

## Trabajo completo

# Efectos de los conjugados del ácido linoleico sobre la incorporación tisular de ácidos grasos y metabolismo lipídico en ratas deficientes en ácidos grasos esenciales

RECIBIDO: 02/08/2013

ACEPTADO: 13/09/2013

Fariña, A.C.<sup>1,2</sup> • González, M.A.<sup>1</sup> • Latorre, M.E.<sup>2</sup> • Bernal, C.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Cátedra Bromatología y Nutrición, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, 3000, Santa Fe, Argentina.

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), 3000, Santa Fe, Argentina.

E-mail: cbernal@fbc.unl.edu.ar

**RESUMEN:** El objetivo del presente estudio fue investigar si los conjugados del ácido linoleico (CLA) podrían atenuar o potenciar algunas alteraciones observadas en ratas con deficiencia marginal de ácidos grasos esenciales (AGE). Para ello, ratas Wistar macho fueron alimentadas 60 días con dietas suficientes o deficientes en AGE, suplementadas o no con CLA. Los CLA presentaron distinto grado de incorporación en los tejidos, mostrando una alta retención en tejido adiposo y una marcada resistencia en cerebro; asimismo en los animales con dietas suficientes o deficientes en AGE, los CLA modificaron en forma diferencial los marcadores tisulares de deficiencia de AGE. En animales con dietas deficientes en AGE, los CLA redujeron los triglicéridos circulantes y el

tamaño del tejido adiposo; no obstante, estas modificaciones y el incremento del hígado permitirían postular una similitud con ciertas alteraciones observadas en los inicios de la lipodistrofia presente en otros modelos experimentales.

**PALABRAS CLAVE:** Deficiencia de ácidos grasos esenciales, Conjugados del ácido linoleico, Nutrición, Metabolismo de lípidos.

**SUMMARY:** *Effects of conjugated linoleic acid on tissular fatty acid incorporation and lipid metabolism in essential fatty acid-deficient rats*

The aim of this work was to investigate whether conjugated linoleic acid (CLA) may attenuate or enhance some alterations observed in rats with marginal deficiency of

essential fatty acids (EFA). For this purpose, male Wistar rats were fed sufficient or deficient in EFA diets, supplemented or not with CLA, for 60 days. CLA showed different degree of incorporation into the tissues, showing a high retention in adipose tissue and noticeable resistance in brain. Moreover, independently of the EFA deficiency, CLA differentially modified the tissue biomarkers of EFA deficiency. In animals with EFA deficient diets, CLA

reduced circulating triacylglycerides and adipose tissue weight; however, these changes and the increased liver size would allow postulating that a similarity with some alterations observed in the beginning of the lipodystrophy syndrome in other experimental models might be present in these rats.

**KEYWORDS:** Essential fatty acid deficiency, Conjugated linolenic acid, Nutrition, Lipid metabolism.

---

### Introducción

El ácido linoleico (AL: 9c,12c-18:2) y el ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA: 9c,12c,15c-18:3) son los dos ácidos grasos esenciales (AGE) para el hombre, y su esencialidad se debe a la incapacidad de los seres humanos para añadir dobles enlaces en las posiciones n-3 y n-6 de la cadena acílica, por carecer de las enzimas  $\Delta$ 12 y  $\Delta$ 15 desaturasas. Debido a esto, ambos ácidos grasos (AG) deben ser suministrados por la dieta (1). Los AGE cumplen numerosas funciones biológicas, entre ellas, determinan ciertas propiedades de membranas celulares y son precursores de AG poliinsaturados (AGPI) de cadena larga (20 y 22 átomos de carbono) y de eicosanoides que regulan diferentes procesos biológicos (2). Los AGE, y sus derivados, cumplen un rol fundamental en el crecimiento y desarrollo normal, como asimismo desempeñan un importante papel en el desarrollo y/o prevención de enfermedades crónicas no transmisibles, como enfermedades coronarias, hipertensión, artritis, enfermedades inflamatorias y autoinmunes, diversos tipos de cáncer y en el control de la homeostasis de los lípidos (3). Por con-

siguiente, tanto en seres humanos, como en animales de experimentación, las consecuencias de la deficiencia de AGE incluyen, entre otras (4): retraso del crecimiento, pérdida de la integridad cutánea, alteraciones en la reproducción, degeneración hepática y renal, esteatosis hepática, fragilidad capilar, modificaciones en la composición de AG de los lípidos tisulares y aumento de la susceptibilidad a infecciones (5). Además, la deficiencia de AGE puede agravar la malabsorción de grasas, empeorando la carencia de AGE (6,7). La deficiencia de AGE no es frecuentemente observada; no obstante ciertos pacientes pueden tener una deficiencia marginal de AGE que los tornan vulnerables a trastornos metabólicos.

Por otro lado, los conjugados del ácido linoleico (CLA) son un grupo de isómeros geométricos y posicionales derivados del AL, producidos durante la biohidrogenación de AGPI en el rúmen de los animales poligástricos, o por procesos industriales. En los productos naturales prevalece el 9c,11t-18:2 (9c,11t-CLA), mientras que en las preparaciones comerciales que se expenden como suplementos dietéticos

para reducir de peso o como ayudas ergogénicas, se presentan principalmente y en cantidades equimoleculares, los isómeros 9c,11t-CLA y 10t,12c-18:2 (10t,12c-CLA). Diversos efectos benéficos han sido reportados en relación a los CLA. Entre ellos en diferentes modelos animales se les han atribuido propiedades anticancerígenas (8), antiaterogénicas (9), antiobesogénicas (9–11), como asimismo se ha observado que los CLA mejoran los niveles de lípidos y lipoproteínas circulantes (12) e incrementan la masa magra corporal (13). En contraposición, también efectos adversos han sido reportados debidos a la ingesta de CLA, entre ellos, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia y esteatosis hepática masiva en ratones (11,14,15). En general, los efectos mencionados de los CLA dependen de muchos factores, como el tipo de isómero, la especie, sexo, condición fisiológica y nutricional (16).

Dado que los CLA se incorporan en los tejidos y podrían actuar como sustratos alternativos o competir en el metabolismo de los AGE y sus derivados (17,18), el objetivo del presente estudio fue investigar si los CLA podrían atenuar o potenciar algunas alteraciones observadas en un modelo animal de deficiencia marginal de AGE. El estudio fue centrado en la incorporación diferencial de CLA en tejidos y su efecto sobre la deficiencia en AGE, como también sobre parámetros nutricionales, niveles de lípidos plasmáticos y tisulares, y algunos de los mecanismos implicados en su regulación.

## **Materiales y métodos**

### **• Materiales**

La mayoría de los componentes, incluyendo vitaminas y minerales para la preparación de las dietas fueron al menos

grado químico, a excepción del aceite de maíz (Arcor, Córdoba, Argentina), aceite de coco hidrogenado (Castoroil, Buenos Aires, Argentina), aceite rico en CLA (Lipid Nutrition B.V., Wormerveer, The Netherlands), sacarosa, celulosa y almidón de maíz, que fueron de grado alimenticio y se obtuvieron a partir de fuentes locales. El aceite de maíz fue utilizado como una fuente de AG insaturados; el aceite de coco fue utilizado para producir una deficiencia moderada de AGE y el aceite rico CLA se utilizó como fuente equimolecular de 9c,11t-CLA y 10t,12c-CLA. Los estándares utilizados fueron adquiridos en Sigma Chemical Co (St Louis, MO, EE UU). Los solventes y reactivos utilizados para la cuantificación de AG fueron de grado cromatográfico, y los demás reactivos químicos utilizados fueron, al menos, de grado reactivo analítico ACS. Los kits de pruebas comerciales se obtuvieron de la Sociedad de Bioquímicos (Santa Fe, Argentina).

### **• Animales, dietas y diseño experimental**

Todos los protocolos seguidos en los estudios fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral y acorde a la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación en el Laboratorio (19). Ratas Wistar macho con un peso de 70–80 g se mantuvieron en un bioterio bajo condiciones controladas ( $23 \pm 2$  °C y ciclo de 12 hs. luz-oscuridad). Los animales tuvieron libre acceso a agua y dieta estándar de laboratorio antes del período experimental. Después de alcanzar 100–120 g, fueron divididos en cuatro grupos de similar peso ( $n=6$  por grupo). Los animales fueron alojados en jaulas metabólicas de acero inoxi-

dable individuales y alimentados *ad libitum* durante 60 días con dieta suficiente en AGE (SAGE), dieta deficiente en AGE (DAGE), dieta SAGE suplementada con aceite rico CLA (SAGE+CLA) o dieta DAGE suplementada con aceite rico CLA (DAGE+CLA).

La composición de las dietas se presenta en la Tabla 1, y se basó en las recomendaciones del Comité del Instituto Americano de Nutrición (AIN-93G) (20). Todas las dietas fueron isoenergéticas, proporcionando teóricamente 16,6 kJ/g. La dieta SAGE contuvo 7 % de aceite de maíz (20 % de la energía) como fuente de grasa de

la dieta. En la dieta DAGE, el 7 % del aceite de maíz fue sustituido por 7 % de aceite de coco hidrogenado libre en AG trans. La suplementación con CLA se logró mediante la sustitución del 1 % de aceite de maíz (SAGE+CLA) o del 1 % de aceite de coco hidrogenado (DAGE+CLA) por el aceite rico en CLA (mezcla de isómeros 9c,11t-CLA y 10t,12c-CLA, aproximadamente 35-40 % de cada uno). Excepto por el tipo de grasas, todas las dietas fueron idénticas y preparadas cada 3 días durante todo el período experimental.

**Tabla 1.** Composición de las dietas experimentales.

Componentes dietarios (g/kg dieta)	SAGE	DAGE	SAGE+CLA	DAGE+CLA
Almidón de maíz	529,5	529,5	529,5	529,5
Caseína	200	200	200	200
Sacarosa	100	100	100	100
Aceite de maíz	70	–	60	–
Aceite deficiente en AGE	–	70	–	60
Aceite rico en CLA	–	–	10	10
Fibras	50	50	50	50
Mezcla de vitaminas	35	35	35	35
Mezcla de minerales	10	10	10	10
L-Cisteína-L-metionina	3,0	3,0	3,0	3,0
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Energía (KJ/g)	16,6	16,6	16,6	16,6

Las dietas fueron preparadas de acuerdo con AIN-93G (20).

#### • Protocolo experimental

Tres veces a la semana se registró el peso de los animales, la ingesta de alimentos y se recogieron las heces, a lo largo de todo el tratamiento dietario. La ingesta de alimentos se ajustó mediante la colección de los restos de alimentos. Las heces se deshidrataron y almacenaron a –80 °C hasta su análisis. En

la mañana del día 60, los animales se sacrificaron bajo condiciones de anestesia (1 mg de acepromacina + 100 mg de ketamina/kg de peso corporal), el cuerpo fue desprovisto del pelo y eviscerado.

Las carcasas fueron pesadas, trituradas y congeladas a –80°C hasta el análisis de su composición centesimal. Otros

grupos de animales fueron tratados nutricionalmente y sacrificados en las mismas condiciones que fueran detalladas con el fin de obtener sangre y tejidos para diversas determinaciones, o para llevar a cabo diferentes experimentos in vivo. El suero se obtuvo por centrifugación después de la extracción de la sangre y de eliminar el coagulo resultante. Los hígados, músculos gastrocnemio, tejido adiposo epididimal (TAE), tejido adiposo retroperitoneal (TARP) y cerebro se pesaron y almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

#### • Composición de AG de los aceites dietarios

La composición de AG de los aceites dietarios (Tabla 2) se determinó por cromatografía gaseosa con un cromatógrafo Shimadzu (GC 2014) equipado con un detector de ionización de llama como ésteres metílicos de los AG (FAME). Los derivados metílicos se formaron por transesterificación con una solución de hidróxido de potasio–metanólico en una etapa intermedia antes de la saponificación (21). Los FAME se separaron en una columna capilar CP Sil 88

**Tabla 2.** Composición de AG de los aceites dietarios

Ácidos grasos (%)	Aceite de maíz	Aceite de coco deficiente en AGE	
		Aceite rico en CLA	
6:0	0,00	0,49	0,00
8:0	0,00	6,76	0,00
10:0	0,00	5,64	0,00
11:0	0,00	0,02	0,00
12:0	0,00	47,67	0,00
13:0	0,00	0,02	0,00
14:0	0,03	17,46	0,00
16:0	12,21	9,21	5,85
16:1	0,12	0,00	0,00
18:0	1,93	12,53	1,20
9c-18:1	31,95	0,05	9,05
11c-18:1	0,54	0,00	0,41
9c,12c-18:2	51,26	0,01	1,08
20:0	0,50	0,14	0,00
11c-20:1	0,25	0,00	0,00
9c,12c,15c-18:3	0,88	0,00	0,00
22:0	0,16	0,00	0,35
24:0	0,15	0,00	0,00
9c,11t-CLA	0,00	0,00	38,99
11c,13t-CLA	0,00	0,00	1,54
10t,12c-CLA	0,00	0,00	38,76
$\Sigma$ NI	0,00	0,00	3,11

NI: no identificado. Los valores son presentados como porcentaje de los FAME totales.

(100 m x 0,25  $\mu$ m diámetro), según metodologías oficiales (22). Los FAME se identificaron por comparación de sus tiempos de retención relativos con los de estándares comerciales u otros pertenecientes a ensayos interlaboratorios internacionales donde nuestro grupo ha participado. Los valores fueron expresados como porcentaje de los ésteres metílicos de los ácidos grasos totales.

#### • **Parámetros nutricionales**

El contenido de proteínas corporales fue cuantificado por el método de Kjeldahl (23), mediante el cual el nitrógeno en los homogeneizados de carcasa fue convertido a  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mediante digestión ácida. El contenido de proteínas se calculó multiplicando la cantidad de nitrógeno obtenida por el factor 6,25 (24). El contenido de agua se determinó mediante el secado de alícuotas de carcasa y de comida hasta peso constante en estufa a 60°C. El contenido total de grasa en las muestras secas de carcasa, comidas y heces se extrajo con éter de petróleo (23). El extracto de grasa se evaporó en un sistema de vacío y la grasa total se midió gravimétricamente. El consumo de energía se calculó multiplicando la cantidad de alimento consumido diariamente por el valor calórico (kJ/g) de la dieta. La eficiencia en la ganancia de peso se estimó como el porcentaje de la ganancia de peso (g) dividido por la ingesta energética (kJ/período experimental) durante 60 días. La absorción aparente de la grasa dietaria, como índice de biodisponibilidad, se evaluó como el porcentaje de la ingesta de grasas que no fue excretada en las heces (25).

#### • **Biomarcadores del estado nutricional de AGE y de la incorporación de los CLA**

La deficiencia de AGE generada a partir del tratamiento dietario en los grupos DAGE y DAGE+CLA, y la incorporación de isómeros CLA en los grupos SAGE+CLA y DAGE+CLA en los lípidos totales fueron evaluados mediante el análisis de los AG: AL, ALA, 5c,8c,11c–20:3, de la relación trieno/tetraeno (5c,8c,11c–20:3/5c,8c,11c,14c–20:4) y del contenido de los isómeros individuales CLA en suero, hígado, TAE y cerebro. El análisis de AG fue realizado mediante cromatografía gaseosa como fuera descrito anteriormente, previa extracción de las grasas totales (26).

#### • **Determinación de TG en suero, hígado y músculo gastrocnemio**

La determinación de los niveles de TG en el suero se llevó a cabo mediante un método espectrofotométrico utilizando kits comerciales. Los niveles de TG en hígado y músculo se determinaron en homogenatos de tejidos diluidos (1:10, p/p) con agua destilada por el método de Laurell (27).

#### • **Velocidad de secreción hepática de TG**

Para estimar la velocidad de secreción hepática de TG (VSTG) (28), otros grupos de animales fueron ayunados y anestesiados como se detalló anteriormente. Se tomaron muestras de sangre a tiempo 0 y luego de 120 minutos de la inyección vía intravenosa de 600 mg de Triton WR 1339 en solución salina por Kg de peso corporal. En muestras de suero correspondientes a tiempo 0 y 120 minutos posteriores a la inyección de la solución de Triton, se valoró la concentración de TG. La VSTG se estimó basándose en la acumulación sérica de TG durante los 120

minutos de experiencia, el volumen plasmático y el peso corporal como han sido previamente reportados (29).

#### • Actividad de la lipoproteína lipasa en tejido adiposo y músculo gastrocnemio

La actividad enzimática lipoproteína lipasa (LPL) en tejido adiposo se cuantificó en polvo de acetona de TAE por el método fluorométrico de Del Prado (30). Brevemente, muestras de TAE fueron delipidadas para la obtención del polvo acetónico. Los polvos obtenidos se resuspendieron e incubaron en solución buffer  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$ , 25 mM, pH 8,1 con 1 UI/ml de heparina. La reacción enzimática se llevó a cabo a 37 °C en un medio conteniendo buffer adecuado con di-butilil fluoresceína (DBF) como sus-

trato. La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo durante 5 minutos el aumento de fluorescencia ( $\lambda_{\text{excitación}} = 490$  nm;  $\lambda_{\text{emisión}} = 530$  nm) producto de la liberación de fluoresceína como consecuencia de la hidrólisis enzimática del DBF. En paralelo, el mismo ensayo se llevó a cabo en presencia de NaCl 1 M durante la incubación, para inhibir la actividad LPL y determinar la actividad enzimática inespecífica. La actividad de la LPL se determinó como la diferencia entre la actividad lipolítica no específica (determinada en presencia de NaCl 1 M) y la actividad lipolítica total (determinada en ausencia de NaCl 1 M). Los valores fueron expresados como nmol fluoresceína liberado/minuto/tejido total (nmol fluoresceína/minuto/g).

**Tabla 3.** Efecto de la deficiencia de AGE y de los CLA en parámetros nutricionales y composición corporal.

	SAGE	DAGE	SAGE+CLA	DAGE+CLA
Ingesta energética (KJ/d)	293,32±8,29	310,02±5,97	312,00±20,40	300,86±12,84
Ganancia de peso (g)	209,75±7,31	226,25±7,08	201,92±3,96	203,58±6,60
Eficiencia de la ganancia de peso (g/100 KJ)	1,20±0,06	1,22±0,05	1,10±0,07	1,13±0,05
<b>Utilización de grasa</b>				
Grasa ingerida (g/d)	1,27±0,04	1,38±0,05	1,38±0,09	1,45±0,07
Grasa fecal (mg/d)	27,12±0,80 <sup>a</sup>	18,80±1,22 <sup>b</sup>	24,77±2,40 <sup>a</sup>	15,59±2,86 <sup>b</sup>
Grasa fecal/Grasa ingerida (%)	2,24±0,05 <sup>a</sup>	1,38±0,10 <sup>bc</sup>	1,82±0,09 <sup>ab</sup>	1,07±0,15 <sup>c</sup>
Absorción aparente (%)	97,76±0,04 <sup>a</sup>		98,18±0,09 <sup>ab</sup>	98,23±0,15 <sup>c</sup>
<b>Composición de carcasa (g/100 g)</b>				
Proteínas	20,85±0,83	21,75±0,28	21,44±0,26	20,33±0,81
Grasa	16,08±0,60	17,29±0,55	16,95±0,41	15,13±0,80
Agua	58,52±0,65	56,88±0,73	55,72±0,81	58,91±0,75
<b>Peso tejidos (g/100 g)</b>				
Hígado	3,62±0,04 <sup>a</sup>	3,16±0,07 <sup>a</sup>	3,58±0,10 <sup>a</sup>	3,99±0,09 <sup>b</sup>
Músculo gastrocnemius	0,35±0,02	0,37±0,02	0,40±0,02	0,40±0,01
Tejido adiposo epididimal	2,32±0,10 <sup>a</sup>	2,69±0,13 <sup>a</sup>	2,34±0,09 <sup>a</sup>	1,65±0,04 <sup>b</sup>
Tejido adiposo retroperitoneal	2,31±0,08 <sup>a</sup>	2,14±0,18 <sup>a</sup>	2,14±0,18 <sup>a</sup>	1,64±0,12 <sup>b</sup>

Los resultados son presentados como el promedio ± SEM, n = 6 por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé. Los valores en la misma fila con diferentes supra-índices son significativamente diferentes (p<0,05).

Para evaluar la actividad LPL muscular, se homogeneizó el músculo gastrocnemio en buffer  $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$ -heparina (50 mmol/L, pH 8,6; conteniendo 4,0 UI/mL de heparina) y se incubó durante 15 min a 4 °C. La cuantificación de la actividad LPL en músculo se realizó como se ha descrito previamente para el tejido adiposo. La actividad medida fue expresada como nmol fluoresceína liberado/minuto/músculo total (nmol fluores/min/tej total).

#### • Análisis estadístico

Los valores fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de seis animales por grupo. Las diferencias estadísticas entre las medias se analizaron mediante un 2x2 ANOVA, siendo la suficiencia/deficiencia AGE y la suplementación con CLA las variables independientes. Las comparaciones múltiples post hoc se realizaron mediante la prueba de rango crítico de Scheffé. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de  $p < 0,05$  (31). Para comparar la incorporación de los CLA, se establecieron diferencias estadísticas entre las medias mediante la prueba t de Student para datos independientes.

### Resultados

#### • Estado fisiológico y parámetros nutricionales

Durante el período experimental, todos los animales mostraron un buen estado de salud, sin ninguna manifestación fisiológica de la deficiencia de AGE o síntomas toxicológicos debido al tratamiento con CLA. Además, no se observaron síntomas de alteraciones intestinales o hepatomegalia por ninguno de los tratamientos. Sin embargo,

a pesar de ser la ingesta de grasa similar entre los grupos, la deficiencia de AGE, independientemente de la adición o no de CLA, redujo la excreción de grasa fecal, lo que condujo a un aumento en la absorción aparente de la grasa dietaria. El consumo promedio diario de energía no difirió entre los grupos, como tampoco lo hicieron la ganancia de peso corporal, ni la eficiencia en la ganancia de peso. Sin embargo, los CLA en deficiencia de AGE, generaron una disminución en el peso del TAE y TARP, y un aumento en el peso del hígado.

#### • Biomarcadores de la deficiencia de AGE e incorporación de los CLA en los lípidos totales de suero y tejidos

En la actualidad es difícil considerar un único y específico biomarcador de deficiencia de AGE, como asimismo un único tejido donde evaluarlo. En este sentido, y para investigar la influencia de los CLA sobre la deficiencia de AGE, evaluamos los niveles de AL, ALA y 5c,8c,11c-20:3, la relación trieno/tetraeno (5c,8c,11c-20:3/5c,8c,11c,14c-20:4), como asimismo el contenido de los CLA en suero, hígado, tejido adiposo y cerebro (Tabla 4). Bajo nuestras condiciones experimentales, los niveles de AL mostraron una reducción significativa por la deficiencia de AGE en los grupos suplementados o no con CLA y este efecto fue independiente del tejido considerado. La excepción fue el cerebro, que mostró una resistencia a la deficiencia de AGE y sólo se observó una disminución de los niveles de AL estadísticamente significativa en el grupo DAGE+CLA frente al grupo SAGE. Además, los CLA, redujeron significativamente los niveles de AL en hígado y tejido adiposo en animales con

dietas SAGE. Los niveles de ALA mostraron un efecto diferencial en función del tejido considerado; específicamente, en suero, no se vieron modificados por la deficiencia de AGE independientemente de la presencia o no de CLA. Sin embargo, en estas mismas condiciones, los niveles de ALA se vieron reducidos en hígado y TAE, alcanzando niveles no detectables en el TAE. Así como para el AL, el cerebro mostró una alta resistencia a cambios de los niveles de ALA. Los CLA, redujeron significativamente los niveles de ALA en hígado y TAE de animales independientemente de la adecuación o deficiencia de AGE. El 5c,8c,11c-20:3, un AG derivado de la síntesis exacerbada

de AGPI de la familia n-9 en condiciones de deficiencia de AGE, fue detectado en suero, hígado y cerebro de animales deficientes en AGE. Como consecuencia, la relación trieno/tetraeno en dichos tejidos fue incrementada por la deficiencia de AGE independientemente de la presencia de CLA. Cabe destacar que, en cerebro de animales del grupo DAGE los niveles de 5c,8c,11c-20:3, fueron mayores que en el grupo DAGE+CLA, y que en TAE dicho AG se encontró por debajo del límite de detección. Por esta última razón, los niveles de 5c,8c,11c-20:3 y la relación trieno/tetraeno no fueron mostrados.

**Tabla 4.** Efecto de la deficiencia de AGE y de los CLA sobre biomarcadores de déficit de AGE y retención de isómeros.

	SAGE	DAGE	SAGE+CLA	DAGE+CLA
<b>Suero</b>				
9c,12c-18:2	20,20±0,59 <sup>bc</sup>	7,89±0,53 <sup>b</sup>	19,91±1,15 <sup>c</sup>	13,42±0,30 <sup>d</sup>
9c,12c,15c-18:3	0,22±0,01	0,20±0,01	0,24±0,02	0,19±0,03
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,36±0,05 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,32±0,07 <sup>b</sup>
9c,11t-CLA	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,74±0,10 <sup>b</sup>	0,89±0,11 <sup>b</sup>
10t,12c-CLA	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,55±0,06 <sup>b</sup>	0,42±0,11 <sup>b</sup>
Relación: trieno/tetraeno	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,04±0,01 <sup>b</sup>
<b>Hígado</b>				
9c,12c-18:2	21,19±0,63 <sup>a</sup>	5,13±0,20 <sup>bcd</sup>	15,78±1,27 <sup>c</sup>	7,40±0,52 <sup>d</sup>
9c,12c,15c-18:3	0,29±0,03 <sup>a</sup>	0,07±0,03 <sup>bcd</sup>	0,15±0,02 <sup>cd</sup>	0,07±0,01 <sup>d</sup>
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,27±0,04 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,22±0,03 <sup>b</sup>
9c,11t-CLA	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,86±0,13 <sup>b</sup>	0,89±0,07 <sup>b</sup>
10t,12c-CLA	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,33±0,04 <sup>b</sup>	0,23±0,03 <sup>b</sup>
Relación: trieno/tetraeno	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>b</sup>
<b>Tejido adiposo</b>				
9c,12c-18:2	34,30±1,00 <sup>a</sup>	1,86±0,08 <sup>bcd</sup>	28,92±1,97 <sup>c</sup>	2,52±0,42 <sup>d</sup>
9c,12c,15c-18:3	0,67±0,05 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>	0,48±0,06 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>b</sup>
9c,11t-CLA	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	2,71±0,09 <sup>b</sup>	2,39±0,10 <sup>c</sup>
10t,12c-CLA	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	1,23±0,07 <sup>b</sup>	0,61±0,05 <sup>c</sup>

	SAGE	DAGE	SAGE+CLA	DAGE+CLA
<b>Cerebro</b>				
9c,12c-18:2	1,04±0,26 <sup>a</sup>	0,86±0,28 <sup>ab</sup>	0,95±0,12 <sup>ab</sup>	0,46±0,06 <sup>b</sup>
9c,12c,15c-18:3	0,01±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,40±0,02 <sup>c</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,28±0,03 <sup>b</sup>
9c,11t-CLA	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
10t,12c-CLA	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Relación: trieno/tetraeno	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,01 <sup>b</sup>	0,00±0,00 <sup>a</sup>	0,02±0,01 <sup>b</sup>

Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  SEM,  $n = 6$  por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé. Los valores en la misma fila con diferentes supra-índices son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Los CLA dietarios fueron incorporados en el suero, hígado y tejido adiposo, mientras que el cerebro se mostró completamente resistente a la incorporación de los isómeros presentes en la dieta. Pese a que la suplementación con CLA, aporta cantidades equimoleculares de los isómeros 9c,11t-CLA y 10t,12c-CLA, el grado de retención tisular del primero fue superior que el del isómero 10t,12c-CLA. Por otra parte, la deficiencia de AGE, no afectó la incorporación de los isómeros, excepto en tejido adiposo, donde los niveles de 9c,11t-CLA y 10t,12c-CLA se vieron reducidos en el grupo DAGE+CLA.

#### • Niveles y regulación de TG séricos y tisulares

Como puede observarse en la Tabla 5, los niveles de TG séricos fueron reducidos por la deficiencia de AGE, siendo ésta reducción más acentuada en presencia de isómeros CLA. En hígado, la deficiencia de AGE, redujo los niveles de TG, pero fueron normalizados cuando se adicionaron los

CLA. Los CLA, *per se* no modificaron los niveles de TG séricos ni hepáticos en animales con adecuación de AGE, no obstante en deficiencia de AGE los CLA redujeron los niveles séricos e incrementaron los hepáticos de TG. El contenido de TG muscular no fue afectado por la deficiencia de AGE, ni por los CLA, no obstante los niveles de TG en el grupo DAGE+CLA fue significativamente menor al grupo SAGE+CLA. La VSTG aumentó significativamente por efecto de la deficiencia de AGE, y este aumento, se normalizó por la adición de CLA. Los CLA en SAGE no modificaron dicha VSTG. La actividad de la enzima LPL en TAE, expresada por tejido total, fue incrementada significativamente por la deficiencia de AGE y por la suplementación con CLA, y el efecto fue aditivo por acción conjunta de ambas variables. La actividad de la LPL en músculo gastrocnemio no se vio modificada por la deficiencia de AGE ni por la suplementación con CLA.

**Tabla 5.** Efecto de la deficiencia de AGE y de los CLA sobre los niveles de TG y su regulación.

	SAGE	DAGE	SAGE+CLA	DAGE+CLA
Niveles de TG				
Suero (g/l)	1,27±0,17 <sup>a</sup>	0,82±0,06 <sup>b</sup>	1,21±0,09 <sup>a</sup>	0,58±0,03 <sup>c</sup>
Hígado (μmol/g)	19,85±1,06 <sup>ac</sup>	14,12±1,68 <sup>b</sup>	23,04±1,72 <sup>c</sup>	19,82±1,55 <sup>ac</sup>
Músculo (μmol/g)	4,63±0,44 <sup>ab</sup>	3,64±0,32 <sup>a</sup>	5,84±0,27 <sup>b</sup>	3,55±0,23 <sup>a</sup>
VSTG (nmol/min.100g)	160,78±4,83 <sup>ac</sup>	240,54±11,06 <sup>b</sup>	155,62±6,18 <sup>c</sup>	169,55±10,07 <sup>ac</sup>
Act. LPL en TA (nmol fluores/min/tej total)	0,53±0,09 <sup>a</sup>	1,73±0,09 <sup>bc</sup>	1,44±0,12 <sup>c</sup>	3,04±0,10 <sup>d</sup>
Act. LPL en músculo (nmol fluores/min/tej total)	3,56±0,39	3,99±0,51	4,30±0,39	4,20±0,17

Los resultados son presentados como el promedio ± SEM, n = 6 por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido del test de Scheffé. Los valores en la misma fila con diferentes supra-índices son significativamente diferentes (p<0,05).

## Discusión

La deficiencia de AGE o desequilibrios en la ingesta de los mismos están asociados a profundas alteraciones metabólicas (1–3). Dado que deficiencias moderadas o marginales sin manifestaciones clínicas son factibles de ser encontradas en nuestra población, en el presente trabajo se empleó una deficiencia marginal de AGE, antes de que las manifestaciones de la deficiencia se evidencien. Nuestro estudio muestra que, si bien los CLA pueden actuar como sustratos alternativos o competir en las vías de metabolización con los AGE, la suplementación con estos isómeros en animales con deficiencia marginal de AGE tuvo diferente respuesta dependiendo del tejido considerado, pero notoriamente produjo alteraciones nutricionales y en el metabolismo lipídico.

En nuestro modelo experimental con ratas, la máxima retención de CLA fue observada en tejido adiposo, seguido de hígado y suero, sin ser afectada por la deficiencia de AGE. La elevada retención de CLA en el tejido adiposo y su alta correla-

ción con la ingesta de ciertos ácidos grasos, como los AGPI e isómeros de AG (32), ha permitido que los niveles de estos AG en tejido adiposo, sean empleados como biomarcadores de consumo. En cerebro, no fueron detectados los isómeros, confirmando la alta resistencia y selectividad de este tejido reportada por Shelton (33). Así, estos resultados en su conjunto, confirman la incorporación preferencial de CLA en los tejidos ricos en lípidos neutros (34). La mayor retención del 9c,11t-CLA que la del 10t,12c-CLA, está en concordancia con la propuesta de Banni (35) quien concluyó que diferencias en la β-oxidación peroxisomal entre 9c,11t-CLA y 10t,12c-CLA podrían ser responsables, al menos en parte, de las diferencias observadas entre estos dos isómeros en algunos sistemas biológicos. Además, dado que deficiencias en AGE conducen a una mayor β-oxidación de AG (36), los niveles de ambos isómeros fueron menores en los animales del grupo DAGE+CLA que en los del SAGE+CLA. Esta razón, asociada a la diferencial β-oxi-

dación de los isómeros podría justificar la acentuada reducción de los niveles del 10t,12c-CLA en el grupo DAGE+CLA.

Los niveles de AL, ALA y 5c,8c,11c-20:3, como así también la relación trieno/tetraeno, indicadores de deficiencia de AGE, se modificaron en diferente manera, en función de la dieta recibida, del tejido y del AG considerado. Específicamente, los niveles de AL fueron marcadamente reducidos en tejido adiposo, hígado y suero por la deficiencia en AGE, no mostrando influencia a nivel de cerebro. La suplementación con CLA sólo redujo los niveles de AL en hígado de animales con suficiencia en AGE, los cuales podrían estar asociados a una sustitución del AL por los CLA y a una incrementada  $\beta$ -oxidación, como fuera demostrado en ratones (37,38), pero no por algunos autores en ratas (39). Es dable mencionar, que la velocidad de oxidación de AG hepática es mayor conforme incrementa la insaturación de los AG (40); así un incremento en la  $\beta$ -oxidación mitocondrial y peroxisomal inducida por los CLA podría conducir a un descenso diferencial de los AGE. Notoriamente, los CLA en animales deficientes en AGE mostraron un efecto dual. Si bien, atenuaron la deficiencia de AL en suero, condujeron a una notoria disminución de sus niveles en cerebro. En forma semejante a lo reportado en ratones por Hargrave (41), a nivel hepático y en tejido adiposo, los CLA no modificaron los reducidos niveles de AL generados por la deficiencia de AGE. Tal como se podía esperar, la deficiencia de AGE y los CLA en suficiencia de AGE redujeron los niveles de ALA en hígado y tejido adiposo, mientras que en suero y cerebro no se observaron cambios por ningún tipo de tratamiento. Como fuera sugerido para el AL, los CLA en hígado y tejido

adiposo podrían estar sustituyendo al ALA, como asimismo incrementar la  $\beta$ -oxidación, efecto que no ha sido observado en suero y cerebro. Una respuesta diferente del AL y ALA ha sido observada cuando los animales presentaron deficiencia de AGE suplementada con CLA en suero y cerebro, mostrando el ALA una mayor resistencia a cambios composicionales. Como ha sido observado por otros autores (42), nuestros resultados hacen sugerir que en respuesta a la deficiencia marginal de AGE (menos del 2 % de energía como AL), la biosíntesis de AGPI de cadena larga fue exacerbada, conduciendo así a un incremento en la formación del ácido 5c,8c,11c-20:3 y como consecuencia de la relación trieno/tetraeno. Ambos indicadores de deficiencia de AGE, presentan niveles equivalentes en suero e hígado en los grupos deficientes de AGE independientemente de la suplementación con CLA; no obstante, el ácido 5c,8c,11c-20:3 no ha sido detectado en tejido adiposo. Si bien es conocido que el tejido adiposo puede sintetizar el 5c,8c,11c-20:3 (43), es probable que la ausencia de dicho AG sea debida a que, bajo niveles marginales de AL en circulación, una liberación de AGPI desde el tejido adiposo (44) hacia circulación tiende a compensar el déficit. Es importante considerar que, si bien el 5c,8c,11c-20:3 no es un sustrato para la formación de eicosanoides, el mismo puede ser liberado a circulación para suplir a los AGPI de las familias n-6 y n-3 en las membranas biológicas (44). Un efecto diferente a los anteriormente descritos ha sido observado en cerebro, donde los AGPI provienen preferentemente de una captación de AG desde circulación (45), dado que la biosíntesis de AGPI de cadena larga a partir de sus precursores no

es cuantitativamente muy importante. Así, ante la deficiencia de AGE, podemos interpretar que el cerebro incorpora desde la circulación al 5c,8c,11c-20:3 para funciones estructurales de membranas. Asimismo, podríamos postular que en cerebros de animales con deficiencia en AGE suplementados con CLA, la incorporación de metabolitos de los mismos isómeros compitan con la incorporación del 5c,8c,11c-20:3, conduciendo a menores niveles de dicho AG que en cerebros de animales que no fueron suplementados con CLA. Además, los cambios observados a nivel de cerebro no descartan la posibilidad que otras hipótesis se puedan presentar, por ejemplo, un recambio diferencial de los AG en los lípidos tisulares también podría estar involucrado (46).

Estos cambios que, en diferente grado se produjeron en la composición de AG de los lípidos circulantes y tisulares, fueron acompañados con mecanismos compensatorios y modificaciones nutricionales y metabólicas. Así, es probable que en los animales con dieta DAGE y DAGE+CLA, el descenso de la excreción de grasa fecal, y en consecuencia la mayor absorción de AG, sea una respuesta tendiente a incorporar más AGE. Esta propuesta no excluye que la mayor absorción intestinal sea también debida a la diferencial velocidad de absorción de los AG constitutivos de las dietas (47). No obstante, en todas las dietas la absorción aparente fue muy elevada y la diferencia entre los grupos no condujo a modificaciones en el peso corporal de los diferentes animales. Otros autores (48,49) reportaron que los animales con dietas DAGE presentaron una menor absorción de grasa, y consecuentemente una menor ganancia de peso corporal. Es probable que las diferencias sean atribuidas a los diseños experimenta-

les, dado que en nuestro modelo las ratas fueron sometidas a una deficiencia marginal de AGE y no a una profunda deficiencia como en otros trabajos.

Hallazgos de distintos investigadores, incluyendo resultados nuestros, han demostrado que el ratón (50-51), pero no la rata (39,52), es muy sensible a variaciones en el peso, como también en la masa grasa y magra corporal. Es notorio que en el presente trabajo, ni la suplementación con CLA, ni la deficiencia de AGE, modificaron estos parámetros, pero la suplementación con CLA en los animales con deficiencia en AGE condujo a ciertas alteraciones observadas en modelos más sensibles como las descritas en el ratón, incluyendo reducción del tejido adiposo e incremento del peso hepático. En este sentido, la disminución del peso de los panículos adiposos epididimales y retroperitoneales observada por la suplementación con CLA en deficiencia de AGE, probablemente responda a un aumento en la velocidad de oxidación de AG en este tejido inducido conjuntamente por la presencia de CLA y la deficiencia de AGE, como también ocurre en otros modelos experimentales (41,53), y/o a una incrementada lipólisis de TG, como sugiere Ippagunta (54). Estos hallazgos están de acuerdo a los cambios mencionados anteriormente en los niveles de AL y ALA en tejido adiposo, y también es claramente soportado por una mayor  $\beta$ -oxidación descrita por otros autores en tejido adiposo de ratones (10,37), siendo controvertido en ratas (39,52). La marcada reducción del tejido adiposo pareciera estimular una mayor captación de AG por el mismo, y esto se refleja por la incrementada actividad de la enzima LPL observada en el TAE, que no alcanza a contrarrestar la elevada  $\beta$ -oxi-

dación y probablemente la mayor lipólisis. Podemos así proponer que esta mayor actividad LPL, importante en la captación de AG por el adipocito, pero asimismo clave en la remoción de TG circulantes, podría ser al mismo tiempo un factor determinante de la reducción de los niveles de TG observada en plasma. Es de destacar que hemos encontrado en similitud a otros autores que, tanto la deficiencia de AGE como la suplementación con CLA, aumentaron la actividad LPL en tejido adiposo (55) y este efecto se potenció con la conjunción de ambos tratamientos. En cambio, otros autores bajo diferentes condiciones en adipocitos aislados (56,57) y en tejido adiposo (58), han encontrado que la actividad de la enzima LPL se encuentra disminuida por la acción de los CLA. Relacionado a dicha actividad, en tejido adiposo bajo diferentes modelos experimentales, se han encontrado distintas respuestas sobre los TG circulantes (58,59). No obstante, en la mayoría de los estudios en ratas normales, los CLA tienen muy poco efecto sobre los mismos; y es notorio como en el presente trabajo, la conjunción de la deficiencia de AGE con la suplementación con CLA tuvieron un efecto aditivo sobre la actividad LPL en tejido adiposo, sin cambios en la actividad LPL de músculo, conduciendo a una profundización de la reducción de los TG circulantes.

Otro hallazgo interesante de puntualizar, es el incremento en el peso del hígado, sin formación de hígado graso, comprobado en las ratas con deficiencia marginal de AGE suplementadas con CLA. Esta observación, en ratas alimentadas con CLA a niveles suficientes de AGE, no ha sido hallada en la presente experiencia pero ha sido comúnmente encontrada en ratones (15), independientemente de la ingesta de AGE. No dis-

ponemos de evidencias experimentales que justifiquen el incremento del peso hepático, pero si, es dable postular que algunas alteraciones observadas en el síndrome lipodistrófico inducido por el 10t,12c-CLA en ratones, se produzcan en la rata en forma más atenuada, cuando se conjugan los efectos de ingesta de CLA con déficit marginal de AGE. Así, en caso de compartir mecanismos metabólicos, en la rata se debería observar una elevación de los niveles de insulina como se aprecia en el ratón alimentado con CLA, para de este modo promover la síntesis proteica conduciendo al incremento del peso hepático. Esto no deja de ser una hipótesis que requiere mayor grado de investigación para así establecer una similitud metabólica entre los efectos de los CLA en ratones normales y en ratas con deficiencia marginal de AGE. No obstante, también es importante considerar que en los ratones, la esteatosis hepática inducida por los CLA está estrechamente relacionada a la hiperinsulinemia, y en nuestro modelo no hemos encontrado una acumulación de lípidos en hígado. La ausencia de dicha alteración podría deberse, entre otras causas, a que la disminución de los TG hepáticos inducida por la deficiencia de AG compensa el incremento de lípidos inducido por los CLA. Estas variaciones en los niveles de TG hepáticos se correlacionaron inversamente con los cambios en la velocidad de secreción de TG observados en nuestras experiencias.

En numerosos estudios se ha encontrado que las ratas son más resistentes a la acción de los CLA sobre el metabolismo lipídico que otras especies, como el ratón. Alteraciones semejantes a las observadas en ratones han sido reportadas por nuestro grupo (50) en ratas cuando los animales presentaban

desnutrición calórico–proteica, y por Sugano (60) en ratas bajo condiciones de estimulada  $\beta$ -oxidación en tejido adiposo.

### Conclusiones

Los CLA presentaron una capacidad diferencial de incorporación a distintos tejidos de rata, mostrando una alta retención en tejido adiposo y una resistencia a la incorporación en el cerebro.

No se puede concluir que los CLA atenuan la deficiencia de AGE, dado que la suplementación de CLA a ratas alimentadas con dietas deficientes en AGE no modificó en el mismo sentido todos los marcadores plasmáticos y tisulares empleados para evaluar dicho déficit.

En animales alimentados con dietas suficientes en AGE, los CLA se incorporan en los tejidos, sin causar cambios significativos en los parámetros evaluados.

Si bien puede considerarse que la reducción de TG circulantes y la disminución del tejido adiposo producida por los CLA en animales alimentados con dietas deficientes en AGE podrían ser efectos deseables, es posible que la continuación en el tiempo de este estado nutricional conduzca a profundas alteraciones, generalmente observadas en la lipodistrofia presente en otros modelos experimentales.

Dado que la deficiencia marginal de AGE es ocasionalmente observada en la población y puede ser desconocida por el individuo, más estudios deben ser realizados para dilucidar el efecto específico que poseen los CLA de origen comercial bajo situaciones nutricionales que puedan potenciar ciertas alteraciones metabólicas.

### Agradecimientos

Agradecemos al Sr. Walter DaRú y a la Srita. Mónica Nasimbera por sus asistencias técnicas. También agradecemos el apoyo financiero recibido de la Universidad Nacional del Litoral – Cursos de Acción para la Investigación y Desarrollo (CAI+D 2009 PI–08–36) – Secretaría de Ciencia y Técnica – UNL – y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP CONICET # 112–200801– 02831).

### Presentación del trabajo a congresos

Los resultados del mismo han sido parcialmente presentados y discutidos en II Congreso de la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). Barcelona, España, 2010 y XVI Congreso Latinoamericano de Nutrición. SLAN. La Habana, Cuba, 2012.

### Referencias bibliográficas

1. Smit, E.N.; Muskiet, F.A.J. y Boersma, E.R., 2004. The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids. **71**: 241–250.
2. Innis, S.M., 1991. Essential fatty acids in growth and development. Progress in Lipid Research. **30**: 39–103.
3. Simopoulos, A.P., 1991. Omega–3 fatty acids in health and disease and in growth and development. American Journal of Clinical Nutrition. **54**: 438–463.
4. Holman, R.T., 1971. Essential fatty acids deficiency. Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids. **9**: 275–348.
5. Hansen, A.E.; Beck, O. y Wiese, H.F., 1948. Susceptibility to infection manifested by dogs on a low fat diet. Federation Proceedings. **7**: 289.
6. Levy, E.; Garofalo, C.; Thibault, L.; Dionne, S.;

- Daoust, L.; Lepage, G. y Roy, C.C., 1992. Intraluminal and intracellular phases of fat absorption are impaired in essential fatty acid deficiency. *American Journal of Physiology*. **262**: 319–326.
7. Li, Q.; Tan, L.; Wang, C.; Li, N.; Li, Y.; Xu, G. y Li, J., 2006. Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts. *European Journal of Nutrition*. **45**: 144–151.
8. Ip, C., 1997. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. *American Journal of Clinical Nutrition*. **66**: 1523–1529.
9. Wang, Y.W. y Jones, P.J.H., 2004. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. *International journal of obesity and related metabolic disorders. Journal of the International Association for the Study of Obesity*. **28**: 941–955.
10. 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.
11. 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. *American Journal of Physiology*. **275**: 667–672.
12. Lee, K.N.; Kritchevsky, D. y Pariza, M.W., 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*. **108**: 19–25.
13. Tsuboyama-kasaoka, N.; Takahashi, M.; Tanemura, K.; Kim, H.; 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.
14. Clement, L., 2002. Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *Journal of Lipid Research*. **43**: 1400–1409.
15. Poirier, H.; Niot, I.; Clément, L.; Guerre-Millo, M.; Besnard, P., 2005. Development of conjugated linoleic acid (CLA)-mediated lipodystrophic syndrome in the mouse. *Biochimie*. **87**: 73–9.
16. Plourde, M.; Jew, S.; Cunnane, S. and Jones, P., 2008. Conjugated linoleic acids: why the discrepancy between animal and human studies?. *Nutrition Reviews*. **66**: 415–421.
17. Banni, S., 2002. Conjugated linoleic acid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*. **13**: 261–266.
18. Sébédio, J.L.; Juanéda, 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. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1345**: 5–10.
19. Bayne, K., 1996. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. *American Physiological Society. The Physiologist*. **39**: 208–211.
20. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H. y Fahey, G.C., 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. *Journal of Nutrition*. **123**: 1939–1951.
21. Animal and vegetable fats and oils—Preparation of methyl esters of fatty acids, 2000. En ISO 5509.
22. David Firestone ed., 2009. Fatty acids in extracted fats by GC. In *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*.
23. Windham W., 1999. Animal feed. In Cunniff, P. (ed.), *Official Methods of Analysis of AOAC International*, Vol. 1.
24. Rafecas, I.; Esteve, M.; Fernández-López, J.A.; Remesar, X. y Alemany, M., 1994. Whole-rat protein content estimation: applicability of the N x 6.25 factor. *British Journal of Nutrition*. **72**: 199–209.
25. Nicolosi, R.J.; Wilson, T.A.; Rogers, E.J. y Kritchevsky, D., 1998. Effects of specific fatty acids (8:0, 14:0, cis-18:1, trans-18:1) on plasma lipo-

- proteins, early atherogenic potential and LDL oxidative properties in the hamster. *Journal of Lipid Research*. **39**: 1972–1980.
- 26.** Bligh, E.G. y Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. **37**: 911–917.
- 27.** Laurell, S., 1966. A method for routine determination of plasma triglycerides. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*. **18**: 668–672.
- 28.** Otway, B.S.; Robinson, D.S.; French, T.W.R. y Otway, S., 1967. The effect of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) on the removal of triglyceride fatty acids from the blood of the rat. *Journal of Physiology*. **1339**: 309–319.
- 29.** Bernal, C.; Basílico, M.; Gutman, R. and 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.
- 30.** Del Prado, M.; Hernández-Montes, H. y Villalpando, S., 1994. Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase. *Archives of Medical Research*. **25**: 331–335.
- 31.** DeGroot, M., 1986. "Probability and statistics". Addison-Wesley (Reading).
- 32.** Baylin, A.; Kabagambe, E.K.; Siles, X. y Campos, H., 2002. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *American Journal of Clinical Nutrition*. **76**: 750–757.
- 33.** Shelton, V.J.; Shelton, A.G.; Azain, M.J. y Hargrave-Barnes, K.M., 2012. Incorporation of conjugated linoleic acid into brain lipids is not necessary for conjugated linoleic acid-induced reductions in feed intake or body fat in mice. *Nutrition Research*. **32**: 827–836.
- 34.** 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. *Journal of Lipid Research*. **42**: 1056–1061.
- 35.** Banni, S.; Petroni, A.; Blasevich, M.; Carta, G.; Cordeddu, L.; Murru, E.; Melis, M.P.; Mahon, A. y Belury, M.A., 2004. Conjugated linoleic acids (CLA) as precursors of a distinct family of PUFA. *Lipids*. **39**: 1143–1146.
- 36.** Portillo, M.P.; Serra, F.; Simon, E.; Del Barrio, A.S. y Palou, A., 1998. Energy restriction with high-fat diet enriched with coconut oil gives higher UCP1 and lower white fat in rats. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders. Journal of the International Association for the Study of Obesity*. **22**: 974–979.
- 37.** 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. *Physiological Genomics*. **21**: 351–361.
- 38.** 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**: 571–581.
- 39.** Martin, J.C.; Grégoire, S.; Siess, M.H.; Genty, M.; Chardigny, J.M.; Berdeaux, O.; Juanéda, P. y Sébédio, J.L., 2000. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids*. **35**: 91–98.
- 40.** Björntorp, P., 1968. Rates of oxidation of different fatty acids by isolated rat liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*. **243**: 2130–2133.
- 41.** Hargrave, K.M.; Azain, M.J. y Miner, J.L., 2005. Dietary coconut oil increases conjugated linoleic acid-induced body fat loss in mice independent of essential fatty acid deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1737**: 52–60.
- 42.** Sargent, J.R.; Bell, J.G.; Bell, M. V.; Henderson, R.J. y Tocher, D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology*. **11**: 183–198.

43. Hymans, B.T.; Stoll, L.L. y Spector, A.A., 1981. Accumulation of (n-9)-eicosatrienoic acid in confluent 3T3-L1 and 3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry*. **256**: 8863-8866.
44. Lord, R.S. y Bralley, J.A., 2008. "Laboratory evaluations for integrative and functional medicine". Metamatrix Institute, (Duluth).
45. Qi, K.; Hall, M. y Deckelbaum, R.J., 2002. Long-chain polyunsaturated fatty acid accretion in brain. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. **5**: 133-138.
46. Rapoport, S., 2011. NIH Public Access. **1791**: 1-22.
47. Bernard, A. y Carlier, H., 1991. Absorption and intestinal catabolism of fatty acids in the rat: effect of chain length and unsaturation. *Experimental Physiology*. **76**: 445-455.
48. Werner, A.; Minich, D.M.; Havinga, R.; Bloks, V.; Van Goor, H.; Kuipers, F. y Verkade, H.J., 2002. Fat malabsorption in essential fatty acid-deficient mice is not due to impaired bile formation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. **283**: 900-908.
49. Minich, D.M.; Vonk, R.J. y Verkade, H.J., 1997. Intestinal absorption of essential fatty acids under physiological and essential fatty acid-deficient conditions. *Journal of Lipid Research*. **38**: 1709-1721.
50. 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.
51. 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.
52. Ealey, K.N.; El-Sohemy, A. y Archer, M.C., 2002. Effects of dietary conjugated linoleic acid on the expression of uncoupling proteins in mice and rats. *Lipids*. **37**: 853-861.
53. 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. *Obesity Research*. **12**: 1435-1444.
54. 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.
55. Mersmann, H.J.; 2002. Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition. *Journal of Animal Science*. **80**: 126-134.
56. 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.
57. Park, Y. y Pariza, M.W., 2001. Lipoxygenase inhibitors inhibit heparin-releasable lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes and enhance body fat reduction in mice by conjugated linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1534**: 27-33.
58. 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. *Journal of Nutrition*. **133**: 663-667.
59. Vyas, D.; Kadegowda, A.K.G. y Erdman, R.A., 2012. Dietary conjugated linoleic acid and hepatic steatosis: species-specific effects on liver and adipose lipid metabolism and gene expression. *Journal of Nutrition and Metabolism*. **2012**: 928-932.
60. Sugano, M.; Akahoshi, A.; Koba, K.; Tanaka, K.; Okumura, T.; Matsuyama, H.; Goto, Y.; Miyazaki, T.; Murao, K.; Yamasaki, M.; Nonaka, M. y Yamada, K., 2001. Dietary manipulations of body fat-reducing potential of conjugated linoleic acid in rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **65**: 2535-2541.