

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA



Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral, para la obtención del Grado Académico de: **Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos**

**“EFECTOS BENÉFICOS DE UNA GRASA LÁCTEA MODIFICADA
SOBRE LA FORMACIÓN DE HÍGADO GRASO Y OTRAS
ALTERACIONES METABÓLICAS EN ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN”**

Cátedra de Bromatología y Nutrición. Departamento de Ciencias Biológicas. FBCB-UNL

Bioq. Carolina Daniela Gerstner

Director de Tesis: **Dr. Claudio A. Bernal**

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

Miembros del Jurado de la Tesis:

Dra. Silvia A. Belmonte

Dr. Aldo R. Eynard

Dra. Laura Kass

2020

*Todos nosotros sabemos algo.
Todos nosotros ignoramos algo.
Por eso, aprendemos siempre.*

Paulo Freire

AGRADECIMIENTOS

Frente a la finalización de este trabajo de Tesis Doctoral quiero manifestar mi infinito agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado desde el inicio de este proyecto y durante el largo camino recorrido.

Agradecer a la educación pública de nuestro país, a la Universidad Nacional del Litoral, a la Facultad de Ingeniería Química, por la enseñanza de sus docentes quienes me brindaron herramientas que aplique en la carrera de Doctorado. A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por brindarme el espacio y los elementos necesarios para formarme como profesional y como persona, no sólo a lo largo del Doctorado sino también en mi carrera de grado, y en mi desempeño como docente.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por la beca recibida, y a la Universidad Nacional del Litoral, que a través de sus subsidios PIC 50420150100008LI (2016): “Potenciales efectos benéficos de una grasa láctea funcional sobre la acumulación de lípidos en hígado y tejido adiposo de animales alimentados con dietas ricas en grasa” y PJ 50020150100030LI (2016): “Estudio del metabolismo de la glucosa en músculo de ratas *Wistar* alimentadas con una grasa láctea enriquecida naturalmente en CLA y reducida en ácidos grasos saturados”, colaboraron con la financiación para la realización de este trabajo de tesis.

A los pequeños y medianos productores de leche, por la gentil donación de grasa láctea modificada utilizada en este trabajo.

A mi director, Claudio Bernal, quien puso su confianza en mí y me permitió formar parte de su grupo de trabajo, por las enseñanzas y oportunidades, por su apoyo, por los consejos recibidos, por ser un referente y por brindarme la posibilidad de continuar avanzando en mi formación académica. Además, gracias por su infinita paciencia y el acompañamiento durante todo el proceso transcurrido.

A mi co-directora, Marcela González, por alentarme siempre a seguir y transmitirme su buena energía. Gracias por las tazas de café compartidas y sobre todo, por haber confiado en mí.

A Jime, Juli y Anita por su gran paciencia para enseñar y explicarme, las veces que sea necesario, las distintas técnicas que utilice. Por alentarme a seguir adelante cada vez que me enfurecía porque las cosas no me salían bien, y apoyarme en los momentos en los que sentía que no tenía fuerzas. Por los aventones en auto, y especialmente, gracias por abrirme las puertas de su hogar, familia y de sus corazones y permitirme sentirme mimada y acompañada en los momentos más duros que me toco vivir personalmente.

A María Rosa y Emi quienes fueron mi guía en mis primeros pasos en el laboratorio, por los momentos de risa, charlas y mates compartidos.

A Nacho, que pese a ser más joven, posee una enorme sabiduría y madurez. Gracias por haber escuchado mis temores, haberme aconsejado mil veces y por compartir momentos de concentración con música.

A Pao por motivarme a seguir adelante con mis objetivos y por esas salidas para cortar con la rutina.

A Nahue por haberme ayudado, por su alegría y empeño en realizar las cosas.

A las demás personas de la Cátedra y del Departamento de Ciencias Biológicas por su aliento a seguir.

A todos mis compañeros de cursado de la carrera de Doctorado por los momentos compartidos en clases.

A mis hermanas de la vida, Marlise, Anto, Vero, Luisi, Flor y Mari, por la amistad que nos une desde hace años, por estar siempre, por compartir viajes y hermosas reuniones distendidas que llenan el alma.

A Romina por darme consejos y fuerzas para no bajar los brazos y seguir adelante con mis objetivos académicos y personales.

A mis padres por darme la vida, brindarme las herramientas y formarme como persona, por cuidarme y ayudarme, por haberme tendido una mano y darme su infinito amor siempre.

A mi hermana y mi cuñado por sostenerme y acompañarme en el momento más duro de mi vida, y a mis adorados sobrinos quienes son mi cable a tierra por su inocencia y amor.

A mi compañero de viajes, locuras y escapadas a la naturaleza, quién apareció en mi vida en la peor etapa “la escritura de la Tesis”. Él con su inmensa paciencia me dio aliento para seguir, y aguanto todos mis berrinches.

Por último, quiero dedicar el presente trabajo a una persona muy amada que se fue físicamente de mi lado, quién me enseñó cosas de la vida que no se aprenden de un libro y con el cual compartí muchos años. Gracias por darme la fuerza para seguir adelante con mis anhelos, sé que estarías muy feliz y orgulloso de que haya llegado tan lejos.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

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

Resúmenes publicados en revistas internacionales de publicación periódica

- **Gerstner, C**; Lavandera, J; Saín, J; Scanarotti, I; González, M; Bernal, C. (2018). *Modulation of hepatic triacylglycerol in rats fed a functional milk fat*. BIOCELL 42 (4): p 91. ISSN 0327-9545 (Versión papel). ISSN 1667-5746 (Versión electrónica).

Presentado en LIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 5 al 8 de noviembre de 2018, Paraná, Entre Ríos, Argentina.

- Saín, J; Scanarotti I; **Gerstner, C**; Fariña, A; Lavandera, J; González, M; Bernal, C. (2016). *Glucose metabolism in skeletal muscle of rats fed a functional milk fat at high levels*. BIOCELL 40 (1): p 109. ISSN 0327-9545 (Versión papel). ISSN 1667-5746 (Versión electrónica).

Presentado en LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 7 al 10 de noviembre de 2016. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Resúmenes publicados en revistas nacionales de publicación periódica

- Quiroz, N; Contini, M; Vera Candiotti, L; **Gerstner, C**; Lavandera, J; Bernal, C; González, M. (2018). *Effect of a functional milk fat on biomarkers of hepatic oxidative stress in rats fed high fat levels*. MEDICINA 78 (III): p 86. ISSN 0025-7680 (Versión papel). ISSN 1669-9106 (Versión electrónica).

Presentado en LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). 14 al 17 de noviembre de 2018, Mar del Plata, Argentina.

- Ramirez, MR; **Gerstner, C**; Saín, J; González, M; Bernal, C. (2017). *Estudio preliminar del efecto de la grasa láctea funcional en ciertos parámetros comportamentales en roedores*. FABICIB 21: p 180. ISSN 0329-5559 (Versión papel).

Presentado en XL Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN). VII Congreso de Alimentos Siglo XXI: Alimentos, Nutrición y Salud. 29 de noviembre al 1 de diciembre de 2017. FBCB. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Presentaciones orales en congresos, encuentros y jornadas

- Bernal, C; **Gerstner, C**; Saín, J; Gonzalez, M; Lavandera, J; Scanarotti, I. *Preventive effect of foods enriched in natural conjugated linoleic acid on some metabolic alterations induced by high fat diets in rats*. VIII Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. 14 al 16 de agosto de 2019. UNCuyo, Mendoza, Argentina.
- **Gerstner, C**; Lavandera, J; González, M; Bernal, C. *Regulación de los ácidos grasos en tejido adiposo de ratas alimentadas con grasa láctea funcional*. XL Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN). VII Congreso de Alimentos Siglo XXI: Alimentos, Nutrición y Salud. 29 de noviembre al 1 de diciembre de 2017. FBCB. Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Presentaciones de trabajos en congresos, encuentros y jornadas

- Bernal, C; **Gerstner, C**; Quiroz, N; Lavandera, J; Gonzalez, M. *Hepatoprotective effects of milk fat enriched in conjugated linoleic acid in an animal model of nonalcoholic fatty liver disease induced by high fat diets*. 17th Euro Fed Lipid Congress and Expo. 20 al 23 de octubre de 2019. Sevilla, España.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Tablas.....	XIII
Índice de Figuras.....	XIV
Abreviaturas.....	XVIII
Resumen.....	1
Introducción.....	4
1- Ácidos grasos. Conceptos generales.....	5
2- Lípidos dietarios. Efectos en la salud.....	7
3- Ácidos grasos <i>trans</i>.....	11
3.1- Fuente.....	11
3.2- Efectos biológicos de los ácidos grasos <i>trans</i>.....	12
4- Conjugados del ácido linoleico.....	14
4.1- Fuentes de los conjugados del ácido linoleico.....	16
4.2- Efectos biológicos de los conjugados del ácido linoleico.....	19
4.2.1- Efectos sobre la carcinogénesis.....	20
4.2.2- Efectos sobre el peso y la composición corporal.....	21
4.2.3- Efectos sobre el metabolismo glucídico.....	22
4.2.4- Efectos el metabolismo lipídico.....	23
4.2.5- Efectos sobre la respuesta inflamatoria y el sistema inmune.....	23
5- Grasa Láctea.....	24
5.1- Composición de la grasa láctea y su impacto nutricional.....	24
5.2- Grasa láctea modificada como fuente de CLA.....	27
6- Esteatosis hepática.....	28
6.1- Lipólisis del tejido adiposo y captación de los AGL por el hígado.....	29

6.2- Lipogénesis y esterificación.....	29
6.3- Ácidos grasos dietarios.....	30
6.4- Secreción de VLDL-TAG.....	30
6.5- Oxidación de ácidos grasos.....	30
7- Resistencia a la insulina y esteatosis hepática.....	31
8- Modelos experimentales de esteatosis hepática.....	31
8.1- Dietas deficientes en colina y metionina.....	32
8.2- Dieta rica en colesterol y ácido cólico.....	32
8.3- Dieta deficiente en arginina.....	32
8.4- Dietas ricas en carbohidratos simples.....	33
8.5- Dieta de cafetería.....	33
8.6- Dieta rica en grasas.....	33
Objetivos.....	36
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos.....	37
Materiales y Métodos.....	39
1- Dietas Experimentales.....	40
2- Seguimiento experimental de los animales.....	44
2.1- Ingesta energética.....	44
2.2- Ganancia de peso.....	44
2.3- Sacrificio de los animales y toma de muestras.....	45
2.4- Composición corporal.....	45
2.4.1- Determinación del contenido de agua.....	45
2.4.2- Determinación del contenido de proteínas.....	45

2.4.3- Determinación del contenido de grasa.....	46
3- Parámetros metabólicos plasmáticos y tisulares.....	46
3.1- Cuantificación de triacilglicéridos en suero.....	46
3.2- Cuantificación de colesterol total en suero.....	46
3.3- Cuantificación de glucosa plasmática.....	47
3.4- Cuantificación de insulina circulante.....	47
3.5- Cuantificación de triacilglicéridos tisulares.....	47
3.6- Composición y relaciones de ácidos grasos circulantes y tisulares.....	48
3.6.1- Obtención del extracto lipídico.....	48
3.6.2- Derivatización de ácidos grasos.....	48
3.6.3- Identificación y cuantificación de ácidos grasos.....	49
3.6.4- Flujo a través de enzimas claves involucradas en el metabolismo lipídico.....	49
4- Actividad de enzimas reguladoras del metabolismo lipídico en hígado.....	50
4.1- Sintasa de ácidos grasos.....	50
4.2- Acetil-CoA carboxilasa.....	51
4.3- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	51
4.4- Carnitina palmitoil transferasa-1.....	52
5- Actividad tisular de la enzima lipoproteína lipasa.....	52
5.1- LPL en tejido adiposo epididimal.....	52
5.2- LPL en músculo gastrocnemio.....	53
6- Secreción hepática de TAG-pre- β -lipoproteínas.....	54
7- Metabolismo de la glucosa.....	55
7.1- Test de tolerancia oral a la glucosa.....	55
7.2- Metabolitos tisulares de la glucosa.....	55
7.2.1- Glucosa 6-fosfato, glucosa 1-fosfato, fructosa 6-fosfato, glucosa y fructosa 1,6-	

bisfosfato.....	55
7.2.2- Citrato.....	57
7.2.3- Glucógeno.....	57
7.3- Actividad y flujo a través de enzimas reguladoras.....	57
7.3.1- Fosfofructoquinasa muscular.....	57
7.3.2- Flujo a través de enzimas glucolíticas claves.....	58
8- Estado oxidativo en hígado.....	58
8.1- Daño peroxidativo.....	58
8.2- Sustancias reactivas de oxígeno.....	58
8.3- Cociente Glutation reducido (GSH)/ Glutation oxidado (GSSG).....	59
8.4- Actividad de la enzima catalasa.....	59
9- Niveles de ARNm de diferentes parámetros metabólicos.....	60
10- Análisis Estadístico.....	62
Resultados.....	63
1- Parámetros nutricionales.....	64
1.1- Consumo de alimento e ingesta energética.....	64
1.2- Ganancia de peso y composición corporal.....	64
1.3- Peso de tejidos.....	66
2- Parámetros lipídicos.....	66
2.1- Concentración de triacilglicéridos, colesterol y ácidos grasos circulantes.....	66
2.2- Concentración de triacilglicéridos hepáticos.....	72
2.3- Contenido y relaciones de ácidos grasos hepáticos.....	72
2.4- Concentración de triacilglicéridos en músculo.....	83
2.5- Contenido y relaciones de ácidos grasos en músculo.....	84

2.6- Contenido y relaciones de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	89
3- Parámetros asociados a la regulación de los TAG hepáticos.....	93
3.1- Lipogénesis en hígado.....	93
3.1.1- Actividades de enzimas lipogénicas.....	93
3.1.2- Expresión de enzimas y reguladores de la síntesis de lípidos en hígado.....	95
3.2- Oxidación de ácidos grasos.....	97
3.2.1- Actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa-1a en hígado.....	97
3.2.2- Expresión de enzimas y reguladores de la oxidación de ácidos grasos en hígado.....	98
3.3- Proteínas transportadoras de ácidos grasos en hígado.....	100
3.4- Secreción hepática <i>in vivo</i> de TAG-pre- β -lipoproteínas.....	101
4- Parámetros asociados a la regulación de los TAG en músculo.....	102
4.1- Captación de ácidos grasos en músculo gastrocnemio.....	102
4.2- Oxidación de ácidos grasos.....	103
4.2.1- Expresión de la enzima CPT-1b y del receptor de adiponectina en músculo.....	103
5- Parámetros asociados a la regulación de los TAG en tejido adiposo.....	105
5.1- Captación de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	105
5.2- Translocasa de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	106
5.3- Síntesis de lípidos en tejido adiposo.....	106
5.4- Expresión de la enzima adiposo triglicérido lipasa en tejido adiposo epididimal.....	108
5.5- Oxidación de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	108
5.6- Expresión de adiponectina en tejido adiposo epididimal.....	109
6- Metabolismo glucídico.....	110
6.1- Concentración de glucosa e insulina circulantes.....	110
6.2- Utilización de la glucosa.....	112

6.3- Regulación del metabolismo de la glucosa en hígado.....	113
6.4- Regulación del metabolismo de la glucosa en músculo gastrocnemio.....	115
7- Estado oxidativo en hígado.....	116
7.1- Estado de lipoperoxidación hepático.....	116
7.2- Citoquinas pro-inflamatorias y NF- κ B en hígado.....	117
7.3- Mecanismos de defensas antioxidantes en hígado.....	119
Discusión.....	123
1- Modelo experimental.....	124
2- Dietas ricas en ácidos grasos insaturados: características del modelo experimental.....	125
3- Dieta GLM30: parámetros nutricionales.....	130
4- Dieta GLM30: influencia sobre el metabolismo lipídico.....	131
4.1- Cambios en la composición de AG séricos y tisulares.....	131
4.2- Regulación de los lípidos hepáticos.....	136
4.2.1- Influencia de la VSTAG.....	138
4.2.2- Influencia de la oxidación de ácidos grasos.....	139
4.2.3- Influencia de la lipogénesis.....	140
4.2.4- Influencia del transporte de ácidos grasos.....	142
4.3- Regulación de los lípidos circulantes.....	143
4.4- Regulación de los lípidos musculares.....	146
4.5- Regulación de lípidos en tejido adiposo.....	147
5- Dieta GLM30: influencia sobre el estado oxidativo.....	148
6- Dieta GLM30: influencia sobre el metabolismo de la glucosa.....	151
6.1- Capacidad de utilización de la glucosa y parámetros relacionados.....	151

6.2- Regulación del metabolismo de la glucosa.....	152
Conclusiones	156
Bibliografía	159

ÍNDICE de TABLAS

Tabla 1- Composición de las dietas experimentales.....	41
Tabla 2- Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales.....	42
Tabla 3- Consumo de alimentos, ingesta energética, ganancia de peso y composición corporal.....	65
Tabla 4- Peso de hígado, TAE, TAR y del músculo gastrocnemio.....	66
Tabla 5- Perfil de ácidos grasos circulantes.....	69
Tabla 6- Perfil de ácidos grasos en hígado.....	74
Tabla 7- Perfil de ácidos grasos en músculo gastrocnemio.....	85
Tabla 8- Perfil de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	90
Tabla 9- Contenido y relaciones de metabolitos hepáticos.....	114
Tabla 10- Contenido y relaciones de metabolitos en músculo gastrocnemio.....	115

ÍNDICE de FIGURAS

Figura 1- Numeración de los átomos de carbono de un ácido graso.....	5
Figura 2- Representación esquemática de la isomería geométrica de los ácidos grasos.....	6
Figura 3- Representación esquemática de la isomería posicional de los ácidos grasos.....	7
Figura 4- Estructura química del ácido elaídico (9 <i>t</i> -18:1) (a) y ácido <i>trans</i> - vaccénico (11 <i>t</i> -18:1) (b).....	11
Figura 5- Síntesis de 11 <i>t</i> -18:1 por biohidrogenación del ácido linoleico y α -linolénico en el rumen.....	12
Figura 6- Estructura química del ácido linoleico (9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> -18:2) (a), 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -18:2 (b) y ácido ruménico (9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -18:2) (c).....	15
Figura 7- Biosíntesis ruminal y endógena del 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -18:1.....	16
Figura 8- Formación de CLA a través de la biohidrogenación ruminal.....	17
Figura 9- Esquema de la reacción de isomerización e hidrogenación del AL para la síntesis química de CLA.....	19
Figura 10- Esquema que representa las contribuciones de las distintas vías metabólicas a la esteatosis hepática.....	28
Figura 11- Evolución de la ganancia de peso diaria.....	65
Figura 12- Niveles séricos de triacilglicéridos.....	67
Figura 13- Niveles séricos de colesterol.....	67
Figura 14- Niveles de triacilglicéridos en hígado.....	72
Figura 15- Relación porcentual: AR/AV en hígados de animales alimentados con dietas ricas en grasas lácteas.....	77
Figura 16- Flujo a través de la enzima Δ 9-desaturasa en hígado. Expresada por la	

relación porcentual: ácido palmitoleico/ácido palmítico (a) y ácido oleico/ácido esteárico (b).....	78
Figura 17- Relación porcentual: AA/AL en hígado.....	79
Figura 18- Flujo a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa en hígado.....	80
Figura 19- Relación porcentual: DGLA/GLA en hígado.....	80
Figura 20- Flujo a través de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa en hígado.....	81
Figura 21- Relación porcentual: DHA/ALA en hígado.....	82
Figura 22- Relación porcentual: EPA/ALA en hígado.....	82
Figura 23- Relación porcentual: DHA/EPA en hígado.....	83
Figura 24- Niveles de triacilglicéridos en músculo.....	84
Figura 25- Relación porcentual: AR/AV en músculos de animales alimentados con dietas ricas en grasas lácteas.....	88
Figura 26- Relaciones porcentuales: AA/AL y DHA/ALA en músculo.....	89
Figura 27- Relación porcentual: ácido palmitoleico/ácido palmítico (a) y ácido oleico/ácido esteárico (b) en tejido adiposo epididimal.....	93
Figura 28- Actividad de enzimas acetil-CoA carboxilasa (a), sintasa de ácidos grasos (b) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (c) en hígado.....	94
Figura 29- Niveles de ARNm de acetil-CoA carboxilasa (a), sintasa de ácidos grasos (b) y estearoil-CoA desaturasa (c) en hígado.....	95
Figura 30- Niveles de ARNm de diacilglicerol aciltransferasa en hígado.....	96
Figura 31- Niveles de ARNm de LXR α (a), SREBP-1a (b) y SREBP-1c (c) en hígado.....	97
Figura 32- Actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa-1a en hígado.....	98
Figura 33- Niveles de ARNm de carnitina palmitoil transferasa-1a (a) y acil-CoA oxidasa 1 (b) en hígado.....	99

Figura 34- Niveles de ARNm de PPAR α en hígado.....	99
Figura 35- Niveles de ARNm de AdipoR2 en hígado.....	100
Figura 36- Niveles de ARNm de FATP2 (a), FATP5 (b) y CD36 (c) en hígado.....	101
Figura 37- Velocidad de secreción hepática de TAG.....	102
Figura 38- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa por gramo de músculo gastrocnemio.....	103
Figura 39- Niveles de ARNm de carnitina palmitoil transferasa-1b en músculo.....	104
Figura 40- Niveles de ARNm del receptor de adiponectina en músculo.....	104
Figura 41- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en TAE.....	105
Figura 42- Niveles de ARNm de CD36 en TAE.....	106
Figura 43- Niveles de ARNm de estearoil-CoA desaturasa en TAE.....	107
Figura 44- Niveles de ARNm de diacilglicerol aciltransferasa en TAE.....	107
Figura 45- Niveles de ARNm de adiposo triglicérido lipasa en TAE.....	108
Figura 46- Niveles de ARNm de carnitina palmitoil transferasa-1a (a) y acil-CoA oxidasa 1 (b) en TAE.....	109
Figura 47- Niveles de ARNm de adiponectina en TAE.....	110
Figura 48- Niveles plasmáticos de glucosa.....	111
Figura 49- Niveles plasmáticos de insulina.....	111
Figura 50- Área bajo la curva respecto a su valor basal.....	112
Figura 51- Índice HOMA.....	113
Figura 52- Niveles de ARNm de ChREBP en hígado.....	114
Figura 53- Actividad de la enzima PFK-1 α en músculo gastrocnemio.....	116
Figura 54- Niveles de TBARS (a) y ROS (b) en hígado.....	117
Figura 55- Niveles de ARNm de IL-6 (a) y TNF α (b) en hígado.....	118
Figura 56- Niveles de ARNm de NF- $\kappa\beta$ en hígado.....	118

Figura 57- Actividad de la enzima catalasa en hígado.....	119
Figura 58- Relación GSH/GSSG en hígado.....	120
Figura 59- Niveles de ARNm de CAT (a), GR (b), SOD (c) y GSH-Px (d) en hígado.....	121
Figura 60- Niveles de ARNm de Nrf2 en hígado.....	122
Figura 61- Cuadro metabólico de alteraciones inducidas por las dietas ricas en ácidos grasos insaturados.....	129
Figura 62- Cuadro metabólico de los efectos benéficos inducidos por la grasa láctea modificada.....	155

ABREVIATURAS

9c,11t-CLA: isómero *cis*9,*trans*11-18:2 (9c,11t-18:2)

10t,12c-CLA: isómero *trans*10,*cis*12-18:2 (10t,12c-18:2)

AA: ácido araquidónico

ACC: acetil-CoA carboxilasa

ACOX: acil-CoA oxidasa

AdipoR1: receptor 1 de adiponectina

AdipoR2: receptor 2 de adiponectina

AG: ácido graso

AGI: ácidos grasos insaturados

AGL: ácidos grasos libres

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

AGPI-CL: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

AGS: ácidos grasos saturados

AGT: ácidos grasos *trans*

AL: ácido linoleico

ALA: ácido α -linolénico

***ANOVA:** análisis de la varianza. Acrónimo del inglés “analysis of variance”

AO: ácido oleico

ApoB: apolipoproteína B

AR: ácido ruménico (9c,11t-18:2)

AS: aceite de soja

***ATGL:** adiposo triglicérido lipasa. Acrónimo del inglés “adipose triglyceride lipase”

AV: ácido *trans*-vaccénico

c: *cis*

CAT: catalasa

***CD36:** translocasa de ácidos grasos. Acrónimo del inglés “cluster of differentiation 36”

***ChREBP:** proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos. Acrónimo del inglés “carbohydrate-responsive element-binding protein”

***CIC:** transportador del citrato mitocondrial. Acrónimo del inglés “mitochondrial citrate carrier”

***CLA:** conjugados del ácido linoleico. Acrónimo del inglés “conjugated linoleic acid”

Col: colesterol total

CPT: carnitina palmitoil transferasa

DBF: di-butiril fluoresceína

DCFH2-DA: 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetado

DGAT: diacilglicerol aciltransferasa

***DGLA:** ácido dihomo- γ -linolénico. Acrónimo del inglés “dihomo- γ -linolenic acid”

***DHA:** ácido docosaheptaenoico. Acrónimo del inglés “docosahexaenoic acid”

ECNT: enfermedades crónicas no transmisibles

ECV: enfermedades cardiovasculares

***EPA:** ácido eicosapentaenoico. Acrónimo del inglés “eicosapentaenoic acid”

F-6-P: fructosa 6-fosfato. Acrónimo del inglés “fructose 6-phosphate”

F-1,6-P₂: fructosa 1,6-bisfosfato. Acrónimo del inglés “fructose 1,6-bisphosphate”

***FABP:** proteínas de unión a ácidos grasos. Acrónimo del inglés “fatty acids binding protein”

***FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Acrónimo del inglés “Food and Agriculture Organization of the United Nations”

***FAS:** sintasa de ácidos grasos. Acrónimo del inglés “fatty acids synthase”

***FATP:** proteína transportadora de ácidos grasos. Acrónimo del inglés “fatty acids transport protein”

***FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos. Acrónimo del inglés “Food and Drugs Administration”

FL: fosfolípidos

***G-1-P:** glucosa 1-fosfato. Acrónimo del inglés “glucose 1-phosphate”

***G-6-P:** glucosa 6-fosfato. Acrónimo del inglés “glucose 6-phosphate”

***G6PDH:** glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. Acrónimo del inglés “glucose 6-phosphate dehydrogenase”

GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

***GC:** cromatografía gaseosa. Acrónimo del inglés “gas chromatography”

GK: glucoquinasa

GL: grasa láctea

GL30: dieta con grasa láctea a niveles elevados de grasa

***GLA:** ácido γ -linolénico. Acrónimo del inglés “ γ -linolenic acid”

GLE: grasa láctea estandarizada

GLE30: dieta con grasa láctea estandarizada a niveles elevados de grasa

GLM: grasa láctea modificada

GLM30: dieta con grasa láctea modificada a niveles elevados de grasa

GLUT-4: transportador de glucosa-4

GR: glutatión reductasa

GSH: glutatión reducido

GSH-Px: glutatión peroxidasa

GSSG: glutatión oxidado

***HDL:** lipoproteínas de alta densidad. Acrónimo del inglés “high density lipoprotein”

***HF:** alta en grasa. Acrónimo del inglés “high fat”

***HFD:** dieta alta en grasa. Acrónimo del inglés “high fat diet”

HK: hexoquinasa

***Hprt1:** hipoxantina fosforibosiltransferasa-1. Acrónimo del inglés “hypoxanthine phosphoribosyltransferase-1”

Ig: inmunoglobulinas

IL: interleuquina

IR: insulino resistencia

***LDL:** lipoproteínas de baja densidad. Acrónimo del inglés “low density lipoprotein”

LPL: lipoproteína lipasa

LPO: lipoperoxidación

***LXR:** receptores hepáticos X. Acrónimo del inglés “liver X receptors”

***MCD:** deficitarias en colina y metionina. Acrónimo del inglés “methionine/choline deficient”

MDA: malondialdehído

MG: músculo gastrocnemio

***NAFLD:** enfermedad del hígado graso no alcohólico. Acrónimo del inglés “non-alcoholic fatty liver disease”

***NASH:** esteatohepatitis no alcohólica. Acrónimo del inglés “nonalcoholic steatohepatitis”

ND: no detectado

***NF- κ β :** factor nuclear kappa β . Acrónimo del inglés “nuclear factor κ β ”

NI: no identificado

***Nrf2:** factor nuclear derivado de eritroide 2. Acrónimo del inglés “nuclear factor erythroid-derived 2”

OMS: Organización Mundial de la Salud

***PFK:** fosfofructoquinasa. Acrónimo del inglés “phosphofructokinase”

PDH: piruvato deshidrogenasa

PGI: fosfoglucoisomerasa

***PGM:** fosfoglucomutasa. Acrónimo del inglés “phosphoglucomutase”

***PPAR:** receptor que activa la proliferación de peroxisomas. Acrónimo del inglés “peroxisome proliferator-activated receptor”

RE: retículo endoplásmico

***ROS:** especies reactivas del oxígeno. Acrónimo del inglés “reactive oxygen species”

S7: dieta control con aceite de soja a niveles recomendados de grasa

S30: dieta control con aceite de soja a niveles elevados de grasa

***SCD:** estearil-CoA desaturasa. Acrónimo del inglés “stearyl-CoA desaturase”

***SEM:** error estándar de la media. Acrónimo del inglés “standard errors of mean”

SMet: síndrome metabólico

SOD: superóxido dismutasa 2

***SREBP:** proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides. Acrónimo del inglés “sterol regulatory element-binding protein”

t: *trans*

TA: tejido adiposo

TAE: tejido adiposo epididimal

TAG: triacilglicérido

TAR: tejido adiposo retroperitoneal

***TBARS:** sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Acrónimo del inglés “thiobarbituric acid reactive substances”

***TNF- α :** factor de necrosis tumoral- α . Acrónimo del inglés “tumor necrosis factor alpha”

TPI: triosa fosfato isomerasa

TTOG: test de tolerancia oral a la glucosa

Ubc: ubiquitina c

***UCP:** proteína desacoplante. Acrónimo del inglés “uncoupling protein”

***VLDL:** lipoproteínas de muy baja densidad. Acrónimo del inglés “very low-density lipoprotein”

Vp: volumen plasmático

VSTAG: velocidad de secreción de TAG-pre- β lipoproteínas

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

Resumen

RESUMEN

Dietas ricas en grasas inducen en animales de experimentación acumulación de lípidos en hígado y tejido adiposo, y favorecen la inflamación aguda, factores críticos para el desarrollo de enfermedad de hígado graso no-alcohólico, daño hepático y alteraciones en la utilización de la glucosa. La grasa láctea (GL) contiene bajos niveles de compuestos bioactivos, como el ácido ruménico (AR -principal conjugado del ácido linoleico “CLA” de origen natural-) y ácido *trans*-vaccénico (AV), los cuales pueden ser incrementados en una GL modificada (GLM) a niveles potencialmente funcionales a través de la alimentación del ganado con suplementos ricos en ácidos grasos (AG) poliinsaturados. El AR, y su precursor AV, han mostrado acciones benéficas sobre obesidad, diabetes, inflamación y acumulación lipídica en hígado y otros tejidos. Por consiguiente, el objetivo de la presente tesis fue investigar los mecanismos involucrados en los potenciales efectos benéficos de una GLM rica en CLA y AV, y reducida en AG saturados, sobre la prevención o atenuación de la formación de hígado graso y alteraciones en el metabolismo intermedio glucídico y lipídico, inducidas por la alimentación crónica con altos niveles de lípidos dietarios en un modelo experimental animal.

Se alimentaron ratas *Wistar* machos de aproximadamente 100 g de peso, durante 60 días, con dietas: S7 (aceite de soja -AS-: 7%), S30 (AS: 30%), GL30 (GL: 27% + AS: 3%), GLM30 (GLM: 27% + AS: 3%) y GLE30 (GL Estandarizada: 27% + AS: 3%). Los estudios se focalizaron en evaluar la actividad y expresión de enzimas y reguladores involucrados en la lipogénesis, síntesis de triacilglicéridos (TAG) y oxidación de AG; incorporación hepática de diferentes AG y secreción de TAG-pre- β -lipoproteínas. En referencia al metabolismo de la glucosa, se cuantificaron parámetros bioquímicos plasmáticos, metabolitos intermediarios en hígado y músculo, actividades de enzimas claves y niveles de expresión génica de factores de transcripción, y la utilización *in vivo* de la glucosa. Dichos estudios se correlacionaron con evaluaciones nutricionales, parámetros involucrados en la regulación de TAG en suero, tejido adiposo y músculo, como también el estado oxidativo en hígado.

Los resultados demuestran que GLM previno el desarrollo de esteatosis hepática y exacerbada acreción de lípidos en músculo; mejoró el estado lipoperoxidativo hepático y la utilización de la glucosa en un modelo animal experimental caracterizado por alteraciones lipídicas y glucídicas inducidas por dietas ricas en grasas.

Los principales mecanismos se asociaron con: 1) elevada incorporación tisular de AR y AV, generando un entorno lipídico-metabólico favorable, 2) prevención del desarrollo de esteatosis

hepática relacionada con un incremento en la secreción de TAG-pre- β -lipoproteínas y en la β -oxidación mitocondrial, junto con un descenso en la expresión génica de proteínas transportadoras de AG, 3) reducción de los niveles de LPO y ROS, de la expresión génica de *Nf- κ β* y de un mejoramiento en los niveles de AG precursores de mediadores anti-inflamatorios, 4) una mayor utilización de glucosa, atribuida a la conjunción de un mejoramiento en la sensibilidad a la insulina (mediada por la adiponectina y por cambios en el perfil de AG de membranas); un incremento en la glucólisis (reflejada por un elevado flujo y actividad de PFK-1 α); y una reducción de los depósitos lipídicos musculares.

Si bien los efectos mencionados por el consumo de GLM, pueden tener una alta asociación con la acción del AR y AV, no podemos descartar que otros compuestos funcionales estén cumpliendo un rol central en los beneficios de las grasas lácteas.

El conocimiento de mecanismos de acción de compuestos bioactivos presentes en la GLM, podrá contribuir a la prevención o reversión de desórdenes metabólicos característicos de enfermedades con alta morbi-mortalidad inducidas por desbalances nutricionales.

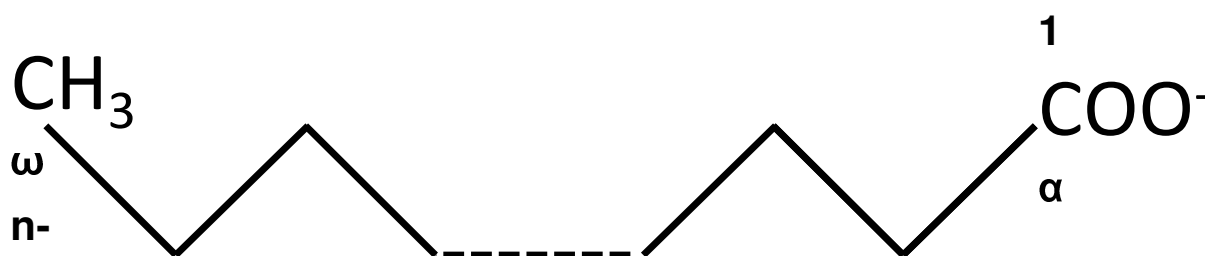
Introducción

INTRODUCCIÓN

1- Ácidos grasos. Conceptos generales

Los ácidos grasos (AG) son ácidos orgánicos con una cadena alifática y en uno de sus extremos poseen un grupo carboxilo. La mayoría de los AG naturales posee un número par de átomos de carbono debido a que son biosintetizados a partir de acetato (CH_3CO_2^-) (Wade, 1993). Químicamente, los átomos de carbono se numeran desde el carbono carboxílico (C1 o $\text{C}\alpha$) al carbono metílico terminal (Cn o $\text{C}\omega$), pero nutricionalmente se numeran en sentido opuesto. En este caso, la denominación se antecede de la letra “ ω ” o “ n ” (**Figura 1**).

Figura 1- Numeración de los átomos de carbono de un ácido graso

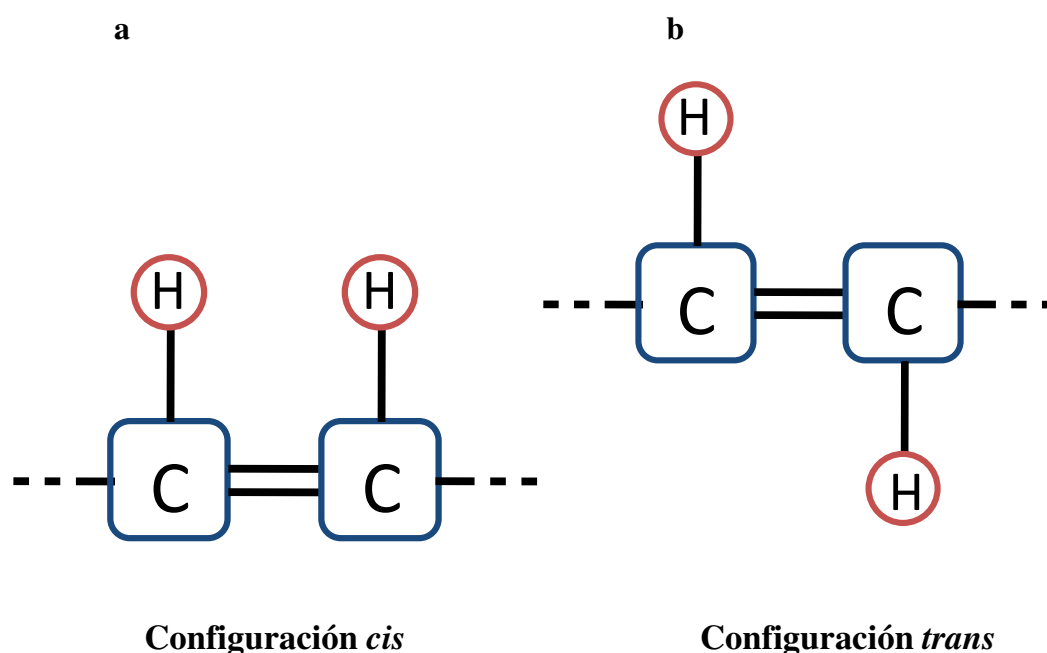


La mayoría de los AG presentes en los seres vivos contienen entre 12 y 24 átomos de carbono, siendo los más abundantes los de 16 a 18 carbonos. En función del número de insaturaciones pueden ser: saturados (AGS), donde todos los carbonos están unidos por enlace simple, y el resto de los electrones disponibles están totalmente ocupados (“saturados”) por hidrógeno; ó insaturados, donde dos ó más carbonos se encuentran unidos por dobles enlaces. El número de insaturaciones es variable, dando lugar a la clasificación de los AG en monoinsaturados (AGMI) cuando poseen sólo un doble enlace o poliinsaturados (AGPI) cuando los AG presentan más de un doble enlace en su estructura. La posición de las insaturaciones en la cadena de los AG permite que estos puedan agruparse conforme a una misma estructura terminal que les confiere propiedades y roles biológicos diferentes, dando origen así a las distintas familias de AG insaturados.

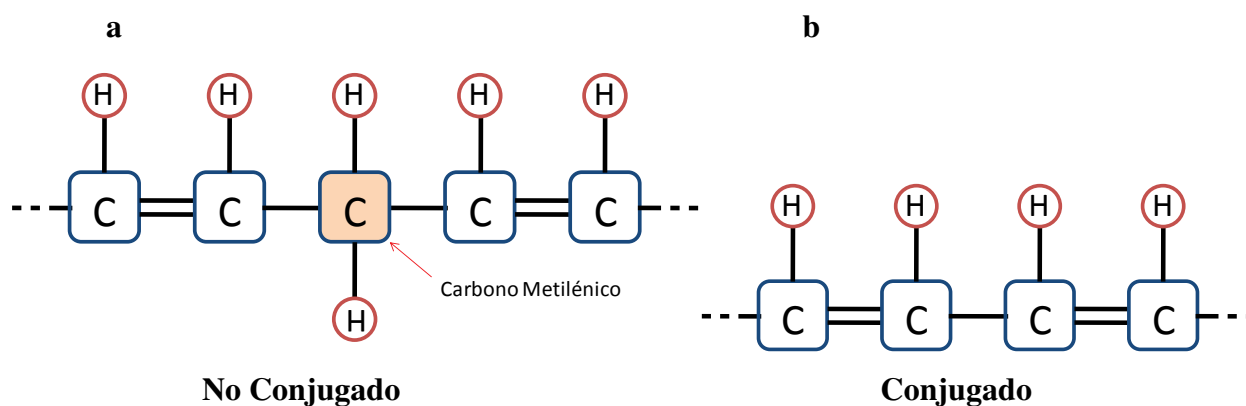
En las últimas décadas, han llamado la atención las grasas con isomerías geométricas y/o posicionales, debido a la alta repercusión que poseen sobre el riesgo de padecer Enfermedades Crónicas No Transmisibles (ECNT). Las mismas pueden tener un efecto *per se* o pueden interactuar con los AG de otras fuentes de grasas dietarias, interfiriendo en su normal metabolismo.

Los AG insaturados (AGI) predominantes en la naturaleza, contienen de uno a seis dobles enlaces, los cuales pueden tener isomería geométrica y/o posicional. La gran mayoría de los AG que se encuentran en la naturaleza posee isomería *cis*, aunque, una pequeña parte de AG con isomería *trans* se encuentran en la carne y la leche de rumiantes (Koletzko y Decsi, 1997). En la conformación espacial del doble enlace entre dos átomos de carbono, estos generan una estructura planar en la cual, los átomos de hidrógeno o carbono de las cadenas acílicas pueden quedar hacia un mismo lado del plano que forma el doble enlace, o en sentido contrario. Cuando los hidrógenos se disponen hacia un mismo lado del plano del doble enlace, el AG adquiere la isomería geométrica *cis* (**Figura 2a**), mientras que, cuando se disponen en distintos lados del plano del doble enlace, el AG se presenta bajo la isomería geométrica *trans* (**Figura 2b**) (Valenzuela, 2008; Mozaffarian y col., 2009b).

Figura 2- Representación esquemática de la isomería geométrica de los ácidos grasos



Por otro lado, la mayoría de los AGPI en su forma natural poseen dos dobles enlaces separados por un carbono intermedio que no participa de la estructura de insaturación. Este tipo de estructura se denomina “no conjugada” y al carbono localizado entre los dobles enlaces se lo designa como carbono metilénico intermedio (**Figura 3a**). La migración del doble enlace sobre el carbono metilénico conlleva a la formación de una estructura “conjugada” (**Figura 3b**). La conjugación de los dobles enlaces puede, además, ocasionar un cambio en la isomería espacial del AG (Sanhueza y col., 2002).

Figura 3- Representación esquemática de la isomería posicional de los ácidos grasos

2- Lípidos dietarios. Efectos en la salud

La grasa dietaria puede tener un gran impacto en la salud, tanto en la prevención, como así también en el desarrollo de ECNT. Es reconocida su importancia en el crecimiento y desarrollo, como también en el mantenimiento de la salud. Además de ser los nutrientes con la mayor densidad energética (Freedman y Bagby 1989), vehiculizan vitaminas liposolubles, pigmentos carotenoides y esteroides. Como componentes estructurales celulares tienen un rol fundamental en funciones de membranas, tales como permeabilidad, transporte y actividades enzimáticas (Segré y col., 2001). Aportan colesterol (Col), precursor de ácidos biliares, hormonas y una clase importante de moléculas de señalización intra- y extracelular (Jimenez y col., 2012; Jump y col., 2013). Son fuente de: ácido linoleico (AL) y ácido α -linolénico (ALA), que tienen el carácter de esenciales (Burr y Burr, 1929) debido a que no pueden ser sintetizados por el organismo.

El consumo de altos niveles de grasa fue tradicionalmente asociado al riesgo de ECNT, que son enfermedades de larga duración y generalmente de progresión lenta. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los cuatro tipos principales de enfermedades crónicas son: enfermedades cardiovasculares (ECV), enfermedades respiratorias crónicas, diabetes mellitus y cáncer (Alwan, 2011), y tienen principalmente las 3 primeras una alta relación con el sobrepeso y la obesidad. Las ECNT son la principal causa de muerte en el mundo (Alwan y col., 2010) y representan 40 millones de muertes al año, lo que equivale al 70% de todas las muertes en todo el mundo (Islam y col., 2014; OMS, 2017). En el año 2013, la OMS (OMS, 2013) proyectó que para el presente año, las mismas representarían el 80% de la carga mundial de todas las enfermedades.

El papel importante de la nutrición para la prevención y/o desarrollo de las ECNT es bien conocido. La nutrición inadecuada, ya sea por déficit, sobrealimentación y/o desequilibrios de nutrientes pueden tener graves consecuencias (WHO, 2003; Egger y col., 2014). En referencia a la

sobrealimentación, durante años el énfasis comunicacional se centró en equilibrar la ingesta de calorías con el gasto energético y disminuir la grasa en la dieta. Así, durante varias décadas se recomendó reducir la grasa dietética total para disminuir la ingesta calórica, y al mismo tiempo minimizar el consumo de grasas saturadas (DHHS, 1985). En este sentido por la década de los ´80, se recomendaron dietas bajas en grasas y altas en carbohidratos con el fin de inducir una pérdida de peso y disminuir el riesgo de ECV. El enfoque en la reducción de la grasa total resultó en un mayor consumo de carbohidratos refinados y azúcares simples, y redujo la ingesta de alimentos ricos en AG insaturados saludables, como los de frutos secos, semillas y aceites vegetales. Esto finalmente conllevó a un aumento en la palatabilidad de los alimentos, un incremento del consumo de los mismos, y finalmente un aumento de la tasa de obesidad en ciertos países como los Estados Unidos (Austin y col., 2011; Ogden y col., 2014). Si bien el sobrepeso y la obesidad se consideraban antes un problema propio de los países de ingresos altos, actualmente ambos trastornos aumentan en los países de ingresos bajos y medianos, en particular en los entornos urbanos. A nivel global, en 2016 el 39% de los adultos tenían sobrepeso, y el 13% eran obesos. En forma muy preocupante, la prevalencia de sobrepeso y obesidad se trasladó a los niños y adolescentes (de 5 a 19 años) en forma llamativa, incrementando así del 4% en 1975 a más del 18% en 2016. La causa fundamental del sobrepeso y la obesidad es un desequilibrio energético entre el consumo y gasto energético, exacerbado por una vida cada vez más sedentaria.

Se ha demostrado que los efectos específicos de los AG sobre la salud, dependen del tipo de AG, en este sentido cabe mencionar que, los AGS incrementan el Col total y el Col de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y que disminuyen los niveles de Col de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Específicamente, se sabe que los AG mirístico, palmítico y láurico son responsables de dicho efecto (Tholstrup y col., 1994, 2003 y 2004), conduciendo a un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria. Sin embargo, el ácido esteárico decrece el Col LDL y aumenta el HDL lo que sugeriría que tiene propiedades antiaterogénicas (Tholstrup y col., 1994; Sanders y col., 2001). Asimismo, el consumo de grasas saturadas ha sido asociado a otros efectos no deseables sobre la salud, tales como: aumento del riesgo de obesidad que conlleva a una mayor liberación de citoquinas proinflamatorias e incrementa el riesgo de padecer patologías asociadas (Hariri y col., 2010) y desarrollo de cáncer de mama (Binukumar y Mathew, 2005), entre otros. Actualmente se han puesto en discusión los efectos de las grasas saturadas. Así, Lawrence (2013) argumentó que las grasas saturadas, por ser menos susceptibles a la peroxidación que las insaturadas, no estarían involucradas en el desarrollo de cuadros proinflamatorios, los cuales están estrechamente asociados a las ECNT. Por otra parte, numerosos autores sugieren que la alta disposición de AGS no

esterificados, tales como palmítico y esteárico, estarían involucrados en la insulino resistencia (IR) desarrollados en el músculo esquelético (Randle y col., 1963; Hirabara y col., 2012).

Los AGMI, característicamente presentes en la dieta mediterránea, han mostrado efectos benéficos sobre el perfil de lípidos sanguíneos y factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (Mensink y col., 2003; Appel y col., 2005). Además, se ha descrito que modulan la presión sanguínea, mejoran la sensibilidad a la insulina y regulan los niveles de la glucosa. Asimismo, 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; Costa y col., 2011), y protegen contra el deterioro cognitivo relacionado con la edad y la enfermedad de Alzheimer (López-Miranda y col., 2010). Específicamente, se ha demostrado que el ácido oleico posee propiedades antiaterogénicas y antitrombóticas, que incrementa la relación de Col HDL/LDL, y que decrece la agregación de trombocitos. Asimismo, la incorporación de ácido oleico en ésteres de Col, triacilglicéridos (TAG) y fosfolípidos (FL) de partículas de lipoproteínas, aumenta la resistencia a la lipoperoxidación (Tvrzicka y col., 2011).

Los AGPI han demostrado tener diversas funciones fisiológicas de relevancia en la salud, tales como: regulación del nivel de lípidos plasmáticos, efectos benéficos sobre la función cardiovascular e inmune, acción de la insulina y desarrollo de la función neuronal y visual. La ingesta de AGPI impacta en gran medida sobre la mayoría de las células corporales, alterando la composición de membranas y su funcionalidad, la síntesis de eicosanoides, y la señalización y regulación de la expresión de diversos genes. La respuesta celular a los cambios en la composición de AGPI está dada por el metabolismo lipídico celular específico, como así también, por la expresión de los factores reguladores de la transcripción de AG.

La síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL), ácido araquidónico (AA) a partir del AL y ácido eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) a partir del ALA, ocurre, principalmente en el hígado, aunque también, en menor medida, en otros tejidos. La vía de metabolización consiste en una secuencia alternativa de pasos de elongación y desaturación catalizados por elongasas de AG y las $\Delta 5$ - y $\Delta 6$ -desaturasas (Gibson y col., 2011 y 2013). Los AGPI-CL son incorporados en las membranas celulares, principalmente en la posición sn-2 de los FL, y por acción de la enzima fosfolipasa A₂ son liberados de la misma. Estos AG sirven como sustratos para las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas y son convertidos en eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) (Calvani y Benatti, 2003; Benatti y col., 2004). Es importante resaltar algunos de los numerosos efectos benéficos que ejercen los AGPI-CL, que a su vez dependen de la familia de origen 1) AGPI-CL de las familia n-3 y n-6 tienen efectos

hipotensores 2) ambos influyen fuertemente sobre la expresión de genes, siendo los AGPI-CL n-3 potentes activadores de los receptores que activan la proliferación de peroxisomas (PPAR), induciendo la oxidación de AG y la supresión de la síntesis de AG y TAG, 3) los AGPI-CL n-3 tienen un potente efecto anti-inflamatorio, mientras que los AGPI n-6 son pro-inflamatorios, 4) los derivados de la familia n-3 poseen efectos antitrombóticos, mejoran la hiperinsulinemia y resistencia insulínica, 5) los eicosanoides derivados de los AGPI-CL n-3 se han asociado a una disminución del crecimiento de células tumorales y metástasis, mientras que un efecto inverso ha sido observado con los derivados de los AGPI-CL n-6, 6) los AGPI-CL, principalmente el DHA se correlaciona con las sinapsis de tejidos neuronales, son importantes en la formación de nuevos tejidos y los derivados de la familia n-6 tienen una alta implicancia en el crecimiento y desarrollo. En función de lo mencionado anteriormente es necesario destacar que los niveles y la relación de AGPI n-3 y n-6 poseen un significativo impacto en el desarrollo o prevención de alteraciones comunes a las ECNT (Calvani y Benatti, 2003; Simopoulos, 2008). Así, la relación recomendada entre AL y ALA es de 5:1-10:1 (FAO, 2012).

Los ácidos grasos *trans* (AGT) son AG insaturados con uno o más dobles enlaces en posición *trans*. Si bien se encuentran pequeñas cantidades de AGT “natural” en las carnes y la leche de rumiantes, estos contribuyen mínimamente a la dieta (Weggemans y col., 2004) y su asociación con el riesgo de ECV es muy controvertida (Mozaffarian y col., 2009b). De hecho, el ácido graso 9*t*-16:1, un biomarcador de ingesta de grasa láctea, está relacionado con un menor riesgo de diabetes y muerte súbita (Bandosz y col., 2015). Aún en la actualidad, donde se redujo considerablemente el uso de grasas parcialmente hidrogenadas, la mayor contribución de AGT (30-60%) es a través de la producción industrial. En las últimas décadas se ha asociado la ingesta de AGT industriales con un aumento del Col LDL, apolipoproteína B (ApoB), TAG y lipoproteínas (a), una disminución del Col HDL y ApoA1 y riesgo de ECV y muerte súbita (Mozaffarian y col., 2006; Mente y col., 2009). Por otra parte, se ha demostrado que estos AG promueven la inflamación, disfunción vasodilatadora endotelial, resistencia a la insulina, adiposidad visceral (Micha y col., 2009; Wallace y col., 2009).

3- Ácidos grasos *trans*

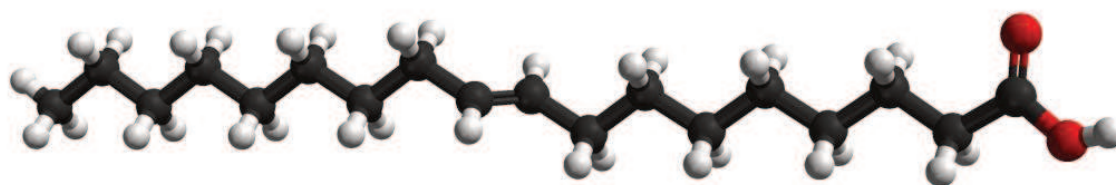
3.1- Fuente

Durante las diferentes etapas de su desarrollo, el hombre ha consumido AGT de diferente origen y en diversas cantidades. Los AGT presentes en los alimentos pueden derivar, principalmente, de tres orígenes. Los AGT de origen industrial son generados, aunque cada vez en

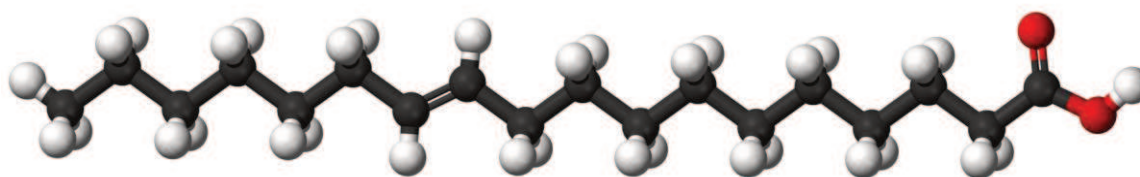
menor cuantía, por los procesos de hidrogenación parcial de aceites vegetales para su uso como grasas para untar, para panificación y frituras en el cual prevalece el ácido elaídico ($9t$ -18:1) (**Figura 4a**). Otra fuente de AGT, se generan por el sobrecalentamiento y/o cocción de aceites a muy altas temperaturas en procesos de refinación y culinarios como las frituras, así como también en la reutilización del mismo (Brühl y col., 1995; Koletzko y Decsi, 1997; Mensink y col., 2005; Liu y col., 2007; Valenzuela, 2008), en los que los isómeros generados pueden ser muy diversos, dependiendo del tipo de aceite sometido a altas temperaturas. Una tercera procedencia de AGT es por transformación bacteriana de los AG insaturados *cis* en *trans*, en el rúmen de los animales poligástricos en los que prevalecen fundamentalmente el ácido *trans*-vaccénico (AV) ($11t$ -18:1) (**Figura 4b**) y los conjugados del ácido linoleico (CLA), principalmente $9c,11t$ -CLA ó ácido ruménico (AR).

Figura 4- Estructura química del ácido elaídico ($9t$ -18:1) (a) y ácido *trans*-vaccénico ($11t$ -18:1) (b)

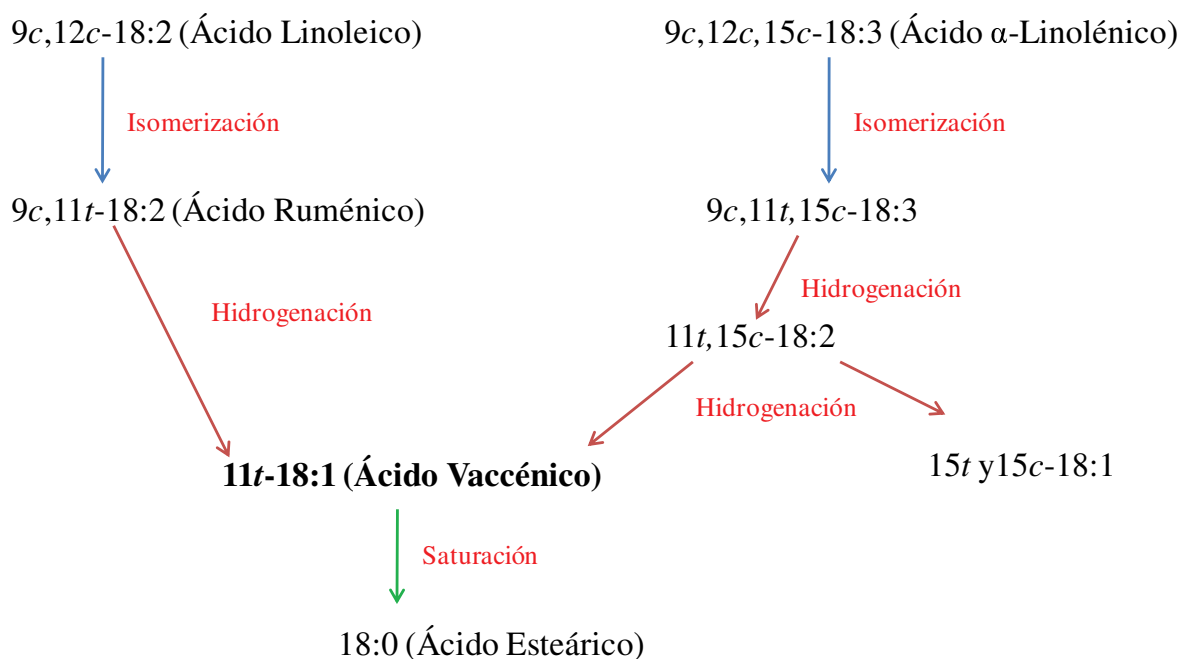
a



b



La **Figura 5** muestra la biohidrogenación incompleta de los AGPI a través de los microorganismos presentes en el rumen (Lock y Bauman, 2004) produciendo principalmente AV.

Figura 5- Síntesis de 11*t*-18:1 por biohidrogenación del ácido linoleico y α -linolénico en el rumen*

*Adaptado de Lock y Bauman (2004) y Field y col. (2009).

3.2- Efectos biológicos de los ácidos grasos *trans*

Los AGT dietarios se incorporan en los tejidos, acumulándose principalmente en el tejido adiposo, preferencialmente en la posición sn-1 de los TAG (Cook, 1980), como en los FL de membranas celulares ocupando las posiciones normalmente utilizadas por los AGS. Así, al incorporarse los AGT en los FL, reducen la fluidez de membrana, modulan la actividad de las proteínas insertas en las mismas, produciendo alteraciones en la estructura celular y en las funciones reguladoras de derivados de los AGPI-CL.

Esta incorporación de los diferentes AGT dietarios está íntimamente relacionada con las evidencias provistas por estudios epidemiológicos que han demostrado una correlación positiva entre el consumo de AGT totales, niveles circulantes y tisulares de AGT y el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Pietinen y col., 1997; Oh y col., 2005). Así, análisis combinados de 4 estudios de cohorte prospectivos, han permitido estimar que un incremento del 2% en el consumo de energía como AGT fueron asociados a un aumento del 23% del riesgo de enfermedad coronaria (Mozaffarian y col., 2006). Estudios más recientes han parcialmente diferenciado el riesgo de enfermedades cardiovasculares con el origen de los AGT dietarios. Específicamente, Bendsen y col. (2011) han mostrado que en estudios observacionales la ingesta de AGT de origen industrial, pero no los AGT de origen natural, correlacionaban positivamente con los eventos y casos fatales de

enfermedades cardiovasculares. Más aún, trabajos en humanos (Tholstrup y col., 2006; Jakobsen y col., 2008), y en animales de experimentación (Roy y col., 2007) han demostrado efectos benéficos de los AGT naturales. En este sentido, Mozaffarian y col. (2009a) han encontrado que la sustitución de AGT provenientes de aceites parcialmente hidrogenados (45%) por iguales contenidos de grasa láctea rica en AGT naturales, redujeron significativamente y en la misma medida que grasas vegetales no hidrogenadas, el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

La ingesta de AGT de origen industrial también se encuentra asociada con una mayor ganancia de peso corporal en humanos y en animales de experimentación ligado con un aumento de los panículos adiposos (Matthan y col., 2001; Smit y col., 2010; Ballesteros-Vásquez y col., 2012; Fariña y col., 2015; Illesca y col., 2015), así como un incremento en el peso del tejido hepático (Colandré y col., 2003). Los cambios en la adiposidad tienen un estrecho vínculo con el desarrollo de inflamación ya que el tejido adiposo (TA) secreta una serie de moléculas bioactivas consideradas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6), resistina, entre otras. En rigurosos estudios con este tipo de grasas, se ha demostrado que el consumo de AGT incrementa los niveles de Col-LDL y disminuye los de Col-HDL (Mensink y Katan, 1990; Almendingen y col., 1995; Chardigny y col., 2008). Además de las alteraciones sobre la colesterolemia, se demostró que la ingesta de AGT incrementaron los niveles TAG circulantes más que otras grasas dietarias (Colandré y col., 2003; Mensink y col., 2003; Illesca y col., 2015). Asimismo, se ha reportado un acumulo de TAG en hígado de animales de experimentación alimentados con AGT (Colandré y col., 2003; Bernal y col., 2006; Sain y col., 2013; Fariña y col., 2015; Illesca y col., 2015). En este sentido, en hepatocitos aislados fue demostrado que los AGT alteraban la producción de lipoproteínas, incrementando la secreción de ApoB 100, modificando la composición lipídica, aumentando el contenido de Col y reduciendo el tamaño de las partículas secretadas (Dashti y col., 2002; Mitmesser y Carr, 2005). Estas alteraciones de las lipoproteínas demostradas “*in vitro*” evidenciaron efectos potencialmente aterogénicos inducidos por los AGT industriales, independiente de su acción sobre las fracciones de Col plasmático. Estudios realizados con AGT en humanos también encontraron reducción en el tamaño de las lipoproteínas y alteraciones en la metabolización de las LDL (Mauger y col., 2003; Matthan y col., 2004).

Estudios de los efectos deletéreos de las grasas hidrogenadas ricas en ácido elaídico han sido extendidas a otras ECNT en humanos, como diabetes (Dorfman y col., 2009) y aterosclerosis (Mozaffarian y col., 2006). En este sentido cabe mencionar, que se ha establecido que en individuos con sobrepeso o diabetes mellitus, las dietas con AGT mostraron tener un efecto adverso en la sensibilidad a la insulina, acompañado de un incremento de los niveles de insulina en ayunas y postprandial sin cambios de la glucosa circulante (Christiansen y col., 1997; Larqué y col., 2001;

Meyer y col., 2001; Lefevre y col., 2005). No obstante, en individuos sanos y de peso corporal normal, no se encontró relación entre la ingesta de AGT y la sensibilidad a la insulina (Louheranta y col., 1999; Lovejoy y col., 2002). Investigaciones realizadas en modelos animales indicaron consistentemente que la ingesta de AGT tiene efectos adversos sobre marcadores de IR, cuando se comparó con dietas ricas en AGMI o AGS. Estos marcadores de IR incluyen, hiperinsulinemia posprandial (Ibrahim y col., 2005; Kavanagh y col., 2007; Pisani y col., 2008), hiperglucemia (Axen y col., 2003; Albuquerque y col., 2006) y reducción de la captación de la glucosa por el músculo esquelético (Natarajan e Ibrahim, 2005; Kavanagh y col., 2007; Fariña y col., 2018) y músculo cardíaco (Silveira Osso y col., 2008). Sin embargo, nuestro grupo (Bernal y col., 2006) y otros (Huang y col., 2009) sugieren que los AGT tendrían escaso efecto sobre las vías de metabolización de la glucosa.

Por otra parte, estudios de nuestro grupo de trabajo reportaron diversos efectos positivos de grasas ricas en AV y/o AR (Andreoli y col., 2007, 2009, 2010 y 2012; Scalerandi y col., 2014), por lo cual el tipo de AGT presente en la dieta puede ser determinante para las alteraciones asociadas al riesgo, desarrollo y/o prevención de ciertas ECNT.

Algunos estudios han demostrado que el AV tiene efectos neutrales en condiciones normolipidémicas e induce efectos hipotriglicéridémicos en condiciones de dislipidemia (Wang y col., 2008 y 2009). Estos hallazgos también han sido observados por varios estudios clínicos (Tholstrup y col., 2006; Chardigny y col., 2008; Motard-Belanger y col., 2008). Asimismo, evidencias bibliográficas sugieren que la suplementación con AV purificado puede atenuar las complicaciones observadas en el síndrome metabólico (SMet), incluidas la inflamación y la enfermedad del hígado graso (Blewett y col., 2009; Tyburczy y col., 2009; Ruth y col., 2010; Jacome-Sosa y col., 2014), como así también mejorar la secreción de insulina en modelos de roedores con diabetes tipo 2. Se ha propuesto que los efectos reductores de lípidos y antiinflamatorios del AV pueden estar parcialmente asociados con su capacidad para activar ligando de las vías reguladas por PPARs (Jaudszus y col., 2012; Wang y col., 2012).

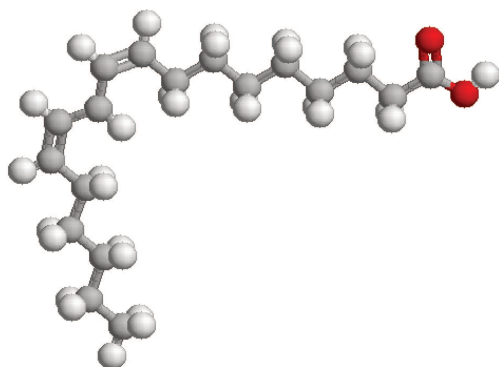
4- Conjugados del ácido linoleico

El término CLA comprende una serie de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico que se caracterizan por haber perdido el grupo metilénico que separa dos dobles enlaces contiguos conformando las estructuras conjugadas. A su vez, la mayoría de los CLA tienen al menos un doble enlace con isomería *trans*. Si bien existen potencialmente un gran número de isómeros posibles para los CLA (Roach y col., 2002), los más importantes por su abundancia y

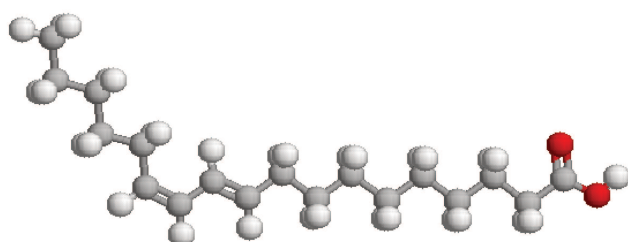
efectos biológicos tanto en animales como en humanos, son el $9c,11t-18:2$ y el isómero $10t,12c-18:2$ (Bauman y col., 1999) (**Figura 6**).

Figura 6- Estructura química del ácido linoleico ($9c,12c-18:2$) (a), $10t,12c-18:2$ (b) y ácido ruménico ($9c,11t-18:2$) (c)

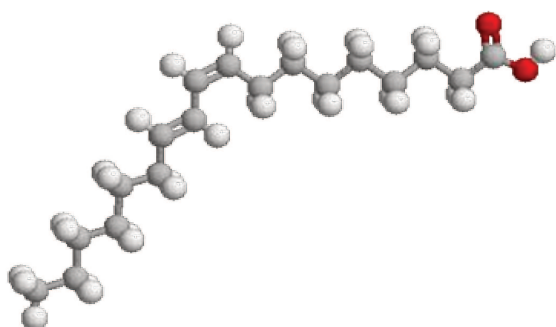
a



b



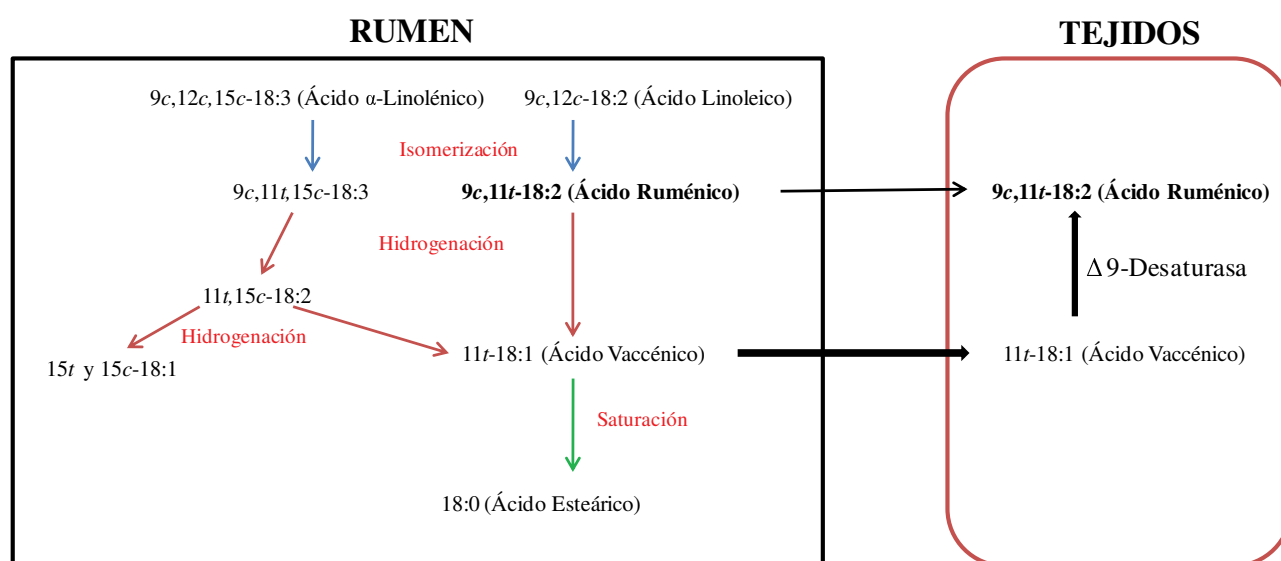
c



4.1- Fuentes de los conjugados del ácido linoleico

La mayor fuente natural de CLA proviene de la carne y de los productos lácteos derivados de animales rumiantes (vacas, ovejas, cabra y búfalo). Aunque se han identificado cerca de veinte isómeros en productos de rumiantes (Roach y col., 2002), el 75-90% del CLA total está representado por el AR (Bauman y col., 2003), mientras que el isómero $10t,12c$ -CLA se encuentra normalmente en concentraciones muy bajas (Piperova y col., 2000). En el rúmen se genera AR debido a la isomerización y transposición del doble enlace en la posición $12c$ a $11t$. La posterior hidrogenación del AR resulta en la producción del AV (**Figura 7**). Se ha visto que es poco probable que la alta proporción de AR presente en la leche de vaca (2-52 mg/g grasa) provenga sólo del rumen. Así, Griinari y Baumann (1999) han determinado que el 70% del AR de la grasa de la leche es derivado del AV por la actividad de la $\Delta 9$ -desaturasa en el tejido mamario. La síntesis endógena de AR a partir del AV también se ha informado en humanos (Turpeinen y col., 2002) y en otras especies (Santora y col., 2000; Corl y col., 2003), lo que contribuye a aumentar los niveles de $9c,11t$ -CLA en los tejidos del cuerpo mediado por la enzima $\Delta 9$ -desaturasa.

Figura 7- Biosíntesis ruminal y endógena del $9c,11t$ -18:2*

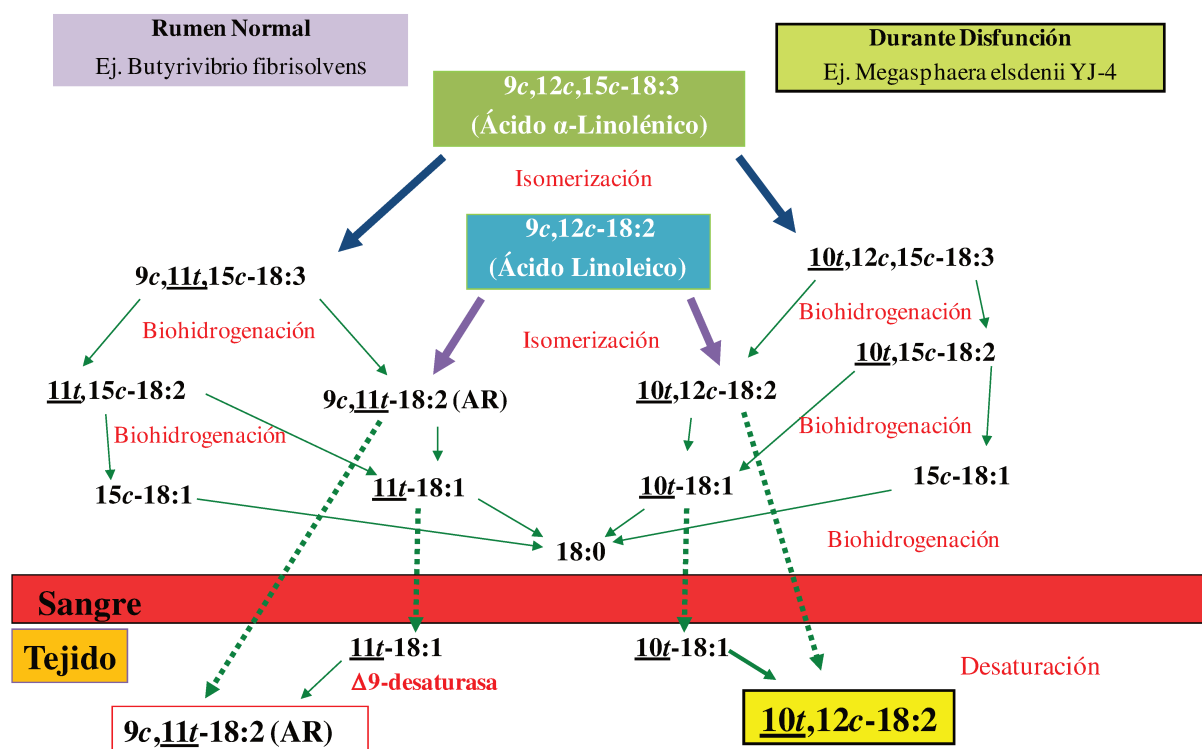


*Adaptado de Bauman y col. (2003); Field y col. (2009).

Bajo ciertas condiciones dietarias (ej: dieta bajas en fibra), el pH del rumen puede modificarse, y esto resulta en variaciones de la población bacteriana con consecuentes cambios en los patrones de biohidrogenación. Así, se altera el perfil de AG t -18:1 de los tejidos de rumiantes y, en esta situación, el isómero predominante en la grasa láctea es el $10t$ -18:1 (Griinari y Bauman,

1999). La síntesis de 10*t*-18:1 involucra a la enzima isomerasa bacteriana que forma el 10*t*,12*c*-CLA, como producto intermedio, incrementando su contenido en grasa de leche (**Figura 8**).

Figura 8- Formación de CLA a través de la biohidrogenación ruminal*



* Adaptado de Kramer y col. (2004).

El contenido de CLA en los productos lácteos varía aproximadamente entre 2,9 a 8,9 mg CLA/g de grasa y en las carnes entre 1,2 a 6,2 mg CLA/g de grasa, conteniendo aproximadamente 80% de AR, 10% de 10*t*,12*c*-CLA y otros CLA minoritarios (Parodi y col., 1977). Sin embargo, 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 rumiante. Como los productos lácteos son la principal fuente de CLA en la dieta humana (Lawson y col., 2001) y se han observado efectos benéficos de los mismos, se han hecho numerosos esfuerzos para aumentar el contenido de CLA en la grasa de la leche, lo que se puede lograr mediante la inclusión de aceites vegetales en la dieta de las vacas lecheras (Collomb y col., 2006; Chilliard y col., 2007; Gagliostro y col., 2017) y de otras especies como búfalas (Gagliostro y col., 2015).

Como la mayor parte del AR secretado en la leche se sintetiza endógenamente a partir del AV a través de la enzima Δ-9 desaturasa, la leche naturalmente enriquecida en AR también es una importante fuente de AV (Lock y col., 2005). Además, debe tenerse en cuenta que, bajo ciertas condiciones de enriquecimiento natural con AV y AR, se pueden modificar en la grasa de la leche

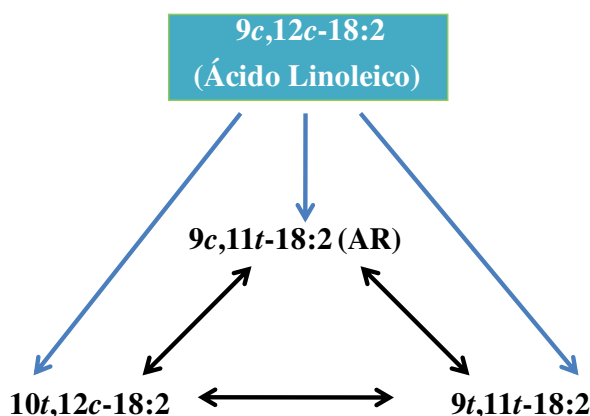
las concentraciones de otros isómeros *t*-18:1 distintos al AV, el contenido de AGS (principalmente AG de cadena media) y AGI (Chilliard y col., 2007). Esto debe tenerse en cuenta dado que no todos los alimentos enriquecidos naturalmente en CLA contienen la misma composición de AG.

Aumentar el contenido de AR en productos de rumiantes parece ser una buena opción ya que, no solo aumentaría la dosis efectiva, sino que también mejoraría el valor nutritivo de los productos de rumiantes. Existen varios factores que pueden regular/afectar el contenido de AR en dichos productos, entre ellos, la cantidad de precursor de CLA, especie, raza, factores fisiológicos o genéticos, el período de lactancia de los animales y las variaciones estacionales (Dhiman y col., 1999 y 2005; Slots y col., 2008). Numerosos estudios han demostrado que la dieta es el factor más importante que afecta el contenido de CLA de la grasa de la leche, y su concentración puede aumentarse varias veces por medios dietéticos (Chilliard y col., 2000 y 2001; Bauman y col., 2001a y 2001b; Stanton y col., 2003; Lock y Bauman, 2004). Una clave para aumentar el contenido de CLA en la leche es aumentar la ingesta de AGPI de 18 átomos de carbono (sustrato para la biohidrogenación del rumen). El suministro de AL y ALA es fácilmente logrado mediante la adición de aceites vegetales ricos en estos AG, como aceite de soja, girasol, colza o lino (Kelly y col., 1998a; Dhiman y col., 2000; Bauman y col., 2006; Shingfield y col., 2008; Toral y col., 2010). La cantidad de AGPI de 18 átomos de carbono que se puede agregar a las dietas de las vacas lecheras debe ser controlada, debido a los potenciales efectos adversos que estos AG pueden tener en el metabolismo de las bacterias del rumen, lo que perjudicaría la fermentación del rumen y el rendimiento de CLA natural (Jenkins, 1993; Gonthier y col., 2005). Sumado a lo antes mencionado, el uso de pasturas frescas produce un aumento de 2 a 3 veces el contenido de CLA de la grasa de la leche (Stanton y col., 1997; Kelly y col., 1998b; Dhiman y col., 1999). Thorsdottir y col. (2004) reportaron una mayor concentración de AR en la época de verano al comparar con el invierno. En general, se piensa que las variaciones estacionales en el contenido de AR y AV en la leche son causadas por variaciones estacionales en el contenido de ALA en la pastura, que es más alta en verano (Banni y col., 1996; Auldist y col., 2002; Lock y Garnsworthy, 2003; Meluchová y col., 2008; Zunong y col., 2008; Butler y col., 2009). La etapa de lactancia del animal también tiene un efecto sobre el contenido de AR en la leche (Kay y col., 2005; Stoop y col., 2009). Durante la lactancia temprana (antes de 100 días) el contenido de este AG es significativamente menor que en la etapa posterior (después de 200 días) (Kgwatalala y col., 2009; Borowiec y col., 2010; Oh, 2012).

Otra fuente importante de CLA ha sido desarrollada industrialmente para su comercialización debido a las múltiples propiedades benéficas encontradas a los mismos isómeros. Para ello, se han desarrollado métodos que permiten convertir el AL en una mezcla de CLA, conteniendo principalmente los isómeros AR y 10*t*,12*c*-CLA. Así, por isomerización alcalina de

aceites ricos en AL, como aceite de cártamo, girasol o maíz, se obtienen mezclas con cantidades equimoleculares de ambos isómeros (aproximadamente 40% de cada uno) y otros isómeros minoritarios (**Figura 9**) (Pariza y col., 2001). Otro método para la obtención de CLA, consiste en la isomerización del AL mediante la utilización de bacterias específicas (Kishino y col., 2003). Éste método puede contribuir a la preparación de isómeros con mayor grado de pureza y máxima actividad biológica. Cabe destacar que, los niveles de CLA contenidos en los alimentos son muy inferiores que aquellos que se pueden obtener por sustitución con CLA obtenidos de síntesis, y además, es distinta la proporción relativa de sus constituyentes, por lo que los efectos biológicos que pueden ejercer pueden ser diferentes.

Figura 9- Esquema de la reacción de isomerización e hidrogenación del AL para la síntesis química de CLA*



*Adaptado de Bernas y col. (2003).

4.2- Efectos biológicos de los CLA

El interés por los CLA comenzó a partir de los estudios de Pariza y Hargrave, en los cuales encontraron que dicho compuesto, presente en la carne grillada, tenía propiedades antimutagénicas (Pariza y Hargrave, 1985; Ha y col., 1987). Estudios posteriores corroboraron el potencial anticancerígeno de los CLA y han extendido sus efectos benéficos a otros estados fisiopatológicos relacionados con diversas ECNT.

La mayoría de los efectos de los CLA son atribuibles a los isómeros AR y 10t,12c-CLA, ya sea, a la acción directa de los mismos o al resultado de diversas interacciones entre ellos o con otras variables nutricionales. Ambos isómeros poseen diferentes acciones y éstas pueden ser consecuencia de la diferente estructura de dieno conjugado que presentan los isómeros y sus metabolitos, como también, de su diferencial incorporación en las fracciones de lípidos tisulares y

metabolización. Una vez que los distintos isómeros CLA son incorporados a los tejidos, ellos pueden ser metabolizados, secretados/excretados o retenidos en las estructuras celulares o de depósitos. Resultados de nuestro grupo (Scalerandi, 2013; Illesca, 2015; Fariña y col., 2019) han demostrado que TA tiene una mayor retención de CLA que otros tejidos, mientras que el cerebro tiene una tasa de retención prácticamente cercana a la sensibilidad metodológica.

También es importante destacar que, en relación a los efectos biológicos de los CLA, se ha observado una fuerte diferencia en la susceptibilidad a estos isómeros por parte de las distintas especies. Así, los ratones son los que presentan mayor respuesta metabólica, seguida por los hámsters 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 son un factor influyente en la respuesta a los CLA (Fernandez-Quintela y col., 2004). En humanos, los efectos de los CLA hallados sobre la salud son controversiales, y esto se debe, principalmente, a los distintos tipos de CLA utilizados, las diferentes dosis, variaciones en la duración del tratamiento y características de los sujetos estudiados. A continuación se mencionan algunos de los principales efectos de los CLA.

4.2.1- Efectos sobre la carcinogénesis

El rol de los CLA en la inhibición del crecimiento tumoral y/o su potencial efecto metastásico, es aún controversial. Además, el mecanismo exacto por el cual actúan, no es totalmente conocido, aunque pareciera estar asociado al isómero *9c,11t*-CLA, el cual podría inhibir la angiogenesis (Sikorski y col., 2008). Otro efecto beneficioso de los CLA en la evolución de los tumores podría ser la interferencia con componentes del ciclo celular. Se ha demostrado que inhiben los niveles de ciclinas D y A, y que aumentan la expresión de p53 (Kelley y col., 2007; Stachowska, 2008). La acción antitumoral de los CLA también ha sido atribuida a alteraciones de la peroxidación lipídica, metabolismo de eicosanoides y expresión génica (Kelley y col., 2007). En relación a éste efecto de los CLA, es importante distinguir algunas discrepancias entre modelos animales y humanos. En modelos animales, se ha reportado que los CLA inhiben la inducción química de tumores de glándula mamaria, piel, colon, entre otros (Sakai y col., 2006; Stachowska, 2008; Shiraishi y col., 2010). El efecto inhibitorio antitumoral observado, dependió de la concentración dietaria de la mezcla de CLA (entre 0,05-1%), y concentraciones mayores al 15% no presentaron efecto. Sin embargo, Ip y col. (2007) observaron, en ratones, que la sustitución con *10t,12c*-CLA, estimuló el crecimiento y desarrollo del tumor mamario. Los resultados en humanos, son mucho menos concluyentes. Han sido reportado efectos benéficos del *9c,11t*-CLA sobre la apoptosis, dependientes del tiempo de tratamiento y la dosis empleada, en líneas celulares de cáncer de colon (Beppu y col., 2006). Asimismo, se ha demostrado que ambos isómeros (AR y *10t,12c*-

CLA) suprimen la proliferación tumoral de cáncer mamario (Koronowicz y col., 2009; McGowan y col., 2013). Por otro lado, Larsson y col. (2009), sugieren que no hay evidencias del efecto protector de los CLA contra el cáncer de mama. Por lo tanto, con los resultados controversiales encontrados y el bajo número de estudios disponibles, se considera que no hay pruebas suficientes para determinar si la ingestión de CLA tiene un efecto significativo sobre el cáncer.

4.2.2- Efectos sobre el peso y la composición corporal

Desde los primeros reportes realizados por Park y col. (1997) mostrando que los CLA dietarios podrían alterar la composición corporal en ratones, numerosos investigadores han extendido los estudios en el tema, empleando distintos modelos animales. El efecto en la disminución de la adiposidad con una mezcla de isómeros CLA se ha confirmado en varios modelos de ratones (West y col., 1998; Poirier y col., 2005a; Halade y col., 2010; Parra y col., 2010; Den Hartigh y col., 2017), ratas (Azain y col., 2000), hámsters (Gavino y col., 2000; Navarro y col., 2003) y cerdos (Ostrowska y col., 2003; Dugan y col., 2004; Corl y col., 2008). Sin embargo, la suplementación con CLA afecta de manera diferente a las distintas especies, mostrando una mayor susceptibilidad en ratones. Muy pocos trabajos han reportado una disminución de los depósitos de grasa por la sustitución con AR (Akahoshi y col., 2003; de Roos y col., 2005; Scalerandi y col., 2014). Por lo tanto, los cambios en la composición corporal se atribuyen fundamentalmente al isómero 10*t*,12*c*-CLA (Park y col., 1999; Clément y col., 2002).

Los mecanismos involucrados mediante los cuales los CLA, y más específicamente el 10*t*,12*c*-CLA, modulan la composición corporal están relacionados a acciones sobre la captación, oxidación y síntesis de AG, como así también sobre la lipólisis. Así, ha sido sugerido que incrementan la tasa metabólica basal, la transcripción de las proteínas desacoplantes (UCP) (Wendel y col., 2009; Shen y col., 2013 y 2015), la oxidación de lípidos asociada a un incremento en la expresión de las enzimas acil-CoA oxidasa (ACOX) y carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1), siendo esta última la enzima clave involucrada en la captación de los AG en la mitocondria (De Deckere y col., 1999; LaRosa y col., 2006; Choi y col., 2007; Kim y col., 2012; Den Hartigh y col., 2013). En relación a la lipogénesis (Brown y col., 2004; LaRosa y col., 2006), se ha observado una reducción en la expresión y actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), sintasa de ácido graso (FAS), y estearil-CoA desaturasa (SCD). Algunos autores han observado que una reducción en la actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL), clave en la captación de AG, también contribuye a la reducción del TA en roedores (Xu y col., 2003; Andreoli y col., 2009). Muchos de los mecanismos subyacentes a las modificaciones enzimáticas están relacionados a la capacidad de los CLA de inhibir factores de transcripción activadores de genes lipogénicos, como el PPAR γ y la

proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP)-1. En relación a la lipólisis, los efectos encontrados son controversiales. Mientras que algunos autores han observado que el tratamiento agudo con mezcla de isómeros CLA o 10*t*,12*c*-CLA incrementa la lipólisis en adipocitos (Chung y col., 2005; Moon y col., 2006) y en tejido adiposo de ratones (Ippagunta y col., 2011 y 2013), otros no han encontrado efecto en el TA de estos últimos en estudios a largo plazo (Simón y col., 2005). Por otro lado, numerosos autores han demostrado que los CLA tienen la capacidad de disminuir el número de células adiposas por supresión de la diferenciación y proliferación, como por inducción de una mayor apoptosis. Estos efectos pueden ser mediados por la acción antagonista de los CLA sobre el PPAR γ (Brown y col., 2003; Kennedy y col., 2008; Kadegowda y col., 2013), el cual cumple un rol clave en la conversión de preadipocitos a adipocitos, como por una mayor expresión del TNF- α (Poirier y col., 2006; Kennedy y col., 2008).

Es importante considerar que la reducción de las reservas de grasa inducida por los CLA, disminuye drásticamente los niveles de adiponectina circulante (Miller y col., 2008; Den Hartigh y col., 2017) lo que podría explicar las alteraciones en el metabolismo de glucosa y la propensión a procesos inflamatorios observadas en diferentes modelos experimentales.

Los estudios que evaluaron los efectos de los CLA sobre la composición corporal en humanos son muy controversiales debido a la menor sensibilidad frente a los isómeros y las numerosas variables en los protocolos experimentales empleados (Wang y Jones, 2004; Silveira y col., 2007; Kennedy y col., 2010).

4.2.3- Efectos sobre el metabolismo glucídico

Los resultados hallados en modelos experimentales alimentados con mezclas comerciales de CLA sobre el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina son escasos y discrepantes. En ratas obesas y diabéticas, los CLA han mostrado efectos benéficos sobre la IR y los niveles plasmáticos de glucosa (Houseknecht y col., 1998; Henriksen y col., 2003; Nagao y col., 2003). Contrariamente, en ratones, el 10*t*,12*c*-CLA indujo IR con hiperinsulinemia y normo- o hiperglucemia (DeLany y col., 1999; Tsuboyama-Kasaoke y col., 2000; Clément y col., 2002). Esta diferente respuesta, puede estar asociada a la marcada pérdida de grasa corporal inducida por el isómero 10*t*,12*c*-CLA, y la consecuente alteración en las concentraciones de adipocinas plasmáticas que se observa en el ratón y no en la rata.

En humanos, los resultados hallados fueron estrechamente relacionados al estado fisiológico de los sujetos. Así, en personas sedentarias jóvenes, con buen estado de salud, los CLA han mejorado la sensibilidad insulínica (Eyjolfson y col., 2004), a diferencia de los sujetos obesos o con sobrepeso, donde no mostraron efectos significativos (Risérus y col., 2002a; Gaullier y col., 2004 y

2005; Syvertsen y col., 2007; Norris y col., 2009). En cambio, en pacientes con alto riesgo de contraer ECV, los CLA disminuyeron la sensibilidad a la insulina (Risérus y col., 2002b y 2004b).

4.2.4- Efectos sobre el metabolismo lipídico

Ha sido reportado, tanto para la mezcla, como para ambos isómeros individuales, un efecto benéfico sobre las lesiones ateroscleróticas en conejos y hamsters (Kritchevsky y col., 2000; Valeille y col., 2005; Wilson y col., 2006; Navarro y col., 2007). Asimismo, en animales de experimentación se ha demostrado una reducción de los niveles séricos de Col, TAG y Col-LDL (Munday col., 1999; Stangl, 2000; Lee y col., 2005). Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que el 10*t*,12*c*-CLA induce hepatomegalia y esteatosis hepática en ratones por redistribución de los depósitos de grasa (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002), el cual ha sido definido como un cuadro lipoatrófico (Poirier y col., 2005a), el cual pareciera tener su origen primario a nivel del tejido adiposo. Este efecto no se observa en ratas alimentadas con el isómero 9*c*,11*t*-CLA.

En humanos, algunos autores no han encontrado cambios en los niveles de lípidos y lipoproteínas plasmáticas, especialmente con la mezcla de isómeros y con AR, en voluntarios saludables (Smedman y Vessby, 2001; Mele y col., 2013) y en aquellos con sobrepeso/obesidad (Risérus y col., 2004a; Eftekhari y col., 2014; Dus-Zuchowska y col., 2016). Mientras que, otros investigadores reportaron que los CLA mejoran el perfil lipídico en ambos tipos de pacientes (Gaullier y col., 2005).

4.2.5- Efectos sobre la respuesta inflamatoria y el sistema inmune

Numerosos estudios han demostrado que los CLA tienen la capacidad de modificar la inmunidad influenciando la producción de factores solubles y mediadores inflamatorios, tanto en humanos como en modelos animales (Kelly, 2001; Bhattacharya y col., 2006). Se ha demostrado que los CLA aumentan la función humoral incrementando la producción de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA de los linfocitos de bazo) de manera dosis dependiente, y que reducen la función de los macrófagos disminuyendo la síntesis de mediadores y/o enzimas inflamatorias (O'Shea y col., 2004; Ramirez-Santana y col., 2011). También se ha visto que reducen los niveles de IgE, PGE₂ e IL-12, los cuales juegan un rol crucial en las reacciones alérgicas tipo-I (Sugano y col., 1998). Dada la similitud entre el AL y los CLA, es probable que ciertos efectos de los CLA sean mediados a través de una modificación del metabolismo del AA, con los consecuentes cambios en la síntesis de eicosanoides y mediadores lipídicos derivados de los mismos (O'Shea y col., 2004; Kwak y col., 2009). Además, los CLA disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente TNF- α e interferón- γ , que juegan un rol central en la patogénesis de inmunopatologías crónicas

(Akahoshi y col., 2004; Perdomo y col., 2011). Asimismo, se ha observado que los CLA disminuyen la respuesta inmune innata, decreciendo la actividad de los monocitos, macrófagos y de las células “natural killers”, como también la producción de prostaglandinas y leucotrienos (O’Shea y col., 2004). Existe también, una hipótesis complementaria que postula que los CLA podrían alterar la función inmune interactuando con los PPARs, los cuales regulan la expresión de genes responsables del balance energético y la inmunidad (Moya-Camarena y col., 1999; Yu y col., 2002; Perdomo y col., 2011).

Es importante enfatizar que la mayoría de los mecanismos descritos anteriormente con los CLA pueden ser base para la interpretación de acciones regulatorias, pero no necesariamente pueden ser concebidos como efectos que se puedan extrapolar a los diferentes modelos experimentales y a ambos isómeros por igual. Más aún, el comportamiento de los isómeros individuales, como fuera previamente demostrado por nuestro grupo (Scalerandi, 2013), depende del entorno de otros AG, como también de la matriz, siendo así esperado que los efectos de los componentes aislados sean diferentes a los posiblemente observados con leches enriquecidas con 9*c*,11*t*-CLA.

5- Grasa láctea

5.1- Composición de la grasa láctea y su impacto nutricional

Durante años se ha insistido en recomendar un consumo preferente de productos lácteos desnatados o con reducido contenido en grasa. Sin embargo, durante los últimos años se han realizado investigaciones que han demostrado la significativa actividad biológica de los AG presentes en la leche, en relación con la salud humana (Akalin y col., 2006; German y Dillar, 2006; Steijns, 2008; Parodi, 2009). Estudios epidemiológicos no han encontrado o han reportado escasas asociaciones inversas entre la ingesta de productos lácteos y el riesgo de ECV (Soedamah-Muthu y col., 2011; de Oliveira Otto y col., 2012). Asimismo, Elwood y col. (2010) han demostrado que el consumo de leche y productos lácteos tiene una incidencia positiva en la salud al disminuir el riesgo sobre las ECV, además estudios longitudinales sugieren que no existe una correlación entre el consumo de leche entera y obesidad, diabetes o ECV en adultos (Mozaffarian y col., 2011; Sluijs y col., 2012; O’Sullivan y col., 2013; Wang y col., 2014; Smith y col., 2015). En lo que respecta a la grasa láctea (GL) no existe evidencia científica clara que demuestre que su consumo moderado tenga incidencia negativa sobre las ECV (Steijns, 2008), más aún, se ha demostrado que la GL puede tener beneficios potenciales para la diabetes mellitus (Mozaffarian y col., 2010 y 2013; Forouhi y col., 2014; Buijsse y col., 2015; Yu y Hu, 2018) y las ECV (Khaw y col., 2012; de

Oliveira Otto y col., 2013; Chowdhury y col., 2014; Dehghan y col., 2018; Álvarez-Bueno y col., 2019). Además, se ha sugerido que el consumo de productos lácteos puede prevenir el desarrollo de SMet (Mena-Sánchez y col., 2019) incluidos algunos factores de riesgo como la resistencia a la insulina (Drouin-Chartier y col., 2016a), el aumento de la presión arterial, la dislipidemia y la obesidad abdominal, que en conjunto aumentan notablemente el riesgo de diabetes y ECV (Astrup, 2014; Hu y col., 2014; Qin y col., 2015). Las evidencias sugieren que la combinación de péptidos bioactivos, minerales y AG lácteos específicos (ej: ácidos grasos de cadena ramificada, grasas saturadas de cadena media, grasas *trans* específicas de rumiantes) u otros factores solubles en la GL constituyen una matriz compleja que puede limitar los efectos nocivos como el aumento de Col por parte de los AGS (Mozaffarian, 2015; Drouin-Chartier y col., 2016b). También se asoció un alto consumo de productos lácteos enteros con un menor riesgo de desarrollo de cáncer colorrectal (Barrubés y col., 2019). Cabe mencionar que Fontecha y col. (2019) concluyeron que el consumo de productos lácteos no afecta de manera adversa el riesgo de resultados cardiovasculares (ECV, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca y accidente cerebrovascular) e incluso puede tener un débil efecto protector.

No obstante, no se puede dejar de mencionar que existen trabajos de investigación que observaron un efecto negativo de la leche y los productos lácteos principalmente por un alto consumo de los mismos (Michaëlsson y col., 2014; Aune y col., 2015; Brouwer-Brolsma y col., 2018).

La GL en la leche se presenta en forma de glóbulos rodeados de una membrana de naturaleza lipoproteica compuesta principalmente por FL y glicoproteínas cuyo núcleo está constituido mayoritariamente (95 %) por TAG. Su composición comprende además otros lípidos simples (diglicéridos, monoglicéridos, ésteres de Col y ceras), lípidos complejos (mayoritariamente FL), Col, antioxidantes (especialmente tocoferoles) y escualeno (Jensen, 2002). Los lípidos de la leche constituyen un vehículo para las vitaminas liposolubles (A, D, E y K), así como carotenoides (Juárez y Fontecha, 2009).

Los lípidos se encuentran entre los componentes más importantes de la leche, son una buena fuente de energía y proporcionan atributos sensoriales y físicos únicos a los productos lácteos.

La composición de TAG es compleja existiendo más de 400 AG diferentes, que dependen principalmente de la dieta de los rumiantes y su etapa de lactancia (Jensen, 2002; Schroeder y Vetter, 2013; Shingfield y col., 2013; Hanuš y col., 2018). El perfil lipídico de la GL contiene un elevado niveles de AGS (60-70%), un 20-25 % de AGMI con un 20-22 % de ácido oleico y un 1-4 % de AGT y 3-5 % de AGPI, en cuya fracción está incluido el AL y AR (Fontecha y Juárez, 2012). Los AG que conforman los TAG de la GL provienen de dos fuentes: síntesis *de novo* en la glándula

mamaria y la transferencia de AG preformados desde los lípidos dietarios. Los AG de cadena corta y media (4:0 a 14:0) y la mitad del 16:0 se sintetizan *de novo*, a partir del acetato y el β -hidroxibutirato provenientes de la fermentación microbiana de celulosa y hemicelulosa en el rumen (Mansbridge y Blake, 1997). Estos sustratos son transportados hacia las células epiteliales de las glándulas mamarias. Mientras que el resto de los AG, incluido el 50% del ácido palmítico y los AG de cadena larga derivan de la captación de los AG circulantes por parte de las células epiteliales de las glándulas mamarias. Aquellos AG que provienen de la dieta, se absorben a nivel intestinal y son transportados como TAG; por lo tanto, la captación de los mismos en la glándula mamaria depende de la acción de la enzima LPL presente en la pared de los capilares. En cambio, los AG de cadena larga que provienen de las reservas del TA del animal son transportados en la circulación como ácidos grasos libres (AGL) y la captación mamaria es proporcional a la concentración plasmática (Lock y Bauman, 2004). En condiciones normales, aproximadamente la mitad de los AG de la leche se sintetiza *de novo* en la glándula mamaria, mientras que el resto proviene de la captación de TAG y AGL circulantes. Esta proporción puede variar en función del estado fisiológico del animal y de factores ambientales. En el primer caso, las variaciones se deben a cambios en las reservas de tejido adiposo (Bauman y Griinari, 2003); mientras que, el componente nutricional ha sido el más importante dentro de los factores ambientales, siendo así una herramienta para lograr modificaciones en el rendimiento y composición de la GL (Bauman y Griinari, 2001a; Bauman y col., 2011).

A pesar del elevado contenido en AGS (65%) en la GL, sólo la fracción correspondiente a los ácidos laúrico, mirístico y palmítico, podría considerarse desfavorable, si se produce un consumo excesivo (Legrand, 2008). El ácido esteárico es considerado neutro desde la perspectiva de la salud humana, aunque es tan efectivo para reducir el Col plasmático como el ácido oleico, presente en GL en altas concentraciones (15-23%). La presencia de AGS de cadena corta (butírico y caproico) y cadena media (caprílico y cáprico), no ejerce efecto sobre los niveles del Col en sangre (Parodi, 2004). El ácido butírico, es un agente antitumoral, inhibe el crecimiento y la diferenciación de células tumorales de próstata, mama y colon, y favorece su apoptosis en animales de experimentación (Hassig y col., 1997; German, 1999). Por otro lado, los AG de 6 a 10 átomos de carbono poseen actividades antibacterianas y antivírales tanto en ensayos *in vitro* como en animales de experimentación (Thormar y col., 1994; Hilmarsson y col., 2006).

Actualmente se ha observado un creciente interés en los lípidos lácteos como fuente de ingredientes bioactivos y funcionales cuyo consumo aporta beneficios para la salud y la prevención de enfermedades crónicas en humanos. En particular, cabe señalar que la GL es la principal fuente

natural de CLA de nuestra dieta y es reconocida la actividad de los mismos en la inhibición del cáncer, aterosclerosis y mejoramiento de las funciones inmunológicas (Parodi, 2004).

5.2- Grasa láctea modificada como fuente de CLA

Los productos lácteos poseen una concentración de CLA natural que varía de 0,34 a 1,07 g/100 g de GL (Fritsche y col., 1999 y 2000), pero esta concentración de CLA es baja para cumplir con funciones benéficas y/o reguladoras para el humano (Mir y col., 2004; Zlatanos y col., 2008). Por lo tanto, se han realizado varias intervenciones para mejorar la concentración de CLA en la leche. Para este propósito se han utilizado como estrategias diferentes especies de animales, razas, manipulaciones de la dieta, efectos estacionales, etc. (Grinari y Bauman, 1999; Bauman y col., 1999 y 2001a).

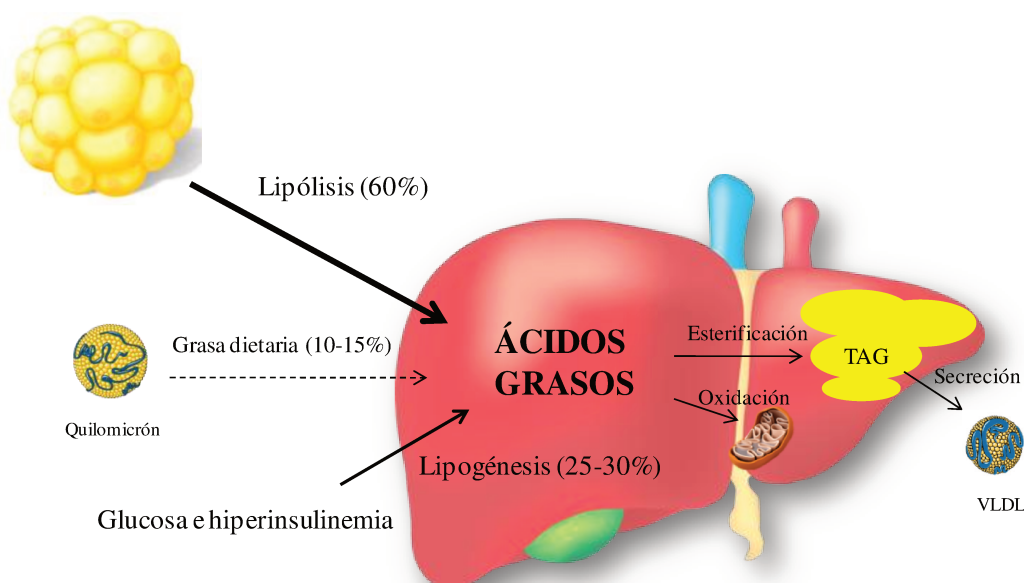
En lo que respecta a la manipulación de la dieta, los cambios más importantes se han logrado agregando aceites vegetales o marinos ricos en AGPI, como suplemento a la dieta del ganado lechero o cambiando las cantidades y la naturaleza de los forrajes, particularmente las pasturas (Dewhurst y col., 2006; Chilliard y col., 2007). En términos generales, cuando el porcentaje de pasto aumenta en la dieta, se han observado aumentos lineales en ALA, AV y CLA y disminuciones en el contenido de los AGS (Couvreur y col., 2006). En lo que respecta a la influencia del suplemento dietario y del forraje sobre la biohidrogenación de los AG en el rumen y en la formación de CLA. Cruz-Hernández y col. (2007) informaron que hubo un aumento lineal del contenido de AV y AR (entre un 66 a 85%) en función del nivel de aceite de girasol utilizado en la ración; mientras que, los AGS totales disminuyeron un 18%. Bell y col. (2006), utilizando una combinación de aceite de cártamo con monensina, incrementaron 10 veces el contenido de AR en comparación con la dieta control. El uso de aceite de pescado en las raciones del ganado lechero produjo significativos incrementos (más de 300%) en los niveles de CLA (Chilliard y col., 2001). Asimismo, Dhiman y col. (2000) lograron aumentar entre 305 y 318% el contenido de CLA total usando raciones suplementadas con aceite de lino (2 y 4 %, respectivamente). En lo que respecta al uso de pasturas fresca, estos autores (Dhiman y col.; 1999) informaron que el consumo de la misma por el ganado bovino incrementó un 500% el contenido de CLA en la leche en comparación con las vacas alimentadas con una dieta que contenía 50% de forraje conservado (heno y ensilajes) y 50% de grano. Del mismo modo, otros autores también reportaron aumentos en el contenido total de CLA, entre un 100% (Kelly y col., 1998b) y un 187% (Tyagi y col., 2007). Mientras que, Ward y col. (2003) informaron incrementos menores (26% para el AV y 18% para CLA) al aumentar un 25% la ingesta de pastura fresca.

6- Esteatosis hepática

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) se caracteriza por una evidente esteatosis hepática (acúmulo de grasa en hígado igual o mayor al 5% del peso del órgano), en ausencia de causas secundarias de acumulación de grasa hepática, como son el consumo excesivo de alcohol y otras afecciones que pueden conducir a la esteatosis hepática. La presencia de esteatosis e inflamación con lesión de los hepatocitos se define como esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que puede estar acompañada de fibrosis progresiva (Chalasani y col., 2012; Haas y col., 2016). NAFLD constituye un problema de salud importante, ya que en la mayoría de los casos está íntimamente relacionada con obesidad, diabetes mellitus tipo 2, IR y otras anormalidades metabólicas, incluyendo hipertensión y dislipidemia, denominadas colectivamente como SMet (Petersen y col., 2007; Lewis y col., 2010). A su vez, constituye una de las principales causas de cirrosis y también puede asociarse con carcinoma hepatocelular (Yasui y col., 2011).

La esteatosis ocurre cuando hay un desequilibrio entre la disponibilidad, secreción y eliminación de los lípidos (Barrows y col., 2005; Lou-Bonafonte y col., 2011). Donnelly y col. (2005) demostraron en pacientes con NAFLD, que aproximadamente el 60% de los AG que participan en el acúmulo de TAG hepáticos proceden de la lipólisis del tejido adiposo, el 15% directamente de la dieta (ingesta excesiva de grasa e hidratos de carbono) y el 25% restante proceden de la lipogénesis (**Figura 10**).

Figura 10- Esquema que representa las contribuciones de las distintas vías metabólicas a la esteatosis hepática*



*Adaptado Ferré y Foufelle (2010)

Dado que el origen específico de los lípidos que se acumulan en el hígado sigue siendo desconocido, la comprensión de los mecanismos moleculares que conducen a la esteatosis hepática es importante para la prevención y/o la reversión de esta afección. Entre los diferentes mecanismos propuestos debemos considerar:

6.1- Lipólisis del tejido adiposo y captación de los AGL por el hígado

Una de las principales fuentes de AG hepáticos es el reclutamiento de AGL del torrente sanguíneo. Los mismos derivan de la lipólisis en los adipocitos, que ocurre en el estado de ayuno, promovido por catecolaminas, péptidos natriuréticos y glucagón, y generalmente son reprimidos por la insulina (Arner, 2005). En presencia de IR en el tejido adiposo, los niveles de AGL son altos, a pesar de los elevados niveles de insulina circulante, debido a la resistencia a la acción antilipolítica de esta hormona (Groop y col., 1989; Bugianesi y col., 2005; Lafontan y col., 2009). Los hepatocitos captan los AGL mediante las proteínas transportadoras de AG (FATP), caveolinas, traslocasa de AG (FAT/CD36) y/o las proteínas de unión a AG (FABP) o por difusión pasiva (Trigatti y col., 1999; Doege y col., 2006; Berk, 2008; Snel y col., 2012). La expresión hepática de FAT/CD36 es normalmente débil, pero aumenta con el contenido de TAG hepático (Degrace y col., 2006; Greco y col., 2008; Buqué y col., 2010).

Los AGL si no se oxidan, se acumulan bajo la forma de TAG dentro de las gotas de lípidos intracitoplasmáticos; una vez que se supera el umbral de almacenamiento de lípidos, la acumulación excesiva de AGL conduce a la producción de metabolitos lipídicos tóxicos (ceramidas, diacilgliceroles, lisofosfatidilcolina y metabolitos de Col oxidado) (Peverill y col., 2014; Liu y col., 2016) que promueven la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno causando daño hepático (Listenberger y col., 2003; Mantzaris y col., 2011; Saponaro y col., 2015). Además, otros estudios han demostrado que la inhibición de la síntesis de TAG en hígado produce una mejoría de la esteatosis hepática, pero exacerba el daño de las células hepáticas debido a una mayor acumulación intra-hepática de AGL (Neuschwander-Tetri, 2010). Estos hallazgos sugieren que la acumulación de TAG hepáticos podría ser un mecanismo de protección (Listenberger y col., 2003; Yamaguchi y col., 2007).

6.2- Lipogénesis y esterificación

Cuando la ingesta de carbohidratos es excesiva, la vía de la lipogénesis permite su conversión en AG, que a su vez, pueden ser esterificados a TAG en el hígado. En NAFLD el aumento de la glucemia y la hiperinsulinemia, como consecuencia de la IR, favorecen la conversión

de glucosa en AG por aumento de la expresión de las enzimas glucolíticas y lipogénicas inducidas por la activación del SREBP-1c, ChREBP y LXR α (Foufelle y Ferré, 2002; Fabbrini y col., 2010).

6.3- Ácidos grasos dietarios

La composición de AG de la dieta es un factor importante capaz de influir en el metabolismo de los lípidos hepáticos siendo capaces de regular varias vías metabólicas (Nguyen y col., 2008; Jump, 2011). Dado que el hígado desempeña un papel clave en el metabolismo de los lípidos, la grasa de la dieta y sus metabolitos oxidados no solo pueden influir en la patogénesis de las enfermedades hepáticas (El-Badry y col., 2007; Lee y col., 2007; Feldstein y col., 2010a y 2010b; Leamy y col., 2013; Santoro y col., 2014), sino también pueden prevenir y/o revertir las manifestaciones de NAFLD (Masterton y col., 2010). En particular, se ha informado que los AGPI n-3 pueden reducir la acumulación de TAG en el hígado (Xin y col., 2008; Di Minno y col., 2012), mientras que una dieta con alta proporción n-6/n-3 podría inducir hígado graso (El-Badry y col., 2007). Además, los AGS son más lipotóxicos que los AGMI o AGPI (Leamy y col., 2013), y se ha demostrado que los mismos causan disfunción hepática al promover el estrés y la apoptosis del retículo endoplásmico (RE) (Wang, D. y col., 2006; Wei y col., 2006; Pfaffenbach y col., 2010).

Es importante destacar que el exceso de energía suministrada por la grasa a menudo conduce a una menor utilización de glucosa en los tejidos, causando hiperglucemia e hiperinsulinemia (Ikemoto y col., 1996).

6.4- Secreción de VLDL-TAG

El hígado secreta TAG en forma de partículas VLDL, que son transportadas hacia los tejidos periféricos y convertidos en lipoproteínas de baja e intermedia densidad, por la enzima LPL. En NAFLD, la cantidad de lípidos para el ensamblaje aumenta, además existe una incapacidad de la insulina para disminuir la producción de VLDL (Adiels y col., 2007) lo que trae como resultado un aumento en la trigliceridemia. Aunque la exposición crónica a la insulina induce mayor producción de VLDL, el incremento de su secreción no compensa la excesiva formación de TAG, manteniéndose la esteatosis (Choi y Ginsberg, 2011).

6.5- Oxidación de ácidos grasos

La disminución de las vías de utilización de los AG también puede generar esteatosis hepática. Los AG son catabolizados a través de la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal y de la ω -oxidación en el RE, siendo la β -oxidación mitocondrial, la vía dominante de metabolización de los AG de cadena corta, media y larga (Tessari y col., 2009). En NAFLD aparecen cambios

adaptativos dirigidos a incrementar la β -oxidación mitocondrial para compensar la excesiva captación y síntesis *de novo* de los AG (Kotronen y col., 2009). Sin embargo, al sobrepasarse la capacidad oxidativa, los lípidos se acumulan en los hepatocitos. Por ejemplo, un incremento de malonil-CoA puede comprometer la β -oxidación y favorecer el acumulo de los AG por su función inhibidora sobre la CPT-1, enzima que regula la entrada de los AG en la mitocondria (Lavoie y Gauthier, 2006). También una menor actividad oxidativa en los peroxisomas induce una esteatosis severa microvesicular (Reddy y Rao, 2006), mientras que la activación de PPAR α puede prevenir y/o disminuir la acumulación de lípidos en el hígado (Chou y col., 2002; Ip y col., 2003; Harano y col., 2006).

7- Resistencia a la insulina y esteatosis hepática

Estudios han demostrado que la IR periférica (en TA) sería el primer acontecimiento que originaría un aumento del flujo de AGL al hígado, mediante la reducción del efecto supresor de la lipólisis por la insulina en el tejido adiposo (Ginsberg y col., 2005). En NAFLD el hígado se hace resistente a la acción de la hormona, incrementando la gluconeogénesis y la glucogenólisis (Bugianesi y col., 2005) mientras que, por el contrario, responde a la hiperinsulinemia aumentando la transcripción de los genes lipogénicos. El aumento en la producción de glucosa hepática acoplada a su menor captación periférica acentúa la hiperglucemia e incrementa la secreción de insulina, aumentando todavía más la lipogénesis hepática (Morino y col., 2006). Sin embargo, no está claro si la IR hepática es la causa o la consecuencia de la esteatosis (Kotronen e Yki-Järvinen, 2008).

La hiperinsulinemia crónica deteriora aún más la señalización de la insulina en el hígado y en el músculo esquelético, lo que promueve la esteatosis hepática (Cusi, 2009). El tejido adiposo resistente a la acción insulínica produce cantidades excesivas de AGL a través de la lipólisis, incrementa la producción de TNF α e IL-6 (Hotamisligil y col., 1993) creando un círculo vicioso de acumulación de metabolitos lipotóxicos, esteatosis y resistencia a la insulina (Arner, 2003).

8- Modelos experimentales de esteatosis hepática

Los modelos animales constituyen una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiopatológicos asociados con diferentes enfermedades, y en nuestro caso en particular con la esteatosis hepática. Así, entre otros, se puede profundizar en el conocimiento de las causales, sus características histológicas y ensayar nuevas terapias. Se distinguen dos grandes grupos de modelos animales: los que son resultado de modificaciones genéticas (espontáneas o artificiales) o los inducidos por agentes externos (dieta, fármacos o toxinas). En ciertas ocasiones es necesario combinar ambos tipos. La capacidad de modificar genéticamente animales, mediante la

sobreexpresión de genes que promueven la lipogénesis o eliminación de genes específicos que regulan la oxidación de AG, o aprovechar mutaciones naturales, ofrece una vía para descifrar los mecanismos asociados al desarrollo de hígado graso no alcohólico. Dentro de los agentes externos podemos citar: la inhibición de la oxidación de AG por hormonas y/o toxinas, inducción de la lipogénesis hepática por toxinas y principalmente el uso de distintas dietas.

Los modelos basados en dietas tienen distintos mecanismos de acción, entre ellos:

8.1- Dietas deficientes en colina y metionina

Las dietas deficitarias en colina y metionina (MCD) alteran la β -oxidación mitocondrial (Leclercq y col., 2000) y provocan alteraciones en la secreción hepática de VLDL (Ibrahim y col., 2016), lo que resulta en una acumulación de lípidos en el hígado, estrés oxidativo, muerte de las células hepáticas y cambios en las citoquinas y adipoquinas (Lau y col., 2017). Aunque la dieta MCD provoca un rápido inicio del fenotipo de NASH, los animales no exhiben ninguna otra característica metabólica como las que se observan en la NAFLD humana, incluida la obesidad, la resistencia periférica a la insulina y la dislipidemia. Por lo tanto, este modelo generalmente se considera más adecuado para estudiar los eventos intrahepáticos en relación con NASH y el tratamiento farmacológico de NASH, que para investigar distintos aspectos del NAFLD (Byrne y Targher, 2015). Una variante experimental de este modelo está basado en dietas deficitarias en metionina y colina, y ricas en grasa (Ustundag y col., 2007).

8.2- Dieta rica en colesterol y ácido cólico

La dieta aterogénica basada en una dosis relativamente alta de Col (1-1,25%) y ácido cólico (0,5%) (Matsuzawa-Nagata y col., 2007) ha demostrado ser útil como modelo animal de aterosclerosis. La presencia de ácido cólico promueve la absorción de Col y grasa, suprime la conversión de Col en ácidos biliares, reduce su eliminación y aumenta sus niveles séricos, promoviendo de este modo el desarrollo de aterosclerosis (Nishina y col., 1990). Además, la dieta induce esteatosis, inflamación y fibrosis.

8.3- Dieta deficiente en arginina

Las dietas deficitarias en arginina conducen a esteatosis hepática en los roedores a través de un incremento en la biosíntesis lipídica hepática. El mismo estaría mediado por una significativa reducción del contenido hepático de ATP y anormal metabolismo del ácido orótico en ratas, hamsters o conejos (Milner y Hassan, 1981).

8.4- Dietas ricas en carbohidratos simples

Las dietas ricas en fructosa y/o sacarosa promueven la síntesis hepática de TAG y su liberación en plasma en forma de VLDL. Tanto en ratas como en ratones, estos carbohidratos producen esteatosis simple, sin características de NASH, e induce un aumento del peso corporal, además de provocar hipertrigliceridemia e hiperglucemia (Spruss y col., 2009; Mamikutty y col., 2015), considerándose un modelo aceptado de SMet.

Una variante de este modelo es con adición de grasas saturadas, las cuales realizan un importante aporte de lípidos exógenos con funciones también deletéreas. Así, dietas ricas en sacarosa/grasas (20% de grasas de origen animal, 53% de sacarosa y 2% de Col) inducen hígado graso en roedores (Loria y col., 1976). En modelos semejantes, se demostró que los animales además de esteatosis, obesidad y resistencia a la insulina, progresan a un fenotipo similar a NASH acompañado de fibrosis (Kohli y col.; 2010; Ishimoto y col., 2013; Kanuri y Bergheim, 2013; Verbeek y col., 2015 y 2016).

8.5- Dieta de cafetería

La dieta de cafetería contiene alimentos de consumo humano altamente energéticos y muy sabrosos (ricos en grasas, azúcares y sal) (Sclafani y Springer, 1976) que inducen hiperfagia continua y desencadenan obesidad, esteatosis con intolerancia a la glucosa e inflamación en animales de laboratorio (Sampey y col., 2011). Este tipo de dieta está muy estrechamente alineado con los patrones dietéticos observados en humanos (Martire y col., 2013).

8.6- Dietas ricas en grasas

Existen numerosos modelos animales con dietas ricas en grasas, difiriendo entre otros, en el tipo y cantidad de grasa dietaria, que presentan alteraciones comunes a enfermedades observadas en humanos (Buettner y col., 2006; Koppe y col., 2009; Hariri y col., 2010; Krishnan y col., 2014). Se han usado múltiples dietas conteniendo altos niveles de grasa (HFD) (20-60% de energía), cuyo componente lipídico fueron derivados de animales (manteca de cerdo, sebo de res, aceites de pescados) y de aceites vegetales (palma, maíz, coco, o aceite de cártamo) (Buettner y col., 2007). En general, HFD pueden inducir en roedores: obesidad, intolerancia a la glucosa, dislipidemia, aumento de la expresión de citoquinas proinflamatorias (Takahashi y col., 2012; Hu y col., 2018), además de provocar un aumento en los TAG hepáticos.

Si bien las dietas ricas en AGS son consideradas más perjudiciales que las que contienen AGPI (Bray y col., 2002; Buettner y col., 2006; Hariri y col., 2010; Krishnan y col., 2014), se ha

demostrado que los AGPI exhiben mayor sensibilidad al daño inducido por especies reactivas de oxígeno, la susceptibilidad a la oxidación aumenta exponencialmente en función del número de dobles enlaces por molécula de AG (Bielski y col., 1983). Las dietas altas en AGS de cadena larga, son más obesogénicas que las ricas en AGMI y AGPI, ya que estos AG se usan de manera ineficiente para la producción de energía y, por lo tanto, se almacenan más fácilmente (Storlien y col., 2001). Por su parte, los AGS de cadena corta se metabolizan muy rápidamente, no se depositan en los tejidos y en consecuencia, tienen muy bajo poder obesogénico (Hariri y col., 2010). Estudios con roedores alimentados con altos contenidos de grasas animales y/o vegetales (Chalkley y col., 2002; Gustafson y col., 2002; Lee, J. y col., 2005; Honors y col., 2012) a diferencia de aquellos alimentados con aceites ricos en AGPI-CL n-3 (Storlien y col., 1987 y 1996) han mostrado que desarrollan hiperglucemia, hiperinsulinemia e IR sistémica (Ikemoto y col., 1996; Buettner y col., 2007; Ferramosca y col., 2013). Las relaciones existentes entre obesidad y alteraciones en el metabolismo glucídico, pueden estar exacerbadas por los niveles de citoquinas. Específicamente, la adiponectina disminuye en obesidad (Tsuchida y col.; 2004) y esto correlaciona con una baja sensibilidad a la insulina y disminución de la utilización periférica de la glucosa. Además, se ha reportado que las dietas enriquecidas en grasa modifican la composición de los FL de membranas musculares, influyendo en la unión de la insulina y/o en la función del GLUT4 (Pan y Storlien, 1993; Liu y col., 1994). Efectos similares a los observados en el metabolismo de la glucosa, han sido observados en el contenido de los TAG circulantes, donde roedores alimentados con HFD a base de grasa animal y/o vegetal (Yaqoob y col., 1995; Briaud y col., 2002), presentan hipertrigliceridemia, mientras que en los alimentados con aceite de pescado los niveles de TAG circulantes tendieron a disminuir (Rokling-Andersen y col., 2009).

En ratas se ha demostrado que HFD puede progresar de la esteatosis a alteraciones bioquímicas observadas en procesos clínicos de NASH (Baumgardner y col., 2008), lo que dificulta la reversión de las alteraciones y agrava el cuadro metabólico conduciendo a consecuencias más severas.

En virtud del potencial poder funcional y aplicación al consumo humano, la grasa láctea modificada (GLM) caracterizada por moderada carga de compuestos biológicamente activos (9*c*,11*t*-CLA y AV) y bajos niveles de AGS aterogénicos (12:0, 14:0 y 16:0), pareciera tener grandes ventajas distintivas frente a aquellas adicionadas de CLA comerciales. Así, nos resultó relevante investigar algunos de los potenciales efectos benéficos que podría tener la GLM y los mecanismos involucrados en la posible prevención o atenuación de la formación de hígado graso, acumulación de lípidos en TA, alteraciones en la utilización de la glucosa e inflamación en un

modelo experimental que comparte alteraciones de muy alta prevalencia y repercusión en la morbimortalidad de nuestra población. Asimismo, los resultados podrán tener alta repercusión en la profundización del conocimiento de las propiedades bioactivas de los componentes de la GLM, como de los mecanismos bioquímicos y moleculares de acción, permitiendo colaborar a una posterior intervención o prevención de alteraciones producidas nutricionalmente.

Así, basados en: 1) ingestas elevadas de grasas y/o desequilibrios en el tipo de AG aumentan la acumulación de lípidos en hígado y tejido adiposo, como asimismo pueden incrementar la inflamación, factores críticos para el desarrollo de enfermedad de hígado graso no-alcohólico (NAFLD), daño hepático y alteraciones en la utilización de la glucosa, 2) variaciones en los niveles y tipos de AGS y AGI de la GL son determinantes de las alteraciones en el metabolismo lipídico e hidrocarbonado, como así también sobre el efecto pro-inflamatorio, 3) si bien existen resultados controvertidos, los CLA han mostrado acciones benéficas incluyendo: antiobesogénicas, antidiabetogénicas, antiinflamatorias y atenuantes de la acumulación lipídica en hígado y otros tejidos, 4) los efectos y mecanismos de acción de los distintos CLA dependen del isómero individual considerado y de la relación entre ellos, y con otros AG no isoméricos, 5) el AV es un AGT natural, que a diferencia de los AGT de origen sintéticos, tiene efectos funcionales *per se* sobre el metabolismo lipídico y glucídico, además de ser un precursor del AR cuyos efectos benéficos son más reconocidos, 6) que modificaciones de la alimentación del ganado con pastura y aceites ricos en AGPI-CL, sin la adición de compuestos de síntesis y por procesos totalmente naturales, es posible modular la composición de la GL disminuyendo los AGS (principalmente los aterogénicos), aumentando las relaciones AGI/ AGS y AGPI n-3/ AGPI n-6, al mismo tiempo que los niveles de AR y AV, produciendo así una GLM con propiedades bioactivas, podemos formular las siguientes hipótesis: 1) la GLM caracterizada por una reducción de AGS e incremento de AG bioactivos (AR y AV) disminuye o atenúa la acumulación lipídica en tejido hepático, muscular y adiposo, al mismo tiempo que mejora la utilización de la glucosa, y 2) los mecanismos involucrados en estas potenciales propiedades funcionales pueden fundamentarse en un mejoramiento del balance oxidación/biosíntesis de AG, cambios en la composición de AG tisulares, reducción del estrés oxidativo, incremento de biomoduladores con efectos predominantemente oxidativos, incremento de la secreción hepática de pre- β -lipoproteínas y modificaciones en el equilibrio captación/liberación de AG por los tejidos periféricos.

Objetivos

OBJETIVOS

En función de todo lo expuesto anteriormente, se plantearon los siguientes objetivos del trabajo de tesis:

Objetivo general

Investigar los mecanismos involucrados en los potenciales efectos benéficos de una GLM rica en CLA y AV, y reducida en AGS, sobre la prevención o atenuación de la formación de hígado graso y alteraciones en el metabolismo intermedio glucídico y lipídico, inducidas por la alimentación crónica con altos niveles de lípidos dietarios en un modelo experimental animal.

Objetivos específicos

- 1.- Evaluar, durante los tratamientos experimentales, parámetros nutricionales incluyendo: consumo de alimentos e ingesta energética, ganancia de peso.
- 2.- Estudiar, al final del tratamiento dietario: composición corporal, como también, peso del hígado, de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal, y del músculo gastrocnemio.
- 3.- Determinar los potenciales cambios en los niveles séricos/plasmáticos de TAG, Col, glucosa e insulina.
- 4.- Determinar la incorporación y retención de AV y AR en los lípidos de suero, hígado, tejido adiposo y músculo gastrocnemio; como también la conversión de AV en AR en dichos tejidos.
- 5.- Estudiar el impacto de las variables nutricionales sobre la composición de AG en plasma, hígado, tejido adiposo y músculo gastrocnemio.
- 6.- Analizar el contenido de TAG en hígado y músculo gastrocnemio.
- 7.- Evaluar los mecanismos involucrados en la posible prevención de la formación del hígado graso y de alteraciones en parámetros lipídicos en plasma y tejidos claves. Las mismas incluyen: secreción hepática “*in vivo*” y remoción plasmática de TAG-pre- β lipoproteínas por el tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio.
- 8.- Evaluar las actividades y expresiones relativas de enzimas claves de la lipogénesis y biosíntesis hepática de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (AGPI-CL).
- 9.- Estimar la expresión relativa de factores de transcripción claves en la regulación del metabolismo lipídico y glucídico en los principales tejidos reguladores.

10.- Cuantificar la capacidad oxidativa de AG en hígado, músculo gastrocnemio y tejido adiposo mediante la actividad y expresión de las enzimas claves.

11.- Medir la expresión génica de enzimas involucradas en la lipólisis del tejido adiposo epididimal.

12.- Estimar el daño peroxidativo y el estado de las defensas antioxidantes a nivel hepático.

13.- Medir la expresión génica de algunos biomoduladores del metabolismo lipídico/inflamatorio en tejido adiposo epididimal e hígado.

14.- Evaluar la capacidad de asimilación y metabolización de la glucosa por los tejidos periféricos a través de un test de tolerancia oral a la glucosa.

15.- Cuantificar los niveles de metabolitos glucolíticos en músculo gastrocnemio, como así también el flujo a través de algunas enzimas claves del metabolismo de la glucosa.

16.- Determinar las actividades y expresiones de algunas enzimas clave del metabolismo de la glucosa en tejido muscular.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

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*) y fueron aprobadas por el comité de ética de la FBCB-UNL.

1- Dietas experimentales

Para investigar los posibles efectos metabólico-nutricionales potencialmente benéficos de una “Grasa Láctea Modificada” (GLM) y los mecanismos involucrados en la posible prevención o atenuación de la formación de hígado graso, se alimentaron animales de experimentación con dietas preparadas en el laboratorio a partir de los componentes de grado alimenticio. Las mismas se basaron en las recomendaciones emanadas del comité *ad hoc* del “American Institute of Nutrition” (Reeves y col., 1993).

- **S7** (Soja a niveles recomendados de grasa): dieta control según las recomendaciones emanadas del comité *ad hoc* del “American Institute of Nutrition” (AIN-93G) para roedores en crecimiento (Reeves y col., 1993) conteniendo 7% (p/p) de aceite de soja (AS).

- **S30** (Soja a niveles elevados de grasa): dieta control al 30% (p/p) de grasa, obtenida a partir de la sustitución de 23% (p/p) de los hidratos de carbono (almidón) de la dieta S7 por 23% (p/p) de aceite de soja.

- **GL30** (Grasa Láctea a niveles elevados de grasa): se sustituyó 27 % del aceite de soja de la dieta S30 por 27% de GL.

- **GLM30** (Grasa Láctea Modificada a niveles elevados de grasa): se sustituyó 27% del aceite de soja de la dieta S30 por 27% de GLM enriquecida con CLA natural y mejorada en la composición de los AGS.

- **GLE30** (Grasa Láctea Estandarizada a niveles elevados de grasa): se sustituyó 27% del aceite de soja de la dieta S30 por 27 % de GLE a equivalentes niveles de grasa saturada e insaturada que la GLM30.

Todas las dietas cumplieron las recomendaciones de AG esenciales para así evitar cualquier posible alteración como consecuencia de un déficit dietario de los mismos. Cada dieta fue preparada semanalmente, conservada a -20°C y ofrecida a los animales diariamente durante el período experimental (60 días).

La GL fue adquirida de comercios locales.

La GLM fue obtenida por pequeños y medianos productores de leche. La metodología para la obtención de la GLM se basó en la suplementación del ganado con aceites ricos en AGPI. Debido a dificultades para garantizar la obtención de grasas lácteas con elevados niveles de CLA (aproximadamente 3% de AR) se trabajó con GLM con niveles moderados de CLA (1,90-2,30 g CLA/100g), los cuales pueden ser fácilmente transferidos a empresas lácteas para su comercialización.

La GLE se obtuvo por mezclado de GL con aceite de oliva, soja y maíz para obtener equivalentes niveles de AGS, AGI totales y la misma relación AGPI n-3/n-6 que la GLM.

El grupo S30 (conteniendo 53% de calorías como grasas), tuvo como fundamento estimular la acreción de lípidos en tejidos claves para producir algunas de las alteraciones observadas en la enfermedad de hígado graso no alcohólico humano (NAFLD). Frente a dicho grupo, la dieta GLM permite inferir los efectos ocasionados por los cambios composicionales en todos los AG dietarios.

La comparación de la GLM con la GL permitió distinguir los potenciales efectos benéficos de la modificación total en la composición de AG de la grasa láctea; específicamente por: 1) enriquecimiento de 9*c*,11*t*-CLA (mas su precursor: AV) y 2) mejoramiento del perfil de AG por reducción de AGS. Dado que los posibles efectos benéficos podrían ser debidos a la presencia de 9*c*,11*t*-CLA o a la disminución en los niveles de AGS, se comparó los resultados del grupo GLM con el grupo GLE. Así, de encontrarse diferencias entre GLM y GLE las mismas son debidas al efecto del CLA (y su precursor: AV).

Tabla 1- Composición de las dietas experimentales (g/kg dieta)

	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30
Almidón	529,5	299,5	299,5	299,5	299,5
Sacarosa	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Caseína	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
Aceite de soja	70,0	300,0	30,0	30,0	30,0
GL	-	-	270	-	-
GLM	-	-	-	270	-
GLE	-	-	-	-	270
Fibras	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Vitaminas	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Minerales	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
L-Cisteína + L-Metionina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Energía (KJ/Kg)	16529	21344	21344	21344	21344

Grupos experimentales: S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS.

La composición de AG de los lípidos constituyentes de las grasas y aceites, como metil ésteres, se evaluó por cromatografía gaseosa (GC) 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 las dietas experimentales se muestra en las **Tabla 2**. Se preservó la calidad de las grasas y aceites para minimizar procesos de oxidación a través de la eliminación del oxígeno por desplazamiento con gas nitrógeno y se controló antes de su uso el grado de deterioro mediante la evaluación del índice de peróxidos, AGL y formación de dienos, trienos y tetraenos conjugados por análisis espectrales de absorción (AOAC).

Tabla 2- Perfil de ácidos grasos de las dietas experimentales (% del total AG)

Ácido graso	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30
4:0	ND	ND	2,86	2,36	2,25
6:0	ND	ND	1,74	1,36	1,37
8:0	ND	ND	1,02	0,77	0,80
10:0	ND	ND	2,19	1,77	1,72
12:0 iso	ND	ND	0,22	0,14	0,17
12:0	ND	ND	2,46	2,18	1,94
9c-12:1	ND	ND	0,06	0,05	0,05
14:0	0,07	0,07	9,04	8,27	7,12
15:0 iso	ND	ND	0,21	0,14	0,17
15:0 anteiso	ND	ND	0,37	0,33	0,29
9c-14:1	ND	ND	0,69	0,82	0,54
15:0	ND	ND	0,86	0,68	0,68

16:0 iso	ND	ND	0,18	0,12	0,14
16:0	11,05	11,05	27,40	22,23	25,09
11t-16:1	ND	ND	0,06	0,12	0,04
17:0 iso	ND	ND	0,27	0,38	0,21
7c-16:1	ND	ND	0,18	0,04	0,14
9c-16:1	0,07	0,07	0,97	1,04	1,14
17:0 anteiso	ND	ND	0,34	0,34	0,27
17:0	0,09	0,09	0,42	0,31	0,35
9c-17:1	ND	ND	0,13	0,09	0,10
18:0	4,26	4,26	11,81	11,23	9,70
8t-18:1	ND	ND	0,25	0,38	0,20
9t-18:1	ND	ND	0,21	0,34	0,16
10t-18:1	ND	ND	0,43	1,05	0,34
11t-18:1 (AV)	ND	ND	1,88	4,26	1,48
9c-18:1 (AO)	19,86	19,86	22,73	24,98	28,86
11c-18:1	1,17	1,17	0,87	1,55	1,62
12c-18:1	ND	ND	0,20	0,55	0,16
14c-18:1	ND	ND	ND	0,29	ND
15c-18:1	ND	ND	ND	0,13	ND
9t, 12t-18:2	ND	ND	0,11	0,25	0,09
9c, 12t-18:2	ND	ND	ND	0,12	ND
9t, 12c-18:2	ND	ND	ND	0,13	ND
9c, 12c-18:2 (AL)	54,89	54,89	7,35	7,53	10,24
6c, 9c, 12c-18:3 (GLA)	0,33	0,33	0,14	0,14	0,12
20:0	0,43	0,43	0,04	0,04	0,10
5c-20:1	0,36	0,36	0,04	0,04	0,04
9c, 12c, 15c-18:3 (ALA)	6,24	6,24	1,14	0,94	1,17
8c-20:1	0,18	0,18	0,04	0,15	0,04
11c-20:1	ND	ND	ND	ND	0,05
9c, 11t-18:2 (AR)	ND	ND	0,78	2,07	0,62
11c, 14c-20:2	0,03	0,03	ND	ND	ND
8c, 11c, 14c-20:3 (DGLA)	ND	ND	0,02	0,05	0,02
22:0	0,37	0,37	0,09	0,09	0,10
11c, 14c, 17c-20:3	ND	ND	ND	0,07	ND
5c, 8c, 11c, 14c-20:4 (AA)	ND	ND	0,09	0,02	0,11
24:0	0,10	0,10	0,04	0,01	0,03

7c,10c,13c,16c,19c-22:5	ND	ND	0,05	0,03	0,04
Σ NI	0,50	0,50	0,05	0,06	0,14

Grupos experimentales: S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. ND: no detectado. NI: no identificado. Σ NI: sumatoria de AG no identificados.

2- Seguimiento experimental de los animales

Se emplearon ratas machos de la cepa *Wistar* provistas por el Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (Esperanza, Santa Fe), las cuales se alojaron en las facilidades del Departamento de Ciencias Biológicas de la FCB en un ambiente con ciclo luz-oscuridad de 12 hs, a temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y libre acceso al agua y comida. Los animales alimentados con dieta estándar de laboratorio para ratas en crecimiento, luego de un período de aclimatación en el bioterio y habiendo alcanzado los 100 ± 10 g de peso, fueron distribuidos aleatoriamente en los 5 grupos experimentales y alimentados durante 60 días con alguna de las dietas anteriormente mencionadas. Así, los grupos dietarios utilizados a lo largo del trabajo de tesis fueron identificados como: S7, S30, GL30, GLM30 y GLE30. Para desarrollar las diferentes experiencias se emplearon 3 lotes de los 5 grupos dietarios con un tamaño muestral de 6 animales por grupo y por lote experimental.

A lo largo de todo el tratamiento dietario se realizó el seguimiento de la ingesta energética de alimentos y de los pesos corporales de los animales.

2.1- Ingesta energética

La ingesta energética se calculó multiplicando la ingesta dietaria (g) por la densidad calórica de la dieta (KJ/g de alimento). La ingesta dietaria se determinó por la diferencia entre la comida ofrecida y remanente corregidos por los cambios en la humedad. Para corregir los cambios en el contenido de agua, se llevaron a peso constante una fracción de la dieta proporcionada y el remanente de la dieta ofrecida. Con el factor de corrección de humedad estimado por el peso húmedo/ peso seco de la dieta ofrecida, y el peso seco de la dieta remanente, se determinó la masa de alimento sobrante en base húmeda.

2.2- Ganancia de peso

Con los datos obtenidos del registro diario de peso de los animales de cada grupo experimental (promedio \pm SEM) se confeccionaron curvas de peso. Se calculó, además, la ganancia de peso por diferencia entre el peso al final y al inicio de la experiencia (n=6 por grupo).

2.3- Sacrificio de los animales y toma de muestras

Al finalizar el tratamiento dietario experimental, los animales fueron ayunados 8-10 hs. y 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 o sin anticoagulante (según corresponda) y se centrifugaron a 4°C. El plasma/suero obtenido fue alícuotado y procesado de inmediato o congelado a -80°C hasta el momento de su valoración, según corresponda. Hígado, tejido adiposo epididimal (TAE), tejido adiposo retroperitoneal (TAR) y músculo gastrocnemio fueron extraídos en forma completa, pesados y alícuotas de cada uno de ellos fueron congeladas con una pinza enfriada en nieve carbónica, morterizadas y conservadas en ultrafreezer (-80°C) hasta su procesamiento. En requerimiento de muestras frescas, detalles son provistos en las determinaciones específicas.

2.4- Composición corporal

Animales que cumplieron los tratamientos nutricionales fueron anestesiados y sacrificados para evaluar la composición corporal de la carcasa. Los cuerpos de los animales, fueron rasurados para eliminar el pelo en su totalidad. Posteriormente se realizó una incisión abdominal y fueron eviscerados. Las carcasas fueron pesadas y llevadas a estufa a 60°C hasta pesada constante, para lograr el secado total de las mismas y estimar el contenido porcentual de agua. Cada una de las carcasas secas fueron trituradas hasta obtener una muestra homogénea, a partir de la cual, distintas alícuotas fueron utilizadas para las determinaciones de los contenidos de proteínas y grasas.

2.4.1- Determinación del contenido de agua

El contenido de agua fue determinado por diferencias de pesadas mediante método de secado térmico a 60°C (Whindham, 1999). Los resultados se expresaron como g de agua/100 g de carcasa.

2.4.2- Determinación del contenido de proteínas

La cuantificación de nitrógeno (N) en alícuotas de carcasas secas y trituradas se realizó mediante el método de Kjeldahl (Windham, 1999). Para ello, la muestra se digirió con H₂SO₄ concentrado con el fin de destruir oxidativamente la materia orgánica. De esta manera todo el N orgánico fue transformado en H₃N, el cual quedó 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. El resto de 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 H_3N 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 H_3N 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 carcasa 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.

2.4.3- Determinación del contenido de grasa

La cuantificación del contenido de grasa total se realizó en alícuotas de carcasas secas mediante el método extractivo con éter de petróleo utilizando el extractor tipo Twisselman. La cantidad de grasa se obtuvo por gravimetría (Windham, 1999). Los resultados se expresaron como g de grasa/100 g de carcasa.

3- Parámetros metabólicos plasmáticos y tisulares

3.1- Cuantificación de triacilglicéridos en suero

La concentración de triacilglicéridos (TAG) en suero fresco fue determinada mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). El método se basa en la hidrólisis enzimática (lipasas) de los TAG generando glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado a glicerol-fosfato en presencia de la enzima glicerol kinasa y ATP, luego este derivado fosforilado es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de glicerol fosfato oxidasa. El producto final de color es una quinonimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La quinonimina posee un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de TAG presentes en la muestra. Los resultados fueron expresados en g/l.

3.2- Cuantificación de colesterol total en suero

La concentración de colesterol (Col) total en suero fresco fue determinado mediante un método enzimático utilizando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). El método se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los ésteres de Col por la enzima colesterol esterasa liberando colesterol y AG. El Col producido en esta reacción, más el Col libre, es oxidado por acción de una colesterol oxidasa, con formación de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa y fenol, oxida el cromógeno 4-aminofenazona a un compuesto de color

rojo. La quinona 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 g/l.

3.3- Cuantificación de glucosa plasmática

La concentración de glucosa en plasma se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Wiener Lab, Rosario, Argentina). El fundamento se basa en que la glucosa circulante es oxidada por la glucosa oxidasa, a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno. Este último en presencia de peroxidasa, oxida al cromógeno 4-aminofenazona/ 4-hidroxibenzoato a una quinonimina 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.

3.4- Cuantificación de insulina circulante

Se cuantificaron los niveles circulantes de insulina en muestras de plasma por radioinmunoensayo (derivado a un laboratorio externo IBYME-CONICET). Los resultados se expresaron como ng/ml. A partir de estos datos y de la concentración de glucosa se calculó el índice HOMA (Homeostasis model assessment for insulin resistance) según la fórmula de Matthews.

$$\text{HOMA} = [(\text{Insulina (mU/l)} \times \text{Glucosa (mmol/l)})] / 22,5$$

3.5- Cuantificación de triacilglicéridos tisulares

Para cuantificar el contenido de TAG tisulares, una alícuota de tejido (hígado y/o músculo) conservado a -80°C fue homogeneizada con un volumen apropiado de agua destilada fría (4°C, dilución 1:20 y 1:10 respectivamente). El contenido de TAG fue determinado mediante la técnica propuesta por Laurell (1966). Los TAG fueron extraídos utilizando una mezcla éter isopropílico: etanol (95:5, v/v) y luego fueron saponificados con una solución KOH 6N: etanol (0,5:9,5, v/v). El glicerol liberado fue cuantificado mediante el ensayo de Lambert y Neish (1950) que consiste en la oxidación del glicerol con peryodato generando un mol de ácido fórmico y dos moles de formaldehído por 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 TAG presentes en la muestra. Los resultados fueron expresados como μmol de TAG/g tejido húmedo.

3.6- Composición y relaciones de ácidos grasos circulantes y tisulares

El perfil de AG circulante y tisular, se cuantificó mediante GC, empleando un cromatógrafo gas-líquido marca Shimadzu (GC-2014), con detector FID y columna capilar CP-Sil 88 (100 m x 0,25 mm id x 20 mm de espesor). Los metil ésteres de los AG circulantes y tisulares 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, requiere de tres etapas: obtención del extracto lipídico, derivatización de los AG, e identificación y cuantificación de AG.

3.6.1- Obtención del extracto lipídico

La extracción de la materia grasa se realizó mediante el método de Bligh y 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 formar una sola fase miscible con el agua de la muestra, que extrae, tanto la grasa libre, como estructural. La separación de fases se logra con la adición de alícuotas de cloroformo y agua. El material lipídico se encuentra en la fase orgánica, mientras que el material no lipídico se ubica en la fase acuosa. Los extractos fueron centrifugados, la fase acuosa fue descartada y la fase orgánica evaporada bajo corriente de gas N₂. Los extractos lipídicos obtenidos continuaron con su procesamiento o fueron resuspendidos en cloroformo y conservados en viales apropiados herméticamente cerrados bajo corriente de gas N₂, a -80°C para su posterior análisis.

El volumen de suero utilizado fue de 0,8 ml para la extracción lipídica (ajustándose con el agregado de agua destilada, de ser necesario), 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.

3.6.2- Derivatización de ácidos grasos

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 GC. Por esta razón los AG de los TAG presentes en la muestra son convertidos en metil ésteres con KOH 2N, previa disolución del extracto lipídico en hexano calidad HPLC. Los ésteres metílicos formados tienen un peso molecular algo mayor que el respectivo AG, pero, al

romperse el puente de hidrógeno, bajan su punto de ebullición a la mitad, pudiendo ser analizados perfectamente por GC.

3.6.3- Identificación y cuantificación de ácidos grasos

La GC 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: una gaseosa que corresponde al gas de arrastre o gas portador que es móvil, y 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. 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 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. Los resultados se expresaron como porcentaje de los AG totales (Masson y col., 2015).

3.6.4- Flujo a través de enzimas claves involucradas en el metabolismo lipídico

El palmitato y el estearato son los precursores de los AGMI más abundantes en el tejido animal. El doble enlace es introducido en la cadena del AG mediante una reacción oxidativa catalizada por la enzima $\Delta 9$ -desaturasa (SCD). Cabe mencionar que esta enzima también está involucrada en la bioconversión del AV a AR, para poder estimar el flujo de dicha enzima se realizó la relación porcentual producto/sustrato a partir de los niveles de dichos AG medidos por GC en hígado (principalmente), músculo y TAE (Sjögren y col., 2008; Flowers, 2009).

	(9c-16:1 / 16:0) X 100
$\Delta 9$ -desaturasa	(9c-18:1 / 18:0) X 100
	(9c,11t-18:2 / 11t-18:1) X 100

El AL (9c,12c-18:2) es uno de los principales AG esenciales presente en la dieta, y es el precursor de los AGPI-CL de la serie n-6. Dentro de esta familia se destaca el DGLA (8c,11c,14c-20:3), que dará lugar a eicosanoides de la serie E1, y el AA (5c,8c,11c,14c-20:4) que deriva en eicosanoides de la serie E2 (con características pro-inflamatorias). Por otra parte, el ALA (9c,12c,15c-18:3) es otro AG esencial y es el precursor de los AGPI-CL de la serie n-3, destacándose el EPA (5c,8c,11c,14c,17c-20:5), como principal precursor de los eicosanoides de la familia E3 (con características anti-inflamatorias), y el DHA (4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6). El metabolismo de los AG esenciales ocurre principalmente en el hígado e involucra reacciones de desaturación y elongación compartiendo las principales enzimas como la Δ 5 y 6-desaturasa y las elongasas 2 y 5 (Gibson y col., 2011; Hofacer y col., 2011; Zhang y col., 2016). Para poder evaluar la biosíntesis de estos AG e intermediarios de ambas familias y estimar el flujo de las principales enzimas involucradas se realizó un cociente (porcentual) entre producto y sustrato, quedando conformada de la siguiente manera:

Biosíntesis de AGPI-CL n-6	(AA / AL) X 100
Δ 6-desaturasa	(GLA / AL) X 100
Elongasa 5	(DGLA / GLA) X 100
Δ 5-desaturasa	(AA / DGLA) X 100
Biosíntesis de AGPI-CL n-3	(DHA / ALA) X 100
Biosíntesis de EPA	(EPA / ALA) X 100
Elongasa 2 y Δ 6-desaturasa	(DHA / EPA) X 100

4- Actividad de enzimas reguladoras del metabolismo lipídico en hígado

4.1- Sintasa de ácidos grasos

Las enzimas relacionadas con la actividad lipogénica en hígado se encuentran en la fracción citosólica celular. Para la determinación de la actividad de la sintasa de ácidos grasos (FAS, E.C. 2.3.1.85) se homogenizaron fracciones de hígado (0,5 g) frescos en buffer pH 7,6 (KCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, N-acetil-cisteína 10 mM y ditiotreitól 0,5 mM) en proporción 1:10. Luego, se centrifugó el homogenado a 60.000g a 4°C durante 90 minutos y se separó el sobrenadante (Herzberg y Janmohamed, 1980); la actividad de la enzima se determinó inmediatamente, espectrofotométricamente a 340 nm, mediante la diferencia en la oxidación de NADPH en

presencia y en ausencia de malonil-CoA. Para esta determinación, cantidades adecuadas del sobrenadante fueron adicionadas a una mezcla previamente incubada a 37°C, que comprendió buffer KH_2PO_4 100 mM, 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 fue iniciada con 10 μl de malonil-CoA 7 mM (Lynen, 1969). Se registró la variación de densidad óptica debido a la oxidación de NADPH; una unidad de actividad enzimática representa 1 μmol de NADPH oxidado por minuto a 37°C. 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. (1951). Los resultados se expresaron como mU/mg proteína.

4.2- Acetil-CoA carboxilasa

Para la determinación de la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC, E.C. 6.4.1.2) se realizó un homogenado a partir de tejido hepático frescos en buffer fosfato pH: 7,0 (KH_2PO_4 9 mM, K_2HPO_4 85 mM, ditioneitol 1 mM y KHCO_3 70 mM) en proporción 1:10, el cual fue posteriormente centrifugado a 60.000g a 4°C durante 90 minutos, se separó el sobrenadante en tres alícuotas; en las dos primeras porción se midió inmediatamente la actividad de ACC y Glucosa-6-Fosfato Deshidrogenasa y la última alícuota se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas utilizando la técnica de Lowry y col. (1951).

La actividad de ACC se cuantificó espectrofotométricamente a 340 nm con una mezcla de reacción a 37°C conteniendo: Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), citrato de potasio 10 mM, MgCl_2 10 mM, glutatión 3,75 mM (pH 8,0), albúmina sérica bovina 0,75 mg/ml, acetil-CoA 0,125 mM, fosfoenolpiruvato 0,5 mM, NADH 0,125 mM, piruvato quinasa 15 $\mu\text{g/ml}$, lactato dehidrogenasa 6 $\mu\text{g/ml}$ y cantidades adecuadas de sobrenadante. La reacción fue iniciada por la adición de ATP 150 mM y KHCO_3 1 M. La actividad de la enzima se determinó siguiendo el decaimiento de la absorbancia por oxidación del NADH durante 5 minutos y se expresó como mU/mg proteína, donde una unidad de actividad enzimática representa 1 μmol de NADH oxidado por minuto a 37°C Zimmermann y col. (2003).

4.3- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

La actividad de la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH, E.C. 1.1.1.49) se determinó, utilizando el sobrenadante obtenido anteriormente, espectrofotométricamente a través de la formación de NADPH durante 5 minutos a temperatura ambiente, medida por absorbancia a 340 nm, en un medio: buffer trietanolamina 0,05 M, pH 7,5 en presencia de NADP^+ 0,03 M disuelto en NaHCO_3 1% y glucosa 6-fosfato 0,04 M. La velocidad de formación de NADPH, expresada en

μmol/minuto, representa la actividad enzimática de G6PDH. La concentración de proteínas de determinó a través de la técnica de Lowry y col. (1951). Los resultados fueron expresados como mU/mg proteína. (Lohr y col., 1974).

4.4- Carnitina palmitoil transferasa-1

El proceso de β-oxidación de los AG se realiza en la matriz mitocondrial de las células, siendo una de las enzimas clave la carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1). Esta enzima es la encargada de transportar los AG, que se encuentran en el citosol, hacia el interior de las mitocondrias.

La actividad de la enzima CPT-1a (E.C. 2.3.1.21) se determinó según Ling y col. (2012) con algunas modificaciones. Se realizó un homogenado (proporción 1:10) a partir de tejido hepático fresco en buffer (HEPES 20 mM pH 7,4, KCl 140 mM, EDTA 10 mM y MgCl₂ 5 mM). El homogenado se centrifugó a 600g a 4°C durante 10 minutos, luego el sobrenadante se volvió a centrifugar a 9.500g a 4°C por 35 minutos; se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido con 500 μl de buffer homogenado, se centrifugó 9.500g a 4°C por 10 minutos; esta operación se repitió. Por último se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet mitocondrial en 200 μl de buffer homogenado. Se determinó la concentración de proteínas siguiendo la técnica de Lowry y col. (1951). Para determinar la actividad total de CPT, se incubó a 37°C por 5 minutos 100 μg de proteínas del resuspendido con un buffer de reacción (HEPES 20 mM pH 7,4, sacarosa 220 mM, KCl 40 mM, EGTA 1 mM, ácido 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) 0,1 mM, albúmina sérica bovina 1,3 mg/ml y palmitoil CoA 40 μM). La reacción se inicia con L-carnitina 1mM. La tasa de aparición de CoASH-DTNB se registró espectrofotométricamente a 412 nm. La actividad de CPT-2 se midió bajo las mismas condiciones en presencia de malonil CoA 10 μM (inhibidor de la CPT-1). La actividad de CPT-1a se calculó por la diferencia entre la actividad total de CPT y CPT-2 y se expresó como nmol CoASH liberado por minuto por mg de proteína (nmol/min.mg proteína).

5- Actividad tisular de la enzima lipoproteína lipasa

5.1- LPL en tejido adiposo epididimal

La actividad total de la enzima LPL (E.C. 3.1.1.34) en TAE se determinó empleando el método fluorimétrico descrito por Del Prado y col. (1994). Para tal fin, una cantidad de TAE fresco se homogeneizó en frío con buffer Tris-HCl 0,2 M pH 8,2 a 4°C, en una proporción 0,2g de tejido/ml de buffer. 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 y col. (1951).

Para la determinación de la actividad LPL se utilizó di-butiril fluoresceína (DBF) como sustrato enzimático, el cual fue sintetizado según Kramer y col. (1963). Para esto, 10 g de fluoresceína se mezclaron con 10 ml de piridina y 30 ml de anhídrido butírico, almacenada a temperatura ambiente por 24 hs. antes de la adición de 300 ml de etanol absoluto y finalmente, la mezcla se guardó a -20°C por 18 hs. El DBF fue recristalizado en 95% de etanol varias veces hasta remover las trazas de fluoresceína libre. La pureza del producto final se evaluó mediante un espectro de emisión, comprobando la ausencia de pico de excitación de fluoresceína a 490 nm.

La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo 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 del DBF. La reacción se realizó a 37°C en buffer fosfato 0,1 M pH 8 en presencia de 5% de 2-etoxietanol y 10 mM de DBF y se inició con la adición del polvo acetónico previamente resuspendido en 1 ml de buffer NH₄Cl 25 mM pH 8,1 con 1 UI/ml de heparina. Es importante considerar que los niveles de proteínas en la mezcla de reacción no deben superar los 15 mg, por tal motivo, se cuantificó en los resuspendidos de los polvos acetónicos la concentración de proteínas por la técnica de Lowry y col. (1951).

Paralelamente, el mismo ensayo, fue llevado a cabo en presencia de NaCl 1M 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).

5.2- LPL en músculo gastrocnemio

Una porción de músculo gastrocnemio fresco 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 minutos a 4°C los homogenados fueron centrifugados a 2.600g a 4°C durante 15 minutos obteniéndose los extractos crudos frescos tisulares. La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo durante 5 minutos el aumento de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}} = 530 \text{ nm}$) producto de la liberación de fluoresceína como resultado 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).

6- Secreción hepática de TAG-pre- β -lipoproteínas

La velocidad de secreción de TAG-pre- β lipoproteínas (VSTAG) se determinó “*in vivo*” utilizando 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 $\delta < 1,006$ g/ml por la administración de Triton WR 1339, de modo que los TAG se acumulan en el tiempo en el sistema vascular en forma proporcional a la velocidad con la que son secretados por el hígado.

Animales pertenecientes a un segundo lote alimentado con alguno de los 5 tratamientos dietarios descritos, fueron ayunados 12-18 hs. Bajo la acción de anestesia, se administró por vía endovenosa una solución de Triton WR 1339 al 10% (v/v) en NaCl 0,9% (dosis: 600 mg/kg peso). Se tomaron muestras de sangre para el dosaje de TAG 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 VSTAG fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{VSTAG (nmol/100g/min)} = \frac{([\text{TAG}_{120}] - [\text{TAG}_0]) \times \text{Vp}}{\text{P} \times \text{t}}$$

Siendo $[\text{TAG}_{120}]$ y $[\text{TAG}_0]$ las concentraciones de TAG a tiempo 120 y 0 minutos de la administración del Triton WR 1339 y expresadas en $\mu\text{mol/ml}$; el peso (P) en gramos del animal; Vp en ml y t en minutos.

En un trabajo previo (Bernal y col., 1989) ha sido demostrado que, en ratas, la dosis empleada es la que provee la máxima inhibición de la clarificación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)-TAG y que bajo estas condiciones el acúmulo de TAG en el plasma es lineal hasta los 150 minutos, razón por la que sólo se cuantificaron los niveles de TAG a los tiempos 0 y 120 minutos.

7- Metabolismo de la glucosa

7.1- Test de tolerancia oral a la glucosa

Con la finalidad de evaluar la capacidad de utilización de la glucosa, por los tejidos periféricos, se realizó un test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG). Un lote de animales fueron ayunados aproximadamente 10 hs. y el día de la experiencia se les administró por sonda oral una solución de glucosa al 20% a razón de 1g de glucosa/ kg de peso corporal. Se recolectaron muestras de sangre de la cola en tubos conteniendo EDTA (18 mM de concentración final) inmediatamente antes y a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos después de la incorporación de la glucosa (Teachey y col., 2003). Inmediatamente después de finalizado el TTOG, los animales recibieron subcutáneamente 2,5 ml de solución salina estéril 0,9% para compensar las pérdidas de plasma. Las concentraciones de glucosa en plasma a diferentes tiempos fueron cuantificados mediante kit enzimático comercial. La respuesta al TTOG fue evaluada a través de la comparación de los valores individuales a cada tiempo y mediante la cuantificación del área integrada bajo la curva (AIC, 0 a 180 minutos).

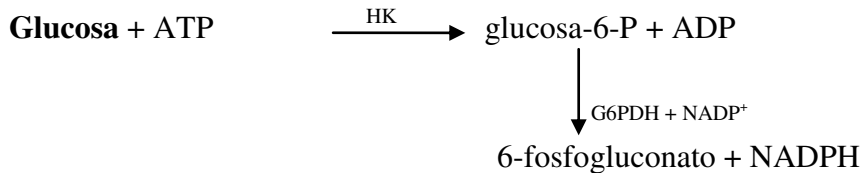
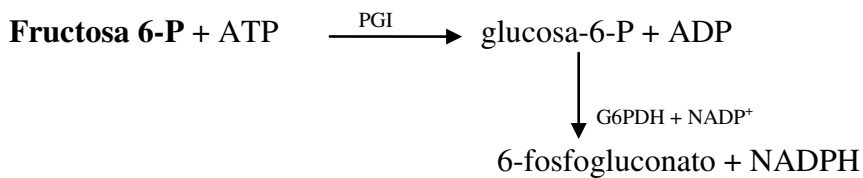
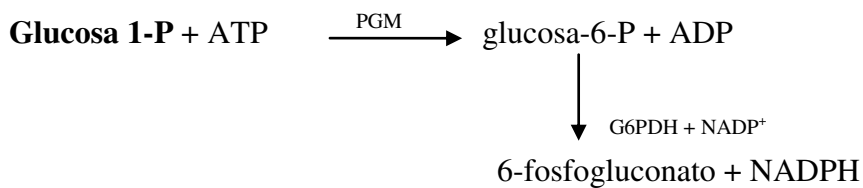
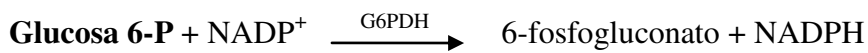
7.2- Metabolitos tisulares de la glucosa

Para determinar los niveles de los diferentes metabolitos se realizó una deproteinización de la muestra con ácido perclórico (PCA) 1,5 M (0,1g de tejido hepático/muscular: 4 ml del desproteinizante). Los desproteinizados fueron centrifugados a 11.000g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se neutralizó con 0,25 volúmenes de KHCO_3 2,3 M y nuevamente se centrifugó a 11.000g y 4°C durante 10 minutos. Este sobrenadante fue utilizado como extracto para medir las concentraciones de metabolitos por métodos fluorimétricos (Lowry y Passonneau, 1972) utilizando sistemas de acoples enzimáticos. Los resultados se expresaron en $\mu\text{mol/g}$ tejido húmedo (Bernal y col., 2006).

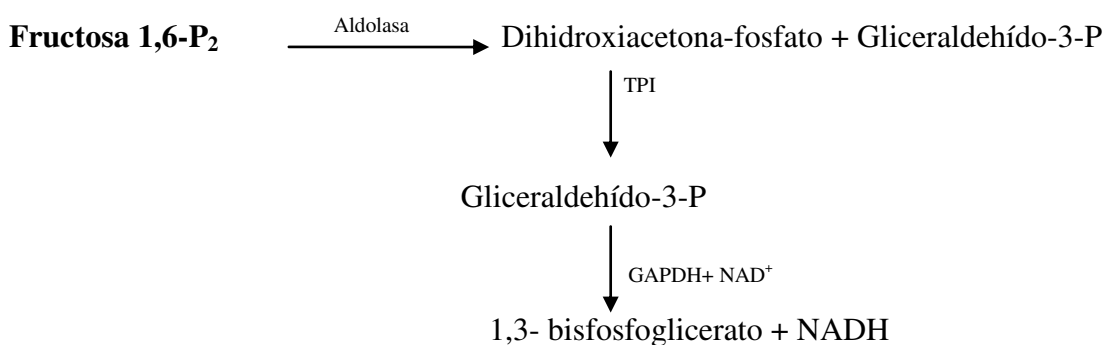
7.2.1- Glucosa 6-fosfato, glucosa 1-fosfato, fructosa 6-fosfato, glucosa y fructosa 1,6-bisfosfato

Para la cuantificación de los niveles de glucosa 6-fosfato (G-6-P), glucosa 1-fosfato (G-1-P), fructosa 6-fosfato (F-6-P) y glucosa, se empleó un medio conteniendo Tris 1M pH 8,1, MgCl_2 0,25 M, DTT 0,25 M, ATP 300 mM, NADP 25 mM y EDTA 50 mM. La G-6-P presente en la muestra fue transformada inicialmente por la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) a 6-fosfogluconato y NADPH. El aumento de la fluorescencia debido a la formación de NADPH a 340 nm es proporcional a la concentración de G-6-P en la muestra. Una vez realizada la lectura correspondiente a la G-6-P, se adicionó la enzima, fosfoglucomutasa (PGM). La G-1-P fue

convertida por la PGM a G-6-P, y a su vez la G-6-P por acción de la G6PDH fue convertida en 6-fosfogluconato y NADPH. En este caso, el aumento de la fluorescencia debido a la formación de NADPH es proporcional al contenido de G-1-P. De la misma manera las concentraciones de F-6-P y glucosa fueron medidas adicionando e incubando en cada caso con su correspondiente enzima de acople: fosfoglucoisomerasa (PGI) y hexoquinasa (HK), respectivamente; según:

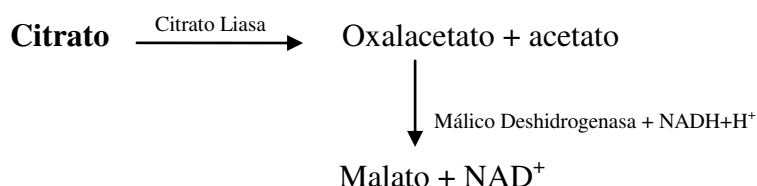


Para determinar los niveles de fructosa 1,6-bisfosfato (F-1,6-P₂) se preparó un medio conteniendo imidazol 1 M, NAD 100 mM, Na₂HAsO₄ 0,5 M, EDTA 50 mM y β-mercaptoetanol 4,5 M. Se utilizó un sistema de acople enzimático conteniendo aldolasa, triosa fosfato isomerasa (TPI) y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y se cuantificó la formación de NADH a 340 nm, según la reacción:



7.2.2- Citrato

La cuantificación de los niveles de citrato se realizó con un buffer Tris 1M pH 8,1, MgCl₂ 0,5M, EDTA 50 mM y NADH 15 mM. El citrato presente en la muestra fue convertido inicialmente en acetato y oxalacetato por acción de la enzima citrato liasa. Posteriormente, se adicionó la enzima málico deshidrogenasa, la cual cataliza la conversión del oxalacetato y NADH en malato y NAD⁺. La disminución de la fluorescencia debido a la oxidación del NADH a 340 nm es proporcional a la concentración de citrato presente en la muestra, según:



7.2.3- Glucógeno

Para medir el contenido de glucógeno presente en los tejidos, se desproteinizó tejido hepático o muscular congelados a -80°C con PCA 1,5 M (1:10). Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se empleó para determinar el contenido de macroglucógeno mientras que en el precipitado se cuantificaron los niveles de proglucógeno. Con el fin de hidrolizar el glucógeno a glucosa se trataron 200 µl de sobrenadante y el precipitado correspondiente a 20 mg de tejido a 100°C durante 2 hs con 650 µl HCl 2 M (Adamo y Graham, 1998). Se neutralizó la mezcla de reacción con NaOH 2 M y luego se centrifugó a 6700g a temperatura ambiente durante 5 minutos. Los niveles de glucosa de ambas fracciones se cuantificaron siguiendo la metodología mencionada anteriormente (punto 7.2.1). Los resultados de macroglucógeno y proglucógeno se expresaron en µmol de glucosa/g tejido húmedo (Bernal y col., 2006).

7.3- Actividad y flujo a través de enzimas reguladoras

7.3.1- Fosfofructoquinasa muscular

La determinación de la actividad de la enzima fosfofructoquinasa-1α (PFK-1α, E.C. 2.7.1.11) se realizó en tejido muscular fresco. Para tal fin, se homogeneizó una alícuota de músculo gastrocnemio (relación 1:5) en buffer Tris-HCl pH 7,0 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 4 mM, NaF 30 mM, β-Mercaptoetanol 30 mM), el cual fue posteriormente centrifugado a 12.000 g a 4°C durante 15 minutos. Un volumen del sobrenadante de centrifugación fue incubado 1 min a 30°C con medio de reacción (Tris-HCl 200 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, MgCl₂ 24 mM, (NH₄)₂SO₄ 16 mM, fructosa-6-fosfato 10 mM, NADH 2 mM, Aldolasa 0,04 U/µl, Triosa fosfato isomerasa 0,04 U/µl,

Glicerofosfato isomerasa 0,04 U/ μ l) en presencia o no de ATP 50 mM para determinar la actividad específica e inespecífica, respectivamente. La actividad de la enzima se determinó siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 340 nm por oxidación del NADH durante 3 minutos y se expresó como mU/mg proteína (Cadefau y col., 1990). La concentración de proteínas se estimó en el sobrenadante utilizando la técnica de Lowry y col. (1951).

7.3.2- Flujo a través de enzimas glucolíticas claves

Debido a la importancia de la fosforilación de la glucosa, primera reacción irreversible de la fase preparatoria de la glucólisis catalizada por quinasas que produce glucosa 6-fosfato, se estimó el flujo a través de la glucoquinasa (hígado) y hexoquinasa (músculo) mediante la relación producto/sustrato (G-6-P/ glucosa).

El paso limitante de la vía glucolítica es la reacción catalizada por la PFK-1 donde la F-6-P se fosforila convirtiéndose en F-1,6-P₂. El flujo de dicha enzima fue calculado a partir del contenido de dichos metabolitos medidos en músculo gastrocnemio por medio del cociente producto/sustrato (F-1,6-P₂/F-6-P) (Bernal y col., 2006).

8- Estado oxidativo en hígado

8.1- Daño peroxidativo

El daño peroxidativo -grado de lipoperoxidación (LPO)- a nivel hepático fue evaluado a través del análisis de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Para tal fin, los hígados posterior a su remoción, fueron rápidamente lavados con solución salina enfriada a 4 °C y conservados a -80 °C. La determinación se realizó en homogenados hepáticos preparados en una proporción 1:9 con KCl 1,15% de acuerdo al método de Ohkawa y col (1979). El método se fundamenta en la reacción del 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 tejido húmedo.

8.2- Sustancias reactivas de oxígeno

Las sustancias reactivas de oxígeno (ROS) fueron medidas por métodos fluorimétricos. Los niveles de ROS se cuantificaron utilizando el método de la 2'7'-diclorodihidrofluoresceína diacetado (DCFH₂-DA) según la metodología propuesta por Chen y col. (2010). La DCFH₂-DA es un colorante permeable a membrana capaz de difundir pasivamente dentro de las células, donde sus

grupos acetato son clivados activamente por esterasas para formar 2'7'-diclorodihidrofluoresceína. Ésta es oxidada por radicales libres para formar el compuesto fluorescente 2'7'-diclorofluoresceína. La determinación se realizó según Wang, X. y col. (2015) con algunas modificaciones. Específicamente, se homogeneizaron 0,2 g de tejido hepáticos en 3 ml de buffer PBS 0,1M (pH 7,4). El homogenado se centrifugó a 900g a 4°C por 20 minutos y posteriormente el sobrenadante fue incubado en oscuridad con DCFH₂-DA 10µM a 37°C por 30 minutos. La cuantificación de la intensidad de fluorescencia fue determinada utilizando un espectrofotómetro de luminiscencia ($\lambda_{excitación} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{emisión} = 538 \text{ nm}$). En cada caso se realizó un blanco de muestra incubando la muestra bajo las mismas condiciones pero sin la adición del reactivo fluorescente, el valor obtenido fue restado al valor de la muestra correspondiente. Los resultados fueron expresados como unidades de fluorescencia/mg de proteína. La concentración de proteínas se determinó a través de la técnica de Lowry y col. (1951).

8.3- Cociente Glutation reducido (GSH)/ Glutation oxidado (GSSG)

La cuantificación simultánea de GSH y GSSG se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Maeso y col. (2005). Para tal fin, 100 mg de hígado fueron homogeneizados en frío con 4 ml de AcN/H₂O (62,5:37,5 v/v). Se transfirieron 800 µl de los homogeneizados a tubos eppendorf y se centrifugaron a 36000g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante fue filtrado con filtros de nylon 0,22 µm Micron Separation Inc. e inmediatamente medidos por electroforesis capilar (P/ACE TM MDQ. Beckman Coulter, CA, U.S.A. Capilar desnudo de sílice fundido de 55 cm por 75 µm de d.i. con detección UV 200±10 nm) usando como buffer de corrida H₃BO₃ 0,2 M pH 8. Los resultados se expresaron como la relación GSH/GSSG.

8.4- Actividad de la enzima catalasa

Para la determinación de la actividad de la enzima catalasa (CAT E.C. 1.11.1.6) se obtuvieron homogenados hepáticos con buffer fosfato 50 mM, pH 7,0 en una relación de 1g de tejido fresco por 9 ml de buffer, los cuales fueron luego centrifugados a 10.000g a 4°C durante 12 minutos. La actividad enzimática se determinó en el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación y se fundamenta en la cantidad de H₂O₂ 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 H₂O₂ fue medida espectrofotométricamente a 240 nm durante 30 segundos. La actividad enzimática fue expresada U/mg de proteína, siendo una U la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un µmol de sustrato por minuto (Aebi, 1984; Cohen y col., 1970). La concentración de proteínas en el sobrenadante fue determinada por el método de Lowry y col. (1951).

9- Niveles de ARNm de diferentes parámetros metabólicos

El ARN total fue aislado a partir de 100 mg de tejido (hígado, músculo y TAE) utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN fueron tratadas con kit DNA-free (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) para remover cualquier contaminación con ADN genómico. El rendimiento y calidad del ARN fue evaluado por medidas de absorbancia a 230, 260, 280 y 310 nm para hígado y músculo gastrocnemio y para TAE se utilizó el kit enzimático Qubit® RNA HS Assay Kit. De cada muestra, 1 µg de ARN total fue sometido a transcripción reversa para sintetizar la primera cadena de ADN complementaria (ADNc) usando el kit de síntesis M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Argentina).

En el tejido hepático se analizaron los niveles de ARNm de las enzimas vinculadas a la lipogénesis y síntesis de TAG: FAS, ACC, SCD1 y diacilglicerol aciltransferasa (DGAT2) y de las principales enzimas vinculadas a la β -oxidación: CPT-1a y ACOX1. También se evaluó la expresión génica de los factores de transcripción: LXR α , SREBP-1a, SREBP-1c y PPAR α y de las proteínas transportadoras de ácidos grasos: FATP2, FATP5 y CD36, además del receptor de adiponectina AdipoR2 y ChREBP. En este tejido también se evaluaron los niveles de ARNm de interleuquinas, factores de transcripción y enzimas relacionadas con el estado lipoperoxidativo. Específicamente: IL-6, TNF α , factor nuclear kappa B (NF- κ B), catalasa (CAT), glutation reductasa (GR), superóxido dismutasa 2 (SOD), glutation peroxidasa (GSH-Px) y factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2).

En músculo gastrocnemio se evaluó el nivel de ARNm de CPT-1b y AdipoR1.

Se analizaron en TAE los niveles de ARNm de las enzimas vinculadas a la lipogénesis: DGAT2 y SCD1; y de las enzimas vinculada a la β -oxidación: CPT-1a y ACOX1. También se evaluó la expresión génica de una de las enzimas vinculadas con la lipólisis de los TAG: lipasa triglicérido adiposo (ATGL). Por último, se evaluó el nivel de ARNm de adiponectina y de CD36.

Los oligonucleótidos específicos fueron diseñados utilizando información en GenBank, sintetizados comercialmente (Invitrogen Argentina S.A.-Thermo Fisher Scientific) y las secuencias se detallan a continuación:

Genes	ID GenBank	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
<i>Acc</i>	NM_022193.1	AACAGTGTACAGCATCGCCA	CATGCCGTAGTGGTTGAGGT
<i>Acox1</i>	NM_017340.2	CCCGTCCCAAGAACTCCAGA	GCCTCGAAGATGAGTTCCGTG
<i>Adiponectina</i>	NM_144744.3	ACTCAGCATTACAGCGTAGGGG	TGGTCGTAGGTGAAGAGAACGG
<i>Adipor1</i>	NM_207587.1	AAACGTGACGGCTCTCCCTC	TGATGGACACTTAGGCCGTGTCG
<i>Adipor2</i>	NM_001037979.1	ACAATGACAACCACCACGGA	CGAGTTCTCGGGGCTATTTT
<i>Atgl</i>	NM_001108509.2	CTTCAAGGGGTGCGCTATGT	GAGCTGTCTTGTGGGCAGAT
<i>Cat</i>	NM_012520.2	AGCCAGAAGAGAAACCCACA	CGGTCGCTGAACAAGAAAG
<i>Cd36</i>	NM_031561.2	GTACTCTCTCCTCGGATGGC	ATGTGGCCTGGTTCAACTAAT
<i>Chrebp</i>	NM_133552.1	AACAGAGGACCCCAAACGCA	CCCGGCTCAGGAACTAAGGG
<i>Cpt-1a</i>	NM_031559.2	ACGTGAGTGACTGGTGGGAAGAAT	TCTCCATGGCGTAGTAGTTGCTGT
<i>Cpt-1b</i>	NM_013200.1	CGAGTTCAGAAACGAACGCC	GTCGGCGATATCCAACAGTGC
<i>Dgat2</i>	NM_001012345.1	GGCTTCAGCATGAAGACCCT	GAGCCAGTGCCCCATCG
<i>Fas</i>	NM_017332.1	CAGAACTCTTCCAGGATGTCAACA	GTCGCCCTGTCAAGGTTTCCAG
<i>Fatp2</i>	NM_031736.1	GTGGTTGGGGCTACATTTGC	GTACCGAAGCAGTTCACCGA
<i>Fatp5</i>	NM_024143.2	GCTGCTTACAACCTGGAGCC	GGTTGCCCTGGGACATTACA
<i>Gr</i>	NM_053906.2	GGGCAAAGAAGATTCCAGGTT	CATTTCTGCTTCTCTCGTGGTT
<i>Gsh-px</i>	NM_030826.4	TTCGGACATCAGGAGAATGG	GAAGGTAAGAGCGGGTGAG
<i>Il-6</i>	NM_012589.2	CCTTCTGGGACTGATGTTGTTGAC	GGGTGGTATCCTCTGTGAAGTCTCC
<i>Lxra</i>	NM_031627.2	CCTTCCTCAAGGACTTACAGTTACAA	CATGGCTCTGGAGAACTCAAAGAT
<i>Nf-kβ</i>	NM_001276711.1	GCCGTGGAGTACGACAACATC	TTTGAGAAGAGCTGCCAGCC
<i>Nrf2</i>	NM_031789.2	CACATCCAGACAGACACCAGTT	CTACAAATGGGAATGTCTCTGCC
<i>Pparaα</i>	NM_013196.1	CCCCACTTGAAGCAGATGACC	CCCTAAGTACTGGTAGTCCGC
<i>Scd1</i>	NM_139192.2	CACACGCCGACCCTCACAACCT	TCCGCCCTTCTCTTTGACAGCC
<i>Sod</i>	NM_017051.2	CACCACAGCAAGCACCAC	GCCTCCAGCAACTCTCTCT
<i>Srebp-1a</i>	NM_001276707.1	AGCGCTACCGTTCCTCTATC	GCGCAAGACAGCAGATTTAT
<i>Srebp-1c</i>	NM_001276708.1	GGAGCCATGGATTGCACATT	GCTTCCAGAGAGGAGCCCAG
<i>Tnfa</i>	NM_012675.3	GCCTCTTCTCATTCCTGCTCGTGG	TTCTCCTCCTTGTGGGACCGATC
<i>β-actina</i>	NM_031144.3	ACAACCTTCTTGCAGCTCCTC	TCATCCATGGCGAACTGGTGG

<i>Hprt1</i>	NM_012583.2	TCCTCCTCAGACCGCTTTTC	ATCACTAATCACGACGCTGGG
<i>Ubc</i>	NM_017314.1	ACACCAAGAAGGTCAAACAGGA	CACCTCCCCATCAAACCCAA

Los niveles de ARNm relativos fueron cuantificados usando PCR en tiempo real con un equipo de detección StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems). Se tomaron 0,1 µl de cada ADNc que fueron agregados a la mezcla de reacción de PCR, HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis BioDyne) con los primers (pares de oligonucleótidos) correspondientes. Las condiciones de amplificación de la PCR fueron: 1º ciclo de desnaturalización a 95°C por 15 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos combinados con anillado a 60°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 20 segundos.

Se realizaron curvas estándar para cada oligonucleótido utilizando diluciones seriadas (1/10-1/1000) de un pool de muestras de ADNc. La eficiencia correspondiente a cada primer (E) fue calculado de un ciclo en fase exponencial de acuerdo con la ecuación $E=10^{(-1/\text{pendiente})}$ (Rasmussen y col., 2001). Todas las eficiencias de los primer fueron 100 (SEM 10)%. Los genes en estudio fueron normalizado con la media geométrica de tres genes de referencia: *β-actina*, *ubiquitina c (Ubc)* y *hipoxantina fosforibosiltransferasa-1 (Hprt1)* (Vandesompele y col., 2002). Los resultados fueron expresados usando el método recomendado de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y col., 2001).

10- Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se consideró un número de 6 ratas por grupo (n=6), procurando la máxima optimización de los animales, los resultados fueron expresados como la media ± error estándar de la media (SEM). Para evaluar el efecto del consumo de una dieta rica en grasa, se realizó un test t de Student entre los grupos S7 y S30, mientras que las diferencias estadísticas entre las medias de los grupos que recibieron dietas ricas en grasa (S30, GL30, GLM30 y GLE30) se analizaron mediante un Análisis de Variancia (One Way ANOVA, 1x4); las comparaciones múltiples *post-hoc* se realizaron mediante el test de Tukey's. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$ (DeGroot, 1986).

Resultados

RESULTADOS

1- Parámetros nutricionales

1.1- Consumo de alimento e ingesta energética

Todos los animales correspondientes a los distintos lotes experimentales aceptaron las dietas suministradas, sin manifestar rechazo o resistencia a la ingesta de las mismas, lo cual se refleja a través del equivalente consumo medio diario de energía (**Tabla 3**) y por el registro del aumento de peso corporal desde el inicio hasta el final del período experimental (**Figura 11**). Como es de esperar, al incrementar la densidad energética de la dieta, se observó una menor ingesta de alimento en los animales correspondientes a todos los grupos con dietas ricas en grasas, manteniendo un equivalente consumo energético.

1.2- Ganancia de peso y composición corporal

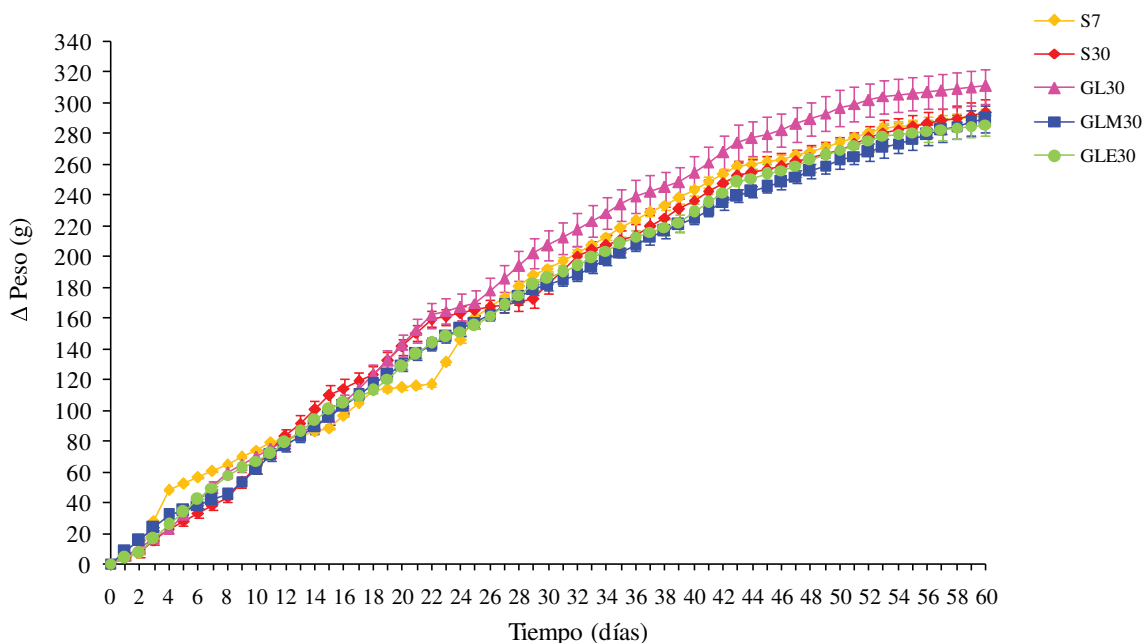
En virtud de una ganancia de peso corporal similar entre los 5 grupos, el peso corporal al final de la experiencia no presentó diferencias significativas (**Tabla 3**).

Los posibles cambios en la composición corporal inducidos por las diferentes dietas se evaluaron mediante los contenidos de grasa, proteínas y agua en las carcasas correspondientes a los animales eviscerados de cada grupo experimental. El incremento del consumo de grasa dietaria, fue acompañado de un mayor contenido de grasa corporal (S30 vs S7). A elevados niveles de grasa, sólo alcanzaron diferencias significativas entre el grupo GLM30 y el GL30. Los cambios en el contenido porcentual de grasa corporal condujeron a una disminución en el contenido de proteínas corporales, sin observarse cambios entre las dietas a altos niveles de grasa (**Tabla 3**).

Tabla 3- Consumo de alimentos, ingesta energética, ganancia de peso y composición corporal

	Grupos Experimentales				
	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30
Consumo de alimento (g/día)	21,6 ± 1,4	17,3 ± 0,7*	16,9 ± 1,2	18,8 ± 1,1	16,9 ± 0,6
Ingesta energética (KJ/día)	362,1 ± 23,3	373,9 ± 14,6	363,5 ± 26,6	404,4 ± 24,4	401,4 ± 15,2
Ganancia de peso (g)	292,4 ± 4,1	294,1 ± 8,4	311,1 ± 11,7	290,0 ± 8,4	286,3 ± 7,0
Composición corporal (g/100g)					
Grasa	16,0 ± 0,6	18,4 ± 0,2 ^{*ab}	16,8 ± 0,6 ^a	19,6 ± 0,7 ^b	18,4 ± 0,2 ^{ab}
Proteínas	21,7 ± 0,4	17,4 ± 0,9*	17,6 ± 0,3	16,7 ± 0,6	17,8 ± 0,5
Agua	55,1 ± 1,1	53,6 ± 0,2 ^a	57,2 ± 0,4 ^b	54,1 ± 0,4 ^{ac}	55,2 ± 0,1 ^c

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Figura 11- Evolución de la ganancia de peso diaria

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS.

1.3- Peso de tejidos

Debido a la importancia del hígado, tejido adiposo y músculo esquelético en la regulación metabólica, y dado que dichos tejidos pueden ser modificados de acuerdo a la grasa dietaria consumida, se presentan los pesos del hígado, TAE, TAR y del músculo gastrocnemio (MG).

Los pesos del hígado, TAR y músculo gastrocnemio (tanto absolutos como relativos) no fueron alterados por los diferentes tratamientos dietarios. Mientras que el peso del TAE (absoluto y relativo) mostró diferencias estadísticamente significativas, observándose un incremento en el grupo GL30 vs S30 ($p < 0,01$) (**Tabla 4**).

Tabla 4- Peso de hígado, TAE, TAR y del músculo gastrocnemio

	Grupos Experimentales				
	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30
Peso Hígado (g)	9,6 ± 0,4	9,7 ± 0,2	9,4 ± 0,5	10,0 ± 0,4	9,5 ± 0,2
Peso Hígado relativo (g/100g)	2,52 ± 0,06	2,53 ± 0,05	2,35 ± 0,08	2,48 ± 0,06	2,44 ± 0,03
Peso TAE (g)	11,1 ± 0,7	11,5 ± 0,6 ^a	15,0 ± 0,5 ^b	13,4 ± 0,8 ^{ab}	12,9 ± 0,7 ^{ab}
Peso TAE relativo (g/100g)	2,92 ± 0,13	2,97 ± 0,11 ^a	3,57 ± 0,17 ^b	3,32 ± 0,12 ^{ab}	3,27 ± 0,10 ^{ab}
Peso TAR (g)	10,1 ± 0,7	10,7 ± 0,6	12,0 ± 1,1	11,3 ± 0,9	10,9 ± 1,1
Peso TAR relativo (g/100g)	2,65 ± 0,14	2,78 ± 0,11	2,98 ± 0,22	2,78 ± 0,14	2,76 ± 0,21
Peso MG (g)	1,49 ± 0,07	1,47 ± 0,04	1,54 ± 0,05	1,66 ± 0,05	1,47 ± 0,07
Peso MG relativo (g/100g)	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,37 ± 0,02

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

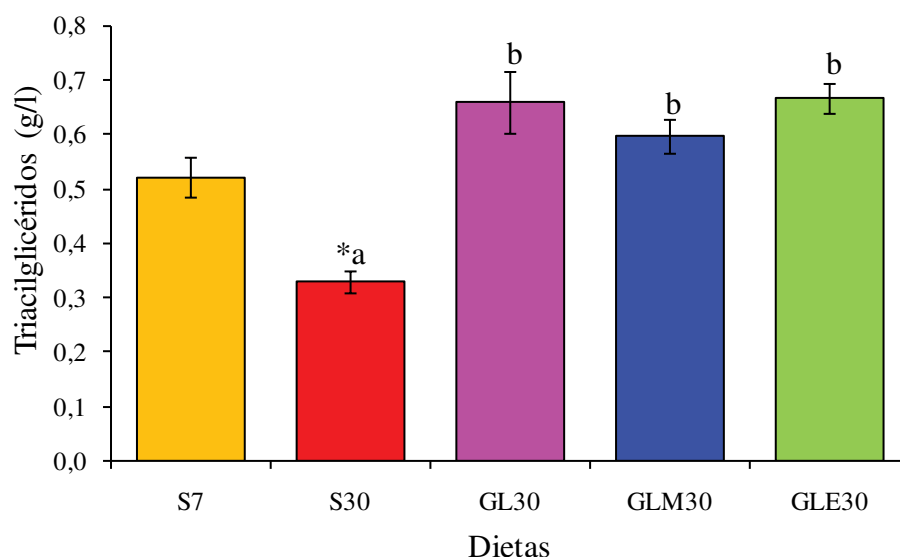
2- Parámetros lipídicos

2.1- Concentración de triacilglicéridos, colesterol y ácidos grasos circulantes

Las concentraciones de TAG séricos descendieron por el consumo de la dieta S30, y respecto a este grupo, la ingesta de dietas conteniendo distintas grasas lácteas incrementaron sus niveles independientemente del tipo de grasa (**Figura 12**). La concentración de Col disminuyó en

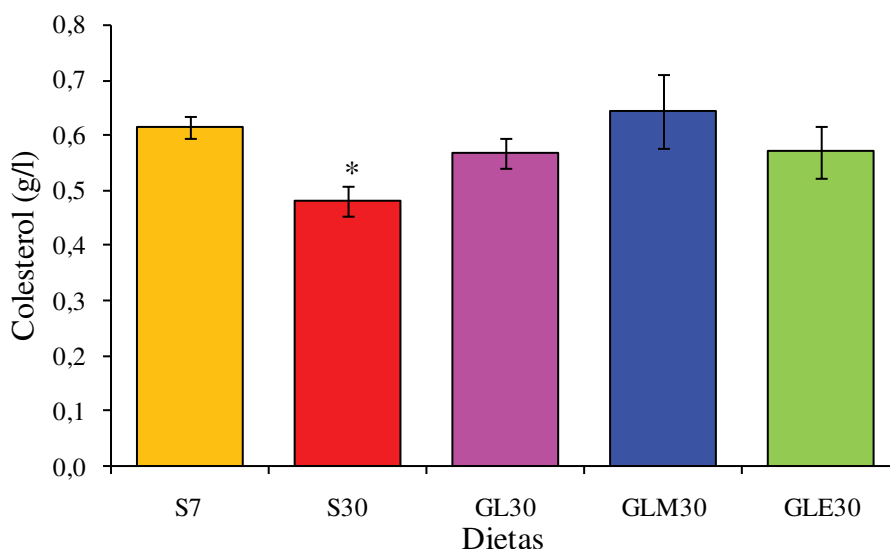
suero de animales alimentados con altos niveles de soja dietaria respecto a la dieta control ($p < 0,01$), y no se observaron diferencias entre las dietas a altos niveles de grasa dietaria (**Figura 13**).

Figura 12- Niveles séricos de triacilglicéridos



Resultados expresados como el promedio \pm SEM ($n=6$). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Figura 13- Niveles séricos de colesterol



Resultados expresados como el promedio \pm SEM ($n=6$). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student.

Entre los cambios más importantes en el perfil de AG circulantes, se observó que el incremento de los niveles de aceite de soja dietario, aumentó los niveles de AL y ALA, al mismo tiempo que disminuyó los niveles de 9*c*-16:1, 11*c*-18:1 y AA (**Tabla 5**).

En los lípidos circulantes de los animales alimentados con dietas ricas en grasas lácteas, se encontró un significativo contenido de ácido ruménico (AR) y de su precursor, ácido *trans*-vaccénico (AV). Dichos niveles fueron más manifiestos en el grupo GLM30. A elevados niveles de grasas dietarias, el contenido de ácidos grasos saturados (AGS) sólo mostró una disminución en el grupo GLM30 vs GL30. Mientras que las principales diferencias se observaron entre los AGMI y AGPI. Específicamente, las grasas lácteas incrementaron los niveles de AGMI*c* (principalmente 9*c*-16:1, 9*c*-18:1 y 11*c*-18:1) y AGMI*t* a expensas de una reducción de los niveles de AGPI. Dicha reducción fue observada en las familias de AGPI n-3 y n-6, a excepción del grupo GLM30, el cual mostró niveles de AGPI n-3 equivalentes a los de la S30.

Tabla 5- Perfil de ácidos grasos circulantes (% del total de AG)

Ácidos Grasos	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30	Prueba t	One-Way ANOVA
12:0	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,04±0,00 ^b	0,04±0,01 ^b	NS	0,000
14:0	0,20±0,02	0,17±0,01 ^a	0,92±0,08 ^b	0,78±0,04 ^b	0,52±0,04 ^c	NS	0,000
9c-14:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,08±0,01 ^b	0,07±0,01 ^b	0,00±0,00 ^a	NS	0,000
15:0	0,09±0,00	0,13±0,01 ^{*a}	0,35±0,03 ^b	0,32±0,02 ^b	0,27±0,03 ^b	0,006	0,000
16:0 iso	0,05±0,00	0,04±0,00 ^a	0,05±0,00 ^{ab}	0,07±0,01 ^c	0,06±0,00 ^{bc}	NS	0,002
16:0	21,52±0,76	17,18±0,13 ^{*a}	20,68±0,88 ^b	18,84±0,23 ^{ab}	19,34±0,35 ^b	0,001	0,003
9t-16:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,14±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	NS	0,000
11t-16:1	0,06±0,01	0,10±0,01 ^{*ab}	0,07±0,00 ^a	0,13±0,02 ^b	0,07±0,02 ^a	0,012	0,029
17:0 iso	0,10±0,00	0,07±0,00 ^{*a}	0,15±0,01 ^b	0,22±0,02 ^c	0,12±0,01 ^b	0,000	0,000
9c-16:1	0,89±0,06	0,17±0,01 ^{*a}	0,85±0,02 ^b	0,81±0,08 ^{bc}	0,62±0,08 ^c	0,000	0,000
17:0 anteiso	0,07±0,01	0,00±0,00 ^{*a}	0,09±0,01 ^{bc}	0,10±0,01 ^c	0,07±0,01 ^b	0,000	0,000
17:0	0,26±0,03	0,31±0,02	0,30±0,01	0,32±0,01	0,32±0,01	NS	NS
(9-10)c-17:1	0,42±0,03	0,23±0,01 [*]	0,18±0,01	0,19±0,02	0,17±0,01	0,001	NS
18:0	18,04±1,27	21,34±1,00 ^a	18,69±0,68 ^{ab}	17,37±0,57 ^b	19,36±0,90 ^{ab}	NS	0,030
6t-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,04±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	NS	0,000
9t-18:1	0,02±0,00	0,00±0,00 ^{*a}	0,17±0,02 ^{bc}	0,21±0,02 ^c	0,15±0,01 ^b	0,000	0,000

11t-18:1 (AV)	0,03±0,00	0,07±0,01 ^{*a}	0,57±0,04 ^b	1,26±0,09 ^c	0,41±0,05 ^b	0,006	0,000
9c-18:1 (AO)	5,49±0,48	4,65±0,09 ^a	11,86±0,28 ^{bc}	13,76±0,48 ^c	11,45±0,85 ^b	NS	0,000
11c-18:1	3,10±0,16	1,61±0,07 ^{*a}	2,41±0,15 ^b	2,37±0,03 ^b	2,47±0,15 ^b	0,000	0,000
12c-18:1	0,18±0,02	0,07±0,00 ^{*a}	0,41±0,03 ^{bc}	0,49±0,02 ^c	0,38±0,04 ^b	0,001	0,000
14c-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,34±0,04 ^{bc}	0,39±0,03 ^c	0,27±0,02 ^b	0,000	0,000
9c, 12c-18:2 (AL)	16,34±1,46	22,33±1,55 ^{*a}	13,29±0,81 ^b	14,06±0,89 ^b	14,61±1,22 ^b	0,030	0,000
6c, 9c, 12c-18:3 (GLA)	0,18±0,01	0,17±0,00 ^a	0,11±0,01 ^b	0,14±0,01 ^c	0,08±0,00 ^d	NS	0,000
20:0	0,08±0,01	0,14±0,00 ^{*a}	0,08±0,00 ^b	0,04±0,01 ^c	0,04±0,00 ^c	0,002	0,000
5c-20:1	0,03±0,00	0,05±0,00 ^{*a}	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	0,007	0,000
9c, 12c, 15c-18:3 (ALA)	0,34±0,04	0,90±0,07 ^{*a}	0,27±0,01 ^b	0,44±0,04 ^c	0,34±0,05 ^b	0,000	0,000
8c-20:1	0,04±0,00	0,00±0,00 ^{*a}	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,000	0,000
11c-20:1	0,04±0,00	0,08±0,01 ^{*a}	0,04±0,00 ^b	0,03±0,00 ^b	0,04±0,00 ^b	0,024	0,001
9c, 11t-18:2 (AR)	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,30±0,04 ^b	0,65±0,06 ^c	0,27±0,01 ^b	NS	0,000
11c,14c-20:2	0,15±0,02	0,27±0,02 ^{*a}	0,08±0,01 ^b	0,09±0,01 ^b	0,08±0,00 ^b	0,005	0,000
8c, 11c, 14c- 20:3 (DGLA)	0,31±0,01	0,32±0,02 ^a	0,70±0,04 ^{bc}	0,80±0,08 ^c	0,57±0,01 ^b	NS	0,000
22:0	0,03±0,00	0,04±0,00 ^{*a}	0,02±0,00 ^b	0,02±0,00 ^b	0,00±0,00 ^c	0,000	0,000

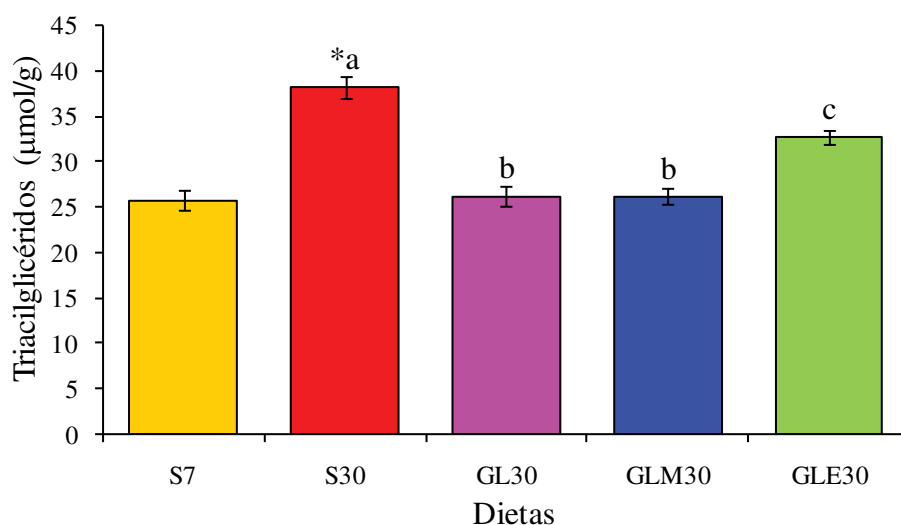
5c, 8c, 11c, 14c- 20:4 (AA)	26,19±0,08	22,79±0,87 ^{*a}	20,28±0,45 ^a	17,83±0,45 ^b	20,65±0,55 ^a	0,008	0,001
13c- 22:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,05±0,00 ^b	0,04±0,00 ^{bc}	0,04±0,01 ^c	NS	0,000
5c, 8c, 11c, 14c, 17c- 20:5 (EPA)	0,37±0,02	0,32±0,03 ^{ab}	0,36±0,03 ^{ab}	0,48±0,04 ^b	0,21±0,02 ^c	NS	0,000
24:0	0,05±0,00	0,05±0,00 ^a	0,03±0,00 ^b	0,03±0,00 ^b	0,03±0,00 ^b	NS	0,003
15c- 24:1	0,32±0,01	0,05±0,00 ^{*a}	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,000	0,000
7c, 10c, 13c, 16c- 22:4	0,07±0,00	0,44±0,03 ^{*a}	0,36±0,03 ^{ab}	0,27±0,02 ^b	0,46±0,02 ^a	0,000	0,001
4c, 7c, 10c, 13c, 16c-22:5	0,14±0,00	0,08±0,00 ^{*a}	0,38±0,06 ^b	0,22±0,01 ^{ac}	0,35±0,04 ^{bc}	0,000	0,000
7c, 10c, 13c, 16c, 19c-22:5	0,66±0,05	0,70±0,06	0,80±0,05	0,86±0,03	0,75±0,02	NS	NS
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6 (DHA)	3,93±0,20	4,67±0,33 ^a	3,46±0,23 ^b	4,47±0,07 ^a	3,45±0,22 ^b	NS	0,004
Σ NI	0,65±0,09	0,44±0,03	0,98±0,01	1,66±0,07	0,40±0,01	-	-
Σ AGS	40,40±1,16	39,33±1,06 ^{ab}	41,28±0,36 ^b	38,10±0,53 ^a	40,12±0,70 ^{ab}	NS	0,049
Σ AGMI _c	10,51±0,62	6,89±0,14 ^{*a}	16,24±0,14 ^{bc}	18,16±0,47 ^c	15,44±1,02 ^b	0,001	0,000
Σ AGMI _t	0,11±0,01	0,16±0,01 ^{*a}	0,86±0,06 ^b	1,74±0,10 ^c	0,64±0,06 ^b	0,008	0,000
Σ AGPI _c n-6	42,29±0,76	46,41±1,00 ^{*a}	35,21±0,29 ^b	34,09±0,51 ^b	36,81±0,95 ^b	0,017	0,000
Σ AGPI _c n-3	5,30±0,17	6,58±0,37 ^{*a}	4,88±0,24 ^b	6,21±0,08 ^a	4,77±0,21 ^b	0,020	0,003
Σ AGPI _c	47,59±0,69	52,99±0,78 ^{*a}	40,10±0,33 ^b	40,30±0,57 ^b	41,58±0,83 ^b	0,002	0,000

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; ΣAGMI_c: sumatoria de AG monoinsaturados *cis*; ΣAGMI_t: sumatoria de AG monoinsaturados *trans*; ΣAGPI_cn-6: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis* n-6; ΣAGPI_cn-3: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis* n-3 y ΣAGPI_c: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis*.

2.2- Concentración de triacilglicéridos hepáticos

Comparando con S7, el contenido de TAG en hígado aumentó significativamente en los animales que consumieron S30 ($p < 0,001$). Del análisis de varianzas, a altos niveles de grasa, podemos observar que los TAG hepáticos disminuyen, observándose el mayor descenso en los grupos GL30 y GLM30 (**Figura 14**).

Figura 14- Niveles de triacilglicéridos en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM ($n=6$). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

2.3- Contenido y relaciones de ácidos grasos hepáticos

En la **Tabla 6** se presenta la composición de AG en hígados de los animales alimentados con las cinco dietas experimentales. Los elevados niveles de aceite de soja en S30 reflejaron un incremento en el contenido de AGPI de las familias n-6 y n-3, principalmente por cambios en los AG: AL y ALA, como de sus derivados de desaturación y elongación. Paralelamente a estos cambios, se redujeron los porcentajes de los AGS y AGMI. Específicamente, en S30 (vs S7) se observó un descenso de los niveles de 16:0, 9c-16:1 y 11c-18:1, acompañados de un incremento del porcentaje de AL, GLA, ALA, 11c-20:1, 11c,14c-20:2, DGLA, 7c,10c,13c,16c-22:4 y 7c,10c,13c,16c,19c-22:5.

Los isómeros AV y AR fueron incorporados en el hígado de los animales alimentados con altos niveles de grasa láctea, mostrando los mayores niveles en el grupo GLM30.

En las dietas enriquecidas en grasas lácteas se observó un incremento en los niveles de AGS y AGMI, asociados a un descenso en los AGPI. El incremento de AGS fue mayor en los animales alimentados con GL30 y GLE30. Notablemente la dieta GLM30 incrementó los niveles de EPA y disminuyó los de AA respecto a las distintas grasas lácteas.

Tabla 6- Perfil de ácidos grasos en hígado (% del total de AG)

Ácidos Grasos	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30	Prueba t	One-Way ANOVA
10:0	0,00±0,00	0,01±0,00 ^{*a}	0,03±0,00 ^b	0,03±0,00 ^b	0,05±0,01 ^c	0,000	0,000
12:0	0,02±0,00	0,01±0,00 ^{*a}	0,14±0,02 ^b	0,14±0,04 ^b	0,06±0,00 ^{ab}	0,006	0,008
14:0	0,39±0,03	0,17±0,02 ^{*a}	1,60±0,21 ^b	1,57±0,17 ^b	0,90±0,10 ^c	0,001	0,000
9c-14:1	0,03±0,01	0,00±0,00 ^{*a}	0,15±0,01 ^b	0,14±0,02 ^b	0,08±0,01 ^c	0,001	0,000
15:0	0,10±0,00	0,09±0,00 ^{*a}	0,36±0,03 ^b	0,39±0,01 ^b	0,26±0,02 ^c	0,008	0,000
16:0 iso	0,04±0,01	0,02±0,00 ^{*a}	0,04±0,00 ^b	0,05±0,00 ^b	0,04±0,00 ^b	0,030	0,001
16:0	20,34±0,17	13,57±0,20 ^{*a}	21,58±0,44 ^b	20,17±0,08 ^{bc}	19,87±0,47 ^c	0,000	0,000
9t-16:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,04±0,00 ^b	0,08±0,01 ^c	0,03±0,00 ^b	NS	0,000
11t-16:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,06±0,00 ^b	0,24±0,02 ^c	0,04±0,00 ^b	NS	0,000
7c-16:1	0,19±0,01	0,24±0,01 ^{*a}	0,34±0,02 ^b	0,48±0,01 ^c	0,28±0,02 ^a	0,027	0,000
9c-16:1	2,27±0,29	0,22±0,01 ^{*a}	1,01±0,05 ^b	1,08±0,07 ^b	0,93±0,08 ^b	0,000	0,000
17:0 anteiso	0,10±0,02	0,00±0,00 ^{*a}	0,16±0,03 ^b	0,20±0,01 ^b	0,14±0,00 ^b	0,002	0,000
17:0	0,18±0,01	0,20±0,01 ^a	0,30±0,01 ^b	0,31±0,00 ^b	0,28±0,02 ^b	NS	0,000
(9-10)c-17:1	0,30±0,02	0,14±0,01 ^{*a}	0,20±0,02 ^b	0,18±0,01 ^{ab}	0,16±0,01 ^{ab}	0,000	0,041
18:0	11,06±0,42	11,82±0,23 ^a	12,66±0,80 ^{ab}	10,67±0,32 ^a	14,81±0,71 ^b	NS	0,002
9t-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,10±0,01 ^{ab}	0,34±0,05 ^c	0,12±0,02 ^b	NS	0,000

11t-18:1 (AV)	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,30±0,03 ^b	0,93±0,08 ^c	0,29±0,04 ^b	NS	0,000
9c-18:1 (AO)	11,36±0,92	9,75±0,55 ^a	19,22±0,68 ^b	20,78±0,26 ^b	18,92±1,29 ^b	NS	0,000
11c-18:1	3,43±0,05	2,13±0,12 ^{*a}	3,17±0,08 ^b	4,05±0,17 ^c	3,68±0,05 ^c	0,000	0,000
12c-18:1	0,20±0,03	0,09±0,00 ^{*a}	1,08±0,07 ^b	0,94±0,06 ^b	0,65±0,02 ^c	0,008	0,000
14c-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,27±0,01 ^b	0,31±0,01 ^c	0,22±0,00 ^d	NS	0,000
9c, 12c-18:2 (AL)	24,20±0,18	33,77±2,00 ^{*a}	12,69±0,30 ^b	13,82±0,74 ^b	14,79±0,53 ^b	0,003	0,000
6c, 9c, 12c-18:3 (GLA)	0,40±0,04	0,59±0,05 ^{*a}	0,20±0,01 ^b	0,23±0,01 ^b	0,13±0,02 ^c	0,025	0,000
20:0	0,15±0,01	0,24±0,02 ^{*a}	0,05±0,00 ^b	0,07±0,00 ^b	0,07±0,00 ^b	0,010	0,000
5c-20:1	0,10±0,01	0,10±0,01 ^a	0,02±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	NS	0,000
9c, 12c, 15c-18:3 (ALA)	1,10±0,10	1,92±0,12 ^{*a}	0,44±0,02 ^b	0,72±0,03 ^c	0,41±0,03 ^b	0,002	0,000
11c-20:1	0,06±0,00	0,16±0,02 [*]	0,15±0,01	0,11±0,01	0,12±0,01	0,002	NS
9c, 11t-18:2 (AR)	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,75±0,03 ^b	2,31±0,09 ^c	0,43±0,03 ^d	NS	0,000
11c,14c-20:2	0,14±0,01	0,37±0,03 ^{*a}	0,10±0,00 ^b	0,11±0,01 ^b	0,13±0,01 ^b	0,000	0,000
8c, 11c, 14c- 20:3 (DGLA)	0,25±0,02	0,37±0,01 ^{*a}	0,47±0,01 ^b	0,51±0,03 ^b	0,43±0,00 ^{ab}	0,002	0,001
22:0	0,01±0,00	0,02±0,00 [*]	0,02±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,043	NS
11c, 14c, 17c- 20:3	0,01±0,00	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^{ab}	0,02±0,00 ^b	0,02±0,00 ^{ab}	NS	0,012
5c, 8c, 11c, 14c- 20:4 (AA)	17,08±0,83	15,17±0,42 ^{ab}	16,11±0,14 ^b	12,60±0,49 ^a	17,46±1,08 ^b	NS	0,001

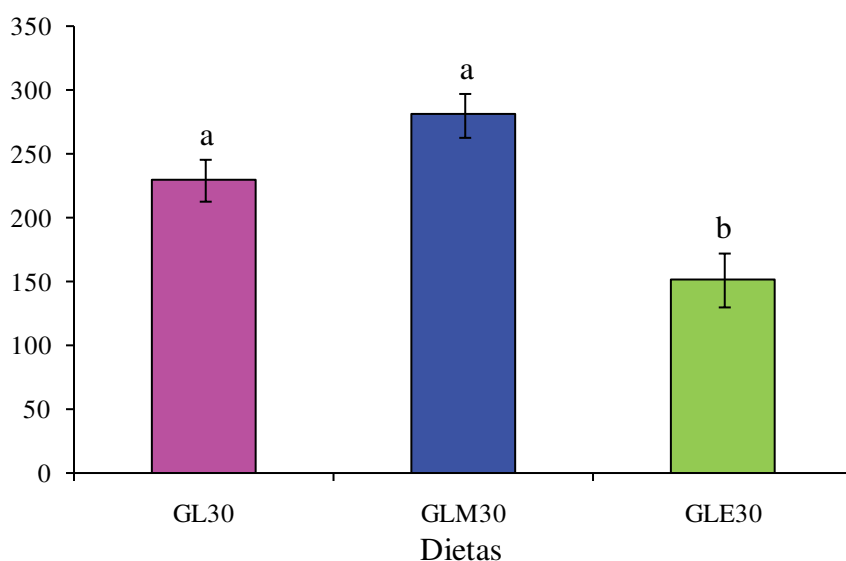
5c, 8c, 11c, 14c, 17c- 20:5 (EPA)	0,41±0,02	0,53±0,02 ^{*a}	0,25±0,02 ^b	0,36±0,03 ^c	0,17±0,01 ^b	0,004	0,000
24:0	0,01±0,00	0,02±0,00 ^{*a}	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a	0,002	0,001
7c, 10c, 13c, 16c- 22:4	0,27±0,02	0,42±0,01 ^{*a}	0,29±0,02 ^b	0,23±0,02 ^b	0,47±0,02 ^a	0,001	0,000
4c, 7c, 10c, 13c, 16c-22:5	0,16±0,01	0,15±0,01 ^a	0,34±0,03 ^b	0,19±0,01 ^a	0,37±0,04 ^b	NS	0,000
7c, 10c, 13c, 16c, 19c-22:5	0,55±0,06	0,73±0,02 [*]	0,75±0,04	0,76±0,04	0,81±0,04	0,031	NS
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6 (DHA)	4,03±0,19	4,44±0,14	3,99±0,18	3,74±0,33	3,73±0,23	NS	NS
Σ NI	0,58±0,00	0,57±0,05	0,81±0,04	0,98±0,03	0,58±0,02	-	-
Σ AGS	32,39±0,27	26,17±0,32 ^{*a}	36,95±0,39 ^b	33,63±0,41 ^c	36,53±0,52 ^b	0,000	0,000
Σ AGMI _t	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,50±0,03 ^b	1,59±0,11 ^c	0,48±0,05 ^b	NS	0,000
Σ AGMI _c	17,96±1,21	12,83±0,63 ^{*a}	25,60±0,74 ^b	28,09±0,51 ^b	25,05±1,41 ^b	0,009	0,000
Σ AGPI _c n-6	42,51±0,74	52,10±0,74 ^{*a}	30,20±0,34 ^b	27,49±0,41 ^c	33,41±0,67 ^d	0,000	0,000
Σ AGPI _c n-3	6,09±0,23	7,63±0,18 ^{*a}	5,45±0,20 ^b	5,57±0,24 ^b	5,14±0,25 ^b	0,002	0,000
Σ AGPI _c	48,60±0,93	59,67±0,86 ^{*a}	35,65±0,53 ^b	33,25±0,34 ^b	38,92±0,95 ^c	0,000	0,000

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; ΣAGMI_c: sumatoria de AG monoinsaturados *cis*; ΣAGMI_t: sumatoria de AG monoinsaturados *trans*; ΣAGPI_cn-6: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis* n-6; ΣAGPI_cn-3: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis* n-3 y ΣAGPI_c: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis*.

Si bien el AV y el AR están presentes en las dietas ricas en grasa láctea, el AR también es formado por bioconversión a partir del AV incrementando potencialmente el pool de este ácido graso bioactivo. El cociente AR/AV en el hígado de los animales alimentados con las dietas lácteas fue: GLM30=GL30>GLE30 (**Figura 15**). Esta bioconversión es catalizada por la enzima $\Delta 9$ -Desaturasa (SCD-1), la cual también participa en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos y es reflejada por las relaciones ácido palmitoleico/ ácido palmítico y ácido oleico/ ácido esteárico.

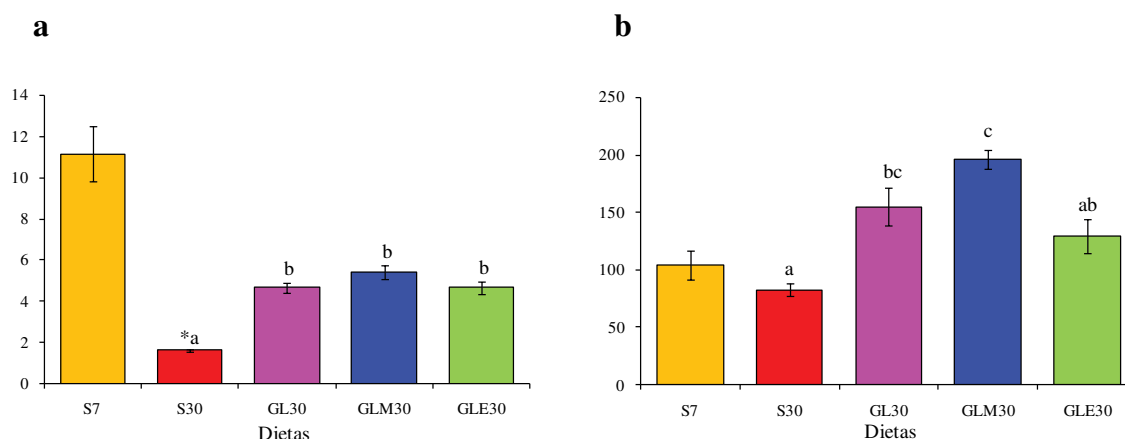
Así, la relación 9c-16:1/ 16:0 disminuyó a elevados niveles de grasa (**Figura 16a**). La comparación del tipo de grasa dietaria muestra mayores niveles de este cociente respecto a la S30. En forma diferente, la relación 9c-18:1/ 18:0 (**Figura 16b**), no se modificó por el nivel de grasa dietaria, pero si mostró un incremento por las dietas ricas en grasa láctea, siendo más elevada en el grupo GLM30.

Figura 15- Relación porcentual: AR/AV en hígados de animales alimentados con dietas ricas en grasas lácteas



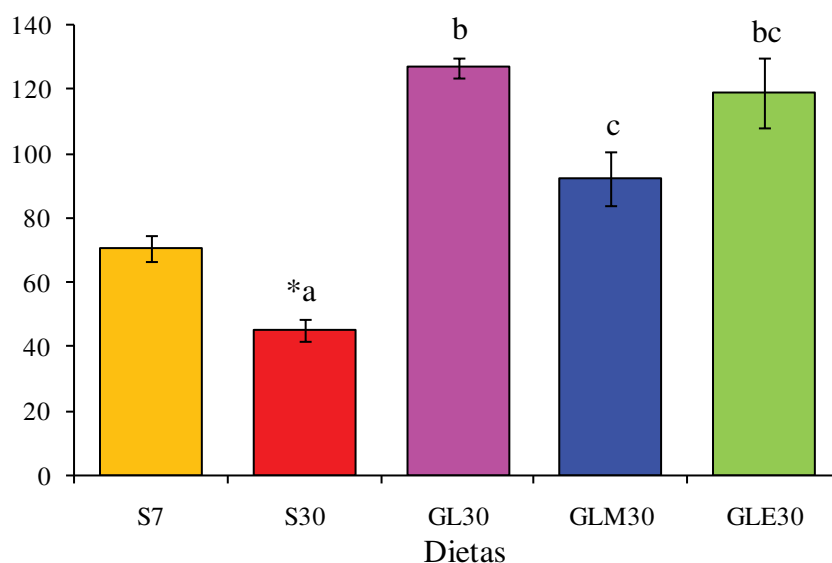
Resultados expresados como el promedio de la relación porcentual: AR/AV \pm SEM (n=6). GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Figura 16- Flujo a través de la enzima Δ^9 -desaturasa en hígado. Expresada por la relación porcentual: ácido palmitoleico/ácido palmítico (a) y ácido oleico/ácido esteárico (b)



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

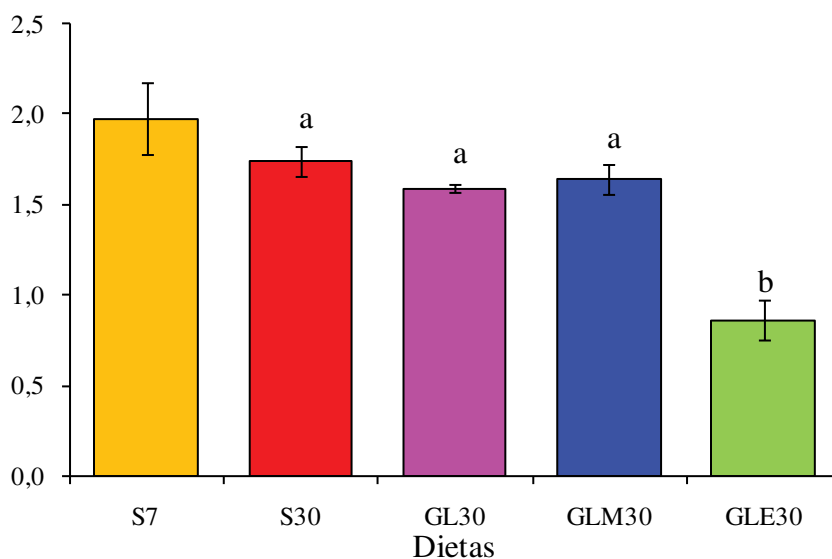
La biosíntesis total de AGPI de la serie n-6, estimada a través de la relación porcentual producto/sustrato (AA/AL) (**Figura 17**), mostró una disminución significativa en el grupo S30. No obstante, a altos niveles de grasa, las grasas lácteas aumentaron dicha relación, siendo más elevada en los grupos GL30 y GLE30.

Figura 17- Relación porcentual: AA/AL en hígado

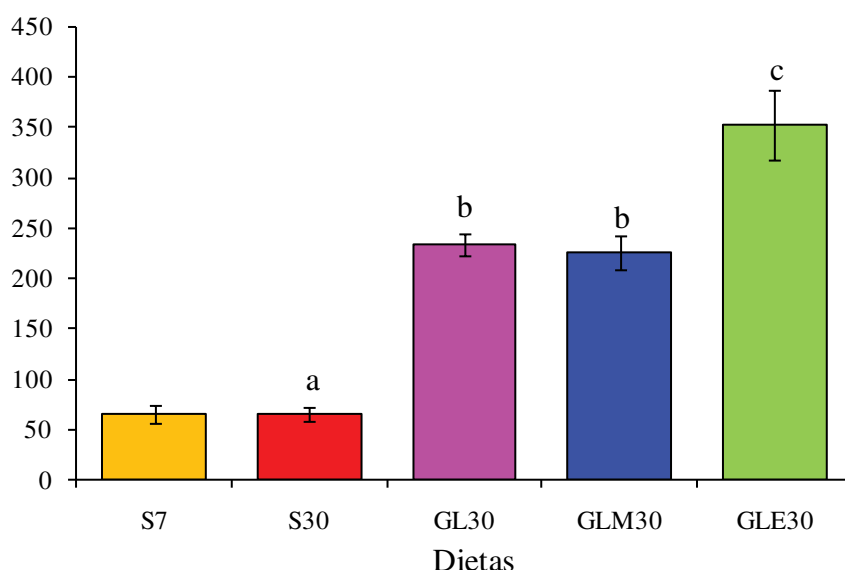
Resultados expresados como el promedio de la relación porcentual: AA/AL \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Dado que la enzima clave de la biosíntesis de AA es la $\Delta 6$ -desaturasa, se muestra el flujo a través de dicha enzima mediante la relación porcentual GLA/AL (**Figura 18**). Este parámetro no presentó diferencias estadísticamente significativas al aumentar el nivel de grasa; no obstante, a altos niveles de grasa, se observó una disminución en el grupo GLE30. La relación porcentual DGLA/GLA fue incrementada sólo por la presencia de grasa láctea a elevados niveles de grasa, siendo observado el mayor aumento en el grupo GLE30 (**Figura 19**).

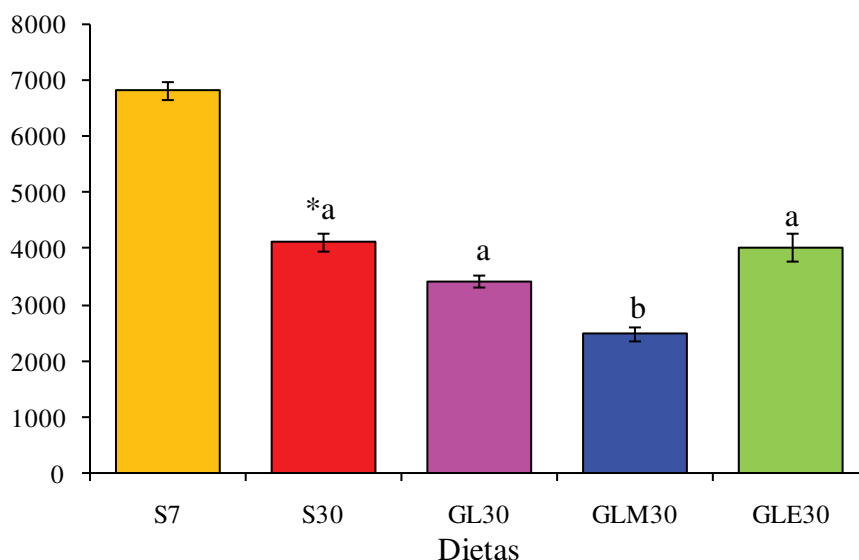
El flujo de sustrato a través de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa, representado por la relación AA/DGLA, muestra una disminución en S30 al comparar con S7 (**Figura 20**). Esta disminución se acentúa en el grupo GLM30 cuando lo comparamos con los grupos alimentados a altos niveles de grasa.

Figura 18- Flujo a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa en hígado

Resultados expresados como el promedio de la relación porcentual: ácido γ -linolénico/ácido linoleico \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

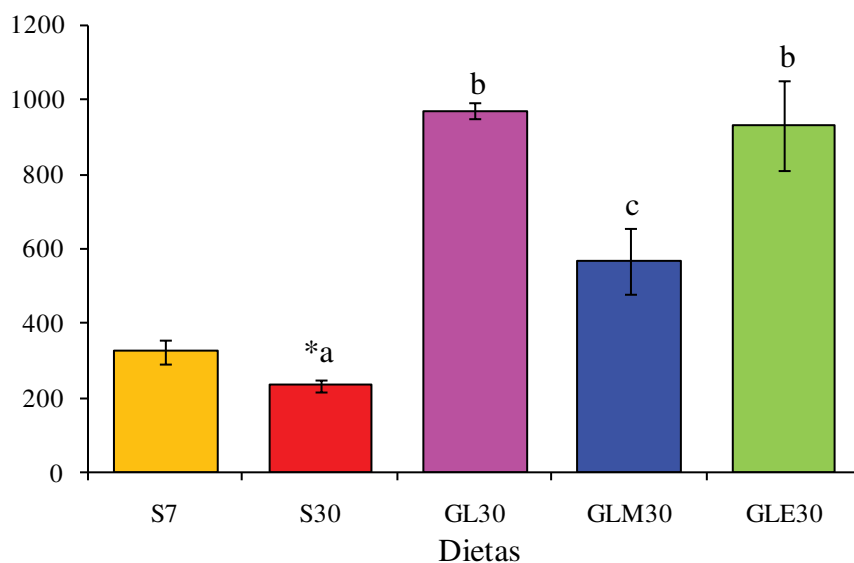
Figura 19- Relación porcentual: DGLA/GLA en hígado

Resultados expresados como el promedio de la relación porcentual: DGLA/GLA \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

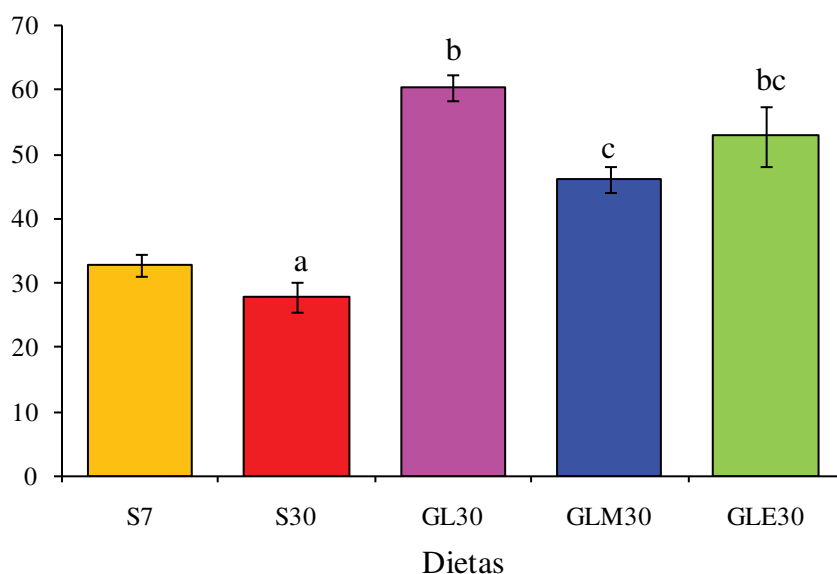
Figura 20- Flujo a través de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa en hígado

Resultados expresados como el promedio de la relación porcentual: ácido araquidónico/ácido di-homo- γ -linolénico \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa,, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

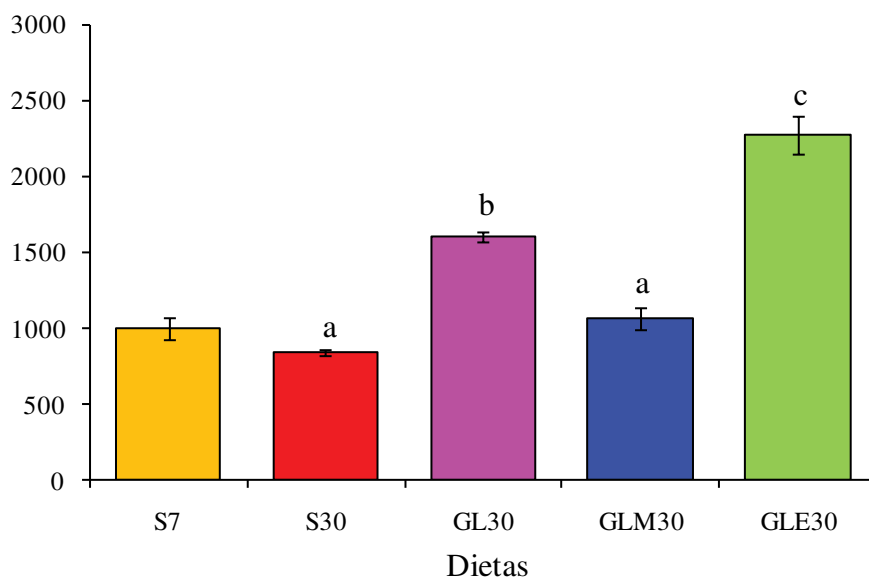
La biosíntesis de AGPI-CL de la serie n-3, expresada por la relación DHA/ALA, manifestó modificaciones por el nivel y tipo de grasa dietaria. Específicamente, elevados niveles de grasa inhibieron la conversión de ALA a DHA, mientras que elevados niveles de grasa láctea estimularon dicha conversión, observándose en forma más significativa en los grupos GL30 y GLE30 (**Figura 21**). A través del análisis de los intermediarios de dicha vía, se observa que la biosíntesis de EPA, expresada por la relación EPA/ALA, muestra el mismo comportamiento que la relación DHA/ALA no alcanzando diferencias significativas por el nivel de grasa dietaria y denotando que el incremento observado por la grasa láctea fue mayor en el grupo GL30 que en el GLM30 (**Figura 22**). Además, la elongación de EPA a DHA, expresada por la relación DHA/EPA, no fue afectada por el nivel de grasa dietaria, y mostró un incremento significativo en los grupos GL30 y GLE30 (**Figura 23**).

Figura 21- Relación porcentual: DHA/ALA en hígado

Resultados expresados como el promedio de la relación porcentual: DHA/ALA \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Figura 22- Relación porcentual: EPA/ALA en hígado

Resultados expresados como el promedio de la relación porcentual: EPA/ALA \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

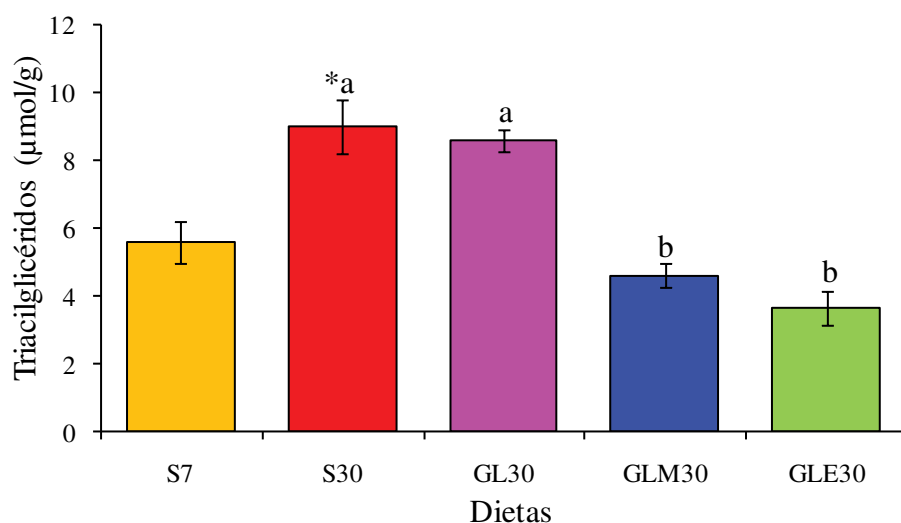
Figura 23- Relación porcentual: DHA/EPA en hígado

Resultados expresados como el promedio de la relación porcentual: DHA/EPA \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Debido a los escasos niveles de algunos de los metabolitos intermediarios, no fue factible estimar los efectos en los flujos parciales de sustratos a través de las diferentes enzimas participantes en la biosíntesis total de DHA.

2.4- Concentración de triacilglicéridos en músculo

Comparando con S7, el contenido de TAG en músculo aumentó significativamente en los animales que consumieron S30 ($p < 0,001$). Los TAG musculares a elevados niveles de grasa disminuyeron en los grupos GLM30 y GLE30, sin observarse cambios en GL30 (**Figura 24**).

Figura 24- Niveles de triacilglicéridos en músculo

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

2.5- Contenido y relaciones de ácidos grasos en músculo

En la **Tabla 7** se observa la composición de AG en músculo gastrocnemio de los distintos grupos experimentales. En músculo, las dietas ricas en aceite de soja incrementaron aproximadamente en un 50% los niveles de AGPI totales, como los de las familias n-6 y n-3. No obstante, los incrementos fueron observados principalmente en cuatro AG: AL, ALA, DHA y 11c, 14c-20:2. El incremento en AGPIs, estuvo asociado a una disminución de los AGS y AGMI, siendo importante el descenso significativo de AG involucrados en lipogénesis como 16:0, 9c-16:1 y 11c-18:1.

Los isómeros *trans* fueron incorporados en el músculo, independientemente del tipo de isómero *trans* considerado, guardando una relación con la ingesta de los mismos. De esta forma se destaca la incorporación de AV y AR en el grupo GLM30.

En las dietas enriquecidas en grasas lácteas se observaron aumentos significativos en el contenido de AGS y AGMI, acompañados de un descenso en los AGPI. El aumento de AGMI fue mayor en los animales alimentados con GLE30 a expensas, principalmente, de los AG: 9c-18:1 y 11c-18:1. El descenso en los AGPIs totales en las dietas ricas en grasas lácteas fue similar entre los diferentes grupos, no obstante la mayor contribución a ese descenso fue observada en los AGPI de la familia n-6. Es interesante observar que los niveles de AA en los animales del grupo GLM30 fueron significativamente inferiores que los del grupo GL30.

Tabla 7- Perfil de ácidos grasos en músculo gastrocnemio (% del total de AG)

Ácidos Grasos	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30	Prueba t	One-Way ANOVA
12:0	0,33±0,03	0,09±0,01 ^{*a}	0,53±0,00 ^b	0,96±0,23 ^c	0,73±0,19 ^{bc}	0,002	0,018
14:0	1,37±0,15	0,28±0,01 ^{*a}	2,86±0,12 ^{bc}	3,39±0,21 ^c	2,41±0,09 ^b	0,002	0,000
9c-14:1	0,10±0,02	0,00±0,00 ^{*a}	0,22±0,03 ^b	0,25±0,02 ^b	0,20±0,05 ^b	0,011	0,001
15:0	0,11±0,00	0,08±0,00 ^{*a}	0,37±0,01 ^b	0,40±0,02 ^b	0,38±0,05 ^b	0,005	0,000
16:0 iso	0,06±0,00	0,04±0,00 ^{*a}	0,08±0,00 ^b	0,10±0,01 ^b	0,08±0,01 ^b	0,010	0,000
16:0	27,16±1,03	19,66±0,66 ^{*a}	26,62±0,15 ^b	24,65±0,58 ^b	26,83±2,19 ^b	0,004	0,009
9t-16:1	0,01±0,00	0,02±0,00 ^{*a}	0,13±0,00 ^b	0,22±0,01 ^c	0,06±0,00 ^d	0,028	0,000
9c-16:1	5,79±0,65	0,35±0,04 ^{*a}	1,92±0,26 ^b	1,45±0,12 ^b	1,52±0,32 ^b	0,001	0,005
17:0	0,13±0,01	0,21±0,01 ^{*a}	0,28±0,00 ^b	0,32±0,01 ^c	0,27±0,00 ^b	0,002	0,000
(9-10)c-17:1	0,01±0,00	0,00±0,00 ^{*a}	0,00±0,00 ^a	0,11±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,021	0,000
18:0	8,40±1,15	10,26±0,33	9,62±0,25	9,55±0,06 ^a	8,69±0,58	NS	NS
6t-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,09±0,01 ^b	0,25±0,07 ^c	0,09±0,02 ^b	NS	0,011
9t-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,17±0,01 ^b	0,36±0,04 ^c	0,14±0,01 ^b	NS	0,000
10t-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,30±0,02 ^b	0,85±0,08 ^c	0,27±0,05 ^b	NS	0,000
11t-18:1 (AV)	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,40±0,01 ^b	1,58±0,01 ^c	0,40±0,02 ^b	NS	0,000

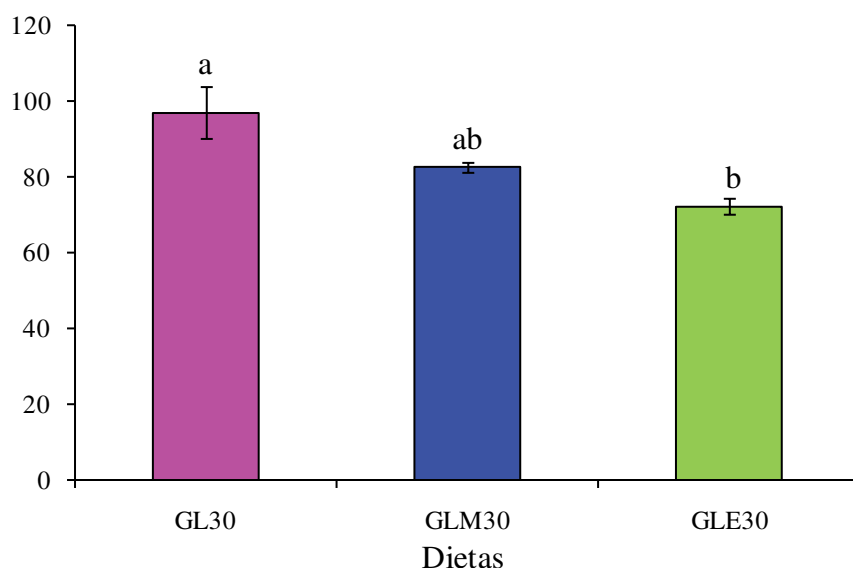
9c-18:1 (AO)	16,90±1,11	13,61±0,67 ^a	18,26±0,55 ^b	20,37±0,13 ^b	22,77±0,51 ^c	NS	0,000
11c-18:1	3,13±0,20	1,86±0,01 ^{*a}	1,86±0,02 ^a	1,66±0,09 ^a	2,23±0,06 ^b	0,003	0,000
9c, 12c-18:2 (AL)	19,97±0,12	32,04±0,40 ^{*a}	14,12±0,08 ^b	14,33±0,79 ^b	15,01±0,50 ^b	0,000	0,000
6c, 9c, 12c-18:3 (GLA)	0,05±0,01	0,05±0,00 ^a	0,03±0,00 ^{ab}	0,02±0,00 ^b	0,03±0,01 ^{ab}	NS	0,025
20:0	0,03±0,00	0,03±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	NS	NS
5c-20:1	0,01±0,00	0,02±0,00 ^{*a}	0,00±0,00 ^b	0,01±0,00 ^c	0,01±0,00 ^c	0,007	0,002
9c, 12c, 15c-18:3 (ALA)	0,66±0,03	1,08±0,03 ^{*a}	0,32±0,02 ^b	0,44±0,01 ^c	0,36±0,02 ^{bc}	0,001	0,000
11c-20:1	0,06±0,00	0,09±0,00 [*]	0,06±0,00	0,07±0,00	0,07±0,01	0,010	NS
9c, 11f-18:2 (AR)	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,38±0,03 ^b	1,30±0,03 ^c	0,30±0,02 ^b	NS	0,000
11c, 14c-20:2	0,11±0,01	0,21±0,00 ^{*a}	0,07±0,00 ^b	0,07±0,00 ^b	0,06±0,01 ^b	0,000	0,000
8c, 11c, 14c-20:3 (DGLA)	0,03±0,00	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,02±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	NS	0,020
22:0	0,20±0,03	0,24±0,00 ^a	0,53±0,01 ^b	0,44±0,03 ^b	0,31±0,04 ^a	NS	0,000
11c, 14c, 17c-20:3	0,02±0,00	0,02±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	NS	NS
5c, 8c, 11c, 14c-20:4 (AA)	6,98±0,68	8,58±0,42 ^{ab}	8,83±0,37 ^b	6,90±0,04 ^a	7,49±0,61 ^{ab}	NS	0,034
5c, 8c, 11c, 14c, 17c-20:5 (EPA)	0,05±0,01	0,04±0,02 ^a	0,08±0,00 ^b	0,08±0,00 ^b	0,04±0,01 ^a	NS	0,036
24:0	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,02±0,01	NS	NS
7c, 10c, 13c, 16c-22:4	0,24±0,04	0,24±0,00	0,30±0,01	0,21±0,00	0,26±0,06	NS	NS

4c, 7c, 10c, 13c, 16c-22:5	0,33±0,08	0,23±0,01 ^{*a}	0,60±0,04 ^b	0,30±0,04 ^a	0,66±0,03 ^b	0,005	0,000
7c, 10c, 13c, 16c, 19c-22:5	0,95±0,26	1,21±0,06	1,91±0,10	1,62±0,04	1,21±0,29	NS	NS
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6 (DHA)	5,45±0,61	7,96±0,26 ^{*a}	7,06±0,37 ^{ab}	5,78±0,54 ^b	5,78±0,23 ^b	0,020	0,008
Σ NI	1,49±0,05	1,51±0,03	1,92±0,03	1,91±0,02	1,32±0,04	-	-
Σ AGS	37,81±0,33	30,89±0,34 ^{*a}	40,93±0,09 ^b	39,85±0,77 ^b	39,73±1,88 ^b	0,000	0,000
Σ AGMI_t	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	1,08±0,04 ^b	3,26±0,19 ^c	0,94±0,07 ^b	NS	0,000
Σ AGMI_c	26,00±1,81	15,92±0,70 ^{*a}	22,34±0,84 ^b	23,91±0,26 ^b	26,80±0,28 ^c	0,007	0,000
Σ AGPI_c n-6	27,71±0,86	41,37±0,33 ^{*a}	23,98±0,35 ^b	21,85±0,74 ^b	23,53±1,12 ^b	0,000	0,000
Σ AGPI_c n-3	7,13±0,86	10,30±0,34 ^{*a}	9,37±0,44 ^{ab}	7,93±0,54 ^b	7,40±0,47 ^b	0,026	0,007
Σ AGPI_c	34,84±1,72	51,68±0,56 ^{*a}	33,35±0,78 ^b	29,77±0,98 ^b	30,92±1,54 ^b	0,001	0,000

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; ΣAGMI_c: sumatoria de AG monoinsaturados *cis*; ΣAGMI_t: sumatoria de AG monoinsaturados *trans*; ΣAGPI_cn-6: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis* n-6; ΣAGPI_cn-3: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis* n-3 y ΣAGPI_c: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis*.

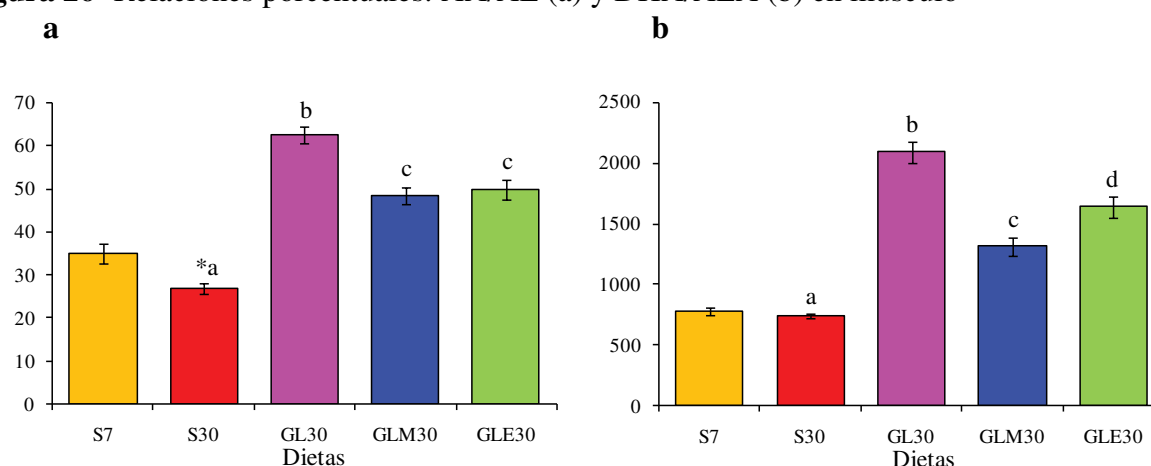
Si bien la incorporación de AV y AR estuvo relacionada con la ingesta de los mismos, el cociente AR/AV en músculo gastrocnemio sólo presentó diferencias en el grupo GLE30 vs GL30 (**Figura 25**).

Figura 25- Relación porcentual: AR/AV en músculos de animales alimentados con dietas ricas en grasas lácteas



Resultados expresados como el promedio de la relación porcentual: AR/AV \pm SEM (n=6). GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

En forma semejante a lo observado en hígado, la relación porcentual AA/AL (**Figura 26a**), disminuyó en los animales del grupo S30 e incrementaron en las grasas lácteas, siendo mayor en el grupo GL30. El cociente DHA/ALA (**Figura 26b**) no mostró diferencias por el nivel de grasa dietaria, y presentó el mismo patrón que el indicado para la relación AA/AL para los grupos de animales alimentados con dietas enriquecidas en grasa.

Figura 26- Relaciones porcentuales: AA/AL (a) y DHA/ALA (b) en músculo

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

2.6- Contenido y relaciones de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

El perfil de los AG de los lípidos totales en el tejido adiposo epididimal es presentado en la **Tabla 8**. Como puede observarse, el incremento de los niveles dietarios de aceite de soja elevó los niveles de AGPI en un 71%, siendo equivalente el incremento en los AGPI de las familias n-6 y n-3, como asimismo mostrando aumentos semejantes en la mayoría de los AGPI individuales. Los AGS y en menor grado los AGMI decrecieron con la dieta S30, siendo muy importante el descenso en los AG involucrados en la lipogénesis.

A elevados niveles de lípidos, las dietas ricas en grasas lácteas han mostrado mayor incorporación de AG isoméricos en tejido adiposo que en otros tejidos (hígado, músculo y suero). Dicha incorporación fue más acentuada en los animales alimentados con GLM30, destacándose principalmente la retención del AR.

Los AGS y AGMI totales disminuyeron significativamente al aumentar el nivel de grasa, no obstante, respecto al grupo S30, las dietas ricas en grasas lácteas mostraron mayores niveles de AGS (entre 115 y 150 %) y de AGMI (entre 60 y 76 %). Estos resultados fueron asociados a un descenso muy significativo en los niveles de AGPI. Los animales del grupo GL30 presentaron el mayor incremento de los AGS aterogénicos (12:0, 14:0 y 16:0) y del 18:0.

Es interesante notar que, de los animales que consumieron grasas lácteas, los mayores niveles de AGPI n-3 se observaron en el grupo GLM30 a expensas de elevados niveles de ALA, y no de los productos de elongación EPA y DHA; y los niveles más elevados de AGPI n-6 se presentaron en el grupo GLE30.

Tabla 8- Perfil de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal (% del total de AG)

Ácidos Grasos	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30	Prueba t	One-Way ANOVA
10:0	0,02±0,00	0,01±0,00 ^{*a}	0,44±0,01 ^b	0,36±0,01 ^c	0,30±0,01 ^d	0,001	0,000
12:0	0,07±0,00	0,03±0,00 ^{*a}	1,44±0,03 ^b	1,21±0,02 ^c	1,01±0,04 ^d	0,000	0,000
14:0	1,32±0,02	0,36±0,03 ^{*a}	6,45±0,09 ^b	6,04±0,07 ^b	4,57±0,15 ^c	0,000	0,000
9c-14:1	0,09±0,01	0,00±0,00 ^{*a}	0,61±0,02 ^b	0,67±0,01 ^c	0,40±0,01 ^d	0,000	0,000
15:0	0,11±0,01	0,07±0,00 ^{*a}	0,64±0,02 ^b	0,61±0,01 ^b	0,50±0,01 ^c	0,007	0,000
16:0 iso	0,09±0,01	0,04±0,00 ^{*a}	0,14±0,01 ^b	0,14±0,00 ^b	0,10±0,00 ^c	0,000	0,000
16:0	25,25±0,56	12,45±0,37 ^{*a}	26,50±0,20 ^b	21,92±0,20 ^c	23,47±0,33 ^d	0,000	0,000
9t-16:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,28±0,01 ^b	0,00±0,00 ^a	NS	0,000
11t-16:1	0,22±0,00	0,17±0,01 ^{*a}	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,001	0,000
17:0 iso	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,19±0,01 ^b	0,28±0,01 ^c	0,19±0,01 ^b	NS	0,000
7c-16:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,13±0,01 ^b	0,19±0,01 ^c	0,11±0,01 ^b	NS	0,000
9c-16:1	6,93±0,36	0,65±0,06 ^{*a}	3,50±0,09 ^b	3,17±0,12 ^{bc}	3,06±0,09 ^c	0,000	0,000
17:0 anteiso	0,20±0,01	0,04±0,00 ^{*a}	0,22±0,01 ^b	0,31±0,02 ^c	0,24±0,01 ^b	0,000	0,000
17:0	0,07±0,01	0,12±0,00 ^{*a}	0,24±0,00 ^b	0,29±0,00 ^c	0,23±0,01 ^b	0,000	0,000
(9-10)c-17:1	0,27±0,01	0,10±0,01 ^{*a}	0,26±0,01 ^b	0,26±0,01 ^b	0,25±0,00 ^b	0,000	0,000
18:0	3,11±0,09	3,46±0,06 ^{*a}	5,37±0,04 ^b	5,31±0,07 ^{bc}	5,02±0,10 ^c	0,018	0,000

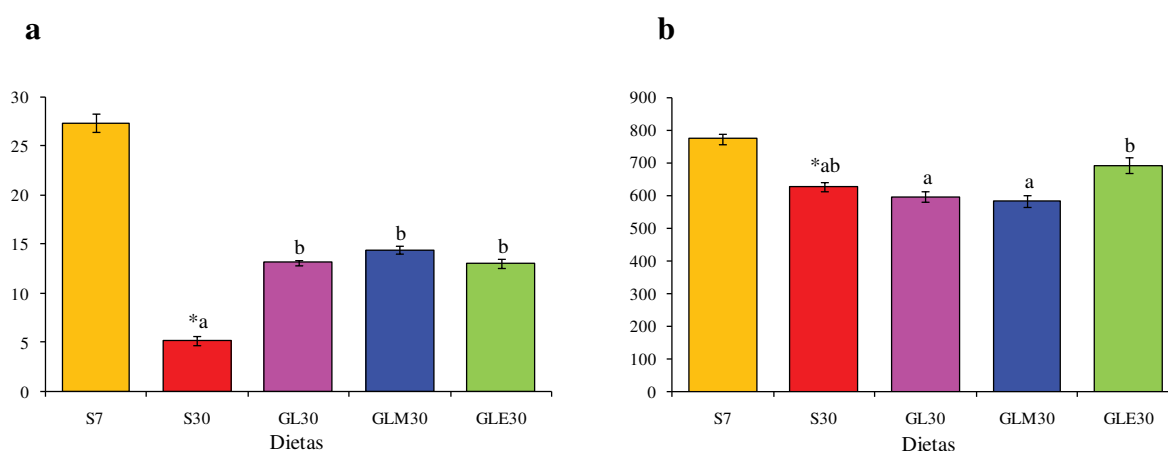
6t-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,28±0,01 ^b	0,57±0,05 ^c	0,20±0,02 ^b	NS	0,000
9t-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,43±0,01 ^b	0,90±0,07 ^c	0,21±0,01 ^d	NS	0,000
11t-18:1 (AV)	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	1,07±0,09 ^b	2,42±0,07 ^c	0,68±0,09 ^d	NS	0,000
9c-18:1 (AO)	24,00±0,65	21,71±0,22 ^{*a}	32,02±0,60 ^b	30,98±0,58 ^b	34,69±0,74 ^c	0,016	0,000
11c-18:1	6,31±0,21	3,70±0,12 ^{*a}	4,84±0,29 ^b	6,18±0,33 ^c	6,32±0,33 ^c	0,000	0,000
12c-18:1	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	0,82±0,04 ^b	1,22±0,04 ^c	1,62±0,09 ^d	NS	0,000
9c,12c-18:2 (AL)	29,53±0,58	50,84±0,66 ^{*a}	10,99±0,21 ^b	11,30±0,16 ^b	14,64±0,34 ^c	0,000	0,000
6c,9c,12c-18:3 (GLA)	0,15±0,01	0,29±0,00 ^{*a}	0,00±0,00 ^b	0,04±0,00 ^c	0,03±0,00 ^c	0,000	0,000
20:0	0,03±0,00	0,05±0,00 ^{*a}	0,00±0,00 ^b	0,04±0,00 ^c	0,04±0,00 ^c	0,001	0,000
5c-20:1	0,08±0,00	0,11±0,01 ^{*a}	0,00±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^b	0,006	0,000
9c,12c,15c-18:3 (ALA)	2,06±0,09	3,64±0,05 ^{*a}	0,69±0,02 ^b	0,96±0,01 ^c	0,78±0,02 ^b	0,000	0,000
11c-20:1	0,15±0,01	0,15±0,01 ^a	0,03±0,00 ^{bc}	0,04±0,00 ^c	0,02±0,00 ^b	NS	0,000
9c,11t-18:2 (AR)	0,00±0,00	0,00±0,00 ^a	1,15±0,03 ^b	3,26±0,03 ^c	0,80±0,02 ^d	NS	0,000
11c,14c-20:2	0,15±0,01	0,21±0,01 ^{*a}	0,05±0,00 ^b	0,04±0,00 ^b	0,06±0,00 ^b	0,003	0,000
8c,11c,14c-20:3 (DGLA)	0,09±0,01	0,14±0,01 ^{*a}	0,07±0,00 ^b	0,07±0,00 ^c	0,06±0,00 ^c	0,000	0,000
11c,14c,17c-20:3	0,00±0,00	0,03±0,00 ^{*a}	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,000	0,000

5c,8c,11c,14c-20:4 (AA)	0,55±0,02	0,79±0,04 ^{*a}	0,22±0,01 ^b	0,17±0,01 ^b	0,24±0,01 ^b	0,002	0,000
5c,8c,11c,14c,17c-20:5 (EPA)	0,02±0,00	0,05±0,00 ^{*a}	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,001	0,000
7c,10c,13c,16c-22:4	0,09±0,01	0,08±0,01 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	NS	0,000
4c,7c,10c,13c,16c-22:5	0,08±0,00	0,10±0,01 ^a	0,03±0,00 ^{bc}	0,04±0,00 ^c	0,02±0,00 ^b	NS	0,000
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6 (DHA)	0,14±0,01	0,14±0,01 ^a	0,04±0,00 ^b	0,04±0,00 ^b	0,02±0,00 ^c	NS	0,000
Σ NI	0,16±0,02	0,40±0,01	0,73±0,03	0,96±0,05	0,35±0,01	-	-
Σ AGS	30,28±0,62	16,63±0,34 ^{*a}	41,63±0,18 ^b	36,52±0,30 ^c	35,69±0,58 ^c	0,000	0,000
Σ AGMI_t	0,22±0,00	0,17±0,01 ^{*a}	1,77±0,09 ^b	4,16±0,08 ^c	1,09±0,10 ^d	0,001	0,000
Σ AGMI_c	37,83±1,01	26,42±0,25 ^{*a}	42,23±0,44 ^b	42,76±0,48 ^b	46,51±0,46 ^c	0,000	0,000
Σ AGPI_c n-6	30,57±0,61	52,36±0,62 ^{*a}	11,26±0,21 ^b	11,62±0,17 ^b	15,03±0,33 ^c	0,000	0,000
Σ AGPI_c n-3	2,30±0,09	3,94±0,05 ^{*a}	0,77±0,02 ^b	1,04±0,02 ^c	0,83±0,02 ^b	0,000	0,000
Σ AGPI_c	32,87±0,64	56,30±0,61 ^{*a}	12,03±0,21 ^b	12,66±0,17 ^b	15,87±0,33 ^c	0,000	0,000

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; ΣAGMI_c: sumatoria de AG monoinsaturados *cis*; ΣAGMI_t: sumatoria de AG monoinsaturados *trans*; ΣAGPI_cn-6: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis* n-6; ΣAGPI_cn-3: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis* n-3 y ΣAGPI_c: sumatoria de AG poliinsaturados total *cis*.

La relación ácido palmitoleico/ ácido palmítico (**Figura 27a**) disminuyó al aumentar el nivel de grasa. Al comparar con S30, se observó un incremento equivalente de dicha relación en los grupos alimentados con grasas lácteas. Si bien al incrementar el nivel de grasa también se observó un descenso de la relación ácido oleico/ácido esteárico, no se observaron diferencias en dicha relación en los grupos alimentados con altos niveles de grasas lácteas respecto al grupo S30 (**Figura 27b**).

Figura 27- Relación porcentual: ácido palmitoleico/ácido palmítico (a) y ácido oleico/ácido esteárico (b) en tejido adiposo epididimal



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

3- Parámetros asociados a la regulación de los TAG hepáticos

Los niveles de TAG hepáticos dependen de los lípidos dietarios, de los lípidos provenientes de tejidos extrahepáticos, de la síntesis endógena y catabolismo hepático, y finalmente de la capacidad de exportación a la circulación como TAG-pre- β -lipoproteínas.

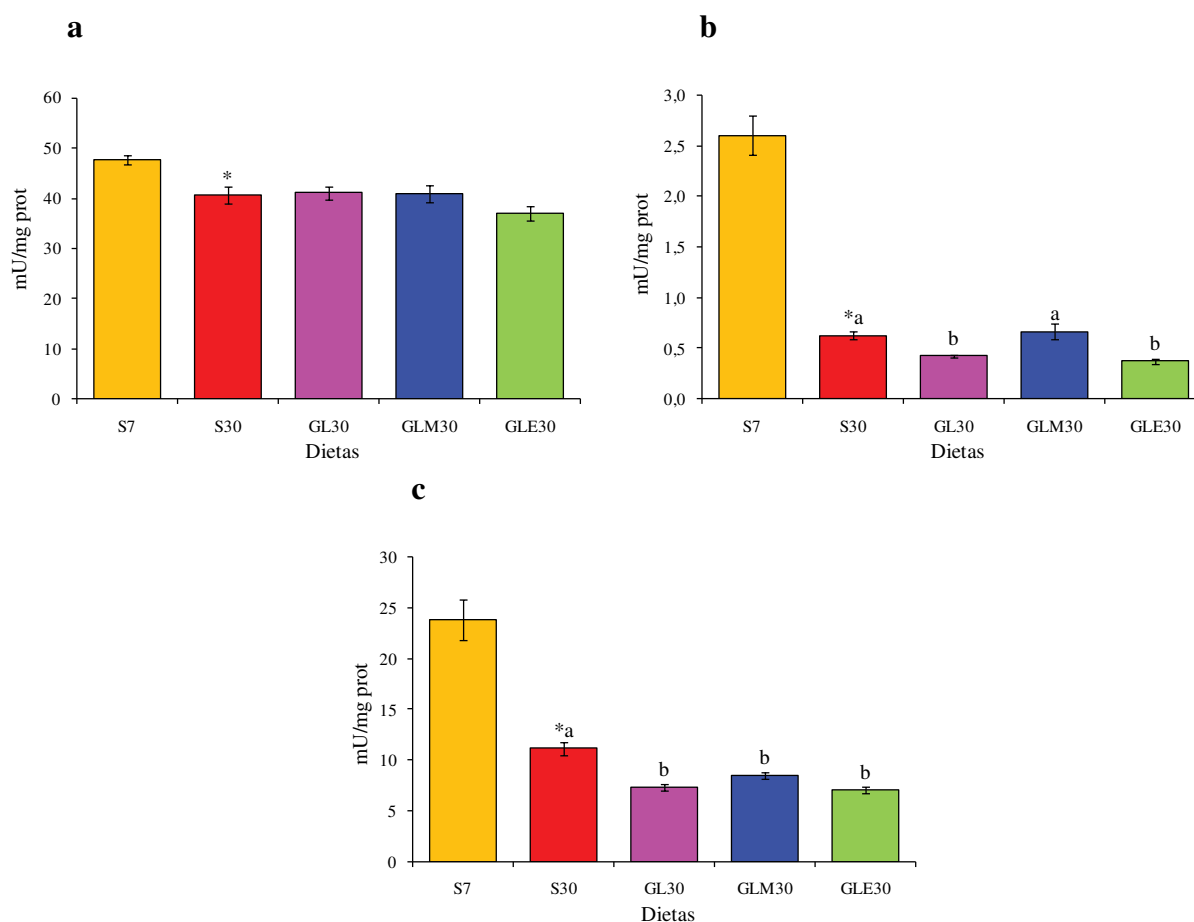
3.1- Lipogénesis en hígado

3.1.1- Actividades de enzimas lipogénicas

En la síntesis *de novo* de AG en hígado están implicadas diversas enzimas, entre ellas resulta clave destacar: ACC, FAS y G6PDH. Las mismas son determinantes de los niveles y disponibilidad de AG para su posterior esterificación, depósito, utilización o secreción al torrente sanguíneo.

La actividad hepática de la enzima ACC presentó un descenso significativo al incrementar el nivel de grasa; sin embargo, no se observaron diferencias entre las dietas a altos niveles (**Figura 28a**). El análisis estadístico para datos independientes mostró que la actividad de la enzima FAS disminuyó significativamente en la dieta S30. A elevados niveles de grasa dietaria, los grupos GL30 y GLE30 presentaron los menores niveles en dicha actividad enzimática (**Figura 28b**). La actividad de la G6PDH también sufrió un marcado descenso al aumentar el nivel de grasa, este efecto se magnificó de igual medida en las 3 dietas con grasas lácteas (**Figura 28c**).

Figura 28- Actividad de enzimas acetil-CoA carboxilasa (a), sintasa de ácidos grasos (b) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (c) en hígado



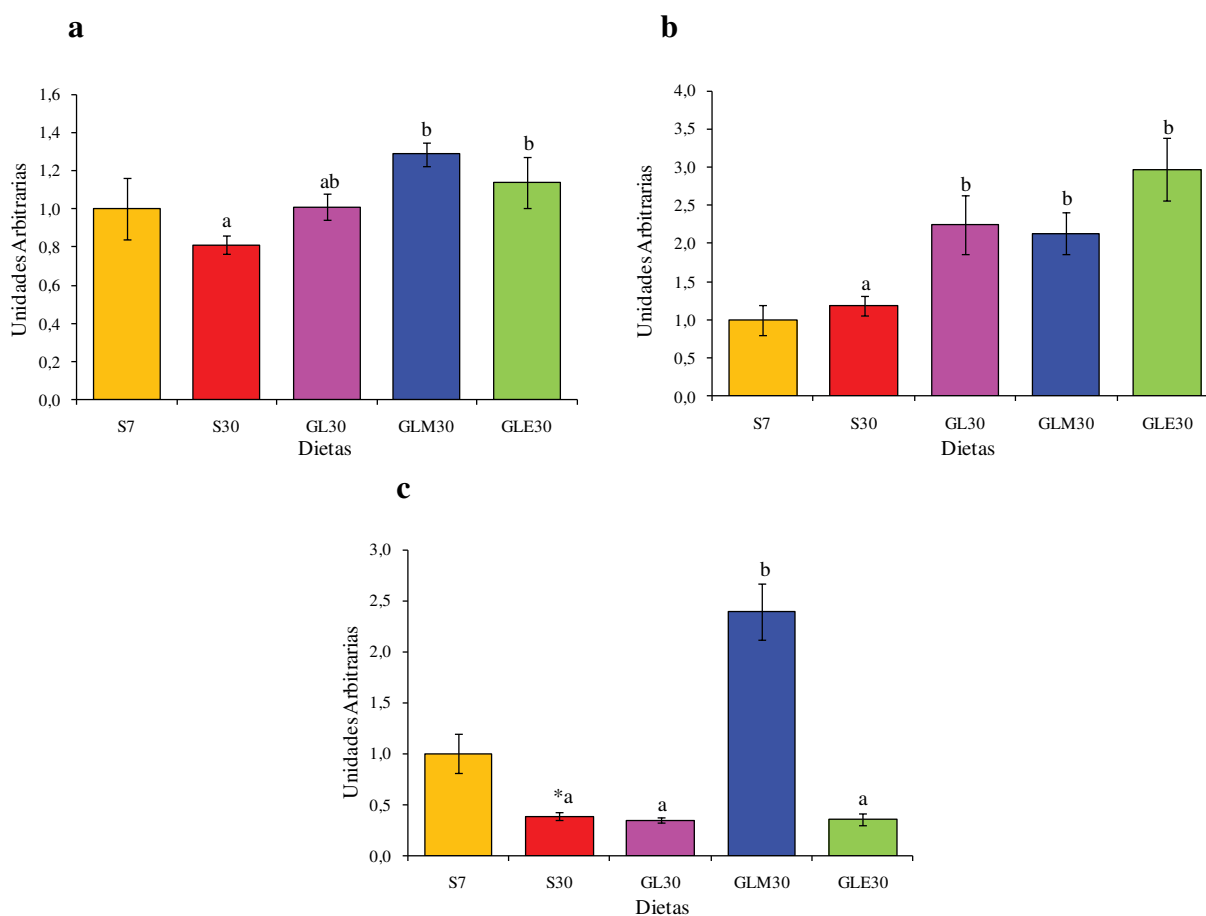
Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

3.1.2- Expresión de enzimas y reguladores de la síntesis de lípidos en hígado

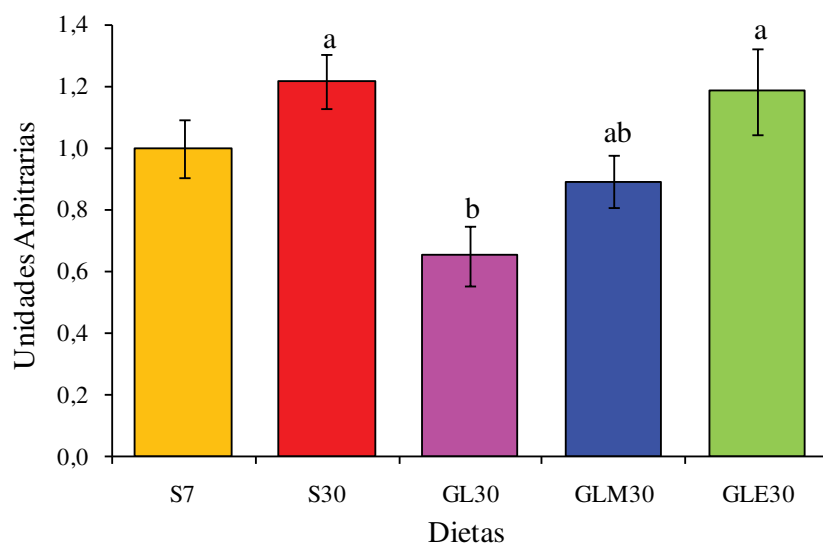
Se evaluaron las expresiones génicas de algunas enzimas y factores de transcripción claves responsables de la síntesis de AG y TAG: *Acc*, *Fas*, *Scd1*, *Dgat2*, *Srebp1a*, *Srebp1c* y *Lxr α* . Los niveles de ARNm de las enzimas lipogénicas se muestran en la **Figura 29 (a, b y c)**. Específicamente, la expresión génica de *Scd1* disminuyó por el nivel de grasa dietaria. Respecto al grupo S30, la GLM30 incrementó los niveles de ARNm de las tres enzimas lipogénicas evaluadas, mientras que la GL30 aumentó la expresión génica de la enzima FAS y la GLE30 para las enzimas ACC y FAS.

La expresión génica de la enzima DGAT, involucrada en la síntesis de TAG no presentó cambios al aumentar el nivel de grasa, mientras que a altos niveles de grasa descendió significativamente sólo en los animales alimentados con GL30 (**Figura 30**).

Figura 29- Niveles de ARNm de acetil-CoA carboxilasa (a), sintasa de ácidos grasos (b) y estearoil-CoA desaturasa (c) en hígado

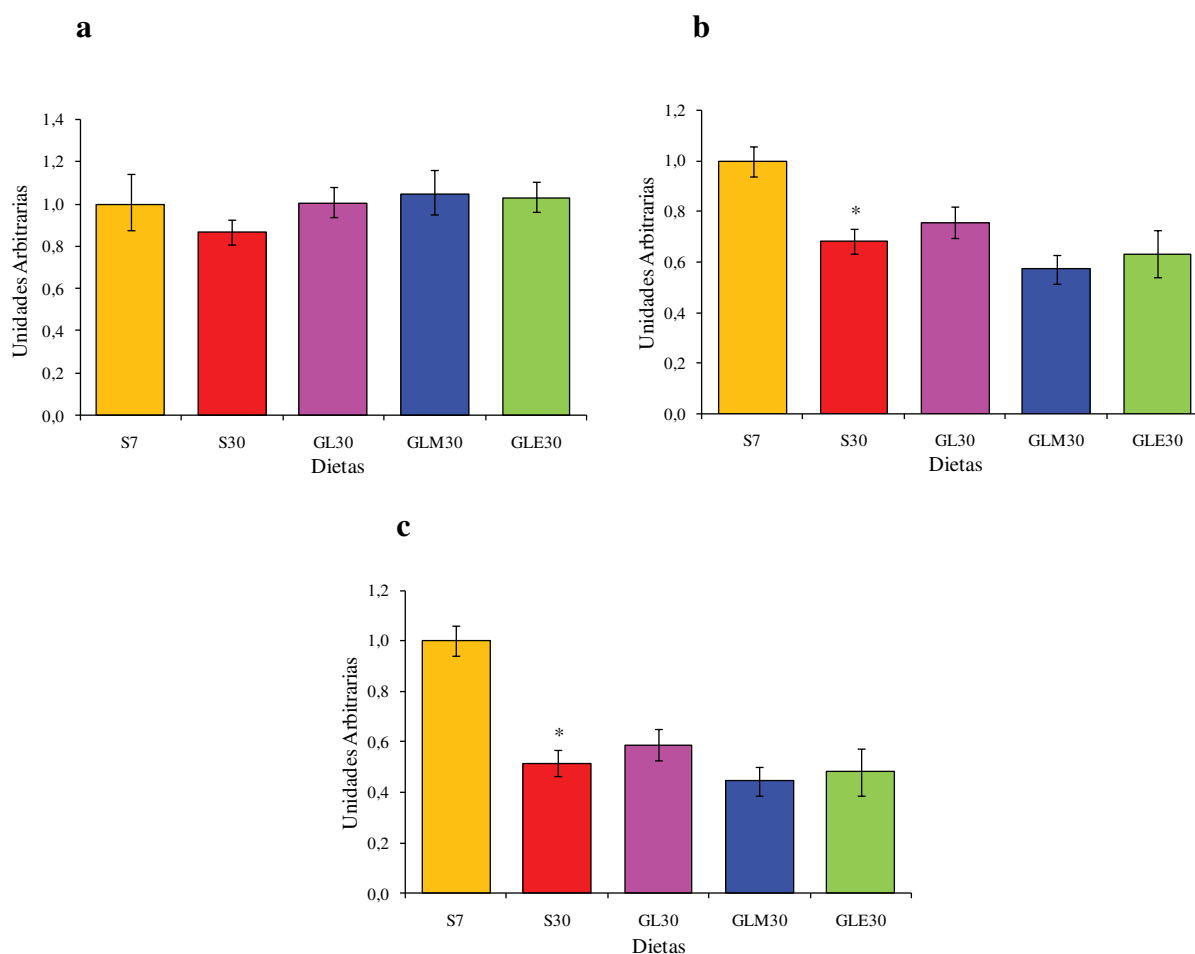


Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's

Figura 30- Niveles de ARNm de diacilglicerol aciltransferasa en hígado

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Los factores de transcripción LXR α y SREBP-1a intervienen sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de AG, colesterol y TAG; mientras que el SREBP-1c sólo participa en la transcripción de genes involucrados en la regulación de la lipogénesis. Los niveles de ARNm de SREBP-1a y SREBP-1c disminuyeron significativamente con el incremento del nivel de grasa dietaria, mientras que no presentaron cambios en el LXR α . A elevados niveles de grasa, los tres tipos de grasas lácteas no mostraron diferencias significativas respecto a S30 (**Figura 31**).

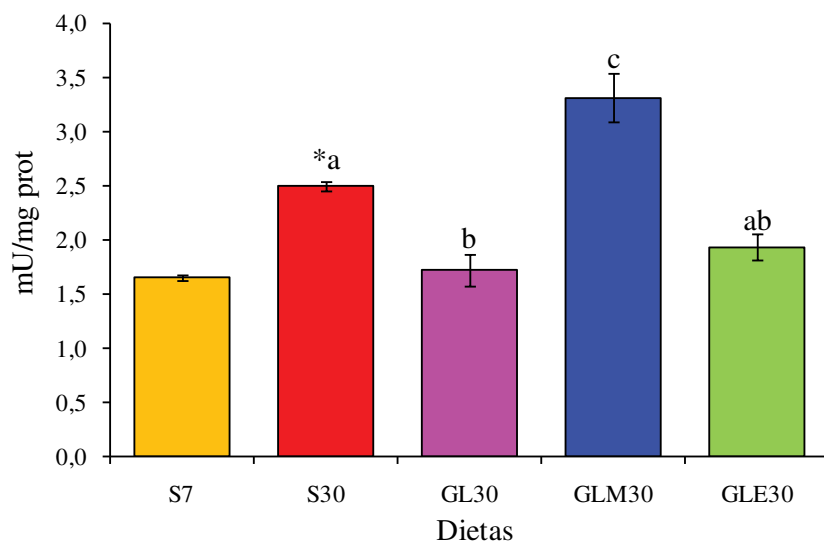
Figura 31- Niveles de ARNm de LXR α (a), SREBP-1a (b) y SREBP-1c (c) en hígado

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student.

3.2- Oxidación de ácidos grasos

3.2.1- Actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa-1a en hígado

La actividad de la enzima CPT-1a, enzima clave de la β -oxidación, mostró un incremento significativo en el grupo S30 respecto del control S7. A elevados niveles de grasas la actividad de dicha enzima, incrementó en el grupo GLM30, y disminuyó en el grupo GL30, respecto al grupo S30 (**Figura 32**).

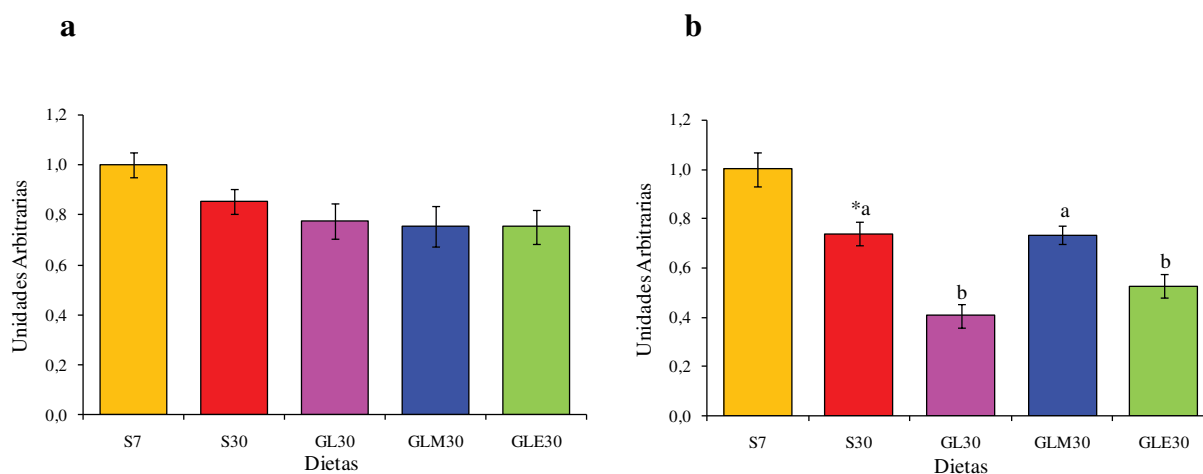
Figura 32- Actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa-1a en hígado

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

3.2.2- Expresión de enzimas y reguladores de la oxidación de ácidos grasos en hígado

Los niveles hepáticos de ARNm de la enzima CPT-1a (β -oxidación mitocondrial) no mostraron diferencias estadísticas por ningún tratamiento dietario. Mientras que la expresión génica de la enzima ACOX1 (β -oxidación peroxisomal) en hígado presentó un descenso por el elevado contenido graso, el cual fue aún más acentuado en los animales correspondientes a los grupos GL30 y GLE30 (**Figura 33a y b**).

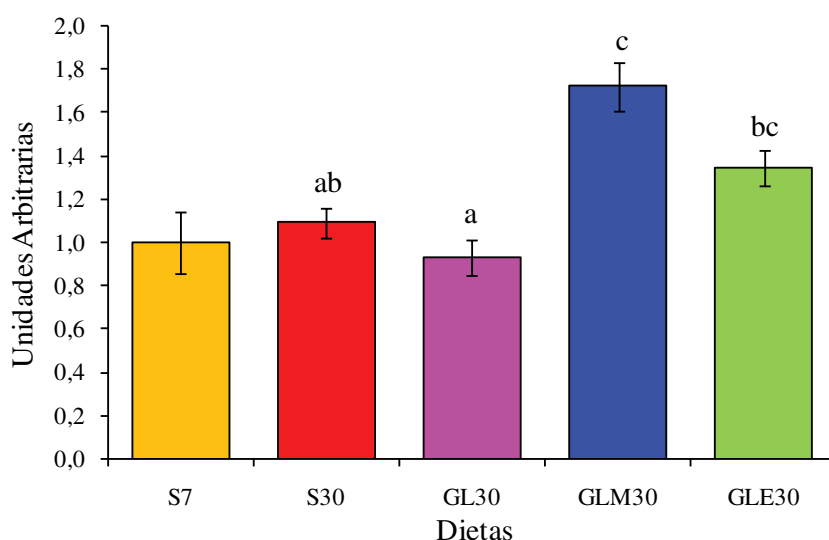
Figura 33- Niveles de ARNm de carnitina palmitoil transferasa-1a (a) y acil-CoA oxidasa 1 (b) en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Con respecto a los factores de transcripción asociados a las enzimas involucradas en la β -oxidación de AG, se evaluó la expresión génica hepática del *Ppara*. La expresión de este factor de transcripción mostró un aumento significativo sólo para el grupo GLM30 (**Figura 34**).

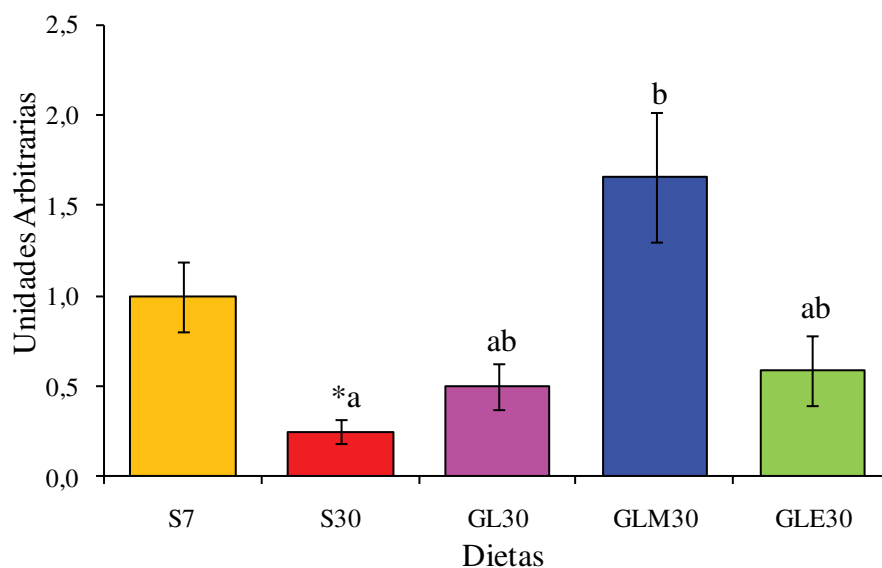
Figura 34- Niveles de ARNm de PPAR α en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Otro paso metabólico en la oxidación de sustratos en hígado está regulado por el receptor de adiponectina (AdipoR2). La expresión génica de dicho receptor, estuvo significativamente disminuido por el nivel de grasa dietaria y mostró un significativo incremento en los animales alimentados con GLM30 (**Figura 35**).

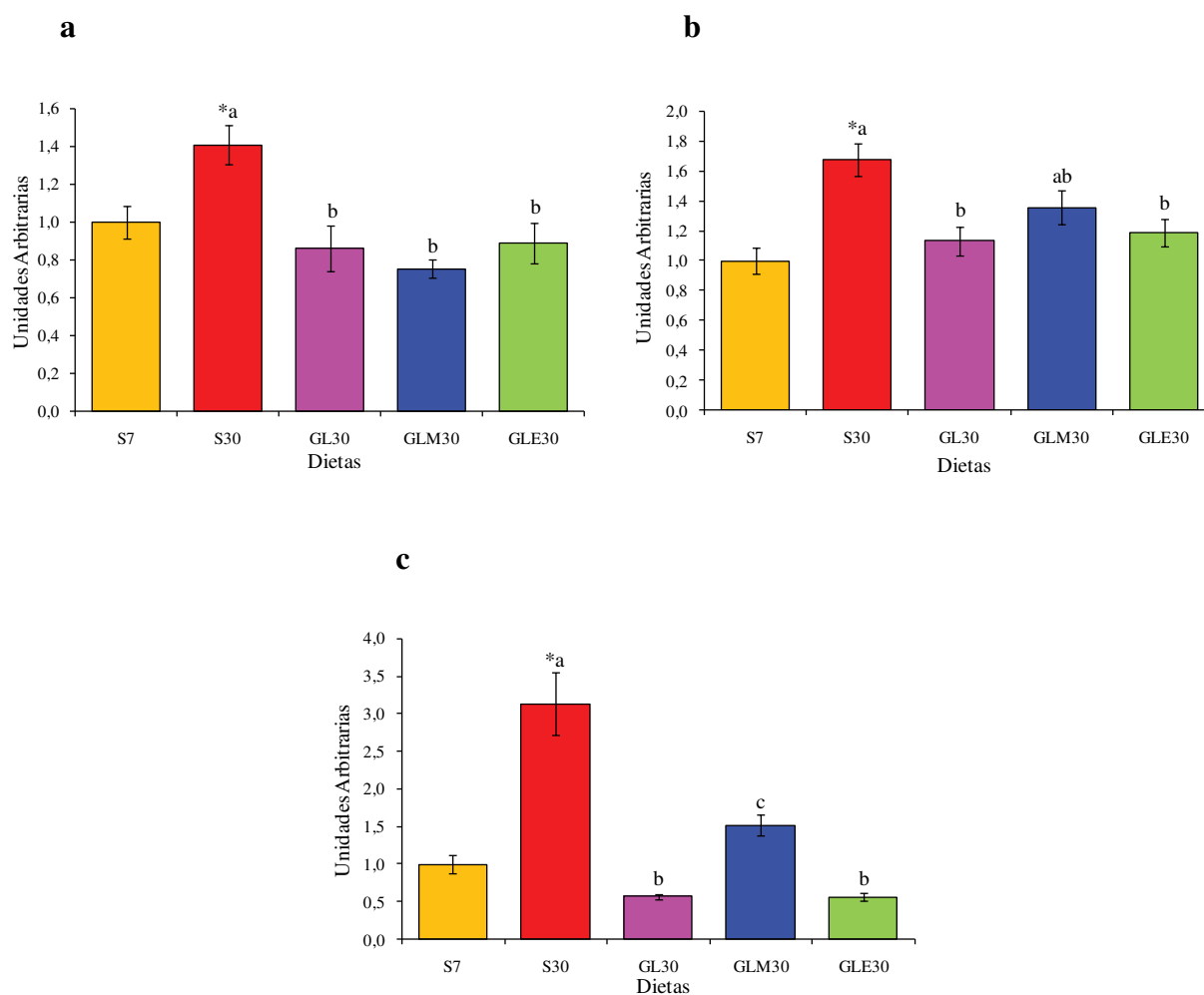
Figura 35- Niveles de ARNm de AdipoR2 en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's

3.3- Proteínas transportadoras de ácidos grasos en hígado

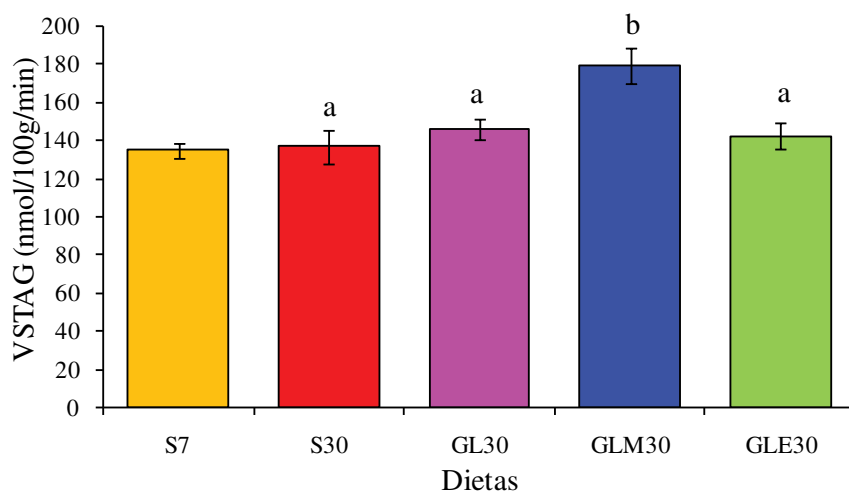
Se midieron los niveles de ARNm de las proteínas transportadoras de ácidos grasos de cadena larga: FATP2 y FATP5, además de la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36). Los mismos muestran un aumento en los animales alimentados con S30. A altos niveles de grasa se observó una disminución de dichas expresiones génicas por los tratamientos con las distintas grasas lácteas. El grupo GLM30 mostró un menor descenso en la expresión del ARNm de CD36 al comparar con las otras grasas lácteas (**Figura 36a, b y c**).

Figura 36- Niveles de ARNm de FATP2 (a), FATP5 (b) y CD36 (c) en hígado

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

3.4- Secreción hepática *in vivo* de TAG-pre- β -lipoproteínas

La velocidad de secreción de TAG (VSTAG), no sufrió cambios al aumentar el nivel de grasa, no obstante, se observó un incremento de este parámetro en los animales que ingirieron la dieta GLM30 (Figura 37).

Figura 37- Velocidad de secreción hepática de TAG

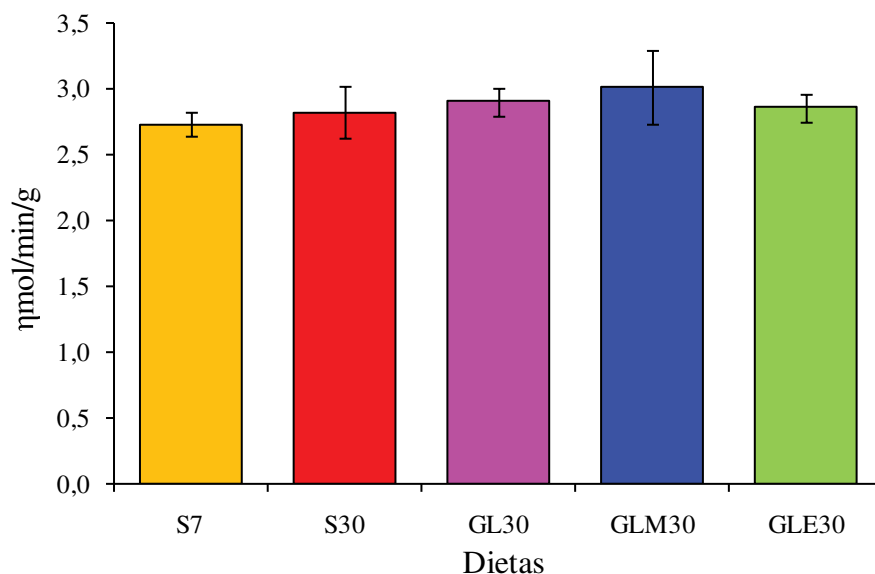
Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

4- Parámetros asociados a la regulación de los TAG en músculo

El músculo es un tejido altamente oxidativo y participa en gran medida en la oxidación de glucosa y ácidos grasos. Para comprender los cambios en los niveles y posibles mecanismos involucrados en la regulación de TAG en este tejido, se determinaron diferentes parámetros cruciales en la vía de regulación de la oxidación de lípidos. Para ello, se evaluaron la capacidad de captación de AG mediante la enzima LPL, la participación del receptor de adiponectina (expresión de AdipoR1) y la expresión de la enzima clave involucrada en la β -oxidación de ácidos grasos (CPT-1b).

4.1- Captación de ácidos grasos en músculo gastrocnemio

La capacidad de captación de AG transportados en las TAG-pre- β -lipoproteínas es regulada, principalmente, por la actividad de la enzima LPL muscular, la cual a la vez, es clave en el proceso de clarificación de los TAG circulantes en condiciones de ayuno. La actividad de la enzima LPL en músculo gastrocnemio, no se vio afectada por el nivel, ni por el tipo de grasa dietaria (**Figura 38**).

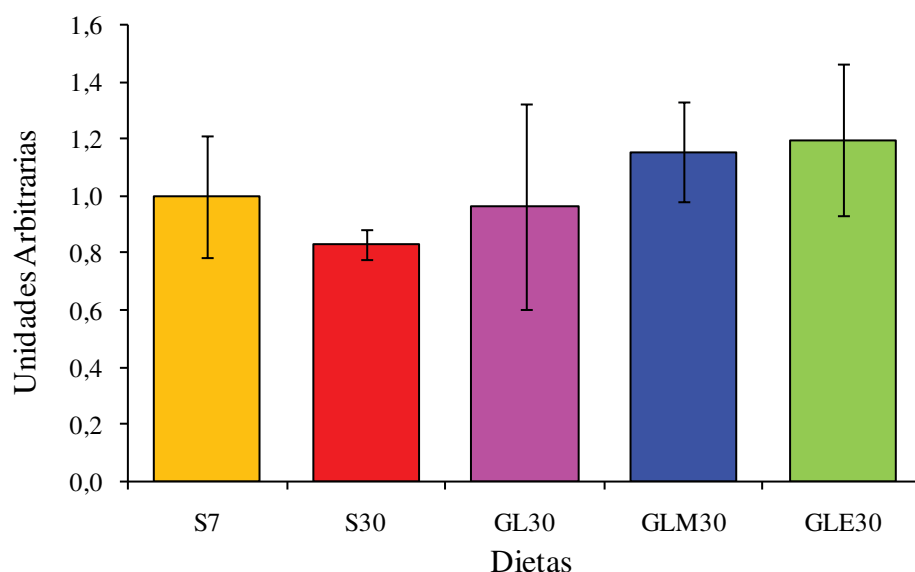
Figura 38- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa por gramo de músculo gastrocnemio

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS.

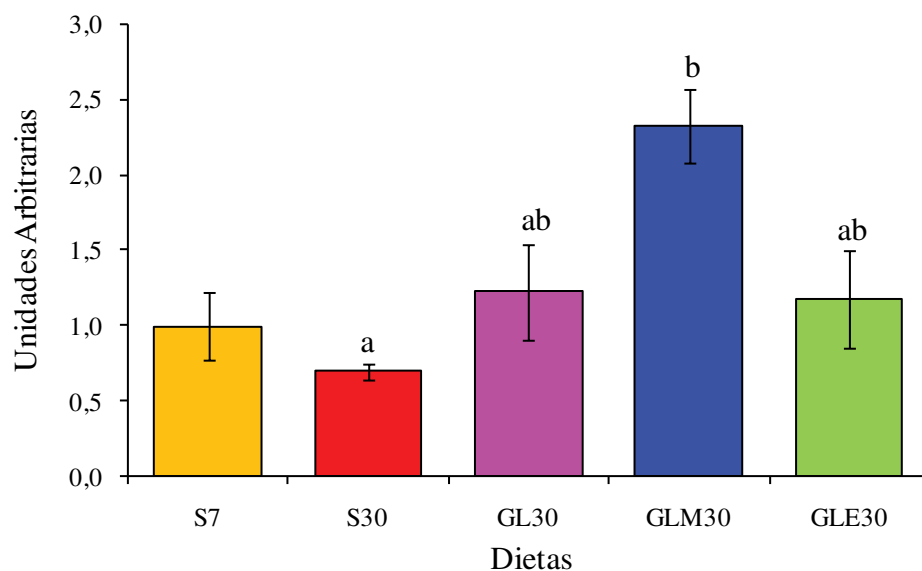
4.2- Oxidación de ácidos grasos

4.2.1- Expresión de la enzima CPT-1b y del receptor de adiponectina en músculo

En la **Figura 39** se puede observar que la expresión génica de *Cpt-1b* no mostró diferencias significativas con ningún tratamiento dietario. Mientras que los niveles de ARNm del receptor de adiponectina (AdipoR1) no fueron modificados en S30 (*vs* S7) e incrementaron significativamente en los animales alimentados con GLM30 (**Figura 40**).

Figura 39- Niveles de ARNm de carnitina palmitoil transferasa-1b en músculo

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS.

Figura 40- Niveles de ARNm del receptor de adiponectina en músculo

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

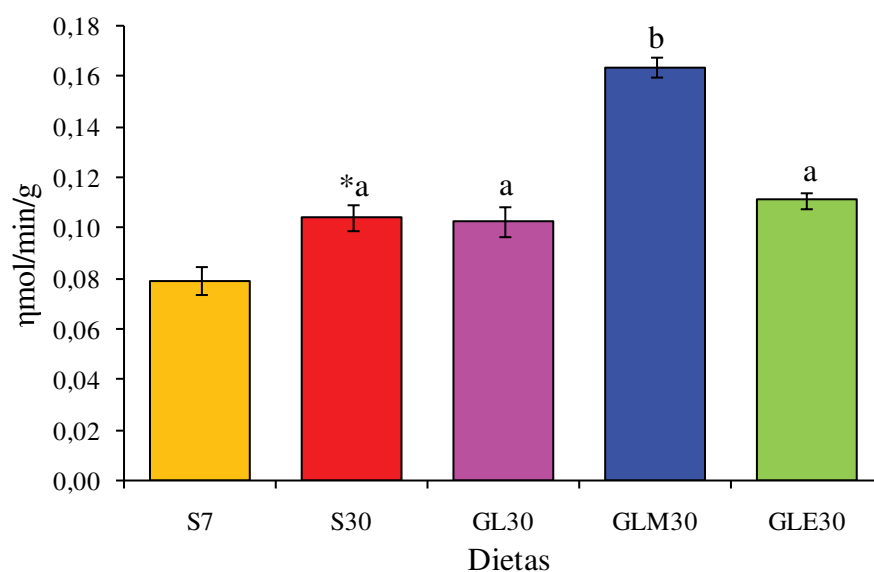
5- Parámetros asociados a la regulación de los TAG en tejido adiposo

Una de las funciones importantes del tejido adiposo blanco es la de depositar TAG para reserva y disponer de los mismos cuando el organismo lo requiere. El almacenamiento de TAG es consecuencia, principalmente, de los lípidos que puede captar de la circulación y en menor medida de los que sintetiza a partir de precursores energéticos. Se evaluó la actividad de la enzima LPL de tejido adiposo epididimal y la expresión de las enzimas SCD1 y DGAT. Asimismo, fue cuantificada la expresión génica de la primera enzima encargada de la lipólisis de TAG, y de enzimas involucradas en la oxidación (CPT-1a y ACOX1).

5.1- Captación de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

Altos niveles de grasa dietaria incrementaron la actividad de la enzima LPL en TAE y dicho aumento fue exacerbado en los animales alimentados con GLM30 (**Figura 41**).

Figura 41- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en TAE

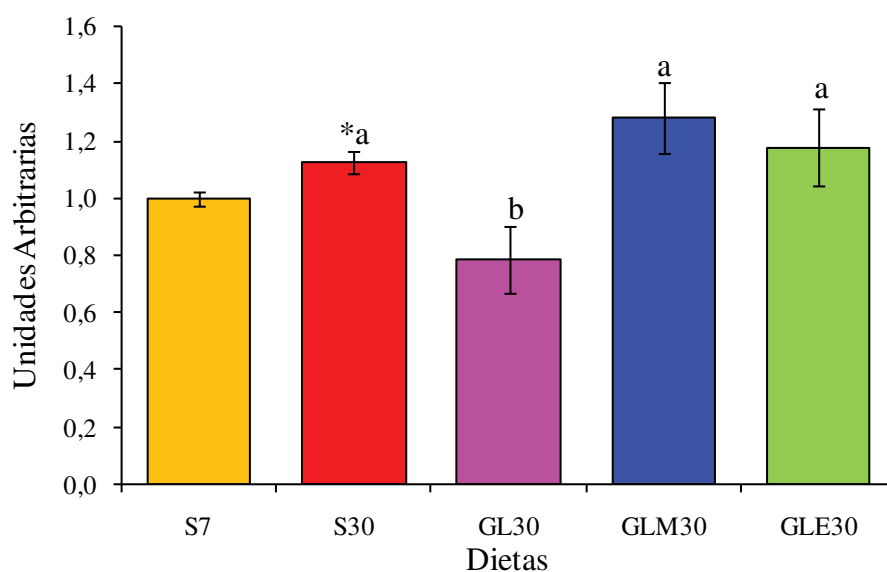


Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's

5.2- Translocasa de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

Los niveles de ARNm de la translocasa CD36 se incrementaron en la dieta S30 al compararse con el grupo control; mientras que a elevados niveles de grasa dietaria, la GL30 disminuyó la expresión génica de dicho transportador (**Figura 42**).

Figura 42- Niveles de ARNm de CD36 en TAE

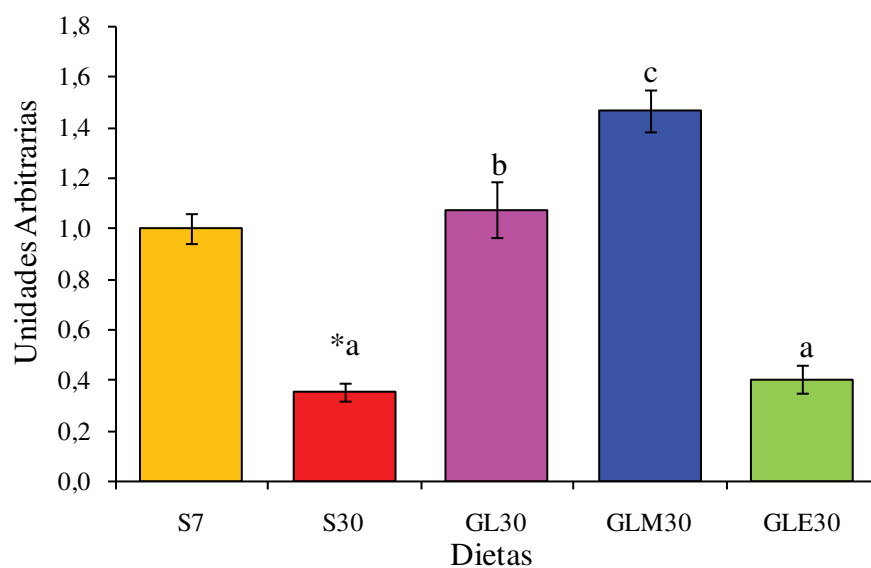


Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

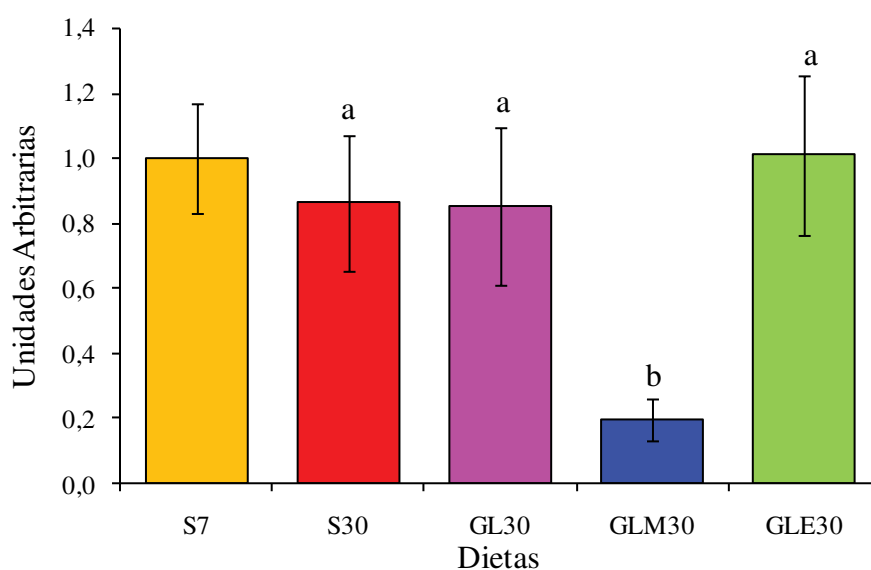
5.3- Síntesis de lípidos en tejido adiposo epididimal

La expresión génica de *Scd1* implicada en la síntesis de AG mostró un descenso estadísticamente significativo en el grupo S30. Mientras que a elevados niveles de grasa láctea, el grupo GL30 y en mayor medida el GLM30 incrementaron la expresión génica de dicha enzima (**Figura 43**).

Los niveles de ARNm de la enzima DGAT, involucrada en la síntesis de triacilglicéridos no mostraron cambios al incrementar los niveles de grasa dietaria y descendieron significativamente en los animales alimentados con dieta GLM30 (**Figura 44**).

Figura 43- Niveles de ARNm de estearoil-CoA desaturasa en TAE

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's

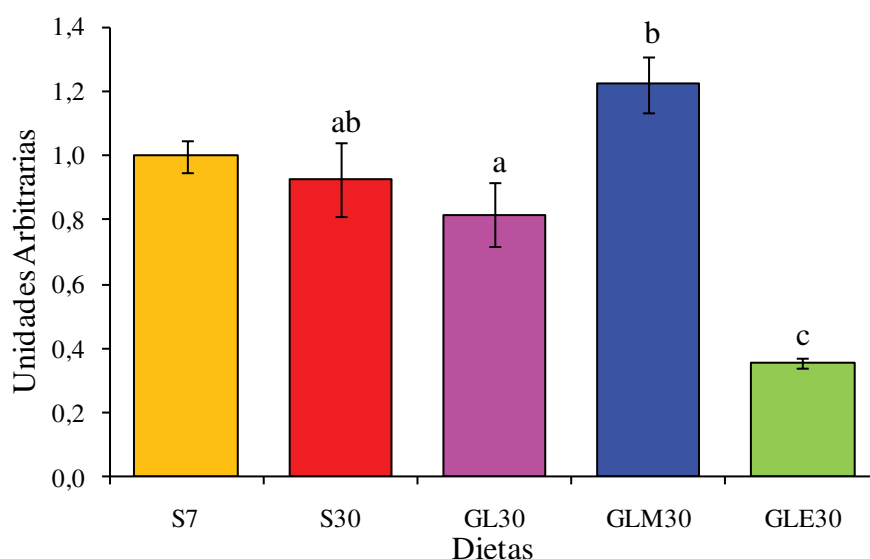
Figura 44- Niveles de ARNm de diacilglicerol aciltransferasa en TAE

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

5.4- Expresión de la enzima adiposo triglicérido lipasa en tejido adiposo epididimal

En el estudio de los niveles de ARNm de la enzima adiposo triglicérido lipasa (ATGL), una de las enzimas vinculadas a la lipólisis de TAG en TAE, no se observaron diferencias por el nivel de grasa dietaria, denotando cambios por el tipo de grasa dietaria. Específicamente, en los animales alimentados con GLE30 se observó un descenso significativo al comparar con S30; y entre las dietas conteniendo grasas lácteas se observó que los niveles de ARNm de la enzima ATGL, mostraron que GLM30 > GL30 > GLE30 (**Figura 45**).

Figura 45- Niveles de ARNm de adiposo triglicérido lipasa en TAE

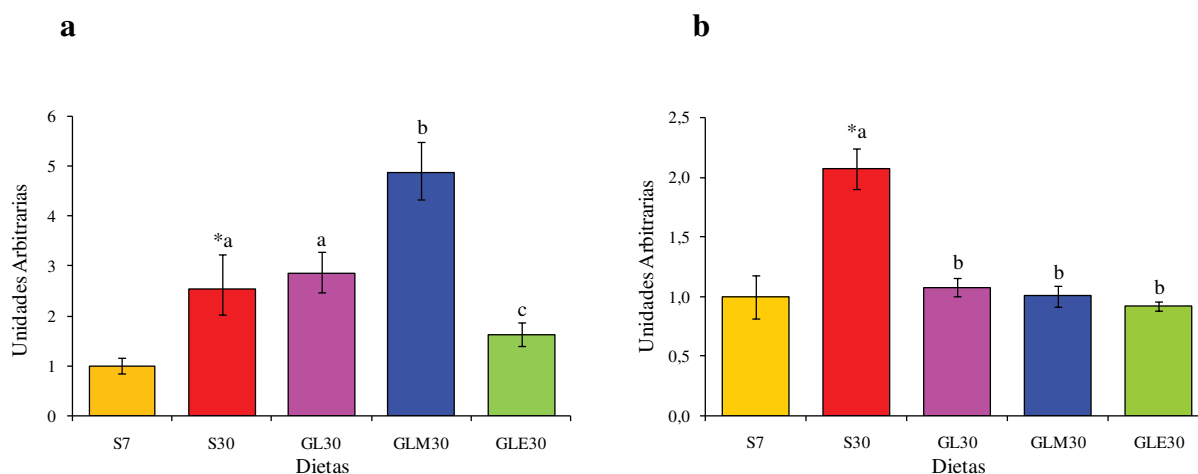


Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

5.5- Oxidación de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

Relacionado a la oxidación de AG en TAE, las expresiones génicas de la enzimas CPT-1a (β -oxidación mitocondrial) y ACOX1 (β -oxidación peroxisomal) mostraron un incremento significativo al aumentar el nivel de grasa. Sin embargo, a altos niveles de grasa dietaria la expresión génica de *Cpt-1a*, aumento en los animales alimentados con la dieta GLM30 y disminuyó en el grupo GLE30. Por otra parte, los niveles de ARNm de la ACOX1 descendieron independientemente del tipo de grasa láctea (**Figura 46a y b**).

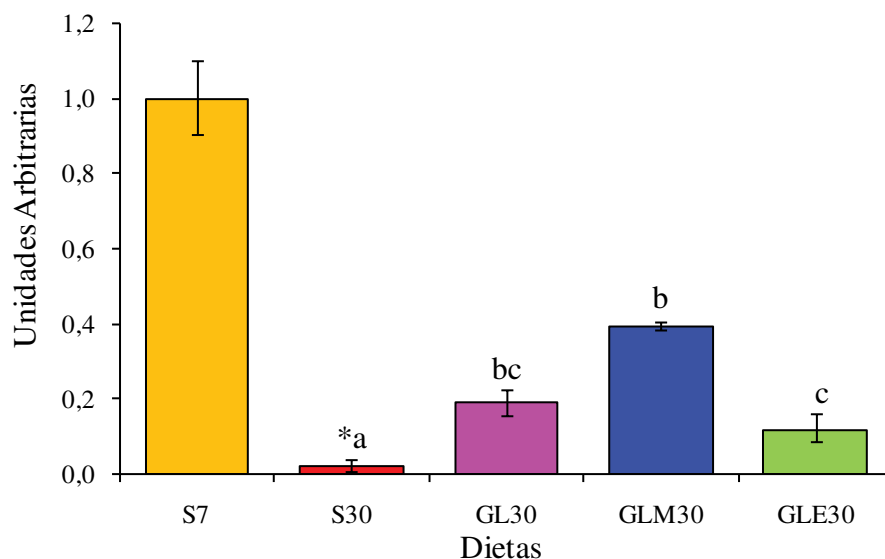
Figura 46- Niveles de ARNm de carnitina palmitoil transferasa-1a (a) y acil-CoA oxidasa 1 (b) en TAE



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

5.6- Expresión de adiponectina en tejido adiposo epididimal

Los niveles de ARNm de adiponectina en los animales tratados con S30 disminuyeron significativamente por el aumento de grasa dietaria (S30 vs S7). Dichos valores incrementaron parcialmente por el tratamiento con dietas conteniendo grasa láctea, alcanzando niveles más acentuados en aquellos animales alimentados con GLM30 (**Figura 47**).

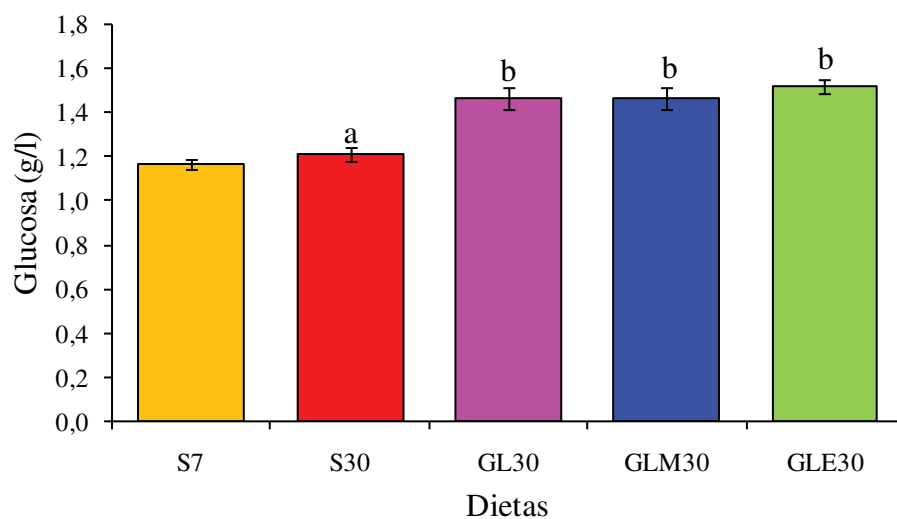
Figura 47- Niveles de ARNm de adiponectina en TAE

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

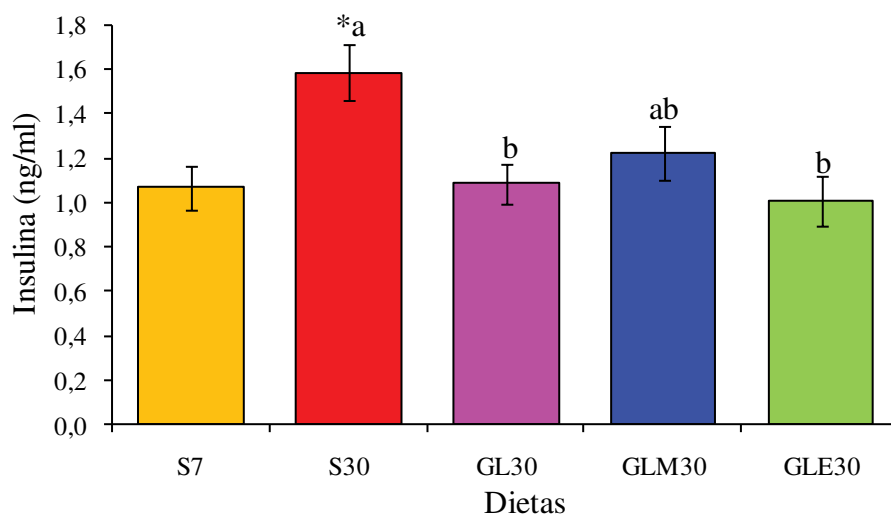
6- Metabolismo glucídico

6.1- Concentración de glucosa e insulina circulantes

Los niveles de glucosa plasmática no fueron modificados por el consumo de altos niveles de aceite de soja. No obstante, se observó un incremento de la glucemia independientemente del tipo de grasa láctea empleada (**Figura 48**). El contenido de insulina circulante presentó un incremento significativo a altos nivel de grasa. Los animales alimentados con grasas lácteas disminuyeron dichos niveles, alcanzando diferencias significativas en los grupos GL30 y GLE30 (**Figura 49**).

Figura 48- Niveles plasmáticos de glucosa

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Figura 49- Niveles plasmáticos de insulina

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

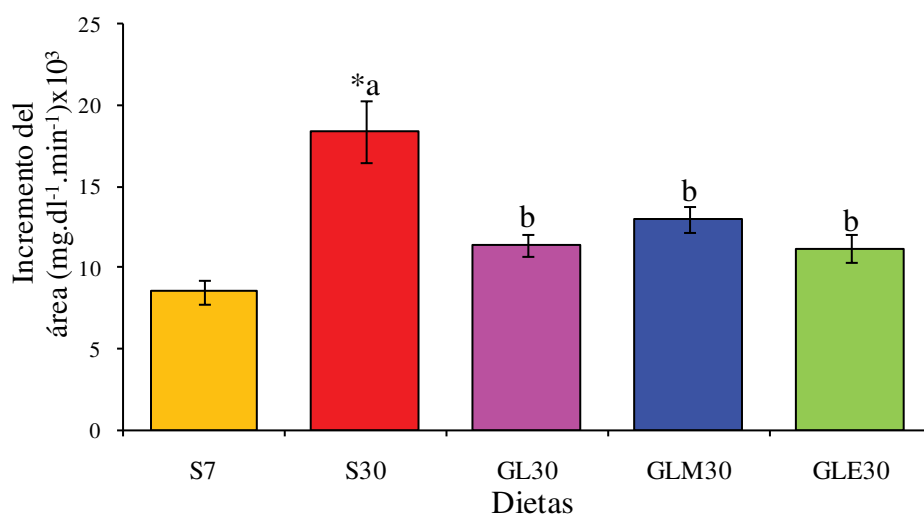
6.2- Utilización de la glucosa

El grado de utilización de la glucosa se evaluó a través del test de tolerancia oral a la glucosa, asimismo se estimó el índice HOMA.

Los animales alimentados con dieta S30 mostraron una reducida utilización de la glucosa, expresada por un incremento en el área bajo la curva de glucosa vs tiempo ante la sobrecarga oral de glucosa. Este parámetro mostró un significativo descenso independientemente del tipo de grasa láctea dietaria (**Figura 50**).

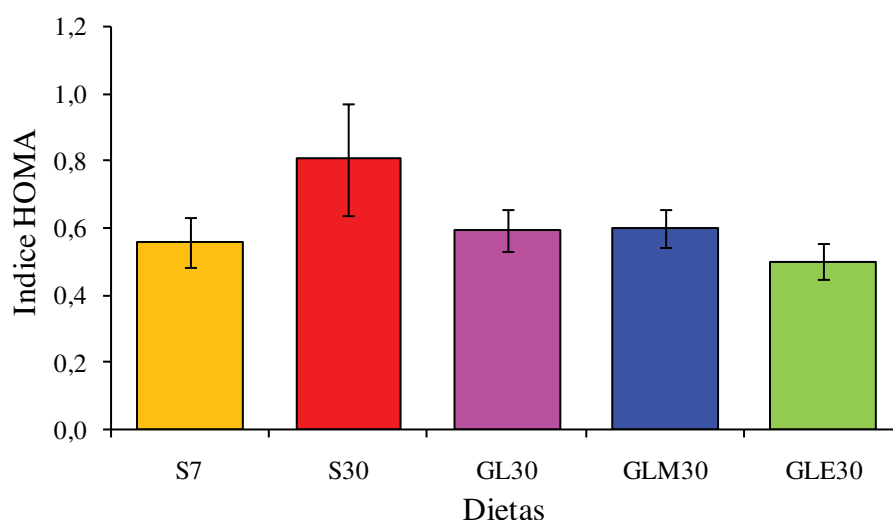
A partir de los niveles de glucosa e insulina en ayunas se estimó el índice HOMA, el cual no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos dietarios, tanto por el nivel, como por el tipo de grasa dietaria (**Figura 51**). Sólo se observó una cierta tendencia a niveles más elevados en el grupo S30.

Figura 50- Área bajo la curva respecto a su valor basal



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Figura 51- Índice HOMA



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS.

6.3- Regulación del metabolismo de la glucosa en hígado

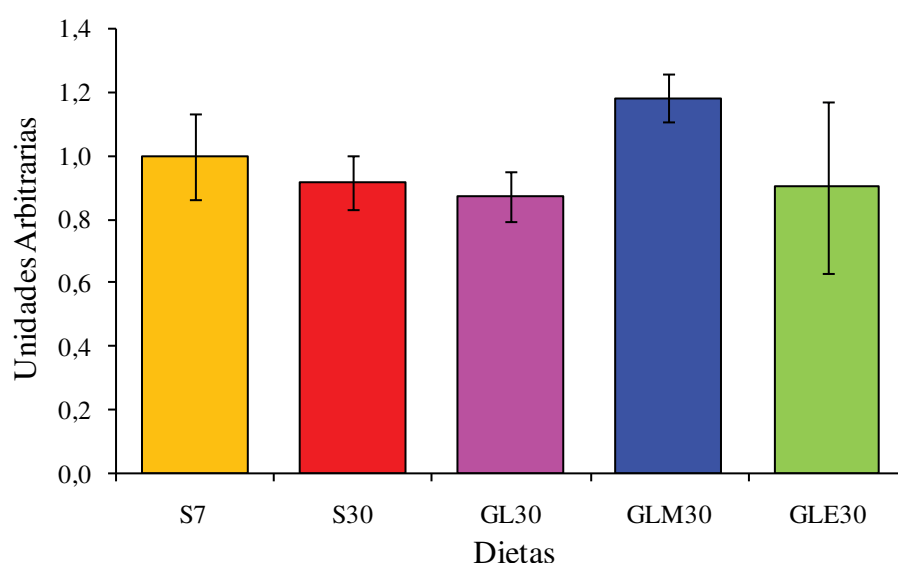
Los resultados de los niveles de metabolitos hepáticos relacionados a la degradación de la glucosa y síntesis de glucógeno (**Tabla 9**) muestran que el incremento de grasa dietaria (S30 vs S7) se correlacionó con una disminución significativa de los niveles de glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato, en paralelo con un incremento en los niveles de glucógeno. Los animales alimentados con GLE30 presentaron los menores niveles de fructosa 6-fosfato y de glucógeno respecto a los demás grupos que consumieron dietas ricas en grasa. La relación glucosa 6-fosfato/glucosa, medida del flujo a través de la enzima glucoquinasa, mostró una disminución significativa por el nivel de grasa dietaria.

Tabla 9- Contenido y relaciones de metabolitos hepáticos

	Grupos Experimentales				
	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30
	μmol/g tejido hepático				
Glucosa	7,72±0,73	8,11±0,72	8,06±0,59	7,91±0,77	7,69±0,83
Glucosa 6-fosfato	2,41±0,14	1,49±0,14*	1,46±0,17	1,39±0,10	1,57±0,26
G-6-P/Glucosa	0,35±0,03	0,23±0,02*	0,23±0,03	0,17±0,03	0,31±0,07
Fructosa 6-fosfato	1,58±0,12	1,21±0,14 ^{ab}	1,54±0,64 ^a	1,17±0,62 ^{ab}	0,79±0,49 ^b
Glucosa 1-fosfato	1,24±0,20	1,61±0,15	1,15±0,24	1,32±0,32	1,61±0,26
Glucógeno	248,1±4,4	303,0±8,9 ^a	316,2±15,6 ^a	266,1±11,5 ^{ab}	247,1±16,5 ^b
Citrato	0,48±0,12	0,72±0,19	0,47±0,10	0,65±0,11	0,74±0,11

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Los niveles de cada metabolito son expresados en μmol/g de tejido húmedo. S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Además del factor de transcripción SREBP-1c, mencionado anteriormente, se evaluaron los niveles de ARNm del ChREBP. Como puede observarse en la **Figura 52**, la expresión génica de dicho regulador no se modificó por el nivel, ni por el tipo de grasa dietaria.

Figura 52- Niveles de ARNm de ChREBP en hígado

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS.

6.4- Regulación del metabolismo de la glucosa en músculo gastrocnemio

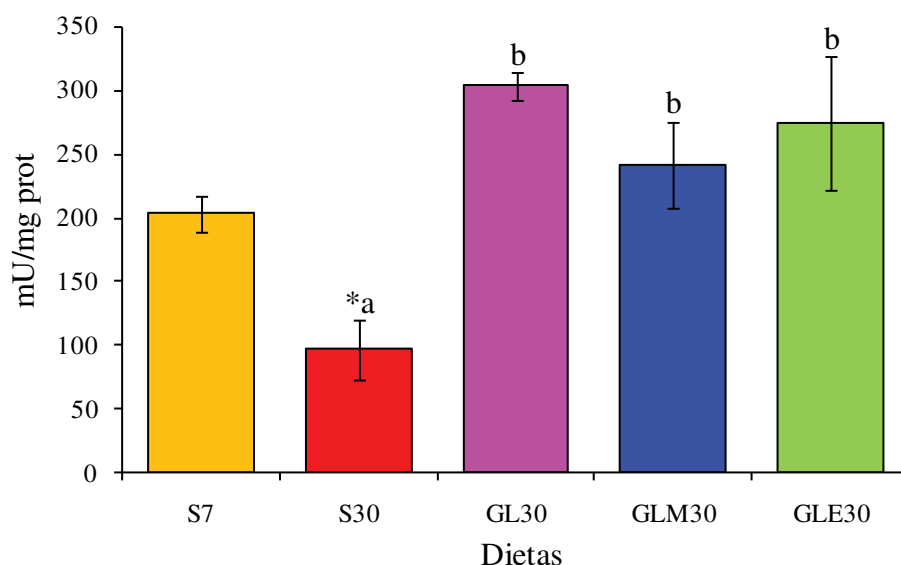
En músculo esquelético (**Tabla 10**) se observó que el incremento de grasa dietaria estuvo asociado a un aumento en los niveles de glucosa y citrato, y a una disminución en los niveles de glucosa 6- fosfato, fructosa 1,6-bifosfato y en el flujo a través de las enzimas fosfofructoquinasa-1 α (PFK-1 α) y hexoquinasa. Por otro lado, analizando el tipo de grasa dietaria se encontró una disminución en los niveles de citrato en GLM30 y GLE30 respecto a S30; y además se observó un incremento del flujo a través de PFK-1 α en GLM30.

Tabla 10- Contenido y relaciones de metabolitos en músculo gastrocnemio

	Grupos Experimentales				
	S7	S30	GL30	GLM30	GLE30
	$\mu\text{mol/g}$ de músculo				
Glucosa	1,43 \pm 0,17	3,02 \pm 0,33*	2,20 \pm 0,26	2,22 \pm 0,20	2,40 \pm 0,24
Glucosa 6-fosfato	2,43 \pm 0,20	1,78 \pm 0,17*	2,33 \pm 0,33	1,81 \pm 0,24	2,17 \pm 0,12
Fructosa 6-fosfato	1,77 \pm 0,12	1,59 \pm 0,12	1,79 \pm 0,11	1,55 \pm 0,07	1,54 \pm 0,07
Fructosa 1,6-bifosfato	0,94 \pm 0,12	0,61 \pm 0,09*	0,50 \pm 0,09	0,76 \pm 0,15	0,56 \pm 0,09
G-6-P/Glucosa	1,50 \pm 0,29	0,70 \pm 0,12*	0,96 \pm 0,09	0,86 \pm 0,09	0,98 \pm 0,09
F-1,6-P₂/F-6-P	0,72 \pm 0,07	0,37 \pm 0,05 ^a	0,29 \pm 0,06 ^a	0,79 \pm 0,18 ^b	0,39 \pm 0,02 ^a
Glucógeno	33,58 \pm 5,27	25,70 \pm 3,26	24,56 \pm 2,40	20,30 \pm 2,20	15,2 \pm 3,10
Citrato	0,82 \pm 0,17	1,46 \pm 0,13 ^a	1,29 \pm 0,25 ^{ab}	0,76 \pm 0,17 ^b	0,50 \pm 0,15 ^b

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Los niveles de cada metabolito son expresados en $\mu\text{mol/g}$ de tejido húmedo. S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

La actividad de la enzima PFK-1 α de músculo gastrocnemio de animales alimentados con las diferentes dietas experimentales es mostrada en la **Figura 53**. Como puede observarse, la actividad de la misma disminuyó en los animales tratados con S30 (vs S7). En cuanto a las dietas conteniendo altos niveles de grasa láctea, se observó un incremento de la actividad de dicha enzima independientemente del tipo de grasa láctea.

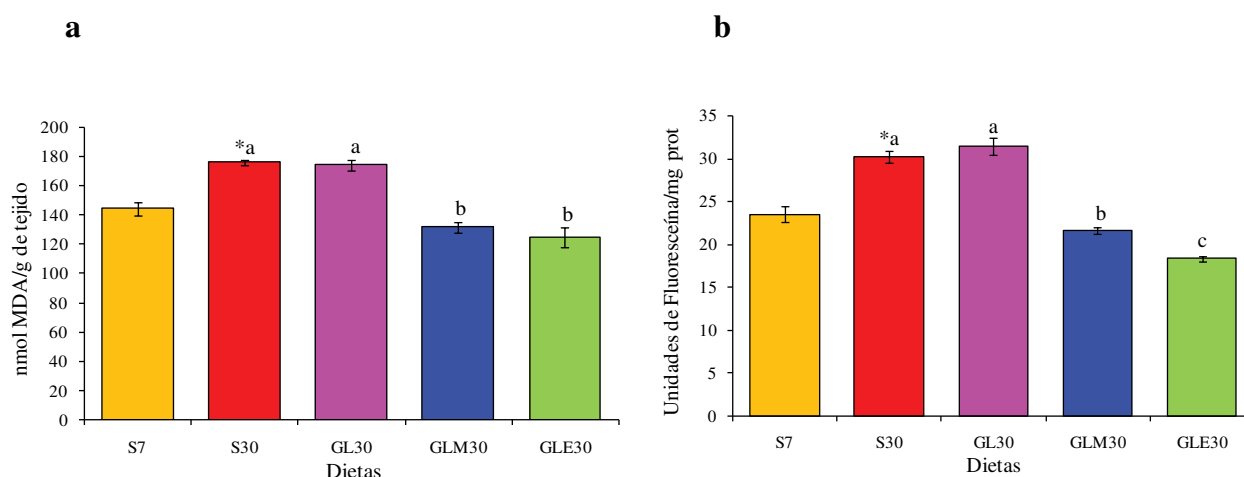
Figura 53- Actividad de la enzima PFK-1 α en músculo gastrocnemio

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

7- Estado oxidativo en hígado

7.1- Estado de lipoperoxidación hepático

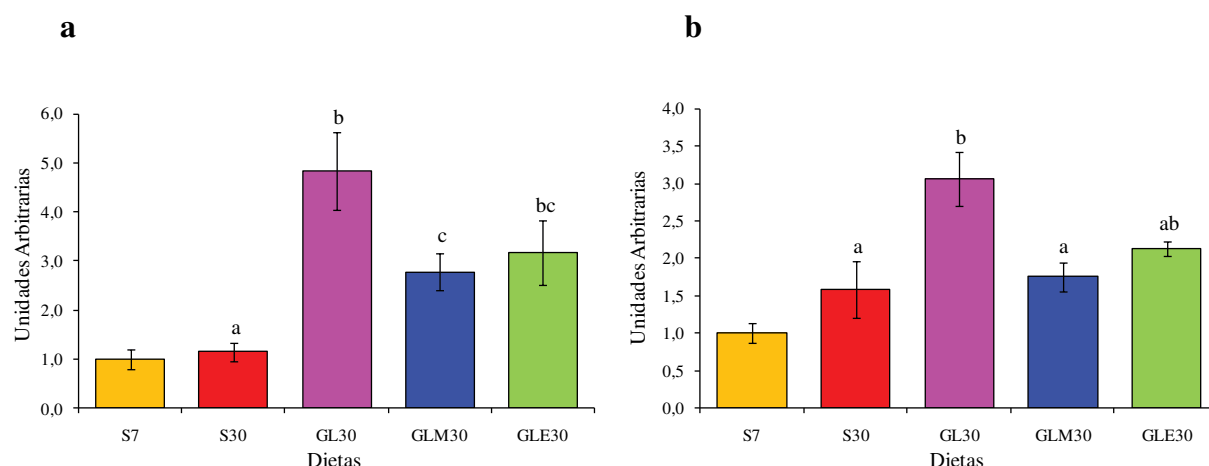
Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y las especies reactivas del oxígeno (ROS), parámetros indicativos del estado de peroxidación lipídica, aumentaron significativamente al incrementar el nivel de grasa en la dieta. A altos niveles de grasa dietaria, se observó una disminución de ambos parámetros en los grupos GLM30 y GLE30 (**Figura 54a y b**), y no en GL30.

Figura 54- Niveles de TBARS (a) y ROS (b) en hígado

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

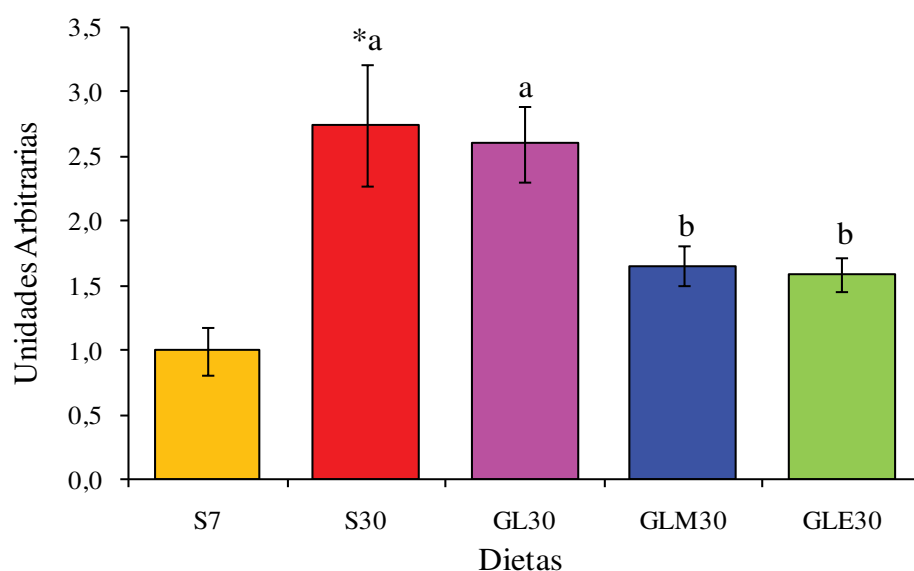
7.2- Citoquinas pro-inflamatorias y NF- κ B en hígado

Para profundizar el estudio del estado oxidativo hepático se midieron los niveles de ARNm de IL-6 y TNF α (Figura 55a y b). Ambas citoquinas no mostraron cambios en sus expresiones génicas por el incremento de los niveles de aceite de soja. Sin embargo, a elevados niveles de grasa, se observó un incremento de los niveles de ARNm de IL-6 por el consumo de dietas conteniendo grasas lácteas, siendo mayor para el grupo alimentado con GL30. Por otra parte, la expresión génica de *Tnfa* incrementó significativamente sólo en el grupo GL30.

Figura 55- Niveles de ARNm de IL-6 (a) y TNF α (b) en hígado

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Los niveles hepáticos de ARNm del factor nuclear kappa β aumentaron en el grupo S30. Mientras que, en los grupos GLM30 y GLE30, la expresión génica descendió significativamente (Figura 56).

Figura 56- Niveles de ARNm de NF- $\kappa\beta$ en hígado

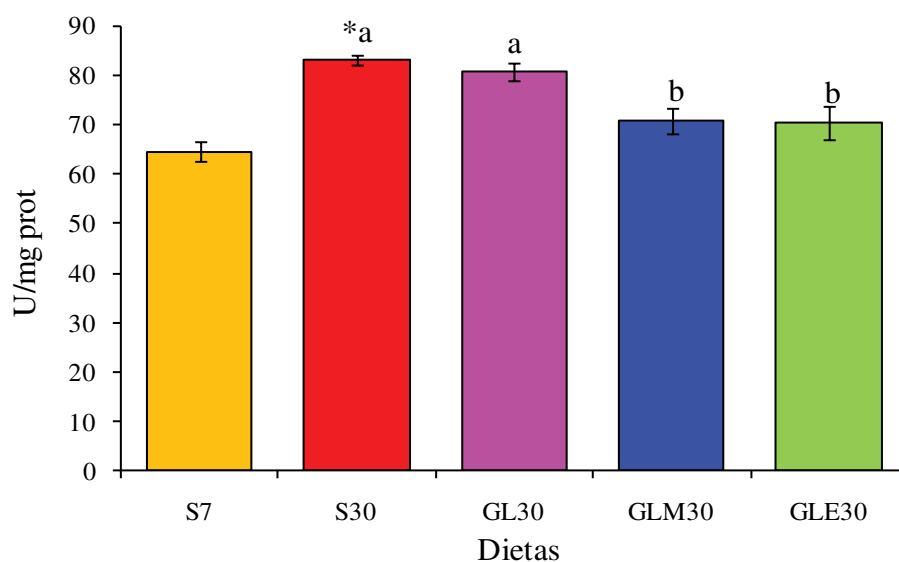
Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

7.3- Mecanismos de defensas antioxidantes en hígado

Dentro de los mecanismos de defensas antioxidantes hepáticos se evaluaron la actividad de la enzima catalasa, la relación glutatión reducido/ oxidado y las expresiones de enzimas y factores de transcripción claves en dicha regulación.

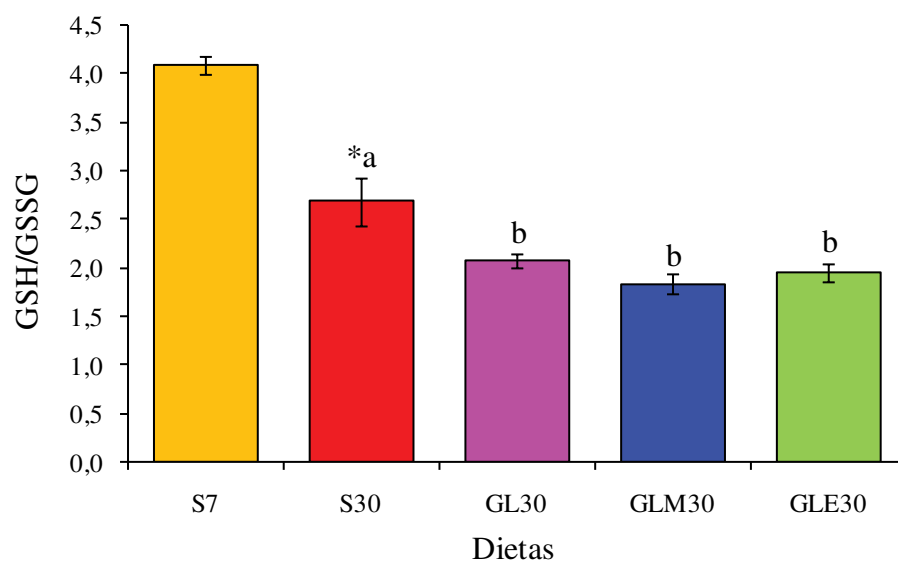
En la **Figura 57** se observa que la actividad de la enzima catalasa, incrementó por el contenido de grasa dietaria y, a elevados niveles de grasa, descendió significativamente en los grupos GLM30 y GLE30.

Figura 57- Actividad de la enzima catalasa en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

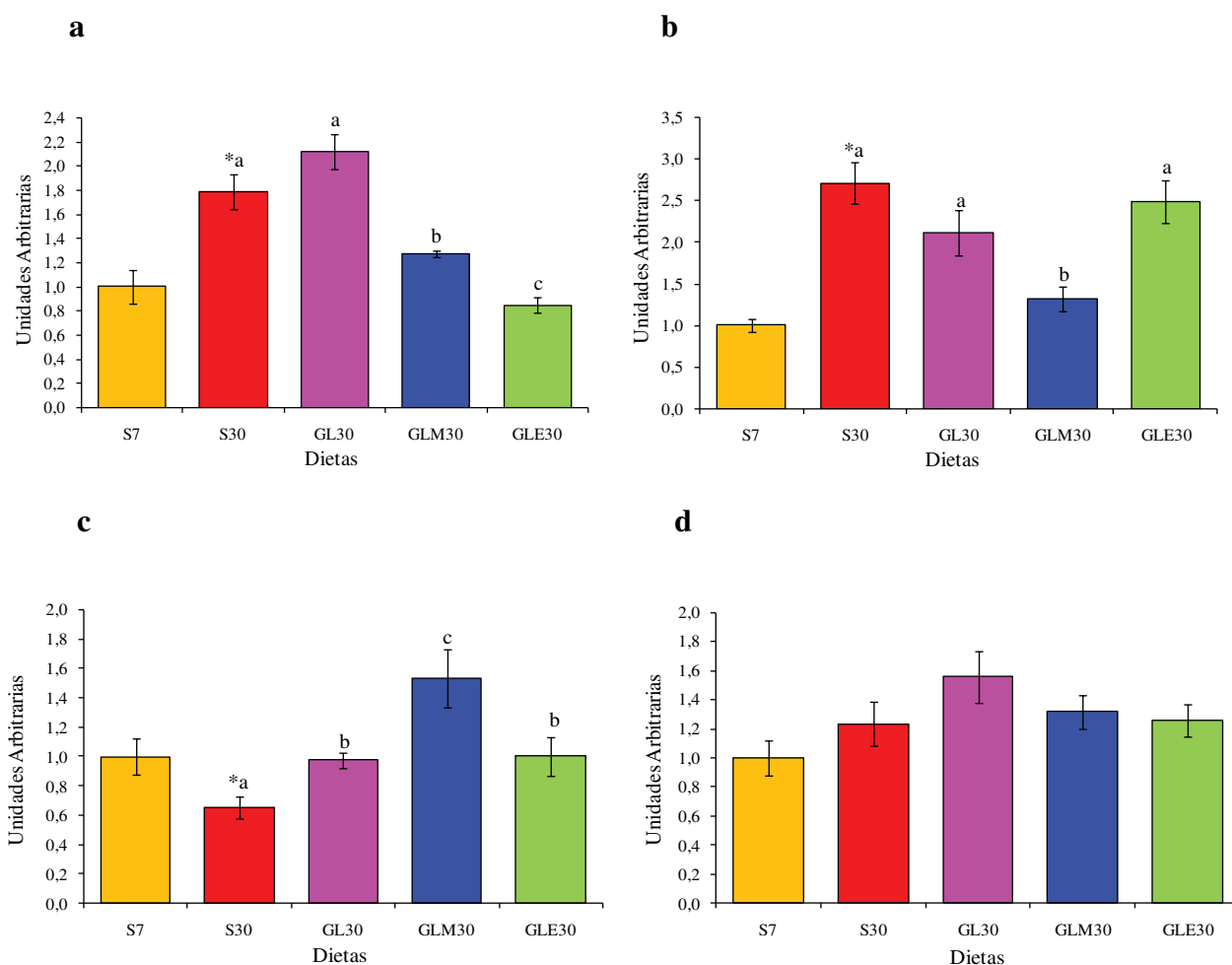
La relación glutatión reducido/ glutatión oxidado disminuyó en los hígados de los animales alimentados con S30; y a elevados niveles de grasa dietaria, las grasas lácteas acentuaron dicho descenso independientemente del tipo de grasa (**Figura 58**).

Figura 58- Relación GSH/GSSG en hígado

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's

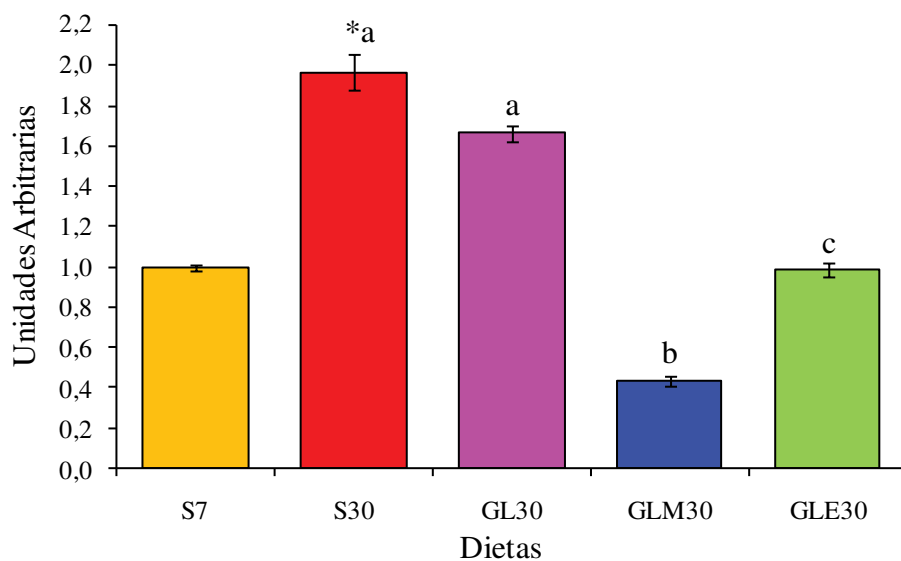
Para complementar el estudio del estado oxidativo, se evaluó la expresión génica de las enzimas con capacidad antioxidantes: catalasa (CAT), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa 2 (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y el factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2).

En comparación con el grupo control, S30 mostró un incremento de los niveles de ARNm de CAT y GR, y un descenso en el de la SOD (**Figuras 59a, b y c**). A elevados niveles de grasas dietarias, las expresiones génica de *Cat* y de *Gr* disminuyeron significativamente en el grupo GLM30; mientras que en la GLE30 sólo disminuyó la *Cat*, pero en mayor magnitud que en el grupo GLM30. Los niveles de ARNm de la enzima SOD mostraron un efecto opuesto al de la CAT, disminuyendo al incrementar el nivel de grasa, mientras que a elevados niveles en las distintas grasas lácteas se observó un aumento de dicha expresión génica, siendo mayor en el grupo GLM30 (**Figura 59c**). La expresión génica de *Gsh-px* no mostró cambios significativos en los diferentes grupos dietarios (**Figura 59d**).

Figura 59- Niveles de ARNm de CAT (a), GR (b), SOD (c) y GSH-Px (d) en hígado

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Los niveles hepáticos de ARNm del factor de transcripción Nrf2 aumentaron en el grupo S30 (vs S7). En los grupos GLM30 y GLE30, dicha expresión génica descendió significativamente, mostrando los valores más bajos en el grupo GLM30 (**Figura 60**).

Figura 60- Niveles de ARNm de Nrf2 en hígado

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). S7: dieta control conteniendo 7% de AS; S30: dieta conteniendo 30% de AS; GL30: dieta conteniendo 27% de GL+ 3% de AS; GLM30: dieta conteniendo 27% de GLM+ 3% de AS; GLE30: dieta conteniendo 27% de GLE+ 3% de AS. * diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre S30 vs S7 mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos alimentados con altos niveles de grasa, analizados mediante One-Way ANOVA seguido de test de Tukey's.

Discusión

DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo evaluar los potenciales efectos benéficos de una dieta rica en grasa láctea modificada (GLM), sobre la formación de hígado graso y otras alteraciones metabólicas inducidas por dietas con altos niveles de grasas en animales de experimentación. Se estudiaron los efectos de una GLM caracterizada por un incremento natural de ácido ruménico (AR) y su precursor ácido *trans*-vaccénico (AV). Es importante destacar que los valores de AR y AV se incrementaron aproximadamente 3 veces respecto a los niveles encontrados en una grasa láctea comercial, al mismo tiempo que se redujeron los valores de AGS en aproximadamente un 15%.

Entre los principales hallazgos, destacamos que la GLM atenuó la esteatosis hepática y alteraciones en la utilización de la glucosa inducidas por elevados niveles de grasa. Por consiguiente, la tesis se focalizó en los estudios regulatorios involucrados en el metabolismo de los TAG en hígado, estudiando la actividad y expresión de enzimas y reguladores involucrados en la lipogénesis, síntesis de TAG y oxidación de AG; incorporación hepática de diferentes AG y secreción de TAG-pre- β -lipoproteínas. En los aspectos referentes al metabolismo de la glucosa se cuantificaron parámetros bioquímicos plasmáticos, y la utilización *in vivo* de la glucosa. Para profundizar en los mecanismos regulatorios, se estudiaron los niveles de metabolitos intermediarios en hígado y músculo, las actividades de enzimas claves y niveles de expresión génica de factores de transcripción que regulan dichas enzimas. Además, integramos estos dos principales ejes de estudio con evaluaciones nutricionales, parámetros involucrados en la regulación de TAG en suero, tejido adiposo y músculo, como también el estado oxidativo en hígado.

1- Modelo experimental

Este trabajo de Tesis se desarrolló en un modelo experimental animal empleando ratas macho de la cepa *Wistar*, que en diversos aspectos reproduce ciertas alteraciones metabólicas observadas en humanos. Los modelos animales, si bien poseen ciertas limitaciones, son recursos invaluable para la investigación biomédica, incluida la investigación sobre efectos nutricionales (Warden y Fisler, 2008; Bagnol y col., 2012). En este sentido, los modelos de alta acreción tisular y plasmática de lípidos inducida por manipulaciones dietarias son uno de los más utilizados para estudiar diversos aspectos relacionados a la obesidad y enfermedades asociadas a la misma (Jobgen y col., 2009; Crew y col., 2016; Giles y col., 2016; Nguyen y col., 2017; Xia y col., 2018).

La elección del uso de animales machos se sustentó en la necesidad de minimizar los cambios asociados con el ciclo estral fisiológico de las hembras y de esta manera reducir el número de variables introducidas en el diseño experimental (Gallo y col., 1987; Andersen y col., 1997; Reuter, 2007). Al inicio del tratamiento dietario se consideró que los animales se encontraban en pleno desarrollo, esto permitió evaluar el potencial impacto de las dietas en un período etario de alta demanda nutricional y alta tasa de recambio metabólico. El presente estudio permitió observar efectos diferenciales de distintas fuentes lipídicas en dietas conteniendo niveles elevados de grasa (30%, p/p), empleando un control con niveles recomendados de lípidos (7%, p/p) según el Comité *ad hoc* del “American Institute of Nutrition” para roedores en crecimiento AIN-93G (Reeves y col., 1993) y un control secundario conteniendo 30% de aceite de soja. El elevado nivel de grasa dietaria tuvo como fundamento estimular la acreción de lípidos, principalmente en los tejidos reguladores claves del metabolismo de TAG y glucosa.

Los animales alimentados con las distintas dietas mostraron una buena aceptación de las mismas. Durante todo el período experimental, los animales exhibieron un buen estado de salud, sin ningún tipo de manifestaciones de deterioro aparentes debido a los tratamientos recibidos.

2- Dietas ricas en ácidos grasos insaturados: características del modelo experimental

En los animales del presente modelo experimental, pese a haberse observado una elevada acreción de TAG en hígado y músculo, no se registraron aumento del peso corporal, incremento en los pesos de los panículos adiposos, hepatomegalia; como así tampoco hipertrigliceridemia.

Muchos estudios han demostrado que ratas alimentadas *ad libitum* con una dieta alta en grasas desarrollan obesidad (Woods y col., 2003; Carmiel-Haggai y col., 2004; Buettner y col., 2006; Bortolin y col., 2018), hipertensión, dislipidemia (Lanni y col., 2005; Briand y col., 2012), incremento de los niveles de ácidos grasos libres en sangre (Sampey y col., 2011), intolerancia sistémica a la glucosa, hiperinsulinemia (Sampey y col., 2011; Chow y col., 2017), resistencia a la insulina (Pedersen y col., 1991; Buettner y col., 2006; Briand y col., 2012) y acumulación de lípidos con lesiones hepáticas (Carmiel-Haggai y col., 2004; Fromenty y col., 2004; Crescenzo y col., 2008; Sampey y col., 2011).

En nuestro modelo experimental, los animales alimentados con una dieta conteniendo 30 % (p/p) de aceite de soja, no desarrollaron obesidad. Similares resultados fueron encontrados en ratas y ratones tratados con dietas ricas en diferentes tipos de grasas (Harrold y col., 2000; Akieda-Asai y col., 2013). Este hallazgo puede explicarse por una reducción en la ingesta de alimentos para mantener el balance energético. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores,

tanto con grasas ricas en AGPI (Bernal y col., 2006; Dziedzic y col., 2007; Andreoli y col., 2009; Dhibi y col., 2011; Hashimoto y col., 2013; Tsushima y col., 2014; Soares da Costa y col., 2015) como con grasas saturadas (de Melo Lucena y col., 2010; Nakashima e Yokokura, 2010; Angélico y col., 2012; Crescenzo y col., 2014; Liu y col., 2017; Buyukdere y col., 2019). Esto podría ser explicado, en parte, por la regulación a través de mecanismos centrales (cerebro) y periféricos (intestino) que controlan la producción de señales neuronales, hormonales y metabólicas (ej: serotonina, glucosa y ácidos grasos) (Blundell y col., 1996; Duca y col., 2013), autolimitando la ingesta de alimentos, para compensar un excesivo consumo de energía (Lieber y col., 2004; Angélico y col., 2012; Hashimoto y col., 2013; Zeeni y col., 2015).

Otros estudios, aún en animales con elevado consumo energético a través de dietas ricas en grasas, no han reportado incremento en el peso corporal (Omagari y col., 2008; Nakashima y col., 2010; Estrany y col., 2011; Perris y col., 2014; de Almeida y col., 2015a y 2015b). Por el contrario, otros autores reportaron un incremento en los pesos corporales de animales de experimentación tratados con dietas altas en grasas (Woods y col., 2003; Ferramosca y col., 2012; Uhegbu y col., 2013; Illesca y col., 2015; Marques y col., 2016; Pei y col., 2017; Echeverría y col., 2018; Hoque y col., 2018; Shin y col., 2018; Fukui y col., 2019). Las diferencias con nuestros resultados pueden ser debidas a la edad de los animales utilizados en el modelo experimental (Tschop y Heiman, 2001), el tiempo de tratamiento (Bagnol y col., 2012), la palatabilidad del alimento (Leigh y col., 2018) y el tipo de AG dietario (Bray y col., 2002; Buettner y col., 2006; Hariri y col., 2010; Krishnan y Cooper, 2014).

En el caso de las dietas ricas en AGPI, ha sido demostrado que los AGPI n-3 limitan el desarrollo de la masa grasa y preservan la masa magra a través de un aumento del gasto energético por activación de proteínas desacoplantes (Matsuo y col., 2002), por incremento del catabolismo lipídico mediante la activación del PPAR α (β -oxidación) (Siri-Tarino y col., 2010) y a través de una disminución de la síntesis de TAG por inhibición de SREBP-1c y G6PDH (Stabile, 1998; Kim y col., 1999; Xu y col., 1999).

El aceite de soja, recomendado por AIN (Reeves y col., 1993), cumple con los requisitos de una cantidad y equilibrio de ácidos grasos esenciales, linoleico (n-6) y linolénico (n-3). Específicamente contiene aproximadamente 86% de ácidos grasos insaturados, siendo 51% de ácido linoleico y 7% de ácido α -linolénico, con una relación n-6/n-3 igual a 7 (Bourre y col., 1989; Lee y col., 1989; Bourre y col., 1990; FAO, 2012). Además, el aceite de soja es una fuente de compuestos antioxidantes, contribuyendo a proteger contra el estrés oxidativo tisular (Lu y Liu, 2002).

A nivel de composición de carcasa, hemos observado que el incremento en el contenido de grasa en los animales alimentados con S30, estuvo acompañado de un descenso en el contenido

proteico. Estos resultados pueden ser contradictorios, los cuales concuerdan parcialmente con los hallados por Matsuo y col. (2002), Woods y col. (2003), Crescenzo y col. (2008 y 2014), y no por los estudios de Angélico y col. (2012), de Almeida y col. (2015a), Illesca y col. (2015) y Buyukdere y col. (2019). Las modificaciones en la composición de carcasa, no fueron acompañadas de cambios en los panículos adiposos, coincidiendo con lo observado por ciertos autores (Omagari y col., 2008; Andreoli y col., 2009; Leonardi y col., 2010; Hoque y col., 2018). Sin embargo, otros investigadores, con diferentes modelos experimentales, han reportado una exacerbada acreción del tejido adiposo blanco en los animales que consumieron una dieta rica en grasa (Andreoli y col., 2009, Nakashima y col., 2010; Estrany y col., 2011; Hashimoto y col., 2013; Crescenzo y col., 2014, Tsushima y col., 2014; Illesca y col., 2015; Liu y col., 2017; Shin y col., 2018).

Otra característica de nuestro modelo experimental con dietas ricas en AGI fue el desarrollo de esteatosis hepática, la cual está de acuerdo con numerosos trabajos (Feoli y col., 2003; Andreoli y col., 2009; Hashimoto y col., 2013; Illesca y col., 2015). Algunos investigadores como Dhibi y col. (2011), Crescenzo y col. (2014) y Liu y col. (2017) a su vez encontraron hepatomegalia a diferencia de nosotros. En estudios previos de nuestro grupo (Bernal y col., 2006), no observamos esteatosis cuando los animales fueron alimentados con 20% (p/p) de aceites ricos en AGPI n-6.

La acumulación de lípidos en el hígado puede ser consecuencia de elevados aportes de grasa dietaria, aumento de la síntesis de TAG, oxidación reducida de AG y/o disminución de la secreción de VLDL (Postic y Girard, 2008).

La esteatosis que observamos en los animales alimentados con dieta S30 podría asociarse a la conjunción de una elevada oferta de lípidos dietarios junto a un incrementado transporte, expresado por los elevados niveles de ARNm de las proteínas transportadoras de AG. Como es bien conocido bibliográficamente (Crescenzo y col., 2008 y 2014; Ferramosca y col., 2013), la elevada oferta de lípidos dietarios se asoció a una marcada inhibición de la lipogénesis. Otro mecanismo compensador descrito, está relacionado con una mayor oxidación de AG. En este sentido, al igual que otros autores (Vial y col., 2011; Kakimoto y Kowaltowski, 2016), hemos observado una mayor actividad de la enzima clave de la β -oxidación mitocondrial (CPT-1a). No obstante, el citado mecanismo no logró compensar la gran afluencia de lípidos ofrecidos por la dieta HF. En forma opuesta, Deminice y col. (2011) y Ferramosca y col. (2012) reportaron una menor actividad CPT-1a, la cual estaría reflejando una baja β -oxidación hepática. Finalmente, la secreción hepática de TAG no contribuyó a compensar la alta oferta de lípidos dietarios. Estos hallazgos son compartidos por estudios de nuestro grupo en otro modelo experimental (Illesca y col., 2015), como también por otros autores (Hashimoto y col., 2013), que atribuyeron la esteatosis a una disminución en la degradación peroxisomal de AG.

Otra característica del modelo es que, pese a mostrar glucemias normales, existe hiperinsulinemia y, frente a una sobrecarga de glucosa, reducción en la utilización de la misma. Estos hallazgos en los niveles de glucosa coinciden con lo publicado por ciertos autores en diversos modelos con animales alimentados con dietas ricas en grasas (Bernal y col., 2006; Dziedzic y col., 2007; Omagari y col., 2008; Nakashima y col., 2010; Estrany y col., 2011; Garlipp-Picchi y col., 2011; Hashimoto y col., 2013; Tsushima y col., 2014; de Almeida y col., 2015a; Buyukdere y col., 2019). Por otra parte, otros estudios han reportado un incremento en los niveles de glucosa circulante (Deminice y col., 2011; Honors y col., 2011; Ferramosca y col., 2012; Leite y col., 2015; Pei y col., 2017; Shin y col., 2018). En referencia a la insulinemia, Dziedzic y col. (2007), Crescenzo y col. (2008), Honors y col. (2011), Ferramosca y col. (2012), Marques y col. (2016) y Shin y col. (2018) observaron un incremento en los niveles de insulina circulantes, coincidiendo con nuestras observaciones. Sin embargo, fueron reportados resultados muy diversos y contradictorios en este parámetro (Omagari y col., 2008; Nakashima y col., 2010; Deminice y col., 2011; Crescenzo y col., 2014; de Almeida y col., 2015a; Soares da Costa y col., 2015; Pei y col., 2017; Buyukdere y col., 2019).

La menor utilización de glucosa, reflejada por un incremento en el área bajo la curva de glucosa vs tiempo en el test de tolerancia oral de glucosa, fue demostrada hace muchos años atrás por Randle y col. (1963), conociéndose dicho mecanismo como “Ciclo de Randle”. Nuestros resultados con animales alimentados con dietas ricas en AG insaturados a diferencia de los de Randle con grasas saturadas, también fueron compartidos por ciertos autores (Huang y col., 2004; Honors y col., 2011; Auberval y col., 2014; Marques y col., 2016), pero no por otros estudios (Crescenzo y col., 2008; de Almeida y col., 2015a y 2015b). Posiblemente, los incrementados niveles de TAG musculares puedan explicar la disminuida utilización de glucosa *in vivo*.

Sorprendentemente, a diferencia de muchos estudios que reportaron un marcado incremento de TAG y colesterol sérico (Feoli y col., 2003; Leite y col., 2015; Liu y col., 2017), observamos que los animales alimentados con la dieta S30 presentaban una marcada hipotrigliceridemia acompañada por hipocolesterolemia. Resultados en el mismo sentido, también fueron reportados por Uhegbu y col. (2013), de Almeida y col. (2015a), Erukainure y col. (2016) y Hoque y col. (2018).

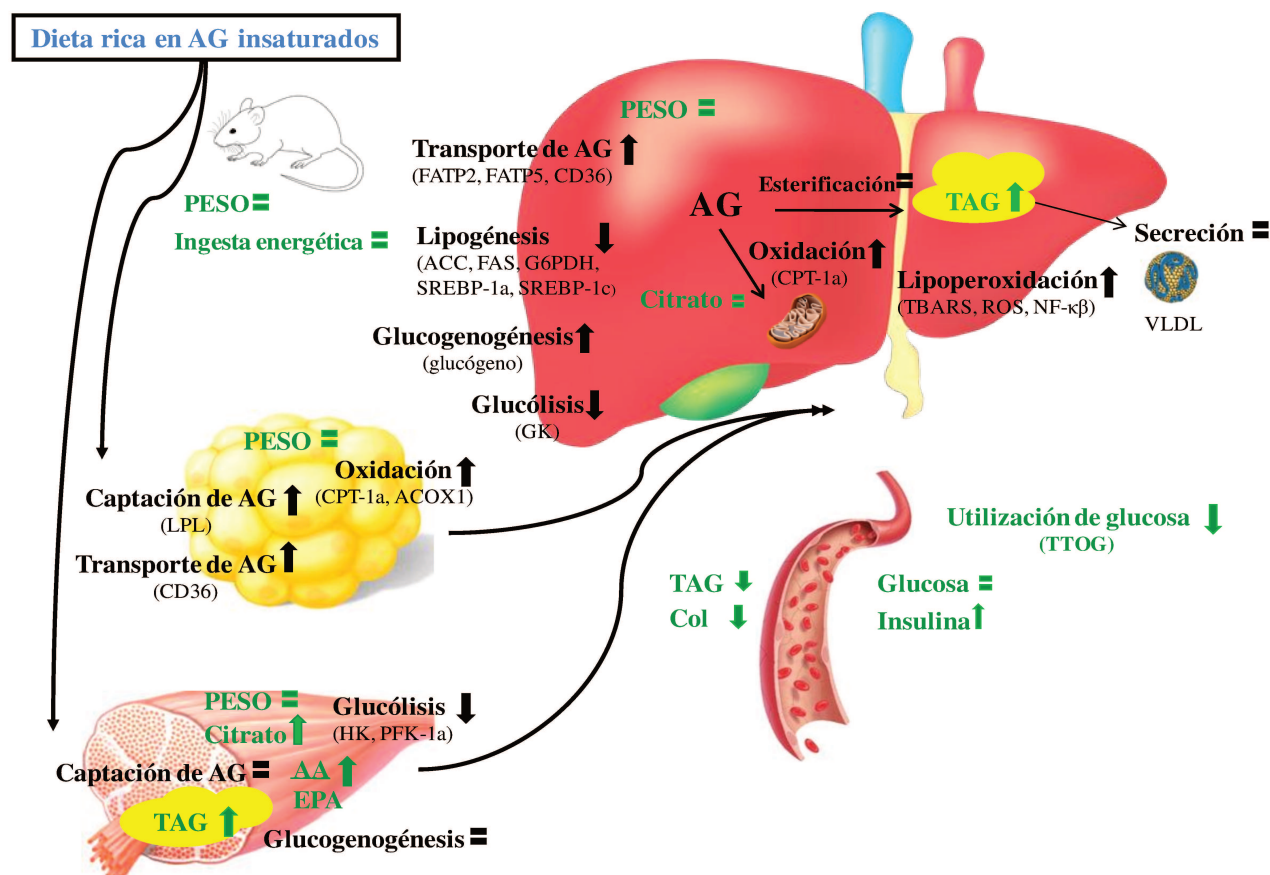
El estrés oxidativo es uno de los primeros pasos en la patogénesis hepática inducida por las dietas con alto contenido de grasas (Urakawa y col., 2003; Furukawa y col., 2004; Mantena y col., 2008; Matsuzawa-Nagata y col., 2008; White y col., 2009; Dhibi y col., 2011; Kanuri y col., 2013; Nakamura y col., 2013). Se ha demostrado que dietas HF pueden causar la formación de intermediarios tóxicos y acumulación de radicales hidroxilo (Batra y col., 1989; Thampi y col.,

1991, Vial y col., 2011). Este efecto, depende del tipo de grasa dietaria, y si bien las grasas saturadas han mostrado incrementar el estrés oxidativo, los AGPI exhiben una mayor sensibilidad al daño inducido por especies reactivas de oxígeno, y su sensibilidad a la oxidación aumenta exponencialmente en función del número de dobles enlaces por molécula de AG (Bielski y col., 1983). En nuestras experiencias, el elevado consumo de aceite de soja en el grupo S30, ha incrementado la lipoperoxidación hepática reflejada por un aumento de los niveles de TBARS y ROS. Estos hallazgos concuerdan con los obtenidos por ciertos autores (Crescenzo y col., 2008 y 2014; Deminice y col., 2011; Ferramosca y col., 2012; Auberval y col., 2014; Liu y col., 2017; Echeverría y col., 2018).

Hemos registrado un incremento en la actividad y expresión génica de la enzima catalasa, lo cual podría estar asociado a un mecanismo de defensa frente al H₂O₂ producido. Por otro lado, encontramos una disminución de la relación GSH/GSSG, lo cual están en consonancia con los resultados de Hsu y col. (2007), quienes mostraron un descenso en el contenido de GSH y un incremento en los niveles de GSSG en ratas obesas inducidas por una dieta rica en grasas.

En la **Figura 61** se propone un esquema metabólico con las principales alteraciones sobre el metabolismo intermedio glucídico y lipídico que caracterizan al modelo experimental de dietas ricas en ácidos grasos insaturados.

Figura 61- Cuadro metabólico de alteraciones inducidas por las dietas ricas en AG insaturados



3- Dieta GLM30: parámetros nutricionales

Los animales alimentados con GLM30 previnieron diferentes alteraciones en parámetros bioquímicos y metabólicos inducidos por las dietas ricas en grasas, sin manifestaciones de cambios significativos en parámetros nutricionales.

La ausencia de cambios en los pesos de los animales, de los panículos adiposos y en la composición de carcasa, pudo estar relacionada al equivalente consumo energético entre las distintas dietas hipercalóricas. Además, otros factores pudieron haber influido sobre estos resultados, teniendo en cuenta que en nuestro modelo hemos empleado animales de experimentación jóvenes y el tiempo de tratamiento dietario no fue muy prolongado, repercutiendo en el efecto inductivo sobre la acreción de lípidos corporales por altos niveles de todas las grasas dietarias. Nuestros resultados referidos a parámetros nutricionales con GLM enriquecida en AV y AR, en gran medida concuerdan con los hallados por otros autores en diferentes modelos experimentales (Lock y col., 2005; Chinnadurai y col., 2013; de Almeida y col., 2015a).

Bibliográficamente, existen resultados muy controvertidos del efecto de la grasa láctea estándar sobre la obesidad y acreción de lípidos tisulares (Legrand y col., 2015), en parte esto puede estar relacionado a que los AGS, dependiendo de su longitud de cadena y tipo de alimento, pueden conducir a efectos metabólicos diferentes. Así a modo de ejemplo, mientras Ehrampoush y col. (2016), demostraron que ratas *Wistar* de 6 semanas de edad alimentadas por 12 semanas con dietas conteniendo altos niveles de grasas lácteas (41% de energía), desarrollaron obesidad y modificaciones en parámetros metabólicos. Otros autores (Perris y col., 2014; Khodadadi y col., 2017) no observaron diferencias en las ganancias de pesos entre animales alimentados con una dieta rica en grasa láctea y dietas ricas en AG insaturados.

Distintos efectos de los CLA han sido descriptos sobre la ganancia de peso y composición de carcasa, dependiendo entre otros de las especies en cuestión, niveles y tipos de isómeros. Así, de Almeida y col. (2015b), Illesca y col. (2015) y Bezan y col. (2018) no encontraron diferencias en los pesos corporales, contenido de grasa en carcasas y peso de los tejidos entre ratas alimentadas con una dieta rica en grasa suplementada con CLA comercial y aquellas que recibieron una dieta sin suplementar. Por el contrario, en ratones alimentados con HFD (Andreoli y col., 2009) o con niveles recomendados de grasa (Scalerandi y col., 2014) suplementadas con CLA, se observó una marcada reducción de los panículos adiposos, denotando un efecto diferencial según la especie. Este efecto estuvo asociado principalmente a la acción del isómero 10*t*,12*c*-CLA y en menor medida al AR (Scalerandi y col., 2014).

Los posibles mecanismos responsables de las propiedades antiobesogénicas del isómero 10*t*,12*c*-CLA y en menor medida del AR incluyen, 1) disminución de la ingesta de energía por un efecto supresor sobre genes hipotalámicos que regulan el apetito (Park y col., 1997; So y col., 2009); 2) aumento del gasto de energía en tejido adiposo blanco, muscular y hepático por un incremento en la expresión génica de *Ucp*, *Ppara* y *Acox1* (Ealey y col., 2002; Takahashi y col., 2002; Kang y col., 2004; LaRosa y col., 2006, Choi y col. 2007); 3) disminución de la adipogénesis y lipogénesis en tejido adiposo blanco (Kang y col., 2003; Liu y col., 2007) por una represión de la expresión PPAR γ , del factor de transcripción SREBP-1a/c y de sus genes diana; y 4) aumento de la lipólisis. Los resultados fueron divergentes en función de las variables experimentales, difiriendo entre otros por el tipo de especie (ej.: rata-ratón). En el caso de los ratones experimentales, los efectos enumerados son muy pronunciados conduciendo a un agotamiento de los depósitos de TAG en el tejido adiposo blanco, con una gran acumulación de lípidos hepáticos (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002) características del síndrome lipodistrófico descrito por Poirier y col. (2005).

Resumiendo, la falta de efecto de la dieta GLM30 sobre la acreción de lípidos en carcasa y la ganancia de peso pudo haber sido debida, entre otros a: 1) el bajo efecto antiobesogénico del AR, 2) la baja sensibilidad de las ratas a dicha acción por los CLA y, 3) a los menores niveles de AR factibles de alcanzar con el empleo de GLM comparando con el uso de suplementos sintéticos.

4- Dieta GLM30: influencia sobre el metabolismo lipídico

4.1- Cambios en la composición de AG séricos y tisulares

La incorporación de isómeros de AG en los tejidos mantuvo una proporcionalidad con el nivel AR y AV dietario. En los tratamientos dietarios con todas las grasas lácteas se observó que los mayores niveles de AR se registraron en el tejido adiposo, seguido de hígado, músculo y suero. Sin embargo, a excepción del TAE, los niveles de AV no siguieron el mismo patrón en los distintos tejidos, ni tampoco entre las distintas dietas con grasas lácteas. Específicamente, en hígado se observaron los menores niveles de AV independientemente de la grasa láctea dietaria. La mayor incorporación de estos isómeros de AG observada en el tejido adiposo, ha sido también reportada por otros autores (Sébédio y col., 2001; Alasnier y col., 2002; Kelley y col., 2006; Lund y col., 2006; Mohankumar y col., 2013) y está relacionada con la tasa de incorporación, catabolismo y velocidad de conversión a otros derivados isoméricos.

Se ha demostrado que el AV es precursor de la síntesis endógena de AR mediante la acción de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa (Bauman y col., 1999). Dicha bioconversión metabólica ha sido

observada en humanos, ratas y otras especies (Ip y col., 1999; Adlof y col., 2000; Banni y col., 2001; Loor y col., 2002; Turpeinen y col., 2002), siendo dependiente de varios factores, como la especie experimental (Santora y col., 2000; Corl y col., 2001), características del tejido (Lund y col., 2006), condiciones experimentales (Pollard y col., 1980; Gruffat y col., 2005) y tipo de grasa dietaria (Ntambi y col., 1992 y 1999). A diferencia de lo reportado por otros autores (Santora y col., 2000; Banni y col., 2001; Kraft y col., 2006; Illesca y col., 2015), donde observaron una mayor tasa de formación de AR desde su precursor en el tejido adiposo, en este trabajo, al igual que lo observado por Lock y col. (2005), encontramos que la mayor tasa de bioconversión se produce principalmente en el hígado, seguido por el TAE y músculo. Por otra parte, otros investigadores (Lund y col., 2006) no observaron una significativa bioconversión en hígado y tejido adiposo de ratas *Wistar* alimentadas con una manteca enriquecida en AV y AR. La bioconversión de AV a AR (expresada por la relación AR/AV) fue influenciada, además de la naturaleza del tejido, por el tratamiento dietario. Así, el flujo de AV a AR, a través de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa, fue más acentuado en los animales tratados con GLM30 y en menor medida en el grupo GLE30. Por consiguiente, la elevada bioconversión de AV a nivel hepático en los animales alimentados con GLM30 podría jugar un rol determinante en los marcados efectos benéficos que la misma ejerce atenuando la esteatosis inducida por dietas ricas en grasas.

Los tratamientos dietarios modificaron diferencialmente la composición de ácidos grasos de los distintos tejidos y del suero en los animales de experimentación. Si bien los animales alimentados con grasas lácteas incrementaron los niveles de AGS en el hígado, a equivalentes niveles dietarios de AGS totales (GLM30 vs GLE30), el grupo GLM30 mostró menores niveles hepáticos de AGS totales, y específicamente de ácido esteárico (18:0). Esto puede estar relacionado a una sustitución del 18:0 por el AV, cuya configuración espacial tridimensional es semejante. Por otro lado, la ausencia de AG de 4 a 8 átomos de carbono, y los bajos niveles de aquellos entre 10 a 14 carbonos, en los hígados de los animales alimentados con las distintas grasas lácteas, no se correlacionó con los aportes dietarios. Esto puede ser explicado por su rápido transporte por vena porta unidos a la albúmina (You y col., 2008) y su incorporación al hígado sin necesidad de utilizar proteínas transportadoras de AG (Aoyama y col., 2007), para su posterior rápida β -oxidación mitocondrial (Ooyama y col., 2009). Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores en animales consumiendo grasa láctea (Legrand y col., 2010; Ezanno y col., 2015; Huebner y col., 2016).

Las dietas conteniendo grasas lácteas provocan un descenso de los niveles de AGPI totales en hígados, tanto en las familias n-3 como n-6. No obstante, es de destacar que la relación AGPI n-3/AGPI n-6 es más elevada en el grupo GLM30, y específicamente mayor es la relación EPA/AA.

Los menores niveles de AA en los hígados de los animales alimentados con dieta GLM30 podrían ser explicados, al menos en parte, por la competición de sustratos (AR y AL) en las reacciones de biosíntesis de los AG de cadena muy larga (AGPI-CL) de la familia n-6 (Banni y col., 1999; Belury 2002; Yang y col., 2015). En referencia a la biosíntesis de los AGPI-CL n-3, aunque los niveles de ALA y EPA han incrementado en los hígados de los animales del grupo GLM30, el contenido de DHA no mostró cambios significativos. Esto podría ser debido a una competencia de sustratos en la misma vía metabólica, dado que el ALA y el 9c,12c,15c,18c,21c-24:5 emplean la misma enzima $\Delta 6$ -desaturasa (Gibson y col., 2011).

Los AG: EPA y AA, a través de la actividad de las enzimas fosfolipasa A2, ciclooxigenasas y lipooxigenasas, pueden derivar en distintos eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y prostaciclina) con diferentes efectos sobre los procesos inflamatorios, quimiotácticos, mioconstrictores, etc. (Saldeen y col., 2006; Schmitz y col., 2008). Estudios de Araya y col. (2004 y 2010) han reportado que la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) se caracteriza por una disminución en el contenido de AGPI n-3, lo que conlleva a una disminución en la relación AGPI n-3/n-6 y, por consiguiente, a un estado proinflamatorio en el hígado. Se ha demostrado que un hígado con elevada acumulación de grasa puede ser altamente susceptible a lesiones mediadas por la secreción de adipocitocinas proinflamatorias y protrombóticas generando una esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y cirrosis (Weisberg y col., 2003; Pagano y col., 2005; Tilg y col., 2006; Bellentani y col., 2009). Este proceso podría estar influenciado por un desbalance de los eicosanoides derivados del EPA y AA. Por consiguiente, el entorno generado por los ácidos grasos EPA y AA en los animales alimentados con GLM30, podría tener una elevada repercusión sobre la prevención de procesos inflamatorios, y de esta forma sobre la evolución de la esteatosis hepática hacia la esteatohepatitis, cirrosis y finalmente cáncer hepático.

El aumento de los AGI en la membrana muscular mejora la sensibilidad a la insulina, específicamente los AGPI-CL n-3 pueden tener un papel beneficioso (Storlien y col., 1991 y 1996). Por el contrario, los AGS disminuyen la sensibilidad a la insulina (Vessby y col., 2001). Estudios en roedores (Storlien y col., 1991; Abbott y col., 2009) y humanos (Andersson y col., 2002) han demostrado que la composición de AG en el músculo, es altamente influenciada por los AG de los lípidos dietarios (Olomu y col., 1991; Liu y col., 1994; Ayre y col., 1996). Los cambios en la composición de AG en el músculo, y específicamente de los fosfolípidos de membranas musculares, tienen un gran impacto sobre la fluidez de las mismas, la incorporación de proteínas, actividades enzimáticas y funciones de los receptores (Alberts y col., 1994; Ayre y col., 1996) modulando, entre otros, la utilización de la glucosa y la respuesta a la insulina (Storlien y col., 1998). Si bien, en el presente trabajo determinamos el perfil de AG de los lípidos totales en el

músculo y no de los fosfolípidos de membranas, encontramos que las modificaciones en el perfil de AG musculares estuvieron asociadas a efectos benéficos sobre la utilización de la glucosa. La elevada ingesta de AGPI con un adecuado equilibrio de las familias n-3/n-6, como acontece en nuestro modelo experimental con la dieta S30, si bien mejora el perfil de ciertos AG en los lípidos musculares, específicamente, elevando los niveles de AGPI a expensas de una reducción de los AGS, incrementa la relación AA/EPA muscular. Esto podría generar un entorno deletéreo a través de un aumento de mediadores eicosanoides inflamatorios.

Como era de esperar, las distintas dietas con grasas lácteas provocaron, en músculo, un incremento de los AGS y una disminución de los AGPI a expensas de un aumento de los AGMI, junto a la incorporación de AR y AV. Al menos a nuestro conocimiento, no existen estudios que hayan demostrado modificaciones en el perfil de AG musculares por grasas lácteas enriquecidas en CLA, más aún escasos estudios han mostrado la influencia de CLA sintéticos sobre los mismos (Li y col., 1998; Alasnier y col., 2002; Fariña, 2014). Es de destacar que la biosíntesis de EPA a partir de ALA está sustancialmente incrementada por la GLM30, resultando en la mayor relación de EPA/AA. Este efecto podría generar un entorno anti-inflamatorio en el tejido muscular de los animales alimentados con GLM30 mejorando, al mismo tiempo, la sensibilidad a la insulina y permitiendo explicar las mejoras observadas en la utilización de la glucosa y en el contenido de lípidos tisulares. Estos resultados están en concordancia con estudios previos de nuestro grupo, donde una elevada incorporación de CLA sintéticos aumentó la utilización de la glucosa en músculos soleos incubados *in vitro* (Fariña, 2014).

Estudios de nuestro grupo (Andreoli y col., 2010; Scalerandi, 2013; Fariña y col., 2015; Illesca y col., 2015; Sain y col., 2015), y de otros autores (Legrand y col., 2010), han demostrado que la composición de ácidos grasos del tejido adiposo es la que mejor refleja, la constitución de los lípidos consumidos, principalmente, el contenido de AGS. Sin embargo, la síntesis endógena, el transporte y los procesos de conversión de los AG (elongación y desaturación), como el nivel de grasa dietaria, también son factores importantes que contribuyen a la composición del tejido adiposo (Hodson y col., 2008). Los menores niveles de AGS en los animales alimentados con S30 pueden estar relacionados, no sólo a la mayor incorporación de AGPI, sino que también a una acentuada inhibición de la lipogénesis. Así, a altos niveles de grasa dietaria, el perfil de AGS hasta 16 átomos de carbono en TAE muestra un mayor paralelismo con el de los lípidos consumidos, mostrándose diferencias entre las distintas grasas lácteas. A diferencia de nuestros resultados, Lock y col. (2005) no reportaron cambios en los niveles de los AGS totales, específicamente de los AG: 12:0, 14:0 y 16:0 en TAE de hamsters alimentados con grasas lácteas enriquecidas naturalmente con AV y AR vs una grasa láctea control.

El tejido adiposo posee una alta capacidad de incorporar AG de circulación y de sintetizar AG hasta 18 átomos de carbono (oleico), como también tiene una baja capacidad de derivar AG a la biosíntesis de AGPI-CL. Es posible que el sorprendente incremento de ALA en tejido adiposo de animales del grupo GLM30 pueda estar asociado a una elevada captación de dicho AG desde circulación por la LPL del tejido adiposo. Similarmente, los bajos niveles de AA podrían relacionarse a los bajos niveles circulantes de dicho AG. La conjunción de estos efectos, podrían tener una resultante benéfica propendiendo, entre otros, a favorecer procesos anti-inflamatorios. Resultados diferentes en los niveles de ALA fueron reportados por Lock y col. (2005). En este sentido, dichos autores no observaron cambios en los niveles de ALA entre animales alimentados con una GL enriquecida naturalmente con AR y AV vs una GL control. Los cambios observados en el perfil de AG de los animales alimentados con GLM30 tienen similitud con aquellos reportados en estudios anteriores de nuestro grupo trabajando con ratones alimentados con dietas mimetizando el efecto de grasas ricas en CLA naturales (1% del isómero AR -Scalerandi, 2013-). En los estudios de Scalerandi (2013), también se observó una asociación entre el perfil de AG de tejido adiposo y un descenso de peso de dichos tejidos. No obstante, el mismo fue mucho menos relevante que el encontrado cuando los animales fueron alimentados con una mezcla con cantidades equimoleculares de AR y 10*t*,12*c*-CLA. En contraposición, Kelley y col. (2006) reportaron, en ratones alimentados con una dieta suplementada con 0,5% de AR, cambios muy diferentes en el perfil de AG del tejido adiposo. Específicamente observaron, una disminución del contenido de AGMI totales a expensas de un descenso en 9*c*-18:1, un incremento de los AGPI n-6 por un aumento del AL y sin cambios en los AGS totales. Estas diferencias pudieron ser debidas al protocolo experimental, incluyendo entre otros, especie, grupo control, tiempo de tratamiento experimental, naturaleza y nivel del isómero empleado. Asimismo, resultados controversiales fueron observados en modelos de ratas alimentadas con dietas suplementadas con CLA comercial o los isómeros con alto grado de pureza (AV y/o AR), las cuales son menos susceptibles a modificaciones en tejido adiposo que los ratones. En este sentido, Sébédio y col. (2001), Alasnier y col. (2002) y Jacome-Sosa y col. (2010) reportaron cambios mínimos en el perfil de AG en tejido adiposo de ratas alimentadas con dietas suplementadas con AR y/o AV. Otros estudios utilizando cantidades equimoleculares de AR y 10*t*,12*c*-CLA (Fariña, 2014; Illesca, 2015) reportaron modificaciones significativas en el perfil de AG del tejido adiposo.

A diferencia de lo que ocurre en condiciones alimentadas, donde el perfil de AG dietario tiene una alta implicancia en el contenido resultante de los mismos a nivel de circulación, los AG séricos de animales ayunados, reflejan principalmente la contribución de los AG provenientes de los lípidos secretados como VLDL-TAG por el hígado y los resultantes de la metabolización de lípidos

por diferentes tejidos. Así, bajo estas condiciones, los AGS de cadena corta y media alcanzan niveles prácticamente indetectables en suero. Es dable mencionar que en el grupo GLM30 se redujeron los niveles de 18:0, conduciendo a menores tenores de AGS y que esta diferencia se acentúa cuando se compara con la GL30. Estos resultados, en cierta manera, están de acuerdo con los de otros autores (Legrand y col., 2010; Perris y col., 2014; Khodadadi y col., 2017), quienes mostraron que bajo diferentes condiciones, los animales alimentados con GL tienen mayores niveles séricos de AGS que aquellos alimentados con aceites vegetales. En referencia a estudios de niveles de AGS en suero de animales alimentados con GL enriquecidas con CLA y/o AV, existen escasos resultados siendo los mismos diferentes a los encontrados en esta tesis. Así, Roy y col. (2007) reportaron equivalentes valores de AGS séricos en conejos alimentados con una grasa láctea enriquecida en AR y AV vs una grasa láctea control.

Si bien el contenido de AGPI disminuyó por la alimentación con las distintas grasas lácteas, al igual que fuera reportado por otros autores (Perris y col., 2014; Khodadadi y col., 2017), un perfil nutricional más adecuado, de los AGPI, ha sido obtenido con GLM30, tanto en comparación con las otras GL, como en referencia a la soja. Específicamente el cociente AGPI n-3/AGPI n-6 ha incrementado en suero de animales alimentados con GLM30 debido a elevadas relaciones DHA/AA y EPA/AA. Esto podría tener un impacto importante tanto, en la provisión de estos AG cruciales para la regulación metabólica de diferentes tejidos, como en la respuesta inflamatoria y estrés oxidativo tisular (Calvani y Benatti, 2003; Benatti y col., 2004; Calder, 2006; Schmitz y col., 2008; Russo, 2009). Nuestros resultados, no coinciden con los encontrados por Roy y col. (2007), quienes reportaron un descenso en los niveles de AGPI n-3 y una disminución en la relación AGPI n-3/AGPI n-6 en plasma de conejos alimentados con grasa láctea enriquecida con AR y AV en comparación con el grupo que consumió una grasa láctea control. Estas diferencias podrían ser debidas a las distintas especies animales y composición de las dietas empleadas. Esto también es sustentado por discrepancias en resultados encontrados en nuestro grupo con otros modelos animales y mezclas comerciales de CLA (Andreoli y col., 2010; Fariña, 2014; Illesca, 2015) o AR obtenido por síntesis (Scalerandi, 2013).

4.2- Regulación de lípidos hepáticos

Un resultado muy interesante del presente estudio es que la GLM30, como la GL30, previnieron la elevación de los niveles lipídicos encontrados en los animales alimentados con S30. No obstante, los mecanismos bioquímicos por los cuales se ejercieron dichos efectos han sido claramente diferentes. En la GLM30, caracterizada por un enriquecimiento con AR y su precursor AV, y una reducción de AGS, el efecto estuvo asociado a una mayor VSTAG y β -oxidación,

denotando cierta asociación entre las modificaciones en el perfil de AG de la GLM y mecanismos diferenciales involucrados en la prevención de la acumulación de TAG en el hígado. En consecuencia, sin descartar que diversas variables podrían estar ejerciendo un rol metabólico central, el AR y AV podrían ser efectores cruciales implicados en dicho efecto bioregulador.

Es bien conocido que el efecto metabólico del AR es diferente al del 10*t*,12*c*-CLA, pero la mayoría de los trabajos sobre la regulación hepática de TAG han reportado efectos de las mezclas comerciales equimoleculares de ambos isómeros o del 10*t*,12*c*-CLA individual, describiéndose muy pocos estudios sobre la acción del AR. Esto ha conllevado a que los resultados de un gran número de trabajos muestren efectos diversos y contradictorios de la acción ejercida por los CLA.

Así, numerosas investigaciones en modelos con ratones alimentados con una dieta suplementada con CLA comercial (mezcla equimolecular de AR y 10*t*,12*c*-CLA), tanto de nuestro grupo de trabajo como de otros autores (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Javadi y col., 2004; Scalerandi y col., 2014), han reportado efectos opuestos a los encontrados en la presente tesis, destacando la presencia de hepatomegalia asociada a una acumulación exacerbada de TAG. Entre los principales mecanismos responsables de la esteatosis observada, los autores destacaron una disminución en la VSTAG (Andreoli y col., 2009) o una elevada lipogénesis (Takahashi y col., 2003; Ferramosca y col., 2006) asociada, está última, al isómero 10*t*,12*c*-CLA (Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005a; Vyas y col., 2012). De este modo, las conclusiones arribadas en el modelo de ratones, empleando niveles relativamente elevados de CLA y con cantidades equimoleculares de 9*c*,11*t*- y 10*t*,12*c*-CLA, podrían no ser transferidas al protocolo empleado por nosotros. En ratas alimentadas con dietas suplementadas con CLA comerciales, si bien algunos trabajos han reportado el desarrollo de esteatosis hepática (Fariña, 2014; Illesca, 2015; Bezan y col., 2018), la mayoría de las investigaciones han mostrado efectos benéficos sobre dicha alteración. Las diferencias en los hallazgos pueden ser atribuidas al modelo/protocolo experimental empleado. En relación a los efectos benéficos, Andreoli y col. (2007) en ratas en etapa de repleción proteica reportaron que una dieta rica en grasa y CLA previno la acumulación lipídica en hígado inducida por la dieta HF a expensas de un incremento en la VSTAG. En forma equivalente, Nagao y col. (2005) observaron en ratas *Zucker* alimentadas con una dieta suplementada con CLA comercial una disminución en el contenido de TAG hepáticos, pero asociado a un aumento en la oxidación de AG, además de una mayor secreción de lipoproteínas ricas en TAG. Y Purushotham y col. (2007) encontraron que el CLA comercial revirtió la esteatosis desarrollada en ratas por dietas ricas en grasas saturadas.

Trabajos reportando los efectos del AR o AV en modelos experimentales con dietas ricas en grasas son muy escasos. En forma semejante a nuestros resultados, Mollica y col. (2014) mostraron,

en ratas alimentados con dietas ricas en grasas suplementadas con AR puro, un descenso en los niveles hepáticos de TAG vs los controles alimentados con dieta HF, asociado a una mayor oxidación. Jacome-Sosa y col. (2010), han encontrado que ratas alimentadas con una dieta moderada en grasa (15%) suplementada con AR y AV redujeron el peso y contenido de TAG hepático, sin ningún tipo de caracterización de los mecanismos involucrados. Otros investigadores estudiaron los efectos en roedores alimentados con dietas normolipídicas encontrando, que a diferencia del 10*t*,12*c*-CLA, el AR y/o su precursor no modificaron los niveles de TAG hepáticos (Alasnier y col., 2002; Degrace y col., 2003; Bissonauth y col., 2006; Kelley y col., 2006; Wang, Y. y col., 2006; Mohankumar y col., 2013; Scalerandi y col., 2014; Maslak y col., 2015); o los disminuyeron (Wang y col., 2009; Jacome-Sosa y col., 2014; Wang, T. y col., 2015).

A nuestro conocimiento sólo un estudio (Chinnadurai y col., 2013) con grasas naturalmente enriquecidas con AR y AV mostraron efectos sobre la atenuación de la acumulación de TAG hepáticos inducidas por dietas ricas en grasas. A diferencia de nuestro estudio, los autores demostraron que a mayor nivel de ambos isómeros, mayor fue el descenso en los TAG hepáticos, no describiendo ningún posible mecanismo involucrado en dicha acción. En este sentido, reiteramos que nuestros resultados nos demuestran que, si bien el efecto final sobre el descenso de los TAG es semejante, los mecanismos bioquímicos involucrados fueron dependientes de las modificaciones en la composición de la grasa láctea, aspecto que por su originalidad e impacto ha despertado un gran interés en proseguir el estudio de los mecanismos diferenciales involucrados.

4.2.1- Influencia de la VSTAG

El incremento en la VSTAG observado en el grupo GLM30 podría estar íntimamente relacionado con los niveles de AR y AV. En este sentido, trabajos de nuestro grupo (Scalerandi y col., 2014), mostraron que una mezcla enriquecida en AR, y no la mezcla equimolecular de 9*c*,11*t*-CLA y 10*t*,12*c*-CLA incrementa la VSTAG, pudiendo prevenir la acumulación de TAG en hígado. Estas evidencias son soportadas por los estudios de Lin y col. (2001a) quienes trabajando con células HepG2 observaron que el isómero AR es un potente estimulador de la secreción de ApoB-100 y TAG a diferencia del 10*t*,12*c*-CLA. Además, Legrand y col. (1997) demostraron en hepatocitos aislados que la secreción de TAG depende de la actividad enzimática SCD, cuya expresión génica se encuentra marcadamente incrementada por la dieta GLM30, al mismo tiempo que observamos una tendencia a mayor flujo (relación: ácido oleico/ácido esteárico) a través de dicha enzima. Es importante mencionar que otros autores encontraron resultados diferentes. Así, Degrace y col. (2003) no observaron cambios en la VSTAG en ratones alimentados con una dieta suplementada con AR vs aquellos alimentados con la dieta control; y Wang y col. (2009) al igual

que Jacome-Sosa y col. (2014) reportaron un descenso en la VSTAG en modelos de ratas genéticamente obesas alimentadas con una dieta suplementada con AV.

4.2.2- Influencia de la oxidación de ácidos grasos

Otro de los mecanismos propuestos por el cual los animales que consumieron GLM30 previnieron la acumulación de TAG en hígado, puede estar relacionado a la mayor β -oxidación observada en este grupo dietario. En este sentido, si bien no encontramos modificaciones en la expresión génica de la enzima CPT-1a, una elevada actividad de la misma fue relacionada con un menor contenido de TAG hepáticos en los animales alimentados con la dieta GLM30. Este incremento de la actividad CPT-1a puede ser consecuencia de la mayor expresión génica de *Ppara*. Resultados que soportan el incremento de la actividad CPT en hígado fueron reportados en animales alimentados con dietas suplementadas con AR (Mollica y col., 2014; Scalerandi y col., 2014), como también con CLA comerciales (Rahman y col., 2001; Akahoshi y col., 2003; Takahashi y col., 2003; Nagao y col., 2005). Sin embargo, otros autores no encontraron cambios en la actividad de dicha enzima clave, tanto con dietas conteniendo AR (Akahoshi y col., 2003; Degrace y col., 2004; Macarulla y col., 2005; Wang, Y. y col., 2006), como con CLA comerciales (Scalerandi y col., 2014, Fariña y col., 2019). Del mismo modo, Degrace y col. (2004) y Wang, Y. y col. (2006), no observaron cambios en la expresión génica de *Cpt-1a* en los animales alimentados con dietas suplementadas con AR. En referencia a la posible regulación de la oxidación de AG a través de los PPAR α , hemos observado que los elevados niveles de ARNm de este factor de transcripción en hígados de los animales del grupo GLM30 coinciden con resultados encontrados por Choi y col. (2007) y Mollica y col. (2014) en ratas alimentadas con dietas suplementadas con AR y con aquellos de Purushotham y col. (2007) con dietas suplementadas con CLA comercial.

Ha sido reportado que el AR es un ligando activador más potente del PPAR α que otros isómeros CLA (Moya-Camarena y col., 1999; Clément y col., 2002), a través de los cuales no sólo puede incrementar la expresión y/o actividad de las enzimas CPT-1 y CPT-2, sino también del citocromo P450A1, la enzima ACOX y la proteína de unión de AG hepática (FABP) (Moya-Camarena y col., 1999; Takahashi y col., 2003). En este sentido, cabe mencionar que en nuestro modelo experimental, observamos un incremento de la expresión génica de *Acox1* en hígado de los animales alimentados con GLM30. Esto posiblemente puede ser explicado por el mayor contenido de AR, como fuera reportado en distintos modelos experimentales con dietas suplementadas con AR o CLA comerciales (Takahashi y col., 2003; Choi y col., 2004; Degrace y col., 2004; Purushotham y col., 2007). Por otra parte, otros autores no han reportado cambios en el proceso de

β -oxidación peroxisomal en modelos experimentales alimentados con dietas suplementadas con AR (Akahoshi y col., 2003; Macarulla y col., 2005).

Otro mecanismo por el cual podrían haber sido activados los PPAR α , y de esta manera incrementar la oxidación peroxisomal, es a través de los receptores de adiponectina (Kadowaki y col., 2005). Nuestros resultados también se podrían enmarcar en esta hipótesis, dado que los animales que consumieron GLM30 mostraron una incrementada expresión génica del receptor de adiponectina (AdipoR2). Resultados semejantes han sido descritos por Choi y col. (2007) en ratas alimentadas con dietas altas en grasas suplementadas con AR.

4.2.3- Influencia de la lipogénesis

Estudios con dietas ricas en grasas han demostrado que los niveles de TAG hepáticos son influenciadas por las concentraciones de lípidos dietarios (Delgado y col., 2009). Las dietas ricas en grasas suprimen la biosíntesis de AG *de novo*, disminuyendo la contribución al contenido de TAG. No obstante, estos autores encontraron que este efecto es insuficiente para prevenir la elevada concentración de TAG hepáticos. Nuestros resultados, confirman una notable inhibición de la lipogénesis por las dietas ricas en grasas, no obstante, hemos notado ciertas diferencias en las actividades y/o expresiones de enzimas claves involucradas en la regulación de la biosíntesis de AG en función del tipo de grasa dietaria. En este estudio se evaluaron actividades, expresiones y/o flujo a través de enzimas involucradas en ciertos pasos metabólicos claves y que proporcionan diferentes respuestas frente a cambios en el ambiente metabólico. Así la FAS, enzima clave de la lipogénesis, responde rápidamente a manipulaciones dietarias, mientras que enzimas como la G6PDH lo hacen en forma menos pronunciada, pero más afectada por cambios en estados de ayuno/alimentación (Boll y col., 1996). La G6PDH, clave en la provisión de NADPH (50-75%) requerido para la síntesis de AG, presenta una mayor inhibición en los grupos de animales alimentados con altos contenidos de grasas lácteas. Esto probablemente condiciona el flujo de sustratos en las enzimas distales de la lipogénesis, y posiblemente explique una respuesta compensatoria en la expresión génica de las enzimas ACC y FAS.

En trabajos previos de nuestro grupo (Scalerandi y col., 2014) se comprobó que ratones, alimentados con dietas conteniendo niveles recomendados de grasas suplementadas con una mezcla de CLA comerciales o con una mezcla rica en AR, no modificaron la actividad de la enzima G6PDH. Estos resultados, concuerdan con la falta de cambios adicionales en la inhibición ejercida por los altos niveles de grasa dietaria entre los grupos alimentados con las distintas grasas lácteas que contienen diferentes tenores de AR.

La actividad de la enzima ACC, clave en la conversión de acetyl-CoA a malonil-CoA, fue inhibida por la sobrecarga de acil-CoA independientemente del tipo de grasa dietaria. No obstante, la expresión génica de dicha enzima incrementó en los hígados de los animales del grupo GLM30. Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores que trabajaron ya sea, con ratas alimentadas con dietas HF suplementadas con CLA comerciales (Illesca, 2015), como con ratones a niveles recomendados de grasa dietaria suplementada con AR (Degrace y col., 2003). En otros modelos experimentales, por ej., en ratones alimentados con CLA comerciales (Takahashi y col., 2003; Javadi y col., 2004; Ferramosca y col., 2006) o en ratas genéticamente obesas con una dieta suplementada con AV, AR y/o AR+AV (Wang y col., 2009; Jacome-Sosa y col., 2010) se observaron resultados diferentes. Ferramosca y col. (2006) demostraron que el consumo de una mezcla equimolecular de CLA aumenta la transcripción del gen de la proteína transportadora del citrato mitocondrial (CIC) e influye en la estabilidad del ARNm y/o la eficiencia de la traducción, generando una sobreexpresión de CIC y, por consiguiente, un aumento en el flujo de citrato desde las mitocondrias hacia el citosol. El citrato exportado no sólo es el sustrato para la lipogénesis, sino que también es un modulador alostérico positivo de la enzima ACC. Consideramos que, independientemente del efecto del AV y/o AR, la acción sobre la enzima ACC no podría ser adjudicada únicamente a dichos isómeros, dado que los animales del grupo GLE30 tuvieron un incremento en la expresión génica de dicha enzima igual que el observado en GLM30.

En lo que respecta a la enzima FAS, si bien existe una marcada inhibición de la actividad por el nivel de grasa dietaria, la magnitud de la misma fue menor en el grupo GLM30. Estos resultados, que si bien coinciden con lo reportado por otros autores que trabajaron con CLA comerciales (Takahashi y col., 2003; Javadi y col., 2004; Ferramosca y col., 2006; Fariña, 2014; Scalerandi y col., 2014) y fueran justificados mediante una inducción ejercida por el 10*t*,12*c*-CLA sobre los factores de transcripción SREBP-1c y PPAR γ , no explicarían los resultados hallados en nuestro estudio como en los de Scalerandi y col. (2014) con el isómero AR individual. En lo que respecta a la expresión génica o proteica de dicha enzima, los resultados son controversiales (Clément y col., 2002; Takahashi y col., 2003; Choi y col., 2004; Wang, Y. y col., 2006; Purushotham y col., 2007; Jacome-Sosa y col., 2010; Maslak y col., 2015), y pareciera que la alta inducción génica podría asociarse a una respuesta compensatoria en todos los grupos alimentados con altos niveles de grasas lácteas.

La síntesis de AG continúa usualmente hasta la formación de ácido oleico donde la enzima limitante es la SCD. Nuestros resultados, con una remarcable inhibición de la SCD por dietas ricas en AGPI, están en acuerdo con estudios de Miyazaki y Ntambi (2003), donde el mecanismo estaría mediado por una represión del SREBP. En contraste, las dietas ricas en grasas lácteas, a través de

sus AGS podrían inducir la expresión de SCD-1 por un mecanismo que involucra la regulación positiva de PGC-1 β (proteína 1 β coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas) y la coactivación posterior de SREBP-1c y LXR (Lin y col., 2005; Sampath y col., 2007). Muy pocas evidencias hay disponibles sobre la acción de los CLA y/o AV en la regulación de enzima SCD. Trabajos de nuestro grupo (Scalerandi, 2013) han demostrado que dietas suplementadas con una mezcla equimolecular de 10*t*,12*c*- y 9*c*,11*t*-CLA, como también rica en AR, no mostraron diferencias en el flujo a través de la enzima SCD-1, evaluado por las relaciones AGMI/AGS, resultados similares a los encontrados en el presente plan de trabajo. Otros estudios indicaron que el 10*t*,12*c*-CLA inhibió la actividad y expresión de la enzima SCD-1 (Breitlón y col., 1999; Park y col., 2000; Eder y col., 2002).

Finalmente en la síntesis de TAG hepática la enzima DGAT juega un rol fundamental integrando el metabolismo de los carbohidratos (estimulada vía ChREBP) con la síntesis de ácidos grasos (estimulada vía SREBP-1c). La sobreexpresión de la DGAT2 en hígado normalmente es asociada con esteatosis hepática, hipersecreción de VLDL-TAG y provisión de sustratos para la formación de especies moleculares que están asociadas a la resistencia insulínica. La ausencia de cambios observada en nuestros resultados, pese a las modificaciones en el nivel de TAG hepáticos podría estar asociada a que las dietas ricas en grasas empleadas no estimularían cambios mediados por carbohidratos (Zammit, 2013). Asimismo, en nuestro modelo experimental, tampoco observamos diferencias en los niveles de ARNm de los factores de transcripción involucrados en la lipogénesis (SREBP-1a y SREBP-1c) entre las distintas dietas a altos niveles de grasa, resultados que coinciden con lo reportado por otros estudios con dietas suplementadas con AR o mezclas de CLA (Clément y col., 2002; Choi y col., 2004; Wang, Y. y col., 2006).

A la luz de los resultados de las actividades, expresiones y flujo a través de las enzimas lipogénicas, consideramos que los efectos diferenciales que puedan tener el AR, AV y las modificaciones del perfil de AG sobre las diferentes enzimas o reguladores claves de la lipogénesis quedan principalmente enmascarados por la notable inhibición ejercida debido al alto contenido de grasa.

4.2.4- Influencia del transporte de ácidos grasos

Los cambios en la expresión génica de las proteínas transportadoras de AG (FATP2, FATP5 y CD36), correlacionaron con el incremento de los TAG hepáticos en el grupo S30 y con el descenso en las dietas conteniendo grasas lácteas a elevados niveles de lípidos. Estas variaciones han sido observadas en otros modelos experimentales, en las que un incremento en la expresión de

las proteínas transportadoras de AG en hígado se asoció con el desarrollo de hígado graso (Koonen y col., 2007; Falcon y col., 2010; Miquilena-Colina y col., 2011; Black y col., 2016).

Es importante destacar que el CD36 es un regulador clave de la captación de los AG en condiciones de elevados niveles circulantes de los mismos, y funcionalmente cumple un rol central en el desarrollo/prevenición de la esteatosis hepática, como asimismo en la modulación de la sensibilidad a la insulina (Wilson y col., 2016). La notable inhibición de la expresión génica del *Cd36* en el grupo GL30 podría ser un mecanismo clave que, reduciendo la incorporación de AG al hígado, prevendría la elevada acumulación de TAG hepáticos en este grupo dietario. En cambio, podríamos postular que la mayor captación de AG mediada por dicha traslocasa en el grupo GLM30 (*vs* GL30) derivarían en una mayor oxidación a nivel mitocondrial/ peroxisomal y/o en una elevada secreción de VLDL-TAG. Es posible así proponer que, los mayores niveles de ARNm del CD36 en el grupo GLM30 *vs* GL30 no se relacionen con los elevados niveles de AV y/o AR, dado que Clément y col. (2002) no reportaron cambios en los niveles de ARNm de CD36 en hígado de ratones alimentados con una dieta suplementada con AR. Además, los estudios que observaron incrementos en la expresión génica de dicha traslocasa los asociaron con isómero 10*t*,12*c*-CLA (Clément y col., 2002; Degrace y col., 2006; Jourdan y col., 2009; Li y col., 2012). En consecuencia, sin excluir el rol que podría tener el CD36, otros mecanismos podrían estar cumpliendo un rol fundamental en la prevención de la esteatosis hepática en el grupo GL30.

4.3- Regulación de los lípidos circulantes

Es ampliamente conocido que en condiciones de ayuno, los niveles circulantes de TAG dependen principalmente de un equilibrio entre la secreción hepática y la remoción a través de las enzimas lipoproteína lipasas extrahepáticas. El incremento de grasas dietarias estuvo asociado a diferentes respuestas en los TAG circulantes dependiendo del tipo de AG constitutivo de las mismas. Llamativamente, el incremento de grasas poliinsaturadas condujo a una marcada reducción de TAG séricos que no se observó en los grupos de animales alimentados con dietas ricas en grasas lácteas. Estos efectos diferenciales pudieron estar relacionados a distintos mecanismos involucrados dependiendo del tipo y cantidad de grasa dietaria. Así, la clara reducción de los TAG en el grupo S30, que estuvo relacionada con una elevada remoción de los mismos por el tejido adiposo y no por el músculo esquelético, fue seguida de una exacerbada oxidación peroxisomal en el tejido adiposo. Este efecto asociado a la acción de AGPI, no se reflejó en los grupos que recibieron altos niveles de grasas lácteas. En referencia a estos últimos, la GLM30 incrementó aún más la remoción de TAG por el tejido adiposo y no por el músculo, pero esto no se reflejó en una menor concentración de TAG circulantes, probablemente debido a una mayor VSTAG. Es probable que además de la

diferencial oxidación peroxisomal en tejido adiposo observada en el grupo el GL30 y GLE30 (vs S30), otros mecanismos puedan justificar la ausencia de cambio en los TAG circulantes entre los grupos alimentados con altos niveles de grasas lácteas. No podemos descartar que las condiciones de ensayo de la actividad LPL *in vitro*, como medida de la remoción de TAG plasmáticos, no sea diferente a la respuesta que tenga dicha enzima en el tejido presente en un entorno metabólico *in vivo* muy diferente.

Las comparaciones bibliográficas que podrían complementar la interpretación de nuestros resultados han empleado controles que no necesariamente serían análogos a los utilizados en los estudios del presente plan de trabajo. Así, comparando con dietas conteniendo niveles recomendados de GL, estudios de Lock y col. (2005), Anadon y col. (2011) y Rodrigues y col. (2014) han demostrado una disminución en los niveles de TAG séricos en animales alimentados con grasa láctea enriquecida en AR y AV. Mientras que descensos (Ryder y col., 2001; Chinnadurai y col., 2013) o incrementos (Roy y col., 2007; de Almeida y col., 2015a) en los TAG circulantes han sido encontrados en dietas con alto contenido de grasa enriquecida naturalmente con AR y/o AV en comparación con altos niveles de GL. Por otra parte, diversos estudios que evaluaron en humanos el efecto de productos naturalmente enriquecidos en AR y AV no han reportado cambios en las concentraciones de TAG circulantes (Desroches y col., 2005; Tholstrup y col., 2006; Tricon y col., 2006; Venkatramanan y col., 2010; Lacroix y col., 2012). Los estudios mencionados, no aportan información de mecanismos reguladores involucrados en las variaciones de la trigliceridemia.

A nuestro conocimiento no se dispone de estudios proponiendo mecanismos asociados a la regulación de los TAG circulantes con grasas lácteas enriquecidas naturalmente con AR y/o AV. Nuestro grupo de investigación (Scalerandi y col., 2014) ha observado que el elevado contenido de TAG en suero de ratones alimentados con dietas ricas en AGPI n-6 suplementadas con AR procedente de síntesis química, ha sido relacionado con una incrementada VSTAG y disminuida actividad de la LPL en tejido adiposo. Opuestamente, dietas suplementadas con AV han decrecido los niveles de TAG (Wang y col., 2009; Jacome-Sosa y col., 2014) a través de una reducción de la secreción hepática de VLDL. Mezclas de CLA comerciales conteniendo cantidades equimoleculares de AR y 10*t*,12*c*-CLA redujeron los niveles de TAG séricos en ratas con dietas desequilibradas en AGPI (Fariña y col., 2019) a través de un incremento de la actividad LPL en TAE y una disminución de la secreción de TAG. Similarmente, los CLA ejercieron un efecto hipotrigliceridémico en ratones alimentados con dietas ricas en grasas a través de un aumento en la clarificación por el tejido adiposo (Andreoli y col., 2009).

Al igual que en trabajos realizados en animales de experimentación, en humanos, los CLA comerciales o AR de síntesis han mostrado efectos discrepantes sobre los niveles de TAG

circulantes, no habiéndose descrito mecanismos regulatorios (Roche y col., 2002; Risérus y col., 2004a; Tricon y col., 2004; Naumann y col., 2006; Raff y col., 2008; Venkatramanan y col., 2010; Eftekhari y col., 2014). La falta de consistencia en los resultados podría deberse, al menos en parte, a los diferentes estados metabólicos de los sujetos en estudio, dosis empleadas, períodos de tratamiento (Battacharya y col., 2006), como así también, al menor efecto que, en general, los CLA han demostrado tener en el humano.

El modelo experimental empleado no es el más adecuado para el estudio del metabolismo del colesterol, por ello este trabajo de tesis sólo tuvo como objetivo investigar la posible influencia de la dieta GLM30 sobre niveles circulantes de colesterol. Al igual que lo observado en otros estudios, trabajando con manteca enriquecida naturalmente en AR y AV (Roy y col., 2007; Anadon y col., 2011), no hemos encontrado cambios en los niveles de colesterol sérico en los grupos de animales alimentados con altos niveles de GLM y GL. No obstante, resultados muy discrepantes han sido publicados. Por ejemplo, Lock y col. (2005) y Chinnadurai y col. (2013) reportaron un descenso, mientras que Rodrigues y col. (2014) y de Almeida y col. (2015a) observaron un incremento en los niveles de colesterol sérico al comparar animales alimentados con manteca enriquecida naturalmente en AR y AV *vs* grasa láctea.

En lo que respecta a los efectos de los isómeros individuales AR y AV o de la mezcla equimolecular AR + 10*t*,12*c*-CLA sobre los niveles de colesterol sérico, numerosos estudios no reportaron cambios en diferentes modelos experimentales (Bissonauth y col., 2006; Wang, Y. y col., 2006; Andreoli y col., 2007; Moloney y col., 2007; Andreoli y col., 2009; Fariña, 2014; Scalerandi, 2013; de Almeida y col., 2015b; Maslak y col., 2015; Wang, T. y col., 2015; Franczyk-Zarow y col., 2019). Sólo escasos estudios reportaron un descenso en el contenido de colesterol en suero trabajando con dietas suplementadas con AR (Jacome-Sosa y col., 2010), AV (Wang y col., 2009) o AR+AV (Jacome-Sosa y col., 2010).

Resultados discrepantes también fueron observados en humanos que ingirieron productos lácteos enriquecidos naturalmente en AR y AV. Así, Tricon y col. (2006), Venkatramanan y col. (2010) y Lacroix y col. (2012) no reportaron cambios en los niveles de colesterol sérico al comparar con productos lácteos normales, mientras que otros (Desroches y col., 2005; Tholstrup y col., 2006) observaron un efecto hipocolesterolemizante.

4.4- Regulación de los lípidos musculares

Estudios previos de otros autores y de nuestro grupo de trabajo, han mostrado que las dietas ricas en grasas inducen una acumulación de lípidos en músculo de animales de experimentación (Kraegen y col., 1991; Andreoli y col., 2009; Zhang y col., 2013; Illesca y col., 2015). En el presente trabajo, el incremento de los TAG musculares estuvo asociado a mayores niveles de citrato. No obstante, la captación de AG por la LPL, como los niveles de ARNm de receptor de adiponectina y de CPT-1b nos inducen a sugerir que la elevada acreción de TAG pudo estar relacionada a una mayor oferta de lípidos, más que a una alterada metabolización de los mismos. Resulta interesante destacar, que la dieta GLM30, al igual que GLE30, previno la acumulación de TAG en músculo gastrocnemio inducida por dietas ricas en grasas. Este efecto no estuvo vinculado con una menor captación de AG, expresada por la actividad de la enzima LPL muscular. Así, si bien otros estudios deberían complementar los presentes para profundizar en la discusión de la regulación de TAG en músculo, máxime disponiendo de ausencia de cambios en la expresión génica de la CPT-1b, los mayores niveles de ARNm del receptor de adiponectina en el grupo GLM30 nos podrían dar indicios de una mayor oxidación de AG intracelular. No existen trabajos científicos que hayan evaluado el efecto de las grasas lácteas enriquecidas en los isómeros AR y AV sobre los mecanismos reguladores de TAG musculares. No obstante, nuestros resultados concuerdan con lo observado por los de Choi y col. (2007) al trabajar con una dieta suplementada con AR, y se refuerzan con otros resultados de estos mismos autores donde demostraron un incremento en los niveles de ARNm de ACOX y UCP2 en músculo de estos animales (Choi y col., 2004). Contrariamente, en ratones alimentados con dietas suplementadas con el isómero AR, Scalerandi y col. (2014) observaron una acumulación de TAG en músculo relacionada a una elevada captación de lípidos a través de la LPL muscular. Interpretaciones más controversiales pueden ser obtenidas de trabajos realizados con CLA comerciales donde, además de las variables de los modelos experimentales, los efectos del AR sobre el metabolismo de TAG se solapan con acciones muy potentes del isómero 10*t*,12*c*-CLA (Park y col., 1997; Zabala y col., 2006; Kim y col., 2012). Así, algunos estudios en ratones (Andreoli y col., 2009; Kanosky y col., 2013; Scalerandi y col., 2014) y en ratas (Henriksen y col.; 2003) observaron un descenso de los niveles de TAG en músculo gastrocnemio, los cuales pudieron estar asociados a una menor actividad LPL muscular (Andreoli y col., 2009) y/o a una mayor actividad CPT-1b (Scalerandi y col., 2014). No obstante, otros autores no encontraron cambios (Andreoli y col., 2007; Bezan y col., 2018; Fariña y col., 2019) u observaron un incremento en el contenido de TAG (Illesca, 2015).

4.5- Regulación de los lípidos en tejido adiposo

El tejido adiposo blanco no sólo representa un tejido de depósito energético, sino también es un regulador clave de mecanismos homeostáticos del organismo (Wronska y col., 2012). Los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal representan dos de los mayores depósitos de tejidos adiposo blanco en roedores y son modulados en forma diferente, entre otros factores, por la cantidad y tipo de grasas dietarias. Dada la mejor respuesta obtenida en las variaciones de acreción de lípidos en el TAE, y en función de su clara accesibilidad, el mismo fue elegido para profundizar los estudios metabólicos.

La acreción de lípidos en las dietas ricas en grasas mostró ser influenciada por el tipo de ácidos grasos presente en la misma. Así, solamente los animales alimentados con la dieta rica en GL, conteniendo elevados niveles de AGS, presentaron mayores contenidos de grasa epididimal respecto aquellos del grupo S30, exhibiendo el rol que tienen las grasas saturadas sobre los depósitos grasos. Ryder y col. (2001), Lock y col. (2005) y Anadon y col. (2011), al igual que nosotros, no encontraron cambios en la acreción de lípidos en el tejido adiposo de roedores alimentados con dietas enriquecidas con AR y AV. Los autores antes mencionados no estudiaron los mecanismos involucrados en la acción de los diferentes AG bioactivos. Mientras que, nuestros resultados permiten sugerir que la mayor captación de AG y sensibilidad tisular reflejada por la expresión génica de adiponectina, podrían conducir a una mayor oxidación de AG, como queda reflejado por los elevados niveles de ARNm de la enzima clave en la β -oxidación de AG, y no a una mayor resíntesis de TAG, como los muestran los muy bajos niveles de la enzima esterificante de TAG.

Existe escasa información referente a los mecanismos involucrados en la regulación de la acreción de lípidos en tejido adiposo por los CLA. Se ha descrito, en estudios *in vitro* en adipocitos 3T3-L1 aislados, que la mayor acción inhibitoria de los CLA sobre la enzima LPL estuvo relacionada al isómero 10*t*,12*c*-CLA (Park y col., 1999; Lin y col., 2001b). Resultados semejantes a los encontrados con este isómero, han sido obtenidos por nuestro grupo (Andreoli y col., 2009; Scalerandi y col., 2014) en ratones alimentados con mezclas equimoleculares de CLA. No obstante, en ratas alimentadas con la misma mezcla comercial de isómeros, encontramos ausencia de cambios (Andreoli y col., 2010) o aumentos (Illesca, 2015 y Fariña y col., 2019) en la actividad de dicha enzima. Por consiguiente, independientemente de cualquier posible efecto del 10*t*,12*c*-CLA que pudiese contrarrestar una acción estimuladora del AR y AV sobre la enzima, resulta claro que además de la acción ejercida por el tipo de isómero, los mecanismos de acción de los CLA dependen de otras variables del protocolo experimental.

Pareciera que la lipólisis seguida de β -oxidación mitocondrial y la esterificación de AG a TAG podrían jugar un rol clave en el mantenimiento de la masa adiposa en el grupo de roedores que consumieron GLM30. En este sentido, el incremento observado en los niveles de ARNm de una enzima clave de la vía de la lipólisis de AG (ATGL) en TAE está en concordancia, en cierta medida, con lo observado en estudios *in vivo* usando CLA comerciales (Park y col., 1997 y 1999; Mersmann, 2002). Asimismo, el aumento en la β -oxidación mitocondrial esta en correlación con lo observado por Park y col. (1997) y Rahman y col. (2001) en el tejido adiposo blanco y marrón de animales de experimentación alimentados con CLA, al igual que la ausencia de cambios en la β -oxidación peroxisomal reportada también por Choi y col. (2004).

El mayor catabolismo de lípidos, podría estar favorecido por un entorno donde una mayor sensibilidad insulínica promovida por la adiponectina, no sólo incrementaría la utilización de glucosa, sino que también la oxidación de AG. En nuestro trabajo la elevada expresión del ARNm de adiponectina en TAE de animales del grupo GLM30 se correlacionó con lo observado por otros autores trabajando en distintos modelos experimentales con dietas suplementadas con CLA comercial (Nagao y col., 2003; Inoue y col., 2004; Noto y col., 2007; Fariña, 2014). Sin embargo, otros estudios no reportaron cambios en la expresión proteica de la misma en TAE de ratas *Zucker* alimentadas con una dieta suplementada con AR (DeClercq y col., 2012a y 2012b), como también niveles disminuidos de adiponectina en tejido adiposo de ratones (Poirier y col., 2005b y 2006), y en adipocitos aislados (Pérez-Matute y col., 2007) tratados con la mezcla equimolecular de isómeros.

Las grasas lácteas naturalmente enriquecidas en CLA y AV no han mostrado efectos sobre la masa y distribución de TA en humanos (Desroches y col., 2005; Venkatramanan y col., 2010), y los efectos de los CLA sintéticos han sido poco concluyentes. Al respecto, Blankson y col. (2000) y Risérus y col. (2001) mostraron un efecto antiobesogénico de dichos isómeros, mientras que Zambell y col. (2000), Mougios y col. (2001), Petridou y col. (2003) y Tricon y col. (2004), no encontraron respuesta, tanto con la mezcla equimolecular de isómeros, como con el AR. Las diferencias, podrían ser atribuidas a diversidades en los diseños experimentales entre las cuales se encuentran: tipo de isómeros, dosis y duración de tratamiento, como también género, peso, edad y estado metabólico de los sujetos estudiados.

5- Dieta GLM30: influencia sobre el estado oxidativo

Como biomarcadores de la lipoperoxidación hepática se emplearon las concentraciones de TBARS y ROS, y como medida del equilibrio oxidativo algunos de los principales sistemas antioxidantes enzimáticos (ej.: SOD, CAT, GSH-Px y GR), y no enzimáticos (relación glutatión

reducido/ oxidado -GSH/GSSG-). Los niveles de TBARS y ROS, sugieren que el elevado contenido de grasa dietaria incrementó la lipoperoxidación hepática, y este efecto fue dependiente del tipo de AG dietarios. Así, la prevención del desarrollo de estrés oxidativo hepático por la dieta GLM30, fue acompañada de un descenso de dichos biomarcadores. En concordancia con nuestros resultados Chinnadurai y col. (2013) observaron similar efecto preventivo empleando una grasa láctea anhidra enriquecida naturalmente con CLA y AV. Además, un trabajo realizado por Choi y col. (2007) mostró una disminución en los niveles de ROS en animales que consumieron una dieta suplementada con AR. Otros estudios, trabajando con CLA comercial, mostraron resultados discrepantes al no encontrar cambios en los niveles de TBARS (Andreoli y col., 2010; Scalerandi, 2013; Fariña, 2014; Illesca, 2015) o encontrarlos disminuidos (Livisay y col., 2000; Kim y col., 2005).

Ha sido reportado que las ROS, y los productos derivados de la LPO, inducen la síntesis de citoquinas proinflamatorias como, $TNF\alpha$, $TGF-\beta$ e $IL-6/IL-8$ (Carter-Kent y col., 2008) a través de la activación de la vía del $NF-\kappa\beta$ (Feldstein y col., 2010a). La elevación de los biomarcadores de lipoperoxidación inducidos por altos niveles de grasa dietaria, tuvieron un paralelismo con la expresión génica de $Nf-\kappa\beta$ y, sólo en el grupo GL30, también con los niveles de ARNm de $TNF\alpha$ e $IL-6$. Asimismo, el efecto preventivo de la dieta GLM30 sobre el estrés oxidativo fue acompañado de una reducción de la expresión génica de $Tnfa$, $Il-6$ y $Nf-\kappa\beta$. Este efecto preventivo del AR fue previamente observado por Couper y col. (2008) en cultivos celulares. Otros estudios *in vitro* han demostrado que los CLA, particularmente el isómero AR, puede disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente $IL-6$, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ e $IL-1\beta$, que juegan un papel importante en la patogénesis de muchas enfermedades mediadas por inflamación crónica (Yu y col., 2002; Jaudszus y col., 2005; Peterson y col., 2009; Bassaganya-Riera y Hontecillas, 2010; Oleszczuk y col., 2012). Estudios *in vivo* con diferentes modelos experimentales usando mezclas equimoleculares de CLA comercial han arrojado resultados similares al evaluar distintos tejidos. En este sentido, Butz y col. (2007) informaron en ratones una menor concentración plasmática de $TNF\alpha$. Asimismo, Noto y col. (2007) reportaron en tejido adiposo de ratas obesas, y Nagao y col. (2005) y Fariña (2014) en hígados de ratas un descenso en los niveles de ARNm del mismo factor de transcripción.

Las células poseen diferentes mecanismos para neutralizar el estrés oxidativo y, entre ellos $Nrf2$ se considera el principal mediador de la adaptación celular al estrés redox (Niture y Jaiswal, 2014). Estudios de Bergamo y col. (2007 y 2011) han demostrado que la mezcla equimolecular de CLA activa la vía $Nrf2$ y, en consecuencia, modula la función mitocondrial hepática (Pereira y col., 2012). A diferencia de lo reportado por Bergamo y col. (2007 y 2011), como así también por

Mollica y col. (2014) trabajando con ratas alimentadas con dietas ricas en grasas y suplementadas con AR, nuestro trabajo mostró una disminución en la expresión génica de *Nrf2* en los hígados de los animales alimentadas con GLM30. Esto podría estar relacionado a que, contrariamente a lo que sucede con la GLM30, las dietas GL30 y S30 podrían inducir la vía *Nrf2* para neutralizar el estrés oxidativo evidenciado por los altos niveles de TBARS y ROS.

Respecto a las enzimas intervinientes en la regulación del equilibrio oxidativo, nuestros resultados, en el grupo GLM30, muestran un descenso en la actividad de CAT y disminución en la expresión génica de las enzimas CAT y GR, como también un incremento en la de la enzima SOD. Estos resultados reflejan una complejidad en el análisis conceptual, máxime considerando los escasos estudios que podrían contribuir a dicha interpretación, los cuales brindan resultados opuestos a los encontrados en este estudio para las enzimas CAT, GR y GSH-Px. En este sentido, Chinnadurai y col. (2013), con grasa láctea anhidra enriquecida naturalmente con CLA y AV, encontraron un incremento de la actividad de la enzima CAT, al igual que Illesca (2015) con dietas ricas en CLA comerciales. Similarmente, Choi y col. (2007) reportaron un incremento en las actividades de GR y GSH-Px al suplementar la dieta con AR. Es probable que frente a estos resultados la enzima SOD, cumpla un rol central en la regulación del estrés oxidativo. En este sentido, el incremento encontrado de la expresión génica de dicha enzima, es congruente con el trabajo de Chinnadurai y col. (2013) en grasa láctea anhidra enriquecida naturalmente con CLA+AV y el de Choi y col. (2007) en dietas suplementadas con AR.

Del mismo modo, resultados inesperados hemos encontrados en el sistema antioxidante no enzimático expresado por la relación GSH/GSSG en los hígados de los animales GLM30. Estos resultados no concuerdan con lo observado por otros autores, los cuales encontraron que al usar tanto, una mezcla equimolecular, como el isómero individual AR incrementan los niveles de GSH (Arab y col., 2006; Choi y col., 2007; Mollica y col., 2014).

Es posible formular la hipótesis que, la menor actividad y expresión de los sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos en hígado estarían relacionadas a la ausencia de estrés oxidativo en el grupo GLM30, reflejado por los bajos niveles de TBARS y de *Nrf2*.

Los estudios en humanos sobre estrés oxidativo e ingesta de productos lácteos naturalmente enriquecidos en *9c,11t*-CLA son escasos y con resultados discrepantes. Así, algunos autores no han observado cambios (Desroches y col., 2005; Tricon y col., 2006; Venkatramanan y col., 2010), mientras que otros (Sofi y col., 2009; Penedo y col., 2013) reportaron un descenso en los niveles circulantes de los marcadores de inflamación (TNF α y citoquinas proinflamatorias).

6- Dieta GLM30: influencia sobre el metabolismo de la glucosa

Las variaciones en el contenido de lípidos tisulares en las presentes experiencias fueron asociadas a alteraciones en la utilización de la glucosa. Estos hallazgos han sido extensamente reportados en trabajos de otros investigadores empleando animales alimentados con dietas ricas en grasas (Storlien y col., 1986; Lichtenstein y Schwab, 2000). El estado de intolerancia a la glucosa observado en modelos animales (Randle, 1963; Carvalho-Filho y col., 2005; Hirabara y col., 2012) es compartido en numerosas situaciones patológicas en humanos, como diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Sin embargo, además de la cantidad de grasa, este efecto depende del tipo de ácido graso (Storlien y col., 1987 y 1991), como asimismo de mediadores bioactivos y/o factores de transcripción generados o inducidos por los distintos AG dietarios (Schmitz-Peiffer, 2000; Andersson y col., 2002). Las principales diferencias se manifestaron entre la dieta conteniendo elevados niveles de aceite de soja rico en AGPI y grasas lácteas fuente de AGS. Es importante destacar que las diferencias con los trabajos de Storlien y col. (1987 y 1991) fueron centradas en que dichos autores emplearon como fuente de AGPI n-3 aceites de pescado ricos en EPA y DHA y compararon con dietas ricas en grasas saturadas de sebo. Es conocido que a los AGPI-CL, EPA y DHA, se les atribuyen acciones moduladoras sobre el metabolismo de la glucosa, y que las fuentes de ALA, como el aceite de soja, no incrementan los niveles tisulares de dichos AG, como lo inducen la ingesta directa de alimentos fuentes de los mismos (Bowen y Clandinin, 2000; Morise y col., 2004; Barceló-Coblijn y col., 2005).

6.1- Capacidad de utilización de la glucosa y parámetros relacionados

Comparando con la dieta rica en aceite de soja, el consumo de grasas lácteas, si bien indujo hiperglucemia basal, mejoró la capacidad de utilización de glucosa (reflejado por una disminución del área incremental bajo la curva) y normalizó los niveles séricos de insulina basal. Los efectos benéficos de la GLM30 en los parámetros antes mencionados no mostraron diferencias con las grasas lácteas, GL y GLE, pero los mecanismos subyacentes fueron diferentes. Estos resultados estuvieron en concordancia con los de Ryder y col. (2001), quienes en animales alimentados con altos niveles de manteca enriquecida naturalmente en AR/AV no mostraron diferencias en la glucemia, insulinemia, índice HOMA y utilización de la glucosa, respecto a animales alimentados con manteca control. En estudios con grasas lácteas enriquecidas naturalmente con AR y AV, de Almeida y col. (2015a) observaron mejoras en parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa, pero con características diferentes a nuestros hallazgos. El principal beneficio que encontraron con la GL enriquecida con AV y AR frente a la grasa láctea estándar fue la reducción

de los niveles de insulina, lo cual lo asociaron con una disminución en el contenido de AGS de la dieta. Al mismo tiempo, los autores no encontraron diferencias en los niveles de glucemia, ni en la utilización de la glucosa frente a una sobrecarga, como tampoco en el índice HOMA. Es importante destacar que el modelo experimental empleado por de Almeida y col. (2015a) es diferente al del presente estudio, no habiendo encontrado alteraciones en los valores basales de glucosa e insulina, ni en los índices de sensibilidad a la insulina con altos niveles de aceite de soja. Los autores han empleado un modelo experimental diferente, con ratas de mayor edad y a niveles de grasas más bajos que los empleados en el presente trabajo de tesis, y principalmente, no profundizaron los mecanismos de acción de las grasas lácteas sobre el metabolismo de la glucosa.

Otros estudios no han encontrado cambios en parámetros generales, como por ejemplo en los niveles de glucosa en animales de experimentación (Anadón y col., 2011; Rodrigues y col., 2014) y en glucosa e insulina en humanos (Tholstrup y col., 2006; Tricon y col., 2006) alimentados con lácteos enriquecidos en AR/AV al comparar con lácteos conteniendo bajos niveles de estos isómeros. La ausencia de cambios en la glucemia e insulinemia por dietas suplementadas con AV y/o AR, también han sido reportados en distintos modelos experimentales (Clément y col., 2002; Akahoshi y col., 2003; Wang y col., 2008; Halade y col., 2010; Mohankumar y col., 2013) y en humanos (Noone y col., 2002; Risérus y col., 2004; Tricon y col., 2004). En referencia al efecto de las mezclas equimoleculares de CLA comerciales sobre los niveles de glucosa e insulina, los resultados son muy discrepantes (Henriksen y col., 2003; Purushotham y col., 2007; Halade y col., 2010; Andreoli y col., 2012; Fariña, 2014; Scalerandi y col., 2014; de Moraes y col., 2017). Esto es debido al efecto diferencial del isómero 10*t*,12*c*-CLA respecto al del AR y/o AV presente en las GLM sobre el metabolismo de la glucosa, lo cual no amerita su profundización en la presente discusión.

6.2- Regulación del metabolismo de la glucosa

La menor capacidad de utilización de glucosa en los animales alimentados con altos niveles de aceite de soja pudo estar relacionada a un menor flujo de sustrato a través de la hexoquinasa y a una inhibición de la enzima clave, PFK-1 α , ejercida por los altos niveles de citrato intracelular (Garland y Randle, 1964; Randle y col., 1965). Esta inhibición de la glucólisis a nivel de enzimas claves, condujo a un incremento en los niveles de glucosa intracelular, posiblemente impidiendo una mayor captación y oxidación frente a una sobrecarga de dicho carbohidrato. En contraste, una mayor actividad de la PFK-1 α , junto con un incremento en la expresión génica del receptor de adiponectina que mejoran la sensibilidad de la acción insulínica, podrían estar conjugando acciones benéficas sobre el metabolismo glucídico en los animales alimentados con dietas ricas en grasas

lácteas. En esta línea de hipótesis, es factible que parte de los efectos sean inducidos por el AR y/o AV. Esto, si bien no se manifiesta en una clara diferencia en la glucemia basal, ni en la respuesta a la sobrecarga de glucosa en el grupo GLM30, tiene como sustento el mayor flujo de sustrato a través de la PFK-1 α y el nivel de ARNm del receptor de adiponectina, junto con estudios previos en otros modelos experimentales. Específicamente, Fariña y col. (2014) reportaron un aumento en la capacidad de oxidación, acompañado de una mejora en la captación e incorporación de glucosa en músculo soleo aislado de ratas alimentadas con la mezcla equimolecular de AR y 10*t*,12*c*-CLA. También otros autores, han demostrado un mejoramiento en la acción insulínica por efecto de los CLA comerciales (Choi y col., 2004), asociado a una mayor tolerancia a la glucosa (Ryder y col., 2001; Henriksen y col., 2003; Andreoli, 2008). Es importante denotar que en ratones, cuyo comportamiento frente a los CLA comerciales es muy diferente al de las ratas, estudios previos de nuestro grupo han demostrado efectos opuestos. Específicamente, Andreoli y col. (2012), observaron incrementos de los niveles de glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato, y una inhibición del flujo a través de la enzima PFK-1 α en músculo gastrocnemio, pese a no observar cambios en los niveles de citrato.

En forma semejante a lo descrito por diversos investigadores (Ryder y col., 2001; Andreoli y col., 2012) con dietas enriquecidas con diferentes tipos de CLA, no hemos reportado cambios en el contenido de glucógeno en músculo gastrocnemio de animales alimentados con dietas ricas en grasas lácteas. Contrariamente, de Moraes y col. (2017) reportaron un incremento en el contenido de glucógeno en músculo de animales alimentados con CLA comercial.

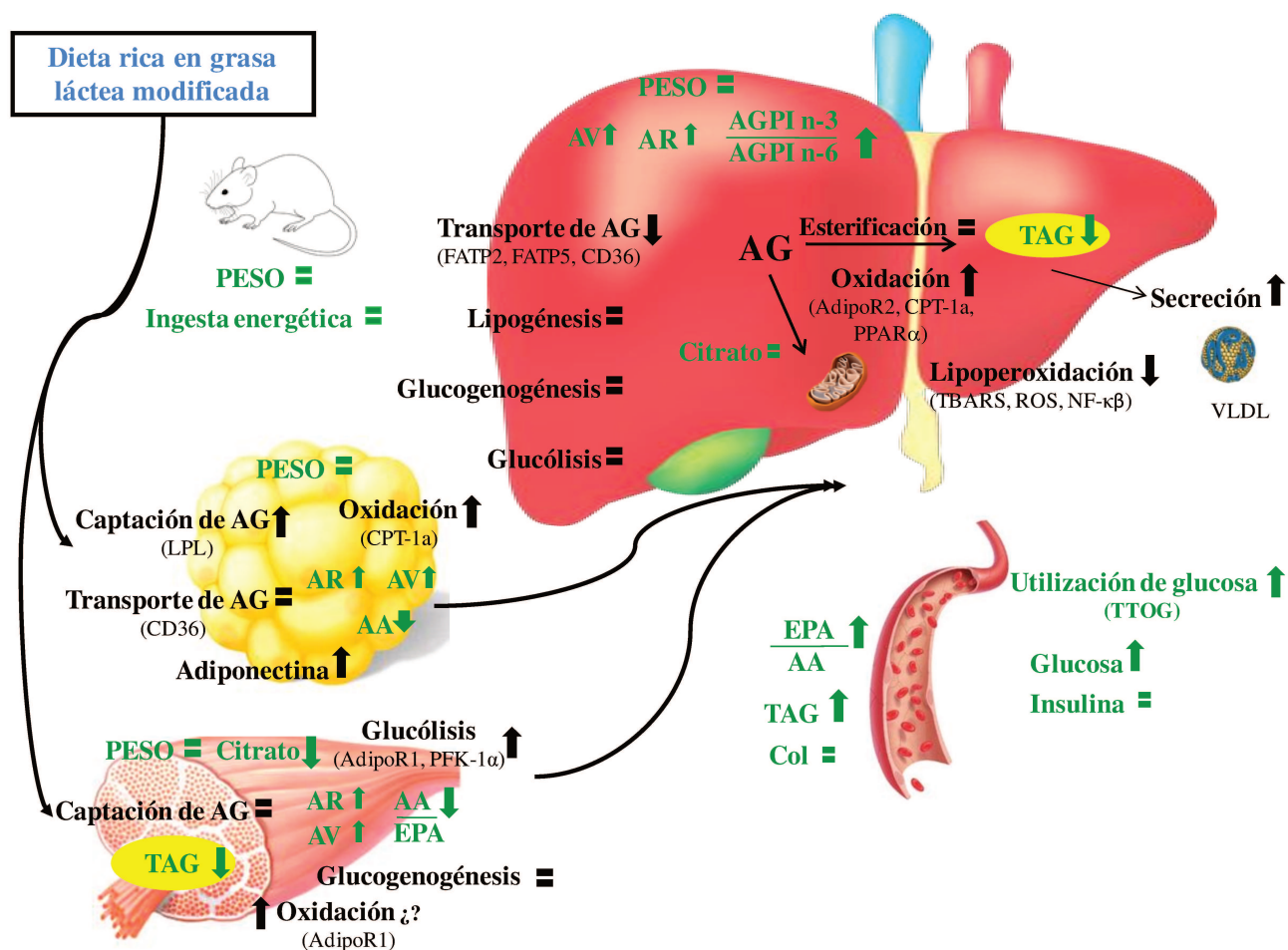
Otro tejido clave involucrado en el metabolismo de la glucosa es el hígado. A nivel hepático el incremento en el contenido de grasa, independientemente del tipo de ácidos grasos dietarios, condujo a una fuerte inhibición de la glucoquinasa (GK), enzima clave de la fosforilación de glucosa a G-6-P. La inhibición del flujo a través de la GK por las dietas conteniendo 30% (p/p) de grasa, podría ser resultado de una inhibición a nivel transcripcional regulado por el SREBP-1c. En este sentido, se ha demostrado que el SREBP-1c, junto con ChREBP, funcionan en forma sinérgica para regular genes hepáticos implicados en la utilización de la glucosa, como por ejemplo, la GK y las enzimas de la vía lipogénica (Bécard y col., 2001; Shimano, 2001; Dentin y col., 2005). Los niveles equivalentes de ARNm del ChREBP a altos niveles de grasa dietaria, podrían ser explicados por un bajo contenido de G-6-P intracelular, el cual es esencial para la activación transcripcional de dicho regulador (Dentin y col., 2012). La ausencia de efecto diferencial sobre la GK por la GLM30, guarda cierta correlación con lo reportado por Choi y col. (2004), quienes encontraron resultados similares en animales alimentados con dietas ricas en grasas suplementadas con AR y/o con CLA comercial.

Es posible que la inhibición de la glucólisis por altos contenidos de grasas dietarias, este asociada a una derivación de la glucosa hacia la síntesis de glucógeno en los animales alimentados con dietas ricas en aceite de soja y en GL, pero no la GLM y GLE. Estos resultados, podrían estar asociados a una menor acumulación de glucógeno inducido por el AR y/o AV, como fuera reportado por Maslak y col. (2015). No obstante, este supuesto no explica totalmente las diferencias existentes entre los distintos grupos alimentados con grasas lácteas. Otros investigadores reportaron un incremento del contenido de glucógeno en hígado de animales de experimentación alimentados con una dieta suplementada, tanto con AR (Choi y col., 2007), como con CLA comercial (Choi y col., 2007; Andreoli y col., 2012).

Además, en los grupos alimentados con altos contenidos de grasas es posible prever una diferente sensibilidad a la acción de la insulina. Los animales que consumieron altos niveles de aceite de soja presentaron hiperinsulinemia, pero muy baja expresión génica de *AdipoR2*. El efecto sobre éste último fue observado también por Beylot y col. (2006), en ratas *Wistar* tratadas con dieta rica en grasas (sebo y soja). De este modo, podría asociarse el déficit de receptor AdipoR2 con una resistencia insulínica en el grupo S30, pero no en los grupos con grasas lácteas y, principalmente, con GLM. Este hallazgo coincide con lo reportado por Choi y col. (2007) quienes concluyeron que la mejora en la sensibilidad a la insulina en animales alimentados con una dieta rica en grasas suplementada con AR está ligada a un incremento en la expresión génica del receptor hepático de adiponectina.

En la **Figura 62** se muestra el mapa metabólico del efecto preventivo de la dieta GLM30 sobre las alteraciones inducidas en el modelo experimental de dietas ricas en AG insaturados.

Figura 62- Cuadro metabólico de los efectos benéficos inducidos por la grasa láctea modificada.



Conclusiones

CONCLUSIONES

Los hallazgos de la presente tesis, demuestran que una grasa láctea modificada enriquecida moderadamente en ácidos grasos bioactivos (ácido ruménico y ácido *trans*-vaccénico) y reducida en ácidos grasos saturados, previene el desarrollo de esteatosis hepática, exacerba la acumulación de lípidos en músculo, mejora el estado lipoperoxidativo hepático y la utilización de la glucosa en un modelo animal experimental caracterizado por alteraciones lipídicas y glucídicas inducidas por dietas ricas en grasas.

Los principales mecanismos involucrados de la GLM30 en los efectos benéficos estuvieron relacionados con:

- ✓ Una marcada incorporación de los isómeros AR y AV en tejidos, los cuales pudieron generar un entorno lipídico-metabólico favorable para la formación de mediadores biológicos con acciones benéficas e inducción de efectos funcionales.
- ✓ La prevención del desarrollo de esteatosis hepática estuvo asociado a un incremento en la secreción de VLDL-TAG y en la β -oxidación mitocondrial, reflejada por una mayor expresión génica de *Adipor2* y *Ppara* e incrementada actividad CPT-1a. Además el descenso en la expresión génica de proteínas transportadoras de AG podría ser un factor adicional contribuyendo a una menor síntesis de TAG y en consecuencia a una reducción de los depósitos hepático de lípidos.
- ✓ Un descenso en los niveles de LPO y ROS, de la expresión génica de *Nf- κ β* y un mejoramiento en los niveles de AG precursores de mediadores anti-inflamatorios, pudieron jugar un rol crucial en la prevención del desarrollo de estrés oxidativo hepático.
- ✓ La mayor utilización de glucosa puede ser atribuida a la conjunción de un mejoramiento en la sensibilidad a la insulina mediada por la adiponectina y probablemente por cambios en el perfil de AG de lípidos de membranas, un incremento en la glucólisis, reflejada por un elevado flujo y actividad de la enzima PFK-1 α , y una reducción de los depósitos lipídicos musculares.

Los efectos mencionados por el consumo de GLM, no pueden ser totalmente atribuidos a la acción de los isómeros AR y AV, dado que ciertos beneficios también han sido observados en los animales alimentados con GL30 y GLE30.

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 de una grasa láctea modificada, caracterizada por un enriquecimiento natural moderado de AR y AV, acompañado por una reducción de AGS, podría ser de gran utilidad para el desarrollo de alimentos funcionales, eficaces para el tratamiento o prevención de alteraciones observadas en ECNT, como hígado graso no alcohólico e intolerancia a la glucosa.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

Abbott, S.; Else, P. y Hulbert, A. (2009). *Membrane fatty acid composition of rat skeletal muscle is most responsive to the balance of dietary n-3 and n-6 PUFA*. Br. J. Nutr. 103(4): 522-529.

Adamo, K. y Graham, T. (1998). *Comparison of traditional measurements with macroglycogen and proglycogen analysis of muscle glycogen*. J. Appl. Physiol. 84(3): 908-913.

Adiels, M.; Westerbacka, J.; Soro-Paavonen, A. y col. (2007). *Acute suppression of VLDL secretion rate by insulin is associated with hepatic fat content and insulin resistance*. Diabetologia. 50: 2356-2365.

Adlof, R.O.; Duval, S. y Emken, E.A. (2000). *Biosynthesis of conjugated linoleic acid in humans*. Lipids. 35: 131-135.

Aebi, H. (1984). *Catalase in vitro*. Methods Enzymol. 105: 121-126.

Akahoshi, A.; Koba, K.; Ohkura-Kaku, S.; Kaneda, N.; Goto, C.; Sano, H. y col. (2003). *Metabolic effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rats*. Nutr. Res. 23: 1691-1701.

Akahoshi, A.; Koba, K.; Ichinose, F.; Kaneko, M.; Shimoda, A.; Nonaka, K. y col. (2004). *Dietary protein modulates the effect of CLA on lipid metabolism in rats*. Lipids. 39(1): 25-30.

Akaln, S.; Gönc, S. y Ünal, G. (2006). *Functional Properties of Bioactive Components of Milk Fat in Metabolism*. Pak. J. Nutr. 5: 194-197.

Akieda-Asai, S.; Koda, S.; Sugiyama, M.; Hasegawa, K.; Furuya, M.; Miyazato, M. y col. (2013). *Metabolic features of rats resistant to a high-fat diet*. Obes. Res. Clin. Pract. 7(4): e243-50.

Alasnier, C.; Berdeaux, O.; Chardigny, J. y Sébédio, J. (2002). *Fatty acid composition and conjugated linoleic acid content of different tissues in rats fed individual conjugated linoleic acid isomers given as triacylglycerols*. J. Nutr. Biochem. 13: 337-345.

Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. (1994). *Membrane structure*. En *Molecular biology of the cell*. (3° ed.). New York: Garland Publishing, Inc.

Albuquerque, K.; Sardinha, F.; Telles, M.; Watanabe, R.; Nascimento, C.; Tavares do Carmo, M. y Ribeiro, E. (2006). *Intake of trans fatty acid-rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring*. Nutrition. 22: 820-829.

Almendingen, K.; Jordal, O.; Kierulf, P.; Sandstad, B. y Pedersen, J. (1995). *Effects of partially hydrogenated fish-oil, partially hydrogenated soybean oil, and butter on serum-lipoproteins and Lp(A) in men*. J. Lipid Res. 36: 1370-1384.

Álvarez-Bueno, C.; Caverro-Redondo, I.; Martínez-Vizcaino, V.; Sotos- Prieto, M.; Ruiz, J.R. y Gil, A. (2019). *Effects of milk and dairy product consumption on type 2 diabetes: overview of systematic reviews and meta-analyses*. Adv. Nutr. 10(2): S154-S163.

Alwan, A.; MacLean, D.; Riley, L.; Espaignet, E.; Mathers, C.; Stevens, G. y col. (2010). *Monitoring and surveillance of chronic non-communicable diseases: progress and capacity in high-burden countries*. The Lancet. 376 (9755): 1861-1868.

Alwan, A. (2011). *Global status report on noncommunicable diseases 2010*. World Health Organization.

Anadon, A.; Martinez-Larranaga, M.; Martinez, M.; Ares, I.; Ramos, E.; Gomez-Cortes, P. y col. (2011). *A 4-week repeated oral dose toxicity study of dairy fat naturally enriched in vaccenic, rumenic and α -linolenic acids in rats*. J. Agric. Food Chem. 59(14): 8036-8046.

Andersen, M.; Clewell, H.; Gearhart, J.; Allen, B. y Barton, H. (1997). *Pharmacodynamic model of the rat estrus cycle in relation to endocrine disruptors*. J. Toxicol. Environ Health. 52: 189-209.

Andersson, A.; Nalsen, C.; Tengblad, S.; Vessby, B. (2002). *Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans*. Am. J. Clin. Nutr. 76: 1222-1229.

Andreoli, M. (2008). *Impacto Bioquímico-Nutricional de los Conjugados del Ácido Linoleico (CLA) en Animales Normales y en Recuperación Post Depleción Proteica Leve*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.

Andreoli, M.; Scalerandi, M.; Borel, I. y Bernal, C. (2007). *Effects of CLA at different dietary fat levels on the nutritional status of rats during protein repletion*. Nutrition. 23: 827-835.

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

Andreoli, M.; Illesca, P.; González, M. y Bernal, C. (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.

Andreoli, M.; Martinelli, M.; Scalerandi, M.; Fariña, A.; Williner, M. y Bernal, C. (2012). *CLA prevents alterations in glycolytic metabolites induced by a high fat diet*. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 114: 718-725.

Angélico, L.; Deminice, R.; Leme, I.; Lataro, R. y Jordao, A. (2012). *Bioelectrical impedance analysis and anthropometry for the determination of body composition in rats: effects of high-fat and high-sucrose diets*. *Rev. Nutr.* 25(3): 331-339.

Aoyama, T.; Nosaka, N. y Kasai, M. (2007). *Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids*. *J. Med. Invest.* 54: 385-388.

Appel, L.; Sacks, F.; Carey, V.; Obarzanek, E.; Swain, J.; Miller, E. y col. (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.

Araya, J.; Rodrigo, R.; Videla, L.A.; Thielemann, L.; Pettinelli, P. y col. (2004). *Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid n-6/n-3 ratio in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease*. *Clin. Sci.* 106: 635-643.

Araya, J.; Rodrigo, R.; Pettinelli, P.; Araya, A.V.; Poniachik, J. y col. (2010). *Decreased liver fatty acid Δ -6 and Δ -5 desaturase activity in obese patients*. *Obesity*. 18: 1460-1463.

Arner, P. (2003). *The adipocyte in insulin resistance: Key molecules and the impact of the thiazolidinediones*. *Trends Endocrinol. Metab.* 14: 137-145.

Arner, P. (2005). *Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role*. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 19(4): 471-482.

Astrup, A. (2014). *Yogurt and dairy product consumption to prevent cardiometabolic diseases: epidemiologic and experimental studies*. *Am. J. Clin. Nutr.* 99(5): S1235-1242.

Auberval, N.; Dal, S.; Bietiger, W.; Pinget, M.; Jeandidier, N.; Maillard-Pedracini, E. y col. (2014). *Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet*. Diabetol. Metab. Syndr. 6: 130.

Auldist, M.; Kay, J.; Thomson, N.; Napper, A. y Kolver, E. (2002). *Concentrations of conjugated linoleic acid in milk from cows grazing pasture or fed a total mixed ration for an entire lactation*. Proc. NZ Soc. Anim. Prod. 62: 240-247.

Aune, D.; Navarro-Rosenblatt, D.; Chan, D.; Vieira, A.; Vieira, R.; Greenwood, D. y col. (2015). *Dairy products, calcium, and prostate cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies*. Am. J. Clin. Nutr. 101(1): 87-117.

Austin, G.; Ogden, L. y Hill, J. (2011). *Trends in carbohydrate, fat, and protein intakes and association with energy intake in normal-weight, overweight, and obese individuals: 1971-2006*. Am. J. Clin. Nutr. 93(4): 836-843.

Axen, K.V.; Dikeakos, A. y Sclafani, A. (2003). *High dietary fat promotes syndrome X in nonobese rats*. J. Nutr. 133: 2244-2249.

Ayre, K. y Hulbert, A. (1996). *Dietary fatty acid profile influences the composition of skeletal muscle phospholipids in rats*. J. Nutr. 126: 653-662.

Azain, M.; Hausman, D.; Sisk, M.; Flatt, W. y Jewell, D. (2000). *Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number*. J. Nutr. 130: 1548-1554.

Bagnol, D.; Al-Shamma, H.; Behan, D.; Whelan, K. y Grottick, A. (2012). *Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents*. Curr. Protoc. Neurosci. 9(9): 1-13.

Ballesteros-Vásquez, M.; Valenzuela-Calvillo, L.; Artalejo-Ochoa, E. y Robles-Sardin, A. (2012). *Ácidos grasos trans: un análisis del efecto de su consumo en la salud humana, regulación del contenido en alimentos y alternativas para disminuirlos*. Nutr. Hsp. 27(1): 54-64.

Bandosz, P.; O'Flaherty, M.; Rutkowski, M.; Kypridemos, C.; Guzman- Castillo, M.; Gillespie, D. y col. (2015). *A victory for statins or a defeat for diet policies? Cholesterol falls in Poland in the past decade: a modeling study*. Int. J. Cardiol. 185: 313-319.

- Banni, S.; Carta, G.; Contini, M.S.; Angioni, E.; Deiana, M.; Dessi, M. y col. (1996). *Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products and lamb tissues*. Nutr. Biochem. 7: 150-155.
- Banni, S.; Angioni, E.; Casu, V.; Melis, M. P.; Carta, G.; Corongiu, F. y col. (1999). *Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid*. Carcinogenesis 20: 1019-1024.
- Banni, S.; Angioni, E.; Murru, E.; Carta, G.; Melis, M.P.; Bauman, D. y col. (2001). *Vaccenic Acid Feeding Increases Tissue Levels of Conjugated Linoleic Acid and Suppresses Development of Malignant Lesions in Rat Mammary Gland*. Nutr. Cancer. 41: 91-97.
- Barceló-Coblijn, G.; Collison, L.; Jolly, C. y col. (2005). *Dietary α -linolenic acid increases brain but not heart and liver docosahexaenoic acid levels*. Lipids. 40: 787-798.
- Barrows, B.; Timlin, M. y Parks, E. (2005). *Spillover of dietary fatty acids and use of serum nonesterified fatty acids for the synthesis of VLDL-triacylglycerol under two different feeding regimens*. Diabetes. 54: 2668-2673.
- Barrubés, L.; Babio, N.; Becerra-Tomás, N.; Rosique-Esteban, N. y Salas-Salvadó, J. (2019). *Association between dairy product consumption and colorectal cancer risk in adults: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies*. Adv. Nutr. 10(2): S190-S211.
- Bassaganya-Riera, J. y Hontecillas, R. (2010). *Dietary conjugated linoleic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel disease*. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. 13: 569-573.
- Batra, S.; Singh, S. y Srivasta, V. (1989). *Xanthine oxidase, Superoxide dismutase, Catalase and lipid peroxidation in mastomys natalensis effect of dipentalonema viteae infection*. Indian J. Exp. Biol. 27: 1067-1670.
- Bauman, D.; Baumgard, L.; Corl, B. y Griinari, J. (1999). *Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants*. J. Anim. Sci. 77: 1-15.
- Bauman, D. y Griinari, J. (2001a). *Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low fat milk syndrome*. Livest. Prod. Sci. 70: 15-29.

Bauman, D.; Corl, B.; Baumgard, L. y Griinari, J. (2001b). *Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow*. Rec. Adv. Anim. Nutr. 1: 221-250.

Bauman, D. y Griinari, J. (2003). *Nutritional Regulation of Milk Fat Synthesis*. Annu. Rev. Nutr. 23: 203-227.

Bauman, D.; Corl, B. y Peterson, D. (2003). The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. En *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Edited by Sébédio, J.; Christie, W.; Adlof, R. Champaign: AOCS Press. 2: 146-173.

Bauman, D.; Mather, I.; Wall, R. y Lock, A. (2006). *Major advances associated with the biosynthesis of milk*. J. Dairy Sci. 89: 1235-1243.

Bauman, D.; McGuire, M. y Harvatine, K. (2011). Mammary Gland, Milk Biosynthesis and Secretion: Milk Fat. En *Encyclopedia of Dairy Sciences*. (2° ed. p. 352-358). Elsevier Inc.

Baumgardner, J.; Shankar, K.; Hennings, L.; Badger, T. y Ronis, M. (2008). *A new model for non-alcoholic steatohepatitis in the rat utilizing total enteral nutrition to overfeed a high-polyunsaturated fat diet*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 294(1): G27-38.

Bécard, D.; Hainault, I.; Azzout-Marniche, D.; Bertry-Coussot, L.; Ferré, P. y Fougelle, F. (2001). *Adenovirus-mediated overexpression of sterol regulatory element binding protein-1c mimics insulin effects on hepatic gene expression and glucose homeostasis in diabetic mice*. Diabetes. 50(11): 2425-2430.

Bell, J.; Griinari, J. y Kennelly, J. (2006). *Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat*. J. Dairy Sci. 89: 733-748.

Bellentani, S. y Marino, M. (2009). *Epidemiology and natural history of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Ann. Hepatol. 8: S4-S8.

Belury, M.A. (2002). *Inhibition of Carcinogenesis by Conjugated Linoleic Acid: Potential Mechanisms of Action*. J. Nutr. 132: 2995-2998.

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.

- Bendsen, N.; Haugaard, S.; Larsen, T.; Chabanova, E.; Stender, S. y Astrup, A. (2011). *Effect of trans-fatty acid intake on insulin sensitivity and intramuscular lipids-a randomized trial in overweight postmenopausal women*. *Metabolism*. 60: 906-913.
- Beppu, F.; Hosokawa, M.; Tanaka, L.; Kohno, H.; Tanaka, T. y Miyashita, K. (2006). *Potent inhibitory effect of trans9, trans11 isomer of conjugated linoleic acid on the growth of human colon cancer cells*. *J. Nutr. Biochem*. 17: 830-836.
- Bergamo, P.; Maurano, F. y Rossi, M. (2007). *Phase 2 enzyme induction by conjugated linoleic acid improves lupus-associated oxidative stress*. *Free Radic. Biol. Med*. 43: 71-79.
- Bergamo, P.; Gogliettino, M.; Palmieri, G.; Cocca, E; Maurano, F.; Stefanile, R. y col. (2011). *Conjugated linoleic acid protects against gliadin-induced depletion of intestinal defenses*. *Mol. Nutr. Food Res*. 55: S248-S256.
- Berk, P. (2008). *Regulatable fatty acid transport mechanisms are central to the pathophysiology of obesity, fatty liver, and metabolic syndrome*. *Hepatology*. 48(5): 1362-1376.
- Bernal, C.; Basilico, M.; Gutman, R. y Lombardo, Y. (1989). *Secretion and removal rates of very low density lipoprotein triglycerides at three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet*. *Nut. Rep. Int*. 46: 71-83.
- Bernal, C.; Rovira, J.; Colandré, M.; Cussó, R. y Cadefau, J. (2006). *Effects of dietary cis and trans unsaturated and saturated fatty acids on the glucose metabolites and enzymes of rats*. *Br. J. Nutr*. 95(5): 947-954.
- Bernas, A.; Kumar, N.; Maki-Arvela, P.; Kulkova, N.V.; Holmbom, B.; Salmi, T. y col. (2003). *Isomerization of linoleic acid over supported metal catalysts*. *Appl. Catalysis A: General*. 245: 257-275.
- Beylot, M.; Pinteur, C. y Peroni, O. (2006). *Expression of the adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats*. *Metabolism*. 55(3): 396-401.
- Bezan, P.; Holland, H.; de Castro, G.; Cardoso, J.; Ovidio, P.; Calder, P. y col. (2018). *High dose of a conjugated linoleic acid mixture increases insulin resistance in rats fed either a low fat or a high fat diet*. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 126(6): 379-386.

- 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(12): 789-810.
- Bielski, B.; Arudi, R. y Sutherland, M. (1983). *A study of the reactivity of HO₂/O₂ with unsaturated fatty acids*. J. Biol. Chem. 258: 4759-4761.
- Binukumar, B. y Mathew, A. (2005). *Dietary fat and risk of breast cancer*. World J. Surg. Oncol. 3: 45.
- Bissonauth, V.; Chouinard, Y.; Marin, J.; Leblanc, N.; Richard, D. y Jacques, H. (2006). *The effects of t10,c12 CLA isomer compared with c9,t11 CLA isomer on lipid metabolism and body composition in hamsters*. J. Nutr. Biochem. 17(9): 597-603.
- Black, P.; Ahowesso, C.; Montefusco, D.; Saini, N. y DiRusso, C. (2016). *Fatty Acid Transport Proteins: Targeting FATP2 as a Gatekeeper Involved in the Transport of Exogenous Fatty Acids*. Med. Chem. Comm. 7(4): 612-622.
- 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.
- Blewett, H.; Gerdung, C.; Ruth, M.; Proctor, S. y Field, C. (2009). *Vaccenic acid favourably alters immune function in obese JCR:LA-cp rats*. Br. J. Nutr. 102: 526-536.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can. J. Biochem Physiol. 37: 911-917.
- Blundell, J.; Lawton, C.; Cotton, J. y Macdiarmid, J. (1996). *Control of human appetite: implications for the intake of dietary fat*. Ann. Rev. Nutr. 16: 285-319.
- Boll, M.; Weber, L.W. y Stampfl A. (1996). *Nutritional regulation of the activities of lipogenic enzymes of rat liver and brown adipose tissue*. Z. Naturforsch C. J. Biosci. 51(11-12): 859-869.
- Borowiec, F.; Ratych, I.; Mazur, B. y Kamińska, M. (2010). *Effect of lactation period on profile of fatty acids, including conjugated linoleic acid (CLA), in cow's milk*. Animal Biology. 12(1): 54-59.
- Bortolin, R.; Vargas, A.; Gasparotto, J.; Chaves, P.; Schnorr, C.; Martinello, K. y col. (2018). *A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: comparison to*

high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. Int. J. Obes. 42(3): 525-534.

Bourre, J.; Francois, M.; Youyou, A.; Dumont, O.; Piciotti, M.; Pascal, G. y Durand, G. (1989). *The effect of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats.* J. Nutr. 119: 1880-1892.

Bourre, J.; Piciotti, M.; Dumont, O.; Pascal, G. y Durand, G. (1990). *Dietary linoleic acid and polyunsaturated fatty acids in rat brain and other organs. Minimal requirements of linoleic acid.* Lipids. 25: 465-472.

Bowen, R. y Clandinin, M. (2000). *High dietary 18:3n-3 increases the 18:3n-3 but not the 22:6n-3 content in the whole body, brain, skin, epididymal fat pads, and muscles of suckling rat pups.* Lipids. 35(4): 389-394.

Bray, G.; Lovejoy, J.; Smith, S.; DeLany, J.; Lefevre, M.; Hwang, D. y col. (2002). *The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation.* J. Nutr. 132: 2488-2491.

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

Briand, F.; Thiéblemont, Q.; Muzotte, E. y Sulpice, T. (2012). *High-fat and fructose intake induces insulin resistance, dyslipidemia, and liver steatosis and alters in vivo macrophage-to-feces reverse cholesterol transport in hamsters.* J. Nutr. 142(4): 704-709.

Briaud, I.; Kelpe, C.; Johnson, L.; Tran, P. y Poitout, V. (2002). *Differential effects of hyperlipidemia on insulin secretion in islets of Langerhans from hyperglycemic versus normoglycemic rats.* Diabetes 51: 662-668.

Brouwer-Brolsma, E.; Sluik, D.; Singh-Povel, C. y Feskens, E. (2018). *Dairy product consumption is associated with pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes in the Lifelines Cohort Study.* Br. J. Nutr. 119: 442-455.

- Brown, J.; Boysen, M.; Jensen, S.; Morrison, R.F.; Storkson, J.; Lea-Currie, R. y col (2003). *Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes*. J. Lipid Res. 44: 1287-1300.
- Brown, J.; Boysen, M.; Chung, S.; Fabiyi, O.; Morrison, R.F.; Mandrup, S. y McIntosh, M.K. (2004). *Conjugated linoleic acid induces human adipocyte delipidation: autocrine/paracrine regulation of MEK/ERK signaling by adipocytokines*. J. Biol. Chem. 279: 26735-26747.
- Brühl, L. (1995). *Determination of trans fatty acids in cold pressed oils*. Eur. J. Med. Res. 1: 89-93.
- Buettner, R.; Parhofer, K.; Woenckhaus, M.; Wrede, C.; Kunz-Schughart, L.; Schölmerich, J. y col. (2006). *Defining high-fat-diet rat models: Metabolic and molecular effects of different fat types*. J. Mol. Endocrinol. 36: 485-501.
- Buettner, R.; Scholmerich, J. y Bollheimer, L. (2007). *High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents*. Obesity.15: 798-808.
- Bugianesi, E.; Gastaldelli, A.; Vanni, E.; Gambino, R.; Cassader, M.; Baldi, S. y col. (2005). *Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: Sites and mechanisms*. Diabetologia. 48: 634-642.
- Buijsse, B.; Boeing, H.; Drogan, D.; Schulze, M.B.; Feskens, E. y col. (2015). *Consumption of fatty foods and incident type 2 diabetes in populations from eight European countries*. Eur. J. Clin. Nutr. 69: 455-461.
- Buqué, X.; Martínez, M.; Cano, A. y col. (2010). *A subset of dysregulated metabolic and survival genes is associated with severity of hepatic steatosis in obese Zucker rats*. J. Lipid. Res. 51(3): 500-513.
- Burr, G.O. y Burr, M. (1929). *A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet*. J. Biol. Chem. 82: 345.
- Butler, G.; Collomb, M.; Rehberger, B.; Sanderson, R.; Eyre, M. y Leifert, C. (2009). *Conjugated linoleic acid isomer concentrations in milk from highand low-input management dairy systems*. J. Sci. Food Agr. 89: 697-705.

Butz, D.; Li, G.; Huebner, S. y Cook, M. (2007). *A mechanistic approach to understanding conjugated linoleic acid's role in inflammation using murine models of rheumatoid arthritis*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 293: R669-R676.

Buyukdere, Y.; Gulec, A. y Akyol, A. (2019). *Cafeteria diet increased adiposity in comparison to high fat diet in young male rats*. Peer J. 7: e6656.

Byrne, C. y Targher, G. (2015). *Naflid: A multisystem disease*. J. Hepatol. 62: S47-S64.

Cadefau, J.; Casademont, J.; Grau, J.; Fernández, J.; Balaguer, A.; Vernet, M. y col. (1990). *Biochemical and histochemical adaptation to sprint training in young athletes*. Acta Physiol. Scand. 140: 341-351.

Calder, P. (2006). *n-3 Polyunsaturated fatty acid, inflammation, and inflammatory disease*. Am. J. Clin. Nutr. 83(6): 1505S-1519S.

Calvani, M. y Benatti, P. (2003). *Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA)*. Sigma-tau S.p.A.-Scientific Department: 1-55.

Carmiel-Haggai, M.; Cederbaum, A. y Nieto N. (2004). *A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats*. FASEB J. 19: 136-138.

Carter-Kent, C.; Zein, N. y Feldstein, A. (2008). *Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment*. Am. J. Gastroenterol. 103: 1036-1042.

Carvalho-Filho, M.A.; Ueno, M.; Hirabara, S.M.; Seabra, A.B.; Carvalheira, J.B.; de Oliveira, M.G. y col. (2005). *S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance*. Diabetes 54: 959-967.

Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.; Diehl, A.; Brunt, E.; Cusi, K. y col. (2012). *The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American gastroenterological association, american association for the study of liver diseases, and american college of gastroenterology*. Gastroenterology. 142: 1592-1609.

Chalkley, S.; Hettiarachchi, M.; Chisholm, D. y Kraegen, E. (2002). *Long-term high-fat feeding leads to severe insulin resistance but not diabetes in Wistar rats*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282: E1231-E1238.

Chardigny, J.; Destailats, F.; Malpuech-Brugere, C.; Moulin, J.; Bauman, D.; Lock, A. y col. (2008). *Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study*. Am. J. Clin. Nutr. 87: 558-566.

Chen, X.; Zhong, Z.; Xu, Z.; Chen, L. y Wang, Y. (2010). *2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: Forty years of application and controversy*. Free Radic. Res. 44(6): 587-604.

Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Mansbridge, R. y Doreau, M. (2000). *Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids*. Ann. Zootech. 49: 181-205.

Chilliard, Y.; Ferlay, A. y Doreau, M. (2001). *Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids*. Livest. Prod. Sci. 70: 31-48.

Chilliard, Y.; Glasser, F.; Ferlay, A.; Bernard, L.; Rouel, J. y Doreau, M. (2007). *Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109: 828-855.

Chinnadurai, K.; Kanwal, H.; Tyagi, A.; Stanton, C. y Ross, P. (2013). *High conjugated linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and antiatherogenic potency in female Wistar rats*. Lipids Health Dis. 12: 121.

Choi, J.; Jung, M.; Park, H. y Song, J. (2004). *Effect of conjugated linoleic acid isomers on insulin resistance and mRNA levels of genes regulating energy metabolism in high-fat-fed rats*. Nutrition. 20: 1008-1017.

Choi, J.; Koh, I.; Jung, M. 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.

Choi, S. y Ginsberg, H. (2011). *Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance*. Trends Endocrinol. Metab. 22: 353-363.

Chou, C.; Haluzik, M.; Gregory, C.; Dietz, K.; Vinson, C.; Gavrilova, O. y col. (2002). *WY14,643, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonist, improves hepatic and*
Bioq. Gerstner Carolina

muscle steatosis and reverses insulin resistance in lipoatrophic A-ZIP/F-1 mice. J. Biol. Chem. 277(27): 24484-24489.

Chow, L.; Mashek, D.; Wang, Q.; Shepherd, S.; Goodpaster, B.; y Dube, J. (2017). *Effect of acute physiological free fatty acid elevation in the context of hyperinsulinemia on fiber type specific IMCL accumulation.* J. Appl. Physiol. 123(1): 71-78.

Chowdhury, R.; Warnakula, S.; Kunutsor, S.; Crowe, F.; Ward, H.A.; Johnson, L. y col. (2014). *Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis.* Ann. Intern. Med. 160: 398-406.

Christiansen, E.; Schnider, S.; Palmvig, B.; Tauber-Lassen, E. y Pedersen, O. (1997). *Intake of a diet high in trans monounsaturated fatty acids or saturated fatty acids. Effects on postprandial insulinemia and glycemia in obese patients with NIDDM.* Diabetes Care. 20: 881-887.

Chung, S.; Brown, J.; Sandberg, M. 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. y col. (2002). *Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse.* J. Lipid Res. 43: 1400-1409.

Cohen, G.; Dembiec, D. y Marcus, J. (1970). *Measurement of catalase activity in tissue extracts.* Anal. Biochem 34: 30-38.

Colandré, M.; Diez, R.; Bernal, C. (2003). *Metabolic effects of trans fatty acids on an experimental dietary model.* Br. J. Nutr. 89: 631-639.

Collomb, M.; Schmid, A.; Sieber, R.; Wechsler, D. y Ryhänen, E. (2006). *Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects.* Int. Dairy. J. 16: 1347-1361.

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

Cook, H.W. (1980). *Metabolism and positional distribution of isomers of 18-carbon dienoic fatty acids containing trans and cis double bonds by developing rat brain.* Can. J. Biochem. 58: 121-127.

Corl, B.; Baumgard, L.; Dwyer, D.; Griinari, J. y col. (2001). *The role of Delta(9)-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA*. J. Nutr. Biochem. 12: 622-630.

Corl, B.; Barbano, D.; Bauman, D. e Ip, C. (2003). *cis-9, trans-11 CLA Derived Endogenously from trans-11 18:1 Reduces Cancer Risk in Rats*. J. Nutr. 133: 2893-2900.

Corl, B.; Mathews Oliver, S.; Lin, X.; Oliver, W.; Ma, Y.; Harrell, R. y col. (2008). *Conjugated linoleic acid reduces body fat accretion and lipogenic gene expression in neonatal pigs fed low- or high-fat formulas*. J. Nutr. 138: 449-454.

Costa, I.; Moral, R.; Solanas, M.; Andreu, F.J.; Ruiz de Villa, M.C. y Escrich, E. (2011). *High corn oil and extra virgin olive oil diets and experimental mammary carcinogenesis: clinicopathological and immunohistochemical p21Ha-Ras expression study*. Virchows Arch. 458: 141-151.

Couper, K.; Blount, D. y Riley, E. (2008). *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. J. Immunol. 180(9): 5771-5777.

Couvreur, S.; Hurtaud, C.; Lopez, C.; Delaby, L. y Peyraud, L. (2006). *The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition and butter properties*. J. Dairy Sci. 89: 1956-1969.

Crescenzo, R.; Bianco, F.; Falcone, I.; Prisco, M.; Liverini, G. e Iossa, S. (2008). *Alterations in hepatic mitochondrial compartment in a model of obesity and insulin resistance*. Obesity. 16: 958-964.

Crescenzo, R.; Bianco, F.; Coppola, P.; Mazzoli, A.; Tussellino, M.; Carotenuto, R. y col. (2014). *Fructose supplementation worsens the deleterious effects of short-term high-fat feeding on hepatic steatosis and lipid metabolism in adult rats*. Exp. Physiol. 99: 1203-1213.

Crew, R.; Waddell, B. y Mark, P. (2016). *Maternal obesity induced by a 'cafeteria' diet in the rat does not increase inflammation in maternal, placental or fetal tissues in late gestation*. Placenta. 39:33-40.

Cruz-Hernandez, C.; Kramer, J.; Kennelly, J.; Glimm, D.; Sorensen, B.; Okine, E. y col. (2007). *Evaluating the conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomer in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil*. J. Dairy Sci. 90: 3786-3801.

Cusi, K. (2009). *Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis*. Clin. Liver Dis. 13: 545-563.

Dashti, N.; Feng, Q.; Freeman, M.R.; Gandhi, M. y Franklin, F.A. (2002). *Trans polyunsaturated fatty acids have more adverse effects than saturated fatty acids on the concentration and composition of lipoproteins secreted by human hepatoma HepG2 cells*. J. Nutr. 132: 2651-2659.

de Almeida, M.; Luquetti, S.; Sabarense, C.; do Amaral Corrêa, J.; dos Reis, L.; Santos da Conceição, E. y col. (2015a). *Butter naturally enriched in cis-9, trans-11 CLA prevents hyperinsulinemia and increases both serum HDL cholesterol and triacylglycerol levels in rats*. Lipids Health Dis. 13: 200.

de Almeida, M.; de Souza, Y.; Dutra Luquetti, S.; Sabarense, C.; do Amaral Corrêa, J. y da Conceição, E. (2015b). *Cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 CLA mixture does not change body composition, induces insulin resistance and increases serum HDL cholesterol level in rats*. J. Oleo Sci. 64(5): 539-551.

De Deckere, E.; van Amelsvoort, J.; McNeill, G. 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 Melo Lucena, A.; de Oliveira, S.; da Rocha Ataíde, T.; da Silva, A.; Cabral, C.; de Almeida, M. y col. (2010). *High-fat diet based on trienantin has no adverse metabolic effects in rats*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 112: 166-172.

de Moraes, C.; de Oliveira, C.; Corezola do Amaral, M.; Landini, G. y Catisti, R. (2017). *Liver metabolic changes induced by conjugated linoleic acid in calorie-restricted rats*. Arch. Endocrinol. Metab. 61(1): 45-53.

de Oliveira Otto, M.; Mozaffarian, D.; Kromhout, D.; Bertoni, A.G.; Sibley, C.; Jacobs, D. y col. (2012). *Dietary intake of saturated fat by food source and incident cardiovascular disease: the multi-ethnic study of atherosclerosis*. Am. J. Clin. Nutr. 96(2): 397-404.

de Oliveira Otto, M.; Nettleton, J.; Lemaitre, R.; Steffen, L.; Kromhout, D.; Rich, S. y col. (2013). *Biomarkers of dairy fatty acids and risk of cardiovascular disease in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis*. J. Am. Heart Assoc. 2: e000092.

de Roos B.; Rucklidge, G.; Reid, M.; Ross, K.; Duncan, G.; Navarro, M. y col. (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.

DeClercq, V.; Taylor, C.G.; Wigle, J.; Wrightd, B.; Tworekd, L. y Zahradkaa, P. (2012a). *Conjugated linoleic acid improves blood pressure by increasing adiponectin and endothelial nitric oxide synthase activity*. J. Nutr. Biochem. 23: 487-493.

DeClercq, V.; Taylor, C.G. y Zahradkaa, P. (2012b). *Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid on blood pressure, adipocyte size and function*. Br. J. Nutr. 107: 1413-1421.

Degrace, P.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Chardigny, J.; Sébédio, J. 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.; Sébédio, J. 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(4): 861-867.

Degrace, P.; Moindrot, B.; Mohamed, I.; Gresti, J.; Du, Z.; Chardigny, J. y col. (2006). *Upregulation of liver VLDL receptor and FAT/CD36 expression in LDLR-/- apoB100/100 mice fed trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid*. J. Lipid Res. 47(12): 2647-2655.

DeGroot, M. (1986) *Probability and statistics*. Reading: Addison-Wesley.

Dehghan, M.; Mente, A.; Rangarajan, S.; Sheridan, P.; Mohan, V.; Iqbal, R. y col. (2018). *Association of dairy intake with cardiovascular disease and mortality in 21 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study*. Lancet. 392: 2288-2297.

DeLany, J.; Blohm, F.; Truett, A.; Scimeca, J. y West, D. (1999). *Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake*. Am. J. Physiol. 276(2): R1172-R1179.

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

Delgado, T.; Pinheiro, D.; Caldeira, M.; Castro, M.; Geraldés, C.; López-Larrubia, P. y col. (2009). *Sources of hepatic triglyceride accumulation during high-fat feeding in the healthy rat*. NMR Biomed. 22(3): 310-317.

Deminice, R.; da Silva, R.; Lamarre, S.; Brown, C.; Furey, G.; McCarter, S. y col. (2011). *Creatine Supplementation Prevents the Accumulation of Fat in the Livers of Rats Fed a High-Fat Diet*. J. Nutr. 141(10): 1799-1804.

Den Hartigh, L.; Han, C.; Wang, S.; Omer, M. y Chait, A. (2013). *10t,12c-conjugated linoleic acid impairs adipocyte triglyceride storage by enhancing fatty acid oxidation, lipolysis, and mitochondrial reactive oxygen species*. J. Lipid Res. 54: 2964-2978.

Den Hartigh, L.; Wang, S.; Goodspeed, L.; Wietecha, T.; Houston, B.; Omer, M. y col. (2017). *Metabolically distinct weight loss by 10,12 CLA and caloric restriction highlight the importance of subcutaneous white adipose tissue for glucose homeostasis in mice*. PLoS ONE. 12(2):e017291281.

Dentin, R.; Girard, J. y Postic, C. (2005). *Carbohydrate responsive element binding protein (ChREBP) and sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c): two key regulators of glucose metabolism and lipid synthesis in liver*. Biochimie. 87(1): 81-86.

Dentin, R.; Tomas-Cobos, L.; Foufelle, F.; Leopold, J.; Girard, J.; Postic, C. y col. (2012). *Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver*. J. Hepatol. 56(1): 199-209.

Department of Health and Human Services (DHHS); Department of Agriculture. (1985). *Dietary Guidelines for Americans*. U.S. Dept of Health and Human Services. Washington.

Desroches, S.; Chouinard, P.; Galibois, I.; Corneau, L.; Delisle, J.; Lamarche, B. y col. (2005). *Lack of effect of dietary conjugated linoleic acids naturally incorporated into butter on the lipid profile and body composition of overweight and obese men*. Am. J. Clin. Nutr. 82: 309-319.

Dewhurst, R.; Shingfield, K.; Lee, M. y Scollan, N. (2006). *Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems*. Anim. Feed Sci. Technol. 131(3-4): 168-206.

Dhibi, M.; Brahmi, F.; Mnari, A.; Houas, Z.; Chargui, I.; Bchir, L. y col. (2011). *The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats*. Nutr. Metab. 8(1): 65.

Dhiman, T.; Anand, G.; Satter, L. y Pariza, M. (1999). *Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets*. J. Dairy Sci. 82: 2146-2156.

Dhiman, T.; Satter, L.; Pariza, M.; Galli, M.; Albright, K. y Tolosa, M. (2000). *Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid*. J. Dairy Sci. 83: 1016-1027.

Dhiman, T.; Nam, S. y Ure, A. (2005). *Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45(6): 463-482.

Di Minno, M.; Russolillo, A.; Lupoli, R.; Ambrosino, P.; Di Minno, A. y Tarantino, G. (2012). *Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease*. World J. Gastroenterol. 18: 5839-5847.

Doege, H. y Stahl, A. (2006). *Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models*. Physiology (Bethesda). 21: 259-268.

Donnelly, K.; Smith, C.; Schwarzenberg, S.; Jessurun, J.; Boldt, M. y Parks, E. (2005). *Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease*. J. Clin. Invest. 115(5): 1343-1351.

Dorfman, S.; Laurent, D.; Gounarides, J.; Li, X.; Mullarkey, T.; Rocheford, E. y col. (2009). *Metabolic implications of dietary trans-fatty acids*. Obesity. 17: 1200-1207.

Drouin-Chartier, J.; Brassard, D.; Tessier-Grenier, M.; Côté, J.; Labonté, M.; Desroches, S. y col. (2016a). *Systematic review of the association between dairy product consumption and risk of cardiovascular-related clinical outcomes*. Adv. Nutr. 7: 1026-1040.

Drouin-Chartier, J.; Côté, J.; Labonté, M.; Brassard, D.; Tessier-Grenier, M.; Desroches, S. y col. (2016b). *Comprehensive Review of the Impact of Dairy Foods and Dairy Fat on Cardiometabolic Risk*. Adv. Nutr. 7: 1041-1051.

Duca, F.; Sakar, Y. y Covasa, M. (2013). *The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity*. J. Nutr. Biochem. 24(10):1663-1677.

Dugan, M.; Aalhus, J. y Kramer, J. (2004). *Conjugated linoleic acid pork research*. Am. J. Clin. Nutr. 79(6): 1212S-1216S.

- Dus-Zuchowska, M.; Madry, E.; Krzyzanowska, P.; Bogdanski, P. y Walkowiak, J. (2016). *Twelve-week-conjugated linoleic acid supplementation has no effects on the selected markers of atherosclerosis in obese and overweight women*. Food Nutr. Res. 60: 32776.
- Dziedzic, B.; Szemraj, J.; Bartkowiak, J. y Walczewska, A. (2007). *Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats*. J. Neuroendocrinol. 19(5): 364-373.
- Ealey, K.; El-Sohemy, A. y Archer, M. (2002). *Effects of dietary conjugated linoleic acid on the expression of uncoupling proteins in mice and rats*. Lipids. 37: 853-861.
- Echeverría, F.; Valenzuela, R.; Bustamante, A.; Álvarez, D.; Ortiz, M.; Soto-Alarcon, S. y col. (2018). *Attenuation of High-Fat Diet-Induced Rat Liver Oxidative Stress and Steatosis by Combined Hydroxytyrosol (HT) Eicosapentaenoic Acid Supplementation Mainly Relies on HT*. Oxid. Med. Cell Longev. 2018: 5109503.
- 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.
- Eftekhari, M.; Aliasghari, F.; Beigi, M. y Zadeh, J. (2014). *The effect of conjugated linoleic acids and omega-3 fatty acids supplementation on lipid profile in atherosclerosis*. Adv. Biomed. Res. 9: 3-15.
- Egger, G. y Dixon, J. (2014). *Beyond obesity and lifestyle: A review of 21st century chronic diseases determinants*. BioMed Res. Int. 731685: 1-12.
- Ehrampoush, E.; Homayounfar, R.; Davoodi, S.; Zand, H.; Askari, A. y Kouhpayeh, S. (2016). *Ability of dairy fat in inducing metabolic syndrome in rats*. SpringerPlus. 5(1): 2020.
- El-Badry, A.; Graf, R. y Clavien, P. (2007). *Omega 3-Omega 6: What is right for the liver?* J. Hepatol. 47: 718-725.
- Elwood, P.; Pickering, J.; Givens, D. y Gallacher, J. (2010). *The consumption of milk and dairy foods and the incidence of vascular disease and diabetes: an overview of the evidence*. Lipids. 45(10): 925-939.

- Erukainure, O.; Ajiboye, J.; Lawal, B.; Obode, O.; Okoro, E.; Amisu-Tugbobo, A. y col. (2016). *Alterations in atherogenic indices and hypolipidemic effect of soybean oil in normocholesteremic rats*. *Comp. Clin. Path.* 25: 75-78.
- Estrany, M.; Proenza, A.; Lladó, I. y Gianotti, M. (2011). *Isocaloric intake of a high-fat diet modifies adiposity and lipid handling in a sex dependent manner in rats*. *Lipids Health Dis.* 10(52): 1-10.
- Eyjolfson, V.; Spriet, L. y Dyck, D. (2004). *Conjugated linoleic acid improves insulin sensitivity in young, sedentary humans*. *Med. Sci. Sports Exerc.* 36(5): 814-820.
- Ezanno, H.; Beauchamp, E.; Catheline, D.; Legrand, P. y Rioux, V. (2015). *Beneficial impact of a mix of dairy fat with rapeseed oil on n-6 and n-3 PUFA metabolism in the rat: A small enrichment in dietary alpha-linolenic acid greatly increases its conversion to DHA in the liver*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117: 281-290.
- Fabbrini, E.; Sullivan, S. y Klein, S. (2010). *Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications*. *Hepatology.* 51: 679-689.
- Falcon, A.; Doege, H.; Fluitt, A.; Tsang, B.; Watson, N.; Kay, M. y col. (2010). *FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 299(3): E384–E393.
- FAO. (2012). *Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation*. *Food Nutr. Pap.* 91: 1-166.
- Fariña, A. (2014). *Impacto de los ácidos grasos isoméricos trans y CLA sobre la modulación lipídica en ratas alimentadas con dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.
- Fariña, A.; González, M.; Scalerandi, M.V.; Lavandera, J. y Bernal, C. (2015). *Nutritional and metabolic effects of dietary trans fats depend on the intake of linoleic acid*. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117: 933-944.
- Fariña, A.; Hirabara, S.; Sain, J.; González, M.; Curi, R. y Bernal, C. (2018). *Influence of trans fatty acids on glucose metabolism in soleus muscle of rats fed diets enriched in or deprived of linoleic acid*. *Eur. J. Nutr.* 57(4): 1343-1355.

- Fariña, A.; Lavandera, J.; González, M. y Bernal, C. (2019). *Effect of Conjugated Linoleic Acids on Nutritional Status and Lipid Metabolism in Rats Fed Linoleic-Acid-Deprived Diets*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 121. 1800362: 1-10.
- Feldstein, A. (2010a). *Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease*. Semin. Liver Dis. 30(4): 391-401.
- Feldstein, A.; Lopez, R.; Tamimi, T.; Yerian, L.; Chung, Y.; Berk, M. y col. (2010b). *Mass spectrometric profiling of oxidized lipid products in human nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis*. J. Lipid Res. 51: 3046-3054.
- Feoli, A.; Roehrig, C.; Rotta, L.; Kruger, A.; Souza, K.; Kessler, A. y col. (2003). *Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils*. Nutrition. 19(9): 789-793.
- Fernandez-Quintela, A.; Rodríguez, V. M. y Portillo, M. (2004). *Ácido linoleico conjugado y grasa corporal*. Revista Esp. Obesidad. 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.; Conte, A.; Burri, L.; Berge, K.; De Nuccio, F.; Giudetti, A. y col. (2012). *A krill oil supplemented diet suppresses hepatic steatosis in high-fat fed rats*. PLoS One. 7: e38797.
- Ferramosca, A.; Conte, A.; Damiano, F.; Siculella, L y Zara, V. (2013). *Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diets on hepatic lipogenesis in rats*. Eur. J. Nutr. 53(4): 1103-1114.
- Ferré, P. y Foufelle, F. (2010). *Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c*. Diabetes Obes. Metab. 12(2): 83-92.
- Field, C.J.; Blewett, H.; Proctor, S. y Vine, D. (2009). *Human health benefits of vaccenic acid*. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 34: 979-991.
- Flowers, M. T. (2009). *The delta9 fatty acid desaturation index as a predictor of metabolic disease*. Clin. Chem. 55: 2071-2073.

Fontecha, J. y Juárez, M. (2012). *Avances científicos sobre el papel de la grasa láctea en la alimentación. En: Avances en Alimentación, Nutrición y Dietética.* Madrid, España. Ed. Nemira 117-134.

Fontecha, J.; Calvo, M.; Juárez, M.; Gil, A. y Martínez-Vizcaíno, V. (2019). *Milk and dairy product consumption and cardiovascular diseases: an overview of systematic reviews and meta-analyses.* Adv. Nutr. 10(2): S164-S189.

Forouhi, N.G.; Koulman, A.; Sharp, S.J.; Imamura, F.; Kröger, J.; Schulze, M.B. y col. (2014). *Differences in the prospective association between individual plasma phospholipid saturated fatty acids and incident type 2 diabetes: the EPIC-InterAct case-cohort study.* Lancet Diabetes Endocrinol. 2: 810-818.

Foufelle, F. y Ferré, P. (2002). *New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c.* Biochem. J. 366(2): 377-391.

Franczyk-Żarów, M.; Kuś, E. y Kostogrys, R. (2019). *Effect of conjugated linoleic acid and different type of dietary fat on serum lipid profile, liver enzymes activity and oxidative stress markers in Wistar rats.* Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 70(1): 27-33.

Freedman, B. y Bagby, M. (1989). *Heats of combustion of fatty esters and triglycerides.* J. Am. Oil Chem. Soc. 66: 1601-1605.

Fritsche, J.; Rickert, R. y Steinhart, H. (1999). *Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: Formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. En Advances in Conjugated Linoleic Acid Research.* (2° ed. p. 378-396). EE.UU. CRC Press.

Fritsche, J.; Fritsche, S.; Solomon, M.; Mossoba, M.; Yurawecz, M.; Morehouse, K. y col. (2000). *Quantitative determination of conjugated linoleic acid isomers in beef fat.* Eur. J. Lipid Sci. Technol. 102: 667-672.

Fromenty, B.; Robin, M.; Igoudjil, A.; Mansouri A. y Pessayre, D. (2004). *The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH.* Diabetes Metab. 30: 121-138.

Fukui, K.; Shirai, M.; Ninuma, T. y Kato, Y. (2019). *Anti-Obesity Effects of Tocotrienols and Bran in High-Fat Diet-Treated Mice.* Nutrients. 11(4): 830.

Furukawa, S.; Fujita, T.; Shimabukuro, M.; Iwaki, M.; Yamada, Y.; Nakajima, Y. y col. (2004). *Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome*. J. Clin. Invest. 114: 1752-1761.

Gagliostro, G.; Patiño, E.; Sanchez Negrette, M.; Sager, G., Castelli, L.; Antonacci, L. y col. (2015). *Milk composition and fatty acid profile after feeding a blend of soybean and linseed oils to grazing buffaloes*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 67(3): 927-934.

Gagliostro, G.; Garciarena, D.; Rodriguez, M. y Antonacci, L. (2017). *Feeding Polyunsaturated Supplements to Grazing Dairy Cows Improve the Healthy Value of Milk Fatty Acids*. Agri. Sci. 8: 759-782.

Gallo, R.; Babu, G.; Bona-Gallo, A.; Devorshak-Harvey, E.; Leipheimer, R. y Marco, J. (1987). *Regulation of pulsatile luteinizing hormone release during the estrous cycle and pregnancy in the rat*. Adv. Exp. Med. Biol. 219: 109-130.

Garland, P. y Randle, P. (1964). *Regulation of glucose uptake by muscles. Effects of alloxan-diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy, and of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, on the glycerol output and concentrations of free fatty acids, long-chain fatty acyl-coenzyme A, glycerol phosphate and citrate-cycle intermediates in rat heart and diaphragm muscles*. Biochem. J. 93(3): 678-687.

Garlipp-Picchi, M.; Mattos, A.; Barbosa, M.; Duarte, C.; Gandini, M.; Portari, G. y Jordão, A. (2011). *A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats*. Acta Cir. Bras. 26(2): 25-30.

Gaullier, J.; Halse, J.; Høye, K.; Kristiansen, K.; Fagertun, H.; Vik, H. y col. (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.; Halse, J.; Høye, K.; Kristiansen, K.; Fagertun, H.; Vik, H. y col. (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.; Gavino, G.; Leblanc, M. 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.

German, J. (1999). *Butyric acid: a role in cancer prevention*. Nutr. Bull. 24: 293-299.

- German, J. y Dillard, C. (2006). *Composition, structure and absorption of milk lipids: A source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 46(1): 57-92.
- Gibson, R.A.; Muhlhausler, B. y Makrides, M. (2011). *Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life*. Matern. Child Nutr. 7(2): 17-26.
- Gibson, R.A.; Neumann, M.; Lien, E.; Boyd, K. y Tu, W. (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.
- Giles, E.; Jackman, M. y MacLean, P. (2016). *Modeling diet-induced obesity with obesity-prone rats: implications for studies in females*. Front. Nutr. 3: 50.
- Gillingham, L.; Harris-Janz, S. y Jones, P. (2011). *Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors*. Lipids. 46(3): 209-228.
- Ginsberg, H.; Zhang, Y. y Hernandez-Ono, A. (2005). *Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes*. Arch. Med. Res. 36: 232-240.
- Gonthier, C.; Mustafa, A.; Ouellet, D.; Chouinard, P.; Berthiaume, R. y Petit, H. (2005). *Feeding micronized and extruded flaxseed to dairy cows: effects on blood parameters and milk fatty acid composition*. J. Dairy Sci. 88: 748-756.
- Greco, D.; Kotronen, A.; Westerbacka, J.; Puig, O.; Arkkila, P.; Kiviluoto, T. y col. (2008). *Gene expression in human NAFLD*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 294(5): G1281-G1287.
- Griinari, J. y Bauman, D. (1999). *Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants*. In *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. (1° ed. p. 180-200). Champaign. AOCS Press.
- Groop, L.; Bonadonna, R.; DelPrato, S.; Ratheiser, K.; Zyck, K.; Ferrannini, E. y col. (1989). *Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance*. J. Clin. Investig. 84: 205-213.
- Gruffat, D.; De La Torre, A.; Chardigny, J.; Durand, D. y col. (2005). *Vaccenic acid metabolism in the liver of rat and bovine*. Lipids. 40: 295-301.

- Gustafson, L.; Kuipers, F.; Wiegman, C.; Sauerwein, H.; Romijn, J. y Meijer, A. (2002). *Clofibrate improves glucose tolerance in fat-fed rats but decreases hepatic glucose consumption capacity*. J. Hepatol. 37: 425-431.
- Ha, Y.; Grimm, N. y Pariza, M. (1987). *Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid*. Carcinogenesis. 8: 1881-1887.
- Haas, J.; Francque, S. y Staels, B. (2016). *Pathophysiology and mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease*. Annu. Rev. Physiol. 78: 181-205.
- Halade, G.; Rahman, M. y Fernandes, G. (2010). *Differential effects of conjugated linoleic acid isomers in insulin-resistant female C57Bl/6J mice*. J. Nutr. Biochem. 21: 332-337.
- Hanuš, O.; Samková, E.; Křížová, L.; Hasoňová, L. y Kala, R. (2018). *The role of fatty acids in milk fat and the influence of selected farmer factors on their variability-a review*. Molecules. 23(7): E1636.
- Harano, Y.; Yasui, K.; Toyama, T.; Nakajima, T.; Mitsuyoshi, H.; Mimani, M. y col. (2006). *Fenofibrate, a peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist, reduces hepatic steatosis and lipid peroxidation in fatty liver Shionogi mice with hereditary fatty liver*. Liver Int. 26(5): 613-620.
- 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(9): 632-643.
- Harrold, J.; Widdowson, P.; Clapham, J. y Williams, G. (2000). *Individual severity of dietary obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 279(2): E340-347.
- Hashimoto, Y.; Yamada, K.; Tsushima, H.; Miyazawa, D.; Mori, M.; Nishio, K. y col. (2013). *Three Dissimilar High Fat Diets Differentially Regulate Lipid and Glucose Metabolism in Obesity-Resistant Slc:Wistar/ST Rats*. Lipids. 48: 803-815.
- Hassig, C.; Tong, J. y Schreiber, S. (1997). *Fiber-derived butyrate and the prevention of colon cancer*. Chem. Biol. 4: 783-789.

- Henriksen, E.; Teachey, M.; Taylor, Z.; 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.
- Herzberg, G. y Janmohamed, N. (1980). *Regulation of hepatic lipogenesis by dietary maize oil or tripalmitin in the meal-fed mouse*. Br. J. Nutr. 43(3): 571-579.
- Hilmarsson, H.; Larusson, L. y Thormar, H. (2006). *Virucidal effect of lipids on visna virus, a lentivirus related to HIV*. Arch. Virol. 151: 1217-1224.
- Hirabara, S.M.; Gorjao, R.; Vinolo, M.A.; Rodrigues, A.C.; Nachbar, R.T. y Curi, R. (2012). *Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions*. J. Biomed. Biotechnol. 2012: 379024.
- Hodson, L.; Skeaff, C. y Fielding, B. (2008). *Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake*. Prog. Lipid Res. 47(5): 348-380.
- Hofacer, R.; Jandacek, R.; Rider, T.; Tso, P. y col. (2011). *Omega-3 fatty acid deficiency selectively up-regulates delta6-desaturase expression and activity indices in rat liver: prevention by normalization of omega-3 fatty acid status*. Nutr. Res. 31: 715-722.
- Honors, M.; Hargrave, S. y Kinzig, K. (2012). *Glucose tolerance in response to a high-fat diet is improved by a high-protein diet*. Obesity. 20(9): 1859-1865.
- Hoque, M.; Kabir, M.; Hasan, M.; Rahman, M.; Rashid, M.; Ruba, T. y col. (2018). *Biochemical and pathological effects of palm, mustard and soybean oils in rats*. Bangl. J. Vet. Med. 16(1): 107-114.
- Hotamisligil, G.; Shargill, N. y Spiegelman, B. (1993). *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: Direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science. 259: 87-91.
- Houseknecht, K.; Vanden-Heuvel, J.; Moya-Camarena, S.; Portocarrero, C.; Peck, L.; Nickel, K. y col. (1998). *Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244: 678-682.
- Hsu, C. y Yen, G. (2007). *Effect of gallic acid on high fat diet-induced dyslipidaemia, hepatosteatosis and oxidative stress in rats*. Br. J. Nutr. 98: 727-735.

- Hu, D.; Huang, J.; Wang, Y.; Zhang, D. y Qu, Y. (2014). *Dairy foods and risk of stroke: a meta-analysis of prospective cohort studies*. *Nutr. Metab. Cardiovasc.* 24: 460-469.
- Hu, S.; Wang, L.; Yang, D.; Li, L.; Togo, J.; Wu, Y. y col. (2018). *Dietary fat, but not dietary protein or carbohydrate, regulates energy intake and causes adiposity in mice*. *Cell Metab.* 28: 415-431.
- Huang, X.; Xin, X.; McLennan, P. y Storlien, L. (2004). *Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression*. *Diabetes Obes. Metab.* 6: 35-44.
- Huang, Z.; Wang, B.; Pace, R. y Yoon, S. (2009). *Trans fat intake lowers total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol levels without changing insulin sensitivity index in Wistar rats*. *Nutr Res.* 29: 206-212.
- Huebner, S.; Olson, J.; Campbell, J.; Bishop, J.; Crump, P. y Cook, M. (2016). *Low Dietary α -Linolenic Acid Intake from Dairy Fat or Supplements Reduces Inflammation in Collagen-Induced Arthritis*. *Lipids.* 51(7): 807-819.
- Ibrahim, A.; Natrajan, S. y Ghafoorunissa, R. (2005). *Dietary trans -fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats*. *Metabolism.* 54: 240-246.
- Ibrahim, S.; Hirsova, P.; Malhi, H. y Gores, G. (2016). *Animal models of nonalcoholic steatohepatitis: eat, delete, and inflame*. *Dig. Dis. Sci.* 61: 1325-1336.
- 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.
- Illesca, P. (2015). *Incorporación de ácidos grasos trans y CLA dietarios en lípidos tisulares y su potencial implicancia metabólica en animales de experimentales*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.
- Illesca, P.; Lavandera, J.; Gerstner, C.; González, M. y Bernal, C. (2015). *Trans fatty acids modify nutritional parameters and triacylglycerol metabolism in rats: differential effects at recommended and high-fat levels*. *Nutr. Hosp.* 32(2): 738-748.

Inoue, N.; Nagao, K.; Hirata, J.; Wang, Y. e Yanagita, T. (2004). *Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323(2): 679-684.

Ip, C.; Banni, S.; Angioni, E.; Carta, G.; McGinley, J.; Thompson, H.J. y col. (1999). *Conjugated Linoleic Acid-Enriched Butter Fat Alters Mammary Gland Morphogenesis and Reduces Cancer Risk in Rats*. *J. Nutr.* 129: 2135-2142.

Ip, E.; Farrell, G.; Robertson, G.; Hall, P.; Kirsch, R. y Leclercq, I. (2003). *Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice*. *Hepatology.* 38(1): 123-132.

Ip, M.; McGee, S.; Masso-Welch, P.; 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 Hargrave-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.

Ishimoto, T.; Lanaspá, M.; Rivard, C.; Roncal-Jimenez, C.; Orlicky, D.; Cicerchi, C. y col. (2013). *High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase*. *Hepatology.* 58: 1632-1643.

Islam, S.; Purna, T.; Phuong, N.; Mwingira, U.; Schacht, K. y Freoschl, G. (2014). *Non-communicable diseases (NCDs) in developing countries: a symposium report*. *Global Health.* 10:81.

Jacome-Sosa, M.; Lu, J.; Wang, Y.; Ruth, M.; Wright, D.; Reaney, M. y col. (2010). *Increased hypolipidemic benefits of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid in combination with trans-11 vaccenic acid in a rodent model of the metabolic syndrome, the JCR: LA-cp rat*. *Nutr. Metab.* 7: 60.

Jacome-Sosa, M.; Borthwick, F.; Mangat, R.; Uwiera, R.; Reaney, M.; Shen, J. y col. (2014). *Diets enriched in trans-11 vaccenic acid alleviate ectopic lipid accumulation in a rat model of NAFLD and metabolic syndrome*. *J. Nutr. Biochem.* 25(7): 692-701.

- Jakobsen, M.; Overvad, K.; Dyerberg, J. y Heitmann, B. (2008). *Intake of ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease*. Int. J. Epidemiol. 37(1): 173-182.
- Jaudszus, A.; Foerster, M.; Kroegel, C.; Wolf, I. y Jahreis, G. (2005). *Cis-9, trans-11-CLA exerts anti-inflammatory effects in human bronchial epithelial cells and eosinophils: comparison to trans-10, cis-12-CLA and to linoleic acid*. Biochim. Biophys. Acta. 1737: 111-118.
- Jaudszus, A.; Jahreis, G.; Schlörmann, W.; Fischer, J.; Kramer, R.; Degen, C. y col. (2012). *Vaccenic acid-mediated reduction in cytokine production is independent of c9,t11-CLA in human peripheral blood mononuclear cells*. Biochim. Biophys. Acta. 1821: 1316-1322.
- Javadi, M.; Beynen, A.C.; Hovenier, R.; Lankhorst, A.; Lemmens, A.; Terpstra, A. y Geelen, M.J. (2004). *Prolonged feeding of mice with conjugated linoleic acid increases hepatic fatty acid synthesis relative to oxidation*. J. Nutr. Biochem. 15: 680-687.
- Jenkins, T. (1993). *Lipid metabolism in the rumen*. J. Dairy Sci. 76: 3851-3863.
- Jensen, R. (2002). *The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000*. J. Dairy Sci. 85: 295-350.
- Jimenez, P.; Koch, G.; Thompson, J.; Xavier, K.; Cool, R. y Quax, W. (2012). *The multiple signaling systems regulating virulence in Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 76: 46-65.
- Jobgen, W.; Meininger, C.; Jobgen, S.; Li, P.; Lee, M.; Smith, S. y col. (2009). *Dietary L-arginine supplementation reduces white-fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats*. J. Nutr. 139: 230-237.
- Jourdan, T.; Djaouti, L.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Verges, B. y Degraze, P. (2009). *Liver carbohydrate and lipid metabolism of insulin-deficient mice is altered by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid*. J. Nutr. 139: 1901-1907.
- Juárez, M. y Fontecha, J. (2009). *Componentes bioactivos de la grasa láctea. En: Funcionalidad de Componentes Lácteos*. Universidad Miguel Hernández. Elche (Alicante). España. Ed. Cytod-Iberofun.
- Jump, D. (2011). *Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism*. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 14: 115-120.

- Jump, D.; Tripathy, S. y Depner, C. (2013). *Fatty acid-regulated transcription factors in the liver*. *Ann. Rev. Nutr.* 33: 249-269.
- Kadegowda, A.; Khan, M.; Piperova, L.; Teter, B.; Rodriguez-Zas, S.; Erdman, R. y Loor, J. (2013). *Trans-10, cis 12-Conjugated Linoleic Acid-Induced Milk Fat Depression Is Associated with Inhibition of PPAR Signaling and Inflammation in Murine Mammary Tissue*. *J. Lipids*. 2013: 890343.
- Kadowaki, T. y Yamauchi, T. (2005). *Adiponectin and adiponectin receptors*. *Endocr. Rev.* 26(3): 439-451.
- Kang, K.; Liu, W.; Albright, K.; Park, Y. y Pariza, M. (2003). *Trans-10,cis-12 CLA inhibits differentiation of 3T3-L1 adipocytes and decreases PPAR gamma expression*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 795-799.
- Kang, K.; Miyazaki, M.; Ntambi, J. y Pariza, M. (2004). *Evidence that the antiobesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315: 532-537.
- Kang, K. y Choi, S. (2008). *Effects of conjugated linoleic acid supplementation on fatty acid composition in the plasma, liver, and epididymal fat pads of male-Sprague Dawley rats*. *J. Med. Food*. 11(3): 435-442.
- Kanosky, K.; Ippagunta, S. y Barnes, K. (2013). *Mice do not accumulate muscle lipid in response to dietary conjugated linoleic acid*. *J. Anim. Sci.* 91(10): 4705-4712.
- Kanuri, G. y Bergheim, I. (2013). *In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 11963-11980.
- Kakimoto, P. y Kowaltowski, A. (2016). *Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance*. *Redox Biol.* 8: 216-25.
- Kavanagh, K.; Jones, K.; Sawyer, J.; Kelley, K.; Carr, J.; Wagner, J.D. y Rudel, L. (2007). *Trans fat diet induces abdominal obesity and changes in insulin sensitivity in monkeys*. *Obesity*. 15: 1675-1684.

- Kay, J.; Weber, W.; Moore, C.; Bauman, D.; Hansen, L.; Chester-Jones, H. y col. (2005). *Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows*. J. Dairy Sci. 88(11): 3886-3893.
- Kelley, D.; Bartolini, G.; Newman, J.; Vemuri, M. y Mackey, B. (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, N.; Hubbard, N. y Erickson, K. (2007). *Conjugated linoleic acid isomers and cancer*. J. Nutr. 137: 2599-2607.
- Kelly, G. (2001). *Conjugated linoleic acid: a review*. Altern. Med. Rev. 6: 367-382.
- Kelly, M.; Berry, J.; Dwyer, D.; Griinari, J.; Chouinard, P.; Van Amburgh, M. y col. (1998a). *Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows*. J. Nutr. 128: 881-885.
- Kelly, M.; Kolver, E.; Bauman, D.; Van Amburgh, M. y Muller, L. (1998b). *Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows*. J. Dairy Sci. 81: 1630-1636.
- Kennedy, A.; Chung, S.; LaPoint, K.; Fabiyi, O. y McIntosh, M. (2008). *Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid antagonizes ligand-dependent PPAR γ 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(3): 171-179.
- Kgwatalala, P.; Ibeagha-Awemu, E.; Mustafa, A. y Zhao, X. (2009). *Influence of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 genotype and stage of lactation on fatty acid composition of Canadian Jersey cows*. J. Dairy Sci. 92(3): 1220-1228.
- Khaw, K.; Friesen, M.; Riboli, E.; Luben, R. y Wareham, N. (2012). *Plasma phospholipid fatty acid concentration and incident coronary heart disease in men and women: the EPIC-Norfolk prospective study*. PLoS Med. 9:e1001255.
- Khodadadi, I.; Heshmati, A. y Karami, M. (2017). *The impact of dietary feta cheese and butter on serum lipid profile and fatty acid composition in rat*. Nutr. Food Sci. 47(6): 884-895.

- Kim, H.; Kim, S.; Ahn, J.; Cho, I.; Yoon, C. y Ha, T. (2005). *Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 51: 8-15.
- Kim, H.; Takahashi, M. y Ezaki, O. (1999). *Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver: a possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs*. J. Biol. Chem. 274: 25892-25898.
- 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.
- Kim, M.; Park, Y.; Albright, K. y Pariza, M. (2002). *Differential responses of hamsters and rats fed high-fat or low-fat diets supplemented with conjugated linoleic acid*. Nutr. Res. 22: 715-722.
- 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.
- Kohli, R.; Kirby, M.; Xanthakos, S.; Softic, S.; Feldstein, A.; Saxena, V. y col. (2010). *High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology. 52: 934-944.
- Koletzko, B. y Decsi, T. (1997). *Metabolic aspects of trans fatty acids*. Clin. Nutr. 16: 229-237.
- Koonen, D.; Jacobs, R.; Febbraio, M.; Young, M.; Carrie-Lynn M.; Ong, H. y col. (2007). *Increased Hepatic CD36 Expression Contributes to Dyslipidemia Associated With Diet-Induced Obesity*. Diabetes. 56 (12): 2863-2871.
- Koppe, S.; Elias, M.; Moseley, R. y Green, R. (2009). *Trans fat feeding results in higher serum alanine aminotransferase and increased insulin resistance compared with a standard murine high-fat diet*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 297: G378-G384.
- Koronowicz, A.; Dulinska-Litewka, J.; Pisulewski, P. y Laidler, P. (2009). *Effect of conjugated linoleic acid isomers on proliferation of mammary cancer cells*. Rocz. Panstw. Zakl. Hig. 60: 261-267.

- Kotronen, A. e Yki-Järvinen, H. (2008). *Fatty liver: a novel component of the metabolic syndrome*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 27-38.
- Kotronen, A.; Seppälä-Lindroos, A.; Vehkavaara, S. y col. (2009). *Liver fat and lipid oxidation in humans*. *Liver*. 29: 1439-1446.
- Kraegen, E.; Clark, P.; Jenkins, A.; Daley, E.; Chisholm, D. y Storlien, L. (1991). *Development of muscle insulin resistance after liver insulin resistance in high-fat-fed rats*. *Diabetes*. 40(11): 1397-1403.
- Kraft, J.; Hanske, L.; Mockel, P.; Zimmermann, S.; Hartl, A.; Kramer, J.K. y Jahreis, G. (2006). *The conversion efficiency of trans-11 and trans-12 18:1 by Delta9-desaturation differs in rats*. *J. Nutr.* 136: 1209-1214.
- Kramer, D. y Guilbault, G. (1963). *A substrate for the fluorimetric determination of lipase activity*. *Analytical Chemistry*. 35: 588-589.
- Kramer, J.; Cruz-Hernandez, C.; Deng, Z.; Zhou, J.; Jahreis, G. y Dugan, M. (2004). *Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products*. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 1137-1145.
- Krishnan, S. y Cooper, J. (2014). *Effect of dietary fatty acid composition on substrate utilization and body weight maintenance in humans*. *Eur. J. Nutr.* 53: 691-710.
- 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.
- Kwak, H.; Kim, O.; Jung, H. y Kim, J. (2009). *Effects of conjugated linoleic acid supplementation on inflammatory mediators and immunoglobulins in overweight Korean females*. *FASEB J.* 23: 521-563.
- Lacroix, E.; Charest, A.; Cyr, A.; Baril-Gravel, L.; Lebeuf, Y.; Paquin, P. y col. (2012). *Randomized controlled study of the effect of a butter naturally enriched in trans fatty acids on blood lipids in healthy women*. *Am. J. Clin. Nutr.* 95(2): 318-325.
- Lafontan, M. y Langin, D. (2009). *Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue*. *Prog. Lipid Res.* 48: 275-297.

- Lambert, M. y Neish, A.C. (1950). *Rapid method for estimation of glycerol in fermentation solutions*. Can. J. Res. 28: 83-89.
- Lanni, A.; Moreno, M.; Lombardi, A.; de Lange, P.; Silvestri, E.; Ragni, M. y col. (2005). *3,5-Diiodo-L-thyronine powerfully reduces adiposity in rats by increasing the burning of fats*. FASEB J. 19: 1552-1554.
- LaRosa, P.; Miner, J.; Xia, Y.; Zhou, Y.; Kachman, S. y Fromm, M. (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.
- Larqu e, E.; Zamora, S. y Gil, A. (2001). *Dietary trans fatty acids in early life: a review*. Early Hum. Dev. 65: S31-41.
- 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.
- Lau, J.; Zhang, X. e Yu, J. (2017). *Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: Current perspectives and recent advances*. J. Pathol. 241: 36-44.
- Laurell, S. (1966). *A method for routine determination of plasma triglycerides*. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 18: 668-672.
- Lavoie, J. y Gauthier, M. (2006). *Regulation of fat metabolism in the liver: link to nonalcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise*. Cell Mol. Life Sci. 63: 1393-1409.
- Lawrence, G.D. (2013). *Dietary fats and health: dietary recommendations in the context of scientific evidence*. Adv. Nutr. 4: 294-302.
- Lawson, R.; Moss, A. y Givens, D. (2001). *The role of dairy products in supplying CLA to man's diet: a review*. Nutr. Res. Rev. 14: 153-172.
- Leamy, A.; Egnatchik, R. y Young, J. (2013). *Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease*. Prog. Lipid Res. 52: 165-174.
- Leclercq, I.; Farrell, G.; Field, J.; Bell, D.; Gonzalez, F. y Robertson, G. (2000). *Cyp2E1 and Cyp4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine non-alcoholic steatohepatitis*. J. Clin. Invest. 105(8): 1067-1075.

Lee, H.; Fukumoto, M.; Nishida, H.; Ikeda, I. y Sugano, M. (1989). *The interrelated effects of n-6/n-3 and polyunsaturated/saturated ratios of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats*. Nutr. 119: 1893-1899.

Lee, J.; Bullen, J.; Stoyneva, V. y Mantzoros, C. (2005). *Circulating resistin in lean, obese, and insulin-resistant mouse models: lack of association with insulinemia and glycemia*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 288: E625-E632.

Lee, J.H.; Cho, K.; Lee, K. y Kim, M. (2005). *Antiatherogenic effects of structured lipid containing conjugated linoleic acid in C57BL/6J mice*. J. Agric. Food Chem. 53: 7295-7301.

Lee, S.; Gura, K. y Puder, M. (2007). *Omega-3 fatty acids and liver disease*. Hepatology. 45: 841-845.

Lefevre, M.; Lovejoy, J. C.; Smith, S.; Delany, J.; Champagne, C.; Most, M. y col. (2005). *Comparison of the acute response to meals enriched with cis- or trans-fatty acids on glucose and lipids in overweight individuals with differing FABP2 genotypes*. Metabolism. 54: 1652-1658.

Legrand, P.; Catheline, D.; Fichot, M. y Lemarchal, P. (1997). *Inhibiting delta9-desaturase activity impairs triacylglycerol secretion in cultured chicken hepatocytes*. J. Nutr. 127: 249-256.

Legrand, P. (2008). *Intérêt nutritionnel des principaux acides gras des lipides laitiers*. Sciences des Aliments. 28: 34-43.

Legrand, P.; Beauchamp, E.; Catheline, D.; Pédrone, F. y Rioux, V. (2010). *Short chain saturated fatty acids decrease circulating cholesterol and increase tissue PUFA content in the rat*. Lipids. 45(11): 975-986.

Legrand, P. y Rioux, V. (2015). *Specific roles of saturated fatty acids: Beyond epidemiological data*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 117: 1489-1499.

Leigh, S.; Lee, F. y Morris, M. (2018). *Hyperpalatability and the generation of obesity: roles of environment, stress exposure and individual difference*. Curr. Obes. Rep. 7(1): 6-18.

Leite, S.; Leite, M.; Caetano, G.; Ovidio, P.; Jordão, A. y Frade, M. (2015). *Phototherapy improves wound healing in rats subjected to high-fat diet*. Lasers Med. Sci. 30(5): 1481-1488.

- Leonardi, D.; Feres, M.; Portari, G.; Zanuto, M.; Zucoloto, S. y Jordão, A. (2010). *Low-carbohydrate and high-fat diets on the promotion of hepatic steatosis in rats*. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*. 118(10): 724-729.
- Lewis, J. y Mohanty, S. (2010). *Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update*. *Dig. Dis. Sci*. 55: 560-578.
- 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*. *J. Lipids*. 2012: 571281.
- 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.
- Lichtenstein, A. y Schwab, U. (2000). *Relationship of dietary fat to glucose metabolism*. *Atherosclerosis*. 150: 227-243.
- Lieber, C.; Leo, M.; Mak, K.; Xu, Y.; Cao, Q.; Ren, C. y col. (2004). *Model of nonalcoholic steatohepatitis*. *Am. J. Clin. Nutr.* 79(3): 502-509.
- Lin, J.; Yang, R.; Tarr, P.; Wu, P.; Handschin, C.; Li, S. y col. (2005). *Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP*. *Cell*. 120(2): 261-273.
- Lin, Y.; Schuurbiers, E.; Van der Veen, S. y De Deckere, E. (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. 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.
- Ling, B.; Aziz, C. y Alcorn, J. (2012). *Systematic evaluation of key L-carnitine homeostasis mechanisms during postnatal development in rat*. *Nutr. Metab*. 9(1): 66.
- Listenberger, L.; Han, X.; Lewis, S.; Cases, S.; Farese, R.; Ory, D. y Schaffer, J. (2003). *Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 100: 3077-3082.

- Liu, H.; Zhong, H.; Leng, L. y Jiang, Z. (2017). *Effects of soy isoflavone on hepatic steatosis in high fat-induced rats*. J. Clin. Biochem. Nutr. 61(2): 85-90.
- Liu, J.; Han, L.; Zhu, L. e Yu, Y. (2016). *Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats*. Lipids Health Dis. 15: 27.
- Liu, L.F.; Purushotham, A.; Wendel, A. y Belury, M. (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.
- Liu, S.; Baracos, V.; Quinney, H. y Clandinin, M. (1994). *Dietary omega-3 and polyunsaturated fatty acids modify fatty acyl composition and insulin binding in skeletal-muscle sarcolemma*. Biochem. J. 299: 831-837.
- Livak, K. y Schmittgen, T. (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods. 25: 402-408.
- Livisay, S.; Zhou, S.; Ip, C. y Decker, E. (2000). *Impact of dietary conjugated linoleic acid on the oxidative stability of rat liver microsomes and skeletal muscle homogenates*. J. Agric. Food Chem. 48: 4162-4167.
- Lock, A. y Garnsworthy, P. (2003). *Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and D9-desaturase activity in dairy cows*. Livest. Prod. Sci. 79: 47-59.
- Lock, A. y Bauman, D. (2004). *Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health*. Lipids. 39: 1197-1206.
- Lock, A.; Horne, C.; Bauman, D. y Salter, A. (2005). *Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters*. J. Nutr. 135: 1934-1939.
- Lohr, G. y Waller, H. (1974). *In Methods of Enzymatic Analysis*. (2° ed., p. 636) New York: Academic Press.
- Loor, J.; Lin, X. y Herbein, J. (2002). *Dietary trans-vaccenic acid (trans11-18:1) increases concentration of cis9,trans11-conjugated linoleic acid (rumenic acid) in tissues of lactating mice and suckling pups*. Reprod. Nutr. Dev. 42: 85-99.

- López-Miranda, J.; Perez-Jimenez, F.; Ros, E.; De, C.R.; Badimon, L.; Covas, M. y col. (2010). *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.
- Loria, R.; Kibrick, S. y Madge, G. (1976). *Infection of hypercholesterolemic mice with Coxackie virus B*. J. Infect. Dis. 133(6): 655-662.
- Lou-Bonafonte, J.; Arnal, C. y Osada, J. (2011). *New genes involved in hepatic steatosis*. Curr. Opin. Lipidol. 22: 159-164.
- Louheranta, A.; Turpeinen, A.; Vidgren, H.; Schwab, U. y Uusitupa, M. (1999). *A high-trans fatty acid diet and insulin sensitivity in young healthy women*. Metabolism. 48: 870-875.
- Lovejoy, J.; Smith, S.; Champagne, C.; Most, M.; Lefevre, M.; DeLany, J. y col. (2002). *Effects of diets enriched in saturated (palmitic), monounsaturated (oleic), or trans (elaidic) fatty acids on insulin sensitivity and substrate oxidation in healthy adults*. Diabetes Care. 25: 1283-1288.
- Lowry, O. y Passonneau, J. (1972). Pyridine nucleotides. En *A Flexible System of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press.
- 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.
- Lu, C. y Liu, Y. (2002). *Interaction of lipoic acid radical cations with vitamins C and E analogue and hydroxycinnamic acid derivatives*. Arch. Bioc. Biophy. 406: 78-84.
- Lund, P.; Sejrsen, K. y Straarup, E. M. (2006). *Incorporation of conjugated linoleic acid and vaccenic acid into lipids from rat tissues and plasma*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 108: 991-998.
- 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.; Fernández-Quintela, A.; Zabala, A.; Navarro, V.; Echevarría, E.; Churruga, I. y col. (2005). *Effects of conjugated linoleic acid on liver composition and fatty acid oxidation are isomer-dependent in hamster*. Nutrition. 21: 512-519.

Maeso, N.; García-Martínez, D.; Rupérez, F.J.; Cifuentes, A. y Barbas, C. (2005). *Capillary electrophoresis of glutathione to monitor oxidative stress and response to antioxidant treatments in an animal model*. J. Chromatogr. B. 822: 61-69.

Mamikutty, N.; Thent, Z. y Haji-Suhaimi, F. (2015). *Fructose-drinking water induced nonalcoholic fatty liver disease and ultrastructural alteration of hepatocyte mitochondria in male wistar rat*. BioMed Res. Int. 2015:895961.

Mansbridge, R. y Blake, J. (1997). *Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk*. Br. J. Nutr. 78(1): S37-47.

Mantena, S.; King, A.; Andringa, K.; Eccleston, H. y Bailey, S. (2008). *Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver diseases*. Free Radic. Biol. Med. 44: 1259-1272.

Mantzaris, M.; Tsianos, E. y Galaris, D. (2011). *Interruption of triacylglycerol synthesis in the endoplasmic reticulum is the initiating event for saturated fatty acid-induced lipotoxicity in liver cells*. FEBS J. 278: 519-530.

Marques, C.; Meireles, M.; Norberto, S.; Leite, J.; Freitas, J.; Pestana, D. y col. (2016). *High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat*. Adipocyte. 5(1): 11-21.

Martire, S.; Holmes, N.; Westbrook, R. y Morris, M. (2013). *Altered feeding patterns in rats exposed to a palatable cafeteria diet: increased snacking and its implications for development of obesity*. PLoS One. 8:e60407.

Maslak, E.; Buczek, E.; Szumny, A.; Szczepinski, W.; Franczyk-Zarow, M.; Kopec, A. y col. (2015). *Individual CLA Isomers, c9t11 and t10c12, Prevent Excess Liver Glycogen Storage and Inhibit Lipogenic Genes Expression Induced by High-Fructose Diet in Rats*. Biomed Res. Int. 535982: 1-10.

Masson, L.; Alfaro, T.; Camiloa, C.; Carvalho, A.; Illesca, P.; Torres, R. y col. (2015). *Fatty acid composition of soybean/sunflower mix oil, fish oil and butterfat applying the AOCS Ce 1j-07 method with a modified temperature program*. Grasas Aceites. 66(1): 1-16.

Masterton, G.; Plevris, J. y Hayes, P. (2010). *Review article: omega-3 fatty acids-a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease*. Aliment. Pharmacol. Ther. 31: 679-692.

- Matsuo, T.; Takeuchi, H.; Suzuki, H. y Suzuki, M. (2002). *Body fat accumulation is greater in rats fed a beef tallow diet than in rats fed a safflower or soybean oil diet*. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 11(4): 302-308.
- Matsuzawa-Nagata, N.; Takamura, T.; Kurita, S.; Misu, H.; Ota, T.; Ando, H. y col. (2007). *Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet*. Hepatology. 46: 1392-1403.
- Matsuzawa-Nagata, N.; Takamura, T.; Ando, H.; Nakamura, S.; Kurita, S.; Misu, H. y col. (2008). *Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity*. Metabolism. 57: 1071-1077.
- Matthan, N.; Cianflone, K.; Lichtenstein, A.H.; Ausman, L.M.; Jauhiainen, M. y Jones, P.J. (2001). *Hydrogenated fat consumption affects acylation-stimulating protein levels and cholesterol esterification rates in moderately hypercholesterolemic women*. J. Lipid Res. 42: 1841-1848.
- Matthan, N.; Welty, F.; Barrett, P.; Harausz, C.; Dolnikowski, G.; Parks, J. y col. (2004). *Dietary hydrogenated fat increases high-density lipoprotein apoA-I catabolism and decreases low-density lipoprotein apoB-100 catabolism in hypercholesterolemic women*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 24: 1092-1097.
- Mauger, J.; Lichtenstein, A.; Ausman, L.; Jalbert, S.; Jauhiainen, M.; Ehnholm, C. y Lamarche, B. (2003). *Effect of different forms of dietary hydrogenated fats on LDL particle size*. Am. J. Clin. Nutr. 78: 370-375.
- McGowan, M.; Eisenberg, B.; Lewis, L.; Froehlich, H.; Wells, W.; Eastman, A. y col. (2013). *A proof of principle clinical trial to determine whether conjugated linoleic acid modulates the lipogenic pathway in human breast cancer tissue*. Breast Cancer Res. Treat. 138: 175-183.
- Mele, M.; Cannelli, G.; Carta, G.; Cordeddu, L.; Melis, M.P.; Murru, E. y col. (2013). *Metabolism of c9,t11-conjugated linoleic acid (CLA) in humans*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 89: 115-119.
- Meluchová, B.; Blasko, J.; Kubinec, R.; Górová, R.; Dubravská, J.; Margetín, M. y col. (2008). *Seasonal variations in fatty acid composition of pasture forage plants and CLA content in ewe milk fat*. Small Rum. Res. 78(1-3): 56-65.

- Mena-Sánchez, G.; Becerra-Tomás, N.; Babio, N. y Salas-Salvadó, J. (2019). *Dairy products in the prevention of metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies*. *Adv. Nutr.* 10(2): S144-S153.
- Mensink, R. y Katan, M. (1990). *Effect of dietary trans-fattyacids on high-density and low-density-lipoprotein cholesterol levels in healthy-subjects*. *N. Engl. J. Med.* 323: 439-445.
- Mensink, R.; Zock, P.; Kester, A. y Katan, M. (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.
- Mensink, R. (2005). *Metabolic and health effects of isomeric fatty acids*. *Curr Opin Lipidol.* 16: 27-30.
- Mente, A.; de Koning, L.; Shannon, H. y Anand, S. (2009). *A systematic review of the evidence supporting a causal link between dietary factors and coronary heart disease*. *Arch. Intern. Med.* 169: 659-669.
- Mersmann, H.J. (2002). *Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition*. *J. Anim. Sci.* 80: 126-134.
- Meyer, K.; Kushi, L.; Jacobs, D. y Folsom, A. (2001). *Dietary fat and incidence of type 2 diabetes in older Iowa women*. *Diabetes Care.* 24: 1528-1535.
- Micha, R. y Mozaffarian, D. (2009). *Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes*. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5:335-344.
- Michaëlsson, K.; Wolk, A.; Langenskiöld, S.; Basu, S.; Warensjö Lemming, E.; Melhus, H. y col. (2014). *Milk intake and risk of mortality and fractures in women and men: cohort studies*. *BMJ.* 349: g6015.
- Miller, J.; Siripurkpong, P.; Hawes, J.; Majdalawieh, A.; Ro, H. y McLeod, R. (2008). *The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid decreases adiponectin assembly by PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent mechanisms*. *J. Lipid Res.* 49: 550-562.
- Milner, J. y Hassan, A. (1981). *Species specific city of arginine defi ciency-induced hepatic steatosis*. *J. Nutr.* 111: 1067-1073.

- Miquilena-Colina, M.; Lima-Cabello, E.; Sánchez-Campos, S. y col. (2011). *Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C*. Gut. 60(10): 1394-1402.
- Mir, P.; McAllister, T.; Scott, S.; Aalhus, J.; Baron, V.; McCartney, D. y col. (2004). *Conjugated linoleic acid-enriched beef production*. Am. J. Clin. Nutr. 79: 1207-1211.
- Mitmesser, S.; Carr, T. (2005). *Trans fatty acids alter the lipid composition and size of apoB-100-containing lipoproteins secreted by HepG2 cells*. J. Nutr. Biochem. 16: 178-183.
- Miyazakia, M. y Ntambia, J. (2003). *Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 68(2): 113-121.
- Mohankumar, S.; Hanke, D.; Siemens, L.; Cattini, A.; Enns, J.; Shen, J. y col. (2013). *Dietary supplementation of trans-11-vaccenic acid reduces adipocyte size but neither aggravates nor attenuates obesity-mediated metabolic abnormalities in fa/fa Zucker rats*. Br. J. Nutr. 109(9):1628-1636.
- Mollica, M. P.; Trinchese, G.; Cavaliere, G.; De Filippo, C.; Cocca, E.; Gaita, M. y col. (2014). *c9,t11-Conjugated linoleic acid ameliorates steatosis by modulating mitochondrial uncoupling and Nrf2 pathway*. J. Lipid Res. 55(5): 837-849.
- Moloney, F.; Toomey, S.; Noone, E.; Nugent, A.; Allan, B.; Loscher, C. y Roche, H. (2007). *Antidiabetic effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid may be mediated via anti-inflammatory effects in white adipose tissue*. Diabetes. 56(3): 574-582.
- Moon, H.; Lee, H.; Seo, J.; Chung, C.; Kim, T.; Kim, I. y col. (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.
- Morino, K.; Petersen, K. y Shulman, G. (2006). *Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction*. Diabetes. 55(2): S9-S15.
- Morise, A.; Combe, N.; Boué, C. y col. (2004). *Dose effect of α -linolenic acid on PUFA conversion, bioavailability, and storage in the hamster*. Lipids. 39(4): 325-334.

Motard-Belanger, A.; Charest, A.; Grenier, G.; Paquin, P.; Chouinard, Y.; Lemieux, S. y col. (2008). *Study of the effect of trans fatty acids from ruminants on blood lipids and other risk factors for cardiovascular disease*. Am. J. Clin. Nutr. 87: 593-599.

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

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

Mozaffarian, D.; Katan, M.; Ascherio, A.; Stampfer, M. y Willett, W. (2006). *Trans fatty acids and cardiovascular disease*. N. Engl. J. Med. 354: 1601-1613.

Mozaffarian, D. y Clarke, R. (2009a). *Quantitative effects on cardiovascular risk factors and coronary heart disease risk of replacing partially hydrogenated vegetable oils with other fats and oils*. Eur. J. Clin. Nutr. 63(2): S22-33.

Mozaffarian, D.; Aro, A. y Willett, W. (2009b). *Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence*. Eur. J. Clin. Nutr. 63(2): S5-S21.

Mozaffarian, D.; Cao, H.; King, I.; Lemaitre, R.; Song, X.; Siscovick, D. y col. (2010). *Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: a cohort study*. Ann. Intern. Med. 153: 790-799.

Mozaffarian, D.; Hao, T.; Rimm, E.; Willett, W. y Hu, F. (2011). *Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men*. N. Engl. J. Med. 364: 2392-2404.

Mozaffarian, D.; de Oliveira Otto, M.C.; Lemaitre, R.; Fretts, A.; Hotamisligil, G.; Tsai, M. y col. (2013). *Trans-palmitoleic acid, other dairy fat biomarkers, and incident diabetes: the Multi Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)*. Am. J. Clin. Nutr. 97: 854-861.

Mozaffarian, D. (2015). *Diverging global trends in heart disease and type 2 diabetes: the role of carbohydrates and saturated fats*. Lancet Diabetes Endocrinol. 3: 586-588.

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

Nagao, K.; Inoue, N.; Wang, Y. y Yanagita, T. (2003). *Conjugated linoleic acid enhances plasma adiponectin level and alleviates hyperinsulinemia and hypertension in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 562-566.

Nagao, K.; Inoue, N.; Wang, Y.M.; Shirouchi, B. y Yanagita, T. (2005). *Dietary conjugated linoleic acid alleviates nonalcoholic fatty liver disease in Zucker (fa/fa) rats*. *J. Nutr.* 135: 9-13.

Nakamura, A. y Terauchi, Y. (2013). *Lessons from mouse models of high-fat diet-induced NAFLD*. *Int. J. Mol. Sci.* 14(11): 21240-21257.

Nakashima, Y. e Yokokura, A. (2010). *Consumption of a high fat diet containing lard during the growth period in rats predisposes them to favorably respond to the diet in later life*. *J. Nutr. Sci.* 56(6): 380-386.

Natarajan, S. e Ibrahim, A. (2005). *Dietary trans fatty acids alter diaphragm phospholipid fatty acid composition, triacylglycerol content and glucose transport in rats*. *Br. J. Nutr.* 93: 829-933.

Naumann, E.; Carpentier, Y.; Saebo, A.; Lassel, T.; Chardigny, J.; Sebedio, J. y Mensink, R. (2006). *Cis-9, trans-11 and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA) do not affect the plasma lipoprotein profile in moderately overweight subjects with LDL phenotype B*. *Atherosclerosis* 188: 167-174.

Navarro, V.; Zabala, A.; Macarulla, M.; Fernández-Quintela, A.; Rodríguez, V.; Simón, E. y col. (2003). *Effects of conjugated linoleic acid on body fat accumulation and serum lipids in hamsters fed an atherogenic diet*. *J. Physiol. Biochem.* 59: 193-199.

Navarro, V.; Macarulla, M.; Fernández-Quintela, A.; Rodríguez, V.; Simón, E. y Portillo, M. (2007). *Effects of trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on cholesterol metabolism in hypercholesterolaemic hamsters*. *Eur. J. Nutr.* 46: 213-219.

Neuschwander-Tetri, B. (2010). *Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites*. *Hepatology.* 52: 774-788.

Nguyen, J.; Ali, S.; Kosari, S.; Woodman, O.; Spencer, S.; Killcross, A. y col. (2017). *Western diet chow consumption in rats induces striatal neuronal activation while reducing dopamine levels without affecting spatial memory in the radial arm maze*. *Front. Behav. Neurosci.* 11:22.

Nguyen, P.; Leray, V.; Diez, M.; Serisier, S.; Le Bloch, J.; Siliart, B. y Dumon, H. (2008). *Liver lipid metabolism*. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl) 92: 272-283.

Nishina, P.; Verstuyft, J. y Paigen, B. (1990). *Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse*. J. Lipid Res. 31: 859-869.

Niture, S. y Jaiswal, A. (2014). *Regulation of Nrf2-an update*. Free Radic. Biol. Med. 66: 36-44.

Noone, E.J.; Roche, H.; Nugent, A. y Gibney, M. (2002). *The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy human subjects*. Br. J. Nutr. 88: 243-251.

Norris, L.; Collene, A.; Asp, M.; Hsu, J.; Liu, L.; Richardson, J. y col. (2009). *Comparison of dietary conjugated linoleic acid with safflower oil on body composition in obese postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus*. Am. J. Clin. Nutr. 90: 468-476.

Noto, A.; Zahradka, P.; Ryz, N.; Yurkova, N.; Xie, X. y Taylor, C. (2007). *Dietary conjugated linoleic acid preserves pancreatic function and reduces inflammatory markers in obese, insulin-resistant rats*. Metabolism. 56: 142-151.

Ntambi, J. M. (1992). *Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver*. J. Biol. Chem. 267: 10925-10930.

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

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

O'Sullivan, T.; Hafekost, K.; Mitrou, F. y Lawrence, D. (2013). *Food sources of saturated fat and the association with mortality: a meta-analysis*. Am. J. Public Health. 103: e31-e42.

Ogden, C.; Carroll, M.; Kit, B. y Flegal, K. (2014). *Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012*. JAMA. 311(8): 806-814.

Oh, J. (2012). *Growth Inhibitory Effect to Human Cancer Cell Lines by Vaccenic Acid (TVA), Precursor to c9, t11-CLA* (Master Dissertation). Pusan National University, Pusan, South Korea.

Oh, W.; Abu-Elheiga, L.; Kordari, P.; Gu, Z.; Shaikenov, T.; Chirala, S.S. y col. (2005). *Glucose and fat metabolism in adipose tissue of acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 102: 1384-1389.

Ohkawa, H.; Ohishi, N. e Yagi, K. (1979). *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction*. Anal. Biochem. 95(2): 351-358.

Oleszczuk, J.; Oleszczuk, L.; Siwicki, A.K.; Skopińska-Skopińska, E. (2012). *Biological effects of conjugated linoleic acids supplementation*. Pol. J. Vet. Sci. 15(2): 403-408.

Olomu, J. y Baracos, V. (1991). *Prostaglandin synthesis and fatty acid composition of phospholipids and triglycerides in skeletal muscle of chicks fed combinations of flaxseed oil and animal tallow*. Lipids. 26: 743-749.

Omagari, K.; Kato, S. y Tsuneyama, K. (2008). *Effects of a long-term high-fat diet and switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats*. Dig. Dis. Sci. 53: 3206-3212.

Ooyama, K.; Kojima, K.; Aoyama, T. y Takeuchi, H. (2009). *Decrease of food intake in rats after ingestion of medium-chain triacylglycerol*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 55: 423-427.

Organización Mundial de la Salud. (2013). *Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020*. Ginebra, Suiza. Recuperado de https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/94384/9789241506236_eng.pdf?sequence=1

Organización Mundial de la Salud. (2017). *Noncommunicable diseases 2017*. Ginebra, Suiza. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>.

Ostrowska, E.; Suster, D.; Muralitharan, M.; Cross, R.; Leury, B.; Bauman, D. y col. (2003). *Conjugated linoleic acid decreases fat accretion in pigs: Evaluation by dual-energy X-ray absorptiometry*. Br. J. Nutr. 89: 219-229.

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.

Pagano, C.; Soardo, G.; Esposito, W.; Fallo, F.; Basan, L.; Donnini, D. y col. (2005). *Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease*. Eur. J. Endocrinol. 152: 113-118.

- Pan, D. y Storlien, L. (1993). *Dietary lipid profile is a determinant of tissue phospholipid fatty acid composition and rate of weight gain in rats*. J. Nutr. 123: 512-519.
- Papamandjaris, A.; MacDougall, D. y Jones, P. (1998). *Medium chain fatty acid metabolism and energy expenditure: Obesity treatment implications*. Life Sci. 62: 1203-1215.
- Park, Y.; Albright, K.; Liu, W.; Storkson, J.; Cook, M. y Pariza, M. (1997). *Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice*. Lipids. 32: 853-858.
- Park, Y.; Storkson, J.; Albright, K.; Liu, W. y Pariza, M. (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.; Ntambi, J.; Cook, M.; Sih, C.; Pariza, M. (2000). *Inhibition of hepatic stearyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and its derivatives*. Biochim. Biophys. Acta. 1486(2-3): 285-92.
- Pariza, M. y Hargraves, W. (1985). *A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene*. Carcinogenesis. 6: 591-593.
- Pariza, M.; Park, Y. y Cook, M. (2001). *The biologically active isomers of conjugated linoleic acid*. Prog. Lipid. Res. 40: 283-298.
- Parodi, P.W. (1977). *Conjugated Octadecadienoic Acids of Milk Fat*. Dairy Sci. 60: 1550-1553.
- Parodi, P.W. (2004). *Milk fat in human nutrition*. Aust. J. Dairy Technol. 59: 3-59.
- Parodi, P.W. (2009). *Milk lipids: their role as potential anti-cancer agents*. Sciences des Aliments. 28: 44-52.
- Parra, P.; Palou, A. y Serra, F. (2010). *Moderate doses of conjugated linoleic acid reduce fat gain, maintain insulin sensitivity without impairing inflammatory adipose tissue status in mice fed a high-fat diet*. Nutr. Metab. (Lond.) 7: 5.
- Pedersen, O.; Kahn, C.; Flier, J. y Kahn, B. (1991). *High fat feeding causes insulin resistance and a marked decrease in the expression of glucose transporters (Glut 4) in fat cells of rats*. Endocrinol. 129(2): 771-777.

Pei, X.; Xie, Z.; Wang, J.; Shi, K.; Han, F.; Li, A. y Liu, H. (2017). *The effect of various intake levels of soybean oil on blood glucose and inflammation in mice*. Food Agr. Immunol. 29(1): 511-523.

Penedo, L.; Nunes, J.; Gama, M.; Leite, P.; Quirico-Santos, T. y Torres, A. (2013). *Intake of butter naturally enriched with cis9, trans11 conjugated linoleic acid reduces systemic inflammatory mediators in healthy young adults*. J. Nutr. Biochem. 24(12): 2144-2151.

Perdomo, M.; Santos, J. y Badinga, L. (2011). *Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid and the PPAR-gamma agonist rosiglitazone attenuate lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production by bovine immune cells*. Domest. Anim. Endocrinol. 41: 118-125.

Pereira, A.; Sá, L.; Reis, F.; Cardoso, F.; Alberici, R.; Prado, I. y col. (2012). *Administration of a murine diet supplemented with conjugated linoleic acid increases the expression and activity of hepatic uncoupling proteins*. J. Bioenerg. Biomembr. 44: 587-596.

Pérez-Matute, P.; Pérez-Echarri, N.; Martínez, J.; Marti, A. y Moreno-Aliaga, M. (2007). *Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor-alpha*. Br. J. Nutr. 97(2): 389-398.

Perris, P.; Silva, C.; Fernández, I.; Mambrin, M.; Slobodianik, N. y Feliu, M. S. (2014). *Dietas con diferentes fuentes lipídicas: su efecto en el perfil de ácidos grasos séricos de la rata*. Rev. Chil. Nutr. 41(3): 292-296.

Petersen, K.; Dufour, S.; Savage, D.; Bilz, S.; Solomon, G.; Yonemitsu, S. y col. (2007). *The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome*. Proc. Natl. Acad. Sci. 104: 12587-12594.

Peterson, K.; O'Shea, M.; Stam, W.; Mohede, I.; Patrie, J. y Hayden, F. (2009). *Effects of dietary supplementation with conjugated linoleic acid on experimental human rhinovirus infection and illness*. Antiviral Ther. 14: 33-43.

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.

Peverill, W.; Powell, L. y Skoien, R. (2014). *Evolving concepts in the pathogenesis of NASH: beyond steatosis and inflammation*. Int. J. Mol. Sci. 15(5): 8591-8638.

Pfaffenbach, K.; Gentile, C.; Nivala, A.; Wang, D.; Wei, Y. y Pagliassotti, M. (2010). *Linking endoplasmic reticulum stress to cell death in hepatocytes: roles of C/EBP homologous protein and chemical chaperones in palmitate-mediated cell death*. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 298: E1027-E1035.

Pietinen, P.; Ascherio, A.; Korhonen, P.; Hartman, A.; Willett, W.; Albanes, D. y Virtamo, J. (1997). *Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men. The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study*. Am. J. Epidemiol. 145: 876-887.

Piperova, L.; Teter, B.; Bruckental, I.; Sampugna, J.; Mills, S.; Yurawecz, M. y col. (2000). *Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat - depressing diet*. J. Nutr. 130: 2568-2574.

Pisani, L.; Oller do Nascimento, C.; Bueno, A.; Biz, C.; Albuquerque, K.; Ribeiro, E. y Oyama, L. (2008). *Hydrogenated fat diet intake during pregnancy and lactation modifies the PAI-1 gene expression in white adipose tissue of offspring in adult life*. Lipids Health Dis. 7: 13.

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.

Pollard, M.; Gunstone, F.; James, A. y Morris, L. (1980). *Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver*. Lipids. 15: 306-314.

Postic, C. y Girard, J. (2008). *Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice*. J. Clin. Invest. 118: 829-838.

- Purushotham, A.; Shrode, G.; Wendel, A.; Liu, L.F. y Belury, M. (2007). *Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats*. J. Nutr. Biochem. 18: 676-684.
- Qin, L.; Xu, J.; Han, S.; Zhang, Z.; Zhao, Y. y Szeto, I. (2015). *Dairy consumption and risk of cardiovascular disease: an updated meta-analysis of prospective cohort studies*. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 24: 90-100.
- 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.
- Raff, M.; Tholstrup, T.; Basu, S.; Nonboe, P.; Tang Sørensen, M. y Straarup, E. (2008). *A Diet Rich in Conjugated Linoleic Acid and Butter Increases Lipid Peroxidation but Does Not Affect Atherosclerotic, Inflammatory, or Diabetic Risk Markers in Healthy Young Men*. J. Nutr. 138(3): 509-514.
- Rahman, S.; 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. y col. (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.
- Randle, P.; Garland, P.; Hales, C.; Newsholme, E. (1963). *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet. 1(7285): 785-789.
- Randle, P.; Garland, P.; Newsholme, E. y Hales, C. (1965). *The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 131: 324-333.
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. *In Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. (p. 21-34) Heidelberg: Springer Press.
- Reddy, J. y Rao, M. (2006). *Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation*. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 290: G852-858.

- Reeves, P.; Nielsen, F. y Fahey, G. (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.
- Reuter, T. (2007). *Diet-induced models for obesity and type 2 diabetes*. Drug Discov Today Dis. Models. 4(1): 3-8.
- Risérus, 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.
- Risérus, U.; Arner, P.; Brismar, K. y Vessby, B. (2002a). *Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome*. Diabetes Care. 25: 1516-1521.
- Risérus, U.; Basu, S.; Jovinge, S.; Fredrikson, G.; Arnlöv, J. y Vessby, B. (2002b). *Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated C-reactive protein: A potential link to fatty acid-induced insulin resistance*. Circulation. 106: 1925-1929.
- Risérus, U.; Vessby, B.; Arnlov, J. y Basu, S. (2004a). *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.
- Risérus, U.; Vessby, B.; Arner, P. y Zethelius, B. (2004b). *Supplementation with trans10cis12-conjugated linoleic acid induces hyperproinsulinaemia in obese men: Close association with impaired insulin sensitivity*. Diabetologia. 47: 1016-1019.
- Roach, J.; Mossoba, M.; Yurawecz, M. y Kramer, J. (2002). *Chromatographic separation and identification of CLA isomers*. Anal. Chim. Acta. 465: 207-226.
- Roche, H.M.; Noone, E.; Sewter, C.; Mc Bennett, S.; Savage, D.; Gibney, M. y col. (2002). *Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXRAalpha*. Diabetes. 51: 2037-2044.
- Rodrigues, R.; Soares, J.; Garcia, H.; Nascimento, C.; Medeiros, M.; Bomfim, M. y col. (2014). *Goat milk fat naturally enriched with conjugated linoleic acid increased lipoproteins and reduced triacylglycerol in rats*. Molecules. 19(3): 3820-3831.

- Rokling-Andersen, M.; Rustan, A.; Wensaas, A.; Kaalhus, O.; Wergedahl, H.; Rost, T. y col. (2009). *Marine n-3 fatty acids promote size reduction of visceral adipose depots, without altering body weight and composition, in male Wistar rats fed a highfat diet*. Br. J. Nutr. 102: 995-1006.
- Roy, A.; Chardigny, J.M.; Bauchart, D.; Ferlay, A.; Lorenz, S.; Durand, D. y col. (2007). *Butters rich either in trans-10-C18:1 or in trans-11-C18:1 plus cis-9, trans-11 CLA differentially affect plasma lipids and aortic fatty streak in experimental atherosclerosis in rabbits*. Animal. 1: 467-476.
- 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.
- Ruth, M.R.; Wang, Y.; Yu, H.; Goruk, S.; Reaney, M.; Proctor, S. y col. (2010). *Vaccenic and elaidic acid modify plasma and splenocyte membrane phospholipids and mitogen-stimulated cytokine production in obese insulin resistant JCR: LA-cp rats*. Nutrients. 2: 181-197.
- Ryder, J.; Portocarrero, C.; Song, X.; Cui, L.; Yu, M.; Combatsiaris, T. y col. (2001). *Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid. Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2 gene expression*. Diabetes 50: 1149-1157.
- Sain, J.; Gonzalez, M.A.; Lasa, A.; Scalerandi, M.V.; Bernal, C. y Portillo, M.P. (2013). *Effects of trans-fatty acids on liver lipid metabolism in mice fed on diets showing different fatty acid composition*. Ann. Nutr. Metab. 62: 242-249.
- Sain, J.; Gonzalez, M.; Lavandera, J.; Scalerandi, M. y Bernal, C. (2015). *Trans fatty acid retention and conversion rates of fatty acids in tissues depend on dietary fat in mice*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 117(8): 1146-1158.
- Sakai, Y.; Sasahira, T.; Ohmori, H.; Yoshida, K. y Kuniyasu, H. (2006). *Conjugated linoleic acid reduced metastasized LL2 tumors in mouse peritoneum*. Virchows Arch. 449: 341-347.
- Saldeen, P. y Saldeen, T. (2006). *Omega-3 Fatty acids: structure, function, and relation to the metabolic syndrome, infertility, and pregnancy*. Metab. Syndr. Relat. Disord. 4: 138-148.
- Sampath, H.; Miyazaki, M.; Dobrzyn, A. y Ntambi, J.M. (2007). *Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat*. J. Biol. Chem. 282(4): 2483-2493.

Sampey, B.; Vanhoose, A.; Winfield, H.; Freerman, A.; Muehlbauer, M.; Fueger, P. y col. (2011). *Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet*. Obesity. 19(6): 1109-1117.

Sanders, T.; Oakley, F.; Cooper, J. y Miller, G. (2001). *Influence of a stearic acid-rich structured triacylglycerol on postprandial lipemia, factor VII concentrations, and fibrinolytic activity in healthy subjects*. Am. J. Clin. Nutr. 73: 715-721.

Sanhueza, J.; Nieto, S. y Valenzuela, A. (2002). *Acido linoleico conjugado: un acido graso con isomeria trans potencialmente beneficioso*. Rev. Chil. Nutr. 29(2): 98-105.

Santora, J.; Palmquist, D. y Roehrig, K. (2000). *Trans vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice*. J. Nutr. 130, 208-215.

Santoro, N.; Caprio, S.; Giannini, C.; Kim, G.; Kursawe, R.; Pierpont, B. y col. (2014). *Oxidized fatty acids: A potential pathogenic link between fatty liver and type 2 diabetes in obese adolescents?* Antioxid. Redox Signal. 20: 383-389.

Saponaro, C.; Gaggini, M.; Carli, F. y Gastaldelli, A. (2015). *The subtle balance between lipolysis and lipogenesis: A critical point in metabolic homeostasis*. Nutrients. 7: 9453-9474.

Scalerandi, M.V. (2013). *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*. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe.

Scalerandi, M.V.; Gonzalez, M.A.; Sain, J.; Farina, A.C. y Bernal, C.A. (2014). *Effect of conjugated linoleic acid mixtures and different edible oils in body composition and lipid regulation in mice*. Nutr. Hosp. 29: 591-601.

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

Schmitz-Peiffer, C. (2000). *Signalling aspects of insulin resistance in skeletal muscle: mechanisms induced by lipid oversupply*. Cell Signal. 12: 583-594.

Schroeder, M. y Vetter, W. (2013). *Detection of 430 Fatty acid methyl esters from transesterified butter sample*. J. Am. Oil Chem. Soc. 90: 771-790.

Sclafani, A. y Springer, D. (1976). *Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes*. *Physiol. Behav.* 17: 461-471.

Sébedio, J.; Angioni, E.; Chardigny, J.; Grégoire, S.; Juanéda, P. y Berdeaux, O. (2001). *The effect of conjugated linoleic acid isomers on fatty acids 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.

Segré, D.; Ben-Eli, D.; Deamer, D. y Lancet, D. (2001). *The lipid world*. *Orig. Life Evol.* 31: 119-145.

Shen, W.; Chuang, C.C.; Martinez, K.; Reid, T.; Brown, J.M.; Xi, L. y col. (2013). *Conjugated Linoleic Acid Reduces Adiposity and Increases Markers of Browning and Inflammation in White Adipose Tissue of Mice*. *J. Lipid Res.* 54: 909-922.

Shen, W.; Baldwin, J.; Collins, B.; Hixson, L.; Lee, K.T.; Herberg, T. y col. (2015). *Low level of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases adiposity and increases browning independent of inflammatory signaling in overweight Sv129 mice*. *J. Nutr. Biochem.* 26: 616-625.

Shimano, H. (2001). *Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes*. *Prog. Lipid Res.* 40: 439-452.

Shin, S. y Ajuwon, K. (2018). *Effects of Diets Differing in Composition of 18-C Fatty Acids on Adipose Tissue Thermogenic Gene Expression in Mice Fed High-Fat Diets*. *Nutrients*. 10(2): pii: E256.

Shingfield, K.; Ahvenjärvi, S.; Toivonen, T. Vanhatalo, A. Huhtanen, P. y Griinari, J. (2008). *Effect of incremental levels of sunflower-seed oil in the diet on ruminal lipid metabolism in lactating cows*. *Br. J. Nutr.* 99: 971-983.

Shingfield, K.; Bonnet, M. y Scollan, N. (2013). *Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods*. *Animal*. 7: 132-162.

Shiraishi, R.; Iwakiri, R.; Fujise, T.; Kuroki, T.; Kakimoto, T.; Takashima, T. y col. (2010). *Conjugated linoleic acid suppresses colon carcinogenesis in azoxymethane-pretreated rats with long-term feeding of diet containing beef tallow*. *J. Gastroenterol.* 45: 625-635.

Sikorski, A.M.; Hebert, N. y Swain, R.A. (2008). *Conjugated Linoleic Acid (CLA) inhibits new vessel growth in the mammalian brain*. *Brain Res.* 1213: 35-40.

Silveira, M.; Carraro, R.; Monereo, S. y Tebar, J. (2007). *Conjugated linoleic acid (CLA) and obesity*. Public Health Nutr. 10: 1181-1186.

Silveira Osso, F.; Moreira, A.; Teixeira, M.; Pereira, R.; Tavares do Carmo, M. y Moura, A. S. (2008). *Trans fatty acids in maternal milk lead to cardiac insulin resistance in adult offspring*. Nutrition. 24: 727-32.

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

Simopoulos, A.P. (2008). *The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease*. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 17(1): 131-134.

Siri-Tarino, P.; Sun, Q.; Hu, F. y Krauss R. (2010). *Meta-analysis of prospective cohort studies evaluating the association of saturated fat with cardiovascular disease*. Am. J. Clin. Nutr. 91(3): 535-546.

Sjögren, P.; Sierra-Johnson, J.; Gertow, K.; Rosell, M. y col. (2008). *Fatty acid desaturases in human adipose tissue: relationships between gene expression, desaturation indexes and insulin resistance*. Diabetologia. 51: 328-335.

Slots, T.; Butler, G.; Leifert, C.; Kristensen, T.; Skibsted, L. H. y Nielsen, J. (2008). *Potentials to differentiate milk composition by different feeding strategies*. J. Dairy Sci. 92: 2057-2066.

Sluijs, I.; Forouhi, N.; Beulens, J.; van der Schouw, Y.; Agnoli, C.; Arriola, L. y col. (2012). *The amount and type of dairy product intake and incident type 2 diabetes: results from the EPIC-InterAct Study*. Am. J. Clin. Nutr. 96: 382-390.

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

Smit, L.; Willett, W. y Campos, H. (2010). *Trans-fatty acid isomers in adipose tissue have divergent associations with adiposity in humans*. Lipids. 45: 693-700.

Smith, J.; Hou, T.; Ludwig, D.; Rimm, E.; Willett, W.; Hu, F. y col. (2015). *Changes in intake of protein foods, carbohydrate amount and quality, and long-term weight change: results from 3 prospective cohorts*. Am. J. Clin. Nutr. 101: 1216-1224.

Snel, M.; Jonker, J.; Schoones, J.; Lamb, H.; de Roos, A.; Pijl, H. y col. (2012). *Ectopic fat and insulin resistance: pathophysiology and effect of diet and lifestyle interventions*. Int. J. Endocrinol. 2012: 983814.

So, M.; Tse, I. y Li, E. (2009). *Dietary fat concentration influences the effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on temporal patterns of energy intake and hypothalamic expression of appetitecontrolling genes in mice*. J. Nutr. 139: 145-151.

Soares da Costa, C.; De Sousa dos Santos, A.; Santana, C.; Lopes Gonzalez, G.; Pontes Gaspar Reis, R.; Carneiro, C. y col. (2015). *Impact of a high-fat diet containing canola or soybean oil on body development and bone; parameters in adult male rats*. Nutr. Hosp. 31(5): 2147-2153.

Soedamah-Muthu, S.; Ding, E.; Al-Delaimy, W.; Hu, F.; Engberink, M.; Willett, W. y Geleijnse, J. (2011). *Milk and dairy consumption and incidence of cardiovascular diseases and all-cause mortality: dose-response meta-analysis of prospective cohort studies*. Am. J. Clin. Nutr. 93(1): 158-171.

Sofi, F.; Buccioni, A.; Cesari, F.; Gori, A.; Minieri, S.; Mannini, L. y col. (2010). *Effects of a dairy product (pecorino cheese) naturally rich in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid on lipid, inflammatory and haemorrhological variables: a dietary intervention study*. Nutr. Metab. Cardiovasc. 20: 117-124.

Spruss, A.; Kanuri, G.; Wagnerberger, S.; Haub, S.; Bischoff, S. y Bergheim, I. (2009). *Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice*. Hepatology. 50: 1094-1104.

Stabile, L.; Klautky, S.; Minor, S. y Salati, L. (1998). *Polyunsaturated fatty acids inhibit the expression of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in primary rat hepatocytes by a nuclear posttranscriptional mechanism*. J. Lipid Res. 39: 195-1963.

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

Stangl, G. (2000). *Conjugated linoleic acids exhibit a strong fat-to-lean partitioning effect, reduce serum VLDL lipids and redistribute tissue lipids in food-restricted rats*. J. Nutr. 130: 1140-1146.

Stanton, C.; Lawless, F.; Kjellmer, G.; Harrington, D.; Devery, R.; Connolly, J. y col. (1997). *Dietary influences on bovine milk cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid content*. J. Food Sci. 62: 1083-1086.

Stanton, C.; Murphy, J.; McGrath, E. y Devery, R. (2003). Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. In: *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research* (Sébedio, J.; Christie, W.; Adlof, R. y col.). AOCS Press, Champaign, IL. 2: 123-145.

Steijns, J. (2008). *Dairy products and health: Focus on their constituents or on the matrix?* Int. Dairy J. 18: 425-435.

Storlien, L.; James, D.; Burleigh, K.; Chisholm, D. y Kraegen, E. (1986). *Fat feeding causes widespread in vivo insulin resistance, decreased energy expenditure, and obesity in rats*. Am. J. Physiol. 251: E576-E583.

Storlien, L.; Kraegen, E.; Chisholm, D.; Ford, G.; Bruce, D. y Pascoe, W. (1987). *Fish oil prevents insulin resistance induced by high-fat feeding in rats*. Science. 237: 885-888.

Storlien, L.; Jenkins, A.; Chisholm, D.; Pascoe, W.; Khouri, S. y Kraegen, E. (1991). *Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid*. Diabetes. 40: 280-289.

Storlien, L.; Baur, L.; Kriketos, A.; Pan, D.; Cooney, G.; Jenkins, A. y col. (1996). *Dietary fats and insulin action*. Diabetologia. 39: 621-631.

Storlien, L.; Hulbert, A. y Else, P. (1998). *Polyunsaturated fatty acids, membrane function and metabolic diseases such as diabetes and obesity*. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 1: 559-563.

Storlien, L.; Huang, X.; Lin, S.; Xin, X.; Wang, H. y Else, P. (2001). *Dietary fat subtypes and obesity*. World Rev. Nutr. Diet. 88: 148-154.

Sugano, M.; Tsujita, A.; Yamasaki, M.; Noguchi, M. y Yamada, K. (1998). *Conjugated linoleic acid modulates tissue levels of chemical mediators and immunoglobulins in rats*. Lipids 33: 521-527.

Syvetsen, C.; Halse, J.; Høivik, H.O.; Gaullier, J.; Nurminiemi, M.; Kristiansen, K. y col. (2007). *The effect of 6 months supplementation with conjugated linoleic acid on insulin resistance in overweight and obese*. Int. J. Obes. 31: 1148-1154.

Takahashi, Y.; Kushiro, M.; Shinohara, K e 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. e 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.

Takahashi, Y.; Soejima, Y. y Fukusato, T. (2012). *Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis*. World J. Gastroenterol. 18: 2300-2308.

Teachey, M.; Taylor, Z.; Maier, T.; Saengsirisuwan, V.; Sloniger, J.; Jacob, S. y col. (2003). *Interactions of conjugated linoleic acid and lipoic acid on insulin action in the obese Zucker rat*. Metabolism. 52(9): 1167-1174.

Tessari, P., Coracina, A., Cosma, A. y Tiengo, A. (2009). *Hepatic lipid metabolism and nonalcoholic fatty liver disease*. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. 19: 291-302.

Thampi, H.; Manoj, G.; Leelamma, S. y Menon, V. (1991). *Dietary fibre and lipid peroxidation: effects of dietary fibre on levels of lipids and lipid peroxides in high fat diet*. Ind. J. Exp. Biol. 29: 563.

Tholstrup, T.; Marckmann, P.; Jespersen, J. y Sandstrom, B. (1994). *Fat high in stearic acid favorably affects blood lipids and factor VII coagulant activity in comparison with fats high in palmitic acid or high in myristic and lauric acids*. Am. J. Clin. Nutr. 59: 371-377.

Tholstrup, T.; Vessby, B. y Sandstrom, B. (2003). *Difference in effect of myristic and stearic acid on plasma HDL cholesterol within 24 h in young men*. Eur. J. Clin. Nutr. 57: 735-742.

Tholstrup, T.; Ehnholm, C.; Jauhiainen, M.; Petersen, M.; Hoy, C.E.; Lund, P. y Sandstrom, B. (2004). *Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities*. Am. J. Clin. Nutr. 79: 564-569.

Tholstrup, T.; Raff, M.; Basu, S.; Nonboe, P.; Sejrsen, K. y Straarup, E. (2006). *Effects of butter high in ruminant trans and monounsaturated fatty acids on lipoproteins, incorporation of fatty acids into lipid classes, plasma C-reactive protein, oxidative stress, hemostatic variables, and insulin in healthy young men*. Am. J. Clin. Nutr. 83(2): 237-243.

Thormar, H.; Isaacs, E.; Kim, K. y Brown, H. (1994). *Interaction of visna virus and other enveloped viruses by free fatty acids and monoglycerides*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 724: 465-471.

Thorsdottir, I.; Hill, J. y Ramel, A. (2004). *Short Communication: Seasonal variation in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in milk fat from Nordic countries*. J. Dairy Sci. 87(9): 2800-2802.

Tilg, H. y Moschen, A. (2006). *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity*. Nat. Rev. Immunol. 6: 772-783.

Toral, P.; Hervás, G.; Gómez-Cortés, P.; Frutos, P.; Juárez, M. y de la Fuente, M. (2010). *Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae*. J. Dairy Sci. 93: 1655-1667.

Tricon, S.; Burdge, G.; Kew, S.; Banerjee, T.; Russell, J.; Jones, E. y col. (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.

Tricon, S.; Burdge, G.; Jones, E.; Russell, J.; El-Khazen, S.; Moretti, E. y col. (2006). *Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men*. Am. J. Clin. Nutr. 83(4): 744-753.

Trigatti, B.; Anderson, R. y Gerber, G. (1999). *Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 255(1): 34-39.

Tschop, M. y Heiman, M. (2001). *Rodent obesity models: an overview*. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. 109(6): 307-319.

Tsuboyama-Kasaoka, N.; Takahashi, M.; Tanemura, K.; Kim, H.J.; Tange, T.; Okuyama, H. y col. (2000). *Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice*. Diabetes. 49: 1534-1542.

Tsuchida, A.; Yamauchi, T.; Ito, Y.; Hada, Y.; Maki, T.; Takekawa, S. y col. (2004). *Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity*. J. Biol. Chem. 279(29): 30817-30822.

- Tsushima, H.; Yamada, K.; Miyazawa, D.; Mori, M.; Hashimoto, Y.; Ohkubo, T. y col. (2014). *Long-term high-soybean oil feeding alters regulation of body temperature in rats*. Biol. Pharm. Bull. 37(6): 1003-1013.
- Turpeinen, A.; Mutanen, M.; Aro, A.; Salminen, I.; Basu, S.; Palmquist, D. y col. (2002). *Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans*. Am. J. Clin. Nutr. 76: 504-510.
- Tvrzicka, E.; Kremmyda, L.S.; Stankova, B. y Zak, A. (2011). *Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part I: classification, dietary sources and biological functions*. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ Palacky. Olomouc. Czech. Repub. 155: 117-130.
- Tyagi, A.; Kewalramani, N.; Dhiman, T.; Kaur, H.; Singhal, K. y Kanwajia, S. (2007). *Enhancement of the conjugated linoleic acid content of buffalo milk and milk products through green fodder feeding*. Anim. Feed Sci. Tech. 133(3-4): 351-358.
- Tyburczy, C.; Major, C.; Lock, A.L.; Destailats, F.; Lawrence, P.; Brenna, J.T. y col. (2009). *Individual trans octadecenoic acids and partially hydrogenated vegetable oil differentially affect hepatic lipid and lipoprotein metabolism in golden syrian hamsters*. J. Nutr. 139: 257-263.
- Uhegbu, F.; Ugbogu, A.; Nwoku, K. y de Victor, C. (2013). *Effect of Soybean Oil Supplemented Diet on Fatty Acid Level and Lipid Profile of Albino Rats*. Br. J. Pharmacol. Toxicol. 4(4): 158-162.
- Urakawa, H.; Katsuki, A.; Sumida, Y. y col. (2003). *Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88: 4673-4676.
- Ustundag, B.; Bahcecioglu, I.; Sahin, K.; Duzgun, S.; Koca, S.; Gulcu, F. y col. (2007). *Protective effect of soy isoflavones and activity levels of plasma paraoxonase and arylesterase in the experimental nonalcoholic steatohepatitis model*. Digest. Dis. Sci. 52(8): 2006-2014.
- Vaille, K.; Ferezou, J.; Amsler, G.; Quignard-Boulangé, A.; Parquet, M.; Gripois, D. y col. (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.
- Valenzuela, A. B. (2008). *Acidos grasos con isomeria trans I. Su origen y los efectos en la salud humana*. Rev. Chil. Nutr. 35: 162-171.

- Vandesompele, J.; De Preter, K., Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A. y Speleman, F. (2002). *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biol.* 3(7): RESEARCH0034.
- Venkatramanan, S.; Joseph, S.; Chouinard, P.; Jacques, H.; Farnworth, E. y Jones, P. (2010). *Milk enriched with conjugated linoleic acid fails to alter blood lipids or body composition in moderately overweight, borderline hyperlipidemic individuals*. *J. Am. Coll. Nutr.* 29(2): 152-159.
- Verbeek, J.; Lannoo, M.; Pirinen, E.; Ryu, D.; Spincemaille, P.; Vander-Elst, I. y col. (2015). *Roux-en-y gastric bypass attenuates hepatic mitochondrial dysfunction in mice with nonalcoholic steatohepatitis*. *Gut.* 64(4): 673-683.
- Verbeek, J.; Jacobs, A.; Spincemaille, P. y Cassiman, D. (2016). *The development of a representative mouse model with non-alcoholic steatohepatitis*. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 6: 201-210.
- Vessby, B.; Uusitupa, M.; Hermansen, K.; Riccardi, G.; Rivellese, A.; Tapsell, L. y col. (2001). *Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study*. *Diabetologia.* 44(3): 312-319.
- Vial, G.; Dubouchaud, H.; Couturier, K.; Cottet-Rousselle, C.; Taleux, N.; Athias, A. y col. (2011). *Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver*. *J. Hepatol.* 54(2): 348-356.
- Vyas, D.; Kadegowda, A. y Erdman, R. (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.
- Wade, L.G.J. (1993). *Química Orgánica* (Eds.:Hispanoamericana, P.H.) México.
- Wallace, S. y Mozaffarian, D. (2009). *Trans fatty acids and nonlipid risk factors*. *Curr. Atheroscler. Rep.* 11: 423-433.
- Wang, C. y Hegsted, D. (1949). *Determination of blood and plasma volumes, thiocyanate space, and bromsulfalein clearance in rats*. *Am. J. Physiol.* 156: 227-232.
- Wang, D.; Wei, Y. y Pagliassotti, M. (2006). *Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis*. *Endocrinology.* 147: 943-951.

- Wang, H.; Troy, L.; Rogers, G.; Fox, C.; McKeown, N.; Meigs, J. y Jacques, P. (2014). *Longitudinal association between dairy consumption and changes of body weight and waist circumference: the Framingham Heart Study*. *Int. J. Obes.* 38: 299-305.
- Wang, T.; Lim, J.; Lee, J.; Lee, S.; Hwang, J.; Jung, U. y col. (2015). *Effects of dietary trans -9 octadecenoic acid, trans -11 vaccenic acid and cis -9, trans -11 conjugated linoleic acid in mice*. *Mol. Med. Rep.* 12: 3200-3206.
- Wang, X.; Che, H.; Zhang, W.; Wang, J.; Ke, T.; Cao, R. y col. (2015). *Effects of Mild Chronic Intermittent Cold Exposure on Rat Organs*. *Int. Biol. Sci.* 11(10): 1171-1180.
- Wang, Y. y Jones, P.J. (2004). *Dietary conjugated linoleic acid and body composition*. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 1153S-1158S.
- Wang, Y.; Nagao, K.; Inoue, N.; Ujino, Y.; Shimada, Y.; Nagao, T. y col. (2006). *Isomer-specific anti-obese and hypolipidemic properties of conjugated linoleic acid in obese OLETF rats*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 355-362.
- Wang, Y.; Lu, J.; Ruth, M.; Goruk, S.; Reaney, M.; Glimm, D. y col. (2008). *Trans-11 vaccenic acid dietary supplementation induces hypolipidemic effects in JCR:LA-cp rats*. *J. Nutr.* 138(11): 2117-2122.
- Wang, Y.; Jacome-Sosa, M.M.; Ruth, M.; Goruk, S.; Reaney, M.; Glimm, D. y col. (2009). *Trans-11 vaccenic acid reduces hepatic lipogenesis and chylomicron secretion in JCR: LA-cp rats*. *J. Nutr.* 139(11): 2049-2054.
- Wang, Y.; Jacome-Sosa, M.; Ruth, M.; Shen, J.; Reaney, M.; Scott, S. y col. (2012). *The intestinal bioavailability of vaccenic acid and activation of peroxisome proliferator- activated receptor- α and - γ in a rodent model of dyslipidemia and the metabolic syndrome*. *Mol. Nutr. Food Res.* 56: 1234-1246.
- Ward, A.; Wittenberg, K.; Froebe, H.; Przybylski, R. y Malcolmson, L. (2003). *Fresh forage and solin supplementation on conjugated linoleic acid level in plasma and milk*. *J. Dairy Sci.* 86: 1742-1750.
- Warden, C. y Fisler, J. (2008). *Comparisons of diets used in animal models of high fat feeding*. *Cell Metab.* 7(4): 277.

- Weggemans, R.; Rudrum, M. y Trautwein, E. (2004). *Intake of ruminant versus industrial trans fatty acids and risk of coronary heart disease-what is the evidence?* Eur. J. Lipid Sci. Technol. 106: 390-397.
- Wei, Y.; Wang, D.; Topczewski, F. y Pagliassotti, M. (2006). *Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells.* Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 291: E275-E281.
- Weisberg, S.; McCann, D.; Desai, M.; Rosenbaum, M.; Leibel, R. y Ferrante, A. (2003). *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue.* J. Clin. Invest. 112: 1796-1808.
- Wendel, A.; Purushotham, A.; Liu, L. y Belury, M. (2009). *Conjugated linoleic acid induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of ob/ob mice.* Lipids. 44: 975-982.
- West, D.; Delany, J.; Camet, P.; Blohm, F.; Truett, A. y Scimeca, J. (1998). *Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse.* Am. J. Physiol. 275(2): R667-R672.
- White, C.; Pistell, P.; Purpera, M.; Gupta, S.; Fernandez-Kim, S.; Hise, T. y col. (2009). *Effects of high fat diet on Morris maze performance, oxidative stress, and inflammation in rats: contributions of maternal diet.* Neurobiol. Dis. 35: 3-13.
- Wilson, C.; Tran, J.; Erion, D.; Vera, N.; Febbraio, M. y Weiss, E. J. (2016). *Hepatocyte-Specific Disruption of CD36 Attenuates Fatty Liver and Improves Insulin Sensitivity in HFD-Fed Mice.* Endocrinology. 157(2): 570-585.
- Wilson, T.; Nicolosi, R.; Saati, A.; Kotyla, T. y Kritchevsky, D. (2006). *Conjugated linoleic acid isomers reduce blood cholesterol levels but not aortic cholesterol accumulation in hypercholesterolemic hamsters.* Lipids. 41: 41-48.
- 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.
- Woods, S.; Seeley, R.; Rushing, P.; D'alessio, D. y Tso, P. (2003). *A Controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats.* J. Nutr. 133: 1081-1087.
- World Health Organization (2003). *Diet, Nutrition, and the Prevention of Chronic Diseases.* WHO Technical Report Series, 916 (TRS 916). Ginebra, Suiza. Recuperado de <https://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/download/en/>.

Wronska, A. y Kmiec, Z. (2012). *Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots*. Acta physiologica. 205. 194-208.

Xia, X.; Li, G.; Song, J.; Zheng, J. y Kan, J. (2018). *Hypocholesterolaemic effect of whole-grain highland hull-less barley in rats fed a high-fat diet*. Br. J. Nutr. 119: 11021110.

Xin, Y.; Xuan, S.; Zhang, J.; Zheng, M. y Guan, H. (2008). *Omega-3 polyunsaturated fatty acids: a specific liver drug for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)*. Med. Hypotheses. 71: 820-821.

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.

Yamaguchi, K.; Yang, L.; McCall, S.; Huang, J.; Yu, X.; Pandey, S. y col. (2007). *Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis*. Hepatology. 45:1366-1374.

Yang, B.; Chen, H.; Stanton, C.; Ross, R.; Zhang, H.; Chen, Y. y col. (2015). *Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease*. J. Funct. Foods. 15: 314-325.

Yaqoob, P.; Sherrington, E.; Jeffery, N.; Sanderson, P.; Harvey, D.; Newsholme, E. y Calder, P. (1995). *Comparison of the effects of a range of dietary lipids upon serum and tissue lipid composition in the rat*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 27: 297-310.

Yasui, K.; Hashimoto, E.; Komorizono, Y.; Koike, K.; Arii, S.; Imai, Y. y col. (2011). *Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma*. Clin. Gastroenterol. Hepatol. 9: 428-433.

You, Y.; Ling, P.; Qu, J. y Bistrain, B. (2008). *Effects of medium-chain triglycerides, long-chain triglycerides, or 2-monododecanoin on fatty acid composition in the portal vein, intestinal lymph, and systemic circulation in rats*. JPEN J. Parenter Enteral Nutr. 32(2): 169-175.

Yu, E. y Hu, F.B. (2018). *Dairy products, dairy fatty acids, and the prevention of cardiometabolic disease: a review of recent evidence*. Curr. Atheroscler. Rep. 20(5): 24.

Yu, Y.; Correll, P. y Vanden Heuvel, J. (2002). *Conjugated linoleic acid decreases production of pro-inflammatory products in macrophages: evidence for a PPAR γ -dependent mechanism*. Biochim. Biophys. Acta. 1581: 89-99.

- Zabala, A.; Fernández-Quintela, A.; Macarulla, M.; Simón, E.; Rodríguez, V.; Navarro, V. y Portillo, M.P. (2006). *Effects of conjugated linoleic acid on skeletal muscle triacylglycerol metabolism in hamsters*. Nutrition. 22: 528-533.
- Zambell, K.; Keim, N.; Van Loan, M.; Gale, B.; Benito, P.; Kelley, D. y col. (2000). *Conjugated linoleic acid supplementation in humans: Effects on body composition and energy expenditure*. Lipids. 35: 777-782.
- Zammit, V. (2013). *Hepatic triacylglycerol synthesis and secretion: DGAT2 as the link between glycaemia and triglyceridaemia*. Biochem. J. 451: 1-12.
- Zeeni, N.; Bassil, M.; Fromentin, G.; Chaumontet, C.; Darcel, N.; Tome, D. y col. (2015). *Environmental enrichment and cafeteria diet attenuate the response to chronic variable stress in rats*. Physiol. Behav. 139: 41-49.
- Zhang, J.; Kothapalli, K. y Brenna, J. (2016). *Desaturase and elongase-limiting endogenous long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis*. Curr. Opin Clin. Nutr. Metab. Care. 19(2); 103-110.
- Zhang, X.; Wang, C.; Song, G.; Gan, K.; Kong, D.; Nie, Q. y Ren, L. (2013). *Mitofusion-2-mediated alleviation of insulin resistance in rats through reduction in lipid intermediate accumulation in skeletal muscle*. J. Biom. Sci. 20(1): 45.
- Zimmermann, R.; Haemmerle, G.; Wagner, E.; Strauss, J.; Kratky, D. y Zechner, R. (2003). *Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue*. J. Lipid Res. 44(11): 2089-2099.
- Zlatanov, S.; Laskaridis, K. y Sagredos, A. (2008). *Conjugated linoleic acid content of human plasma*. Lipids Health Dis. 7: 34.
- Zunong, M.; Hanada, M.; Aibibula, Y.; Okamoto, M. y Tanaka, K. (2008). *Variations in conjugated linoleic acid concentrations in cow's milk, depending on feeding systems in different seasons*. Asian-Australasian. J. Anim. Sci. 21(10): 1466-1472.