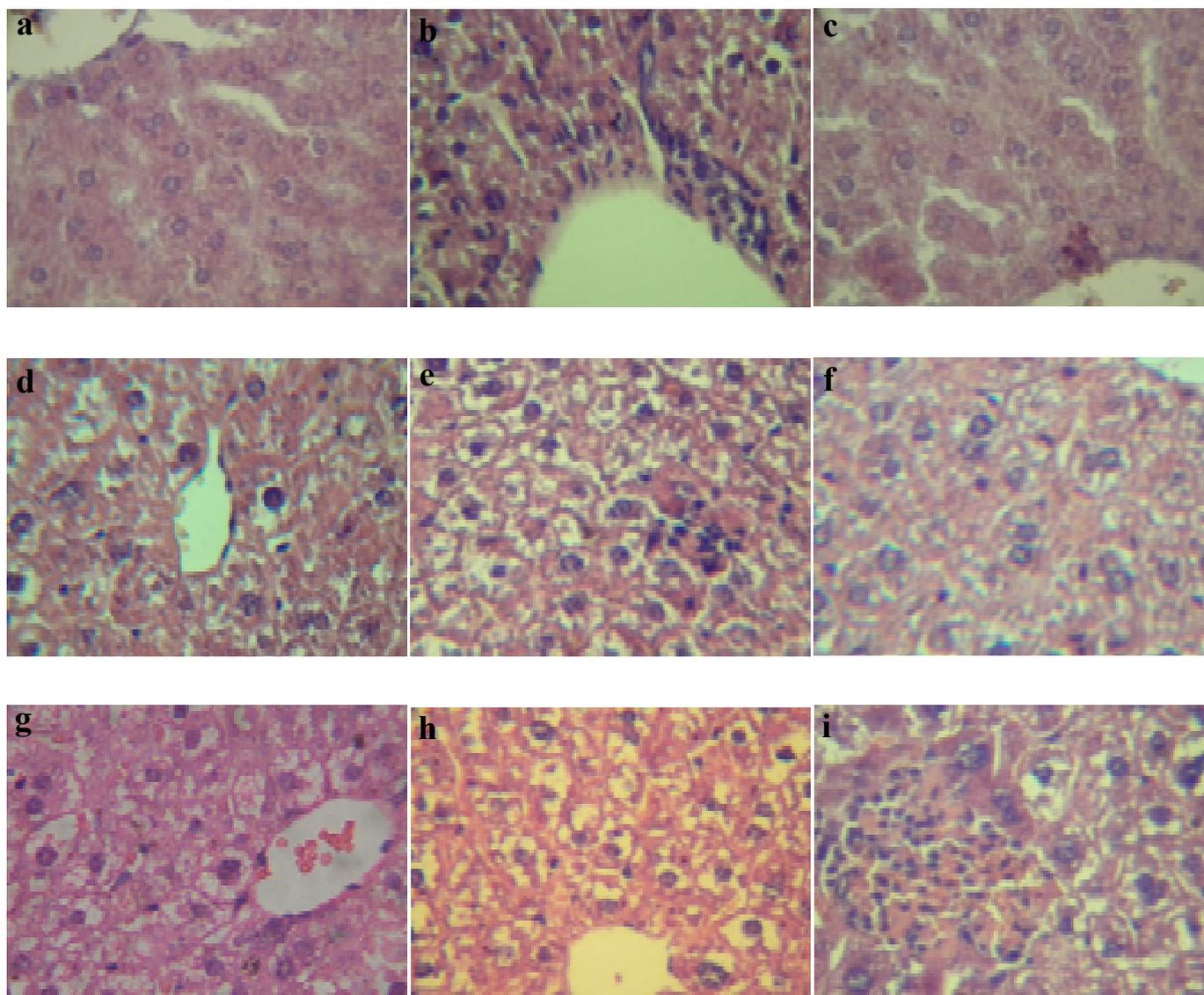
El análisis histológico de cortes representativos de hígados correspondientes a los 9 grupos dietarios se muestra en la Figura 45. Todos los cortes de tejido hepático analizados a la luz del microscopio óptico, correspondientes a los grupos O (Figura 44.a) y C (Figura 44.c), exhibieron una morfología compatible con un patrón tisular normal, con área portal y lobular conservada, citoplasma hepatocítico con la acidofilia característica de los mismos, núcleos conservados con membrana nuclear con límites definidos y patrón de distribución cromatínico en oxi- y basi-cromatina. No se observó infiltrado inflamatorio, células apoptóticas, ni inclusiones lipídicas. Los cortes de hígados de los animales del grupo M (Figura 44.b), presentaron dilatación de la vena central, hepatocitos con ligera tumefacción citoplasmática y patrón nuclear conservado. Además, se observaron focos de inflamación con células apoptóticas en el parénquima e infiltrado leucocitario en el espacio portal.

Tanto la suplementación con AR, como con Mix provocaron alteraciones histológicas dependientes de la grasa dietaria, mostrándose más exacerbadas en los hígados de animales alimentados con la mezcla equimolecular de CLA.

Así, la suplementación con AR a los distintos aceites generó tumefacción citoplasmática, procesos inflamatorios aislados, y escasa o nula presencia de microvacuolas lipídicas. Pese a la presencia de dichas alteraciones, en general los hígados de animales alimentados con dieta C+AR (Figura 44.f) presentaron mejores condiciones morfológicas que los de aquellos alimentados con O+AR (Figura 44.d) y M+AR (Figura 44.e), mientras que los animales del grupo M+AR fueron los que evidenciaron mayor tumefacción citoplasmática y proceso inflamatorio hepático.

La suplementación con Mix generó profundas alteraciones en la morfología hepática, necrosis celular, focos inflamatorios e inclusión de microvacuolas lipídicas, siendo el grado de dichas alteraciones dependiente de la fuente de grasa dietaria utilizada. Específicamente, los hígados de los animales de los grupos O+Mix (Figura 44.g) y C+Mix (Figura 44.i) presentaron infiltrado leucocitario y microvacuolas de grasa, que en el grupo C+Mix se localizaron alrededor de la vena central, y a pesar de que en ambos casos se observaron células en mitosis, degeneración balonzante del hepatocito y tumefacción citoplasmática, estas alteraciones no fueron tan exacerbadas como en el grupo M+Mix. Así, en este grupo (Figura 44.h), se presentó dilatación de la vena central, numerosas células en mitosis con patrón nuclear conservado, degeneración balonzante del hepatocito y marcada tumefacción citoplasmática. Amerita destacar la presencia aislada de microvacuolas lipídicas dispersas en el parénquima hepático. Además, se observó necrosis y apoptosis focal, con presencia de células apoptóticas y núcleos picnóticos, inflamación lobulillar y acúmulo de neutrófilos, patrón correspondiente a hepatitis.

Figura 44. Cortes histológicos hepáticos



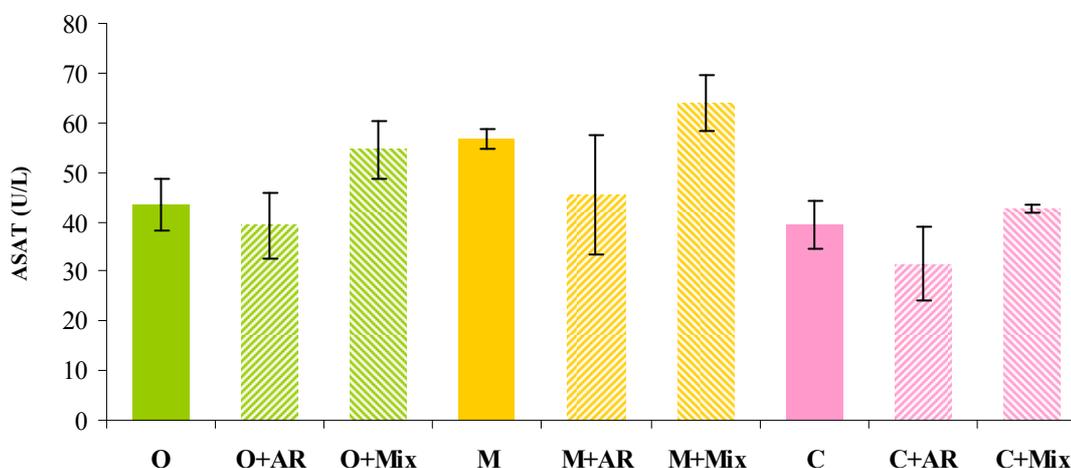
Cortes histológicos representativos de hígados pertenecientes a los distintos grupos dietarios coloreados con hematoxilina-eosina. Aumento 40X.

a. O; **b.** M; **c.** C; **d.** O+AR; **e.** M+AR; **f.** C+AR; **g.** O+Mix; **h.** M+Mix; **i.** C+Mix.

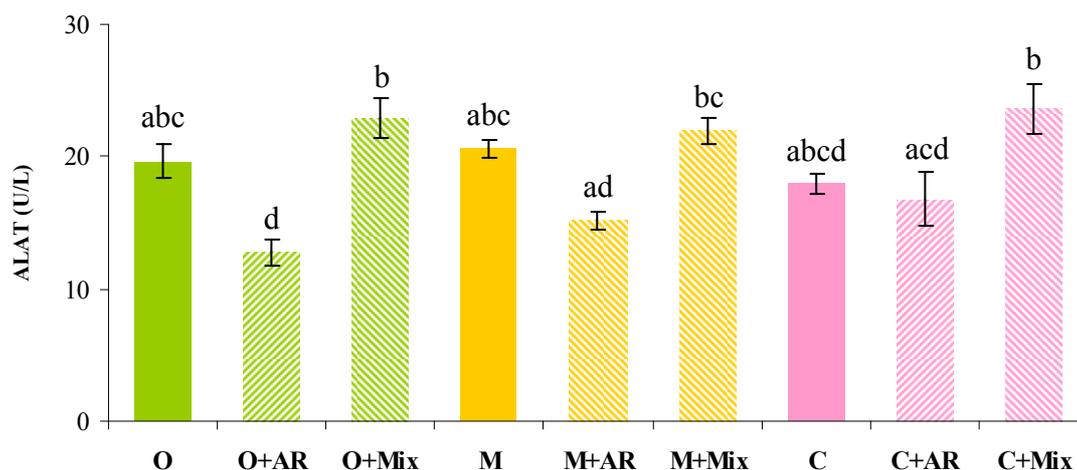
11.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL NIVEL SÉRICO DE ENZIMAS MARCADORAS DE DAÑO HEPÁTICO: ASAT, ALAT, FA

Las actividades de las enzimas plasmáticas indicadoras de daño hepático (ASAT, ALAT y FA) mostraron cambios diferentes en el análisis estadístico 3x3 ANOVA. Así la FA fue afectada por el origen de grasa dietaria ($p = 0,003$), la enzima ALAT por la suplementación con CLA ($p < 0,001$), y la actividad de la enzima ASAT por ambas variables (grasa dietaria: $p = 0,012$; presencia de CLA: $p = 0,033$). No obstante, la evaluación individual no reveló ningún incremento significativo indicador de daño hepático, ni por el origen de grasa dietaria, ni por la suplementación con CLA (Figuras 45, 46 y 47).

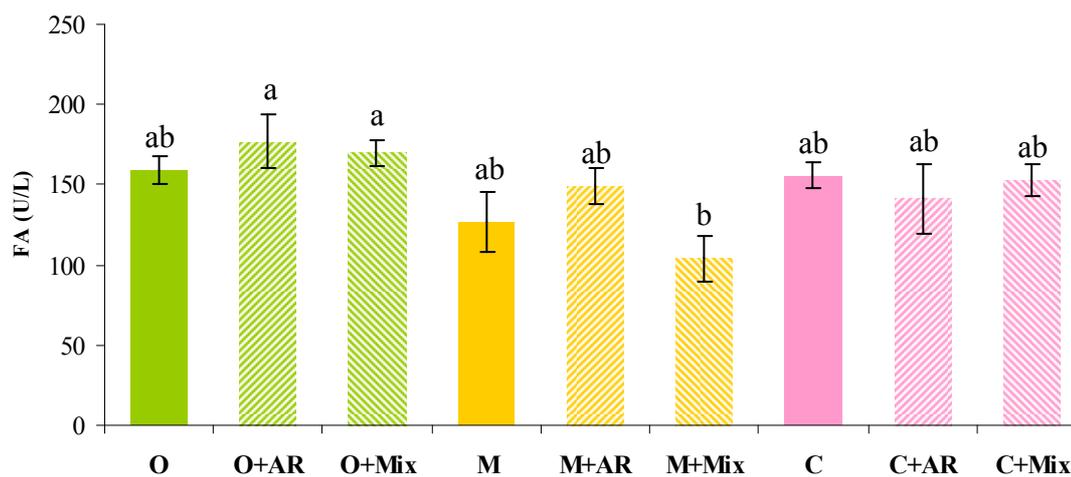
Figura 45. Actividad de la enzima ASAT en suero



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 46. Actividad de la enzima ALAT en suero

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

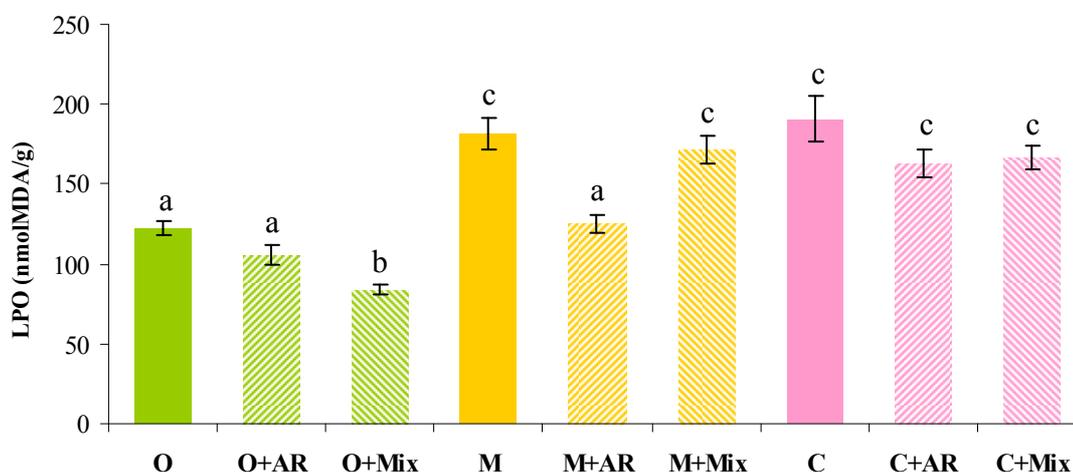
Figura 47. Actividad de la enzima FA en suero

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

12.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL ESTRES OXIDATIVO HEPÁTICO

El grado de LPO hepático (Figura 48), expresado como la cantidad de MDA formado, fue afectado tanto por el origen de grasa dietaria ($p < 0,001$), como por la presencia de CLA ($p < 0,001$). Específicamente, la LPO fue menor en los animales alimentados con aceite de oliva que en los animales que consumieron dietas enriquecidas con grasas más insaturadas. La suplementación con CLA tuvo un efecto diferencial en los distintos grupos, donde la suplementación con AR sólo redujo la LPO en los animales alimentados con aceite de maíz, mientras que la adición de Mix tuvo un efecto semejante en aquellos animales alimentados con aceite de oliva. No obstante, es dable destacar que independientemente del tipo de CLA suplementado, no se ha observado ningún incremento en este parámetro y, si hubo algún efecto, el mismo fue preventivo de la LPO.

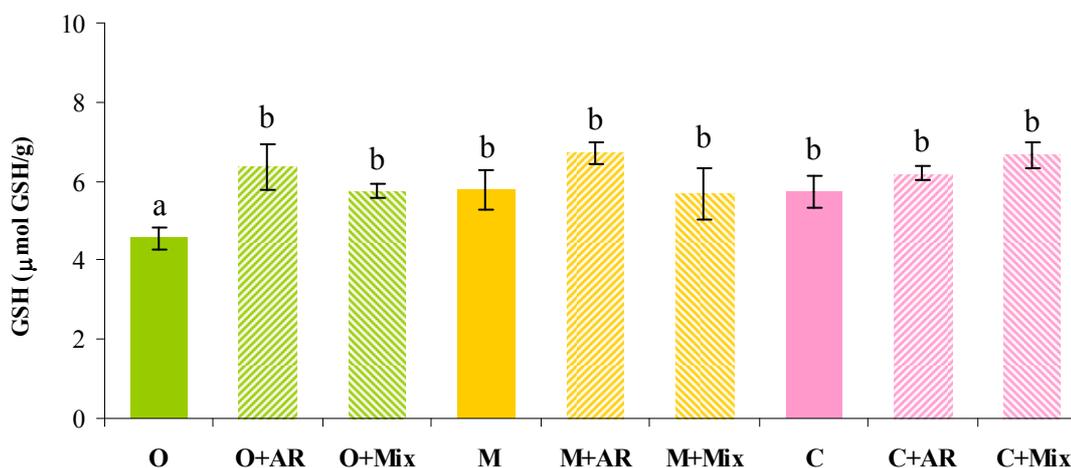
Figura 48. Grado de lipoperoxidación en hígado



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

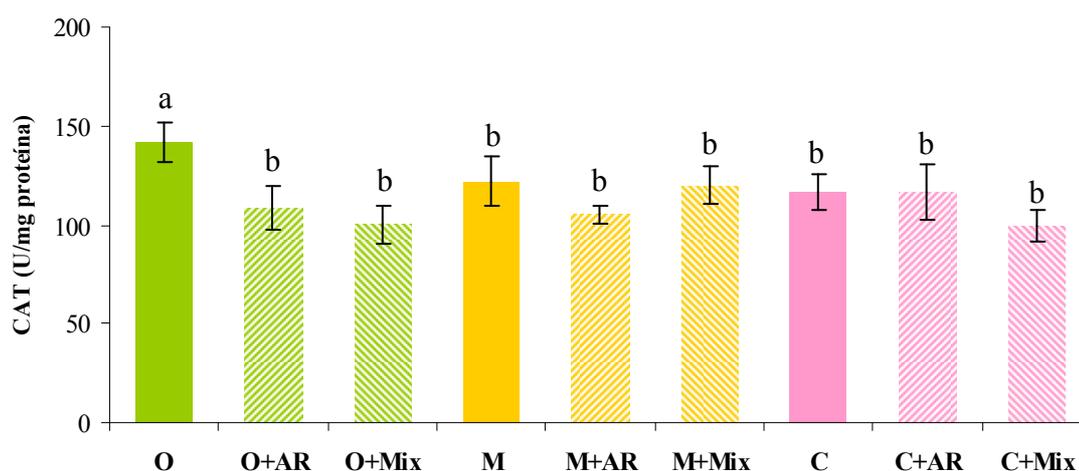
En las Figuras 49, 50 y 51, podemos observar los niveles de algunos de los diferentes reguladores del estrés oxidativo. Dentro de los componentes protectores no enzimáticos del estrés oxidativo, los niveles de GSH sólo fueron significativamente afectados por la presencia de isómeros CLA ($p = 0,007$) en el análisis estadístico 3x3 ANOVA (Figura 49). Sin embargo, las comparaciones no paramétricas mostraron que, en ausencia de CLA, los niveles de GSH fueron menores en los animales que recibieron aceite de oliva que en los que recibieron aceite de canola. La presencia de ambas fuentes de CLA aumentó el contenido de GSH en los animales que recibieron aceite de oliva.

Figura 49. Nivel de GSH en hígado



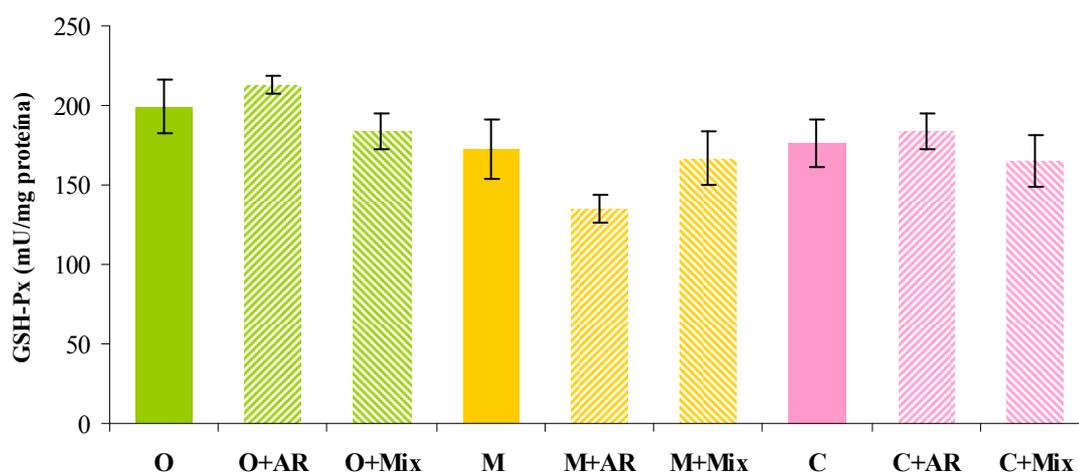
Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Dentro de los sistemas protectores enzimáticos, la actividad de la enzima CAT (Figura 50), no mostró efecto por el origen de grasa dietaria ($p = 0,329$), pero sí por la presencia de isómero CLA ($p = 0,001$) y por la interacción entre estas variables ($p = 0,002$). El análisis individual demostró que la actividad CAT fue mayor en los animales alimentados con aceite de oliva frente a aquellos alimentados con aceite de maíz o canola. La suplementación con CLA, redujo la actividad de dicha enzima en los grupos O+AR y O+Mix.

Figura 50. Actividad de la enzima catalasa en hígado

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Otro componente de los sistemas protectores enzimáticos es la enzima GSH-Px. El análisis estadístico 3x3 ANOVA demostró que la grasa dietaria varió la actividad de dicha enzima ($p = 0,008$). Pese a esto, no se observaron diferencias significativas en la comparación individual de los grupos experimentales (Figura 51).

Figura 51. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa en hígado

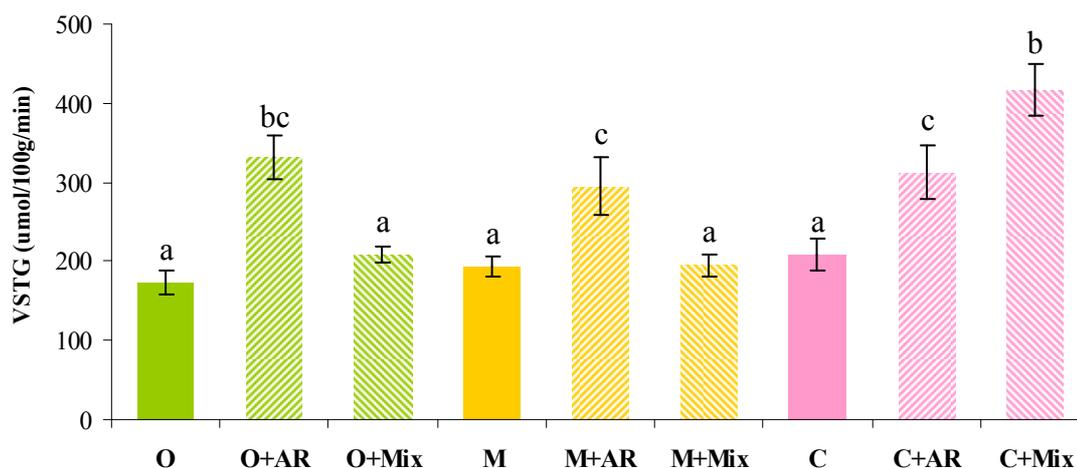
Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

13.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE PARAMETROS RELACIONADOS AL METABOLISMO LIPIDICO

Los niveles tisulares y circulantes de TG dependen del balance de un conjunto de mecanismos interrelacionados en diferentes tejidos. Entre ellos se destacan, como determinantes de los niveles plasmáticos de TG, la velocidad secreción de TG-VLDL y la capacidad de remoción plasmática de los mismos en el tejido adiposo y músculo esquelético. Es importante considerar que también participan en la remoción de los lípidos otros tejidos, como el músculo liso, y diferentes órganos, entre ellos el hígado. Cada uno de estos dos diferentes mecanismos mencionados se encuentran, a su vez, estrechamente relacionados con los niveles de lípidos tisulares. Por esta razón, se presentan en forma secuencial algunos mecanismos bioquímicos determinantes de los lípidos plasmáticos y tisulares.

13.1.- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos

La VSTG es clave en la determinación de los niveles plasmáticos, como también hepáticos de TG. La VSTG presentó un efecto significativo por el origen de grasa dietaria y por la fuente de isómero CLA suplementada a las dietas ($p < 0,001$, en ambos casos). La significancia de la grasa dietaria, es debida al agrupamiento de los 3 tratamientos con aceite de canola que presentaron diferencias con las respectivas compilaciones de los tres grupos que recibieron aceite de oliva o aceite de maíz. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 52, las comparaciones individuales mostraron que, en ausencia de CLA, el origen de grasa dietaria no afectó la VSTG; pero la presencia de isómeros CLA ejerció un efecto diferencial dependiendo del tipo de CLA considerado. La suplementación con AR aumentó la VSTG independientemente del origen de grasa dietaria, mientras que el Mix solo produjo un incremento, y muy marcado, de dicho parámetro en los animales alimentados con aceite de canola.

Figura 52. Velocidad de secreción hepática de triglicéridos

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

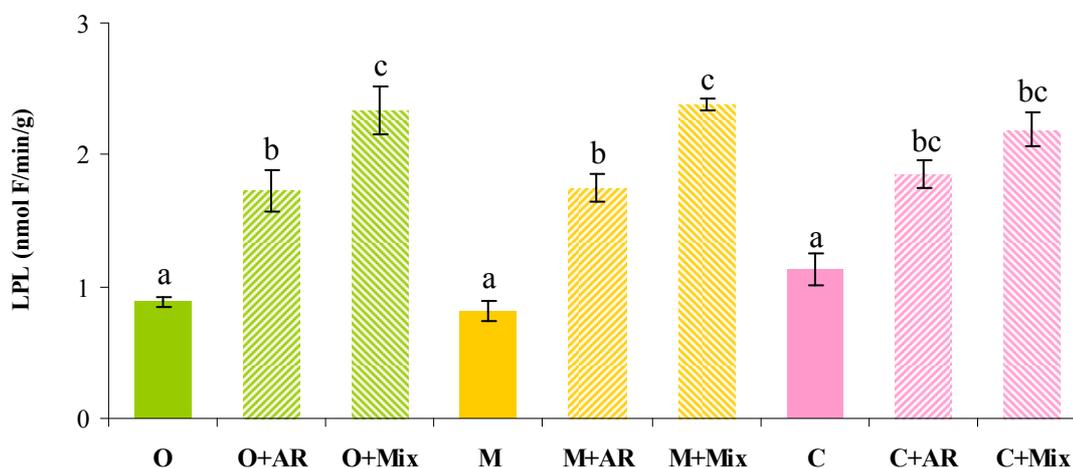
13.2.- Remoción de triglicéridos séricos. Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio

El tejido adiposo es un órgano clave y muy activo en la remoción de TG, fundamentalmente en condiciones post-prandiales. El músculo esquelético, por contribuir con un porcentaje muy elevado de la masa corporal (aprox. 45%) y en virtud de la importancia de la remoción en condiciones de ayuno, participa activamente en la clarificación de los TG circulantes. Es importante considerar a su vez, que el tejido adiposo, es un órgano que se expande en forma muy diversa dependiendo de variables nutricionales, por lo cual, su expresión a la contribución en la remoción de TG debe ser realizada por órgano total.

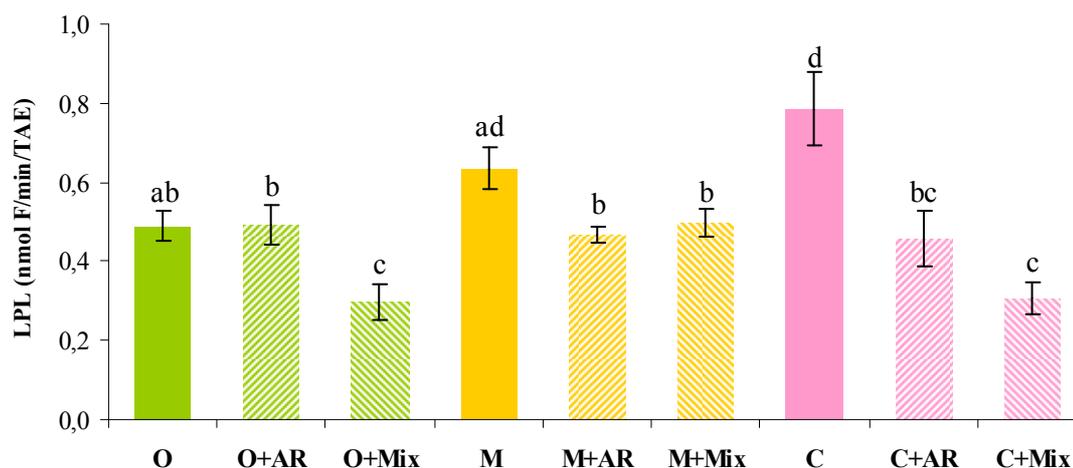
Los resultados de la actividad LPL en tejido adiposo blanco, representado en nuestro caso por el TAE, mostraron por gramo de tejido (Figura 53) que no hubo variaciones significativas por el origen de grasa dietaria ($p = 0,65$), y que la presencia de isómeros CLA incrementaron dicha actividad enzimática ($p < 0,001$). Además, las actividades LPL en TAE fueron, a su vez, más elevadas en los animales suplementados con Mix, alcanzando diferencias estadísticas entre los grupos de animales O+Mix vs. O+AR y M+Mix vs. M+AR. No obstante, es muy diferente la interpretación de los resultados si analizamos la actividad LPL como medida de la remoción en el animal completo. Así, la

actividad LPL afectada por el peso del TAE, nos mostró (Figura 54) que fue modificada tanto, por el origen de grasa dietaria ($p = 0,032$), como por la presencia de isómeros CLA ($p = 0,003$). Específicamente, en ausencia de isómeros, la única diferencia fue notada en la mayor actividad LPL en los animales alimentados con aceite de canola frente a los que recibieron aceite de oliva. Respecto a los CLA, el Mix disminuyó la actividad LPL en TAE, independientemente de la grasa dietaria, mientras que el AR disminuyó este parámetro en aquellos animales que consumieron aceite de maíz ó canola.

Figura 53. Actividad lipoproteína lipasa por gramo de tejido adiposo epididimal

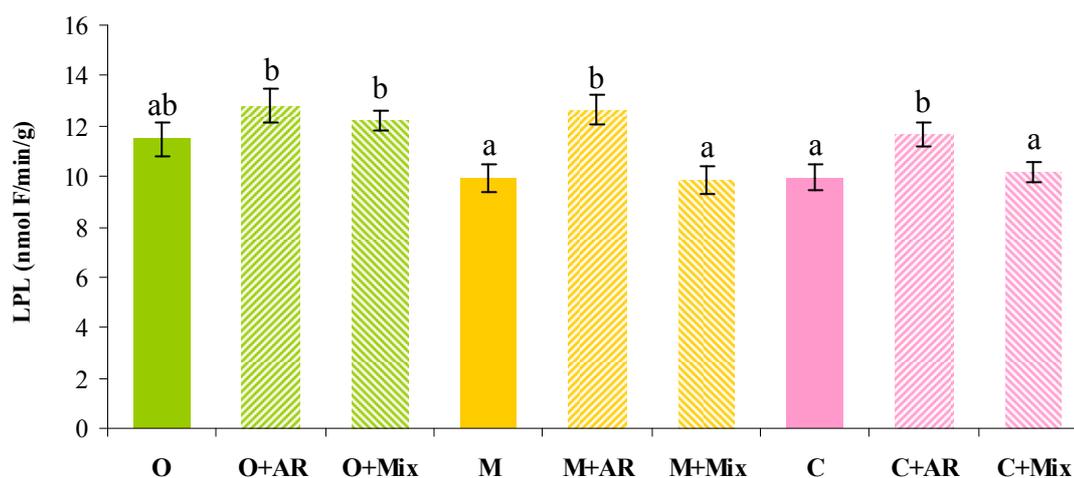


Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 54. Actividad lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal total

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

El análisis estadístico de la actividad LPL en músculo gastrocnemio (Figura 55), elegido como representante de la composición fibrilar media del músculo esquelético, mostró un efecto por el origen de grasa dietaria ($p = 0,002$) y por la presencia de isómeros CLA ($p < 0,001$). El análisis no paramétrico individual nos reveló sólo una diferencia significativa por la suplementación con AR en los grupos de animales que consumieron aceite de maíz y de canola, frente a aquellos que consumieron los respectivos aceites sin CLA, o suplementados con Mix.

Figura 55. Actividad lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

13.3.- Síntesis de ácidos grasos en hígado y tejido adiposo

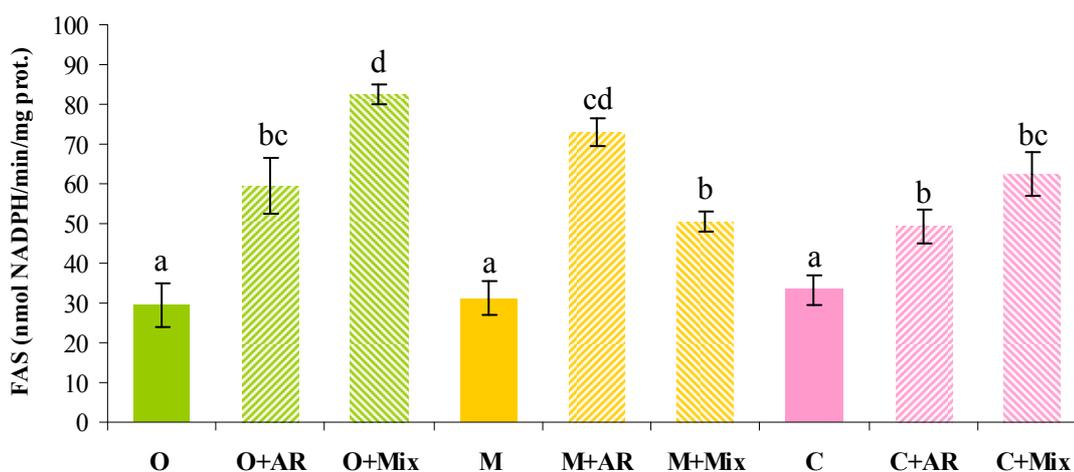
En la síntesis de novo de AG en hígado y tejido adiposo están implicadas diversas enzimas entre ellas las enzimas FAS, EM y G6PDH. Las mismas son determinantes de los niveles y disponibilidad de AG para su posterior esterificación, depósito, utilización o secreción dependiendo del tejido y requerimiento. Dichas enzimas son moduladas entre otras, por diferentes dietas y, en particular en nuestras experiencias, los isómeros CLA han afectado sus actividades en mayor grado que el origen de grasa dietaria.

13.3.1.- Actividad hepática de la enzima sintasa de ácidos grasos

La actividad hepática de la enzima FAS no mostró diferencias por el origen de grasa dietaria utilizada ($p = 0,072$), sin embargo, la suplementación con CLA ejerció un efecto significativo sobre la misma ($p < 0,001$). El análisis no paramétrico del efecto de los CLA sobre la actividad FAS nos muestra que la suplementación con AR y con Mix incrementaron la actividad de dicha enzima (Figura 56). Sin embargo, la respuesta fue diferente dependiendo de la grasa dietaria considerada. Así, en los animales alimentados

con aceite de oliva la actividad fue $O+Mix > O+AR > O$, en los alimentados con aceite de maíz: $M+AR > M+Mix > M$, y en los alimentados con aceite de canola: $C+Mix = C+AR > C$.

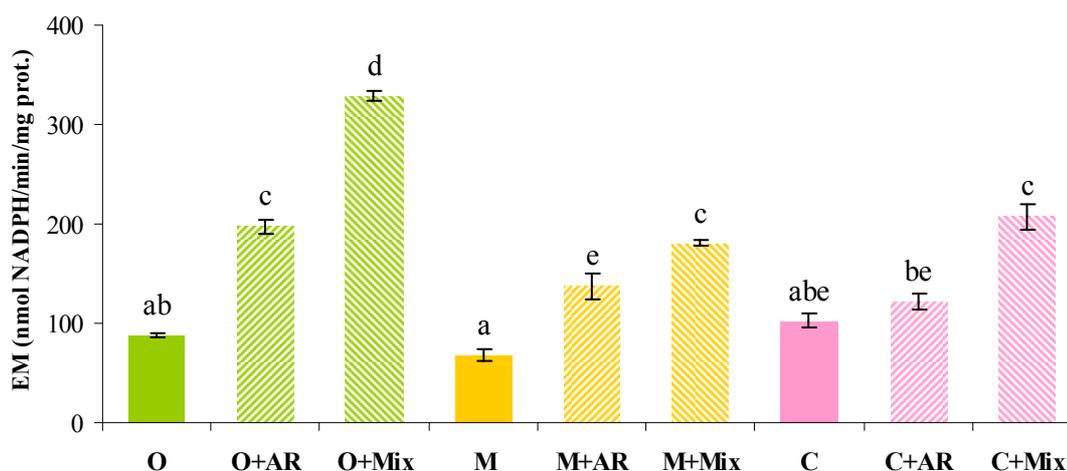
Figura 56. Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos en hígado



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

13.3.2.- Actividad hepática de la enzima málica

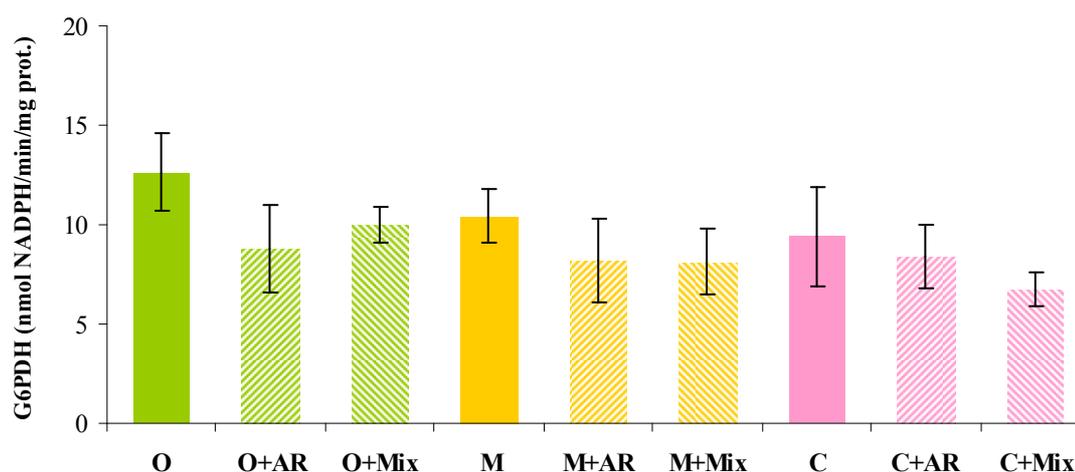
La actividad de la EM mostró un importante efecto por la suplementación con CLA ($p < 0,001$), y la respuesta fue muy diferente en función del origen de grasa dietaria (Figura 57). Si bien la respuesta a los CLA fue para todos los orígenes de grasa dietaria $Mix > AR >$ respectivo control; la magnitud del efecto fue muy marcado en los animales alimentados con aceite de oliva, mientras que, en los alimentados con aceite de canola, no se alcanzaron diferencias estadísticas entre C+AR versus C.

Figura 57. Actividad de la enzima málica en hígado

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

13.3.3.- Actividad hepática de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa

A diferencia de lo observado para las enzimas FAS y EM, no hubo diferencias estadísticas en la actividad de la enzima G6PDH hepática, ni por el origen de grasa dietaria, ni por la suplementación con CLA ($p > 0,05$ en ambos casos) (Figura 58).

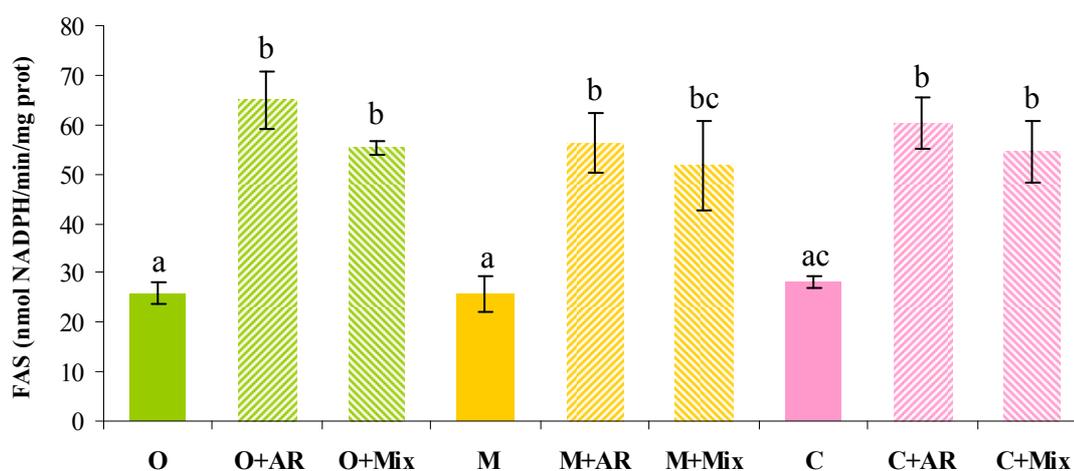
Figura 58. Actividad de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa en hígado

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

13.3.4.- Actividad en tejido adiposo epididimal de la enzimas: sintasa de ácidos grasos, enzima málica y glucosa-6-P-deshidrogenasa

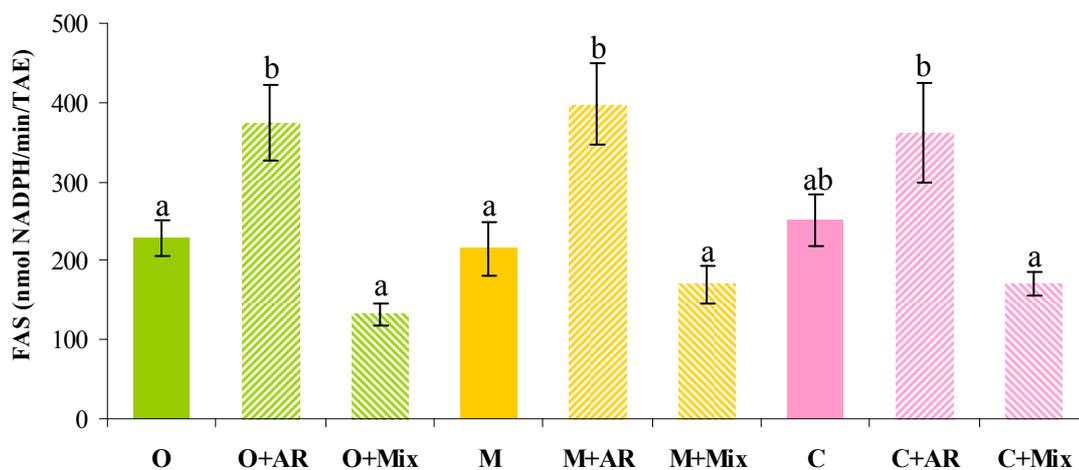
El comportamiento de estas tres enzimas lipogénicas en TAE ha sido semejante frente a las variables analizadas, por lo cual se las presenta en forma conjunta. Las actividades de las enzimas FAS, EM y G6PDH no mostraron diferencias por el origen de grasa dietaria, no obstante presentaron un aumento significativo por la suplementación con CLA ($p < 0,001$). Así, la actividad enzimática expresada por masa de proteína (Figuras 59, 61 y 63, respectivamente), mostró un incremento equivalente con ambos tipos de suplementos de CLA, que fue independiente del origen de grasa dietaria. Sin embargo, es importante considerar que el tejido adiposo presenta un fuerte efecto diferencial en su tamaño, fundamentalmente por el Mix, lo que repercute en la capacidad total de dicho tejido para la biosíntesis de AG; por lo que, las actividades enzimáticas expresadas por tejido total, mostraron un comportamiento muy diferente entre los tipos de CLA suplementados. En las Figuras 60, 62 y 64, respectivamente, se pueden visualizar que la suplementación con AR en las tres enzimas mostró una mayor actividad enzimática que los respectivos controles, y que en aquellos suplementados con Mix, independientemente de la grasa dietaria.

Figura 59. Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal



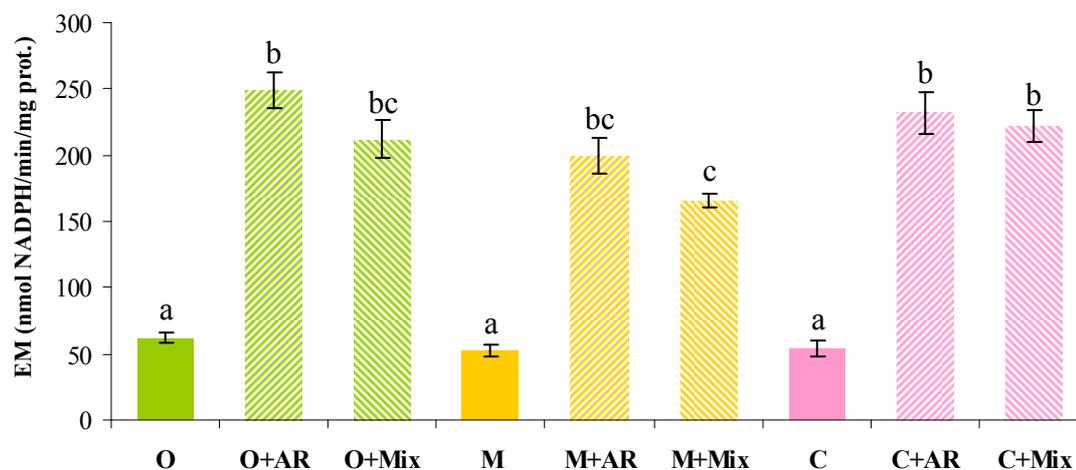
Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 60. Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal total

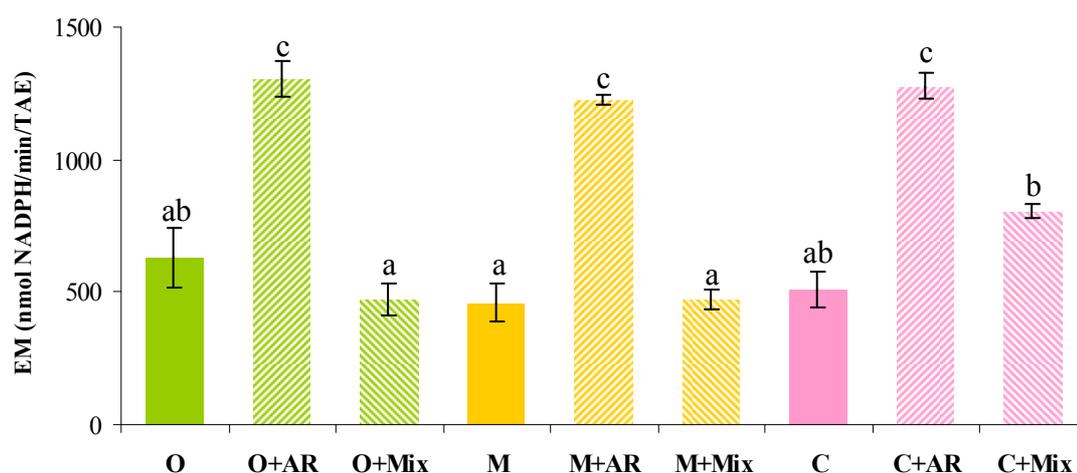


Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

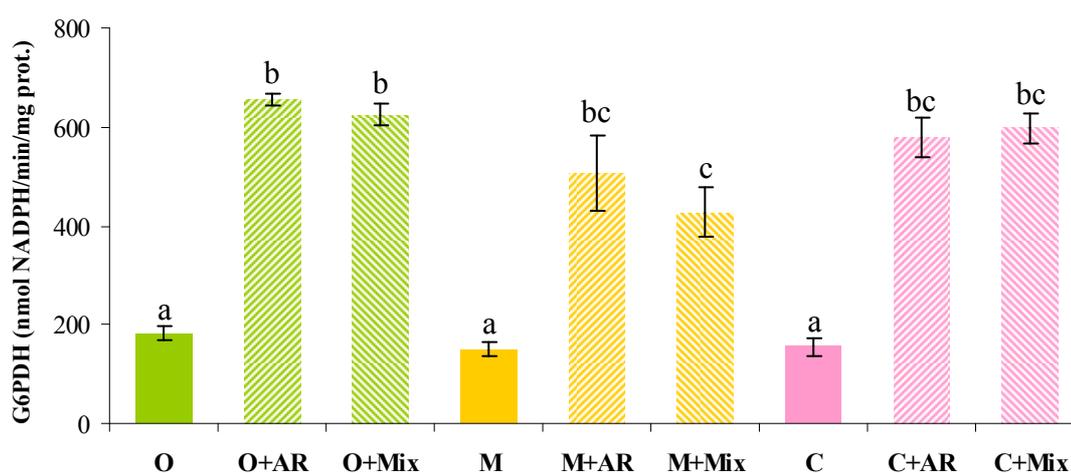
Figura 61. Actividad de la enzima málica en tejido adiposo epididimal



Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

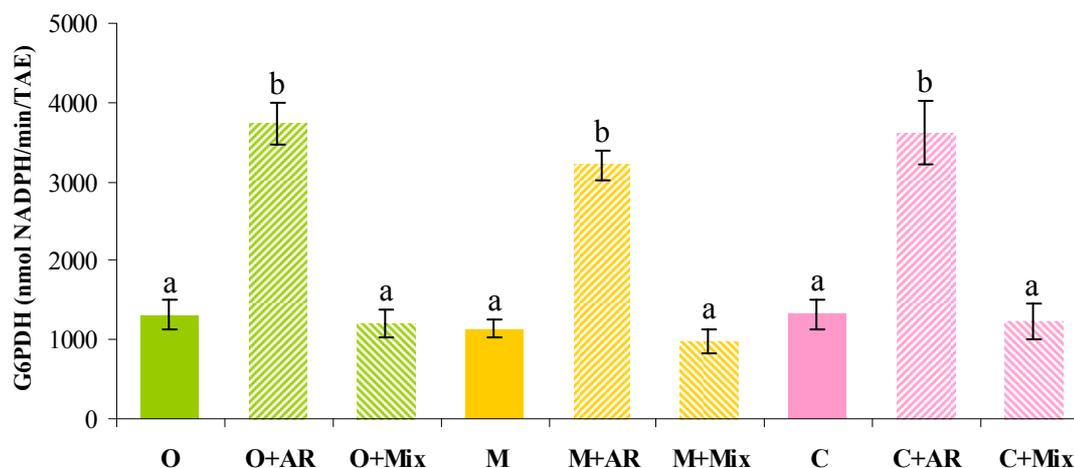
Figura 62. Actividad de la enzima málica en tejido adiposo epididimal total

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 63. Actividad de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa en tejido adiposo epididimal

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

Figura 64. Actividad de la enzima glucosa-6-P-deshidrogenasa en tejido adiposo epididimal total

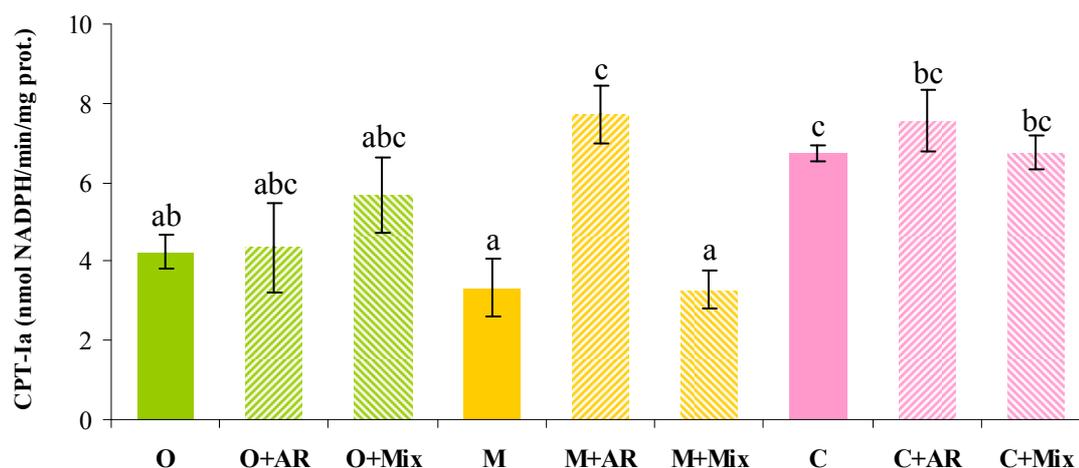


Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

13.4.- Capacidad de oxidación de ácidos grasos en hígado y músculo esquelético

13.4.1.- Oxidación hepática de ácidos grasos

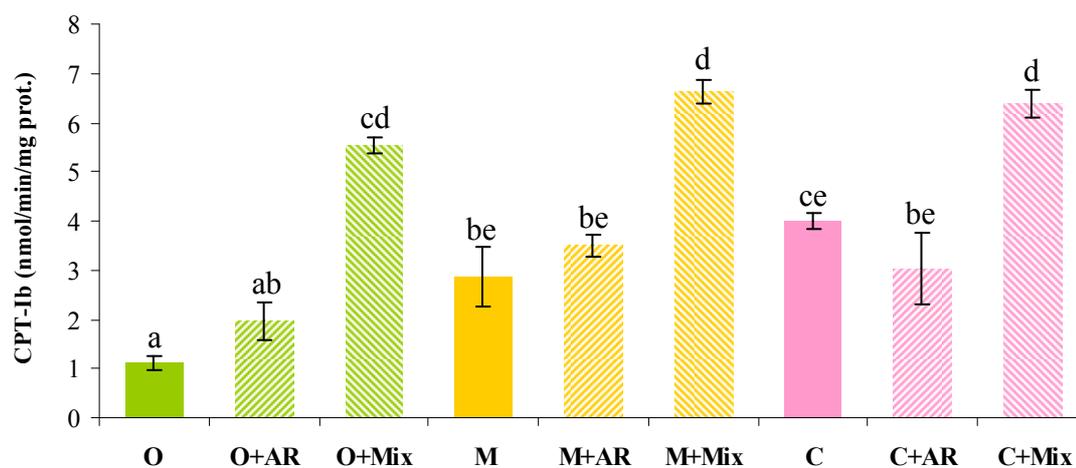
La enzima clave en la β -oxidación hepática de AG es la CPT-Ia, la cual ha sido influenciada tanto por el origen de grasa dietaria ($p < 0,001$), como por los isómeros CLA ($p = 0,014$) (Figura 65). El aceite de canola incrementó, comparativamente con los aceite de oliva y de maíz, la actividad de dicha enzima; mientras que la suplementación con CLA, sólo mostró un incremento de la actividad CPT-Ia en el grupo M+AR vs. M y M+AR vs. M+Mix.

Figura 65. Actividad hepática de la enzima carnitín palmitoil transferasa-Ia

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

13.4.2.- Oxidación de ácidos grasos en músculo gastrocnemio

La actividad CPT-Ib en músculo gastrocnemio fue influenciada tanto por el origen de grasa dietaria ($p < 0,001$), como por la suplementación con CLA ($p < 0,001$) (Figura 66). En ausencia de CLA la capacidad de oxidación muscular expresada por la actividad CPT-Ib fue mayor en los animales alimentados con aceite de maíz y canola. El efecto de los CLA fue muy marcado para el Mix, el cual produjo un aumento en la actividad CPT-Ib independientemente del origen de grasa dietaria.

Figura 66. Actividad muscular de la enzima carnitin palmitoil transferasa-Ib

Valores expresados como media \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. Análisis estadístico: 3x3 ANOVA, seguido del test de Tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Este trabajo demuestra los efectos diferenciales de la suplementación con un aceite rico en ácido ruménico o con cantidades equimoleculares de *c*9,*t*11-CLA y *t*10,*c*12-CLA sobre aspectos nutricionales y del metabolismo lipídico en ratones alimentados con dietas conteniendo diferentes proporciones de AGI n-9, n-6 y n-3. Los estudios de interacción de los diferentes CLA con distintas grasas dietarias son muy escasos, y a diferencia de la presente propuesta, han sido orientados a investigar los efectos preventivos que podrían tener distintos tipos de grasas dietarias sobre efectos deletéreos de la mezcla comercial de CLA o del *t*10,*c*12-CLA. En los aspectos nutricionales, el desarrollo del presente trabajo se focalizó en estudios de ganancia de peso, eficiencias dietarias, cambios en la adiposidad y en la composición corporal, así como también en el potencial desarrollo de hepatomegalia. Mientras que, en el metabolismo lipídico, se puntualizó en la incorporación tisular de diferentes AG, en los perfiles de lípidos plasmáticos y tisulares, en potenciales cambios histológicos a nivel hepático y en los mecanismos de regulación de TG tisulares. Los distintos aceites dietarios ricos en AGI n-9, n-6 y n-3 tienden a reproducir ingestas representativas de dietas habituales en nuestra población, sobre las cuales la suplementación con algunas de estas fuentes de CLA podrían generar respuestas metabólico-nutricionales diferentes.

1.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LA GANANCIA DE PESO, COMPOSICIÓN CORPORAL Y PESOS DE TEJIDOS

Todos los animales, independientemente de los tratamientos, aceptaron perfectamente las dietas, no mostrando diferencias en la ingesta de alimentos y por ende de la energía consumida. Asimismo, los animales en todos los tratamientos dietarios, no evidenciaron trastornos digestivos, lo que fue corroborado con equivalentes porcentajes de absorción aparente de grasas y proteínas. Por ello, las ganancias de peso de los animales alimentados con distintos orígenes de grasas dietarias y fuentes de CLA son atribuidas al efecto específico de la composición de AG presentes en las dietas sobre la eficiencia energética del alimento.

Los diferentes orígenes de grasa dietaria tuvieron un efecto diferencial sobre los parámetros nutricionales evaluados. Sorprendentemente, ratones alimentados con la dieta C, la cual es rica en ALN, mostraron un incremento de la ganancia de peso corporal, asociado con un aumento en la eficiencia y retención energética total, a expensas de una elevada retención de grasa corporal respecto a los animales alimentados con dietas O y M. En este sentido, es generalmente conocido que los AGPI n-3 reducen la adiposidad y el peso corporal, pero la mayoría de estos efectos descriptos para los AGPI n-3, son atribuidos a aceites ricos en EPA y DHA (Lorente-Cebrian y col., 2013). Con relación a aceites ricos en ALN, no hay evidencias suficientes que apoyen los mismos efectos fisiológicos que sus derivados de cadena larga. Así, en acuerdo con nuestros resultados, pero no con los de otros autores (Javadi y col., 2007; Ikemoto y col., 1996), Soares da Costa y col. (2012) en ratas Wistar alimentadas con aceite de canola observaron un incremento de la masa corporal durante los días 33-41 del tratamiento dietario. Asimismo, pero en ratones alimentados con aceite de canola, Sealls y col. (2008) encontraron un mayor tamaño de depósitos grasos frente a dietas conteniendo cebo de cerdo (baja en AGPI n-3) o conteniendo un aceite rico en DHA+EPA.

En comparación con la suplementación con AR, la mezcla equimolecular de CLA mostró un marcado descenso en la ganancia de peso y retención energética total corporal, asociado a una drástica reducción de depósitos de grasa corporales, sin cambios en el contenido porcentual de proteínas. La disminución de la grasa corporal en los animales alimentados con Mix, estuvo asociado a una reducción de los depósitos de grasa, alcanzando niveles inferiores a los existentes previos a la administración del mismo, tal como fuera demostrado por los niveles negativos de la retención de grasa corporal. Los presentes resultados confirmaron los datos reportados por otros autores (Poirier y col., 2005a; Takahashi y col., 2002; DeLany y col., 1999; DeLany y col., 2000; West y col., 1998; West y col., 2000; Terpstra y col., 2002; Terpstra y col., 2003) los cuales también observaron en ratones, una disminución de la ganancia de peso y grasa corporal, junto con una menor eficiencia energética del alimento por la suplementación con mezcla equimolecular de CLA. No obstante, en desacuerdo con algunos estudios que observaron cambios en la masa magra corporal (DeLany y col., 2000; Terpstra y col., 2002; Terpstra y col., 2003), en este trabajo y en los de numerosos autores (Kim y col., 2002; Javadi y col., 2004a; Park y Pariza, 2001; Andreoli y col., 2007), no se encontraron diferencias en el nivel de proteínas corporales por la suplementación con Mix.

Las alteraciones en la composición corporal, y más específicamente los cambios en los depósitos de grasa corporal, dependen de la especie, como también de otras causas como la dosis de CLA, duración del tratamiento y estado fisio-patológico de los animales o individuos estudiados. Así, estudios en nuestro laboratorio no mostraron ningún cambio en la composición corporal en ratas durante la repleción de proteínas (Andreoli y col., 2007). Del mismo modo, efectos ligeros o ausencia de los mismos, han sido reportados por distintos autores en ratas normales y otros modelos animales (Miranda y col., 2009; Purushotham y col., 2007; Martins y col., 2010; Lasa y col., 2008). Pariza y col. (2001), atribuyeron estas diferencias en la sensibilidad al CLA, al “turnover” de grasa corporal específico de cada especie, el cual puede ser mayor en ratones que en otros roedores. Por otro lado, los estudios llevados a cabo en humanos son más escasos, y no tan concluyentes como los obtenidos en modelos animales. Por ejemplo, Blankson y col. (2000) mostraron, un descenso en la masa grasa asociado a un incremento de la masa magra, en hombres y mujeres obesos y con sobrepeso, alimentados durante 12 semanas con mezcla de CLA, sin una correlación lineal con la dosis administrada. Otros autores (Thom y col., 2001) observaron que la reducción de la grasa corporal por la mezcla de CLA, es más acentuada cuando se la combina con actividad física. Asimismo, numerosos autores no encontraron modificaciones en la composición corporal en humanos bajo distintas situaciones fisio-patológicas (Petridou y col., 2003; Zambell y col., 2000; Kreider y col., 2002; Riserus y col., 2002; Larsen y col., 2006).

Los efectos de los CLA sobre la composición corporal, son atribuidos al isómero *t*10,*c*12-CLA (Park y col., 1999; Clément y col., 2002) y, al menos a nuestro conocimiento, sólo dos trabajos encontraron efectos por el isómero *c*9,*t*11-CLA (de Roos y col., 2005; Akahoshi y col., 2003). El efecto del AR sobre la ganancia de peso y composición corporal en las presentes experiencias, fueron dependientes del origen de grasa dietaria. En este sentido, sólo en los animales alimentados con aceite de canola, la suplementación con AR disminuyó la ganancia de peso corporal, asociada con una reducción en la retención energética de grasa. La magnitud del efecto reductor del AR, fue significativamente menor que la observada por la suplementación con Mix, pero es interesante denotar que los efectos adversos presentes en la suplementación con este último, no se evidenciaron con el AR. La ausencia de cambios en la ganancia de peso, composición corporal y eficiencia energética del alimento en los animales de los grupos O+AR y M+AR, coincide con la mayoría de los reportes disponibles en la bibliografía (Park y col., 1999; Gavino y col., 2000; Hargrave y col., 2002).

Los cambios observados en la ganancia de peso y composición corporal, estuvieron en paralelo a modificaciones, principalmente, en el nivel de los depósitos grasos y del tejido hepático. El origen de grasa dietaria, como la fuente de CLA, afectaron la acreción y/o depleción de los depósitos grasos. En este sentido, el incremento en la retención de grasa corporal inducida por el aceite canola ha sido acompañado por una expansión en el tejido adiposo epididimal, sin modificaciones en los pesos o tamaños de otros tejidos; en cambio los CLA tuvieron distintos efectos, y su magnitud estuvo relacionada con el origen de grasa dietaria presente, afectando diferentes órganos y tejidos. Así, con el Mix, el marcado descenso en la retención de grasa se asoció a una notable reducción del tejido adiposo epididimal y a un marcado incremento del peso del hígado, sin cambios en la masa muscular. Estas alteraciones conforman parte del síndrome lipoatrófico descrito por Poirier y col. (2005a) y fueron atribuidos al isómero *t*10,*c*12-CLA. Por otro lado, la suplementación con AR, disminuyó la masa del tejido adiposo epididimal, independientemente del origen de grasa dietaria. No obstante, sólo en los animales del grupo C+AR, este efecto se asoció con una reducción en la retención de grasa corporal. La magnitud de dicho efecto reductor del AR sobre los depósitos grasos, fue significativamente menor que la observada con Mix, pero interesantemente ni hepatomegalia, ni otros efectos adversos estuvieron presentes. Numerosos reportes bibliográficos coinciden con los hallazgos observados con el Mix (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Hwang y col., 2007; Takahasni y col., 2003), pero la mayoría de los estudios con *c*9,*t*11-CLA (Clément y col., 2002; Warren y col., 2003) no encontraron los cambios presentados en este trabajo. Las diferencias, pueden estar asociadas al origen de grasas dietarias utilizadas, como asimismo, a otras variables presentes en los modelos experimentales. Tanto los cambios inducidos por el Mix, como por el AR, fueron el reflejo de modificaciones metabólicas que dieron lugar en los principales tejidos involucrados y se reflejaron asimismo a nivel de circulación. Por ello, en forma secuencial, se presentan los cambios encontrados a nivel plasmático y tisular.

2.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE PARÁMETROS SÉRICOS

La composición de AG presentes en suero de animales en condiciones alimentadas, reflejan el “pool de AG” correspondiente a los lípidos de la dieta, más aquellos procedentes de la metabolización de lipoproteínas a nivel de diferentes tejidos. En este sentido, pese a los notorios cambios observados en las distintas clases de lípidos circulantes, los niveles de los principales AG encontrados en suero, reflejaron el patrón de AG constitutivos de las distintas grasas dietarias suplementadas o no con CLA, más aquellos derivados de la metabolización tisular.

Los niveles de TG séricos no fueron modificados por el origen de grasa dietaria, pero la suplementación con CLA, produjo un incremento de sus niveles circulantes, asociado a cambios en la secreción hepática y remoción plasmática de TG.

El incremento de los niveles de TG en suero en los animales alimentados con Mix, podría explicarse por una menor actividad de la enzima LPL en tejido adiposo, y en el grupo C+Mix, adicionalmente, por una mayor VSTG hepática. Además, en el grupo O+Mix, el incremento de los niveles de TG séricos estuvo acompañado de un aumento en los niveles de Col y FL. La mayoría de los trabajos que hacen un análisis exhaustivo de los cambios en el perfil de lípidos séricos por los CLA, utilizan modelos animales propensos al desarrollo de aterosclerosis. En este sentido, resultados similares a los del presente trabajo sobre la concentración sérica de TG han sido observados por de Deckere y col. (1999) en hámsters alimentados con mixCLA o con $t10,c12$ -CLA. Sin embargo, otros autores obtuvieron una respuesta opuesta en la misma especie animal. Por ejemplo, Macarulla y col. (2005) con $t10,c12$ -CLA y Gavino y col. (2000) con mixCLA, mostraron que los niveles de TG plasmáticos en hamsters fueron reducidos. Los últimos autores, sugirieron que el efecto hipotrigliceridémico del mixCLA estuvo asociado con una perturbación de la asimilación y/o del transporte de grasa como lipoproteína-TG. El efecto reductor de los TG plasmáticos por la suplementación con mixCLA, también ha sido observado en nuestro grupo en ratones alimentados con dietas hiperlipidémicas (Andreoli y col., 2009). Por lo tanto, existe una respuesta controversial del CLA sobre el nivel de TG séricos, y esta puede estar relacionada entre otros factores, con la especie, modelo animal, tipo de isómero y grasa dietaria (Bhattacharya y col., 2006). Resultados controversiales también han sido encontrados en estudios humanos, pero en términos generales escasos efectos han sido observados sobre los lípidos séricos (Bhattacharya 2006). En particular, estudios realizados

en humanos, como también en animales hipertriglicéridémicos, mostraron que existe una relación entre la concentración de TG y colesterol en suero con la capacidad lipogénica hepática expresada por la actividad de la enzima SCD-1 (Attie y col., 2002). Esta capacidad lipogénica diferencial se discute posteriormente, junto con el análisis de otros parámetros del metabolismo de lípidos en el hígado.

Por otro lado, la suplementación con AR, en general no modificó el contenido sérico de los distintos componentes lipídicos, a excepción de un aumento de los niveles de TG sólo en los animales alimentados con la dieta M+AR. Este efecto podría deberse a la mayor VSTG hepática, asociada con una menor actividad de la enzima LPL en tejido adiposo. El mismo efecto en la VSTG hepática y en la actividad LPL del tejido adiposo, fue observado en los animales alimentados con la dieta C+AR; sin embargo, no hubo cambios en las concentraciones de TG séricos en este grupo. La ausencia de cambios en los niveles de lípidos séricos por la suplementación con AR, que se diferencian claramente con la suplementación con mixCLA o con *t10,c12*-CLA, ha sido observada por otros autores como Gavino y col. (2000) y Macarulla y col. (2005) en hamsters. Al menos a nuestro conocimiento, no existe ningún estudio que pudiese explicar los mecanismos fisiológicos en el estado regulatorio observado en el grupo C+AR vs M+AR. No obstante, podría ser postulado que la composición de las lipoproteínas ricas en TG de los animales alimentados con la dieta M+AR, tendrían una menor afinidad por la enzima LPL que las lipoproteínas de los animales alimentados con la dieta C+AR. Esta hipótesis, no excluye que otros mecanismos biológicos pudiesen estar implicados.

Al igual que los niveles de TG circulantes, los niveles de glucosa no se modificaron por grasas dietarias de diferentes orígenes; no obstante la suplementación con Mix, pero no con AR, incremento los niveles de glucosa en los grupos O+Mix y C+Mix. No fue objeto de este estudio investigar mecanismos reguladores de la glucemia, no obstante, como fuera descrito en ratones, los cambios mencionados podrían deberse a un estado de insulino-resistencia generado específicamente por el *t10,c12*-CLA (Adkins y col., 2013; Hommelberg y col., 2010). Otros trabajos en ratones suplementados con mixCLA o con *t10,c12*-CLA, han observado normoglucemia en presencia de una marcada hiperinsulinemia (Poirier y col., 2005b; Javadi y col., 2004b; Clément y col., 2002). Estos mismos autores, observaron que dietas ricas en *c9,t11*-CLA, no modificaron los niveles de glucosa como en el presente trabajo, ni de insulina circulante. Si bien las alteraciones observadas en el síndrome lipoatrófico descrito por Poirier en ratones alimentados con *t10,c12*-CLA o con mixCLA no son las mismas presentes en el paciente obeso que

consume CLA, ambas situaciones metabólicas comparten alteraciones comunes. Así, llamativamente Riserus y col. (2004) en pacientes con obesidad abdominal, observaron que el *t10,c12*-CLA, pero no el *c9,t11*-CLA, ni la mezcla equimolecular de ambos, incrementó la concentración de glucosa e insulina plasmática. Asimismo, otros autores en pacientes con sobrepeso (Gaulhier y col., 2004) o en pacientes sanos (Eviolfson y col., 2004), mostraron que el mixCLA como suplemento dietario, no alteró los niveles de glucemia y los resultados sobre la insulinemia fueron heterogéneos.

3.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LÍPIDOS HEPÁTICOS Y SU REGULACIÓN

A pesar que, los distintos orígenes de grasas dietarias, sin suplementación con CLA, no condujeron a hepatomegalia, ni esteatosis, fueron observadas diferencias en la histología y estado oxidativo a nivel hepático. Por otro lado, la suplementación con Mix, pero no con AR, en el presente modelo experimental produjo hepatomegalia, asociada a una acumulación de TG. Las mismas fueron acompañadas con alteraciones histológicas y cambios en el estado lipoperoxidativo dependiendo del origen de grasa dietaria considerada. Tanto la hepatomegalia, como la esteatosis, han sido observadas por numerosos investigadores en ratones alimentados con una mezcla equimolecular *c9,t11*-CLA + *t10,c12*-CLA (Andreoli y col., 2009; Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000) o con el isómero individual *t10,c12*-CLA (Rasooly y col., 2007; Degrace y col., 2004; Clément y col., 2002). Dichas alteraciones podrían estar relacionadas a la incorporación de CLA en el hígado y a las modificaciones metabólicas que los mismos podrían producir, las cuales muestran dependencia del tipo de grasa dietaria (Rasooly y col., 2007; Degrace y col., 2004; Degrace y col., 2003, Kelley y col., 2009; Ide, 2005).

3.1.- Contenido y retención de isómeros CLA en hígado

El contenido de isómeros *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA en el hígado depende del nivel de ingesta de los mismos, del tiempo de tratamiento dietario, de la afinidad para su incorporación tisular, de la velocidad de secreción del isómero esterificado a diferentes lípidos y de la capacidad de oxidación de los mismos. Dado que, la retención de isómeros

se estandarizó por el porcentaje presente en la dieta, que el tiempo de tratamiento ha sido equivalente en todos los grupos y que la secreción del isómero *t10,c12*-CLA nunca fue superior a la del *c9,t11*-CLA, claramente nuestros resultados, en los cuales se observa un mayor contenido hepático de *c9,t11*-CLA que de *t10,c12*-CLA, soportan los trabajos de otros investigadores que mostraron una mayor capacidad de oxidación del *t10,c12*-CLA que del *c9,t11*-CLA (Martin y col., 2000; Banni y col., 2004a). La velocidad de flujo de AG a través de las vías de β -oxidación mitocondrial y peroxisomal, está fundamentalmente dada por la actividad de las enzimas CPT-Ia mitocondrial y acil Co-A oxidasa (ACO) peroxisomal, respectivamente. Estudios cinéticos realizados por Martin y col. (2000) sobre las enzimas hepáticas CPT-Ia y ACO con derivados CLA-CoA puros, mostraron una canalización diferencial de los isómeros CLA a través de estos caminos oxidativos, principalmente a nivel peroxisomal. Es conocido que la enzima CPT-Ia es capaz de discriminar entre isómeros *cis* y *trans* (Ide y col., 1987), y entre sistemas de doble enlaces conjugados y no conjugados (Martin y col., 2000), pero que no tiene la capacidad para distinguir entre isómeros posicionales de los CLA, por lo que ambos isómeros y sus derivados CoA, serían teóricamente degradados de igual forma a través de la β -oxidación mitocondrial. De esta manera, la actividad CPT-Ia no explicaría la preferente acumulación del isómero *c9,t11*-CLA sobre la del *t10,c12*-CLA observada en los lípidos hepáticos, pudiendo ser la misma explicada por una mayor capacidad de oxidación peroxisomal del *t10,c12*-CLA que del *c9,t11*-CLA (Martin y col., 2000). Confirmando esta observación, se ha encontrado una mayor proporción de los productos conjugados de 16 carbonos provenientes de la β -oxidación parcial del isómero *t10,c12*-CLA que del *c9,t11*-CLA en los lípidos tisulares de ratas alimentadas con CLA (Banni y col. 2004b; Sébédio y col., 2001). Además, a partir de evidencias encontradas para AGPI-CL n-3 (Madsen y col. 1998), es posible considerar que diferencias en la activación de los isómeros CLA a sus respectivos Acil-CoA, por la acil-CoA sintasa, podrían también explicar el contenido diferencial de isómeros encontrados en los lípidos tisulares. Esta preferencia del isómero *t10,c12*-CLA frente al *c9,t11*-CLA para la oxidación, puede estar relacionada a la baja tendencia del primero de seguir vías de elongación y desaturación para luego su incorporación a los lípidos hepáticos. Así, el *c9,t11*-CLA posee un mayor grado de conversión a dienos conjugados de 3 ó 4 insaturaciones y 20 átomos de carbono que el *t10,c12*-CLA, conduciendo a una mayor incorporación en los lípidos polares (Banni y col., 2001; Sebedio y col., 2001). Este mayor contenido de *c9,t11*-CLA que de *t10,c12*-CLA

encontrado en hígado, ha sido también observado por Li y Watkins (1998) en suero, hueso, médula ósea y periostio de ratas alimentadas con una mezcla equimolecular de *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA, y diferentes relaciones n-6/n-3, pero en inversa proporción en otros tejidos como bazo, músculo y corazón.

Li y Watkins (1998) además demostraron una clara dependencia de la incorporación de isómeros CLA en función de la relación de AGI de la dieta, observando una mayor incorporación en los lípidos hepáticos de *c9,t11*-CLA + *9t,11c*-CLA en animales alimentados con dietas conteniendo aceite de arenque rico en AGPI-CL n-3 que con dietas conteniendo aceite de cártamo. Mientras que el *t10,c12*-CLA, además de presentar una menor incorporación que el *c9,t11*-CLA, no mostró cambios en función de las grasas dietarias empleadas. En nuestras experiencias, no es claro cual es el mecanismo que justifica el menor nivel de isómeros en los animales alimentados con aceite de oliva frente a los que recibieron aceite de maíz o de canola. En virtud que la cantidad secretada de ambos isómeros en las VLDL fue la misma para los tres orígenes de grasa dietaria, es posible que modificaciones en la afinidad de incorporación o velocidad de metabolización estén presentes en función de las diferentes proporciones de AGI n-9, n-6 y n-3 en la dieta.

El nivel de incorporación de los diferentes CLA, puede estar asociado a la competencia por similitud estructural con otros AGI. Los CLA mayoritarios en la dieta poseen un doble enlace *cis* y otro *trans*, y este último posee una disposición espacial muy semejante al enlace simple, por lo cual el conjugado *cis-trans* o *trans-cis* podría comportarse estructuralmente como un AGMI *cis*. En este sentido, el *c9,t11*-CLA espacialmente guarda una cierta similitud con el ácido oleico, por lo que, animales alimentados con aceite de oliva que presentaron el mayor incremento de ácido oleico en sus lípidos hepáticos, podrían reducir la incorporación de *c9,t11*-CLA. Este efecto se observó cuando se proporcionó la mezcla equimolecular de isómeros, pero no cuando se suministró la dieta enriquecida con ácido ruménico. Por otro lado, el metabolismo de los CLA, puede estar afectado por el grado de activación de las enzimas oxidativas y/o de la biosíntesis de AGPI-CL que se generen en un entorno afectado por las proporciones relativas de AGI n-9, n-6 y n-3. En ratas Wistar alimentadas durante 60 días con dietas conteniendo un 7% de distintos aceites comestibles (oliva, soja, uva y coco), se observó una mayor tasa de β -oxidación del palmitato, acompañado de un incremento en la actividad de las enzimas oxidativas hepáticas en animales alimentados con aceite de oliva (Hurtado de Catalfo y col., 2013). Esto, podría conducir a una mayor β -oxidación de CLA, principalmente de *t10,c12*-CLA, y consecuentemente explicar los menores niveles de CLA

que observamos en animales que recibieron aceite de oliva. Por otra parte, con respecto a la biosíntesis de AGPI-CL, la mayor actividad $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasa observada con el aceite de oliva por Hurtado de Catalfo y col. (2013), conducirían a una mayor conversión de los isómeros CLA a sus derivados conjugados, con la consecuente disminución del contenido de *c9,t11*-CLA y del *t10,c12*-CLA en los lípidos hepáticos. Esta última hipótesis, estaría en concordancia con los resultados de nuestro trabajo, donde observamos un incremento en las relaciones AA/AL y DHA/ALN en los ratones que consumieron aceite de oliva como fuente de grasa dietaria.

3.2.- Niveles de triglicéridos, colesterol y fosfolípidos en hígado

Los niveles de TG hepáticos no fueron afectados por el origen de grasa dietaria, pero si incrementados por la suplementación con Mix en los grupos M+Mix, y en mayor grado en el O+Mix. Estos cambios estuvieron claramente relacionados con un desequilibrio entre la lipogénesis/ β -oxidación que no fue compensado con una mayor VSTG por el hígado. Sin embargo, a diferencia de estos grupos la dieta C+Mix y la suplementación con AR en las dietas conteniendo cualquiera de los tres orígenes de grasas dietarias, a través de un aumento de la VSTG, evitó la acumulación de TG en el hígado. En concordancia con nuestros resultados, la esteatosis hepática observada en los ratones alimentados con las dietas O+Mix y M+Mix, ha sido atribuida al isómero *t10,c12*-CLA, el cual genera alteraciones hepáticas con manifestaciones comunes a las observadas en el hígado graso no alcohólico (Vyas y col., 2012; Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005). Este efecto diferencial del *t10,c12*-CLA y del *c9,t11*-CLA, explicaría la falta de esteatosis hepática observada en los animales alimentados con AR, la cual ha sido también reportada por otros autores (Clément y col., 2002; Degrace y col., 2004; Macarulla y col., 2005).

Takahashi y col. (2003), en ratones ICR y C57BL/6J macho alimentados durante 21 días con una dieta conteniendo 1% de mixCLA y 14% de grasa dietaria, como Ferramosca y col. (2006) en ratones ICR macho alimentados durante un período de 2 a 16 semanas con una dieta conteniendo 1% de mixCLA y 10% de grasa dietaria, también observaron un incremento en el contenido de TG hepático asociado a una elevada lipogénesis. No obstante, mientras que los primeros encontraron un incremento de FL y Col, Ferramosca y col. (2006) no observaron dichas alteraciones en el contenido de estos componentes lipídicos. Sorprendentemente, en nuestras experiencias, la suplementación con Mix, como

también con AR, a las dietas conteniendo aceite de oliva y de canola, provocaron un aumento en los niveles hepáticos de colesterol. Este incremento pudo haber sido debido a la conjunción de al menos 2 factores. Por un lado, Li y col. (2012) observaron que, tanto el *t10,c12*-CLA como el mixCLA, incrementaron la cetogénesis a través de un aumento en la expresión génica de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintasa (HMG-CoA sintasa), y por otro lado, ha sido demostrado que el ácido oleico (presente en un 55,2 y 61,1 % en los aceites de oliva y canola, respectivamente) es un potente estimulador de la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa (Salam y col., 1989). Estas explicaciones, no descartan que otros potenciales mecanismos, entre ellos los mediados por el SREBP-1 y SREBP-2, que son inducidos por el *t10,c12*-CLA, puedan estar involucrados (Ringseis y col. 2006). Además, es posible postular que, el *c9,t11*-CLA actúe potenciando el efecto del oleico sobre la enzima HMG-CoA reductasa dado la similitud estructural con el ácido oleico, y debido a que éste isómero no pareciera incrementar la cetogénesis, ni actuar como fuerte activador de los SREBP.

En concordancia con Ferramosca y col. (2006) y en disidencia con Takahashi y col. (2003), la suplementación con Mix no incrementó los niveles de FL hepáticos. De igual forma, el AR no incrementó el contenido de FL en ninguna de las fuentes de grasas dietarias. Sólo disponemos de los resultados referenciados en el presente trabajo para su análisis y discusión, mientras que no existe en la bibliografía estudios que puedan explicar bioquímicamente las alteraciones en este parámetro.

3.3.- Lipogénesis y β -oxidación de ácidos grasos en hígado

El origen de grasa dietaria no tuvo influencia diferencial sobre la actividad de las enzimas lipogénicas evaluadas, no obstante el aceite de canola presentó una mayor actividad CPT-Ia, lo cual podría asociarse con una mayor β -oxidación mitocondrial. En cambio, en todos los animales alimentados con Mix o con AR, se observó una estimulación en las actividades de las enzimas lipogénicas FAS y EM, sin cambios en la actividad CPT-Ia (a excepción de un aumento en el grupo M+AR). Numerosos autores (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002; Takahashi y col., 2003; Ferramosca y col., 2006; Degrace y col., 2004) han observado en hígado de ratones alteraciones en la tasa de lipogénesis y/o β -oxidación inducidas tanto por el mixCLA, como por el isómero

individual *t10,c12*-CLA. Sin embargo, a diferencia de lo encontrado en nuestro trabajo por la suplementación con AR, la mayoría de los estudios realizados en modelos animales, no mostraron incremento en la actividad y/o expresión de las enzimas lipogénicas hepáticas por la suplementación con dicho isómero (Clément y col., 2002; Faulconnier y col., 2004).

Las alteraciones provocadas por el mixCLA, sobre la expresión y actividad de enzimas claves de la lipogénesis hepática, pueden ser explicadas por la consiguiente inducción por el *t10,c12*-CLA de los factores de transcripción SREBP-1 y PPAR- γ (Poirier y col., 2005; Clément y col., 2002), como así también, por el marcado incremento en los niveles de insulina circulante inducidos por dicho isómero. Por lo tanto, según Clément y col. (2002), la esteatosis hepática inducida por el *t10,c12*-CLA, pero no por el *c9,t11*-CLA, específicamente en ratones, es secundaria a la hiperinsulinemia, lo que provoca un aumento de la captación y síntesis de AG. El incremento en la actividad de las enzimas lipogénicas hepáticas en los grupos suplementados con AR, podría involucrar mecanismos diferentes a la inducción de los factores de transcripción anteriormente mencionados, ya que a pesar de que Belury y col. (2002) reportaron que el isómero *c9,t11*-CLA es un potente activador del PPAR- γ *in vitro*, Clément y col. 2002 no observaron cambios en la expresión de dicho factor de transcripción por el *c9,t11*-CLA *in vivo*. Además, numerosos trabajos con ratones, demostraron que los isómeros individuales de los CLA presentan un efecto opuesto sobre la expresión SREBP-1, siendo la misma estimulada por el *t10,c12*-CLA y reprimida por el *c9,t11*-CLA (Clément y col., 2002; Roche y col., 2002).

La ausencia de cambios en la actividad de la enzima CPT-Ia en el hígado de ratones alimentados con dietas suplementadas con Mix, concuerda con los resultados de Park y col. (1997) en ratones ICR macho alimentados con 0,5% de CLA y 5,5% de grasa dietaria; mientras que, los resultados hallados en la actividad CPT-Ia en los grupos O+AR y C+AR, concuerdan con aquellos estudios en ratones (Degrace y col., 2004), ratas (Akahoshi y col., 2003) y hamsters (Macarulla y col., 2005) alimentados con dietas suplementadas con *c9,t11*-CLA. No obstante, ciertos resultados contradictorios se encuentran en la bibliografía. Así, en ratones alimentados con 1% de mezcla equimolecular de CLA (Takahashi y col., 2003), de *t10,c12*-CLA o *c9,t11*-CLA (Degrace y col., 2004), se observó una mayor actividad y expresión de la enzima CPT-I mitocondrial. Estos últimos autores no pueden explicar los mayores niveles de CPT-I asociados al incremento de su potente inhibidor intracelular, malonil-CoA. Por otro lado, la actividad de la enzima CPT-I, es modulada por factores de transcripción, que también son influenciados por los CLA. En este sentido, tanto el isómero *c9,t11*-CLA, como el *t10,c12*-CLA, son ligandos de los

PPAR- α (Clément y col., 2002; Moya-Camarena y col., 1999), a través de los cuales, los CLA han mostrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, no sólo incrementar la expresión de las enzimas CPT-I y CPT-II, sino también del citocromo P450A1, la enzima ACO y la proteína de unión de ácidos grasos hepática (LFABP) (Moya-Camarena y col., 1999; Warren y col., 2003, Takahashi y col., 2003). Como se mencionara anteriormente, estos mecanismos no explican los resultados de los grupos suplementados con Mix o de los grupos O+AR y C+AR; no obstante, permiten interpretar el incremento diferencial en la actividad CPT-Ia observado en el grupo M+AR. En este grupo podría existir un efecto sinérgico a nivel hepático, dado por el elevado contenido de AGPI (Σ AGPI: M+AR: 39.30% > C+AR: 25.96% > O+AR: 19.18%) y de *c9,t11*-CLA, principal isómero CLA activador del PPAR- α (Ren y col., 1997; Moya-Camarena y col., 1999).

Además de la regulación de la lipogénesis y/o β -oxidación por las enzimas discutidas anteriormente, los cambios en estas vías metabólicas pueden estar asociados a alteraciones en la composición de AG tisulares, la cual puede ser modificada por el origen de grasa dietaria, como por el tipo de CLA considerado. Así, el perfil de AG tisular puede reflejar el estado metabólico influenciado por la ingesta de AG. En este sentido, las relaciones 16:1/16:0 y 18:1/18:0, que reflejan el flujo a través de la enzima SCD-1, han mostrado un incremento significativo en los animales alimentados con aceite de oliva, y estuvieron particularmente exacerbadas en el grupo O+Mix, mostrando una correlación directa con los considerablemente elevados niveles de TG hepáticos observados en este grupo. En concordancia con otros autores, estos resultados demuestran un aumento de la síntesis de novo de AG por el aceite de oliva (Hurtado de Catalfo y col., 2013; Ferramosca y col., 2008, Ntambi, 1999), y un efecto potenciador del mismo por el mixCLA (Peters y col., 2001). Además del incremento del flujo a través de la enzima SCD-1, distintos autores han demostrado un incremento en la expresión génica de dicha enzima en ratones alimentados con mixCLA (Peters y col., 2001) o con *t10,c12*-CLA (Li y col., 2012; Guillén y col., 2009). No obstante, en contraposición con nuestros resultados y con aquellos discutidos de otros autores, diferentes trabajos no observaron cambios o encontraron una disminución en las relaciones 16:1/16:0 y 18:1/18:0 en el hígado de ratones (Javadi y col., 2004b, Lee y col., 1998) y ratas (Kostogryz y Pisulewski, 2010a) que consumieron la mezcla equimolecular de CLA. Al mismo tiempo, diversos estudios *in vivo* e *in vitro*, indicaron que el *t10,c12*-CLA inhibió la expresión y actividad de la enzima SCD-1 hepática (Lee y col., 1998; Park y col., 2000; Bretillón y col., 1999; Eder y col.,

2002). Finalmente, reforzando la importancia de la enzima SCD-1 hepática en la lipogénesis, es dable destacar que las relaciones 16:1/16:0 y 18:1/18:0 fueron normales en animales alimentados con AR, los cuales no presentaron esteatosis hepática. Estos resultados concuerdan con los de otros autores, los cuales no observaron cambios en la actividad SCD-1, ni en las relaciones: 16:1/16:0 y 18:1/18:0, por el isómero *c9,t11*-CLA en cultivos de células hepáticas (Choi y col., 2001; Lee y col., 1998; Park y col., 2000).

3.4.- Biosíntesis de AGPI-CL en hígado

El contenido hepático de AL, ALN y de los AGPI-CL derivados de los mismos, guardó una relación directa con los niveles dietarios de las respectivas familias de AGI. La biosíntesis hepática de AGPI de la serie n-6 y n-3, expresada por la relación AA/AL y DHA/ALN, respectivamente, fue en el orden $O > M > C$. Estos resultados concuerdan con los de Hurtado de Catalfo y col. (2013), quienes encontraron una mayor actividad y expresión de las enzimas hepáticas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasa, en ratas alimentadas con aceite de oliva, en comparación con aquellas alimentadas con aceites ricos en AL y ALN.

La suplementación con Mix y con AR a cada una de las tres grasas dietarias, disminuyó las relaciones AA/AL y GLA/AL, mostrando una inhibición de la biosíntesis de AGPI n-6 y, específicamente, de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa hepática, sin denotar cambios en el flujo de AG a través de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa (relación AA/DGLA). Es importante destacar que, pese a que la inhibición de la biosíntesis de AGPI-CL n-6 por ambas fuentes de CLA alcanzó la misma magnitud, el contenido final de AA en los lípidos hepáticos fue menor en los grupos suplementados con Mix que en aquellos suplementados con AR. Respecto a la familia n-3, en los animales alimentados con aceite de oliva y de canola, la suplementación con Mix y con AR redujo la biosíntesis de sus AGPI-CL n-3 expresada por la relación DHA/ALN. Específicamente, podemos inferir que la inhibición de la conversión de ALN a AGPI-CL en los grupos C+Mix y C+AR, ha sido debida a un bloqueo en la biosíntesis de EPA (-50% en relación EPA/ALN), la cual podría estar asociada a una reducción de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa. Así, los resultados sobre ambas familias de AG, concuerdan con la mayoría de los trabajos bibliográficos disponibles, los cuales muestran una reducción de la biosíntesis de AGPI-CL y una inhibición de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasa, tanto por el mixCLA (Javadi y col., 2004b), como por los isómeros

individuales *t10,c12*-CLA y *c9,t11*-CLA (Bretillon y col., 1999; Eder y col., 2002). Los resultados de Belury y Kempa-Steczko (1997), mostrando en hígado de ratones una similar conversión enzimática del ^{14}C -CLA y del ^{14}C -AL a productos de 18:3 carbonos, sin excluir una inhibición de la $\Delta 6$ -desaturasa, permiten postular que la reducción de la formación de AA podría también ser debido a una competencia de sustratos, lo cual conduciría a la formación de derivados conjugados de cadena larga que podrían dar eicosanoides con propiedades muy diferentes a los generados a partir del AA. Otra evidencia que soportaría una competencia de sustratos en la formación de AGPI-CL, podría estar sustentada por el trabajo de Takahashi y col. (2003), quienes observaron inesperadamente un aumento de la expresión de las enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasa en hígado de ratones alimentados con mixCLA. La relación de los AG dietarios pareciera ejercer un rol muy importante sobre el efecto inhibitorio ejercido por los CLA en la biosíntesis de AGPI-CL. Así, los resultados de Eder y col. (2002) en células HepG2 que demostraron que el *t10,c12*-CLA inhibió la desaturación del ALN en un medio rico en dicho AG, pero no en un medio desprovisto de ALN, se encuentran en concordancia con nuestros resultados, en los cuales observamos que el Mix inhibió la biosíntesis de AGPI-CL n-3 en las dietas C+Mix, pero no en M+Mix.

Nuestros resultados, junto con los de otros autores (Bretillon y col., 1999; Javadi y col., 2004b) sugieren que la modulación por los CLA dietarios de la actividad $\Delta 6$ -desaturasa y la reducción en el contenido de AA, resultaría en una disminución global de los eicosanoides derivados del mismo. Así, la suplementación con ambos CLA, pero principalmente el Mix, a través de la reducción de la biosíntesis de AA, disminuirían la formación de prostaglandina E_2 (PGE_2) la cual está inversamente relacionada con la esteatosis hepática (Nakanishi y col., 2004). Es importante destacar el marcado descenso de los niveles de AA en el grupo O+Mix, los cuales se asociaron a un notable incremento de TG hepáticos. Asimismo una acentuada reducción de AA fue observada en el grupo C+Mix, donde la esteatosis no ha sido evidenciada, pero en este grupo los niveles de EPA y DHA, han superado altamente los alcanzados en el grupo O+Mix (+1500% y +530%, respectivamente). Es dable recordar que bajos niveles de AGPI-CL n-3 pueden ser un factor lipogénico que conduzca a incrementar la acumulación de lípidos hepáticos por favorecer los depósitos de TG en lugar de acrecentar su oxidación (Matsuzaka y col., 2002; Yoshikawa y col., 2002); asimismo altos niveles de AGPI-CL n-3 ejercen un efecto opuesto.

Llamativamente, la inhibición de la biosíntesis de AGPI-CL por la $\Delta 6$ -desaturasa, puede canalizar los sustratos AL y ALN a productos de elongación previos a la

desaturación, conduciendo a la formación de los AG: 11*c*,14*c*-20:2 y 11*c*,14*c*,17*c*-20:3, los cuales mostraron niveles elevados en los animales alimentados con aceite de maíz y de canola suplementados con Mix y AR. Estos productos formados pueden generar compuestos cuyas acciones, al menos a nuestro conocimiento, son desconocidas.

3.5.- Velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos

Los niveles normales de TG en hígado fueron paralelos a la normal velocidad de secreción hepática de TG-pre- β -lipoproteínas en los grupos que recibieron los tres tipos de grasas dietarias sin suplementar con CLA. En cambio, esta correspondencia no fue observada con la suplementación con CLA, y una dependencia con el origen de grasa dietaria se denotó en la suplementación con Mix. Así, integrando estos resultados con aquellos previamente discutidos, podemos observar una respuesta diferencial del Mix en función del origen de grasa dietaria, en la que específicamente la incrementada lipogénesis inducida por el Mix, en el grupo C+Mix, pero no en los grupos O+Mix y M+Mix, fue compensada por una elevada secreción de TG-VLDL que previno la esteatosis hepática. La normal VSTG observada en el grupo M+Mix, también fue reportada por nuestro grupo (Andreoli y col., 2009) en ratones CF1 alimentados con una dieta hiperlipémica conteniendo 17% de aceite de maíz y 3% de Mix. La mayor VSTG encontrada en el grupo C+Mix, concuerda con los resultados de Degrace y col. (2003), quienes observaron que en ratones C57BL/6j alimentados durante 4 semanas con una dieta rica en ALN suplementada con *t*10,*c*12-CLA, la secreción de TG estuvo incrementada; sin embargo, a diferencia de nuestro trabajo, el incremento de la VSTG fue insuficiente para evitar la esteatosis hepática. La posible explicación del aumento de la VSTG, tanto en el grupo C+Mix, como en el trabajo dirigido por de Degrace y col. (2003), puede radicar en la fuente de grasa dietaria rica en ALN, que conduce a una menor relación AGPI-CL n-6/n-3 en los lípidos hepáticos. Así, en nuestra experiencia, la relación AA/DHA fue significativamente reducida en la dieta conteniendo aceite de canola suplementada con Mix (AA/DHA; O+Mix: 3,2; M+Mix: 4,2 y C+Mix: 0,6); y es conocido que una relación AA/DHA elevada se presenta en la enfermedad del hígado graso, la cual favorece la síntesis de lípidos sobre la oxidación y secreción, conduciendo a la acumulación hepática de lípidos (El-Brady y col., 2007; Vyas y col., 2012). Entre los mecanismos involucrados, podemos reconocer que los AGPI-CL n-3 regulan positivamente la expresión de los PPAR- α , favoreciendo la

expresión de la proteína LFABP y la secreción de apolipoproteína B-100 (apo B-100) (Linden y col., 2002; Carlsson y col., 2001). Cabe consignar que la apo B-100 es un componente clave de la partícula de VLDL, cuya nivel de síntesis en el retículo endoplasmático rugoso controla la tasa global de producción de VLDL (Li y col., 2012).

A diferencia de lo observado con los grupos O+Mix y M+Mix, pero en similitud con el grupo C+Mix, el incremento de la VSTG hepática por la suplementación con AR a las tres grasas dietarias, evitó la acumulación de TG en el hígado. No obstante, mientras que el aumento de la VSTG en el grupo C+Mix pudo haberse debido a una baja relación de AGPI-CL n-6/n-3 en los lípidos hepáticos, la mayor secreción de TG en los animales alimentados con AR pareciera deberse a un efecto específico del alto contenido de *c9,t11*-CLA. Así, en línea con nuestros resultados, Lin y col. (2001a) en células HepG2, observaron que el isómero *c9,t11*-CLA es un estimulador más potente de la secreción de apo B-100 y TG que el *t10,c12*-CLA. Este efecto del *c9,t11*-CLA sobre la secreción de TG-VLDL hepática, puede estar relacionado a la activación del PPAR- α en hígado, ya que estudios *in vitro*, han demostrado que el isómero *c9,t11*-CLA parece ser más eficiente que el *t10,c12*-CLA en la activación de dicho factor de transcripción (Moya-Camarena y col., 1999; Clement y col., 2002), conduciendo a una mayor activación de LFABP (Clement y col., 2002).

Si bien es conocido que la longitud de la cadena acíclica, el número de insaturaciones y la isomería de los AG tienen un profundo impacto sobre el ensamble y secreción de las partículas de TG-VLDL formadas, tanto a partir de los AG disponibles desde depósitos como de aquellos derivados de la síntesis de novo (Sundaram y Yao, 2010), pareciera evidente a partir de nuestros resultados que, en términos generales, los patrones de cambios de los AG secretados son semejantes a aquellos observados en el hígado.

3.6.- Grado de lipoperoxidación e histología hepática

El estado oxidativo y las alteraciones histológicas observadas en el hígado de los animales de experimentación, mostraron una dependencia del origen de grasa dietaria y de la fuente de CLA suplementada. No obstante, no es posible sustentar que los daños histológicos, cuando estuvieron presentes, se relacionaron a un deterioro significativo en el estado lipoperoxidativo.

En ausencia de CLA, los hígados de los ratones alimentados con dietas conteniendo diferentes orígenes de grasa, si bien no mostraron alteraciones en el tamaño, ni en el contenido de lípidos, presentaron diferencias en parámetros indicadores de lipoperoxidación y en su histología. Los animales de los grupos M y C mostraron, frente al grupo O, un mayor grado de LPO hepática, en concordancia con los resultados de otros investigadores (Hurtado de Catalfo y col., 2013; Bello y col., 2006; Mazière y col., 1999). Debido a que los AGMI, junto con los AGS, a diferencia de los AGPI, no son sustratos preferenciales para la generación de especies reactivas al oxígeno, una disminución en el contenido de grasa poliinsaturada, explicaría la menor LPO presente en el grupo O (Hurtado de Catalfo y col., 2013). Asimismo, este efecto se asoció a una reducida actividad CAT en los grupos M y C, que no fue compensada por el incremento de los niveles de GSH. Una consideración a tener en cuenta, es que el aceite de oliva, además de ser rico en AGMI, posee compuestos polifenólicos que exhiben fuertes propiedades antioxidantes y que, por lo tanto, podrían contribuir al menor grado de LPO observado en este grupo (O'Dowd y col., 2004; Di Benedetto y col., 2007). Mientras que, los hígados de los animales de los grupos O y C exhibieron una histología compatible con un patrón normal, los hígados del grupo M mostraron ciertas alteraciones morfológicas, acompañadas de células apoptóticas, focos inflamatorios e infiltrado leucocitario. Estas observaciones están en concordancia con los trabajos de Baumgardner y col. (2008) y Ronis y col. (2013), quienes observaron que ratas alimentadas mediante nutrición enteral con aceite de maíz, presentaron, en una manera dosis-dependiente, un desarrollo progresivo de acumulación de lípidos hepáticos, infiltración de macrófagos, estrés oxidativo, acompañado de alteraciones en la expresión de marcadores inflamatorios, como el TNF- α . Los efectos inflamatorios en el grupo M, podrían estar asociados también, al incremento en el contenido de AL y AA presente en los lípidos hepáticos. El incremento en el contenido de dichos AG, favorece la producción de eicosanoides proinflamatorios, contribuyendo al desarrollo de esteatohepatitis (Bagga y col., 2003), y justificando de esta manera las diferencias observadas en nuestras experiencias con los animales alimentados con aceite de oliva y de canola.

La suplementación con Mix a las diferentes grasas dietarias, en nuestro modelo experimental, y en el de otros investigadores también con ratones (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; DeLany y col., 1999), produjo hepatomegalia y alteraciones hepáticas microanatómicas como tumefacción citoplasmática, microvacuolas lipídicas, células apoptóticas y proceso inflamatorio, las cuales son características de los hígados de

pacientes con enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) (Anderson y Borlak, 2008). No obstante, la magnitud de dichas alteraciones y los cambios en el estado lipoperoxidativo, dependieron de la fuente de grasa dietaria utilizada.

Así, pese a la exacerbada acumulación de TG hepáticos con presencia de microvacuolas lipídicas e infiltrado leucocitario en el grupo O+Mix, las manifestaciones producto de procesos inflamatorios, fueron menores que en aquellos animales que consumieron Mix suplementado a fuentes de AG más insaturados. Este efecto, pudo estar relacionado al menor contenido de AA y, por lo tanto, de sus derivados eicosanoides proinflamatorios. Así también, pudo asociarse a un cierto efecto protector observado por los CLA en el balance entre los sistemas prooxidantes/antioxidantes celulares del grupo O+Mix, debido al bajo grado de insaturación de los AG dietarios que son incorporados en el tejido, a la reducción en el contenido de AGPI y al incremento de los niveles de GSH. Estos resultados están en conformidad con los reportados por estudios previos de nuestro laboratorio (Andreoli y col., 2009) y de otros investigadores (Arab y col., 2006).

La suplementación con Mix en los animales alimentados con aceite de maíz, causó una acumulación de lípidos hepáticos sin desequilibrios en el estado lipoperoxidativo. No obstante, comparativamente con el grupo O+Mix, la menor presencia de microvacuolas lipídicas pudo estar relacionada a la reducida lipogénesis reflejada por las actividades de las enzimas FAS, EM y SCD-1. En este sentido, ha sido demostrado que otros AG de la familia n-6, como el GLA (Nakanishi y col., 2004) y el AA (Oikawa y col., 2009), previnieron la acumulación de TG hepáticos observada en ratones alimentados con mezcla equimolecular de CLA, a través de un incremento en los niveles de PGE₂ y, probablemente, de otros prostanooides. Si bien las relaciones de AA/AL y GLA/AL fueron reducidas por la adición de Mix, los niveles de todos estos AG de la familia n-6 están muy incrementados por las dietas con aceite de maíz, y podrían potenciar la formación de PGE₂ y de otros eicosanoides derivados del AA. Esto también se puede asociar al notable grado inflamatorio a nivel hepático que se observa en este grupo, ya que otros marcadores proinflamatorios que son inducidos por el AL (Ej: Tromboxano A₂, Leucotrieno B₄) (El-Badry y col., 2007) estarían presentes en cantidades importantes, y serían los causales de la exacerbación por los CLA, del grado de degeneración del hepatocito, tumefacción citoplasmática, apoptosis e inflamación observadas histológicamente.

En el grupo C+Mix se observó que, la ausencia de alteraciones en los niveles de TG hepáticos, fueron asociadas a un menor grado proinflamatorio tisular presente en los cortes histológicos. Estos resultados están en acuerdo con otros trabajos que emplearon diferentes

fuentes de AG de la familia n-3, como aceites de pescado (Ide, 2005), aceite de lino (Kelley y col., 2009) o DHA aislado (Yanagita y col., 2005; Fedor y col., 2012), observando prevención del hígado graso y menor daño hepático. En nuestros estudios este efecto protector de los AGPI n-3 no estuvo asociado a cambios en el estado lipoperoxidativo hepático, y podrían ser una consecuencia de la mayor producción de mediadores lipídicos antiinflamatorios derivados de los mismos (Bagga y col., 2003). Estos resultados no descartan que, los altos niveles de ácido oleico presente en el aceite canola, podrían también ser responsables del menor deterioro histológico hepático.

La suplementación con AR provocó menor grado de alteración histológica en el hígado que las observadas por la suplementación con Mix. Además, al igual que estos últimos, dependieron del origen de grasa dietaria. Así, los hígados de animales alimentados con dieta C+AR, presentaron estructuras histológicas más conservadas, mientras que los animales del grupo M+AR, fueron los que evidenciaron mayor tumefacción citoplasmática y proceso inflamatorio hepático. Este efecto puede ser debido, entre otros, a la ausencia de esteatosis hepática y al particular rol antiinflamatorio del isómero *c9,t11*-CLA. Específicamente, de Roos y col. (2005) en ratones, observaron que el isómero *c9,t11*-CLA, pero no el *t10,c12*-CLA, indujo un incremento en la expresión hepática de la proteína antiinflamatoria hsp 70 y una disminución en la expresión del factor inhibidor de la migración de macrófagos. Además, a pesar de que la LPO hepática solo fue reducida significativamente en el grupo M+AR, siempre se observó un efecto preventivo de la misma por la suplementación con AR. Este efecto protector sobre la LPO, podría estar relacionado al incremento en el contenido de GSH, que alcanzó niveles considerables en el grupo O+AR, el cual ha sido también observado por otros autores *in vitro* (Arab y col., 2006). Resultados semejantes, fueron obtenidos *in vivo* (Choi y col., 2007) en ratas alimentadas con una dieta alta en grasa (23% de grasa) suplementada con 1% de una mezcla rica en *c9,t11*-CLA, similar a la utilizada en nuestra experiencia, mostrando una reducción en la producción hepática de MDA y un incremento en los niveles de GSH, como en las actividades de enzimas antioxidantes mitocondriales. Todo este cuadro metabólico e histológico, tanto con la suplementación con Mix, como con AR, pareciera haber sido insuficiente para inducir un incremento en los niveles de las enzimas marcadoras de daño hepático: AST, ALT y FA.

Los notables efectos descriptos a nivel hepático de la grasa dietaria y la suplementación con CLA, al menos a nuestro conocimiento, no han sido reportados en

humanos. No obstante, estos efectos no se circunscriben únicamente al ratón. En este sentido, otros modelos animales, en función de diferentes variables han permitido reportar efectos deletéreos sobre el hígado. Así, por ejemplo Navarro y col. (2009), Macarulla y col. (2005), y Deckere y col. (1999) mostraron que hamsters alimentados con dietas suplementadas con mixCLA o *t10,c12*-CLA, desarrollaron hipertrofia de hígado en ausencia de esteatosis. Además de las diferencias observadas por las distintas especies animales, también se ha reportado una respuesta diferencial en función del estado fisiopatológico del animal (Andreoli y col., 2007; Kostogryz y col., 2010b; Wang y col., 2003).

4.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE EL TEJIDO ADIPOSO Y SU REGULACIÓN

Los profundos cambios observados en la retención de grasa corporal, tuvieron un correlato con alteraciones en los depósitos de grasas corporales. En este trabajo se escogió el tejido adiposo epididimal para el estudio de la movilización de grasa, dado que el mismo, representa uno de los mayores depósitos de tejido adiposo blanco en roedores, y que los mismos pueden ser modulados por los tratamientos dietarios. El tejido adiposo blanco, es ampliamente reconocido en la actualidad, no sólo como un tejido de depósito de energía, sino también, como un regulador clave de los mecanismos metabólicos homeostáticos del organismo (Wronska y Kmiec, 2012).

En ausencia de CLA, los animales del grupo C fueron los que exhibieron mayor depósito de grasa epididimal, y la suplementación con ambas fuentes de CLA disminuyó el peso del tejido adiposo epididimal independientemente de la grasa dietaria, siendo tal disminución más acentuada con el Mix.

4.1.- Contenido y retención de isómeros CLA en tejido adiposo epididimal

El contenido y retención de isómeros CLA depende principalmente de la captación de los mismos desde circulación y de sus velocidades relativas de metabolización, mostrando en el tejido adiposo epididimal de ratones alimentados con Mix, un mayor contenido de *c9,t11*-CLA que de *t10,c12*-CLA, así como fuera observado en el hígado. Los

niveles diferenciales de *c9,t11*-CLA y *t10,c12*-CLA en tejido adiposo epididimal, también han sido reportado por otros autores en tejido adiposo retroperitoneal de ratones (Kelley y col., 2006) y, tanto epididimal como retroperitoneal de ratas (Martins y col., 2010). Esto, podría estar relacionado a la mayor velocidad de oxidación del *t10,c12*-CLA que del *c9,t11*-CLA. Además, en la presente experiencia se observó que dichos niveles presentaron una dependencia con el origen de grasa dietaria cuando la suplementación fue con Mix, pero no con AR. Así, como se discutiera en hígado, ambos isómeros CLA mostraron menores niveles en el tejido adiposo epididimal en el grupo O+Mix versus M+Mix y C+Mix. Pese a que existen trabajos (Martins y col., 2010; Hargrave y col., 2004) donde el nivel de los isómeros en tejido adiposo varía según la grasa dietaria, los resultados no son concluyentes, y los autores no hacen ninguna interpretación de los posibles mecanismos involucrados. Así, no existen estudios específicos para contrastar los resultados obtenidos en el presente trabajo. No obstante, diferentes mecanismos a los propuestos en el hígado, es factible que estén presentes en el tejido adiposo, los cuales pueden estar relacionados a las distintas funciones específicas, y principalmente al diferente estado metabólico de los tejidos. En este sentido, mientras que bajo la suplementación con mixCLA en el hígado prevalecen mecanismos de acumulación de lípidos, en el tejido adiposo se encuentran exacerbados procesos de reducción de los mismos (Poirier y col., 2005).

4.2.- Peso del tejido adiposo epididimal

Como se discutiera anteriormente, los distintos orígenes de grasa dietaria y la suplementación con CLA, tuvieron un impacto diferencial sobre los depósitos de grasa corporal, asociados a cambios en el peso del tejido adiposo epididimal. Así, en animales alimentados con aceite de canola sin suplementación con CLA, se observó una inesperada expansión del tejido adiposo epididimal, la cual podría ser explicada por la activación de la lipogénesis mediada por los factores de transcripción SREBP-1c y PPAR- γ . Esta justificación ha sido reportada por Sealls y col. (2008) en ratones alimentados con dietas conteniendo altos niveles de ALN, pero no ha sido extensamente observada por otros investigadores.

Las variaciones más importantes en el tamaño del tejido adiposo epididimal, han sido encontradas por la suplementación con Mix. La exacerbada disminución del tejido adiposo epididimal producida por el Mix en nuestro modelo experimental con ratones,

estuvo en acuerdo con los resultados observados por otros autores en la misma especie (Parra y col., 2010; Hwang y Kang, 2007; West y col., 2000), y ha sido atribuida, principalmente, al isómero *t*10,*c*12-CLA (Park y col., 1999, Hargrave y col., 2002; Clément y col., 2002; Warren y col., 2003). Resultados disímiles han sido encontrados en tejidos adiposos de diferentes localizaciones. Específicamente, West y col. (2000) reportaron que, ratones AKR/J macho alimentados con 1% de la mezcla equimolecular de CLA, redujeron el peso de los tejidos adiposos inguinal, epididimal y retroperitoneal, mientras que los depósitos de grasa mesentérica no fueron afectados. Tsubuyama-Kasaoka y col. (2000), en ratones C57BL/6J hembra alimentados con la misma mezcla de CLA, y a niveles semejantes, observaron que el tejido adiposo parametrial, fue menos sensible a la acción del CLA que los otros tejidos adiposos blancos estudiados (renal, retroperitoneal, subcutáneo).

En cambio, si bien la suplementación con AR también produjo una reducción en el peso del tejido adiposo epididimal con los tres orígenes de grasa dietaria, la magnitud de dicho cambio fue significativamente menor que la observada en los animales alimentados con Mix. Estos resultados, están en acuerdo con los hallados por de Roos y col. (2005), quienes además observaron que dicho isómero también produjo una significativa reducción del peso del tejido adiposo marrón. Por otro lado, existen muchos reportes bibliográficos controversiales acerca de este efecto y los mecanismos bioquímicos implicados no son claros (Lopes y col., 2008; Hargrave y col., 2002; Warren y col., 2003; Clément y col., 2002). También con la suplementación con AR, una respuesta diferente ha sido observada en función de la localización del tejido adiposo. En este sentido, en ratas alimentadas con AR, se encontró un menor peso del tejido adiposo perirrenal, asociado con una disminución no significativa del tejido adiposo epididimal y un aumento del tejido adiposo marrón (Akahoshi y col., 2003).

4.3.- Captación de TG por el tejido adiposo epididimal

En el tejido adiposo, la LPL es considerada una enzima clave para la diferenciación de los adipocitos, como así también, juega un importante papel en la captación y almacenamiento de lípidos. La actividad de dicha enzima, en un tejido tan variable en su tamaño como es el tejido adiposo, puede tener diferente interpretación en función de su modo de expresión. Así, si el número de adipocitos permaneciera constante, y el mismo

sólo reduce o incrementa su tamaño por cambios en el contenido de lípidos, la actividad LPL, expresada por órgano total, no se debiera ver modificada. Así, tomando esta modalidad de expresión, claramente podemos ver que, tanto el tipo de grasa dietaria, como la suplementación con CLA, modificaron la captación de lípidos por el tejido adiposo epididimal.

En ausencia de suplementación con CLA, los animales alimentados con aceite de canola, mostraron una mayor capacidad de captar lípidos de circulación, que los animales alimentados tanto, con aceite de oliva, como con aceite de maíz. Esto, estuvo estrechamente relacionado, con la mayor expansión de dicho tejido discutida previamente, y en general con la mayor acreción de grasa corporal. En cambio, la suplementación con Mix, disminuyó la actividad LPL. Este efecto, también fue observado por numerosos investigadores, tanto en estudios en adipocitos aislados (Park y Pariza, 2001; Park y col., 1997), como en estudios *in vivo* (Andreoli y col., 2009; Xu y col., 2003); y en estudios *in vitro*, ha sido relacionado, al isómero *t10,c12*-CLA (Park y col., 1999; Lin y col., 2001b; Park y col., 2004). Además, el mismo efecto sobre la actividad LPL, ha sido observado en ratones alimentados con dietas hiperlipidémicas suplementadas con mixCLA (Andreoli y col., 2009), como también en hamsters alimentados con una dieta aterogénica suplementada con *t10,c12*-CLA (Zabala y col., 2006a). Estos cambios en las actividades enzimáticas fueron, a su vez, asociados a una reducción de la expresión de dicha enzima (Zabala y col., 2006a; Liu y col., 2007).

En los ratones alimentados con M+AR y C+AR, un efecto menos marcado, pero significativo, ha sido observado en la reducción de la actividad LPL, el cual se correlacionó con la reducción del peso de los tejidos epididimales. Escasa información bibliográfica existe respecto del efecto de la suplementación con *c9,t11*-CLA sobre la actividad LPL, y en general, la misma es contradictoria. Así por ejemplo, en paralelismo con los resultados hallados en el presente trabajo, Lin y col. (2001b) demostraron en adipocitos 3T3-L1, expuestos a *c9,t11*-CLA, una disminución en la actividad LPL, siendo esta inhibición menos efectiva que la observada por el isómero *t10,c12*-CLA. No obstante en contraposición, estudios *in vitro* (Park y col., 1999), como *in vivo* (Faulconnier y col., 2004), no han observado cambios en la actividad de dicha enzima por la suplementación con *c9,t11*-CLA.

Si bien, en la mayoría de los grupos, se demostró una muy buena correlación entre la actividad de la enzima LPL y los cambios en el tamaño del tejido adiposo epididimal, no podemos descartar la posibilidad de que otros mecanismos podrían estar presentes, dado

que además, en el grupo O+AR, esta reducción del tejido adiposo ocurrió acompañado de una normal actividad enzimática.

4.4.- Lipogénesis en tejido adiposo epididimal

Si bien, a diferencia del hígado, el tejido adiposo principalmente modula los depósitos de lípidos a través de la captación y liberación de AG, la actividad de enzimas lipogénicas puede ser un factor que también contribuya, en forma importante, en la capacidad de reserva en dicho tejido. Así, como se discutiera en el ítem anterior, las actividades de las enzimas lipogénicas expresadas por tejido total, reflejan la capacidad integral del tejido para sintetizar AG.

La capacidad lipogénica, medida a través de las enzimas FAS, EM y G6PDH en tejido adiposo epididimal, no fue modificada por el origen de grasa dietaria, pero mostró una importante influencia por la suplementación con AR. En los grupos suplementados con Mix, la actividad normal de las enzimas lipogénicas, no logró compensar la menor captación de AG, pudiendo entre otros mecanismos, conducir a la reducida masa epididimal. En cambio, los incrementos significativos de las enzimas FAS, EM y G6PDH por la suplementación con AR, pudieron haber compensado, al menos en parte, la reducida captación de AG generando una menor reducción de dicho tejido.

Estudios de la capacidad lipogénica del tejido adiposo, han arrojado resultados de los más diversos en función de la metodología empleada, de la forma de expresar las actividades enzimáticas y del tipo de tejido adiposo evaluado, entre otros factores. Así, por ejemplo, West y col. (2000) evaluando la biosíntesis de novo de AG en tejido adiposo total, pero no las actividades enzimáticas, mostraron que la mezcla equimolecular de CLA incrementó la capacidad de síntesis fraccional de TG. Estos mismos autores, cuando calcularon la síntesis absoluta de TG, no hallaron diferencias entre los ratones tratados con mixCLA y los controles, pese a una significativa reducción de la grasa corporal. Tsuboyama-Kasaoka y col. (2000) no encontraron cambios en la expresión de las enzimas FAS y ACC en tejido adiposo blanco de ratones alimentados con mixCLA, mientras que Kang y col. (2004) observaron que el *t10,c12*-CLA incrementó la expresión de la enzima FAS en el tejido adiposo epididimal. Faulconnier y col. (2004) mostraron que, en ratas adultas que no modificaron el peso del tejido adiposo, las actividades de las enzimas lipogénicas, expresadas por tejido adiposo total, fueron diferentes en función de la fuente

de CLA suplementada y del tejido adiposo analizado. En hamsters alimentados con dieta aterogénica suplementada con diferentes dosis de $t10,c12$ -CLA, Zabala y col. (2006a) observaron una disminución del peso del tejido adiposo epididimal, asociada a un aumento en las actividades de las enzimas FAS, EM, G6PDH y ACC (expresadas por gramo de dicho tejido), y a una disminución en la expresión de ACC, FAS, SREBP-1a y SREBP-1c.

Las vías de biosíntesis de AGMI tienen continuidad metabólica por la acción de las enzimas SCD que se presentan bajo dos isoformas en el tejido adiposo. La actividad de las mismas, evaluada como flujo de sustratos, puede ser reflejada por las relaciones 16:1/16:0 para la SCD-1 y 18:1/18:0 para la SCD-2 (Kim y Ntambi, 1999).

En ausencia de CLA, mientras que la relación 18:1/18:0 no se vio afectada por el origen de grasa dietaria, la relación 16:1/16:0 fue ligeramente mayor en los animales alimentados con aceite de oliva, que en aquellos con aceites de maíz o canola. Esta diferencia, podría estar dada, por la presencia de alto contenido de AL y ALN en las dietas M y C respectivamente, los cuales poseen un efecto represor de la actividad y expresión génica de la enzima SCD-1 en diversos tejidos, entre ellos el tejido adiposo (Ntambi, 1999; Jump y Clarke, 1994; Park y col., 2000).

La suplementación con AR y con Mix, causó diferentes cambios en el flujo de sustratos a través de la enzima SCD, los que han sido avalados en muchos trabajos, por modificaciones tanto en la actividad, como en la expresión de dicha enzima. Además, el efecto sobre la actividad y expresión de la enzima SCD-1, ha sido relacionado a las posiciones de los dobles enlaces $t10$ y $c12$ y, posiblemente, a la estructura conjugada (Lee y col., 1998; Park y col., 2000; Bretillon y col., 1999). En este sentido, Choi y col. (2000) en adipocitos 3T3-L1 incubados con $t10,c12$ -CLA, observaron una disminución en las relaciones 16:1/16:0 y 18:1/18:0, que atribuyeron a una reducción en la actividad SCD-1. En nuestras experiencias, la relación 16:1/16:0 disminuyó significativamente por el Mix, mientras que la relación 18:1/18:0, aumentó en los animales alimentados con aceite de oliva y canola suplementados con ambas fuentes de CLA. Ha sido postulado (Kim y Ntambi, 1999) que, en el adipocito, la enzima SCD-1 podría estar regulada para producir un alto flujo metabólico de biosíntesis de AG 16:1 para los depósitos de lípidos, mientras que la SCD-2 sería constitutivamente expresada para mantener el pool de 18:1 en los depósitos de lípidos y en las membranas celulares. Según esta teoría, nuestro efecto diferencial sobre las relaciones 16:1/16:0 y 18:1/18:0 en el tejido adiposo epididimal de los animales alimentados con Mix, podría ser explicado por un distintivo y selectivo impacto sobre las isoformas de la enzima SCD. Esta posible explicación de nuestros resultados, es

avalada por el trabajo de Kang y col. (2004), en el cual se observó que, ratones alimentados con ι 10, c 12-CLA, presentaban una disminución en la relación 16:1/16:0 y un incremento en la relación 18:1/18:0, sugiriendo que el incremento en esta última relación, es debido a una mayor expresión del gen de SCD-2. Incrementos en la expresión de SCD-2 por el ι 10, c 12-CLA, fueron también observados por otros autores, tanto *in vivo* (House y col., 2005), como *in vitro* (Choi y col., 2000). No obstante, en los tejidos adiposos epididimales de animales alimentados con aceite de maíz suplementados, tanto con Mix, como con AR, se observó un comportamiento diferente en la relación 18:1/18:0. De acuerdo a resultados de diversos autores (Tebbey y Buttke, 1992; Jones y col., 1996; Sessler y col., 1996), la ausencia de cambios por la suplementación con ambas fuentes de CLA en estos grupos, podría estar relacionada al efecto inhibitorio que poseen los AGPI, y en especial los AGPI n-6, sobre la expresión de las isoformas SCD-1 y SCD-2. Pese a que en la bibliografía no hay datos que demuestren el efecto del AR sobre la actividad y/o expresión de la enzima SCD-2, nuestros resultados indicarían que podría estar implicada una acción semejante a la ejercida por el Mix. Estos datos, de un reducido flujo de sustratos a través de la enzima SCD-1 inducido por el Mix, en conjunción a un menor contenido de ácido mirístico (14:0), el cual ha sido también observado por Hargrave-Barnes y col. (2008), estarían indicando una menor síntesis de novo de AG en el tejido adiposo epididimal.

Esta reducción en la capacidad lipogénica inducida por ambos CLA, ha sido también correlacionado con la inhibición de la producción de AG adipogénicos, tales como el AL y AA. Resultados semejantes, han sido observados en tejido adiposo retroperitoneal de ratones alimentados con 0,5% de mixCLA (Hargrave y col., 2004), y en tejido adiposo epididimal y mesentérico de ratones alimentados con 1% de ι 10, c 12-CLA (House y col., 2005). En general, hay muy pocos reportes bibliográficos que analizan el efecto del AR sobre el perfil de AG en tejido adiposo; no obstante, al igual que con el Mix, el efecto reductor observado en nuestras experiencias sobre los niveles de AG adipogénicos, podría también contribuir a la comprensión de la disminución del tejido adiposo epididimal observada en dichos animales. Así, esta reducción en el contenido de AG adipogénicos, puede disminuir la esterificación a TG, como también la conversión en fosfolípidos críticos para el metabolismo celular, y/o la síntesis de segundos mensajeros lipídicos, tales como prostaglandina J₂. Cabe destacar que, esta prostaglandina, como sus derivados, pueden regular la adipogénesis a través de su acción como ligando activador del PPAR- γ (Reginato y col., 1998).

Además de los mecanismos inductores de la reducción de depósitos grasos recientemente descritos, otros autores han observado que los CLA tienen la capacidad de disminuir el tejido adiposo por incremento del gasto energético, debido a una mayor expresión de UCP2, aumento de la oxidación de AG por un incremento en la actividad de la enzima CPT-I, incremento de la lipólisis, inhibición de los procesos de proliferación y diferenciación de preadipocitos, y aumento de la apoptosis (Kennedy y col., 2010). La complejidad de estos mecanismos que regulan los depósitos grasos, podrían estar relacionados, a su vez, a un incremento del TNF- α , y a una reducción en la expresión de PPAR- γ y SREBP-1c, y han sido mayoritariamente descritas en ratones para el isómero *t*10,*c*12-CLA como un "síndrome lipoatrófico" (Poirier y col., 2005).

En términos generales, los efectos de los CLA sobre el tejido adiposo humano, han mostrado resultados menos consistentes. Existen estudios que observaron efectos antiobesogénicos (Riserus y col., 2001; Nakamura y col., 2008; Blankson y col., 2000), no obstante muchos otros no encontraron la misma acción (Zambell y col., 2000; Petridou y col., 2003). Estas diferencias son atribuidas a diferentes diseños experimentales, incluyendo las variables: 1) tipo de isómero CLA, 2) dosis y duración de tratamiento y 3) género, peso, edad y estado metabólico de los sujetos estudiados. No obstante, en cultivos de adipocitos y pre-adipocitos humanos, fueron reproducidos ciertos mecanismos observados en modelos animales (Brown y col., 2003; Kennedy y col., 2008).

5.- EFECTO DEL ORIGEN DE GRASA DIETARIA Y DE LA FUENTE DE ISÓMERO CLA SOBRE LOS NIVELES DE TRIGLICÉRIDOS EN EL MÚSCULO GASTROCNEMIO Y SU REGULACIÓN

Las alteraciones inducidas metabólicamente en los ratones por los CLA, los cuales mostraron una dependencia con el origen de grasa dietaria, podrían conducir a alteraciones en el contenido muscular de TG y en su modulación. En este sentido, hay disponibles muy escasos estudios en la bibliografía que investiguen el efecto de los CLA, y ninguno a nuestro conocimiento, presenta la comparación de ambos tipos de isómeros bajo diferentes fuentes de grasa. Las grasas dietarias poliinsaturadas (M y C vs O) sin suplementación con CLA, mostraron una mayor capacidad de β -oxidación mitocondrial, expresada por la actividad CPT, sin alcanzar a afectar los niveles de TG tisulares. Este efecto, como se

discutiera anteriormente en el hígado, podría estar relacionado con la mayor capacidad oxidativa inducida por los AGPI.

Cambios más significativos han sido producidos por los isómeros CLA. En este sentido, los niveles de TG musculares, se redujeron por la suplementación con Mix y estuvieron asociados a una mayor capacidad de oxidación, y no a una menor captación por la LPL muscular. Resultados semejantes sobre los niveles de TG musculares inducidos por la alimentación con mixCLA o con *t10,c12*-CLA, han sido observados en modelos animales de dislipidemia (Andreoli y col., 2009; Zabala y col., 2006b) y en ratas obesas Zucker (Henriksen y col., 2003). En el caso de los animales dislipémicos, los efectos fueron, a su vez, vinculados a una disminución de la actividad de la enzima LPL, junto con un posible incremento en la β -oxidación muscular. Al igual que nuestros resultados, diferentes autores han observado un incremento en la actividad de la enzima oxidativa CPT-Ib en el músculo esquelético de ratones (Park y col., 1997; Kim y col., 2012), ratas (Rahman y col., 2001) y hamsters (Zabala y col., 2006b) alimentados con mixCLA o con *t10,c12*-CLA. Este efecto estimulador de la actividad CPT-Ib muscular, podría estar mediado por la activación del PPAR- α , y por otros mecanismos adicionales que estimulen la actividad de dicha enzima. Esto último, es justificado por los resultados de Peters y col. (2001), quienes en un modelo experimental de ratones deplecionados en el gen del PPAR- α , hallaron que la expresión de la enzima CPT-I fue estimulada por el mixCLA en músculo esquelético.

Un efecto muy diferente ha sido observado con el AR y fue dependiente del origen de grasa dietaria. Así, la suplementación con AR, aumentó los depósitos de TG musculares en los grupos M+AR y C+AR, pero no en O+AR, y este aumento de grasa estuvo correlacionado con una elevada actividad LPL muscular, sin cambios en la actividad de la enzima CPT-Ib. Al menos a nuestro conocimiento, no existen trabajos que muestren el efecto diferencial del *c9,t11*-CLA sobre la actividad LPL muscular con diferentes grasas dietarias. Por el contrario, respecto a la enzima CPT-Ib, Kim y col. (2012) no observaron cambios en la expresión de dicha enzima en músculo esquelético de ratones alimentados con *c9,t11*-CLA y sometidos a su vez a ejercicio físico. Estos escasos datos bibliográficos sobre los efectos del *c9,t11*-CLA en la regulación de los TG en músculo esquelético, contrastan con los discutidos anteriormente por el *t10,c12*-CLA (Zabala y col., 2006b; Kim y col., 2012). No obstante, se necesitan más estudios sobre la comparación entre la suplementación con *c9,t11*-CLA o mixCLA a diferentes grasas dietarias, para clarificar los

mecanismos biológicos de acción de estos isómeros sobre la regulación de los TG musculares.

Figura 67. Esquema representativo de los cambios metabólicos producidos por la suplementación con Mix a las distintas grasas dietarias

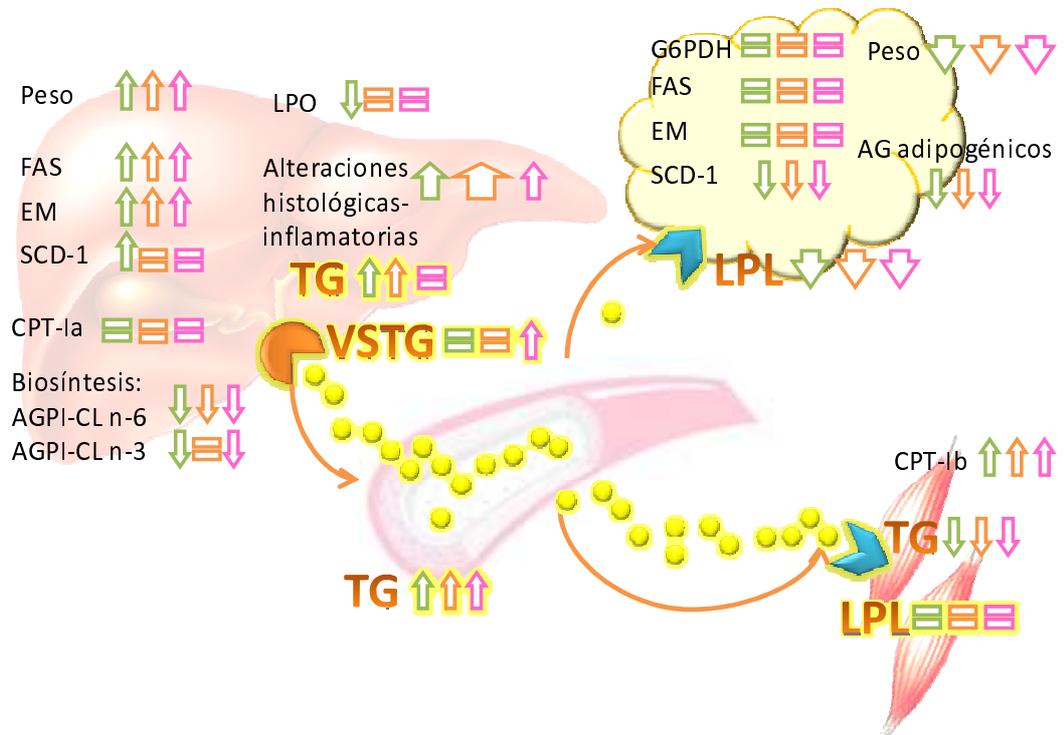
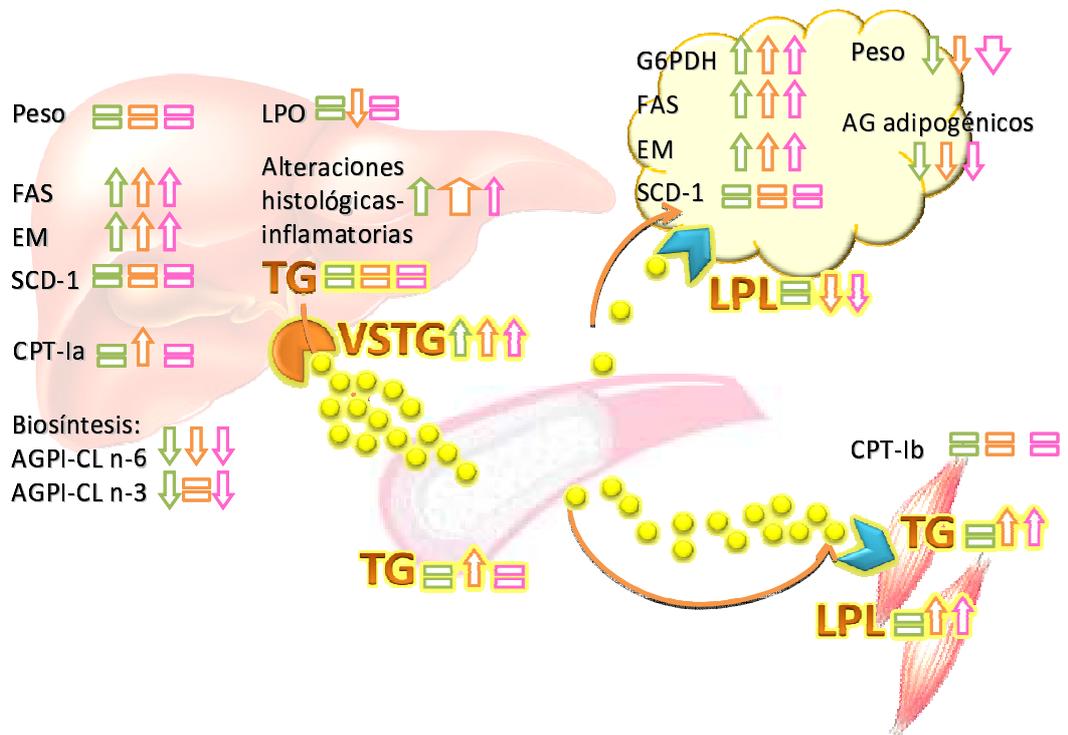


Figura 68. Esquema representativo de los cambios metabólicos producidos por la suplementación con AR a las distintas grasas dietarias



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente estudio observamos que los distintos CLA se incorporan en los lípidos circulantes y tisulares. En función de los niveles alcanzados, tipo de acción e interacción con el metabolismo de otros AG, éstos ejercieron diferentes efectos. En las presentes experiencias, la retención de *c*9,*t*11-CLA ha sido siempre superior que la del *t*10,*c*12-CLA, no obstante, este último es el que posee mayor acción antiobesogénica, como también deletérea.

Los resultados más relevantes del presente trabajo se resumen mayoritariamente en las Figuras 67 y 68. La Figura 67 muestra, en términos generales que, ratones alimentados con Mix, presentaron alteraciones características del síndrome lipoatrófico, como profunda disminución de la adiposidad, asociado a esteatosis hepática y hepatomegalia. La reducción de la masa grasa, estuvo asociada a una baja captación de AG por el tejido adiposo, a bajos niveles de AG adipogénicos y a una reducción en la capacidad lipogénica expresada por el flujo de sustratos a través de la enzima SCD-1, pero no por otras enzimas claves, como la FAS, EM y G6PDH. Este efecto, fue paralelo a una disminución en el contenido de TG musculares, debido a una elevada β -oxidación mitocondrial. Los cambios mencionados, fueron acompañados de hipertrigliceridemia y otras modificaciones en el metabolismo de lípidos tisulares, los cuales fueron modulados por el origen de grasa dietaria. Los mecanismos involucrados en el incremento de los triglicéridos circulantes, estuvieron asociados a una actividad reducida de la LPL en tejido adiposo, que en el caso de los animales alimentados C+Mix, estuvo además relacionado, con una mayor secreción de TG hepática. La mayor liberación de lípidos hepáticos tuvo un efecto beneficioso compensando la elevada lipogénesis, y así en este grupo, previno la acumulación de lípidos en el hígado. No obstante, la mayor lipogénesis en todos los animales suplementados con Mix, junto con desequilibrios en la biosíntesis de AGPI-CL de las familias n-6 y n-3, condujeron a un cuadro inflamatorio hepático que fue más acentuado en los animales alimentados con aceite de maíz, y atenuado en aquellos con aceite de canola.

Un cuadro metabólico muy diferente estuvo presente en los animales suplementados con aceite rico en ácido ruménico (Figura 68), los cuales manifestaron efectos antiobesogénicos más atenuados, pero sin la esteatosis y hepatomegalia característica del síndrome lipoatrófico observada por la suplementación con Mix. Estos efectos que pueden tener una alta implicancia en la prevención de la obesidad, estuvieron presentes a pesar de una mayor lipogénesis en hígado y tejido adiposo epididimal, como de

ciertas alteraciones histológicas en hígado. La mayor lipogénesis hepática fue compensada por una elevada secreción de TG que evitó la acumulación de lípidos. Esta mayor secreción de TG a circulación, fue contrarrestada en el grupo C+AR, por una mayor remoción de TG por acción de la enzima LPL muscular, conduciendo a una normotrigliceridemia; mientras que, en el grupo M+AR, la clarificación plasmática, no fue suficiente para compensar el incremento en los triglicéridos circulantes. Así, en los animales alimentados con aceite de maíz, se observaron los menores efectos benéficos por la suplementación con AR, dado que además, estuvo presente un significativo estado inflamatorio hepático con alteraciones histológicas. Finalmente, si bien en el grupo C+AR se observaron efectos antiobesogénicos mayores que con los otros orígenes de grasa dietaria, los animales alimentados con O+AR, mostraron que la acción preventiva de la acumulación de grasa, estuvo asociada a niveles normales de TG en suero, hígado y músculo esquelético.

Finalmente:

- ✓ La mezcla comercial de CLA, conduce a una notoria reducción de grasa corporal, asociado a profundas alteraciones metabólicas.
- ✓ El aceite rico en ácido ruménico, posee una menor acción antiobesogénica que el Mix; no obstante, presenta otras propiedades funcionales y escasos efectos negativos.
- ✓ Los mejores efectos funcionales de los CLA, con menor grado de disturbios metabólicos, se observaron en los animales alimentados con aceite de oliva suplementados con AR.

A pesar que, los resultados experimentales en modelos animales no pueden extrapolarse directamente a los seres humanos, el conocimiento de los mecanismos implicados en los efectos benéficos y/o deletéreos de la suplementación con una mezcla de CLA comerciales o enriquecida en ácido ruménico a aceites comestibles de uso habitual conteniendo diferentes proporciones de AGI, podría ser de gran utilidad para el desarrollo de alimentos funcionales o estrategias dietarias, eficaces para el tratamiento o prevención de patologías como la obesidad y ECNT en general.

BIBLIOGRAFÍA

BILIOGRAFÍA

- Abell, L.L.; Levy, B.B.; Brodie, B.B. y Kendall, F.E. (1952) *A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity*. The Journal of Biological Chemistry. 195: 357-366.
- Adkins, Y.; Schie, I.W.; Fedor, D.; Reddy, A.; Nguyen, S.; Zhou, P.; Kelley, D.S. y Wu, J. (2013) *A novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis with significant insulin resistance*. Lab Invest. 93: 1313-1322.
- Aebi, H. (1984) *Catalase in vitro*. Methods Enzymol. 105: 121-126.
- Akahoshi, A.; Koba, K.; Ohkura-Kaku, S.; kaneda, N.; Goto, C.; Sano, H.; Iwata, T.; Yamauchi, Y.; Tsutsumi, K. y Sugano, M. (2003) *Metabolic effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rats*. Nutrition Research. 23: 1691-1701.
- Albers, R.; van der Wielen, R.P.; Brink, E.J.; Hendriks, H.F.; Dorovska-Taran, V.N. y Mohede, I.C. (2003) *Effects of cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) isomers on immune function in healthy men*. Eur J Clin Nutr. 57: 595-603.
- Anadon, A.; Martinez-Larranaga, M.R.; Martinez, M.A.; Ares, I.; Ramos, E.; Gomez-Cortes, P.; Juarez, M. y De la Fuente, M.A. *Acute oral safety study of dairy fat rich in trans-10 C18:1 versus vaccenic plus conjugated linoleic acid in rats*. Food Chem Toxicol. 48: 591-598.
- Anderson, N. y Borlak, J. (2008) *Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis*. Pharmacol Rev. 60: 311-357.
- Andreoli, M.F.; Scalerandi, M.V.; Borel, I.M. y Bernal, C.A. (2007) *Effects of CLA at different dietary fat levels on the nutritional status of rats during protein repletion*. Nutrition. 23: 827-835.

Andreoli, M.F.; Gonzalez, M.A.; Martinelli, M.I.; Mocchiutti, N.O. y Bernal, C.A. (2009) *Effects of dietary conjugated linoleic acid at high-fat levels on triacylglycerol regulation in mice*. Nutrition. 25: 445-452.

Andreoli, M.F.; Illesca, P.G.; González, M.A. y Bernal, C.A. (2010) *Conjugated linoleic acid reduces hepatic steatosis and restores liver triacylglycerol secretion and the fatty acid profile during protein repletion in rats*. Lipids. 45: 1035-1045.

Appel, L.J.; Sacks, F.M.; Carey, V.J.; Obarzanek, E.; Swain, J.F.; Miller, E.R., 3rd; Conlin, P.R.; Erlinger, T.P.; Rosner, B.A.; Laranjo, N.M.; Charleston, J.; McCarron, P. y Bishop, L.M. (2005) *Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial*. JAMA. 294: 2455-2464.

Arab, K.; Rossary, A.; Soulere, L. y Steghens, J.P. (2006) *Conjugated linoleic acid, unlike other unsaturated fatty acids, strongly induces glutathione synthesis without any lipoperoxidation*. Br J Nutr. 96: 811-819.

Aranceta, J. y Perez-Rodrigo, C. (2012) *Recommended dietary reference intakes, nutritional goals and dietary guidelines for fat and fatty acids: a systematic review*. Br J Nutr. 107 Suppl 2: S8-22.

Aro, A.; Mannisto, S.; Salminen, I.; Ovaskainen, M.L.; Kataja, V. y Uusitupa, M. (2000) *Inverse association between dietary and serum conjugated linoleic acid and risk of breast cancer in postmenopausal women*. Nutr Cancer. 38: 151-157.

Attie, A.D.; Krauss, R.M.; Gray-Keller, M.P.; Brownlie, A.; Miyazaki, M.; Kastelein, J.J.; Lusis, A.J.; Stalenhoef, A.F.; Stoehr, J.P.; Hayden, M.R. y Ntambi, J.M. (2002) *Relationship between stearoyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia*. J Lipid Res. 43: 1899-1907.

Baddini Feitoza A.; Fernandes Pereira A.; Ferreira da Costa N. y B., G.R. (2009) *Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile*. Nutr Hosp. 24: 422-428.

Bagga, D.; Wang, L.; Farias-Eisner, R.; Glaspy, J.A. y Reddy, S.T. (2003) *Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 1751-1756.

Banni, S.; Carta, G.; Angioni, E.; Murru, E.; Scanu, P.; Melis, M.P.; Bauman, D.E.; Fischer, S.M. y Ip, C. (2001) *Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver*. J Lipid Res. 42: 1056-1061.

Banni, S.; Petroni, A.; Blasevich, M.; Carta, G.; Cordeddu, L.; Murru, E.; Melis, M.P.; Mahon, A. y Belury, M.A. (2004a) *Conjugated linoleic acids (CLA) as precursors of a distinct family of PUFA*. Lipids. 39: 1143-1146.

Banni, S.; Petroni, A.; Blasevich, M.; Carta, G.; Angioni, E.; Murru, E.; Day, B.W.; Melis, M.P.; Spada, S. y Ip, C. (2004b) *Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites*. Biochim Biophys Acta. 1682: 120-127.

Baumgardner January N., S.K., Hennings Leah , Badger Thomas M., y J., a.R.M.J. (2008) *A new model for nonalcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 294: G27-G38.

Bell, R.R.; Spencer, M.J. y Sherriff, J.L. (1995) *Diet-induced obesity in mice can be treated without energy restriction using exercise and/or a low fat diet*. J Nutr. 125: 2356-2363.

Bello, R.I.; Gomez-Diaz, C.; Buron, M.I.; Navas, P. y Villalba, J.M. (2006) *Differential regulation of hepatic apoptotic pathways by dietary olive and sunflower oils in the aging rat*. Exp Gerontol. 41: 1174-1184.

Belury, M.A. y Kempa-Steczko, A. (1997) *Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice*. Lipids. 32: 199-204.

Belury, M.A.; Moya-Camarena, S.Y.; Lu, M.; Shi, L.; Leesnitzer, L.M. y Blanchard, S.G. (2002) *Conjugated linoleic acid is an activator and ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma)*. Nutrition Research. (22): 817-824.

Benatti, P.; Peluso, G.; Nicolai, R. y Calvani, M. (2004) *Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties*. J Am Coll Nutr. 23: 281-302.

Beresford, S.A.; Johnson, K.C.; Ritenbaugh, C.; Lasser, N.L.; Snetselaar, L.G.; Black, H.R.; Anderson, G.L.; Assaf, A.R.; Bassford, T.; Bowen, D.; Brunner, R.L.; Brzyski, R.G.; Caan, B.; Chlebowski, R.T.; Gass, M.; Harrigan, R.C.; Hays, J.; Heber, D.; Heiss, G.; Hendrix, S.L.; Howard, B.V.; Hsia, J.; Hubbell, F.A.; Jackson, R.D.; Kotchen, J.M.; Kuller, L.H.; LaCroix, A.Z.; Lane, D.S.; Langer, R.D.; Lewis, C.E.; Manson, J.E.; Margolis, K.L.; Mossavar-Rahmani, Y.; Ockene, J.K.; Parker, L.M.; Perri, M.G.; Phillips, L.; Prentice, R.L.; Robbins, J.; Rossouw, J.E.; Sarto, G.E.; Stefanick, M.L.; Van Horn, L.; Vitolins, M.Z.; Wactawski-Wende, J.; Wallace, R.B. y Whitlock, E. (2006) *Low-fat dietary pattern and risk of colorectal cancer: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial*. JAMA. 295: 643-654.

Bernal, C.A.; Basilico, M.Z.; Gutman, R. y Lombardo, Y.B. (1989) *Secretion and removal rates of very low density lipoprotein triglycerides at three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet*. Nutrition Reports International. 46: 71-83.

Bernas, A.; Kumar, N.; Maki-Arvela, P.; Kul'kova, N.V.; Holmbom, B.; Salmi, T. y Murzin, D.Y. (2003) *Isomerization of linoleic acid over supported metal catalysis*. Appl. Catalysis A-General. 245: 257-275.

Bhattacharya, A.; Banu, J.; Rahman, M.; Causey, J. y Fernandes, G. (2006) *Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease*. J Nutr Biochem. 17: 789-810.

Bialek, A.; Tokarz, A.; Dudek, A.; Kazimierska, W. y Bielecki, W. (2010) *Influence of diet enriched with conjugated linoleic acids on their distribution in tissues of rats with DMBA induced tumors*. Lipids Health Dis. 9: 126.

Bieber, L.L.; Abraham, T. y Helmrath, T. (1972) *A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase*. Anal Biochem. 50: 509-518.

Binukumar, B. y Mathew, A. (2005) *Dietary fat and risk of breast cancer*. World J Surg Oncol. 3: 45.

Blankson, H.; Stakkestad, J.A.; Fagertun, H.; Thom, E.; Wadstein, J. y Gudmundsen, O. (2000) *Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans*. J Nutr. 130: 2943-2948.

Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959) *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol. 37: 911-917.

Bogani, P.; Galli, C.; Villa, M. y Visioli, F. (2007) *Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil*. Atherosclerosis 190: 181-186.

Bray, G.A.; Paeratakul, S. y Popkin, B.M. (2004) *Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies*. Physiol Behav. 83: 549-555.

Bretillon, L.; Chardigny, J.M.; Gregoire, S.; Berdeaux, O. y Sebedio, J.L. (1999) *Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro*. Lipids. 34: 965-969.

Brown, J.M.; Boysen, M.S.; Jensen, S.S.; Morrison, R.F.; Storkson, J.; Lea-Currie, R.; Pariza, M.; Mandrup, S. y McIntosh, M.K. (2003) *Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes*. J Lipid Res. 44: 1287-1300.

Burdge, G.C.; Finnegan, Y.E.; Minihane, A.M.; Williams, C.M. y Wootton, S.A. (2003) *Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [13C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men*. Br J Nutr. 90: 311-321.

Butz, D.E.; Li, G. y Cook, M.E. (2006) *t10,c12 Conjugated linoleic acid induces compensatory growth after immune challenge*. J Nutr Biochem. 17: 735-741.

Canolty, N.L. y Koong, L.J. (1976) *Utilization of energy for maintenance and for fat and lean gains by mice selected for rapid postweaning growth rate*. J Nutr. 106: 1202-1208.

Cañete, R.; Gil-Campos, M.; Aguilera, C.M. y Gil, A. (2007) *Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child*. Eur J Nutr. 46: 181-187.

Carlsson, L.; Linden, D.; Jalouli, M. y Oscarsson, J. (2001) *Effects of fatty acids and growth hormone on liver fatty acid binding protein and PPARalpha in rat liver*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 281: E772-E781.

Ceriello A. y Motz E. (2004) *Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited*. Arterioscler. Thromb Vasc Biol. 24: 816-823.

Changhua, L.; Jindong, Y.; Defa, L.; Lidan, Z.; Shiyan, Q. y Jianjun, X. (2005) *Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide*. J Nutr. 135: 239-244.

Chen P. S., T.T.Y., and Warner H. (1956) *Microdetermination of Phosphorus*. Analytical Chemistry. 28: 1756-1758.

Chin, S.F.; Liu, W.; Storkson, J.M.; Ha, Y.L. y Pariza, M.W. (1992) *Dietary Sources of Conjugated Dienoic Isomers of Linoleic Acid, a Newly Recognized Class of Anticarcinogens*. J Food Comp Anal. 5: 185-197.

Choi, Y.; Kim, Y.C.; Han, Y.B.; Park, Y.; Pariza, M.W. y Ntambi, J.M. (2000) *The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes*. J Nutr. 130: 1920-1924.

Choi, Y.; Park, Y.; Pariza, M.W. y Ntambi, J.M. (2001) *Regulation of stearyl-CoA desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells*. Biochem Biophys Res Commun. 284: 689-693.

Choi, J.S.; Koh, I.U.; Jung, M.H. y Song, J. (2007) *Effects of three different conjugated linoleic acid preparations on insulin signalling, fat oxidation and mitochondrial function in rats fed a high-fat diet*. Br J Nutr. 98: 264-275.

Chung, S.; Brown, J.M.; Sandberg, M.B. y McIntosh, M. (2005) *Trans-10,cis-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signaling*. J Lipid Res. 46: 885-895.

Clément, L.; Poirier, H.; Niot, I.; Bocher, V.; Guerre-Millo, M.; Krief, S.; Staels, B. y Besnard, P. (2002) *Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse*. J Lipid Res. 43: 1400-1409.

Cohen, L.A.; Zhao, Z.; Pittman, B. y Scimeca, J. (2003) *Effect of soy protein isolate and conjugated linoleic acid on the growth of Dunning R-3327-AT-1 rat prostate tumors*. Prostate. 54: 169-180.

Comba, A.; Maestri, D.M.; Berra, M.A.; Garcia, C.P.; Das, U.N.; Eynard, A.R. y Pasqualini, M.E. (2010) *Effect of omega-3 and omega-9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model*. Lipids Health Dis. 9: 112.

de Deckere, E.A.; van Amelsvoort, J.M.; McNeill, G.P. y Jones, P. (1999) *Effects of conjugated linoleic acid (CLA) isomers on lipid levels and peroxisome proliferation in the hamster*. Br J Nutr. 82: 309-317.

de Roos B.; Rucklidge, G.; Reid, M.; Ross, K.; Duncan, G.; Navarro, M.A.; Arbones-Mainar, J.M.; Guzman-Garcia, M.A.; Osada, J.; Browne, J.; Loscher, C.E.; y Roche H.M. (2005) *Divergent mechanisms of cis9, trans11- and trans10, cis12-conjugated linoleic acid affecting insulin resistance and inflammation in apolipoprotein E knockout mice: a proteomics approach*. FASEB J. 12:1746-1758.

Decsi, T. y Koletzko, B. (2005) *N-3 fatty acids and pregnancy outcomes*. Curr Opin Clin Nutr Metab. Care. 8: 161-166.

Degirolamo, C. y Rudel, L.L. (2010) *Dietary monounsaturated fatty acids appear not to provide cardioprotection*. *Curr Atheroscler Rep*. 12: 391-396.

Degrace, P.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Chardigny, J.M.; Sébédio, J.L. y Clouet, P. (2003) *Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypotriglyceridaemia in C57BL/6j mice fed trans-10,cis-12-linoleic acid*. *FEBS Lett*. 546: 335-339.

Degrace, P.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Chardigny, J.M.; Sebedio, J.L. y Clouet, P. (2004) *Hepatic steatosis is not due to impaired fatty acid oxidation capacities in C57BL/6J mice fed the conjugated trans-10,cis-12-isomer of linoleic acid*. *J Nutr*. 134: 861-867.

Del Prado, M.; Hernandez-Montes, H. y Villalpando, S. (1994) *Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase*. *Arch Med Res*. 25: 331-335.

DeLany, J.P.; Blohm, F.; Truett, A.A.; Scimeca, J.A. y West, D.B. (1999) *Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake*. *Am J Physiol*. 276: R1172-R1179.

DeLany, J.P. y West, D.B. (2000) *Changes in body composition with conjugated linoleic acid*. *J Am Coll Nutr*. 19: 487S-493S.

Devore, E.E.; Stampfer, M.J.; Breteler, M.M.; Rosner, B.; Kang, J.H.; Okereke, O.; Hu, F.B. y Grodstein, F. (2009) *Dietary fat intake and cognitive decline in women with type 2 diabetes*. *Diabetes Care*. 32: 635-640.

Di Benedetto, R.; Vari, R.; Scazzocchio, B.; Filesi, C.; Santangelo, C.; Giovannini, C.; Matarrese, P.; D'Archivio, M. y Masella, R. (2007) *Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defences in spite of its weak antioxidative effectiveness*. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 17: 535-545.

Diekman, C.; Elmadfa, I.; Koletzko, B.; Puska, P.; Uauy, R. y Zevenbergen, H. (2009) *Summary statement of the International Expert Meeting: health significance of fat quality of the diet. Barcelona, Spain, February 1-2, 2009*. *Ann Nutr Metab*. 54 Suppl 1: 39-40.

Dulloo, A.G. y Girardier, L. (1992) *Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse*. Metabolism. 41: 1336-1342.

Eckel, R.H. (2005) *Obesity*. Circulation. 111: e257-259.

Eder, K.; Slomma, N. y Becker, K. (2002) *Trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid suppresses the desaturation of linoleic and alpha-linolenic acids in HepG2 cells*. J Nutr. 132: 1115-1121.

El-Badry, A.M.; Graf, R. y Clavien, P.A. (2007) *Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver?*. J Hepatol. 47: 718-725.

Ellman, G. y Lysko, H. (1979) *A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups*. Anal Biochem. 93: 98-102.

Eyjolfson, V.; Spriet, L.L. y Dyck, D.J. (2004) *Conjugated linoleic acid improves insulin sensitivity in young, sedentary humans*. Med Sci Sports Exerc. 36: 814-820.

Eynard, A.R. y Lopez, C.B. (2003) *Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer*. Lipids Health Dis. 2: 6.

Faulconnier, Y.; Arnal, M.A.; Patureau Mirand, P.; Chardigny, J.M. y Chilliard, Y. (2004) *Isomers of conjugated linoleic acid decrease plasma lipids and stimulate adipose tissue lipogenesis without changing adipose weight in post-prandial adult sedentary or trained Wistar rat*. J Nutr Biochem. 15: 741-748.

Fedor, D.M.; Adkins, Y.; Mackey, B.E. y Kelley, D.S. (2012) *Docosahexaenoic acid prevents trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice by altering expression of hepatic genes regulating fatty acid synthesis and oxidation*. Metab Syndr Relat Disord. 10: 175-180.

Fernández-Quintela, A.; Rodríguez, V.M. y Portillo, M.P. (2004) *Ácido linoleico conjugado y grasa corporal*. Rev Esp Obes. 2: 71-79.

Ferramosca, A.; Savy, V.; Conte, L.; Colombo, S.; Einerhand, A.W. y Zara, V. (2006) *Conjugated linoleic acid and hepatic lipogenesis in mouse: role of the mitochondrial citrate carrier*. J Lipid Res. 47: 1994-2003.

Ferramosca, A.; Savy, V. y Zara, V. (2008) *Olive oil increases the hepatic triacylglycerol content in mice by a distinct influence on the synthesis and oxidation of fatty acids*. Biosci Biotechnol Biochem. 72: 62-69.

Field, A.E.; Willett, W.C.; Lissner, L. y Colditz, G.A. (2007) *Dietary fat and weight gain among women in the Nurses' Health Study*. Obesity (Silver Spring). 15: 967-976.

Folch, J.; Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957) *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem. 226: 497-509.

Gagliostro, G.A. (2005) *CONTROL NUTRICIONAL DEL CONTENIDO DE ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) EN LECHE Y SU PRESENCIA EN ALIMENTOS NATURALES FUNCIONALES. 3. Producción de leche alto CLA a través de la suplementación estratégica de la cabra*. REV. ARG. PROD. ANIM. 24: 165-185.

Gagliostro, G.A. y Schroeder, G.F. (2007) *Efectos de la suplementación con sales cálcicas de ácidos grasos insaturados sobre la digestión ruminal en vacas lecheras en pastoreo*. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 15: 92-103.

García del Moral, R. (1993) *Laboratorio de anatomía patológica*. McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, España, p. 1-654.

Gardner, C.D.; Kiazand, A.; Alhassan, S.; Kim, S.; Stafford, R.S.; Balise, R.R.; Kraemer, H.C. y King, A.C. (2007) *Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A TO Z Weight Loss Study: a randomized trial*. JAMA. 297: 969-977.

Gaullier, J.M.; Halse, J.; Hoye, K.; Kristiansen, K.; Fagertun, H.; Vik, H. y Gudmundsen, O. (2004) *Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans*. Am J Clin Nutr. 79: 1118-1125.

Gaullier, J.M.; Halse, J.; Hoye, K.; Kristiansen, K.; Fagertun, H.; Vik, H. y Gudmundsen, O. (2005) *Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans*. J Nutr. 135: 778-784.

Gavino, V.C.; Gavino, G.; Leblanc, M.J. y Tuchweber, B. (2000) *An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters*. J Nutr. 130: 27-29.

Gibson, R.A.; Neumann, M.A.; Lien, E.L.; Boyd, K.A. y Tu, W.C. (2013) *Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid is inhibited by diets high in polyunsaturated fatty acids*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 88: 139-146.

Gillingham, L.G.; Harris-Janzen, S. y Jones, P.J. (2011) *Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors*. Lipids. 46: 209-228.

Gudbrandsen, O.A.; Rodriguez, E.; Wergedahl, H.; Mork, S.; Reseland, J.E.; Skorve, J.; Palou, A. y Berge, R.K. (2009) *Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid reduces the hepatic triacylglycerol content and the leptin mRNA level in adipose tissue in obese Zucker fa/fa rats*. Br J Nutr. 102: 803-815.

Guillén, N.; Navarro, M.A.; Arnal, C.; Noone, E.; Arbones-Mainar, J.M.; Acin, S.; Surra, J.C.; Muniesa, P.; Roche, H.M. y Osada, J. (2009) *Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver*. Physiol Genomics. 37: 187-198.

Guillén, N.; Acin, S.; Navarro, M.A.; Surra, J.C.; Arnal, C.; Lou-Bonafonte, J.M.; Muniesa, P.; Martínez-Gracia, M.V. y Osada, J. (2009) *Conocimiento de la acción biológica del aceite de oliva virgen extra mediante el uso del ratón carente de la apolipoproteína E*. Rev Esp Cardiol. 62: 294-304.

Ha, Y.L.; Grimm, N.K. y Pariza, M.W. (1987) *Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid*. Carcinogenesis. 8: 1881-1887.

- Ha, Y.L.; Storkson, J. y Pariza, M.W. (1990) *Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid*. *Cancer Res.* 50: 1097-1101.
- Hargrave, K.M.; Li, C.; Meyer, B.J.; Kachman, S.D.; Hartzell, D.L.; Della-Fera, M.A.; Miner, J.L. y Baile, C.A. (2002) *Adipose depletion and apoptosis induced by trans-10, cis-12 conjugated linoleic Acid in mice*. *Obes Res.* 10: 1284-1290.
- Hargrave, K.M.; Meyer, B.J.; Li, C.; Azain, M.J.; Baile, C.A. y Miner, J.L. (2004) *Influence of dietary conjugated linoleic Acid and fat source on body fat and apoptosis in mice*. *Obes Res.* 12: 1435-1444.
- Hargrave-Barnes, K.M.; Azain, M.J. y Miner, J.L. (2008) *Conjugated linoleic acid-induced fat loss dependence on Delta6-desaturase or cyclooxygenase*. *Obesity (Silver Spring)*. 16: 2245-2252.
- Hariri, N.; Gougeon, R. y Thibault, L. (2010) *A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content*. *Nutr Res.* 30: 632-643.
- Henriksen, E.J.; Teachey, M.K.; Taylor, Z.C.; Jacob, S.; Ptock, A.; Kramer, K. y Hasselwander, O. (2003) *Isomer-specific actions of conjugated linoleic acid on muscle glucose transport in the obese Zucker rat*. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285: E98-E105.
- Hommelberg, P.P.; Plat, J.; Remels, A.H.; van Essen, A.L.; Kelders, M.C.; Mensink, R.P.; Schols, A.M. y Langen, R.C. (2010) *Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid inhibits skeletal muscle differentiation and GLUT4 expression independently from NF-kappaB activation*. *Mol Nutr Food Res.* 54: 1763-1772.
- House, R.L.; Cassady, J.P.; Eisen, E.J.; Eling, T.E.; Collins, J.B.; Grissom, S.F. y Odle, J. (2005) *Functional genomic characterization of delipidation elicited by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid (t10c12-CLA) in a polygenic obese line of mice*. *Physiol Genomics.* 21: 351-361.

Howard, B.V.; Manson, J.E.; Stefanick, M.L.; Beresford, S.A.; Frank, G.; Jones, B.; Rodabough, R.J.; Snetselaar, L.; Thomson, C.; Tinker, L.; Vitolins, M. y Prentice, R. (2006) *Low-fat dietary pattern and weight change over 7 years: the Women's Health Initiative Dietary Modification Trial*. JAMA. 295: 39-49.

Hsu, R.Y. y Lardy, H.A. (1969) *Malic enzyme*. Methods enzymol. 17: 230-235.

Hurtado de Catalfo, G.E.; de Alaniz, M.J. y Marra, C.A. (2013) *Dietary lipid-induced changes in enzymes of hepatic lipid metabolism*. Nutrition. 29: 462-469.

Hwang, Y.H. y Kang, K.J. (2007) *Conjugated linoleic acid reduces adipose depots without reduction of stearoyl coenzyme A desaturase 1 gene expression*. Ann Nutr Metab. 51: 126-133.

Ide, T.; Watanabe, M.; Sugano, M. y Yamamoto, I. (1987) *Activities of liver mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation enzymes in rats fed trans fat*. Lipids. 22: 6-10.

Ide, T. (2005) *Interaction of fish oil and conjugated linoleic acid in affecting hepatic activity of lipogenic enzymes and gene expression in liver and adipose tissue*. Diabetes. 54: 412-423.

Ikemoto, S.; Takahashi, M.; Tsunoda, N.; Maruyama, K.; Itakura, H. y Ezaki, O. (1996) *High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils*. Metabolism. 45: 1539-1546.

Ip, C.; Dong, Y.; Ip, M.M.; Banni, S.; Carta, G.; Angioni, E.; Murru, E.; Spada, S.; Melis, M.P. y Saebo, A. (2002) *Conjugated linoleic acid isomers and mammary cancer prevention*. Nutr Cancer. 43: 52-58.

Ip, M.M.; McGee, S.O.; Masso-Welch, P.A.; Ip, C.; Meng, X.; Ou, L. y Shoemaker, S.F. (2007) *The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium*. Carcinogenesis. 28: 1269-1276.

Ippagunta, S.; Hadenfeldt, T.J.; Miner, J.L. y Hargrave-Barnes, K.M. (2011) *Dietary conjugated linoleic acid induces lipolysis in adipose tissue of coconut oil-fed mice but not soy oil-fed mice*. *Lipids*. 46: 821-830.

Ippagunta, S.; Angius, Z.; Sanda, M. y Barnes, K.M. (2013) *Dietary CLA-induced Lipolysis Is Delayed in Soy Oil-Fed Mice Compared to Coconut Oil-Fed Mice*. *Lipids*. 48: 1145-1155.

Iwakiri, Y.; Sampson, D.A. y Allen, K.G. (2002) *Suppression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by conjugated linoleic acid in murine macrophages*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 67: 435-443.

Javadi, M.; Everts, H.; Hovenier, R.; Kocsis, S.; Lankhorst, A.E.; Lemmens, A.G.; Schonewille, J.T.; Terpstra, A.H. y Beynen, A.C. (2004a) *The effect of six different C18 fatty acids on body fat and energy metabolism in mice*. *Br J Nutr*. 92: 391-399.

Javadi, M.; Beynen, A.C.; Hovenier, R.; Lankhorst, A.; Lemmens, A.G.; Terpstra, A.H. y Geelen, M.J. (2004b) *Prolonged feeding of mice with conjugated linoleic acid increases hepatic fatty acid synthesis relative to oxidation*. *J Nutr Biochem*. 15: 680-687.

Javadi, M.; Geelen, M.J.; Lemmens, A.G.; Lankhorst, A.; Schonewille, J.T.; Terpstra, A.H. y Beynen, A.C. (2007) *The influence of dietary linoleic and alpha-linolenic acid on body composition and the activities of key enzymes of hepatic lipogenesis and fatty acid oxidation in mice*. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 91: 11-18.

Jones, B.H.; Maher, M.A.; Banz, W.J.; Zemel, M.B.; Whelan, J.; Smith, P.J. y Moustaid, N. (1996) *Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids*. *Am J Physiol*. 271: E44-E49.

Jump, D.B.; Clarke, S.D.; Thelen, A. y Liimatta, M. (1994) *Coordinate regulation of glycolytic and lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids*. *J Lipid Res*. 35: 1076-1084.

Jump, D.B. (2002) *The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids*. J Biol Chem 277: 8755-8758.

Kang, K.; Miyazaki, M.; Ntambi, J.M. y Pariza, M.W. (2004) *Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity*. Biochem Biophys Res Commun. 315: 532-537.

Kant, A.K. (2010) *Dietary patterns: biomarkers and chronic disease risk*. Appl. Physiol Nutr Metab. 35: 199-206.

Katan, M.B.; Zock, P.L. y Mensink, R.P. (1995) *Dietary oils, serum lipoproteins, and coronary heart disease*. Am J Clin Nutr. 61: 1368S-1373S.

Kelley, D.S.; Bartolini, G.L.; Newman, J.W.; Vemuri, M. y Mackey, B.E. (2006) *Fatty acid composition of liver, adipose tissue, spleen, and heart of mice fed diets containing t10, c12-, and c9, t11-conjugated linoleic acid*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 74: 331-338.

Kelley, D.S.; Vemuri, M.; Adkins, Y.; Gill, S.H.; Fedor, D. y Mackey, B.E. (2009) *Flaxseed oil prevents trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid-induced insulin resistance in mice*. Br J Nutr. 101: 701-708.

Kennedy, A.; Chung, S.; LaPoint, K.; Fabiyi, O. y McIntosh, M.K. (2008) *Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid antagonizes ligand-dependent PPARgamma activity in primary cultures of human adipocytes*. J Nutr. 138: 455-461.

Kennedy, A.; Martinez, K.; Schmidt, S.; Mandrup, S.; LaPoint, K. y McIntosh, M. (2010) *Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid*. J Nutr Biochem. 21: 171-179.

Keys, A. (1995) *Mediterranean diet and public health: personal reflections*. Am J Clin Nutr. 61: 1321S-1323S.

- Kim, Y.C. y Ntambi, J.M. (1999) *Regulation of stearyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation*. *Biochem Biophys Res Commun.* 266: 1-4.
- Kim, M.R.; Park, Y.; Albright, K.J. y Pariza, M.W. (2002) *Differential responses of hamsters and rats fed high-fat or low-fat diets supplemented with conjugated linoleic acid*. *Nutrition Research.* 22: 715-722.
- Kim, J.H.; Kim, J. y Park, Y. (2012) *trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid enhances endurance capacity by increasing fatty acid oxidation and reducing glycogen utilization in mice*. *Lipids.* 47: 855-863.
- Kishino, S.; Ogawa, J.; Ando, A.; Iwashita, T.; Fujita, T.; Kawashima, H. y Shimizu, S. (2003) *Structural analysis of conjugated linoleic acid produced by Lactobacillus plantarum, and factors affecting isomer production*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67: 179-182.
- Knekt, P.; Jarvinen, R.; Seppanen, R.; Pukkala, E. y Aromaa, A. (1996) *Intake of dairy products and the risk of breast cancer*. *Br J Cancer.* 73: 687-691.
- Kostogryś, R.B. y Pisulewski, P.M. (2010a) *Conjugated linoleic acid decreased serum triacyloglycerol and changed fatty acid composition in rat's liver*. *Journal of Animal and Feed Sciences.* 19: 484-494.
- Kostogryś, R.B. y Pisulewski, P.M. (2010b) *Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on lipid profile and liver histology in laboratory rats fed high-fructose diet*. *Environ Toxicol Pharmacol.* 30: 245-250.
- Kostogryś, R.B.; Franczyk-Zarow, M.; Maslak, E.; Gajda, M.; Mateuszuk, L. y Chlopicki, S. (2012) *Effects of margarine supplemented with t10c12 and C9T11 CLA on atherosclerosis and steatosis in apoE/LDLR -/- mice*. *J Nutr Health Aging.* 16: 482-490.

Kramer, J.K.; Cruz-Hernandez, C.; Deng, Z.; Zhou, J.; Jahreis, G. y Dugan, M.E. (2004) *Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products*. Am. J. Clin. Nutr. 79: 1137S-1145S.

Kreider, R.B.; Ferreira, M.P.; Greenwood, M.; Wilson, M. y Almada, A.L. (2002) *Effects of conjugated linoleic acid supplementation during resistance training on body composition, bone density, strength, and selected hematological markers*. J Strength Cond Res. 16: 325-334.

Kritchevsky, D.; Tepper, S.A.; Wright, S.; Tso, P. y Czarnecki, S.K. (2000) *Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits*. J Am Coll Nutr. 19: 472S-477S.

Kuby, S.A. y Noltmann, E.A. (1966) *Glucose 6-phosphate dehydrogenase from brewers yeast*. Methods enzymol. 9: 116-117.

LaRosa, P.C.; Miner, J.; Xia, Y.; Zhou, Y.; Kachman, S. y Fromm, M.E. (2006) *Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid causes inflammation and delipidation of white adipose tissue in mice: a microarray and histological analysis*. Physiol Genomics. 27: 282-294.

Larsen, T.M.; Toubro, S.; Gudmundsen, O. y Astrup, A. (2006) *Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain*. Am J Clin Nutr. 83: 606-612.

Larsson, S.C.; Bergkvist, L. y Wolk, A. (2005) *High-fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography Cohort*. Am J Clin Nutr. 82: 894-900.

Larsson, S.C.; Bergkvist, L. y Wolk, A. (2009) *Conjugated linoleic acid intake and breast cancer risk in a prospective cohort of Swedish women*. Am J Clin Nutr. 90: 556-560.

Lasa, A.; Churruga, I.; Simon, E.; Fernandez-Quintela, A.; Rodriguez, V.M. y Portillo, M.P. (2008) *Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid does not increase body fat loss induced by energy restriction*. Br J Nutr. 100: 1245-1250.

Laurell, S. (1966) *A method for routine determination of plasma triglycerides*. Scand J Clin Lab Invest. 18: 668-672.

Lawson, R.E.; Moss, A.R. y Givens, D.I. (2001) *The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review*. Nutr Res Rev. 14: 153-172.

Lawrence, G.D. (2013) *Dietary fats and health: dietary recommendations in the context of scientific evidence*. Adv Nutr. 4: 294-302.

Lee, K.N.; Pariza, M.W. y Ntambi, J.M. (1998) *Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression*. Biochem Biophys Res Commun. 248: 817-821.

Levin, G.; Duffin, K.L.; Obukowicz, M.G.; Hummert, S.L.; Fujiwara, H.; Needleman, P. y Raz, A. (2002) *Differential metabolism of dihomo-gamma-linolenic acid and arachidonic acid by cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2: implications for cellular synthesis of prostaglandin E1 and prostaglandin E2*. Biochem. J. 365: 489-496.

Li, Y. y Watkins, B.A. (1998) *Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids*. Lipids. 33: 417-425.

Li, J.; Viswanadha, S. y Loor, J.J. (2012) *Hepatic Metabolic, Inflammatory, and Stress-Related Gene Expression in Growing Mice Consuming a Low Dose of Trans-10, cis-12-Conjugated Linoleic Acid*. Journal of Lipids. 2012: 571281.

Lin, Y.; Schuurbiers, E.; Van der Veen, S. y De Deckere, E.A. (2001a) *Conjugated linoleic acid isomers have differential effects on triglyceride secretion in Hep G2 cells*. Biochim Biophys Acta. 1533: 38-46.

Lin, Y.; Kreeft, A.; Schuurbiers, J.A. y Draijer, R. (2001b) *Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes*. J Nutr Biochem. 12: 183-189.

Linden, D.; Lindberg, K.; Oscarsson, J.; Claesson, C.; Asp, L.; Li, L.; Gustafsson, M.; Boren, J. y Olofsson, S.O. (2002) *Influence of peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists on the intracellular turnover and secretion of apolipoprotein (Apo) B-100 and ApoB-48*. J Biol Chem. 277: 23044-23053.

Liu, L.F.; Purushotham, A.; Wendel, A.A. y Belury, M.A. (2007) *Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 292: G1671-G1682.

Lopes, P.A.; Martins, S.V.; Pinho, M.S.; Alfaia, C.M.; Fontes, C.M.; Rodrigues, P.O.; Morais, G.S.; Castro, M.F.; Pinto, R. y Prates, J.A. (2008) *Diet supplementation with the cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid isomer affects the size of adipocytes in Wistar rats*. Nutr Res. 28: 480-486.

Lopez-Miranda, J.; Perez-Jimenez, F.; Ros, E.; De Caterina, R.; Badimon, L.; Covas, M.I.; Escrich, E.; Ordovas, J.M.; Soriguer, F.; Abia, R.; de la Lastra, C.A.; Battino, M.; Corella, D.; Chamorro-Quiros, J.; Delgado-Lista, J.; Giugliano, D.; Esposito, K.; Estruch, R.; Fernandez-Real, J.M.; Gaforio, J.J.; La Vecchia, C.; Lairon, D.; Lopez-Segura, F.; Mata, P.; Menendez, J.A.; Muriana, F.J.; Osada, J.; Panagiotakos, D.B.; Paniagua, J.A.; Perez-Martinez, P.; Perona, J.; Peinado, M.A.; Pineda-Priego, M.; Poulsen, H.E.; Quiles, J.L.; Ramirez-Tortosa, M.C.; Ruano, J.; Serra-Majem, L.; Sola, R.; Solanas, M.; Solfrizzi, V.; de la Torre-Fornell, R.; Trichopoulou, A.; Uceda, M.; Villalba-Montoro, J.M.; Villar-Ortiz, J.R.; Visioli, F. y Yiannakouris, N. (2008) *Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaen and Cordoba (Spain) 2008*. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 20: 284-294.

Lorente-Cebrian, S.; Costa, A.G.; Navas-Carretero, S.; Zabala, M.; Martinez, J.A. y Moreno-Aliaga, M.J. (2013) *Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence*. J Physiol Biochem. 69: 633-651.

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem. 193: 265-275.

Lutz, O.; Lave, T.; Frey, A.; Meraihi, Z. y Bach, A.C. (1989) *Activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase on long- and medium-chain triglyceride emulsions used in parenteral nutrition*. Metabolism. 38: 507-513.

Lynen, F. (1969) *Yeast fatty acid synthase*. Methods enzymol. 14: 14-17.

Macarulla, M.T.; Fernández-Quintela, A.; Zabala, A.; Navarro, V.; Echevarría, E.; Churruga, I.; Rodríguez, V.M. y Portillo, M.P. (2005) *Effects of conjugated linoleic acid on liver composition and fatty acid oxidation are isomer-dependent in hamster*. Nutrition. 21: 512-519.

Madsen, L.; Froyland, L.; Dyroy, E.; Helland, K. y Berge, R.K. (1998) *Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids are differently metabolized in rat liver during mitochondria and peroxisome proliferation*. J Lipid Res. 39: 583-593.

Marshall, J.A. y Bessesen, D.H. (2002) *Dietary fat and the development of type 2 diabetes*. Diabetes Care. 25: 620-622.

Martin, J.C.; Gregoire, S.; Siess, M.H.; Genty, M.; Chardigny, J.M.; Berdeaux, O.; Juaneda, P. y Sebedio, J.L. (2000) *Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats*. Lipids. 35: 91-98.

Martins, S.V.; Lopes, P.A.; Alfaia, C.M.; Rodrigues, P.O.; Alves, S.P.; Pinto, R.M.; Castro, M.F.; Bessa, R.J. y Prates, J.A. (2010) *Serum adipokine profile and fatty acid composition of adipose tissues are affected by conjugated linoleic acid and saturated fat diets in obese Zucker rats*. Br J Nutr. 103: 869-878.

Massaro, M.; Scoditti, E.; Carluccio, M.A. y De Caterina, R. (2008) *Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 79: 109-115.

Masso-Welch, P.A.; Zangani, D.; Ip, C.; Vaughan, M.M.; Shoemaker, S.F.; McGee, S.O. y Ip, M.M. (2004) *Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature*. J Nutr. 134: 299-307.

Matsuzaka, T.; Shimano, H.; Yahagi, N.; Amemiya-Kudo, M.; Yoshikawa, T.; Hasty, A.H.; Tamura, Y.; Osuga, J.; Okazaki, H.; Iizuka, Y.; Takahashi, A.; Sone, H.; Gotoda, T.; Ishibashi, S. y Yamada, N. (2002) *Dual regulation of mouse Delta(5)- and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha*. J Lipid Res. 43: 107-114.

Mazière, C.; Conte, M.A.; Degonville, J.; Ali, D. y Mazière, J.C. (1999) *Cellular Enrichment with Polyunsaturated Fatty Acids Induces an Oxidative Stress and Activates the Transcription Factors AP1 and NFkB*. Biochemical and Biophysical Research Communications 265: 116-122.

Mele, M.C.; Cannelli, G.; Carta, G.; Cordeddu, L.; Melis, M.P.; Murru, E.; Stanton, C. y Banni, S. (2013) *Metabolism of c9,t11-conjugated linoleic acid (CLA) in humans*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 89: 115-119.

Mensink, R.P.; Zock, P.L.; Kester, A.D. y Katan, M.B. (2003) *Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials*. Am J Clin Nutr. 77: 1146-1155.

Miranda, J.; Churrua, I.; Fernández-Quintela, A.; Rodríguez, V.M.; Macarulla, M.T.; Simón, E. y Portillo, M.P. (2009) *Weak effect of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid on body fat accumulation in adult hamsters*. Br J Nutr. 102: 1583-1589.

Miranda, J.; Arias, N.; Fernandez-Quintela, A. y Del Puy Portillo, M. (2013) *Are conjugated linolenic acid isomers an alternative to conjugated linoleic acid isomers in obesity prevention?* Endocrinol Nutr. pii: S1575-0922(13)00204-0. doi: 10.1016/j.endonu.2013.04.016.

Moon, H.S.; Lee, H.G.; Seo, J.H.; Chung, C.S.; Kim, T.G.; Kim, I.Y.; Lim, K.W.; Seo, S.J.; Choi, Y.J. y Cho, C.S. (2006) *Down-regulation of PPARgamma2-induced adipogenesis by PEGylated conjugated linoleic acid as the pro-drug: Attenuation of lipid accumulation and reduction of apoptosis*. Arch Biochem Biophys. 456: 19-29.

Mougiou, V.; Matsakas, A.; Petridou, A.; Ring, S.; Sagredos, A.; Melissopoulou, A.; Tsigilis, N. y Nikolaidis, M. (2001) *Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat*. J Nutr Biochem. 12: 585-594.

Moya-Camarena, S.Y.; Vanden Heuvel, J.P.; Blanchard, S.G.; Leesnitzer, L.A. y Belury, M.A. (1999) *Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha*. J Lipid Res. 40: 1426-1433.

Mozaffarian, D. (2005) *Does alpha-linolenic acid intake reduce the risk of coronary heart disease? A review of the evidence*. Altern Ther Health Med. 11: 24-30; quiz 31, 79.

Mozaffarian, D. y Rimm, E.B. (2006) *Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits*. JAMA. 296: 1885-1899.

Mozaffarian, D.; Aro, A. y Willett, W.C. (2009) *Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence*. Eur J Clin Nutr. 63: S5-21.

Munday, J.S.; Thompson, K.G. y James, K.A. (1999) *Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model*. Br J Nutr. 81: 251-255.

Nakamura, Y.K.; Flintoff-Dye, N. y Omaye, S.T. (2008) *Conjugated linoleic acid modulation of risk factors associated with atherosclerosis*. Nutr Metab (Lond). 5: 22.

Nakanishi, T.; Koutoku, T.; Kawahara, S.; Murai, A. y Furuse, M. (2003) *Dietary conjugated linoleic acid reduces cerebral prostaglandin E(2) in mice*. Neurosci Lett. 341: 135-138.

Nakanishi, T.; Oikawa, D.; Koutoku, T.; Hirakawa, H.; Kido, Y.; Tachibana, T. y Furuse, M. (2004) *Gamma-linolenic acid prevents conjugated linoleic acid-induced fatty liver in mice*. Nutrition. 20: 390-393.

Navarro, V.; Portillo, M.P.; Margotat, A.; Landrier, J.F.; Macarulla, M.T.; Lairon, D. y Martin, J.C. (2009) *A multi-gene analysis strategy identifies metabolic pathways targeted*

by *trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid* in the liver of hamsters. *Br J Nutr.* 102: 537-545.

Nazare, J.A.; de la Perriere, A.B.; Bonnet, F.; Desage, M.; Peyrat, J.; Maitrepierre, C.; Louche-Pelissier, C.; Bruzeau, J.; Goudable, J.; Lassel, T.; Vidal, H. y Laville, M. (2007) *Daily intake of conjugated linoleic acid-enriched yoghurts: effects on energy metabolism and adipose tissue gene expression in healthy subjects.* *Br J Nutr.* 97: 273-280.

Ntambi, J.M. (1999) *Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol.* *J Lipid Res.* 40: 1549-1558.

O'Dowd, Y.; Driss, F.; Dang, P.M.; Elbim, C.; Gougerot-Pocidallo, M.A.; Pasquier, C. y El-Benna, J. (2004) *Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils.* *Biochem Pharmacol.* 68: 2003-2008.

Ogborn, M.R.; Nitschmann, E.; Bankovic-Calic, N.; Weiler, H.A.; Fitzpatrick-Wong, S. y Aukema, H.M. (2003) *Dietary conjugated linoleic acid reduces PGE2 release and interstitial injury in rat polycystic kidney disease.* *Kidney Int.* 64: 1214-1221.

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

Oikawa, D.; Tsuyama, S.; Akimoto, Y.; Mizobe, Y. y Furuse, M. (2009) *Arachidonic acid prevents fatty liver induced by conjugated linoleic acid in mice.* *Br J Nutr.* 101: 1558-1563.

Oleszczuk, J.; Oleszczuk, L.; Siwicki, A.K. y Skopinska-Skopinska, E. (2012) *Biological effects of conjugated linoleic acids supplementation.* *Pol J Vet Sci.* 15: 403-408.

O'Shea, M.; Bassaganya-Riera, J. y Mohede, I.C. (2004) *Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid.* *Am J Clin Nutr.* 79: 1199S-1206S.

Ostrowska, E.; Muralitharan, M.; Cross, R.F.; Bauman, D.E. y Dunshea, F.R. (1999) *Dietary conjugated linoleic acids increase lean tissue and decrease fat deposition in growing pigs*. J Nutr. 129: 2037-2042.

Otway, S. y Robinson, D.S. (1967) *The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions*. J Physiol. 190: 321-332.

Paglia, D.E. y Valentine, W.N. (1967) *Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase*. J Lab Clin Med. 70: 158-169.

Pariza, M.W. y Hargraves, W.A. (1985) *A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene*. Carcinogenesis. 6: 591-593.

Pariza, M.W.; Park, Y. y Cook, M.E. (2000) *Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation*. Proc Soc Exp Biol Med. 223: 8-13.

Pariza, M.W.; Park, Y. y Cook, M.E. (2001) *The biologically active isomers of conjugated linoleic acid*. Prog. Lipid. Res. 40: 283-298.

Park, Y.; Albright, K.J.; Liu, W.; Storkson, J.M.; Cook, M.E. y Pariza, M.W. (1997) *Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice*. Lipids. 32: 853-858.

Park, Y.; Storkson, J.M.; Albright, K.J.; Liu, W. y Pariza, M.W. (1999) *Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice*. Lipids. 34: 235-241.

Park, Y.; Storkson, J.M.; Ntambi, J.M.; Cook, M.E.; Sih, C.J. y Pariza, M.W. (2000) *Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives*. Biochim Biophys Acta. 1486: 285-292.

Park, Y. y Pariza, M.W. (2001) *The effects of dietary conjugated nonadecadienoic acid on body composition in mice*. Biochim Biophys Acta. 1533: 171-174.

Park, Y.; Storkson, J.M.; Liu, W.; Albright, K.J.; Cook, M.E. y Pariza, M.W. (2004) *Structure-activity relationship of conjugated linoleic acid and its cognates in inhibiting heparin-releasable lipoprotein lipase and glycerol release from fully differentiated 3T3-L1 adipocytes*. J Nutr Biochem. 15: 561-568.

Parodi, P.W. (1977) *Conjugated Octadecadienoic Acids of Milk Fat*. Dairy Sci. 60: 1550-1553.

Parra, P.; Serra, F. y Palou, A. (2010) *Moderate doses of conjugated linoleic acid isomers mix contribute to lowering body fat content maintaining insulin sensitivity and a noninflammatory pattern in adipose tissue in mice*. J Nutr Biochem. 21: 107-115.

Perona, J.S.; Cabello-Moruno, R. y Ruiz-Gutierrez, V. (2007) *Modulation of the effects of chylomicron remnants on endothelial function by minor dietary lipid components*. Biochem Soc Trans. 35: 446-450.

Peters, J.M.; Park, Y.; Gonzalez, F.J. y Pariza, M.W. (2001) *Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice*. Biochim Biophys Acta. 1533: 233-242.

Petridou, A.; Mougios, V. y Sagredos, A. (2003) *Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum lipids and effect on body fat of women*. Lipids. 38: 805-811.

Poirier, H.; Niot, I.; Clément, L.; Guerre-Millo, M. y Besnard, P. (2005a) *Development of conjugated linoleic acid (CLA)-mediated lipotrophic syndrome in the mouse*. Biochimie. 87: 73-79.

Poirier, H.; Rouault, C.; Clement, L.; Niot, I.; Monnot, M.C.; Guerre-Millo, M. y Besnard, P. (2005b) *Hyperinsulinaemia triggered by dietary conjugated linoleic acid is associated with a decrease in leptin and adiponectin plasma levels and pancreatic beta cell hyperplasia in the mouse*. Diabetologia. 48: 1059-1065.

- Poirier, H.; Shapiro, J.S.; Kim, R.J. y Lazar, M.A. (2006) *Nutritional supplementation with trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid induces inflammation of white adipose tissue*. Diabetes. 55: 1634-1641.
- Purushotham, A.; Shrode, G.E.; Wendel, A.A.; Liu, L.F. y Belury, M.A. (2007) *Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats*. J Nutr Biochem. 18: 676-684.
- Rafecas, I.; Esteve, M.; Fernandez-Lopez, J.A.; Remesar, X. y Alemany, M. (1994) *Whole-rat protein content estimation: applicability of the N x 6.25 factor*. Br J Nutr. 72: 199-209.
- Rahman, S.M.; Wang, Y.; Yotsumoto, H.; Cha, J.; Han, S.; Inoue, S. y Yanagita, T. (2001) *Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF rats*. Nutrition. 17: 385-390.
- Ramirez-Santana, C.; Castellote, C.; Castell, M.; Molto-Puigmarti, C.; Rivero, M.; Perez-Cano, F.J. y Franch, A. (2011) *Enhancement of antibody synthesis in rats by feeding cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid during early life*. J Nutr Biochem. 22: 495-501.
- Rasooly, R.; Kelley, D.S.; Greg, J. y Mackey, B.E. (2007) *Dietary trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid reduces the expression of fatty acid oxidation and drug detoxification enzymes in mouse liver*. Br J Nutr. 97: 58-66.
- Reardon, M.; Gobern, S.; Martinez, K.; Shen, W.; Reid, T. y McIntosh, M. (2012) *Oleic acid attenuates trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid-mediated inflammatory gene expression in human adipocytes*. Lipids. 47: 1043-1051.
- Reaven, P.; Parthasarathy, S.; Grasse, B.J.; Miller, E.; Steinberg, D. y Witztum, J.L. (1993) *Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects*. J Clin Invest. 91: 668-676.

Reeves, P.G.; Nielsen, F.H. y Fahey, G.C., Jr. (1993) *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J Nutr. 123: 1939-1951.

Reginato, M.J.; Krakow, S.L.; Bailey, S.T. y Lazar, M.A. (1998) *Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Biol Chem. 273: 1855-1858.

Ren, B.; Thelen, A.P.; Peters, J.M.; Gonzalez, F.J. y Jump, D.B. (1997) *Polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic fatty acid synthase and S14 gene expression does not require peroxisome proliferator-activated receptor alpha*. J Biol Chem. 272: 26827-26832.

Riccardi, G.; Giacco, R. y Parillo, M. (2003) *Lifestyle modification to prevent type 2 diabetes*. International congress series. 1253: 231-236.

Ringseis, R.; Konig, B.; Leuner, B.; Schubert, S.; Nass, N.; Stangl, G. y Eder, K. (2006) *LDL receptor gene transcription is selectively induced by t10c12-CLA but not by c9t11-CLA in the human hepatoma cell line HepG2*. Biochim Biophys Acta. 1761: 1235-1243.

Riserus, U.; Berglund, L. y Vessby, B. (2001) *Conjugated linoleic acid (CLA) reduced abdominal adipose tissue in obese middle-aged men with signs of the metabolic syndrome: a randomised controlled trial*. Int J Obes Relat Metab Disord. 25: 1129-1135.

Riserus, U.; Arner, P.; Brismar, K. y Vessby, B. (2002) *Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome*. Diabetes Care. 25: 1516-1521.

Riserus, U.; Vessby, B.; Arnlov, J. y Basu, S. (2004) *Effects of cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men*. Am J Clin Nutr. 80: 279-283.

Roche, H.M.; Noone, E.; Sewter, C.; Mc Bennett, S.; Savage, D.; Gibney, M.J.; O'Rahilly, S. y Vidal-Puig, A.J. (2002) *Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic*

acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXRalpha. Diabetes. 51: 2037-2044.

Rodriguez-Cruz, M.; Tovar, A.R.; del Prado, M. y Torres, N. (2005) *Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud*. Rev Invest Clin. 57: 457-472.

Ronis, M.J.; Baumgardner, J.N.; Sharma, N.; Vantrease, J.; Ferguson, M.; Tong, Y.; Wu, X.; Cleves, M.A. y Badger, T.M. (2013) *Medium chain triglycerides dose-dependently prevent liver pathology in a rat model of non-alcoholic fatty liver disease*. Exp Biol Med (Maywood). 238: 151-162.

Rothlisberger, M.; Negro, E.; Illesca, P.; Gonzalez, M.; Bernal, C. y Williner, MR. (2011) *Ingesta de ácidos grasos trans en estudiantes universitarios de Santa Fe-Argentina. Relación con medidas antropométricas y lípidos séricos*. FABICIB. 15: 84-96.

Russo, G.L. (2009) *Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention*. Biochem Pharmacol. 77: 937-946.

Salam, W.H.; Wilcox, H.G.; Cagen, L.M. y Heimberg, M. (1989) *Stimulation of hepatic cholesterol biosynthesis by fatty acids. Effects of oleate on cytoplasmic acetoacetyl-CoA thiolase, acetoacetyl-CoA synthetase and hydroxymethylglutaryl-CoA synthase*. Biochem J. 258: 563-568.

Sanders, T.A. y Berry, S.E. (2005) *Influence of stearic acid on postprandial lipemia and hemostatic function*. Lipids. 40: 1221-1227.

Sanders, T.A.; Berry, S.E. y Miller, G.J. (2003) *Influence of triacylglycerol structure on the postprandial response of factor VII to stearic acid-rich fats*. Am J Clin Nutr. 77: 777-782.

Sanhueza, J.C.; Nieto, S.K. y Valenzuela, A.B. (2002) *Acido linoleico conjugado: un acido graso con isomeria trans potencialmente beneficioso*. Rev. Chil. Nutr. 29. Versión On-line ISSN 0717-7518.

Satia, J.A. (2010) *Dietary acculturation and the nutrition transition: an overview*. Appl. Physiol Nutr Metab. 35: 219-223.

Schmitz, G. y Ecker, J. (2008) *The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids*. Prog Lipid Res. 47: 147-155.

Sealls, W.; Gonzalez, M.; Brosnan, M.J.; Black, P.N. y DiRusso, C.C. (2008) *Dietary polyunsaturated fatty acids (C18:2 omega6 and C18:3 omega3) do not suppress hepatic lipogenesis*. Biochim Biophys Acta. 1781: 406-414.

Sébédio, J.L.; Juaneda, P.; Dobson, G.; Ramilison, I.; Martin, J.C.; Chardigny, J.M. y Christie, W.W. (1997) *Metabolites of conjugated isomers of linoleic acid (CLA) in the rat*. Biochim Biophys Acta. 1345: 5-10.

Sébédio, J.L.; Angioni, E.; Chardigny, J.M.; Gregoire, S.; Juaneda, P. y Berdeaux, O. (2001) *The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acid profiles of liver and adipose tissues and their conversion to isomers of 16:2 and 18:3 conjugated fatty acids in rats*. Lipids. 36: 575-582.

Sessler, A.M.; Kaur, N.; Palta, J.P. y Ntambi, J.M. (1996) *Regulation of stearyl-CoA desaturase 1 mRNA stability by polyunsaturated fatty acids in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem. 271: 29854-29858.

Simón, E.; Macarulla, M.T.; Fernandez-Quintela, A.; Rodriguez, V.M. y Portillo, M.P. (2005) *Body fat-lowering effect of conjugated linoleic acid is not due to increased lipolysis*. J Physiol Biochem. 61: 363-369.

Simopoulos, A.P. (2003) *Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence* (Eds.: Simopoulos, A.P. y Cleland, L.G.) Karger, Basel, Suiza, p. 1-22.

Sisk, M.B.; Hausman, D.B.; Martin, R.J. y Azain, M.J. (2001) *Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats*. J Nutr. 131: 1668-1674.

Skeaff, C.M. y Miller, J. (2009) *Dietary fat and coronary heart disease: summary of evidence from prospective cohort and randomised controlled trials*. Ann Nutr Metab. 55: 173-201.

Smedman, A. y Vessby, B. (2001) *Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects*. Lipids. 36: 773-781.

Smit, L.A.; Mozaffarian, D. y Willett, W. (2009) *Review of fat and fatty acid requirements and criteria for developing dietary guidelines*. Ann Nutr Metab. 55: 44-55.

Soares da Costa, C.A.; Santana Carlos, A.; Lopes Gonzalez, G.d.P.; Pontes Gaspar Reis, R.; dos Santos Ribeiro, M.; de Sousa dos Santos, A.; Vieira Monteiro, A.M.; Gaspar de Moura, E. y Alves do Nascimento-Saba, C.C. (2012) *Diet containing low n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids ratio, provided by canola oil, alters body composition and bone quality in young rats*. Eur J Nutr. 51: 191-198.

Song, H.J.; Grant, I.; Rotondo, D.; Mohede, I.; Sattar, N.; Heys, S.D. y Wahle, K.W. (2005) *Effect of CLA supplementation on immune function in young healthy volunteers*. Eur J Clin Nutr. 59: 508-517.

Specter, S.E.; Hamilton, J.S.; Stern, J.S. y Horwitz, B.A. (1995) *Chronic protein restriction does not alter energetic efficiency or brown adipose tissue thermogenic capacity in genetically obese (fa/fa) Zucker rats*. J Nutr. 125: 2183-2193.

Stachowska, E. (2008) *Conjugated dienes of linoleic acid and tumorigenesis*. Ann Acad Med Stetin. 54: 122-125.

Sundaram, M. y Yao, Z. (2010) *Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion*. Nutr Metab (Lond). 7: 35.

Takahashi, Y.; Kushiro, M.; Shinohara, K. y Ide, T. (2002) *Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 133: 395-404.

Takahashi, Y.; Kushiro, M.; Shinohara, K. y Ide, T. (2003) *Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid*. *Biochim Biophys Acta*. 1631: 265-273.

Tebbey, P.W. y Buttke, T.M. (1992) *Arachidonic acid regulates unsaturated fatty acid synthesis in lymphocytes by inhibiting stearoyl-CoA desaturase gene expression*. *Biochim Biophys Acta*. 1171: 27-34.

Terpstra, A.H.; Beynen, A.C.; Everts, H.; Kocsis, S.; Katan, M.B. y Zock, P.L. (2002) *The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta*. *J Nutr*. 132: 940-945.

Terpstra, A.H.; Javadi, M.; Beynen, A.C.; Kocsis, S.; Lankhorst, A.E.; Lemmens, A.G. y Mohede, I.C. (2003) *Dietary conjugated linoleic acids as free fatty acids and triacylglycerols similarly affect body composition and energy balance in mice*. *J Nutr*. 133: 3181-3186.

Thom, E.; Wadstein, J. y Gudmundsen, O. (2001) *Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans*. *J Int Med Res*. 29: 392-396.

Toomey, S.; Harhen, B.; Roche, H.M.; Fitzgerald, D. y Belton, O. (2006) *Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid*. *Atherosclerosis*. 187: 40-49.

Tricon, S.; Burdge, G.C.; Kew, S.; Banerjee, T.; Russell, J.J.; Jones, E.L.; Grimble, R.F.; Williams, C.M.; Yaquob, P. y Calder, P.C. (2004) *Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans*. *Am J Clin Nutr*. 80: 614-620.

Tsuboyama-Kasaoka, N.; Takahashi, M.; Tanemura, K.; Kim, H.J.; Tange, T.; Okuyama, H.; Kasai, M.; Ikemoto, S. y Ezaki, O. (2000) *Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice*. *Diabetes*. 49: 1534-1542.

Valeille, K.; Ferezou, J.; Amsler, G.; Quignard-Boulangé, A.; Parquet, M.; Gripois, D.; Dorovska-Taran, V. y Martin, J.C. (2005) *A cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 289: H652-659.

Vyas, D.; Kadegowda, A.K. y Erdman, R.A. (2012) *Dietary conjugated linoleic Acid and hepatic steatosis: species-specific effects on liver and adipose lipid metabolism and gene expression*. J Nutr Metab. 2012: 932928.

Wang, C.F. y Hegsted, D.M. (1949) *Determination of blood and plasma volumes, thiocyanate space, and bromsulphalein clearance in rats*. Am J Physiol. 156: 227-232.

Wang, Y.-M.; Rahman, S.M.; Nagao, K.; Arao, K.; Inoue, N. y Yanagita, T. (2003) *Comparison of the Effects of Triacylglycerol-CLA and Free Fatty Acid-CLA on Hepatic Lipid Metabolism in OLETF obese Rats*. Journal of Oleo Science. 52: 121-128.

Warren, J.M.; Simon, V.A.; Bartolini, G.; Erickson, K.L.; Mackey, B.E. y Kelley, D.S. (2003) *Trans-10,cis-12 CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: possible roles of specific lipid metabolism genes*. Lipids. 38: 497-504.

West, D.B.; Delany, J.P.; Camet, P.M.; Blohm, F.; Truett, A.A. y Scimeca, J. (1998) *Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse*. Am J Physiol. 275: R667-672.

West, D.B.; Blohm, F.Y.; Truett, A.A. y DeLany, J.P. (2000) *Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression*. J Nutr. 130: 2471-2477.

Windham, W. (1999) *Animal feed*. En: *Official Methods of Analysis of AOAC International* (Eds.: Cunniff, P.) AOAC International, Gaithersburg, MD, p. 4.1-4.45.

Wronska, A. y Kmiec, Z. (2012) *Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots*. Acta Physiol (Oxf). 205: 194-208.

Xu, X.; Storkson, J.; Kim, S.; Sugimoto, K.; Park, Y. y Pariza, M.W. (2003) *Short-term intake of conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but does not enhance lipolysis in mouse adipose tissue*. J Nutr. 133: 663-667.

Yamasaki, M.; Chujo, H.; Hirao, A.; Koyanagi, N.; Okamoto, T.; Tojo, N.; Oishi, A.; Iwata, T.; Yamauchi-Sato, Y.; Yamamoto, T.; Tsutsumi, K.; Tachibana, H. y Yamada, K. (2003) *Immunoglobulin and cytokine production from spleen lymphocytes is modulated in C57BL/6J mice by dietary cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid*. J Nutr. 133: 784-788.

Yanagita, T.; Wang, Y.M.; Nagao, K.; Ujino, Y. y Inoue, N. (2005) *Conjugated linoleic acid-induced fatty liver can be attenuated by combination with docosahexaenoic acid in C57BL/6N mice*. J Agric Food Chem. 53: 9629-9633.

Yoshikawa, T.; Shimano, H.; Yahagi, N.; Ide, T.; Amemiya-Kudo, M.; Matsuzaka, T.; Nakakuki, M.; Tomita, S.; Okazaki, H.; Tamura, Y.; Iizuka, Y.; Ohashi, K.; Takahashi, A.; Sone, H.; Osuga Ji, J.; Gotoda, T.; Ishibashi, S. y Yamada, N. (2002) *Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements*. J Biol Chem. 277: 1705-1711.

Zabala, A.; Churrua, I.; Macarulla, M.T.; Rodríguez, V.M.; Fernández-Quintela, A.; Martínez, J.A. y Portillo, M.P. (2004) *The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid reduces hepatic triacylglycerol content without affecting lipogenic enzymes in hamsters*. Br J Nutr. 92: 383-389.

Zabala, A.; Fernández-Quintela, A.; Macarulla, M.T.; Simón, E.; Rodríguez, V.M.; Navarro, V. y Portillo, M.P. (2006a) *Effects of conjugated linoleic acid on skeletal muscle triacylglycerol metabolism in hamsters*. Nutrition. 22: 528-533.

Zabala, A.; Fernández-Quintela, A.; Macarulla, M.T.; Simón, E.; Rodríguez, V.M.; Navarro, V. y Portillo, M.P. (2006b) *Effects of conjugated linoleic acid on skeletal muscle triacylglycerol metabolism in hamsters*. Nutrition. 22: 528-533.

Zambell, K.L.; Keim, N.L.; Van Loan, M.D.; Gale, B.; Benito, P.; Kelley, D.S. y Nelson, G.J. (2000) *Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure*. *Lipids*. 35: 777-782.

Zevenbergen, H.; de Bree, A.; Zeelenberg, M.; Laitinen, K.; van Duijn, G. y Floter, E. (2009) *Foods with a high fat quality are essential for healthy diets*. *Ann Nutr Metab*. 54 Suppl 1: 15-24.