

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**IMPACTO DE LOS ÁCIDOS GRASOS ISOMÉRICOS TRANS Y CLA
SOBRE LA MODULACIÓN LIPÍDICA EN RATAS ALIMENTADAS CON
DIETAS ENRIQUECIDAS O DEPRIVADAS EN ÁCIDO LINOLEICO**

Bioquímica Ana Clara Fariña

Director de Tesis: Dr. Claudio A. Bernal

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

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

-2014-

*El recorrido es lo que importa:
el andar con sus traspies y sus buenos pasos.
La meta en realidad es peregrinar el camino paso a paso*

Jorge González Moore

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los que han hecho posible la realización de este trabajo de tesis:

En primer lugar, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por brindarme el espacio para formarme como profesional y como persona, no solo a lo largo del Doctorado sino también en mi carrera de grado, y en mi desempeño como docente.

A la Universidad Nacional del Litoral y al CONICET, por haberme otorgado las becas doctorales que me permitieron comenzar y culminar el presente Doctorado.

Al CONICET y a la Universidad Nacional del Litoral, que a través de sus subsidios PIP N° 112-200801-02831 (2009): “Efectos de los ácidos grasos trans y CLA sobre el metabolismo de lípidos en ratas con deficiencia en ácidos grasos esenciales” y PI N° 8-36 (2009): “Impacto nutricional de isómeros de ácidos grasos en animales deficientes de ácidos grasos esenciales”, colaboraron con la financiación para la realización de este trabajo de tesis.

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

A mi director, Claudio Bernal, quien generosamente me permitió formar parte de su grupo de trabajo, mostrándome críticamente el maravilloso mundo de la ciencia. Además, gracias por la paciencia y el acompañamiento en éste último tramo.

A mi co-directora, Marcela González, por su incansable espíritu positivo y por alentarme siempre. Gracias por las charlas profundas y por las no tanto pero, sobre todo, por haber confiado siempre en que se podía llegar.

A Vicky y Juli, quienes recorrieron este tramo conmigo, compartiendo las alegrías y penurias de esta experiencia. Gracias por alegrar el box con historias, chismes y largas charlas, por el apoyo incondicional y por toda la ayuda cada vez que la necesité pero, principalmente, gracias por la amistad que forjamos en este proceso.

A Flor por haberme invitado y motivado a recorrer éste camino, y por sus acertados consejos. A María Rosa por tener siempre una anécdota con la cual distender el día. A Jimena por su paciencia, tranquilidad y buena predisposición para escuchar y aconsejar. A Caro por el empuje que le pone a las cosas y por tener siempre la buena predisposición para colaborar. A Aine y Emi, por los ratos compartidos, llenos de anécdotas y alegrías.

Al resto de las personas de la Cátedra, a las chicas de Aguas y a las de Biológica, especialmente a Euge, por los consejos, las complicidades y los chismes de pasillos.

A mis amigas de siempre, Juli, Caro, Carla, Popi, Celi, Luci, por estar siempre, tendiendome una mano o poniendo una oreja. Gracias por haberme alentado a seguir adelante siempre, a pesar de no terminar de enterder en que consistió todo ésto.

A la familia Monje, por el cariño brindado todos estos años y por estar al pie del cañon cada vez que necesité, con urgencia y sin previo aviso, alguien a quien confiarle mi hija.

A mis hermanos Pablo, Fran y Nachi, y mis cuñadas Shirley, Agus y Tota, por las profundas reflexiones acerca de mi profesión, por las charlas y peleas respecto a la vida misma y por ser mis compañeros de vida.

A mi mamá y mi papá, por ser mis pilares e inspiradores, por enseñarme las verdaderas cosas importantes de la vida y darme las herramientas necesarias para poder forjar mi camino. Gracias por las eternas e inagotables jornadas de abuelos tiempo completo, sin las cuales esta tesis no hubiera llegado a su fin. Y sobre todo, gracias por el apoyo, el empuje y el amor de cada día.

A Lucas, gracias por la inagotable paciencia y el infinito apoyo, por ser padre y madre durante largas jornadas, y sin chistar. Gracias por darme la seguridad y el amor que necesito. Éste logro es de los dos.

Finalmente, a mi pequeña hijita, Catalina, por abstraerme del mundo con sus sonrisas y caricias, por mostrame la importancia de las cosas simples con su inocencia y por elegirme, incondicionalmente, cada día.

Publicaciones y presentaciones a congresos

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

Trabajos publicados

Trabajos completos publicados

- **Fariña, AC**; González, MA.; Latorre, ME; Bernal, CA. (2013). *Efectos de los conjugados del ácido linoleico sobre la incorporación tisular de ácidos grasos y metabolismo lipídico en ratas deficientes en ácidos grasos esenciales*. FABICIB; 17: p 85-102.
- **Fariña, AC**; Hirabara, S; Sain, J; Latorre, ME; González, MA; Curi, R and Bernal, CA. (2014). *Conjugated linoleic acid improves glucose utilization in the soleus muscle of rats fed linoleic acid-enriched and linoleic acid-deprived diet*. Nutr Res.; 34: 1092-1100.
- **Fariña, AC**; González, MA; Scalerandi, MV; Bernal, CA. (2014). *Effect of trans fatty acids on the nutritional status and lipid metabolism in rats fed linoleic acid enriched and deficient diets*. Eur J Lipid Sci Technol. Recientemente aceptado para su publicación.

Resúmenes publicados

- González, MA; **Fariña, AC**; Andreoli, MF; Mochiutti, N; Portillo, MP; Bernal, CA. *Efectos de los ácidos grasos trans y conjugados del ácido linoleico sobre la composición de ácidos grasos y la biosíntesis de PUFAs hepáticos en deficiencia de ácidos grasos esenciales*. (2010). Nutr Hosp.; 25: p 136.
- **Fariña, AC**; González, MA; Bernal, CA. *Efectos de los conjugados del ácido linoleico sobre lípidos hepáticos en animales de experimentación con deficiencia parcial de ácidos grasos esenciales*. (2011). Invenio-Revista de Investigación Académica-Universidad del Centro Educativo Latinoamericano; Suplemento Especial: p 28.
- Bernal, CA; **Fariña, AC**; Mochiutti, N; González, MA. (2011). *The increase in hepatic triacylglycerol by partial hydrogenated fats is due to trans fatty acids and not to essential fatty acid deficiency*. Eur J Lipid Sci Technol.; 113: p 58.

- **Fariña, AC**; González, MA; Latorre, ME; Bernal, CA. (2013). *Efectos de los conjugados del ácido linoléico sobre el metabolismo lipídico en ratas deficientes en ácidos grasos esenciales*. Publicación Periódica Anual de la Sociedad de Biología de Rosario; 1: p 205.

Presentaciones a congresos

- González, MA; **Fariña, AC**; Andreoli, MF; Mocchiutti, N; Portillo Baquedano, MP; Bernal, CA. Efectos de los ácidos grasos trans y conjugados del ácido linoleico sobre la composición de ácidos grasos y la biosíntesis de PUFAs hepáticos en deficiencia de ácidos grasos esenciales. II Congreso FESNAD. Barcelona, España. Marzo de 2010.
- **Fariña, AC**; Gonzalez, MA; Saín, J; Scalerandi, MV; Bernal, CA. Efectos de los conjugados del ácido linoleico sobre lípidos séricos en animals de experimentación con deficiencia parcial de Ácidos Grasos Esenciales. 1^{er} Congreso Bioquímico del Litoral. Santa Fe. Junio de 2011.
- **Fariña, AC**; González, MA; Bernal, CA. Efectos de los conjugados del ácido linoleico sobre lípidos hepáticos en animales de experimentación con deficiencia parcial de ácidos grasos esenciales. XXXIV Reunión Anual de CASLAN. III Jornadas Internacionales de Actualización en Nutrición y Tecnología de Alimentos. Rosario, Argentina. Septiembre de 2011.
- Bernal, CA; **Fariña, AC**; Mocchiutti, N; González, MA. The increase in hepatic triacylglycerol by partial hydrogenated fats is due to trans fatty acids and not to essential fatty acid deficiency. 9th Euro Fed Lipid Congress, Oils, Fats and Lipids: for a Health and Sustainable World. Róterdam, Países Bajos. Septiembre de 2011.
- **Fariña, AC**; González, MA; Latorre ME; Bernal, CA. Efecto de la deficiencia de ácidos grasos esenciales y de los ácidos grasos trans sobre la síntesis de LCPUFAs. V Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Buenos Aires. Julio de 2012.
- **Fariña, AC**; González, MA; Bernal, CA. Efectos de los conjugados del ácido linoleico sobre alteraciones metabólicas en animales de experimentación deficientes en ácidos grasos esenciales. XXXV Reunión Anual de CASLAN. VIII Jornadas de Actualización en Nutrición y Tecnología de Alimentos (UNLu). “Tecnología, Nutrición y Salud: El Desafío de Mejorar los Hábitos de Vida”. Luján. Septiembre de 2012.
- **Fariña, AC**; González, MA; Latorre, ME; Bernal, CA. Relación del ácido araquidónico con la grasa corporal en ratas deficientes en ácidos grasos esenciales suplementadas con CLA. XVI

Congreso Latinoamericano de Nutrición. Promoción de Salud y Prevención de Enfermedades. La Habana, Cuba. Noviembre de 2012.

- González, MA; Latorre, ME; **Fariña, AC**; Bernal, CA. Effects of trans fatty acids on brain oxidative status in an experimental animal model of essential fatty acids deficiency. 20th International Congress of Nutrition. Granada, España. Septiembre de 2013.
- **Fariña, AC**; González, MA; Latorre, ME; Bernal, CA. Efectos de los conjugados del ácido linolénico sobre el metabolismo lipídico en ratas deficientes en ácidos grasos esenciales. XV Congreso y XXXIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario. Zavalla. Noviembre de 2013.
- **Fariña, AC**; Hirabara, S; Saín, J; Latorre ME; González, MA; Curi, R; Bernal, CA. Influencia de los conjugados del ácido linoleico en el metabolismo de la glucosa en músculo sóleo de ratas alimentadas con dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico. VI Jornadas de Bioquímica y Biología Molecular de Lípidos y Lipoproteínas. Santa Fe. Julio de 2014.

Índice general

Índice de tablas.....	XIII
Índice de figuras.....	XV
Abreviaturas.....	XIX
Resumen.....	2
Abstract.....	7
Introducción.....	12
1- Componentes lipídicos de la dieta y sus efectos sobre la salud.....	13
1.1- Consumo de grasas y recomendaciones.....	13
1.2- Diferentes tipos de ácidos grasos dietarios.....	14
1.3- Patrón de ingesta de grasas dietarias.....	21
2- Deficiencia de ácidos grasos esenciales.....	22
3- Ácidos grasos <i>trans</i>.....	23
3.1- Fuentes y origen de los ácidos grasos <i>trans</i>.....	23
3.2- Efectos biológicos de los ácidos grasos <i>trans</i>.....	25
3.2.1- Efectos el sobre el metabolismo lipoproteico y el colesterol.....	27
3.2.2- Efectos sobre la función endotelial y la inflamación.....	28
3.2.3- Efectos sobre el metabolismo de los ácidos grasos esenciales.....	28
3.2.4- Efectos sobre la diabetes.....	29
3.2.5- Efectos sobre el cáncer.....	30
4- Conjugados del ácido linoleico.....	30
4.1- Fuentes y origen de los conjugados del ácido linoleico.....	30
4.2- Efectos biológicos de los conjugados del ácido linoleico.....	32
4.2.1- Efectos sobre la carcinogénesis.....	34
4.2.2- Efectos sobre el peso y la composición corporal.....	34
4.2.3- Efectos sobre la diabetes y el metabolismo glucídico.....	36
4.2.4- Efectos sobre la salud cardiovascular y el metabolismo lipídico.....	37
4.2.5- Efectos sobre la respuesta inflamatoria y el sistema inmune.....	39
Objetivos.....	41
Objetivo general.....	42
Objetivos específicos.....	42

Materiales y Métodos	44
1- Animales.....	45
2- Dietas.....	45
3- Grupos experimentales y protocolo de trabajo.....	48
4- Determinaciones realizadas.....	48
4.1- Absorción aparente de lípidos dietarios.....	48
4.2- Composición corporal.....	49
4.2.1- Determinación del contenido de agua.....	49
4.2.2- Determinación del contenido de proteínas.....	49
4.2.3- Determinación del contenido de grasa.....	49
4.3- Retención energética corporal y eficiencia energética.....	50
4.3.1- Retención energética corporal.....	50
4.3.2- Eficiencia energética.....	50
4.4- Cuantificaciones en suero.....	50
4.4.1- Concentración de triglicéridos séricos.....	50
4.4.2- Concentración de colesterol total sérico.....	51
4.4.3- Concentración de fosfolípidos séricos.....	51
4.4.4- Concentración de glucosa sérica.....	52
4.4.5- Perfil de ácidos grasos séricos.....	52
4.5- Cuantificación de lípidos tisulares.....	53
4.5.1- Concentración de triglicéridos tisulares.....	54
4.5.2- Concentración de fosfolípidos tisulares.....	54
4.5.3- Concentración de colesterol total hepático.....	54
4.5.4- Perfil de ácidos grasos tisulares.....	55
4.6- Parámetros relacionados al metabolismo lipídico.....	55
4.6.1- Secreción hepática “ <i>in vivo</i> ” de TG-pre- β lipoproteínas.....	55
4.6.2- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa.....	56
4.6.2.1- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal.....	56
4.6.2.2- Actividad total de enzima lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio.....	57
4.6.3- Actividad de enzimas lipogénicas en hígado y tejido adiposo	57

epididimal.....	
4.6.3.1- Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	58
4.6.3.2- Actividad de la enzima málica.....	58
4.6.3.3- Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos.....	58
4.6.4- Actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa-I en hígado y músculo gastrocnemio.....	58
4.7- Estudio de la expresión génica de adipoquinas y biomarcadores del estado inflamatorio en tejidos.....	59
4.8- Parámetros relacionados al estrés oxidativo hepático.....	60
4.8.1- Determinación del grado de lipoperoxidación.....	60
4.8.2- Determinación del contenido de glutatión reducido.....	61
4.8.3- Determinación de la actividad de la enzima catalasa.....	61
4.9- Estudio del metabolismo de la glucosa.....	61
4.9.1- Extracción e incubación de los músculos.....	61
4.9.2- Evaluación de la oxidación de la glucosa.....	61
4.9.3- Evaluación de la captación de 2-desoxi-[2,6 ³ H]D-glucosa e incorporación de [U- ¹⁴ C]D-glucosa.....	62
4.9.4- Evaluación de la síntesis de glucógeno.....	62
5- Análisis estadístico.....	63
Resultados.....	64
Parte I: Efecto de la sustitución parcial con ácidos grasos <i>trans</i> a dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico.....	65
I.1- Parámetros nutricionales.....	66
I.1.1- Consumo de alimento e ingesta energética.....	66
I.1.2- Ganancia de peso y composición corporal.....	66
I.1.3- Retención energética corporal y eficiencia energética.....	69
I.1.4- Pesos de hígado, tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal, y músculo gastrocnemio.....	69
I.2- Parámetros lipídicos.....	72
I.2.1- Concentraciones circulantes de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol.....	72
I.2.2- Contenido hepático de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol.....	73
I.2.3- Contenido muscular de triglicéridos y fosfolípidos.....	76

1.2.4- Composición de ácidos grasos en hígado, tejido adiposo, músculo, suero y triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad.....	76
I.3- Parámetros relacionados a la regulación del metabolismo de triglicéridos.....	100
I.3.1- Actividad de enzimas lipogénicas en hígado.....	100
I.3.2- Síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	101
I.3.3- Actividades de enzimas oxidativas de ácidos grasos en hígado y músculo gastrocnemio.....	104
I.3.4- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos.....	104
I.3.5- Remoción de triglicéridos séricos: actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemil.....	105
I.4- Expresión del ARNm de biomoduladores del metabolismo lipídico/inflamatorio en tejido adiposo epididimal.....	106
I.5- Expresión de marcadores inflamatorios en hígado.....	107
I.6- Estrés oxidativo hepático.....	107
I.7- Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa.....	110
Parte II: Efecto de la sustitución parcial con conjugados del ácido linoleico a dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico.....	115
II.1- Parámetros nutricionales.....	116
II.1.1- Consumo de alimento e ingesta energética.....	116
II.1.2- Ganancia de peso y composición corporal.....	116
II.1.3- Retención energética corporal y eficiencia energética.....	119
II.1.4- Pesos de hígado, tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal, y músculo gastrocnemio.....	119
II.2- Parámetros lipídicos	122
II.2.1- Niveles séricos de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol.....	122
II.2.2- Contenido hepático de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol.....	123
II.2.3- Contenido muscular de triglicéridos y fosfolípidos.....	126
II.2.4- Composición de ácidos grasos en hígado, tejido adiposo, músculo, suero y triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad.....	126
II.3- Parámetros relacionados a la regulación del metabolismo de triglicéridos.....	147
II.3.1- Actividad de enzimas lipogénicas en hígado.....	147

II.3.2- Síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	147
II.3.3- Actividades de enzimas oxidativas de ácidos grasos en hígado y músculo gastrocnemio.....	150
II.3.4- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos.....	150
II.3.5- Remoción de triglicéridos séricos: actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio.....	151
II.4- Expresión del ARNm de biomoduladores del metabolismo lipídico/inflamatorio en tejido adiposo epididimal.....	152
II.5- Expresión de marcadores inflamatorios en hígado.....	153
II.6- Estrés oxidativo hepático.....	153
II.7- Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa.....	156
Discusión	161
Caracterización del modelo experimental.....	162
Parte I: Efecto de la sustitución parcial con ácidos grasos <i>trans</i> a dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico	167
I.1- Parámetros nutricionales.....	168
I.2- Contenido y retención de isómeros de ácidos grasos <i>trans</i> en tejidos. Efecto sobre los biomarcadores de deficiencia de ácidos grasos esenciales.....	168
I.3- Triglicéridos circulantes y su regulación.....	171
I.4- Niveles de colesterol y fosfolípidos circulantes.....	172
I.5- Lípidos hepáticos.....	172
I.5.1- Niveles de triglicéridos y su regulación.....	172
I.5.2- Niveles de colesterol y fosfolípidos.....	173
I.5.3- Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.....	174
I.6- Grado de lipoperoxidación y respuesta inflamatoria hepática.....	174
I.7- Tejido adiposo y su regulación.....	175
I.7.1- Expresión génica de leptina, adiponectina y marcadores del estado inflamatorio.....	177
I.8- Niveles de de triglicéridos en el músculo gastrocnemius y su regulación.....	177
I.9- Metabolismo de la glucosa.....	178
Parte II: Efecto de la sustitución parcial con conjugados del ácido linoleico a dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico	180

II.1- Parámetros nutricionales.....	181
II.2- Contenido y retención de isómeros de ácidos grasos <i>trans</i> en tejidos. Efecto sobre los biomarcadores de deficiencia de ácidos grasos esenciales.....	182
II.3- Triglicéridos circulantes y su regulación.....	185
II.4- Niveles de colesterol y fosfolípidos circulantes.....	186
II.5- Lípidos hepáticos.....	186
II.5.1- Niveles de triglicéridos y su regulación.....	186
II.5.2- Niveles de colesterol y fosfolípidos.....	189
II.5.3- Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.....	189
II.6- Grado de lipoperoxidación y respuesta inflamatoria hepática.....	190
II.7- Tejido adiposo y su regulación.....	191
II.7.1- Expresión génica de leptina, adiponectina y marcadores del estado inflamatorio.....	194
II.8- Niveles de de triglicéridos en el músculo gastrocnemio y su regulación.....	195
II.9- Metabolismo de la glucosa.....	195
Conclusiones	198
Bibliografía	202
Anexo: Nomenclatura de ácidos grasos.....	244

Índice de tablas

Tabla 1- Composición de las dietas.....	46
Tabla 2- Composición de ácidos grasos de los aceites/grasas dietarios.....	47
Tabla 3- Consumo de alimento, ingesta energética, absorción aparente de la grasa dietaria y composición de carcasa.....	67
Tabla 4- Composición de ácidos grasos en hígado.....	78
Tabla 5- Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	84
Tabla 6- Composición de ácidos grasos en músculo gastrocnemio.....	88
Tabla 7- Composición de ácidos grasos en suero.....	93
Tabla 8- Composición de ácidos grasos del suero enriquecido en triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad.....	97
Tabla 9- Niveles de ARNm de biomoduladores del metabolismo lipídico/inflamatorio en tejido adiposo epididimal.....	109
Tabla 10- Niveles de ARNm de biomoduladores inflamatorio en hígado.....	109
Tabla 11- Captación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato.....	111
Tabla 12- Incorporación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato.....	112
Tabla 13- Oxidación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato.....	113
Tabla 14- Síntesis de glucógeno en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato.....	114
Tabla 15- Consumo de alimento, ingesta energética, absorción aparente de la grasa dietaria y composición de carcasa.....	117
Tabla 16- Composición de ácidos grasos en hígado.....	127
Tabla 17- Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	132
Tabla 18- Composición de ácidos grasos en músculo gastrocnemio.....	136
Tabla 19- Composición de ácidos grasos en suero.....	140
Tabla 20- Composición de ácidos grasos del suero enriquecido en triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad.....	144
Tabla 21- Niveles de ARNm de biomoduladores del metabolismo lipídico/inflamatorio en tejido adiposo epididimal.....	155

Tabla 22- Niveles de ARNm de biomoduladores inflamatorio en hígado.....	155
Tabla 23- Captación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato.....	157
Tabla 24- Incorporación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato.....	158
Tabla 25- Oxidación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato.....	159
Tabla 26- Síntesis de glucógeno en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato.....	160

Índice de figuras

Figura 1- Representación esquemática de la isomería geométrica de los ácidos grasos.....	14
Figura 2- Representación esquemática de la isomería posicional de los ácidos grasos.....	15
Figura 3- Posibles mecanismos involucrados en la insulino resistencia en células de músculo esquelético	17
Figura 4- Representación esquemática de la vía metabólica de elongación y desaturación de los ácidos grasos insaturados n-9, n-6 y n-3.....	19
Figura 5- Síntesis de eicosanoides a partir del ácido dihomo- γ -linoleico, ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico.....	20
Figura 6- Esquema de la reacción de isomerización e hidrogenación del ácido linoleico para la síntesis química de CLA.....	32
Figura 7- Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.....	33
Figura 8- Representación esquemática del síndrome lipoatrófico inducido por el 10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA en ratones.....	39
Figura 9- Evolución de la ganancia de peso diaria.....	68
Figura 10- Ganancia de peso entre los días experimentales 0 y 60 (ΔP_{60-0}).....	68
Figura 11- Retención energética total corporal diaria (RETC), retención energética de grasa corporal diaria (REGC), retención energética de proteínas corporales diaria (REPC), eficiencia energética del alimento (EE).....	70
Figura 12- Peso del hígado.....	71
Figura 13- Peso del tejido adiposo epididimal.....	71
Figura 14- Peso del tejido adiposo retroperitoneal.....	72
Figura 15- Peso del músculo gastrocnemio.....	72
Figura 16- Niveles séricos de triglicéridos (TG), fosfolípidos (FL) y colesterol (Col).....	74
Figura 17- Niveles hepáticos de triglicéridos (TG), fosfolípidos (FL) y colesterol (Col).....	75
Figura 18- Niveles musculares de triglicéridos (TG) y fosfolípidos (FL).....	76
Figura 19- Retención de ácidos grasos <i>trans</i> monoénicos en hígado.....	80

Figura 20- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido araquidónico (AA)/ácido linoleico (AL) en hígado.....	81
Figura 21- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en hígado.....	82
Figura 22- Retención de ácidos grasos <i>trans</i> monoénicos en tejido adiposo epididimal.....	86
Figura 23- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido araquidónico (AA)/ácido linoleico (AL) en tejido adiposo epididimal.....	87
Figura 24- Retención de ácidos grasos <i>trans</i> monoénico en músculo gastrocnemio.....	90
Figura 25- Relación producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en músculo gastrocnemio.....	91
Figura 26- Retención de ácidos grasos <i>trans</i> monoénicos en suero.....	95
Figura 27- Relación producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en suero.....	96
Figura 28- Retención de ácidos graos <i>trans</i> monoénicos en triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad.....	99
Figura 29- Actividad de las enzimas sintasa de ácidos grasos (FAS), málica (EM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en hígado (G6PDH).....	102
Figura 30- Actividad de las enzimas sintasa de ácidos grasos (FAS), málica (EM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en tejido adiposo epididimal.....	103
Figura 31- Actividad de las enzimas carnitina palmitoil transferasa-I en hígado (CPT-Ia) y carnitina palmitoil transferasa-I en músculo gastrocnemio (CPT-Ib).....	104
Figura 32- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos (VSTG).....	105
Figura 33- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal (TAE).....	106
Figura 34- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio...	106
Figura 35- Grado de lipoperoxidación (LPO), niveles de glutatión (GSH) y actividad de la enzima catalasa en hígado.....	108
Figura 36- Niveles de glucosa sérica.....	110
Figura 37- Evolución de la ganancia de peso diaria.....	118
Figura 38- Ganancia de peso entre los días experimentales 0 y 60 (ΔP_{60-0}).....	118

Figura 39- Retención energética total corporal diaria (RETC), retención energética de grasa corporal diaria (REGC), retención energética de proteínas corporales diaria (REPC), eficiencia energética del alimento (EE).....	120
Figura 40- Peso del hígado.....	121
Figura 41- Peso del tejido adiposo epididimal.....	121
Figura 42- Peso del tejido adiposo retroperitoneal.....	122
Figura 43- Peso del músculo gastrocnemio.....	122
Figura 44- Niveles séricos de triglicéridos (TG), fosfolípidos (FL) y colesterol (Col).....	124
Figura 45- Niveles hepáticos de triglicéridos (TG), fosfolípidos (FL) y colesterol (Col).....	125
Figura 46- Niveles musculares de triglicéridos (TG) y fosfolípidos (FL).....	126
Figura 47- Retención de isómeros CLA en hígado.....	159
Figura 48- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido araquidónico (AA)/ácido linoleico (AL) en hígado.....	130
Figura 49- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en hígado.....	131
Figura 50- Retención de isómeros CLA en tejido adiposo epididimal.....	134
Figura 51- Relación producto final/sustrato: ácido araquidónico (AA)/ácido linoleico (AL) en tejido adiposo epididimal.....	135
Figura 52- Retención de isómeros CLA en músculo gastrocnemio.....	137
Figura 53- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en músculo gastrocnemio.....	139
Figura 54- Retención de isómeros CLA en suero.....	142
Figura 55- Relación sérica producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en suero.....	143
Figura 56- Retención de isómeros CLA en triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad.....	146
Figura 57- Actividad de las enzimas sintasa de ácidos grasos (FAS), málica (EM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en hígado.....	148
Figura 58- Actividad de las enzimas sintasa de ácidos grasos (FAS), málica (EM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en tejido adiposos epididimal.....	149

Figura 59- Actividad de las enzimas carnitina palmitoil transferasa-I en hígado (CPT-Ia) y carnitina palmitoil transferasa-I en músculo gastrocnemio (CPT-Ib).....	150
Figura 60- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos (VSTG).....	151
Figura 61- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal (TAE).....	152
Figura 62- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio...	152
Figura 63- Grado de lipoperoxidación (LPO), niveles de glutatión (GSH) y actividad de la enzima catalasa en hígado.....	154
Figura 64- Niveles de glucosa sérica.....	156

Abreviaturas

9*c*,11*t*-CLA: isómer *cis*9-*trans*11-CLA

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

AA: ácido araquidónico

ACC: acil CoA-carboxilasa

ACO: acil CoA oxidasa

AE: ácido eláidico

AG: ácidos grasos

AGE: ácidos grasos esenciales

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: α -linolénico

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

AR: ácido ruménico

AV: ácido vaccénico

c: *cis*

CG: cromatografía gaseosa

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

CoA-AG: derivados CoA de ácidos grasos

Col: colesterol total

COX: ciclooxigenasas

CPT-I: carnitina palmitoil transferasa-I

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

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

*DPA: ácido docosapentaenoico. Acrónimo del inglés “docosapentaenoic acid”

ECNT: enfermedades crónicas no transmisibles

EE: eficiencia energética

EM: enzima málica

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

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

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

*FAS: sintasa de ácido graso. Acrónimo del inglés “fatty acids synthase”

FL: fosfolípidos

FLA₂: fosfolipasa A₂

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

GLUT-4: transportadores de glucosa-4

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

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

GSH: glutatión reducido

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

HK: hexoquinasa

IE: ingesta energética

Ig: inmunoglobulinas

IL: interleuquina

*IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada. Acrónimo del inglés “International Union of Pure and Applied Chemistry”

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

LOX: lipooxigenasas

LPL: lipoproteína lipasa

LPO: lipoperoxidación

LT: leucotrienos

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

NI: no identificado

NS: no significativo

OMS: Organización Mundial de la Salud

*PFK: fosfofructoquinasa. Acrónimo del inglés “phosphofructokinase”

PDH: piruvato deshidrogenasas

PG: prostaglandinas

*PHVO: aceites vegetales parcialmente hidrogenados. Acrónimo del inglés “partially hydrogenated vegetable oil”

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

PTAG-I: proteína transportadora de ácidos grasos-I

REGC: retención energética de grasa corporal

REPC: retención energética de proteínas corporal

RETC: retención energética total corporal

RI: receptor de la insulina

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

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

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

t: trans

TAE: tejido adiposo epididimal

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

TG: triglicérido

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

*UCP-I: proteínas desacoplantes-I. Acrónimo del inglés “uncoupling protein”

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

Vp: volumen plasmático

VSTG: velocidad de secreción de TG-pre- β lipoproteínas

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

Resumen y Abstract

Resumen

Ha sido demostrado que diferentes tipos de grasa dietarias están implicadas en el desarrollo y/o prevención de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). Uno de los problemas nutricionales actuales, fundamentalmente en los países occidentales, está relacionado al consumo excesivo de aceites ricos en ácidos grasos (AG) de la serie n-6. Esto ha conducido a dietas con relaciones de AG n-6/n-3 muy por encima de las recomendadas. También, y con menor frecuencia, coexisten grupos poblacionales con déficits nutricionales asociados a deprivación de los AG esenciales (AGE): ácido linoleico (AL) y ácido α -linolénico (ALA). Por otra parte, durante las últimas décadas, los isómeros de AG han despertado un gran interés por sus potenciales efectos sobre la salud humana. Así, los AG-*trans* (AGT) de origen industrial han sido asociados a efectos deletéreos incrementando el riesgo de enfermedades cardiovasculares, inflamación aguda, diabetes, entre otras ECNT. Mientras que, los conjugados del ácido linoleico (CLA) han mostrado poseer propiedades funcionales, denotando un horizonte promisorio para la prevención de ciertas ECNT. Al mismo tiempo, dependiendo de numerosos factores, estos AG isoméricos pueden tener efectos negativos sobre la salud.

El impacto metabólico de los isómeros AGT o CLA, está relacionado a numerosos factores, entre ellos: tipo específico de isómero considerado, tiempo y dosis de tratamiento, especie, modelo experimental, como también al entorno nutricional existente. En virtud de esto, la hipótesis de la presente tesis fue: “los isómeros AGT y CLA poseen un efecto diferencial sobre la modulación del metabolismo lipídico y glucídico dependiendo del entorno nutricional generado por los niveles dietarios de AL”. El objetivo de este trabajo fue investigar los potenciales efectos metabólico-nutricionales de los AGT y los CLA en dietas enriquecidas o deprivadas en AL en un modelo experimental animal.

Ratas macho, jóvenes, de la cepa Wistar fueron alimentadas durante 60 días con alguna de las siguientes dietas experimentales: ⁺AL: enriquecida en AL; ⁻AL: deprivada de AL; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con aceite rico en AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con aceite rico en AGT; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida con aceite rico en CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida con aceite rico en CLA. Las sustituciones de aceites permitieron arribar al 1% (p/p) del isómero correspondiente a cada dieta. En aspectos nutricionales, principalmente se evaluó la ganancia de peso, eficiencias dietarias y cambios en la composición corporal. En el metabolismo lipídico, fundamentalmente se puntualizó la retención de isómeros de AG, los perfiles de lípidos séricos y tisulares, como también en mecanismos de regulación de triglicéridos (TG); y en el metabolismo de la glucosa, se estudiaron

la captación, incorporación y oxidación de la misma, y la síntesis de glucógeno en músculo soleo aislado.

Todos los animales experimentales mostraron un buen estado de salud durante el tratamiento dietario, logrando un óptimo desarrollo y crecimiento. En los animales alimentados con dietas deprivadas de AL, independientemente de la ausencia o presencia de los isómeros AGT o CLA, detectamos en suero y tejidos periféricos el ácido Mead y la relación trieno/tetraeno característicos de una deficiencia marginal de AGE.

Todos los isómeros de los AGT fueron incorporados en los tejidos analizados y sus niveles totales fueron mayores en tejido adiposo que los de hígado, músculo y suero. Además, la deprivación de AL influyó diferencialmente sobre el contenido de los isómeros individuales, reduciendo los niveles de estos, dependiendo del tejido e isómero considerado. Este efecto podría estar asociado a una competencia tisular entre los AGT y los AG saturados (AGS) presentes en la dieta deprivada de AL. Además, encontramos que los AGT en la dieta enriquecida en AL reemplazaron los AG: AL, ALA y ácido araquidónico (AA) en la mayoría de los tejidos analizados. Dentro de los parámetros nutricionales, los AGT aumentaron la ganancia de peso corporal, asociado a un mayor depósito de grasa visceral, independientemente del status de AL.

Los AGT ejercieron un efecto diferente sobre el metabolismo lipídico en función del status de AL. Específicamente, los animales deprivados de AL, pero no aquellos alimentados con dieta enriquecida, mostraron un incremento de los TG circulantes asociados a una disminución en la clarificación de los TG en tejido adiposo. A nivel hepático, los niveles de TG fueron incrementados por los AGT, independientemente de los niveles de AL, aunque los mecanismos involucrados no fueron los mismos. En animales que recibieron dietas enriquecidas en AL, los AGT incrementaron los niveles de TG a través de una disminución de la oxidación de AG, indicada a través de la actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa (CPT)-Ia. Además, incrementaron la conversión de AL a AA. En los animales alimentados con dietas de en AL, el aumento en los niveles de TG hepáticos fue el resultado de una mayor síntesis de AG denotada por una mayor actividad de las enzimas sintasa de AG (FAS), enzima málica (EM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Otra diferencia importante estuvo centrada en que estos animales, mostraron una disminución de la biosíntesis de AG poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) n-6 y un incremento en la biosíntesis de AGPI-CL n-3. Este efecto podría ser consecuencia de un preferencial flujo de sustratos de AG n-3, debido a una posible competencia de los AGT con los AG n-6 a nivel de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa. En el tejido adiposo, los AGT en la dieta enriquecida en AL aumentaron el peso de los panículos epididimal y retroperitoneal. Este efecto estuvo asociado a una

disminución en los depósitos de los AG: AL, ALA y AA, lo que, probablemente, sea disparador del aumento en la actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) con el propósito de compensar esta reducción de AGPI-CL. Mientras que en los animales privados de AL, el incremento del peso de los panículos adiposos se relacionó a una mayor lipogénesis, manifestada por las actividades de las enzimas FAS, EM y G6PDH, y a un aumentado flujo de sustratos a través de la enzima estearil-CoA desaturasa (SCD-1). Este efecto pudo haber sido desencadenado por los bajos niveles de AG: AL, ALA y AA.

Las alteraciones en los lípidos y su regulación observados a nivel hepático y adiposo no tuvieron correlación con cambios en el metabolismo lipídico en músculo. No obstante, las experiencias en músculo sóleo aislado mostraron que la captación, incorporación y oxidación de la glucosa en condiciones basales incrementaron ligeramente por los AGT, independientemente del status de AL. Contrariamente, frente a la estimulación con insulina, los AGT en los músculos de animales alimentados con dieta enriquecida en AL, disminuyeron la captación, incorporación y oxidación de la glucosa, y síntesis de glucógeno. Este efecto no fue observado en los animales alimentados con dieta privada de AL. Así, los efectos observados en condiciones basales, pero no necesariamente frente al estímulo de insulina, podrían ser los responsables de la reducción de los niveles de glucemia observados, y estar asociados a los diferentes niveles musculares de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), incluyendo el ácido ruménico bioconvertido a partir de ácido *trans*-vaccénico.

En relación a los CLA: 9*c*,11*t*-CLA y 10*t*,12*c*-CLA, ambos fueron incorporados en los tejidos analizados, siendo sus niveles: tejido adiposo > músculo > hígado > suero. En estos 3 últimos, el contenido de ambos isómeros no estuvo afectado por el status de AL; en cambio en el tejido adiposo epididimal los animales que recibieron la dieta privada de AL presentaron menores niveles que los que recibieron la dieta enriquecida. Es probable que, ante la demanda de AGE por el organismo en la dieta privada de AL, y tomando en cuenta la similitud de los CLA con éste AG, los adipocitos liberen a circulación una mayor cantidad de ambos isómeros CLA. Además, los niveles de 9*c*,11*t*-CLA fueron siempre mayores a los de 10*t*,12*c*-CLA. Asimismo, la sustitución con CLA redujo los niveles de AL y ALA en hígado y tejido adiposo de los animales que recibieron la dieta enriquecida en AL. Es probable que éstos isómeros compitan con los AG: AL y ALA por su incorporación a los tejidos. Contrariamente, en la dieta privada de AL, los CLA en suero atenuaron la deficiencia de AL. En suero de ratas alimentadas con dieta privada de AL, los CLA presentaron un efecto hipotrigliceridémico, asociado a una menor secreción y a una mayor remoción de TG. Diferencialmente, en las ratas alimentadas con dieta enriquecida en AL, los CLA

no modificaron dichos niveles. Los CLA incrementaron los niveles de TG hepáticos sólo en los animales privados de AL, y estos efectos estuvieron relacionados a diferentes alteraciones en mecanismos regulatorios. Específicamente, en los animales alimentados con dieta privada de AL, el incremento de TG estuvo asociado a una reducción de la secreción de TG-lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), y a un aumento en la actividad de enzimas lipogénicas. Estos animales también mostraron un descenso en la biosíntesis de ácido araquidónico (AA) debido a un menor flujo de sustrato a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa hepática. Es probable que esta menor síntesis de AA, esté aumentando la síntesis de ácido docosahexaenoico (DHA), y desplazando el flujo de sustratos hacia ésta vía metabólica. La teoría de competitividad entre sustratos podría explicar porque, en nuestro trabajo, en el grupo enriquecido en AL el efecto inhibitorio de los CLA sobre la $\Delta 6$ -desaturasa y la biosíntesis de los AGPI-CL de la familia n-6, no se puso de manifiesto, mientras que, en el grupo privado de AL (donde el contenido de AL como sustrato para la competencia enzimática era baja) el efecto estuvo presente. En las ratas alimentadas con dieta privada de AL, los CLA tendieron a reducir el contenido de grasa corporal, alcanzando una reducción significativa en el peso de los panículos adiposos. Estos cambios no se asociaron a una menor ingesta de alimento, ni de energía, sino a una ligera menor eficiencia energética, y no fueron observados en animales alimentados con dieta enriquecida en AL. El esclarecimiento de los mecanismos regulatorios involucrados en el efecto de los CLA sobre el tejido adiposo necesita ser profundizado, no obstante, dichos mecanismos parecieran depender del status de AL. Es posible postular que en el grupo privado en AL una elevada lipólisis conduzca a una exacerbada actividad de la enzima LPL y de las enzimas lipogénicas como mecanismo compensador de la marcada reducción del tejido adiposo.

En relación al metabolismo de la glucosa, la reducción de los niveles de glucosa sérica inducida por los CLA pudo ser debido a un aumento de la glucólisis muscular, evidenciada con la mayor oxidación de glucosa en condiciones basales; la cual estuvo más acentuada en privación de AL. Contrariamente, se observó una menor respuesta a la insulina sobre la metabolización de la glucosa en los animales suplementados con CLA, independientemente de los niveles de AL. Finalmente, en los animales suplementados con CLA el palmitato no inhibió la acción de la insulina sobre la captación e incorporación de glucosa, y este efecto fue independientemente del status de AL. Es posible proponer que modificaciones en la composición de los lípidos de membrana plasmática muscular estén influyendo sobre la mayor utilización de glucosa.

En resumen:

- ✓ Los AGT, a niveles equivalentes de los que podrían ser consumidos por la población humana, producen efectos deletéreos sobre animales de experimentación, fundamentalmente incrementando la acreción de lípidos en hígado y tejido adiposo.
- ✓ La privación de AL genera cambios en el entorno metabólico de los animales influyendo tanto sobre el efecto de los AGT, como en los mecanismos de acción de éstos.
- ✓ Los niveles de 11*t*-18:1, como asimismo su bioconversión a 9*c*,11*t*-CLA podrían estar atenuando los efectos deletéreos reportados por diversos investigadores para aceites enriquecidos en 9*t*-18:1.
- ✓ Los CLA poseen efectos metabólicos diferentes en función del status de AL.
- ✓ A bajos niveles de ingesta de AL es posible una alta interacción con los CLA conduciendo a ciertos efectos biológicos benéficos, como: reducción de la acreción grasa, reducción de los TG circulantes, incremento en la biosíntesis de AGPI-CL n-3 asociado a una reducción de la biosíntesis de AGPI-CL n-6 y mejoramiento de la utilización de la glucosa.
- ✓ Los CLA en dieta privada de AL conducen en la rata a modificaciones metabólicas atenuadas de aquellas descritas en el ratón.
- ✓ Es factible postular que la baja ingesta de AL podría generar en las ratas una mayor sensibilidad a los CLA, o bien, que en dietas muy ricas en AL, los CLA no compitan en la metabolización de los AGPI n-6, conduciendo a efectos diferenciales en ambas situaciones metabólicas. Esto no descarta la posibilidad que diferentes niveles de metabolitos bioactivos se puedan generar a partir de los CLA consumidos.

Los resultados de la presente tesis contribuyen al conocimiento de los efectos benéficos y deletéreos de los isómeros de AG, como también a los mecanismos de acción de los mismos, bajo situaciones que emulan experimentalmente posibles condiciones nutricionales de la población.

Abstract

It has been widely demonstrated that the different types of dietary fat are implicated in the development and/or prevention of chronic non-communicable diseases (NCD). Nowadays, an important nutritional problem, mainly in Western countries, is related to the excessive consumption of oils rich in n-6 fatty acids (FA). This has led to diets containing n-6/n-3 FA relationships higher than those recommended. Also, and less frequently, this unbalance coexist with nutritional deficits associated to deprivation of essential FA (EFA): linoleic acid (LA) and α -linolenic acid (ALA). Moreover, in the last decades, FA isomers have aroused great interest for its potential effects on human health. Thus, the *trans*-FA (TFA) from industrial origin have been associated with deleterious effects, increasing the risk of cardiovascular diseases, acute inflammation and diabetes, among other NCD. On the other hand, conjugated linoleic acid (CLA) have shown possess functional properties, denoting a promising future for preventing certain NCD. At the same time, depending on numerous factors, these isomeric FA can have negative effects on health.

Metabolic impact of TFA or CLA isomers, is related to many factors, including: isomer specific type considered, time of treatment and dose, species, experimental model as well as the existing nutritional environment. In this regards, the hypothesis of this thesis was "TFA and CLA isomers have a differential effect on the modulation of lipid and carbohydrate metabolism depending on the nutritional environment due to LA dietary levels". The aim of this study was to investigate the potential metabolic-nutritional effects of TFA and CLA in LA-enriched or deprived diets in an experimental animal model.

Male young Wistar rats were fed for 60 days with one of the following experimental diets: ⁺AL: enriched with LA; ⁻AL: deprived of AL; ⁺AL+AGT: ⁺AL substituted with oil rich in TFA; ⁻AL+TFA: ⁻AL substituted with oil rich in TFA; ⁺AL+CLA: ⁺AL substituted with oil rich in CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL substituted with oil rich in CLA. Each one of the oil substitutions let arrive to the 1% (w/w) of the isomers of the diet. In nutritional aspects, mainly, body weight gain, dietary efficiencies and changes in body composition were evaluated. In the lipid metabolism, the focus was on FA isomers retention, lipids profile in serum and tissues, as well as in the triacylglycerol (TG) regulatory mechanisms. In the glucose metabolism, glucose uptake, incorporation and oxidation, and glycogen synthesis in isolated soleus muscle were evaluated.

All experimental animals showed good health during dietary treatment, achieving optimal growth and development. In rats fed LA-deprived diet, regardless of the absence or presence of

TFA and CLA isomers, Mead acid triene/tetraene ratio, characteristic of marginal EFA deficiency, were detected in the serum and peripheral tissues.

All TFA isomers were incorporated into the analyzed tissues and the total levels were higher in adipose tissue than liver, muscle and serum. In addition, LA deprivation differentially reduced the content of the individual isomers, depending on the tissue and isomer considered. This effect could be associated with a tisular competition between TFA and saturated FA (SFA) present in the LA-deprived diet. In addition, we found that TFA in LA-enriched diet replaced the FA: LA, ALA and AA in most analyzed tissues. Within the nutritional parameters, TFA increased body weight gain, associated with increased visceral fat deposition, regardless of AL status

The TFA exerted different effects on lipid metabolism depending on the LA status. Specifically, LA-deprived animals, but not those fed enriched diet, showed an increase in circulating TG associated with a decreased TG removal in adipose tissue. In the liver, TG levels were increased by TFA regardless LA levels, although the mechanisms involved were not the same. In animals receiving LA-enriched diets, TFA increased TG levels through a reduction in FA oxidation, indicated by the activity of the carnitine palmitoyl transferase (CPT)-Ia enzyme. Moreover, the conversion of LA to arachidonic acid (AA) was increased. In animals fed LA deprived diet, the higher TG levels in liver were the result of a greater synthesis of FA denoted by an increased activity of the FA synthase (FAS), malic (ME) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) enzymes. Another important difference was that these animals showed a decrease in the biosynthesis of n-6 long chain polyunsaturated FA (LC-PUFA) and an increase in the n-3 LC-PUFA biosynthesis. This effect could be due to preferential flow substrates of n-3 FA, result of a possible competition between TFA and n-6 FA for $\Delta 6$ -desaturase enzyme. In adipose tissue, TFA in LA-enriched diet increased epididymal and retroperitoneal fat pads weight. This effect was associated with decrease depots of the FA: AL, ALA and AA, which probably was the trigger of the higher lipoprotein lipase (LPL) enzyme activity observed, in order to compensate the LC-PUFA reduction. Otherwise, in the LA-deprived animals, the increased weight of fat depots was related to a greater lipogenesis, expressed by the higher activities of FAS, EM and G6PDH enzymes, and to a greater substrates flow through stearyl CoA desaturase enzyme (SCD-1). This effect may have been triggered by the low FA levels: AL, ALA and AA.

The alterations in lipids and their regulation observed in liver and adipose tissue did not correlate with changes in lipid metabolism in muscle. However, the experiences in isolated soleus muscle showed that the uptake, incorporation and oxidation of glucose under basal conditions were slightly increased by TFA, regardless of the LA status. Conversely, under insulin stimulation, TFA

in the muscles of animals fed LA-enriched diet, decreased uptake, incorporation and oxidation of glucose, and glycogen synthesis. This effect was not observed in animals fed LA-deprived diet. Thus, the effects observed in basal conditions, but not necessarily those observed under insulin stimulation, could be responsible of the reducing serum glucose levels observed, and could be associated with different muscle levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA), including rumenic acid bioconverted from *trans*-vaccenic acid.

In relation to the CLA: both, 9*c*,11*t*-CLA and 10*t*,12*c*-CLA, were incorporated into the tissues analyzed, and their levels were: adipose tissue > muscle > liver > serum. In the last 3 tissues, the contents of both isomers were not affected by the status of LA; however, in epididymal adipose tissue, animals fed LA-deprived diet had lower levels than those fed the enriched one. It is likely that, because of the EFA demand by the organism in the LA-deprived diet, and taking into account the similarity of the CLA with LA, adipocytes release into circulation a greater amount of both CLA isomers. Furthermore, of 9*c*,11*t*-CLA levels were always higher than those of 10*t*,12*c*-CLA. In addition, CLA supplementation reduced LA and ALA levels in the liver and adipose tissue of animals receiving LA-enriched diet. It is likely that these isomers compete with the FA: LA and ALA for its incorporation into tissues. Conversely, in the LA-deprived diet, CLA attenuated serum LA deficiency. In serum of rats fed LA-deprived diet, the CLA had a hypotriglyceridemic effect associated with a TG decreased secretion and increased clearance. Differentially, in rats fed LA-enriched diet, CLA did not change these levels. CLA increased hepatic TG levels only in LA-deprived animals, and these effects were related to different alterations in regulatory mechanisms. Specifically, the animals fed LA-deprived diet; the TG increased was associated with reduced secretion of TG-very low density lipoprotein (VLDL), and with an increase in the activity of lipogenic enzymes. These animals also showed reduced arachidonic acid (AA) biosynthesis due to a diminished flow of substrate through the $\Delta 6$ -desaturase liver enzyme. It is probably that the reduced AA synthesis is increasing the synthesis of docosahexaenoic acid (DHA), and moving the flow of substrates to this metabolic pathway. The theory of competition between substrates could explain why, in the LA-enriched group, the CLA inhibitory capacity over the $\Delta 6$ -desaturase and n-6 LC-PUFA biosynthesis was not evidenced, whereas in the LA-deprived group (where the LA content as substrate for enzymatic competition was low) this effect was present. In rats fed LA-deprived diet, CLA tended to reduce body fat content, reaching a significant reduction in the weight of the fat pads. These changes were not associated with a lower intake of food or energy, but were related to slightly lower energy efficiency, and were not observed in animals fed LA-enriched diet. The regulatory mechanisms involved in the CLA effect on adipose tissue needs to be elucidate.

However, these mechanisms seem to depend on the LA status. It is possible to postulate that in the LA-deprived group a high lipolysis leads to an exacerbated LPL and lipogenic enzymes activity as a compensatory mechanism of the marked reduction of the adipose tissue.

In relation to the glucose metabolism, reduced serum glucose levels induced by CLA could be due to an increased muscle glycolysis, as was evidenced by glucose oxidation under basal conditions; which was more pronounced in LA deprivation. Conversely, it was observed a diminished response to insulin on glucose metabolism in the CLA supplemented animals, regardless of the LA levels. Finally, in the CLA supplemented animals, palmitate did not inhibit insulin action on glucose uptake and incorporation, and this effect was independent of the LA status. It is possible to propose that changes in the composition of muscular plasma membrane lipids are influencing the increased glucose utilization.

To summarize:

- ✓ TFA, at levels equivalent to those that could be consumed by the human population, produce deleterious effects on experimental animals, mainly through increasing the accretion of lipids in liver and adipose tissue.
- ✓ LA deprivation generates changes in the animal's metabolic environment influencing both, the effect of TFA and their mechanisms of action.
- ✓ 11*t*-18:1 levels, as well as, its bioconversion to 9*c*,11*t*-CLA may be attenuating the deleterious effects reported by various researchers for the 9*t*-18:1 enriched oils.
- ✓ CLA have different metabolic effects depending on the LA status.
- ✓ At low intake of LA it is possible to occur a high interaction with CLA leading to some biological beneficial effects, such as: reducing fat accretion, reducing circulating TG, increasing n-3 LC-PUFA biosynthesis associated with a reduction of n-6 LC-PUFA biosynthesis, as well as, improving glucose utilization.
- ✓ CLA in LA-deprived diet lead to attenuated metabolic modifications in the rat, of those described in the mouse.
- ✓ It is feasible to postulate that low intake of LA, in the rats, could result in an increased sensitivity to the CLA, or that in LA rich diets, CLA would not compete in the metabolism of n-6 PUFA, leading to differential effects in both metabolic situations. This does not rule out the possibility that different levels of bioactive metabolites can be generated from the CLA consumed.

The results of this thesis contribute to the knowledge of the beneficial and deleterious effects of FA isomers, as well as to their mechanisms of action, under conditions that mimic experimentally possible nutritional conditions of the population.

Introducción

1- Componentes lipídicos de la dieta y sus efectos sobre la salud

1.1- Consumo de grasas y recomendaciones

En las últimas décadas, en los países industrializados, el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), relacionadas a desequilibrios nutricionales y a un estilo de vida sedentario, han cobrado una gran importancia y prevalencia, y se han convertido en un problema médico y socioeconómico. Este grupo de desordenes metabólicos, entre los que pueden citarse obesidad, hiperlipidemia, aterosclerosis, diabetes tipo 2 e hipertensión, están asociados a un aumento en la morbilidad y mortalidad en distintas etapas de la vida (Eckel, 2005; Nagao y col., 2008). Si bien la patogénesis de muchas de las ECNT es aún desconocida, es sabido que dentro de los desequilibrios nutricionales subyacentes a ellas, se encuentran un consumo de dietas con alta densidad energética, con elevada carga glucémica, o con desequilibrios en su perfil de ácidos grasos (AG), como principales causas etiológicas (Eckel, 2005; Kant, 2010). Asimismo, el tipo de lípidos dietarios ha mostrado ser un importante modulador en términos de riesgo asociado a muchas de éstas patologías (Krauss y col., 2000).

Las recomendaciones nutricionales sobre la ingesta de grasa dietaria total, han sido reevaluadas y modificadas en los últimos años (Smit y col., 2009; Lawrence, 2013). Así, las recomendaciones para el contenido de grasa dietaria, que años atrás era de un máximo de 30% del total de las calorías ingeridas, se ha extendido a un 35% (Diekman y col., 2009). Esta nueva recomendación se basa en que, en diversos estudios prospectivos observacionales se han encontrado escasas o ninguna relación entre la ingesta de grasa total, y la obesidad, ganancia de peso, enfermedad cardiovascular, entre otros (Beresford y col., 2006; Howard y col., 2007; Field y col., 2007). Además, la ingesta de dietas conteniendo bajas cantidades de grasa, no han demostrado ser beneficiosas dado que, normalmente, son acompañadas de altas cantidades de carbohidratos (Appel y col., 2005; Gardner y col., 2007). No obstante, no se pueden ignorar las numerosas evidencias existentes que demuestran que excesos de grasas dietarias tienen una directa correlación con la obesidad (Bray y col., 2004), diabetes tipo 2 (Riccardi y col., 2003) y otras ECNT (Cañete y col., 2007). En virtud de estas evidencias, en la actualidad la mayor atención en relación al consumo de grasa, está centrada en el tipo de grasa ingerida más que en la cantidad de grasa total.

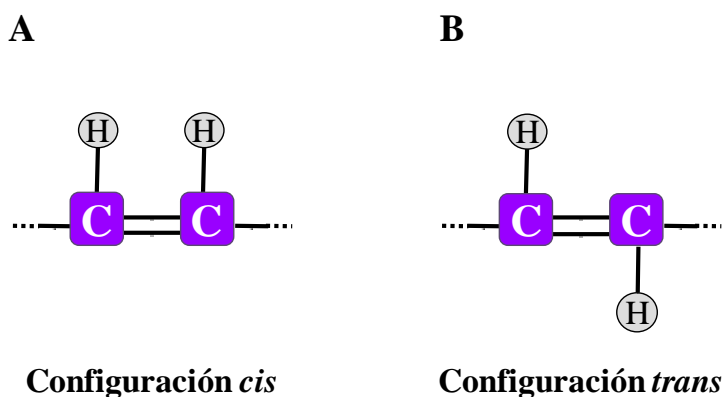
1.2- Diferentes tipos de ácidos grasos dietarios

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 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 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 leche generados en animales 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 se disponen hacia un mismo lado del plano del doble enlace, se produce una isomería geométrica *cis* (Figura 1A), mientras que, cuando se disponen en distintos lados del plano del doble enlace, se forma una isomería geométrica *trans* (Figura 1B) (Valenzuela, 2008; Mozaffarian y col., 2009).

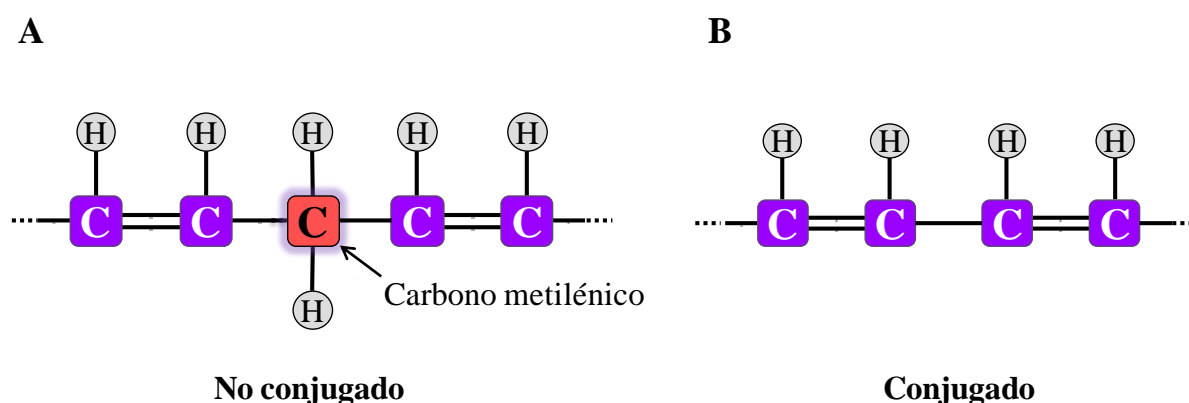
Figura 1- Representación esquemática de la isomería geométrica de los ácidos grasos



Por otro lado, la mayoría de los AG poliinsaturados en su forma natural poseen dos dobles enlaces separados por un carbono intermedio que no participa de la estructura de insaturación. Así, en un AG donde los dobles enlaces están entre los carbonos 9-10 y 12-13, el carbono 11 no participa de la estructura de insaturación. Este tipo de estructura se denomina "no conjugada" y al carbono 11 se lo designa como un carbono metilénico intermedio (Figura 2A). Sin embargo, como consecuencia de la manipulación tecnológica de las grasas y aceites, o en casos muy particulares, por efecto de la metabolización a nivel celular de ciertos AG, es posible que un doble enlace cambie

de la posición 9-10 a la 10-11, o de la 12-13 a la 11-12. En ambos casos desaparece el carbono metilénico intermedio y el AG formado se transforma en una estructura “conjugada” (Figura 2B). La conjugación de los dobles enlaces puede, además, ocasionar un cambio en la isomería espacial del AG (Sanhueza y col., 2002).

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



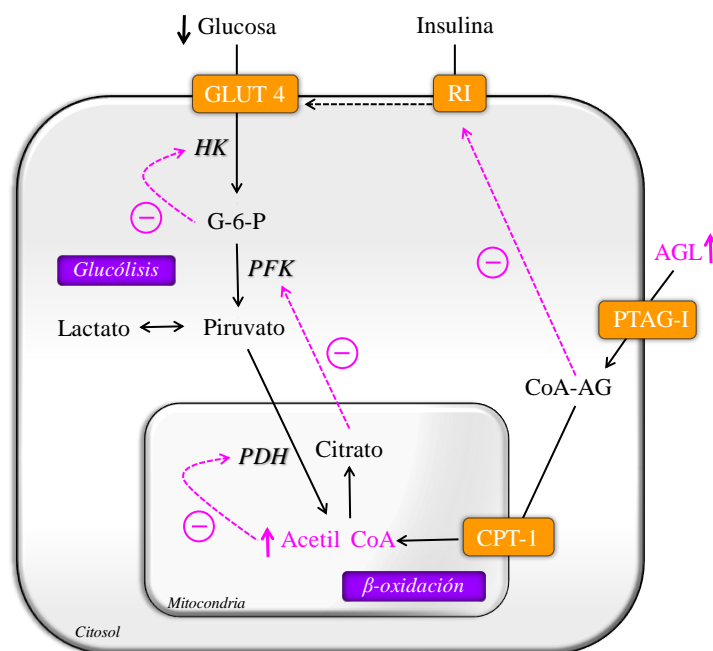
En relación a los AG saturados (AGS), es conocido que incrementan el colesterol total (Col) y el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y que disminuyen los niveles de colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Específicamente, se sabe que los AG mirístico, palmítico y láurico son responsables de dicho efecto (Tholstrup y col., 1994; Tholstrup y col., 2003; Tholstrup y col., 2004), conduciendo a un incremento en el riesgo de enfermedad coronaria. Sin embargo, el ácido esteárico decrece el colesterol 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. Sin embargo, actualmente se han puesto en discusión los efectos de las grasas saturadas. Así, Lawrence, (2013) argumentan 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 desarrollados en el músculo esquelético (Randle y col., 1963; Hirabara y col., 2012) (Figura 3). En relación a esto, es sabido que en condiciones normales, la insulina aumenta la captación y metabolismo de la glucosa en el músculo esquelético activando la vía de la kinasa-3 de fosfatidilinositol/Akt e inactivando el

sustrato Akt 160, resultando en una traslocación de los transportadores de glucosa-4 (GLUT-4) desde las vesículas intracelulares hacia las membranas plasmáticas (Sakamoto y Holman., 2008). Sin embargo, estos efectos se encuentran disminuidos bajo condiciones de insulino resistencia, entre las cuales pueden incluirse obesidad, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares (Roden., 2004; Hirabara y col., 2010). De hecho, cuando el músculo esquelético o miocitos aislados son expuestos a AGS de cadena larga decrece la sensibilidad a la insulina (Cavalho-Filho y col., 2005; Hirabara y col., 2010; Hirabara y col., 2012). Ha sido demostrado que éste efecto se debe, al menos en parte, a que los AGS de cadena larga decrecen el contenido de AG poliinsaturados (AGPI) en los fosfolípidos (FL) de membrana y a que aumentan el contenido intramiocelular de metabolitos lipídicos bioactivos derivados de ellos (Schmith-Peiffer; Andersson y col., 2002; Cooney y col., 2002).

Los ácidos grasos monoinsaturados (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 (Guilligham y col., 2011). 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 colesterol HDL/LDL, y que decrece la agregación de trombocitos. Asimismo, la incorporación de ácido oleico en ésteres de colesterol, triglicéridos (TG) y FL de partículas de lipoproteínas, aumenta la resistencia a la lipoperoxidación (Tvrzicka y col., 2011). Así, los niveles energéticos recomendados de AGS dietarios han sido establecidos como la diferencia entre las recomendaciones de grasas totales (30-35% de las calorías) y las suma de las saturadas (hasta un 10% de la calorías) y las poliinsaturadas (6-10% de la energía), no existiendo niveles de ingesta específicos de grasas monoinsaturadas (Diekman y col., 2009). Sin embargo, el estudio epidemiológico realizado por Degirolamo y Rudel (2010) sugiere que, aunque la sustitución de la grasa saturada dietaria por alimentos ricos en AGMI puede disminuir ciertos factores de riesgo cardiovascular, no disminuye la extensión de la aterosclerosis.

Figura 3- Posibles mecanismos involucrados en la insulino-resistencia en células de músculo esquelético*



Glut-4: transportadores de glucosa-4; HK: hexoquinasa; G-6-P: glucosa-6-fosfato; PFK: fosfofructoquinasa; PDH: piruvato deshidrogenasa; CPT-I: carnitil palmitoil transferasa-I; CoA-AG: derivados CoA de ácidos grasos; PTAG-I: proteína transportadora de ácidos grasos-I; AGL: ácidos grasos libres; RI: receptor de la insulina. *Adaptado de Hue y Taegtmeier (2009).

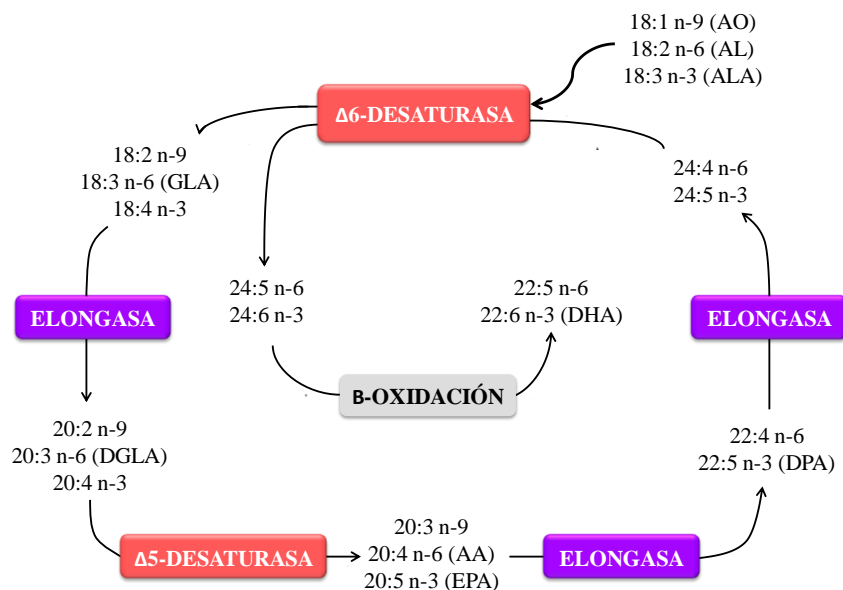
Los AGPI, son aquellos que poseen dos o más dobles enlaces en su estructura, y dentro de este grupo de AG se encuentra los ácido linoleico (AL) y α -linolénico (ALA), esenciales para el ser humano. La esencialidad está dada por la incapacidad que tiene el organismo para sintetizarlos a partir de sus precursores. Específicamente, el ser humano no puede insertar dobles enlaces en las posiciones n-6 y n-3 por falta de las enzimas ($\Delta 12$ y $\Delta 15$ -desaturasas). A partir del AL y ALA, al igual que del ácido oleico, por elongación y desaturación de las cadenas de átomos de carbono, se sintetizan los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL), de 20 o más átomos de carbono. Respecto a la elongación y desaturación de la cadena de carbonos, los AG de las diferentes familias (n-9, n-6 y n-3) compiten por el mismo sistema enzimático, y por ende, influyen en el metabolismo de los AG de sus respectivas familias. Los tres AG precursores compiten por la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, que se convierte así, en la enzima limitante. La mayor afinidad por ésta enzima la posee el ALA, seguido del AL, y finalmente del oleico; el predominio de una u otra vía metabólica depende de la cantidad de AG presente. Los AG de cada familia no pueden convertirse entre sí. Por lo tanto, la síntesis de los diferentes AGPI-CL depende, directamente, de la cantidad de sus respectivos precursores, y es esencial un aporte balanceado. Diversos estudios han demostrado

que el AL es un potente inhibidor del metabolismo de los AG de la familia n-3 (Holman, 1998). Así, la relación recomendada entre AL y ALA es de 5:1-10:1 (FAO, 2012).

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. En relación a estos diversos efectos que los AGPI poseen sobre la salud, se han establecido recomendaciones sobre su ingesta, las cuales van disminuyendo a lo largo de la vida, siendo la ingesta recomendada de AL de 2,5-9% de la energía consumida y 0,5-2% de ALA, para prevenir síntomas de deficiencia en el adulto (FAO, 2012; Aranceta y Perez-Rodrigo, 2012).

La síntesis de AGPI-CL, ácido araquidónico (AA) a partir del AL y ácido docosapentaenoico (EPA) 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. La primera desaturación es efectuada por la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, siendo el paso limitante en la síntesis de los AGPI-CL, y su actividad sobre una determinada serie de AGPI no sólo depende de la competición entre sustratos de distintas familias, sino también, de una regulación “feed-back”, mediada tanto por los productos intermediarios, como por los finales de la misma, y de otras series de AGPI (Holman, 1998; Gibson y col., 2011; Gibson y col., 2013;). Esta vía metabólica es parcialmente compartida por el ácido oleico, formando AG insaturados (AGI) de cadena larga de la familia n-9 (Figura 4). El mecanismo de la conversión final a 22:5 n-6 y ácido docosahexaenoico (DHA) no ha sido aún dilucidado. Inicialmente se creía que ocurría una $\Delta 4$ -desaturación pero, no se han encontrado pruebas de la existencia de dicha enzima (Holman, 1998). Actualmente se sabe que la última parte ocurre vía elongación y desaturación, seguida de un paso de retroconversión por β -oxidación peroxisomal (Gibson y col., 2011; Gibson y col., 2013).

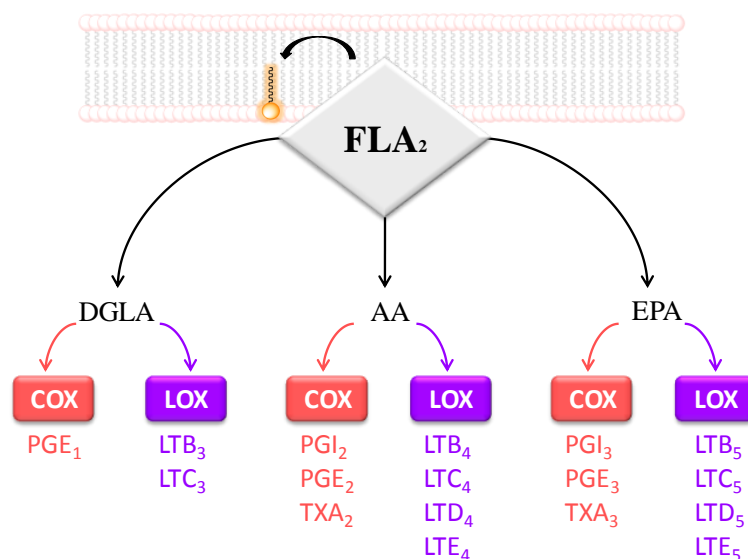
Figura 4- Representación esquemática de la vía metabólica de elongación y desaturación de los ácidos grasos insaturados n-9, n-6 y n-3*



AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; ALA: ácido α -linolénico; GLA: ácido γ -linolénico; DGLA: ácido dihomo- γ -linolénico; AA: ácido araquidónico; EPA: ácido eicosapentaenoico; DPA: ácido docosapentaenoico; DHA: ácido docosahexaenoico. *Adaptado de Gibson y col. (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 (COX-1 y COX-2) y lipooxigenasas (LOX-5, LOX-12 y LOX-15) y son convertidos en un número importante de compuestos tipo hormonas, muy activos y de vida media muy corta llamados eicosanoides. Las familias de prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) y compuestos relacionados son llamados eicosanoides dado que derivan de AGPI-CL de 20 carbonos que contienen tres, cuatro o cinco dobles enlaces (AA, EPA y ácido dihomo- γ -linolénico -DGLA-) (Calvani y Benatti, 2003; Benatti y col., 2004;). Específicamente, la actividad de la enzima COX sobre el AA conduce a la síntesis de prostanoides de la serie 2 (PGE₂-, prostaciclina I₂, y tromboxano A₂), mientras que la actividad de la LOX-5 genera LT de la serie 4. Las enzimas COX y LOX pueden también utilizar el ácido DGLA como sustrato, conduciendo a la síntesis de PG de la serie 1 (PGE₁). El EPA es convertido por estas mismas enzimas a prostanoides de la serie 3 (PGE₃, prostaciclina I₃ y tromboxano A₃) y LT de la serie 5 (Figura 5).

Figura 5- Síntesis de eicosanoides a partir del ácido dihomo- γ -linoleico, ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico*



FLA₂: fosfolipasa A₂; DGLA: ácido dihomo- γ -linoléico; AA: ácido araquidónico; EPA: ácido eicosapentanoico; COX: enzimas ciclooxigenasas; LOX: lipooxigenasas; PG: prostaglandinas; LT: leucotrienos; TX: tromboxano. *Adaptado de El-Badry y col (2007); Massaro y col. (2008)

El AA es un sustrato preferencial frente al EPA para la acción de las enzimas COX y LOX, sugiriendo que la actividad biológica de los eicosanoides derivados del EPA depende estrictamente de su disponibilidad intracelular, en comparación con los compuestos derivados del AA presentes en mayores concentraciones (Jump, 2002). Las lipooxinas y resolvinas, derivados de los AGPI n-3 y n-6 respectivamente, son otros mediadores lipídicos antiinflamatorios que modulan la respuesta fisiológica en diversos desórdenes inflamatorios (Russo, 2009). Así, los eicosanoides formados a partir de las distintas familias de AGPI, pueden ejercer una acción autócrina o parácrina diferencial, influyendo en diversos procesos fisiológicos. Específicamente, los derivados de AGPI n-6 son activos biológicamente en pequeñas cantidades y si son formados en gran proporción, contribuyen a la formación de trombos y ateromas, al desarrollo de desórdenes alérgicos e inflamatorios, y a la proliferación celular. Mientras que, los derivados de la familia n-3, conducen a un estado antiinflamatorio, antitrombótico, vasodilatador e hipolipidémico (Calvani y Benatti, 2003; El-Badry y col., 2007).

Los niveles y la relación de AGPI n-3 y n-6, como la longitud de cadena y número de insaturaciones de los AGPI n-3 poseen un significativo impacto en el desarrollo o prevención de alteraciones comunes a las ECNT (Calvani y Benatti, 2003; Simopoulos, 2008). Si bien los mecanismos y posibles efectos que ejercen estos AG exceden los objetivos de esta introducción, es

importante resaltar, entre otros, que: 1) incrementos en la ingesta de AL conducen a mayor oxidación de las partículas LDL, agregación plaquetaria e interfiere en la incorporación de EPA en los fosfolípidos de membranas, 2) el balance de AG n-6/AG n-3 es un importante determinante del riesgo de enfermedad cardiovascular, 3) ambos tipos de AG influyen sobre la expresión de genes, 4) los AGPI-CL n-3 tienen un potente efecto anti-inflamatorio, mientras que los AGPI n-6 son pro-inflamatorios, siendo esto la base de muchas ECNT, 5) ambos tipos de AGPI tienen efectos hipotensores, 6) fundamentalmente los AGPI n-3 son potentes activadores de los PPARs, mediante los cuales inducen la oxidación de AG y la supresión de la síntesis de AG y TG, 7) los derivados de la familia n-3 poseen efectos antitrombóticos debido a la disminución en la agregación plaquetaria, incremento en la producción de prostaciclina 2 y 3, decrecimiento en la viscosidad sanguínea y aumento en el tiempo de sangría, 8) los AGPI-CL principalmente de la serie n-3 mejoran la hiperinsulinemia y resistencia insulínica, fundamentalmente debido a un aumento en la fluidez de membrana, números de receptores y acción de la insulina, 9) los eicosanoides derivados de los AGPI-CL n-6 se han asociado al aumento del crecimiento de células tumorales y metástasis, mientras que un efecto inverso podría ser esperado de los derivados de los AGPI-CL n-3, 10) los AGPI-CL, pero principalmente el DHA se correlaciona con las sinapsis de tejidos neuronales mejorando la actividad de bombas y canales iónicos, 11) son importantes en la formación de nuevos tejidos, por lo cual vitales para el normal desarrollo fetal y crecimiento del neonato, función y desarrollo neuronal, actividad de los fotorreceptores de la retina, y para el aprendizaje.

1.3- Patrón de ingesta de grasas dietarias

El patrón de ingesta de los diferentes tipos de grasa dietarias, que entre otros factores, regula el desarrollo de ECNT, es característico de distintas sociedades según la problemática en el área de la nutrición y la salud pública de cada una. Así, por ejemplo, décadas atrás Keys (2005) mostró los efectos beneficios de la dieta mediterránea sobre el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, enfatizando la importancia del tipo de AG que caracterizaba la misma. En referencia a esto, el autor resalta que mientras que los Estados Unidos, y otros países occidentales consumían principalmente grasas saturadas, la población mediterránea consumía una alta proporción de grasas monoinsaturadas (aportadas principalmente por el aceite de oliva).

Por otro lado, en los últimos años, la ingesta de lípidos dietarios se ha desplazado hacia un mayor consumo de AGPI debido a sus conocidos efectos benéficos sobre la salud. Así, la dieta consumida por las poblaciones orientales (dieta japonesa), se caracteriza por un alto consumo de pescados y marisco, presentando un elevado consumo de AGPI n-3 y una buena relación n-6/n-3.

Contrariamente, en los países occidentales, el aumento del consumo de aceites vegetales, ricos en AG n-6, ha desplazado la relación n-6/n-3 a 50:1 en lugar de la recomendada (Umesha y Naidu, 2012; Fedacko y col., 2012). Diversos estudios indican que el alto consumo de AG n-6 característico de la dieta occidental ha tornado el estado fisiológico a uno protrombótico y proagregatorio, caracterizado por aumento de la viscosidad sanguínea, vasoconstricción y disminución en el tiempo de sangrado (Simopoulos, 1999). Además, la deficiencia en AGPI n-3 generada en éste tipo de dieta, se ha correlacionado con enfermedades inflamatorias, dermatitis atópica, artritis reumatoidea, colitis ulcerosa y cáncer (Schmitz y Ecker, 2008).

Los aceites vegetales líquidos, como el aceite de maíz, girasol, soja y cártamo, constituyen las principales fuentes dietarias de AGPI n-6, siendo el AL cuantitativamente el más importante. No obstante, algunos alimentos de origen animal como la yema del huevo, la carne y el hígado, resultan fuentes alimenticias, aunque minoritarias, de AA (Rodríguez-Cruz y col., 2005). Dentro de las principales fuentes de AGPI n-3 se encuentran algunos aceites vegetales tales como el de lino, chía y canola, que poseen principalmente AG de 18 átomos de carbono, siendo el ALA el mayoritario. En cambio, en los peces de agua fría (salmón, trucha, arenque, etc.) y mariscos, abundan AGPI n-3 de 20 o más átomos de carbono y con mayor número de insaturaciones (principalmente EPA y DHA) (Russ, 2009; Benatti y col., 2004).

2- Deficiencia de ácidos grasos esenciales

La deficiencia de ácidos grasos esenciales (AGE), tanto en humanos, como en animales de experimentación, conduce a numerosas alteraciones fisiológicas. El clásico síndrome de deficiencia de AGE en roedores tratados a largo plazo (de 8 a 14 semanas) (Ling 2010), ha sido caracterizado desde décadas atrás por ciertas manifestaciones tales como: descamación de las patas y la cola (Burr y Burr, 1930), fragilidad capilar (Kramar y Levine, 1953), aumento de la permeabilidad capilar (Ramalingaswami y Sinclair, 1953), alopecia, lesiones oculares, retraso en el crecimiento (Deuel y col., 1955) y defectos en la capacidad reproductiva (Alfin-Slater y col., 1958). Cabe destacar que según Lauritzen y col. (2001), muchos de los síntomas clásicos de la deficiencia de AGE antes mencionados (dermatitis, retardo en el crecimiento, infertilidad) pueden ser revertidos suplementando las dietas sólo con AG de la familia n-6, ya que éstos síntomas, se relacionan principalmente con las funciones biológicas de los n-6 y sus derivados de cadena larga. Además, ha sido demostrado en animales de experimentación, que la deficiencia de AGE puede modificar la mucosa intestinal en ratas (Korotkova y col., 2000), lo que puede comprometer la capacidad

funcional de la mucosa y exacerbar la deficiencia de AGE. El desarrollo de esteatosis hepática es otra manifestación bien conocida de la deficiencia de AGE en ratones (Werner y col., 2005).

Como se ha descrito anteriormente, las clásicas vías de conversión de AL y ALA a sus derivados de cadena larga de 20 y 22 átomos de carbono involucran las enzimas $\Delta 5$ - y $\Delta 6$ -desaturasas, siendo esta última la enzima limitante en todas las conversiones globales. La enzima $\Delta 6$ -desaturasa tienen una mayor afinidad por los AG de la familia n-3 (Holman y col., 1964; Innis, 1991; Sardesai, 1992), y esto es importante dado las elevadas relaciones 18:2 n-6/18.3 n-3 frecuentemente encontradas en la ingesta poblacional. Además, ambas desaturasas también actúan sobre la familia de los AG n-9, aunque en menor medida que para las otras dos familias de AG. Así, en privación de AGE, se produce una marcada biosíntesis del AG 20:3 n-9, conocido como ácido Mead, y cuya presencia en los tejidos animales es un indicador de deficiencia de AGE. La provisión de cantidades suficientes de cualquiera de estos dos AGE suprime la síntesis de ácido Mead (Sargent y col., 1995).

3- ácidos grasos *trans*

3.1- Fuentes y origen de los ácidos grasos *trans*

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: 1) Industrial: generados 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 eláidico (9*t*-18:1) y 2) Natural: por transformación bacteriana de los AG insaturados *cis* en *trans*, en el rúmen de los animales poligástricos, como las vacas y las ovejas, en los que prevalecen fundamentalmente el ácido *trans*-vaccénico (11*t*-18:1) y los conjugados del ácido linoleico, principalmente 9*c*,11*t*-CLA (ó ácido ruménico). Además, existe un tercer origen de AGT, que se debe al calentamiento y/o cocción de aceites a altas temperaturas en procesos de refinación y culinarios como las frituras (Brühl y col., 1995; Koletzko y Decsi, 1997; Valenzuela, 2008), en los que los isómeros generados pueden ser muy diversos, dependiendo del tipo de aceite o grasa sometida a altas temperaturas.

En las últimas décadas, la industria alimenticia estuvo empleando en gran escala la hidrogenación parcial de aceites vegetales o marinos con el fin de modificar sus propiedades físicas y organolépticas e incrementar su estabilidad química, de modo que sean más atractivos al consumidor y/o tengan propiedades deseadas para la elaboración de diferentes productos. Este

proceso se realiza bajo condiciones controladas (baja presión de hidrógeno y alta temperatura, en presencia de un catalizador metálico) y los dobles enlaces de los AG sufren varias modificaciones estructurales: se hidrogenan y transforman en enlaces simples, se modifica la localización del doble enlace formando isómeros posicionales, o el doble enlace cambia su configuración espacial dando origen a isómeros geométricos con configuración *trans* y así, se obtiene además de AGS, una mezcla de AGMI y AGPI con isomerías *cis* y *trans*. Actualmente, el proceso de hidrogenación está siendo largamente reemplazado por procesos de interesterificación o por el empleo de otras fuentes de grasas para reducir el consumo de AGT. El aporte AGT de origen natural normalmente se consideró muy bajo, aunque en la actualidad podría no ser despreciable. Su procedencia son las carnes, leche y derivados lácteos de animales rumiantes, dado que el rumen posee una gran cantidad de microorganismos anaerobios fermentativos capaces de biohidrogenar los AGPI ingeridos, derivados principalmente del forraje, aunque también, de otras fuentes alimenticias. A partir de la biohidrogenación del AL y ALA se obtiene AG di- y mono-insaturados con isomería *trans*. El primer paso en la biohidrogenación del AL dietario, resulta en la formación del isómero 9*c*,11*t*-CLA, conocido como ácido ruménico (AR), debido a la isomerización y transposición del doble enlace en la posición 12*c* a 11*t*. Este es el isómero natural más abundante presente en los tejidos (más del 90% del total de los CLA). La posterior hidrogenación del AR resulta en la producción del 11*t*-18:1, conocido como ácido *trans*-vaccénico (AV), que es el AG *trans*-monoinsaturado mayoritario presente en los productos alimenticios derivados de las grasas de rumiantes (leche, yogurt, quesos, manteca y carnes) (Parodi y col., 1997). La carne puede contener aproximadamente 1g de AGT/100g de grasa, la grasa 5-6g de AGT/100g, la manteca 2-7g de AGT/100g y la leche entera 0,07-0,1g AGT/100g (Wolf y col., 1998). En la actualidad, estos AGT naturales tienen reconocidos efectos benéficos sobre la salud, por lo cual existe cierta tendencia a incrementar el consumo de los mismos.

Dentro de los AGT consumidos por la población humana, los isómeros *trans*-18:1 son los prevalentes (85-95%), seguidos de los *trans*-18:2 (8-22%), siendo las cantidades de *trans*-18:3 y *trans*-16:1 menores al 10% (Zbikowska, 2010). Entre los *trans*-18:1, el ácido elaídico (AE) es típicamente el isómero que se encuentra en mayor cantidad (Larqué y col., 2001; Kraft y col., 2006). De ésta forma, el contenido de AGT de los productos alimenticios elaborados con aceites vegetales parcialmente hidrogenados (PHVO), varía ampliamente dentro de una categoría de producto y entre categorías.

Durante los últimos años, numerosos esfuerzos se han realizado para reducir el contenido de AGT de origen industrial en los alimentos. Así, mientras que en la década pasada los alimentos que

más contribuían a la ingesta de AGT eran: grasa para panificación (37,4%), quesos de imitación (38%), margarinas (11-49%), grasas de confitería (27%), y alimentos fritos, como pollo, papas y snacks (36%) (Larqué 2001), actualmente, y en términos generales, los niveles de AGT de origen industrial en los alimentos son muy inferiores. Consecuentemente, la ingesta de AGT en los países occidentales que 10-15 años atrás se estimaba en 7-8g/día correspondiendo este valor a un 2-3% de las calorías dietarias (Allison 1999), actualmente se estima cerca del 2-3%.

Frente a las diferentes evidencias de los efectos de los AGT sobre la salud, las recomendaciones de sociedades científicas, las regulaciones implementadas en diferentes países, los esfuerzos de las empresas alimentarias, etc., en muchos países se logró una disminución de aproximadamente 26% en el consumo de AGT. Por otro lado, la legislación en los países del MERCOSUR, también se ha ocupado de los AGT. Así, el Capítulo V del Código Alimentario Argentino, en el Anexo 1, bajo el título “Reglamento Técnico MERCOSUR sobre el rotulado nutricional de alimentos envasados”, establece la obligatoriedad de informar el contenido de AGT en los alimentos a partir de agosto de 2006. Pero esta reglamentación no se ha extendido a todos los alimentos, sino quedó circunscripta a los envasados. Actualmente el Marco Normativo del Código Alimentario Argentino en el Capítulo III- Artículo 155 tris establece: "El contenido de ácidos grasos *trans* de producción industrial en los alimentos no debe ser mayor a: 2% del total de grasas en aceites vegetales y margarinas destinadas al consumo directo y a 5% del total de grasas en el resto de los alimentos. Estos límites no se aplican a las grasas provenientes de rumiantes, incluyendo la grasa láctea".

3.2- Efectos biológicos de los ácidos grasos *trans*

Los AGT dietarios se acumulan en el tejido adiposo y se incorporan tanto, en los TG, preferencialmente en la posición sn-1, en forma similar a los AGS, siendo su destino principal la β -oxidación (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, cuyo punto de fusión es mayor que el de su contraparte *cis* y poseen una orientación espacial similar a la de los AGS, reducen la fluidez de membrana, modulando la actividad de las proteínas insertas en las membranas, produciendo alteraciones en la estructura celular y en sus funciones. Por otro lado, se ha observado que la suspensión del aporte dietario de AGT, resulta en la desaparición de éstos en las membranas celulares y en el tejido adiposo, sugiriendo esto que el tipo de isomería no es una limitante para la completa metabolización de un AG (Valenzuela, 2008). Existe una respuesta diferencial en los distintos tejidos a la ingesta de AGT dietarios que entre otros factores depende de la cantidad y tipo

de isómero considerado. Por ejemplo, el hígado responde rápidamente a la composición dietaria de los lípidos, a diferencia del tejido cerebral, cuya composición lipídica presenta una gran resistencia (Ratnayake y col., 1994; Sugano y col., 1996).

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, involucrando cerca de 140.000 sujetos, 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). Estas y otras evidencias fueron suficientes para que diferentes países, con distintos criterios, reglamenten el rotulado nutricional de los AGT en los alimentos. Asimismo, la Organización Mundial de la Salud (2003 y 2012) y diferentes asociaciones relacionadas a la Salud recomendaron limitar el consumo de los mismos y, por ende, sus niveles en los alimentos. 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), y en animales de experimentación (Roy y col., 2007) han demostrado efectos benéficos de AGT naturales. En este sentido, Mozaffarian (2009) ha demostrado 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. Estudios de los efectos deletéreos de las grasas hidrogenadas ricas en ácido elaídico han sido extendidas a otras enfermedades crónicas no transmisibles en humanos, como diabetes (Dorfman, 2009) y aterosclerosis (Mozaffarian, y col., 2006). Asimismo, nuestro grupo (Colandré, y col., 2003; Bernal y col., 2006, Sain y col., 2013) y otros han demostrado en modelos experimentales numerosas evidencias de efectos deletéreos de las grasas hidrogenadas enriquecidas en AE, como asimismo efectos positivos de grasas ricas en AV y/o AR (Andreoli y col., 2007, 2009, 2011, 2012; Scalerandi y col., 2014), por lo cual el tipo de AGT presente en la dieta puede ser determinante del riesgo de desarrollo o prevención de ciertas ECNT.

3.2.1- Efectos el sobre el metabolismo lipoproteico y el colesterol

Numerosos estudios clínicos y epidemiológicos han establecido una clara relación entre el consumo de AGT de origen industrial y los niveles elevados de TG plasmáticos, colesterol total, colesterol-LDL y descenso de los niveles de colesterol-HDL, lo cual lleva a concluir que el consumo de AGT produce un aumento en el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Mensink y col., 1990; Koletzko y Decsi, 1997; Lichtenstein y col., 2000; de Roos y col., 2001; Sundram y col., 2003; Stender y Dyerberg., 2004; Mozaffarian y col., 2006; Brooker y col., 2008).

Hace mas de 30 años, se reportó por primera vez el efecto que tienen los AGT monoinsaturados de elevar el colesterol, en contraste con sus isómeros *cis* (Vergroesen y col., 1975). Mensink y col. (1990) demostraron que el consumo de la dieta rica en AGT resultó en un aumento del 14% de los niveles séricos de colesterol-LDL y disminuyó un 12% los niveles de colesterol-HDL, comparado con la dieta conteniendo AG *cis*-monoinsaturados. Estos resultados fueron similares que los hallados para la dieta conteniendo AGS pero, la relación colesterol LDL/HDL fue mayor en las personas que consumieron AGT. Si bien este estudio se realizó con niveles de AGT exageradamente altos (30g/día), los resultados fueron corroborados luego en un estudio similar con niveles de AGT más factibles de ser consumidos habitualmente (20g/día) (Nestel y col., 1992). Uno de los mecanismos propuesto por el cual los AGT podrían ejercer éstos efectos es que, principalmente el AE, aumenta el transporte del colesterol desde las partículas de HDL hacia las de LDL (Lagrost, 1992). Este transporte es mediado por la Proteína Transferasa de Ésteres de Colesterol, que transfiere ésteres de colesterol a cambio de TG (Koletzko y col., 1996). Abbey y Nestel (1994) han demostrado, *in vitro*, que la actividad de la Proteína Transferasa de Ésteres de Colesterol incrementa alrededor de un 20% cuando el 4% de la energía total aportada por el ácido oleico es reemplazada por AE. Estudios *in vitro*, han demostrado que los AGT alteran la secreción, la composición lipídica y el tamaño de las partículas de apolipoproteína B-100, producidas por las células hepáticas. Además, aumentan la acumulación celular, como también, la secreción de colesterol libre y ésteres de colesterol (Mittmesser y col., 2005; Dashti y col., 2002; Mauger y col., 2003). Asimismo, estudios en humanos han demostrado una disminución en el catabolismo de las partícula LDL apoB100 (Matthan y col., 2004), reducción del tamaño de las partículas LDL (Mauger y col., 2003) y aumento en el catabolismo de la apoA-I (Matthan y col., 2004).

Dietas ricas en AGT monoinsaturados han mostrado aumentar más los niveles de lipoproteína (a) que dietas ricas en AGS (Nestel y col., 1992; Almendingen y col., 1995; Sundram y col., 1997). Además, diversos estudios han demostrado que, reemplazando el contenido de aceites

parcialmente hidrogenados rico en AGT con aceites conteniendo mezclas de AG *cis* (AGS con ácido oleico ó AGS con AL), se disminuye la concentración de lipoproteína (a) (Vergoesen y col., 1975; Lichtenstein y col., 1993). Estos estudios evidencian un mayor efecto aterogénico de los AGT que de los AGS.

3.2.2- Efectos sobre la función endotelial y la inflamación

Diversos estudios sugieren que los AGT causan disfunción endotelial. Así, la ingesta de dichos AG, ha sido asociada a aumento en los niveles de ciertos marcadores de disfunción endotelial, incluyendo la molécula soluble de adhesión intracelular-1, la molécula soluble de adhesión vascular-1 y selectina E (López-García y col., 2005). Este aumento observado en la selectina E también ha sido observado reemplazando isocalóricamente ácido oleico o carbohidratos con AGT (Baer y col., 2004). Además, de Roos y col. (2002) han demostrado que el consumo de dietas enriquecidas en AGT generan una reducción del 29% del flujo de la arteria braquial mediado por la vasodilatación comparado con la ingesta de AGS.

Los mecanismos celulares que relacionan los AGT con las vías inflamatorias no han sido bien establecidos. Se ha observado que los AGT modulan la respuesta de monocitos y macrófagos en humanos, aumentando la producción de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e interleuquina (IL)6 (Han y col., 2002), y posiblemente, de la proteína quimiotáctica-1 de monocitos (Mozaffarian y col., 2004a). El efecto de la adiposidad sobre los niveles circulantes de IL6 y proteína C reactiva, han sugerido que los efectos inflamatorios de los AGT podrían ser mediados, al menos parcialmente, por el tejido adiposo (Mozaffarian y col., 2004b). En este sentido, estudios realizados en adipocitos de animales de experimentación alimentados con AGT se ha observado alteraciones en la expresión génica de los PPAR- γ , resistina y lipoproteína lipasa (LPL) (Saravanan y col., 2005).

3.2.3- Efectos sobre el metabolismo de los ácidos grasos esenciales

Un efecto inhibitorio de los AGT en las enzimas Δ 5- y/o Δ 6-desaturasas causaría múltiples alteraciones en la biosíntesis de AGPI-CL. En relación a esto, diversas experiencias, tanto *in vitro* como en animales de experimentación y humanos, han demostrado que los AGT podrían perjudicar la síntesis de AGPI-CL a partir de sus precursores AL y ALA.

Investigaciones *in vitro*, tanto en tejidos de roedores (Mahfouz y col., 1984; Koletzko, 1992) como en cultivos de fibroblastos humanos (Rosenthal y Doloresco, 1984) han demostrado claramente que los AGT inhiben la desaturación y elongación de AL y ALA a sus metabolitos

AGPI-CL. Investigaciones *in vivo*, en ratas, también han mostrado que la exposición a varios AGT perjudican el metabolismo de los AG esenciales (Anderson 1975; Lawson 1983; Bruckner 1984). Los diferentes AGT poseen diferentes potenciales inhibitorios sobre el metabolismo de los AG esenciales. Así, el efecto inhibitorio más potente ha sido demostrado con el ácido linolelaídico (6*t*,12*t*-18:2), cuyo aporte al consumo humanos, generalmente, es muy bajo (Christiansen y col., 1997). Sin embargo, tanto el AE como mezclas de otros AGT, han demostrado tener un marcado efecto perjudicial sobre la síntesis de los AGPI-CL (Linchtenstein y col., 2003).

Este efecto inhibitorio de la biosíntesis de AGPI, puede tener un impacto mucho mayor en las primeras etapas de la vida. En este sentido ha sido demostrado que los AGT son transferidos por la placenta al feto e incorporados en los tejidos fetales correlacionándose negativamente con el peso al nacimiento, tanto de niños prematuros como nacidos a término, y también pueden reducir la duración del embarazo (Zbikowska, 2010). Los recién nacidos prematuros, tienen mínimos depósitos de AGPI-CL, siendo el requerimiento de éstos muy elevado y su síntesis limitada. Koletzko (1992) investigaron el efecto de los AGT sobre los AGPI-CL en recién nacidos prematuros y encontraron AGT en el plasma, TG, ésteres de colesterol y FL de todos los bebés, que solo habían recibido alimentación enteral y cuya composición de AG plasmática reflejaba, principalmente, el suministro y metabolismo intrauterino. Estos autores, no encontraron una correlación entre los niveles de AL y ALA con los de los AGT, pero observaron una correlación inversa entre el porcentaje de AGT con el contenido de AGPI-CL. Asimismo, existió una correlación inversa con las relaciones AA/AL y DHA/ALA. El mismo grupo de investigación (Decsi y Koletzko, 1995) estudiaron el potencial efecto de los AGT para interferir en la síntesis de AGPI-CL en niños de alrededor de 7 años, y encontraron que los AGT no se correlacionaban con los niveles de AL, pero sí lo hacían inversamente con los de AA y los AGPI-CL totales de la familia n-6, como también con la relación AA/AL. Sin embargo, no hallaron correlación inversa entre los AGT y los AGPI-CL de la familia n-3, postulando que esta discrepancia podría deberse a que la síntesis de DHA a partir de ALA es mucho más compleja que la de AA a partir de AL.

3.2.4- Efectos sobre la diabetes

Los estudios realizados sobre la asociación entre los AGT y la mayor incidencia de diabetes han arrojado resultados controversiales. Mientras que algunos de los estudios realizados tanto en hombres, como en mujeres (van Dam y col., 2002; Meyer y col., 2001) no han encontrado asociación entre la ingesta de AGT y la incidencia de diabetes, un estudio realizado en 84.941 mujeres a lo largo de 16 años (Hu y col., 2001), mostró que la ingesta de AGT se relacionó

positivamente con la incidencia de diabetes. Aparentemente, las discrepancias entre los resultados obtenidos en los diferentes estudios, podría deberse a que en aquellos en los que no se encontró correlación, la ingesta de AGT fue muy baja (1,3% de energía) o el reporte de diabetes fue incorrectamente realizado (Mozaffarian y col., 2006). Asimismo, existen algunos reportes de que los AGT podrían aumentar los niveles de insulina (Larqué 2001; Meyer y col., 2001; Bray y col., 2002). Los mecanismos moleculares involucrados que podrían estar involucrados en el efecto de los AGT sobre la diabetes mellitus no han sido bien establecidos, pero evidencias de los efectos de los AGT sobre el metabolismo en adipocitos (Sarvanan y col., 2005) y sobre la inflamación sistémica (Mozaffarian y col., 2004a; López-García y col., 2005; Mozaffarian y col., 2004b; Han y col., 2002; Baer y col., 2004), sugieren posibles vías y mecanismos de acción.

3.2.5- Efectos sobre el cáncer

Estudios epidemiológicos han reportado una correlación positiva entre el incremento de la grasa en la dieta y la mayor incidencia de cáncer de mama, colon y próstata. Una relación específica entre el consumo de grasas hidrogenadas y el riesgo de desarrollar cáncer, ya había sido propuesta por Enig y col. (1978). La escasa información existente sugiere una asociación entre los AGT en tejido adiposo y la incidencia de cáncer de mama, próstata y colón (Bakker y col., 1997, Khlmeier y col., 1997; Slattery y col., 2001). Sin embargo, los estudios existentes, no son concluyentes. Asimismo, es importante destacar que, los AGT contribuyen a cambios en la funcionalidad de membranas celulares, lo que podría conllevar al desarrollo de algún tipo de cáncer en los tejidos (Khlmeier 1997; Holmes y col., 1999; Larqué y col., 1999; Slattery y col., 2001).

4- Conjugados del ácido linoleico

4.1- Fuentes y origen de los conjugados del ácido linoleico

Actualmente, los AG conjugados de mayor relevancia nutricional son los conjugados del ácido linoleico (CLA). Existen potencialmente numerosos isómeros CLA, pero los más importantes por su abundancia, importancia fisiológica y efectos metabólicos, tanto en animales de experimentación, como en humanos son: el isómero *cis9-trans11*-CLA (*9c,11t*-CLA), también conocido como AR, y el isómero *trans10,cis12*-CLA (*10t,12c*-CLA).

La mayor fuente natural de CLA proviene de la carne y de los productos lácteos derivados de animales rumiantes, como vacas, ovejas, cabra y ciervo. Como se explicó anteriormente, en el rúmen se genera principalmente *9c,11t*-CLA 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.

Además, se ha propuesto que existe en una isomerasa bacteriana específica *cis*9, *trans*10 que genera 10*t*,12*c*-CLA como primer intermediario (Bauman y col., 1999; Griinari y Griinari, 1999). Por otro lado, se ha visto que es imposible que la alta proporción de AR presente en la leche de vaca (2-52 mg/g grasa) provenga solo del rumen, el cual es distribuido mediante la circulación, en los distintos tejidos, principalmente adiposo y mamario. 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 Δ 9-desaturasa en el tejido mamario. Ésta vía alternativa para la formación del 9*c*,11*t*-CLA puede ocurrir en hígado y otros tejidos de no rumiantes, donde el ácido *trans*-vaccénico puede ser desaturado por la enzima Δ 9-desaturasa.

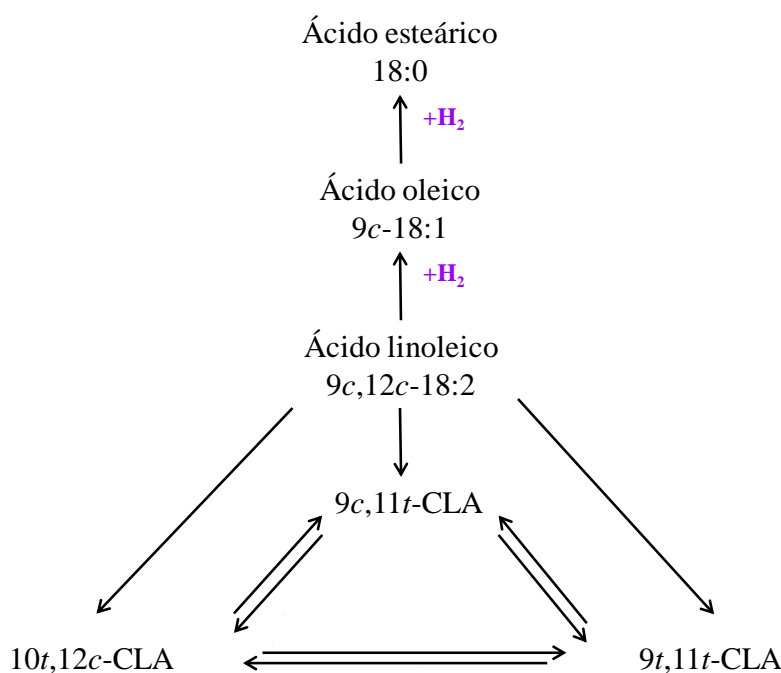
Los CLA de origen natural, están presentes en mayor concentración en los lípidos de la leche, productos lácteos y carnes de rumiantes. El contenido de CLA en los productos lácteos varía aproximadamente entre 2,9 a 8,9 mg/g de grasa y en las carnes entre 1,2 a 6,2 mg/g de grasa, conteniendo aproximadamente 80% de 9*c*,11*t*-CLA, 10% de 10*t*,12*c*-CLA y otros CLA minoritarios (Parodi y col., 1997). Los aceites vegetales y las grasas de animales no rumiantes sólo contienen trazas de CLA.

Como se mencionó anteriormente, una menor cantidad de isómeros geométricos y posicionales de los CLA son producido durante la biohidrogenación ruménica por las isomerasas bacterianas. El isómero predominante en la leche y otros productos derivados, es el 9*c*,11*t*-CLA con una menor pero significativa proporción de 10*t*,12*c*-CLA. Esto contrasta con las preparaciones comerciales, donde las proporciones de los dos isómeros principales son, generalmente, equivalentes. 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 rúmen de los mismos.

A partir de las múltiples propiedades benéficas de los CLA que han sido demostradas en los últimos años, los mismos se comenzaron a preparar industrialmente para su comercialización. Para ello, se han desarrollado métodos que permiten convertir el AL en una mezcla de CLA, conteniendo principalmente los isómeros 9*c*,11*t*-CLA y 10*t*,12*c*-CLA. Así, por isomerización alcalina (Figura 6) 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 (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 son diferentes.

Figura 6- Esquema de la reacción de isomerización e hidrogenación del ácido linoleico para la síntesis química de CLA*



*Adaptado de Bernas y col. (2003).

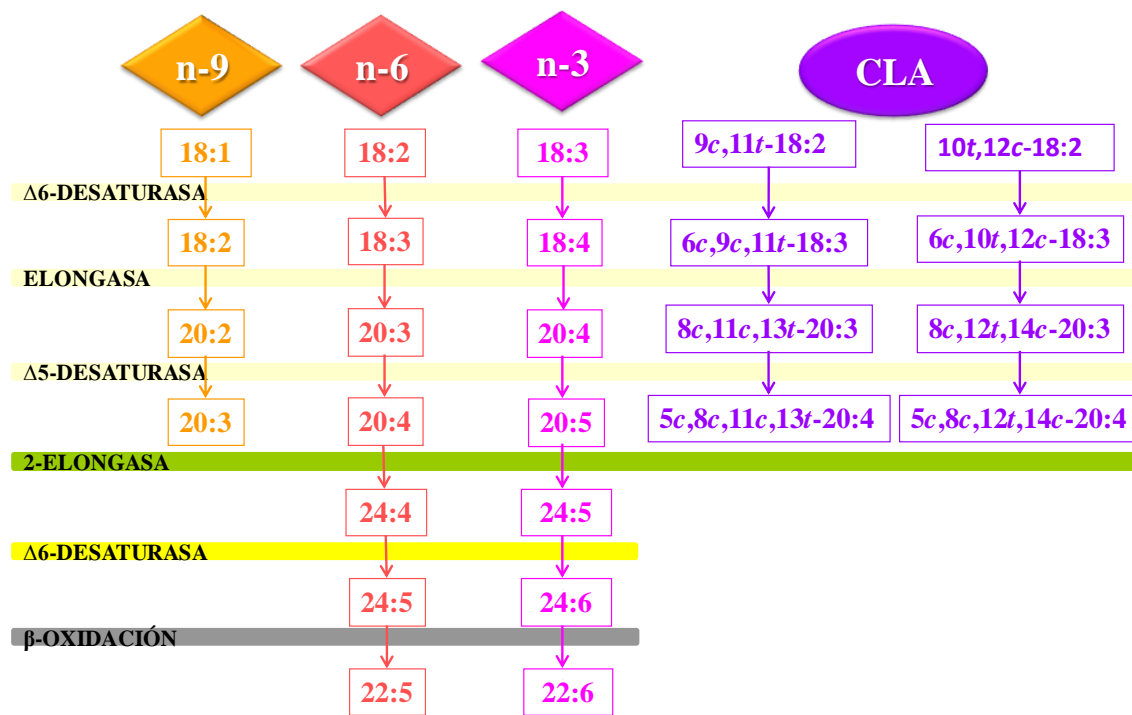
4.2- Efectos biológicos de los conjugados del ácido linoleico

El interés por los CLA comenzó a partir de los estudios de Pariza y col., en los cuales encontraron que dicho compuesto era el antimutagénico presente en la carne grillada (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 atribuibles a los CLA son otorgados a los isómeros 9_c,11_t-CLA y 10_t,12_c-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. En relación a esto, los CLA pueden ser desaturados y elongados utilizando los

mismos sistemas enzimáticos que los AGPI de las series n-3, n-6 y n-9, produciendo una variedad distinta de metabolitos (Figura 7).

Figura 7- Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga*



*Adaptado de Banni y col. (2004a).

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. Algunos estudios demuestran que podría estar asociado a la inhibición de 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, como también metástasis peritoneal de células cancerígenas de estómago y colon, en ratas y ratones (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. El “timing” y la duración de la alimentación con CLA también juegan un rol importante (Kelly, 2001). 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 *9c,11t*-CLA y *10t,12c*-CLA suprimen la proliferación de líneas de cáncer mamario humanas (Koronowicz y col., 2009). Por otro lado, Larsson y col. (2009), sugieren que no hay evidencias del efecto protector de los CLA contra el cáncer de mama.

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 relación a esto, empleando distintos modelos animales. Tanto la sustitución con una mezcla de isómeros CLA, como el isómero *10t,12c*-CLA individual, han demostrado reducir la adiposidad en la mayoría de los modelos animales estudiados (Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005a). Muy pocos trabajos han reportado una disminución de los

depósitos de grasa por la sustitución con *9c,11t*-CLA (Akahoshi y col., 2003; de Roos y col., 2005; Scalerandi y col., 2014). Sin embargo, sólo en algunos modelos en humanos los CLA han mostrado ser efectivos. Posiblemente estas discrepancias se deban a diferencias en las dosis administradas, edad, peso corporal, grasa corporal o estado metabólico de los sujetos en estudio (Wang y Jones, 2004; Silveira y col., 2007; Kenedy y col., 2010).

Los mecanismos involucrados mediante los cuales los CLA, y más específicamente el *10t,12c*-CLA, modulan la composición corporal son muy diversos. Así, ha sido sugerido que en animales de experimentación incrementan el gasto energético a través de un aumento en la tasa metabólica basal, en la termogénesis por aumento en la transcripción de las proteínas desacoplantes, como así también, en la oxidación de lípidos asociada a un incremento en la expresión de la enzima carnitina palmitoil transferasa-I (CPT-I), la cual está involucrada en la captación de los AG en la mitocondria y cataliza el paso limitante en la oxidación de los mismos (LaRosa y col., 2006). Otro mecanismo involucrado es la inhibición de la lipogénesis (Brown y col., 2004; LaRosa y col., 2006). Específicamente, se ha observado una reducción en la expresión y actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS), y estearil-CoA desaturasa (SCD). Algunos autores han observado que una reducción en la actividad de la enzima LPL, clave en la captación de AG, también contribuye a la reducción del tejido adiposo 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 receptor que activa la proliferación de peroxisomas (PPAR)- γ y la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP)-1. En relación a la lipólisis, los efectos encontrados son más controversiales. Mientras que algunos autores han observado que el tratamiento agudo con mezcla de isómeros CLA o *10t,12c*-CLA incrementa la lipólisis en adipocitos (Chung y col., 2005; Moon y col., 2006) y en tejido adiposo de ratones (Ippagunta y col., 2011; Ippagunta y col., 2013), otros no han encontrado efecto en el tejido adiposo 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 , el cual cumple un rol clave en la conversión de preadipocitos a adipocitos, como por una mayor expresión del TNF- α , potente inductor de la apoptosis en tejido adiposo blanco (Poirier y col., 2006; Tsuboyama-Kasaoka y col., 2006; Kennedy y col., 2008).

Estos cambios generados por los CLA en el tejido adiposo, también tienen impacto sobre diferentes mecanismos homeostáticos metabólicos. Así, pueden alterar la liberación de adipocinas proinflamatorias, afectando diversos procesos fisiológicos vinculados, principalmente, al metabolismo lipídico y glucídico.

En diversos trabajos se ha encontrado que la reducción en la adiposidad es acompañada por un incremento en la masa muscular, en animales de experimentación (Park y col., 1997; DeLany y West, 2000), en humanos saludables (Thom y col., 2001) o con sobrepeso u obesos (Blankson y col., 2000). En relación a esto, Pariza y col. (2000) propusieron que los CLA podrían prevenir el catabolismo proteico e incluso aumentar el tamaño muscular como consecuencia de cambios inducidos sobre la regulación y/o acción del TNF- α e IL1, citoquinas que afectan el catabolismo muscular y la respuesta inmune. Además, Butz y col. (2006) demostraron que los CLA, afectando la producción de eicosanoides y citoquinas, también podrían prevenir la pérdida de peso y el catabolismo muscular que acompaña a la administración de endotoxinas y otras enfermedades.

4.2.3- Efectos sobre la diabetes y el metabolismo glucídico

Los resultados hallados por los CLA sobre el metabolismo de la glucosa y la sensibilidad a la insulina son controversiales. En modelos de ratas obesas y diabéticas, se han observado efectos benéficos por la sustitución con CLA sobre la resistencia insulínica y los niveles de glucosa plasmáticos (Henriksen y col., 2003). Contrariamente, en ratones, el 10*t*,12*c*-CLA parece inducir insulino resistencia con hiperinsulinemia y normo o hiper glucemia (DeLany y col., 1999; Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000). Ésta respuesta diferente observada en el ratón, puede estar asociada a la marcada pérdida de grasa corporal, y la consecuente alteración en las concentraciones de adipocinas plasmáticas.

En humanos, los resultados hallados fueron estrechamente relacionados el 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). En sujetos obesos o con sobrepeso, la sustitución con CLA no mostró cambios en los niveles de insulina y glucosa plasmática (Risérus y col., 2002; Gaullier y col., 2004; Gaullier y col., 2005). En cambio, en pacientes con alto riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, los CLA disminuyeron la sensibilidad a la insulina, y éste efecto se relacionó con el estrés oxidativo generado por los CLA (Risérus y col., 2002; Risérus y col., 2004).

En relación al mecanismo de acción de los CLA, numerosos estudios sugieren que el isómero 10*t*,12*c*-CLA sería el isómero bioactivo que influye sobre los cambios en el peso corporal

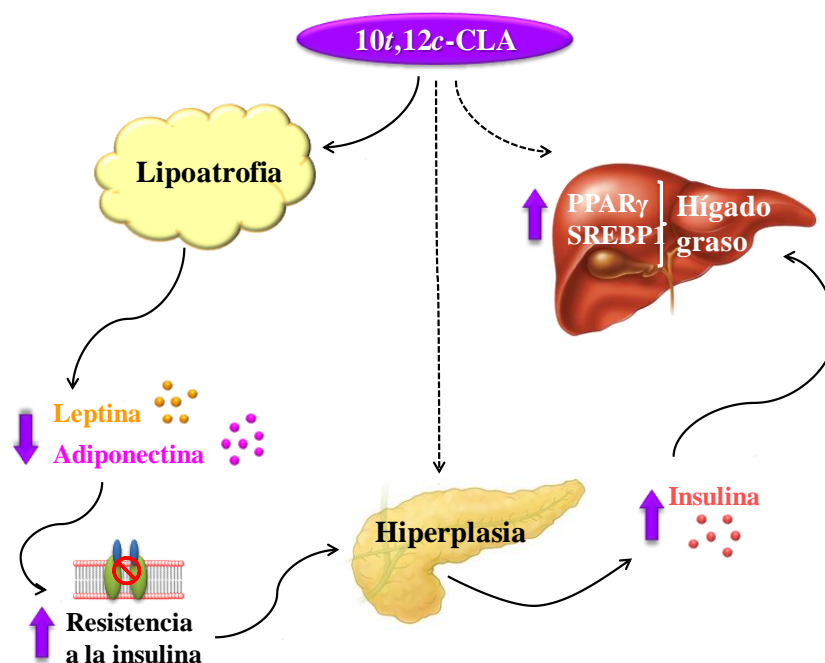
observados en personas con diabetes tipo 2 (Belury y col., 2004). Brown y col. (2004) han observado que durante el proceso de delipidación, el 10*t*,12*c*-CLA disminuye la expresión de los PPAR- γ , y así altera el metabolismo lipídico y glucídico, inhibiendo la captación y metabolización de AG y de la glucosa. El estudio de los mecanismos por los cuales los CLA operan a nivel celular, ha demostrado que los primeros blancos para los CLA son los miembros de la familia de receptores nucleares, particularmente, el factor de transcripción lipostático, PPAR- α , PPAR- γ , SREBP-1c y LXR- α (Taylor y col., 2004). Consecuentemente, los efectos de los CLA en el metabolismo de la glucosa son producidos por efectos secundarios mediados a través de factores tales como el co-activador del PPAR- γ , que es controlado por este receptor nuclear (Hammarsted y col., 2003). Además, también se ha visto que los CLA regulan la expresión de genes (como de proteínas desacoplantes) importantes en la regulación de la adipogénesis, metabolismo de la glucosa y de los lípidos y, posiblemente, en la termogénesis. Otro posible mecanismo de los CLA sobre hiperinsulinemia que ha sido sugerido, es a través de la sensibilización de la adiponectina. Esta adipoproteína secretada por el tejido adiposo aumenta la sensibilidad a la insulina mejorando el metabolismo de la glucosa, estimula la oxidación de AG, decrece los niveles de TG plasmáticos, como también inhibe ciertos procesos inflamatorios. Niveles circulantes reducidos de adiponectina son característicos en animales y humanos obesos, y en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (Beltowski, 2003).

4.2.4- Efectos sobre la salud cardiovascular y el metabolismo lipídico

El efecto de los CLA sobre la salud cardiovascular, al igual que lo anteriormente expuesto sobre otros aspectos de la salud, han mostrado resultados discrepantes. Por un lado, un efecto favorable ha sido reportado, tanto para la mezcla de isómeros, como para ambos isómeros individuales, sobre las lesiones ateroscleróticas en conejos y hamsters (Kritchevsky y col., 2000; Valeille y col., 2005). Asimismo, se ha demostrado una variada respuesta sobre factores de riesgo aterogénicos, tales como reducción de los niveles séricos de colesterol, triglicéridos y colesterol-LDL con niveles normales o aumentados de colesterol HDL (Baddini-Feitoza y col., 2009; Battacharya y col., 2006). Sin embargo, Gavino y col. (2000) encontraron que, tanto la mezcla de isómeros CLA como el 10*t*,12*c*-CLA, aumentaron las concentraciones séricas de TG, TG-lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y colesterol-VLDL. Es probable que ejerzan su función mediante la regulación del metabolismo de los AG en hígado a través de reguladores como: PPARs, SREBP y/o SCD (Choi y col., 2001; Bathacharya y col., 2006) y también mediante la remoción de lipoproteínas ricas en TG (Andreoli y col., 2009).

Los mecanismos de acción que conducen a diferentes efectos sobre los lípidos circulantes, son el resultado del impacto que tienen los isómeros en diferentes tejidos, siendo, probablemente, el hígado y el tejido adiposo, los dos tejidos más importantes. Los efectos en el metabolismo lipídico a nivel hepático han sido muy bien descritos en modelos experimentales, fundamentalmente con 10*t*,12*c*-CLA en ratones. En relación a esto, se ha demostrado que ratones alimentados con 10*t*,12*c*-CLA desarrollan hepatomegalia y esteatosis hepática por redistribución de los depósitos de grasa (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002). Entre los mecanismos que conducen a la acumulación hepática de lípidos pueden considerarse el incremento de la afluencia de AG, aumento de la lipogénesis, y una alterada oxidación de AG y secreción insuficiente de TG para impedir la acumulación de lípidos (Vyas y col., 2012). Muchos de los efectos del 10*t*,12*c*-CLA sobre la acumulación de TG hepáticos, pueden ser mediados por la acción sobre diferentes factores de transcripción que regulan genes claves del metabolismo lipídico. Así, ha sido observado que el tratamiento con 10*t*,12*c*-CLA produce un aumento en la expresión de SREBP-1c y PPAR- γ a nivel hepático (Clément y col., 2002; Rasooly y col., 2007). Este incremento en los factores de transcripción ha sido atribuido a la hiperinsulinemia generada por el 10*t*,12*c*-CLA en ratones. Estas alteraciones son la resultante del cuadro lipoatrófico descrito por Poirier y col. (2005a), el cual pareciera tener su origen primario a nivel del tejido adiposo. Así, estos autores sostienen que la depleción de los depósitos de grasa inducidos por éste isómero, conducen a una reducción en la producción de adipoquinas (leptina y adiponectina), lo cual reduce la sensibilidad insulínica periférica. Esta alteración, conduce, a su vez, a hiperplasia de las células β -pancreáticas e hiperinsulinemia que incrementa la acumulación de lípidos en el hígado, a través de la inducción de diferentes vías metabólicas. Además, la hiperinsulinemia es la responsable del incremento de la síntesis proteica e incremento del tamaño hepático (Figura 8). Estos mecanismos de acción responsables de las alteraciones lipídicas hepáticas, y en general del síndrome lipoatrófico, han sido observados cuando los ratones fueron alimentados con dietas sustituidas sólo con el isómero 10*t*,12*c*-CLA (Clément y col., 2002). De igual forma, no se evidenció síndrome lipoatrófico en otras especies alimentadas con diferentes mezclas de CLA e incluso con el 10*t*,12*c*-CLA (Faulconnier y col., 2004; Zabala y col., 2004; Purushotham y col., 2007).

Figura 8- Representación esquemática del síndrome lipoatrófico inducido por el 10*t*,12*c*-CLA en ratones*



*Adaptado de Poirier y col. (2005a).

En humanos, los resultados hallados también son discrepantes. Mientras que algunos autores no han encontrado cambios en los niveles de lípidos y lipoproteínas plasmáticas especialmente con la mezcla de isómeros y con 9*c*,11*t*-CLA, en voluntarios saludables (Smedman y Vessby, 2001; Mele y col., 2013) y en aquellos con sobrepeso/obesidad (Risérus y col., 2004). Otros investigadores reportaron que los CLA mejoran el perfil lipídico en ambos tipos de pacientes (Gaullier y col., 2005). En contraste, Tricon y col. (2004) en hombres sanos, hallaron que la sustitución con 10*t*,12*c*-CLA incrementa los niveles plasmáticos de TG y las relaciones colesterol-LDL/colesterol-HDL y colesterol total/colesterol-HDL.

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 (Ig) como Ig G, 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 2004). 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). Además, los CLA disminuyen la producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente TNF- α e interferon gamma, que juegan un rol central en la patogénesis de inmunopatologías crónicas (O'Shea 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", y disminuyendo 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; Perdomo y col., 2011).

Pese a que se han realizado numerosos estudios tendientes a dilucidar los efectos de ingestas crónicas de dietas conteniendo AGT y/o CLA, un gran número de interrogantes surgen, principalmente, debido a los modelos experimentales empleados. En este sentido, algunas de las variables introducidas son los niveles de AL en las grasas dietarias. Además, los AG isoméricos se incorporan en los tejidos y podrían actuar como sustratos alternativos o competir en el metabolismo del AL y sus derivados. A nuestro conocimiento, no existen estudios que hayan investigado los efectos de la sustitución parcial con isómeros a dietas enriquecidas o deprivadas en AL.

Objetivos

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

Objetivo general

Investigar los potenciales efectos metabólicos de los AGT y los CLA en dietas enriquecidas o deprivadas en AL en un modelo experimental animal.

Objetivos específicos

A- Validar bioquímicamente el modelo experimental de enriquecimiento y deprivación de AL mediante el análisis del perfil de AG, en suero y tejidos; focalizándose, específicamente para aquellos animales en deprivación de AL, en los niveles de ácido Mead y en la estimación de la relación trieno/tetraeno.

B- Evaluar, durante los tratamientos experimentales, parámetros nutricionales incluyendo: ingesta de alimentos y energética, ganancia de peso y absorción de grasa dietaria,

C- Estudiar, al final del tratamiento dietario: composición corporal, retención energética corporal y eficiencia energética, como también, peso del hígado, de los tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal, y del músculo gastrocnemio.

D- Analizar la incorporación y retención de los isómeros ingeridos, como así también, los cambios que los mismos producen sobre el perfil de AG en suero y tejidos hepático, adiposo y muscular.

E- Determinar los potenciales cambios en los niveles séricos de TG, FL, Col y glucosa séricos.

F- Evaluar cambios en los niveles de TG, FL y Col hepáticos.

G- Analizar el contenido de TG y FL musculares.

H- Estudiar los mecanismos reguladores de los niveles de TG plasmáticos mediante la secreción hepática de TG “in vivo” y la remoción plasmática de TG-pre- β lipoproteínas en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio.

I- Analizar la composición de AG de las lipoproteínas secretadas por el hígado.

J- Evaluar la actividad de las enzimas lipogénicas en hígado y tejido adiposo epididimal: FAS, EM y G6PDH.

K- Estimar el flujo de sustratos a través de la enzima SCD en hígado, tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio.

L- Cuantificar la capacidad oxidativa de AG en hígado y músculo gastrocnemio mediante la actividad de la enzima CPT-Ia y CPT-Ib, respectivamente.

M- Estimar la capacidad de biosíntesis de AGPI-CL de las familias n-6 y n-3 en hígado, tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio.

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

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

O- Estudiar el posible efecto sobre el metabolismo de la glucosa a través de la captación, incorporación y oxidación de la glucosa y síntesis de glucógeno en músculo soleo aislado, en condiciones basales y bajo los efectores insulina y palmitato.

Materiales y Métodos

1- Animales

Para investigar los posibles efectos metabólico-nutricionales potencialmente benéficos y/o adversos de la sustitución parcial con ácidos grasos *trans* y con conjugados del ácido linoleico a dietas enriquecidas o deprivadas en AL, se emplearon ratas machos de la cepa Wistar, de dos semanas post-destete, provistas por el Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Durante el período experimental los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (23 ± 2 °C) y ciclo luz-oscuridad (12 horas). Todos los estudios fueron programados según normas internacionales para el uso de animales de laboratorio (Guide to the Care and Use of Experimental Animals of Laboratory) y fueron aprobadas por el comité de ética de la FBCB-UNL.

2- Dietas

Las dietas fueron elaboradas en base a las recomendaciones del comité *ad hoc* del “American Institute of Nutrition” para roedores en crecimiento, AIN-93G (Reeves y col., 1993) con excepción de la fuente de AG que estuvo basada en la dieta AIN-76 (1973), y fueron isocalóricas y sólo difirieron en el tipo de grasa dietaria, pero no en el nivel (7% de grasa en todos los casos).

- **Dieta enriquecida en AL (⁺AL):** conteniendo 7% de aceite de maíz.
- **Dieta deprivada de AL (⁻AL):** conteniendo 7% de coco hidrogenado bajo trans.
- **Dieta ⁺AL+AGT:** en la cual se sustituyó 2% del aceite de maíz de la dieta ⁺AL por 2% de aceite de soja hidrogenado rico en AGT (50% de AGT).
- **Dieta ⁻AL+AGT:** se sustituyó 2% del aceite de coco de la dieta ⁻AL por 2% de aceite de soja hidrogenado rico en AGT (50% de AGT).
- **Dieta ⁺AL+CLA:** se sustituyó 1% del aceite maíz de la dieta ⁺AL por 1% de aceite rico en mezcla de isómeros CLA.
- **Dieta ⁻AL+CLA:** se sustituyó 1% del aceite coco de la dieta ⁻AL por 1% de aceite rico en mezcla de isómeros CLA.

Tabla 1- Composición de las dietas

Ingredientes (g/kg dieta)	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+AGT	⁻ AL+AGT	⁺ AL+CLA	⁻ AL+CLA
Almidón	529,5	529,5	529,5	529,5	529,5	529,5
Caseína	200	200	200	200	200	200
Sacarosa	100	100	100	100	100	100
Aceite de maíz	70	-	50	-	60	-
Aceite de coco	-	70	-	50	-	60
Aceite rico en AGT	-	-	20	20	-	-
Aceite rico en CLA	-	-	-	-	10	10
Fibra	50	50	50	50	50	50
Minerales	35	35	35	35	35	35
Vitaminas	10	10	10	10	10	10
L-Cisteína + L-Metionina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Energía (kJ/Kg)	16.569	16.569	16.569	16.569	16.569	16.569

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida con CLA.

Para lograr los niveles de AL deseados en las dietas (enriquecidas y deprivadas) se emplearon dos aceites comestibles: aceite de maíz, el cual posee altos niveles de AL, bajos de ALA y un claro desbalance en la relación n-6/n-3; y aceite de coco hidrogenado (muy bajo en AGT) el cual es deprivado en ambos AGE: AL y ALA. Los AG isoméricos fueron aportados por un aceite de soja parcialmente hidrogenado rico en AGT (50%) y un aceite comercial mezcla de los isómeros *c*9,*t*11-CLA y *t*10,*c*12-CLA (39,0% y 38,8%, respectivamente) gentilmente provistas por Lipid Nutrition B.V.

A lo largo de todo el período experimental se prepararon las dietas cada tres días, las cuales fueron ofrecidas diariamente a los animales.

La composición de AG de los aceites utilizados, como metil ésteres, fue determinada por cromatografía gaseosa (CG) con un cromatógrafo Shimadzu 2014 equipado con detector de ionización de llama. Los metil ésteres de AG fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con los de los estándares comerciales. La composición de AG de los aceites utilizados se muestra en la Tabla 2

Tabla 2- Composición de ácidos grasos de los aceites dietarios

Ácido graso (%)	Maíz	Coco	Rico AGT	Rico CLA
6:0	ND	0,49	ND	ND
8:0	ND	6,76	ND	ND
10:0	ND	5,64	ND	ND
11:0	ND	0,02	ND	ND
12:0	ND	47,67	ND	ND
13:0	ND	0,02	ND	ND
14:0	0,031	17,46	0,09	ND
16:0	12,21	9,21	11,06	5,85
16:1	0,12	ND	ND	ND
17:0	ND	ND	0,08	ND
18:0	1,93	12,53	10,78	1,20
(6-8) <i>t</i> -18:1	ND	ND	5,66	ND
9 <i>t</i> -18:1	ND	ND	7,29	ND
10 <i>t</i> -18:1	ND	ND	10,67	ND
11 <i>t</i> -18:1	ND	ND	9,65	ND
12 <i>t</i> -18:1	ND	ND	7,49	ND
(6-8) <i>c</i> +(13/14) <i>t</i> -18:1	ND	ND	8,26	ND
9 <i>c</i> -18:1	31,95	0,05	9,03	9,05
15 <i>t</i> +10 <i>c</i> -18:1	ND	ND	3,94	ND
11 <i>c</i> -18:1	0,54	ND	3,23	0,41
19:0	ND	ND	0,56	ND
9 <i>t</i> 12 <i>t</i> -18:2	ND	ND	1,35	ND
9 <i>c</i> 12 <i>t</i> -18:2	ND	ND	0,40	ND
9 <i>t</i> 12 <i>c</i> -18:2	ND	ND	0,44	ND
9 <i>c</i> 12 <i>c</i> -18:2	51,26	0,01	0,63	1,08
20:0	0,50	0,14	0,03	ND
8 <i>c</i> -20:1	ND	ND	0,06	ND
11 <i>c</i> -20:1	0,25	ND	0,02	ND
9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i> -18:3	0,88	ND	0,00	ND
22:0	0,16	ND	0,35	0,35
24:0	0,15	ND	ND	ND
9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -CLA	ND	ND	ND	38,99
11 <i>c</i> ,13 <i>t</i> -CLA	ND	ND	ND	1,54
10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -CLA	ND	ND	ND	38,76
Σ NI	ND	ND	8,92	3,11

ND: no detectado; NI: no identificado.

3- Grupos experimentales y protocolo de trabajo

Ratas de la cepa Wistar, macho, aclimatadas durante dos semanas luego del destete en un ambiente con luz-oscuridad de 12 hs, a temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), con libre acceso al agua y a una dieta estándar de laboratorio, fueron distribuidos aleatoriamente en 6 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: ^+AL , ^-AL , $^+\text{AL}+\text{AGT}$, $^-\text{AL}+\text{AGT}$, $^+\text{AL}+\text{CLA}$, $^-\text{AL}+\text{CLA}$. A lo largo de todo el tratamiento dietario se realizó el seguimiento de peso de los animales. Al finalizar el período experimental, los mismos fueron sacrificados bajo anestesia (1 mg acepromicina + 100 mg ketamina/Kg peso). Se extrajeron muestras de sangre por punción cardíaca sin anticoagulante y se centrifugaron a 4°C . El suero obtenido fue alicuotado y congelado a -20°C hasta el momento de su valoración. Hígado, tejido adiposo epididimal (TAE), tejido adiposo retroperitoneal (TARP) y músculo gastrocnemio fueron extraídos en forma completa, y muestras de cada uno de ellos fueron congeladas con una pinza enfriada en nieve carbónica, pesadas, morterizadas y conservadas en ultrafreezer (-80°C) hasta su procesamiento.

4- Determinaciones realizadas

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

4.1- Absorción aparente de lípidos dietarios

Las ingestas y excretas diarias fueron llevadas a sequedad y posteriormente se realizó una extracción con éter de petróleo utilizando el extractor tipo Twysselman. El contenido de grasa se obtuvo por gravimetría. (Windham, 1999).

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

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

4.2- Composición corporal

4.2.1- Determinación del contenido de agua

Un lote de animales correspondientes a los diferentes grupos dietarios fuer anestesiados y eviscerados. Las carcasas se pesaron y colocaron en estufa a 60°C hasta peso constante, determinándose por diferencia de pesadas el contenido de agua de las mismas (Windham, 1999). Los resultados se expresaron como g de agua/100 g de carcasa. Cada una de las carcasas secas fueron trituradas hasta obtener una muestra homogénea, a partir de la cual, distintas alícuotas se utilizaron para la determinación del contenido de proteínas y grasa.

4.2.2- Determinación del contenido de proteínas

La cuantificación de 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 H₃N fue arrastrado por vapor de agua y recibido en un frasco colector conteniendo HCl 0,1N. El exceso de HCl que no reaccionó con el H₃N se tituló con NaOH 0,1N. Los miliequivalentes de N cuantificados corresponden a la diferencia entre los miliequivalentes de HCl totales presentes en el frasco colector y los miliequivalentes en exceso. El contenido total de N de la 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.

4.2.3- Determinación del contenido de grasa

La cuantificación del contenido de grasa total se realizó en alícuotas de carcasas secas mediante el método extractivo con solvente descrito en el ítem 4.1 Los resultados se expresaron como g de grasa/100 g de carcasa.

4.3- Retención energética corporal y eficiencia energética

4.3.1- Retención energética corporal

La retención energética de proteínas (REPC) y grasa (REGC) en carcasa se calculó como la diferencia entre la cantidad de proteínas ó de grasa, respectivamente, en carcasa de animales posterior al tratamiento dietario, y previo al mismo en un grupo control de características semejantes al grupo de inicio experimental. Se emplearon los factores de conversión de Canolty y Koong (1976): 18,62 KJ/g de proteínas y 39,12 KJ/g de lípidos para transformar en energía (kJ) el contenido de proteínas y grasas. La retención energética total corporal diaria (RETC) en la carcasa se calculó en función de la ganancia diaria de peso como proteínas y como grasa de cada animal. Mas detalles metodológicos fueron previamente publicados (Colandré y col., 2003).

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

Donde:

$$\text{REPC} = \text{g proteína/día} \times 18,62 \text{ kJ/g proteínas}$$

$$\text{REGC} = \text{g grasa/día} \times 39,12 \text{ kJ/g grasas}$$

4.3.2- Eficiencia energética

La eficiencia energética (EE), durante el período experimental, se calculó mediante el cociente entre la RETC y la ingesta energética (IE) (Dulloo y Girardier, 1992; Bell y col., 1995; Specter y col., 1995). La IE se calculó multiplicando la cantidad de alimento consumido por el número de kJ aportados por gramo de dieta.

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

4.4- Cuantificaciones en suero

4.4.1- Concentración de triglicéridos séricos

La concentración de triglicéridos (TG) en suero se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Sociedad de Bioquímicos, Santa Fe, Argentina). El método se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los TG en glicerol y AG libres, por medio de una combinación especial de lipasas. El glicerol es fosforilado a glicerol-fosfato en presencia de glicerol

quinasa y ATP luego, este derivado fosforilado, es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de la glicerol fosfato oxidasa. El indicador final de color es una quinoneimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La quinoneimina posee un pico de absorción a 510 nm, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de TG presentes en la muestra. Los resultados se expresaron en mmol/l.

4.4.2- Concentración de colesterol total sérico

La concentración de Col en suero se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Sociedad de Bioquímico, Santa Fe, 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 colesterol libre, es oxidado por acción de una colesterol oxidasa, con formación de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4-aminofenazona a un compuesto de color rojo. La quinoneimina roja formada posee un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de Col presente en la muestra. Los resultados se expresaron en mmol/l.

4.4.3- Concentración de fosfolípidos séricos

El nivel de FL séricos se evaluó mediante el contenido de fósforo presente en un extracto de lípidos séricos. La extracción y purificación de los lípidos del suero se llevo a cabo mediante la técnica de Folch y col. (1957), para la cual se homogeneizó una alícuota de suero con la mezcla de solventes cloroformo:metanol 2:1 (v/v), en una proporción 1:19, y posterior lavado del extracto obtenido, por adición de un quinto de su volumen de agua o de una solución apropiada de sales. De la mezcla resultante se obtuvo un sistema bifásico. La fase superior conteniendo todas las sustancias no lipídicas y solo cantidades insignificantes de otros lípidos, fue desechada. Una alícuota de la fase inferior, conteniendo mayoritariamente los lípidos del suero, fue transferida a un tubo de vidrio largo (20 ml) tapa a rosca y secada a 40°C bajo corriente de N₂ gas para su posterior procesamiento.

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

acción del ácido ascórbico. La intensidad del color a 800 nm es proporcional a la concentración de fósforo de la muestra. Los resultados se expresaron en mg/ml.

4.4.4- Concentración de glucosa sérica

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

4.4.5- Perfil de ácidos grasos séricos

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

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

- La extracción de la materia grasa del suero 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 que se forme una sola fase miscible con el agua de la muestra que extrae, tanto la grasa libre, como estructural. Luego se añaden alícuotas de cloroformo y agua para lograr la separación de fases. El material lipídico se encuentra en la fase orgánica, mientras que el material no lipídico se ubica en la fase acuosa. El volumen de suero a utilizar para la extracción lipídica debe ser de 0,8 ml (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. La fase orgánica conteniendo el material lipídico de la muestra se colocó bajo corriente de N₂ gas, con el fin de evaporar los restos de solvente.

- Para la derivatización de los AG es importante considerar que, incluso al estado de vapor, los mismos se encuentran en forma de un dímero unidos por puente de hidrógeno. Esta estructura corresponde al doble de su peso molecular y se refleja en sus propiedades físicas como el punto de ebullición. Así, los AG tienen sus puntos de ebullición anormalmente altos, lo cual impide su análisis directo por CG. Por esta razón los AG de los TG presentes en la muestra son convertidos en metil ésteres con KOH 2N, previa disolución del extracto lipídico en hexano calidad HPLC (ISO 5509:2000 (E)). Los ésteres metílicos formados tienen un peso molecular algo mayor que el respectivo ácido graso, pero al romperse el puente de hidrógeno, bajan su punto de ebullición a la mitad, pudiendo ser analizados por CG, ya que son volátiles a las temperaturas en que se manejan las fases líquidas.

- En referencia a la “corrida cromatográfica”, resulta pertinente aclarar que la cromatografía gaseosa es una técnica de partición que permite que todo compuesto químico que habitualmente es un gas o susceptible de ser transformado en un gas, pueda ser identificado y cuantificado por esta metodología. Así, la muestra en estado gaseoso se reparte entre dos fases no miscibles: 1- una gaseosa que corresponde al gas de arrastre o gas portador que es móvil, y 2- una fase líquida estacionaria. A medida que va pasando el gas portador con la muestra formada por “n” componentes, la separación de cada uno de ellos se efectúa de acuerdo a su propio coeficiente de reparto entre el gas portador y la fase líquida. 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 metil ésteres de AG totales.

4.5- Cuantificación de lípidos tisulares

- En muestras de hígado se determinaron las concentraciones de TG, FL y Col.

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

4.5.1- Concentración de triglicéridos tisulares

Para cuantificar los niveles de TG tisulares (hígado y músculo), una cantidad determinada del tejido conservado a -80°C se homogenizó con un volumen apropiado de solución fisiológica fría (4°C) para obtener una dilución 1/10.

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

4.5.2- Concentración de fosfolípidos tisulares

Para cuantificar los niveles de FL tisulares, una cantidad determinada del tejido conservado a -80°C se homogenizó con la mezcla de solventes cloroformo:metanol 2:1 (v/v), en una proporción 1:19 y se realizó la extracción lipídica siguiendo la técnica de Folch y col. (1957) anteriormente detallada. Posteriormente se cuantificó el contenido de fósforo presente en el extracto lipídico obtenido mediante el método estándar de reducción del complejo fosfomolibdato con ácido ascórbico (Chen y col., 1956). Esta técnica fue descrita en detalle en el apartado 4.4.3. Los resultados se expresaron como mg/g tejido húmedo.

4.5.3- Concentración de colesterol total hepático

Para cuantificar los niveles de Col hepático, una cantidad determinada del tejido conservado a -80°C se homogenizó con la mezcla de solventes cloroformo:metanol 2:1 (v/v), en una proporción 1:19 y se realizó la extracción lipídica siguiendo la técnica de Folch y col. (1957) anteriormente detallada. Una alícuota del extracto lipídico obtenido fue secada bajo corriente de nitrógeno y

resuspendida en isopropanol para la posterior determinación de la concentración de Col mediante método enzimático empleando un kit comercial (Sociedad de Bioquímico, Santa Fe, Argentina). Los resultados se expresaron como mg/g tejido húmedo.

4.5.4- Perfil de ácidos grasos tisulares

La composición de AG de los lípidos tisulares (hígado, TAE y músculo gastrocnemio) se determinó mediante CG, como fuera descrito en el ítem 4.4.5, previa extracción de la materia grasa tisular mediante el método de Bligh y Dyer (1959). En este caso, el método requiere determinar el contenido de humedad de la muestra para ajustarla posteriormente a 80%. Los resultados se expresaron porcentaje de los metil ésteres de AG totales.

4.6- Parámetros relacionados al metabolismo lipídico

4.6.1- Secreción hepática “*in vivo*” de TG-pre- β lipoproteínas

La velocidad de secreción de TG-pre- β lipoproteínas (VSTG) “*in vivo*” se determinó 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 TG se acumulan en el tiempo en el sistema vascular en forma proporcional a la velocidad con la que son secretados por el hígado.

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

La VSTG fue calculada mediante la siguiente ecuación:

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

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

En 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)-TG y que bajo estas condiciones el acumulo de TG en el plasma es lineal hasta los 150 minutos, razón por la que sólo se cuantificaron los niveles de TG a los tiempos 0 y 120 minutos.

4.6.2- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa

4.6.2.1- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal

A pesar de que el tejido adiposo de la rata representa sólo un 7-10% de su peso corporal y que recibe menos del 5% del flujo sanguíneo, se ha demostrado que es el principal tejido responsable de la remoción de las lipoproteínas ricas en TG presentes en circulación. La actividad total de la enzima LPL en TAE se determinó empleando el método fluorimétrico descrito por Del Prado y col. (1994). Para tal fin, una cantidad de TAE se homogeneizó en frío con buffer tris (hidroximetil) aminometano (tris-HCl) 0,2 M pH 8,2 a 4°C, en una proporción 0,2 g de tejido/ml de buffer. 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 N_2 (1 hora a 4°C) y se resuspendió en 1 ml de buffer NH_4Cl 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 (1951).

El método fluorimétrico para la determinación de la actividad de la enzima LPL descrito por Del Prado y col. (1994), utiliza di-butiril fluoresceína (DBF) como sustrato enzimático, el cual fue sintetizado a partir de la mezcla de fluoresceína con piridina y anhídrido butírico. La mezcla fue almacenada a temperatura ambiente por 24 hs antes de la adición de etanol absoluto. Finalmente, la mezcla se guardó en freezer a -20°C por 18 hs. El DBF fue recristalizado en 95% de etanol sucesivas veces hasta remover las trazas de fluoresceína libre. La pureza del producto final se evaluó realizando un espectro de emisión, comprobando que no exista pico de excitación de fluoresceína a 490 nm. La reacción enzimática se llevo a cabo a 37°C en buffer fosfato 0,1 M, pH 8,0, conteniendo 5% de 2-etoxietanol, 10 mM de DBF y extracto enzimático resuspendido (teniendo

en cuenta de no superar los 15 mg de proteínas en la mezcla de reacción). La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo durante 5 minutos el aumento de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}= 490$ nm; $\lambda_{\text{emisión}}= 530$ nm) producto de la liberación de fluoresceína como consecuencia de la hidrólisis enzimática de DBF. Paralelamente, el mismo ensayo fue llevado a cabo en presencia de 1M NaCl para inhibir la actividad enzimática específica. La actividad LPL en tejido adiposo se determinó sustrayendo la actividad lipolítica no específica (determinada en presencia de NaCl 1M) de la actividad lipolítica total (determinada en ausencia de NaCl 1M). Los resultados se expresaron como nmol de fluoresceína liberada por minuto por gramo de tejido (nmol de fluoresceína/min/g) y como nmol de fluoresceína/min/TAE, afectada por el peso del tejido adiposo.

4.6.2.2- Actividad total de enzima lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio

El músculo gastrocnemio conservado a -80°C fue homogeneizado (dil 1/10) en una solución buffer $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$ -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 ($\lambda_{\text{excitación}}= 490$ nm; $\lambda_{\text{emisión}}= 530$ 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).

4.6.3- Actividad de enzimas lipogénicas en hígado y tejido adiposo epididimal

Las enzimas relacionadas con la actividad lipogénica en hígado y tejido adiposo se encuentran en la fracción citosólica celular. Para la determinación de la actividad de estas enzimas se homogenizaron fracciones de hígado (0,5 g) y tejido adiposo (0,25 g) frescos en buffer pH 7,6 (KCl 150 mM, MgCl_2 1 mM, N-acetil-cisteína 10 mM y ditiotreitól 0,5 mM) en proporción 0,5:5 para hígado y 1:2,5 para tejido adiposo. Luego, se centrifugó el homogenado a 60.000g a 4°C durante 90 minutos y se separó el sobrenadante, el cual se almacenó a -80°C hasta la posterior determinación de la actividad de las enzimas. Por otro lado, una alícuota del sobrenadante se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas a través de la técnica de Lowry y col. (1951).

4.6.3.1- Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

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

4.6.3.2- Actividad de la enzima málica

La actividad de la enzima málica (EM, E.C. 1.1.1.40) se determinó espectrofotométricamente a través de la formación de NADPH durante 4 minutos a 37°C, medida por absorbancia a 340 nm, en buffer trietanolamina 0,4 M, pH 7,4, en presencia de NADP 0,2 mM, MnCl₂ 4 mM y L-malato 0,5 mM. La actividad de EM fue expresada como nmol de NADPH producidos por minuto por miligramo de proteína (nmol NADPH/min/mg prot.) (Hsu y Lardy, 1969).

4.6.3.3- Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos

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

4.6.4- Actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa-I en hígado y músculo gastrocnemio

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

Para la determinación de la actividad de la enzima CPT-I se realizó un homogenado (relación 1:5) a partir de tejido congelado (-80°C) de hígado y músculo, en solución de sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, fenil-metil-sulfonil fluoruro 0,2 mM, antipain 1 mg/l, aprotinin 1 mg/l, leupeptin 2 mg/l y pepstatin 0,7 mg/l. El homogenado se centrifugó a 300g a 4°C durante 10 minutos y luego el sobrenadante se volvió a centrifugar a 12.000g a 4°C durante 5 minutos. Este

nuevo sobrenadante, conteniendo un aislado de mitocondrias, se utilizó como fuente de enzima. La determinación de la actividad de la enzima mide la cantidad de coenzima A liberada a partir de palmitoil-CoA en presencia de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB). Para esto, se incubaron las mitocondrias a 30°C durante 5 minutos en un medio conteniendo 800 µl de buffer Tris-HCl, pH 8, (Tris-HCl 116 mM, EDTA 2,5 mM, DTNB 0,11 mM, Triton X-100 0,2%), 75 µl de solución de homogenado, palmitoil-CoA 0,05 mM y L(-) carnitina 0,11 mM. La reacción fue iniciada con 25 µl de muestra y la actividad se determinó siguiendo la liberación del CoA (a través de la formación de CoASH) a 412 nm durante 3 minutos. Este resultado valora la actividad de un conjunto de enzimas que, al igual que la CPT-I, liberan CoA, por lo que se determinó paralelamente la actividad en ausencia de L(-) carnitina para cuantificar la actividad de todas las enzimas excepto de la CPT-I. Para la expresión del resultado se realizó la diferencia entre la actividad en presencia y en ausencia de L(-) carnitina. La concentración de proteínas se estimó en el sobrenadante utilizando la técnica de Lowry y col. (1951). La actividad de la CPT-I fue expresada como nmol de CoA liberados por minuto por miligramo de proteína (nmol/min/mg prot) (Bieber y col., 1972).

4.7- Estudio de la expresión génica de adipoquinas y biomarcadores del estado inflamatorio en tejidos

El ARN total fue aislado a partir de 0,1 g de hígado y 0,15 g de tejido adiposo epididimal utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN fueron tratadas luego con un kit DNA-free (Applied Biosystems, California, EEUU) para remover cualquier contaminación con ADN genómico. El rendimiento y calidad del ARN total obtenido fue evaluado midiendo las absorbancias a 260, 280 y 310 nm y por electroforesis en gel de agarosa al 1,3%. Luego, 1,5 µg de ARN total de cada muestra fue sometido a transcripción reversa para sintetizar el ADN complementario (ADNc) usando el kit de síntesis de ADNc, iScript™ (Bio-Rad, California, EEUU).

Se analizaron los niveles de ARNm de las adipoquinas leptina y adiponectina en tejido adiposo epididimal y de los biomarcadores del estado inflamatorio: IL1-β, IL6 y TNF-α en tejido adiposo epididimal e hígado. Los niveles de ARNm fueron cuantificados usando PCR en tiempo real con un equipo de detección Real Time PCR iCycler™-MyiQ™ (BioRad). Los niveles de β-actina fueron medidos de la misma manera y utilizados como gen de referencia. 0,1 µl de cada ADNc fueron agregados a la mezcla de reacción SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) con los pares de primers correspondientes. Los primers específicos fueron diseñados y sintetizados comercialmente (Integrated DNA Technologies, Brasil). Las secuencias fueron las siguientes:

Leptina: 5'-GTGCCTATCCACAAAGTCCAGG -3' (sentido);

5'-CGCAGGTTCTCCAGGTCATG-3' (antisentido).

Adiponectina: 5'-ACTCAGCATTTCAGCGTAGGGC -3' (sentido);

5'-TGGTCGTAGGTGAAGAGAACGG-3' (antisentido).

IL1- β : 5'-AGGCAGTGTCACTCATTGTGGC-3' (sentido);

5'-TCACATGGGTTCAGACAGCACG-3' (antisentido).

IL6: 5'-CCTTCTTGGGACTGATGTTGTTGA-3' (sentido);

5'-GGGTGGTATCCTCTGTGAAGTCTCC-3' (antisentido).

TNF- α : 5'-GCCTCTTCTCATTTCCTGCTCGTGG-3' (sentido);

5'-TTCTCCTCCTTGTTGGGACCGATC-3' (antisentido).

Todas las PCRs fueron realizadas de acuerdo al siguiente protocolo de reacción: 2 minutos iniciales a 50°C, desnaturalización a 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos combinados con annealing y extensión a 60°C por 1 minuto. En todas las muestras, los niveles de ARN mensajero fueron normalizados según los valores obtenidos para β -actina y los resultados expresados como cambios en el ciclo umbral (Specter y col., 1995) al valor relativo de los controles usando el método de $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak y col., 2001).

4.8- Parámetros relacionados al estrés oxidativo hepático

4.8.1- Determinación del grado de lipoperoxidación

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

4.8.2- Determinación del contenido de glutatión reducido

La determinación de glutatión reducido (GSH) se realizó en homogenados hepáticos obtenidos en una proporción 1:4 con ácido tricloroacético al 5%. Se obtuvo el sobrenadante por centrifugación y se determinaron los niveles de GSH según la técnica de Ellman y Lysko (1979) utilizando como reactivo DTNB. Los resultados se expresaron en μmol GSH/g de tejido.

4.8.3- Determinación de la actividad de la enzima catalasa

Para la determinación de la actividad de la enzima catalasa se obtuvieron homogenados hepáticos con buffer fosfato 50 mM, pH 7,0 en una relación de 1g de tejido por 9 ml de buffer, los cuales fueron luego centrifugados a 4°C y 16.000g durante 12 minutos. La actividad enzimática se determinó en el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación y se fundamenta en la cantidad de H_2O_2 degradada por la enzima, medida en buffer fosfato 50 mM, pH 7,0, con Triton-X 100 al 1%. La disminución en el contenido de H_2O_2 fue medida espectrofotométricamente a 240 nm durante 30 segundos. La actividad enzimática fue expresada como U/mg de proteína, siendo una U la cantidad de enzima que cataliza la conversión de un μmol de sustrato por minuto (Aebi, 1984). La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry y col. (1951).

4.9- Estudio del metabolismo de la glucosa

4.9.1- Extracción e incubación de los músculos

El estudio del metabolismo de la glucosa se llevo a cabo en el músculo soleo. La extracción e incubación de los músculos se realizó según lo descrito por Crettaz y col. (1980), Challiss y col. (1983) e Massao-Hirabara y col. (2003). Así, los animales ($n = 4$ por grupo experimental) con un ayuno de 2 a 3 hs. fueron sacrificados por dislocación cervical post anestesia y se les extrajo el músculo soleo. El músculo así extraído fue dividido en cuatro porciones en el sentido de las fibras. Cada porción se mantuvo estirada mediante un soporte metálico y fueron incubadas por duplicado en 5 ml de solución de Ringer-Krebs pH 7,4 (con el agregado de 5 mM de glucosa y 1,5 % p/v de albúmina sérica bovina) en presencia o en ausencia de ácido palmítico. Se incubaron 4 hs a 35°C con agitación (90 rpm) y gasificación $\text{O}_2:\text{CO}_2$ (95:5 v/v).

4.9.2- Evaluación de la oxidación de la glucosa

La oxidación de $[\text{U}-^{14}\text{C}]\text{D}$ -glucosa fue estimada colectando el $^{14}\text{CO}_2$ producido por este sustrato según el método de Leighton col. (1985). Luego de la incubación antes descripta, las porciones de músculo fueron transferidas a otro frasco con la misma solución de Ringer-Krebs

enriquecida con 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ [$\text{U-}^{14}\text{C}$]D-glucosa y 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ 2-desoxi-[2,6- ^3H]D-glucosa con o sin el agregado de insulina (10 μl insulina/2 ml medio). Se agregó a cada frasco un tubo eppendorf conteniendo papel de filtro en su interior embebido con 400 μl de NaOH 2M. En paralelo se prepararon dos blancos de muestra, uno para evaluar la producción total de CO_2 y otro para evaluar la producción parcial. Una vez finalizada la incubación (5 hs a 35°C) se llevaron los frascos a baño de hielo durante 2 minutos. Luego se retiró el músculo del medio de incubación, se lo lavó con solución Ringer-Krebs fría y se lo congeló a -20°C para su posterior uso. Los frascos volvieron a cerrarse herméticamente y se les adicionó 1 ml de HCl 5N, para liberar el CO_2 del medio y que se fije en el papel de filtro. Se incubó durante 30 minutos a 35°C con agitación (90 rpm). Finalmente se transfirió el papel de filtro a viales conteniendo 2 ml de líquido de centelleo y, luego de agitar y dejar reposar 30 minutos, se midió la radioactividad del ^{14}C .

4.9.3- Evaluación de la captación de 2-desoxi-[2,6 ^3H]D-glucosa e incorporación de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]D-glucosa

De acuerdo a la técnica propuesta por Challis y col. (1986), al músculo congelado y almacenado en el paso anterior se lo pesó y se le agregó KOH 1M hasta alcanzar un volumen final de 500 μl . Se incubó a 70°C durante 20 minutos con agitaciones periódicas para digerir el tejido. Una vez finalizada la digestión se tomó una alícuota de 150 μl y se transfirió a un vial de centelleo conteniendo 1,5 ml de líquido de centelleo. Luego de agitar y dejar reposar 30 minutos se midió la radioactividad del ^3H para cuantificar la captación de 2-desoxi-[2,6- ^3H]D-glucosa. Esta glucosa análoga es conocida por ser transportada por el mismo sistema que la glucosa y fosforilada a 2-deoxiglucosa-6-fosfato, sin sufrir posterior metabolización. Para la cuantificación de la incorporación de [$\text{U-}^{14}\text{C}$]D-glucosa, la cual puede ser normalmente metabolizada, se midió la radioactividad de ^{14}C de forma similar a lo anteriormente descripto.

4.9.4- Evaluación de la síntesis de glucógeno

La evaluación de la síntesis de glucógeno se realizó acorde a la técnica propuesta por Espinal y col. (1983). A los 350 μl remanentes de la digestión del músculo soleo previamente realizada, se le agregaron 70 μl de una solución saturada de Na_2SO_4 y 70 μl de una solución de glucógeno (25 mg/ml) para facilitar la precipitación del glucógeno marcado. Luego se adicionó 1 ml de etanol frío y después de agitar en frío se dejó reposar a -20°C durante 2 hs. Se centrifugó a 2.000 rpm, -4°C , durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el glucógeno en 450 μl de agua destilada. 200 μl de esta solución fueron transferidos a viales de centelleo y se

adicionaron 1,8 ml de líquido de centelleo. Luego de agitar y reposar durante 30 minutos se midió la radioactividad del ^{14}C .

5- Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM) y el tamaño de la muestras fue indicado en cada caso, siendo siempre igual o mayor a 4.

Las diferencias estadísticas entre las medias se analizaron mediante un 2x2 análisis de la varianza (ANOVA), siendo las variables independientes: los niveles dietarios de AL (enriquecidos o deprivados) y la presencia o no de isómeros (AGT ó CLA). Las comparaciones múltiples post-hoc se realizaron mediante el test de Scheffe. En los casos que fueron necesarios, las diferencias estadísticas se establecieron mediante el test t de Student para datos independientes. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$ (DeGroot, 1986).

Resultados

PARTE I

Efecto de la sustitución parcial con ácidos grasos *trans* a dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico

En función de los objetivos planificados para evaluar el efecto de los AGT en el modelo experimental descrito, se describen en esta primera etapa, en forma secuencial las experiencias realizadas considerando las dos variables independientes fijadas en el protocolo. Específicamente: a) el status de AL según cual fuera el aceite fuente de la grasa dietaria (maíz -enriquecido en AL- y coco hidrogenado -deprivado en AL-) y b) presencia o no de isómeros *trans* (con o sin sustitución parcial con aceite rico en AGT).

I.1- Parámetros nutricionales

I.1.1- Consumo de alimento e ingesta energética

Las dietas fueron bien aceptadas por todos los grupos experimentales, sin manifestarse ningún tipo de rechazo o resistencia a la ingesta de las mismas. Esto puede ser constatado (Tabla 3) a través del equivalente consumo medio diario de alimento que no mostró ninguna diferencia significativa por la deprivación de AL, ni por la presencia de AGT. Debido a que las dietas son isocalóricas, la ingesta energética tampoco mostró diferencias estadísticas.

La absorción aparente de grasas en el análisis estadístico ANOVA (2x2) mostró diferencias significativas únicamente por la deprivación de AL, pero no por la presencia de AGT. En las comparaciones no paramétricas mediante el test de Scheffe observamos que la deprivación de AL, en presencia o ausencia de AGT, aumentó la absorción aparente de grasa dietaria respecto al grupo ⁺AL.

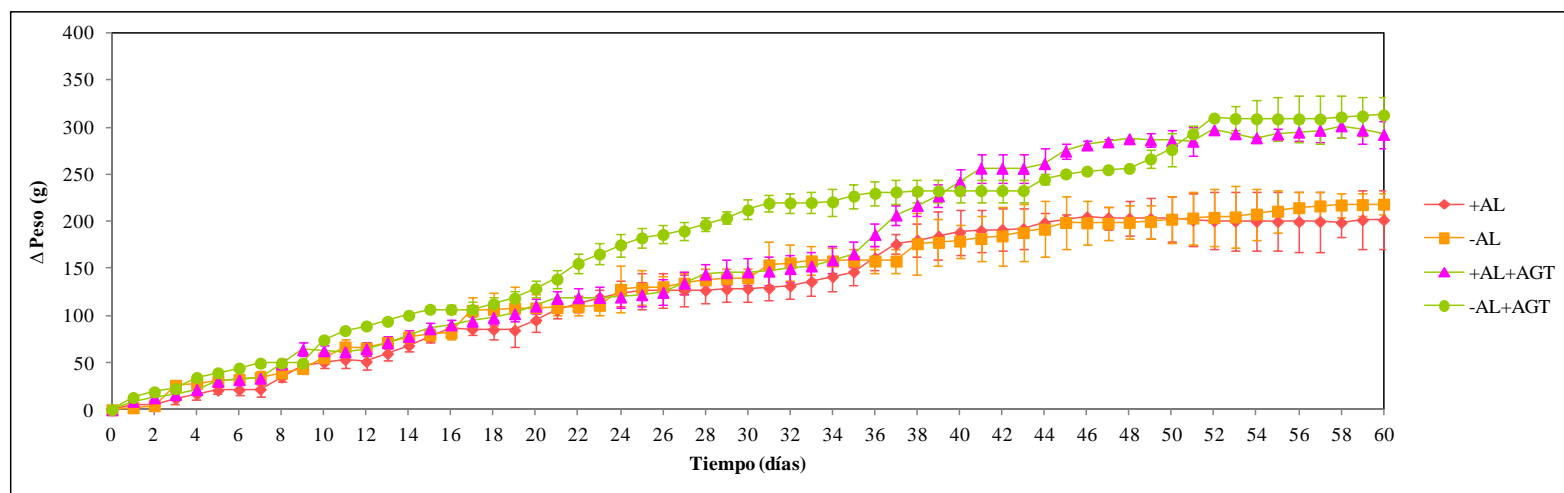
I.1.2- Ganancia de peso y composición corporal

Todos los animales pertenecientes a los distintos grupos dietarios manifestaron un incremento del peso corporal desde el inicio hasta el final del período experimental (Figura 9). El análisis estadístico ANOVA (2x2) de la ganancia de peso durante el total de la experiencia (ΔP_{60-0}) mostró diferencias por la presencia de los AGT ($p < 0,001$), sin observarse cambios por la deprivación de AL ($p = 0,144$). La comparación individual en el incremento de peso mostró que los animales alimentados con dietas ⁺AL+AGT y ⁻AL+AGT presentaron una mayor ganancia de peso que los animales alimentados con dietas ⁺AL y ⁻AL, respectivamente (Figura 10). Al final del tratamiento dietario, los cambios en la ganancia de peso no se correlacionaron con variaciones significativas en el contenido porcentual de grasas, proteínas y agua en la carcasa. Sólo una ligera tendencia a mayores depósitos grasos fue observada en los animales suplementados con AGT (Tabla 3).

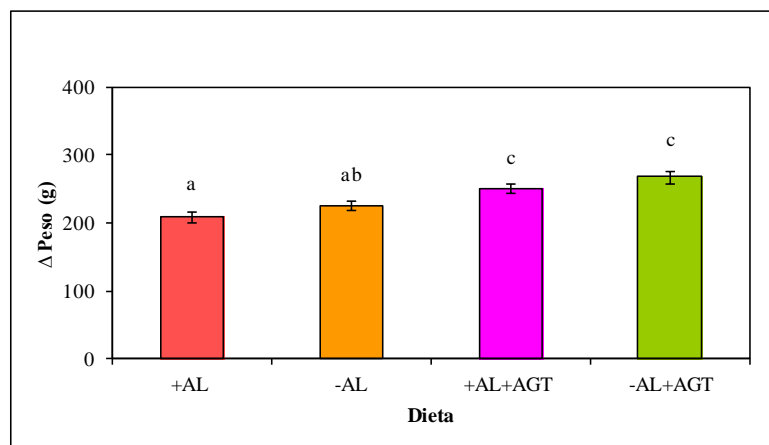
Tabla 3- Consumo de alimento, ingesta energética, absorción aparente de la grasa dietaria y composición de carcasa

	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL +AGT	⁻ AL+AGT	AL	AGT	AL x AGT
Consumo de alimento (g/día)	17,71±0,50	18,70±0,35	17,76±0,48	18,74±1,12	NS	NS	NS
Ingesta energética (kJ/día)	293,32±8,29	310,02±5,97	294,50±7,96	310,42±18,52	NS	NS	NS
Ingesta de grasa (g/día)	1,27±0,04	1,38±0,05	1,30±0,03	1,38±0,10	NS	NS	NS
Grasa fecal (mg/día)	27,12±0,80 ^a	18,80±1,22 ^b	26,04±2,31 ^{ab}	18,74±2,59 ^b	0,001	NS	NS
Grasa fecal/Grasa ingerida (%)	2,24±0,05 ^a	1,38±0,10 ^b	2,04±0,18 ^{ab}	1,44±0,27 ^b	0,001	NS	NS
Absorción aparente de la grasa dietaria (%)	97,76±0,04 ^a	98,62±0,10 ^b	97,96±0,18 ^{ab}	98,56±0,27 ^b	0,001	NS	NS
Composición de carcasa (%)							
Grasa	16,08±0,60	17,29±0,55	17,73±0,43	19,04±0,54	NS	NS	NS
Proteínas	20,85±0,83	21,75±0,28	20,44±0,66	20,91±0,47	NS	NS	NS
Agua	58,52±0,65	56,88±0,73	58,46±0,61	56,05±0,52	NS	NS	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida parcialmente con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida parcialmente con AGT. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: p < 0,05.

Figura 9- Evolución de la ganancia de peso diaria

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo.

Figura 10- Ganancia de peso entre los días experimentales 0 y 60 (ΔP_{60-0})

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

I.1.3- Retención energética corporal y eficiencia energética

La Figura 11 muestra la RETC, la REGC, la REPC y EE del alimento. Si bien el análisis estadístico ANOVA (2x2) mostró que el único cambio producido estuvo dado en la REGC debido a la interacción entre la deprivación de AL y la sustitución con AGT ($p < 0,05$), no se observaron diferencias en este parámetro entre los distintos grupos individuales.

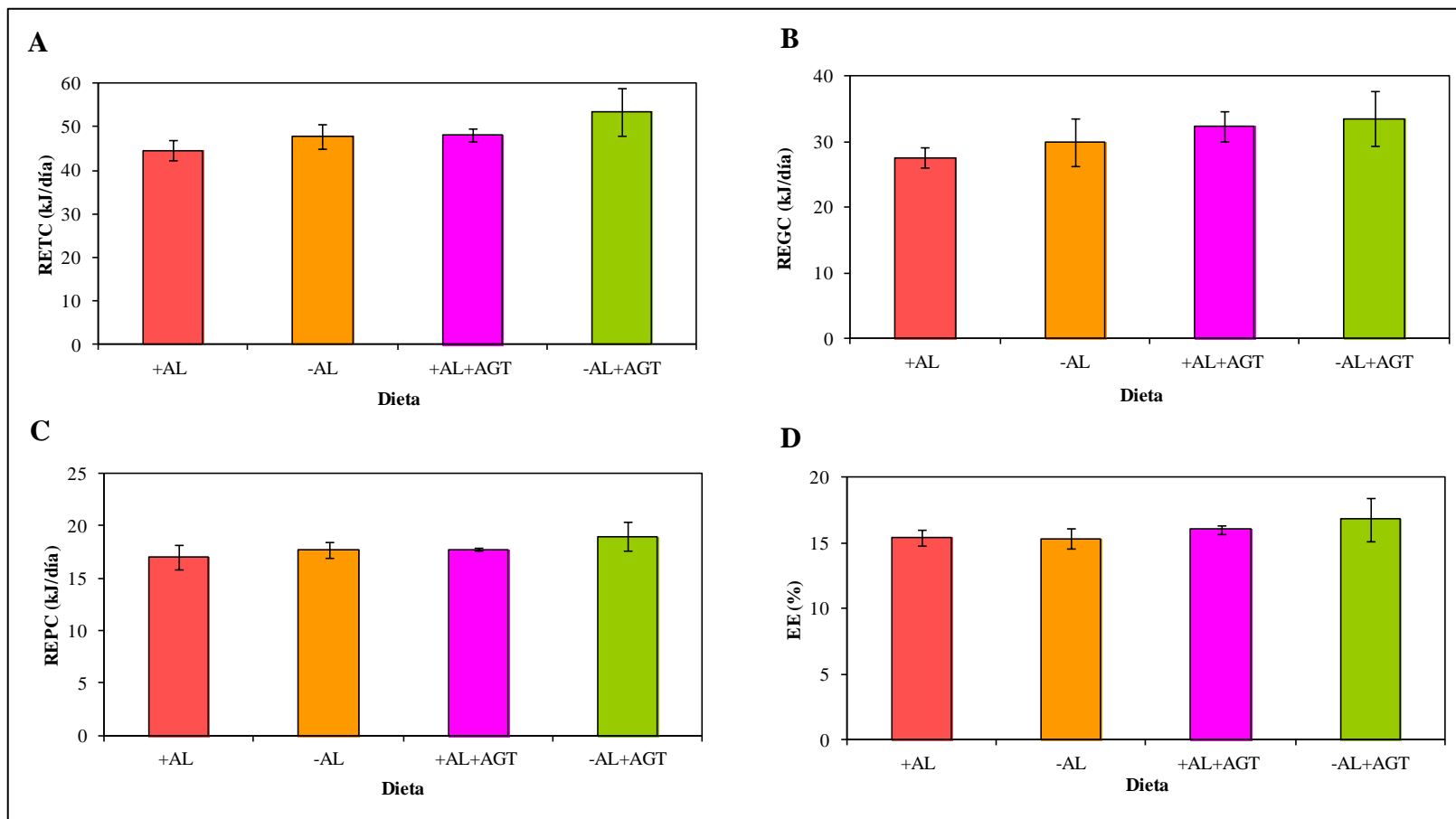
I.1.4- Pesos de hígado, tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal, y músculo gastrocnemio

El análisis de variancia mostró que el peso del hígado absoluto fue significativamente afectado solo por la deprivación de AL ($p < 0,001$), mientras que el peso relativo también estuvo afectado por la sustitución con AGT ($p < 0,001$). El análisis estadístico individual mostró que, el peso del hígado relativo fue disminuido significativamente en ambos grupos deprivados en AL, en comparación a sus correspondientes grupos controles. Además, los AGT disminuyeron el peso hepático relativo frente a los respectivos controles (Figura 12).

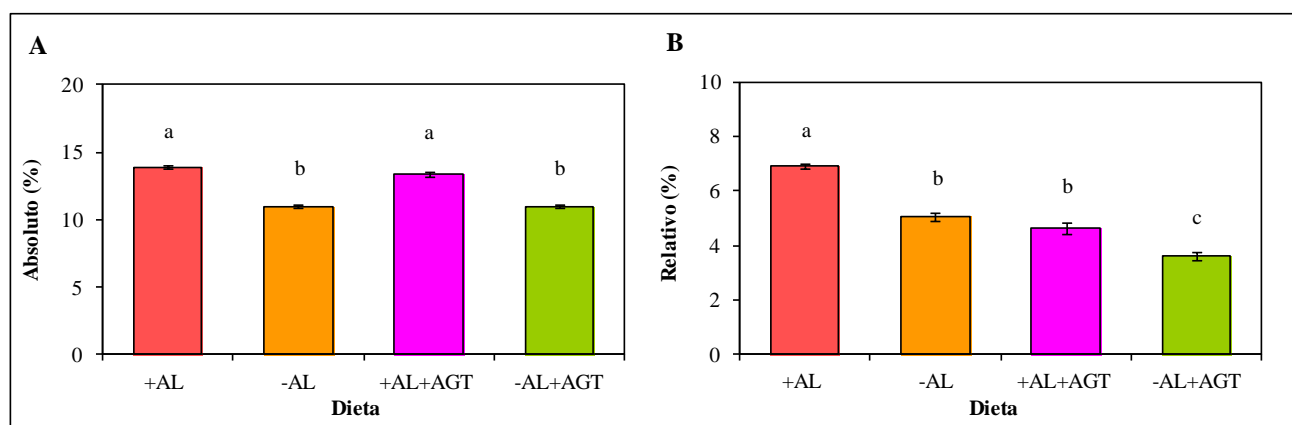
Los pesos de los TAE y TARP, tanto absolutos, como relativos al peso corporal, fueron incrementados por la sustitución con AGT ($p < 0,001$). Los análisis individuales mostraron que la sustitución con AGT, independientemente del status de AL, incrementó el peso de dichos tejidos, tanto en su expresión absoluta, como relativa respecto a sus correspondientes controles (Figuras 13 y 14).

El peso absoluto del músculo gastrocnemio no fue modificado por la deprivación de AL, ni por la sustitución parcial con AGT (Figura 15A). Sin embargo, el peso relativo mostró que estuvieron afectados por la sustitución con AGT ($p < 0,01$), disminuyendo significativamente en el grupo $\bar{AL}+AGT$ vs. \bar{AL} (Figura 15B).

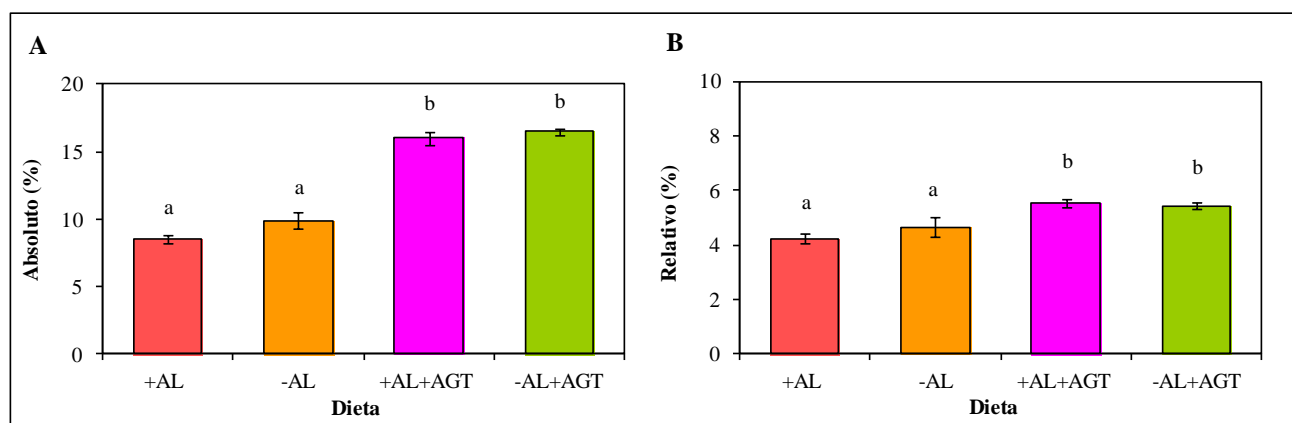
Figura 11- Retención energética total corporal diaria (RETC), retención energética de grasa corporal diaria (REGC), retención energética de proteínas corporales diaria (REPC), eficiencia energética del alimento (EE)



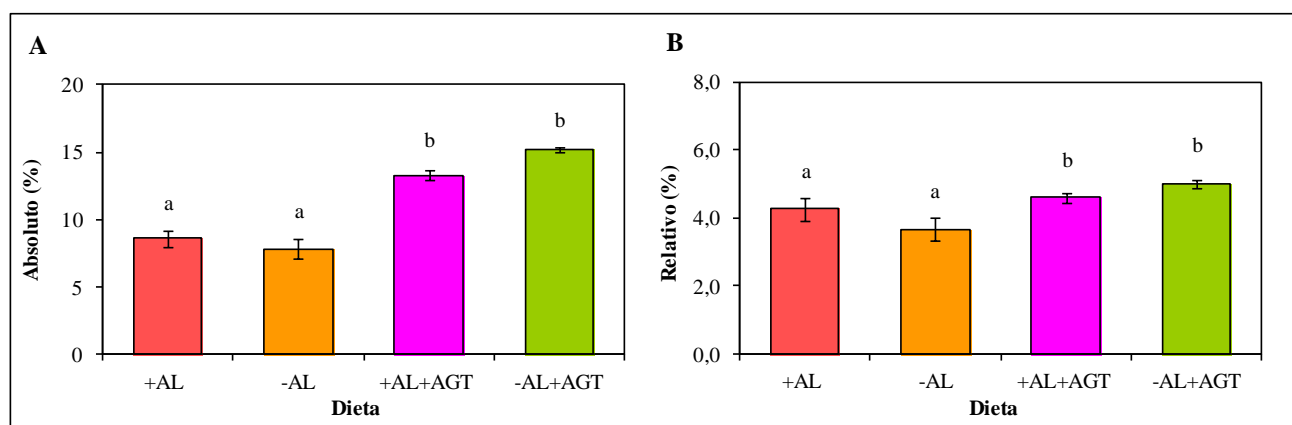
Grupos experimentales: +AL: enriquecida en ácido linoleico; -AL: deprivada de ácido linoleico; +AL+AGT: +AL sustituida con AGT; -AL+AGT: -AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 12- Peso del hígado

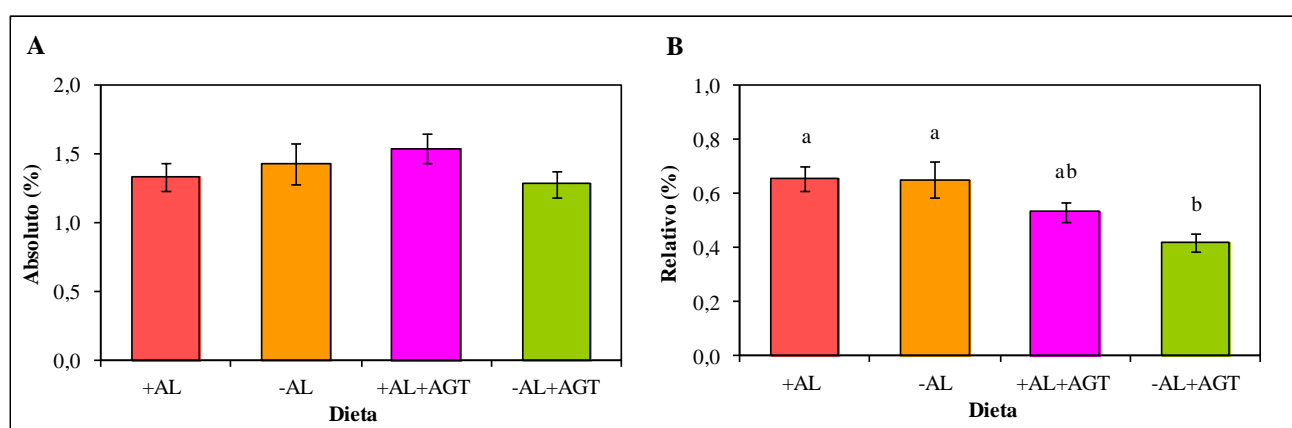
Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 13- Peso del tejido adiposo epididimal

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 14- Peso del tejido adiposo retroperitoneal

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 15- Peso del músculo gastrocnemio

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

I.2- Parámetros lipídicos

I.2.1- Concentraciones circulantes de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol

Las concentraciones de TG séricos no presentaron diferencias significativas tanto por la deprivación de AL, como por la presencia de AGT. No obstante, en las comparaciones individuales los niveles de TG circulantes, mostraron un descenso en el grupo ⁻AL vs. ⁺AL y un incremento en ⁻AL+AGT vs. ⁻AL (Figura 16A).

Las concentraciones de FL séricos mostraron diferencias estadísticas sólo por la deprivación de AL ($p < 0,001$), presentando una reducción significativa en los grupos \bar{AL} y $\bar{AL}+AGT$, comparado a sus respectivos controles (Figura 16B).

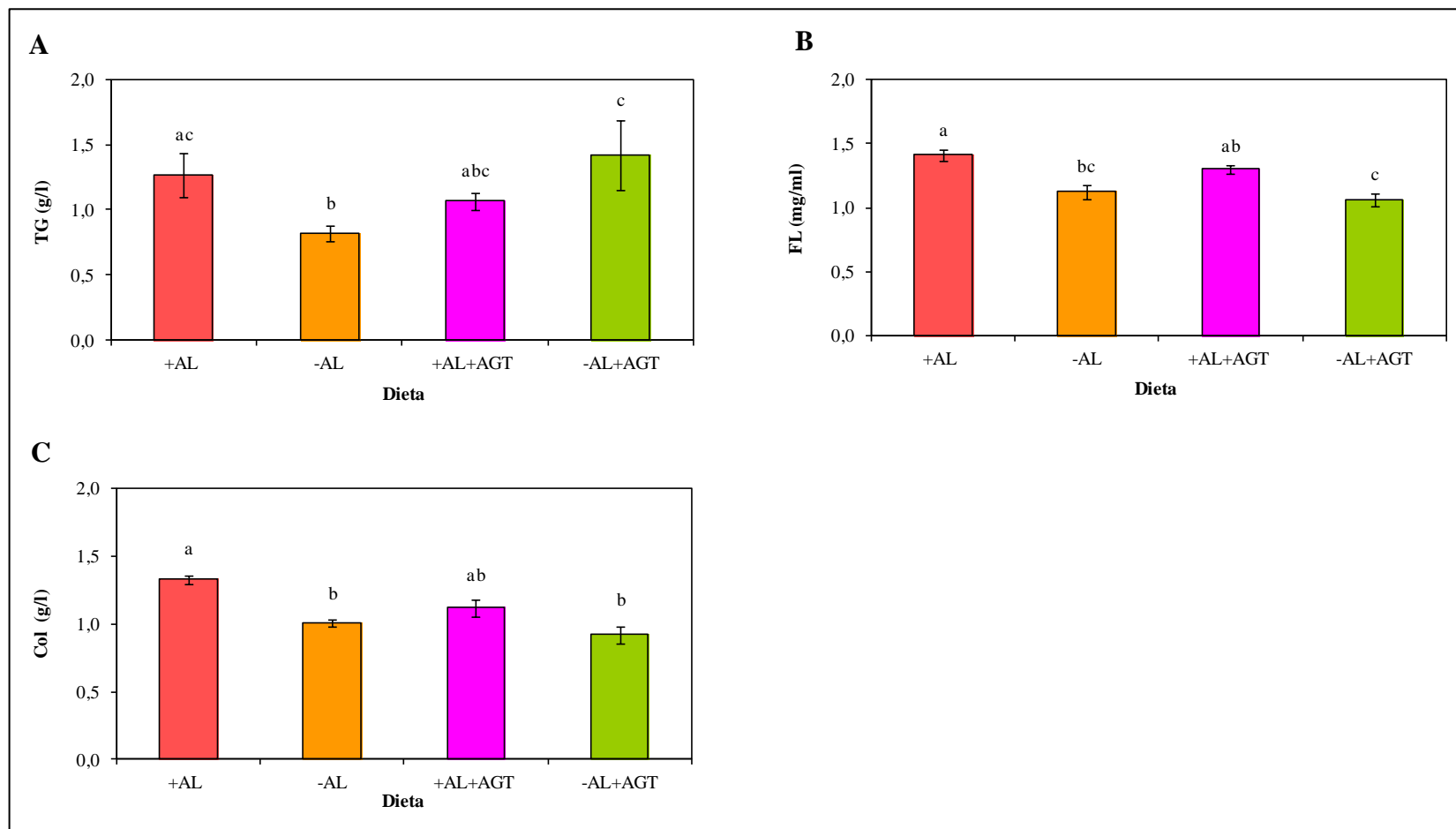
La concentración de Col sérico, se redujo significativamente tanto por la deprivación de AL ($p < 0,001$), como por los AGT ($p < 0,005$). No obstante, el análisis estadístico individual mostró sólo diferencia en el grupo \bar{AL} , el cual estuvo disminuido respecto a su grupo control (Figura 16C).

I.2.2- Contenido hepático de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol

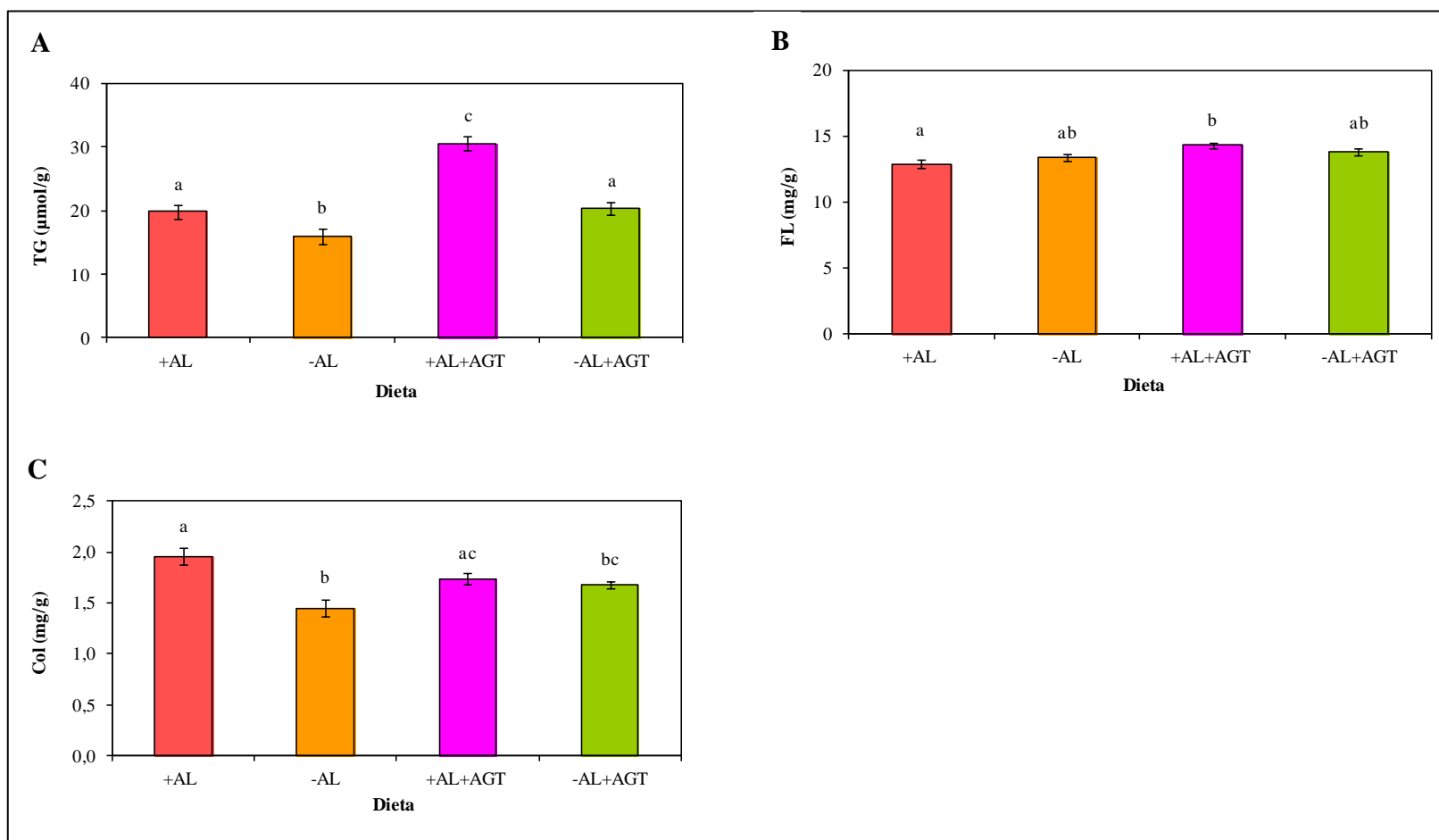
El análisis de varianza mostró que los tratamientos dietarios condujeron a un efecto diferencial sobre el contenido de TG hepáticos. Específicamente, la deprivación con AL disminuyó, mientras que la sustitución con AGT incrementó los niveles de TG hepáticos (Figura 17A).

El contenido hepático de FL fue afectado únicamente por la presencia de los AGT ($p < 0,01$), los cuales mostraron un incremento significativo en el grupo $^{+}AL+AGT$ vs. ^{+}AL (Figura 17B).

El contenido de Col hepático fue afectado por la deprivación de AL ($p < 0,001$), pero no por la sustitución con AGT ($p = 0,850$). En la figura 17C puede observarse que el grupo \bar{AL} presenta una reducción significativa de este parámetro vs. su correspondiente grupo control.

Figura 16- Niveles séricos de triglicéridos (TG), fosfolípidos (FL) y colesterol (Col)

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 17- Niveles hepáticos de triglicéridos (TG), fosfolípidos (FL) y colesterol (Col)

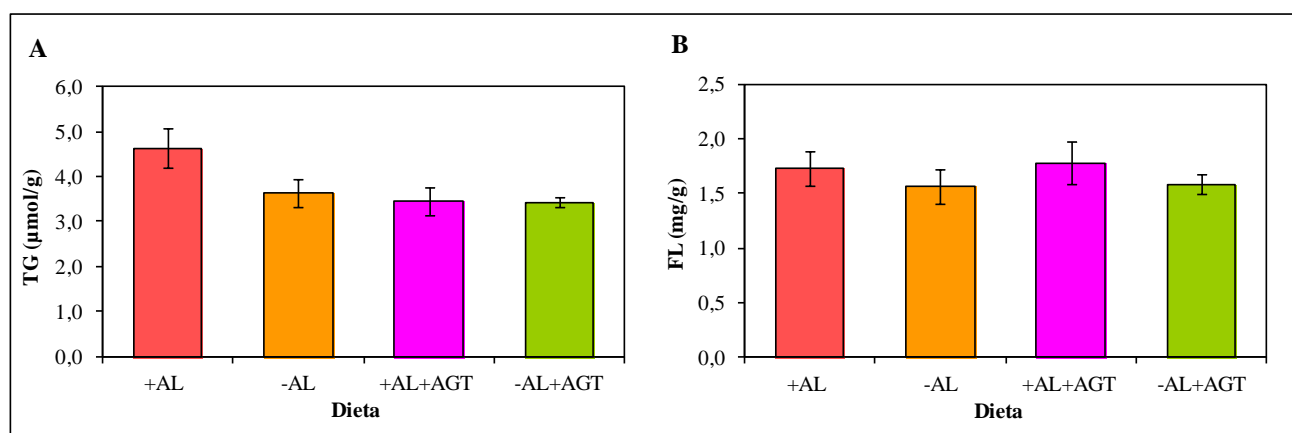
Grupos experimentales: +AL: enriquecida en ácido linoleico; -AL: deprivada de ácido linoleico; +AL+AGT: +AL sustituida con AGT; -AL+AGT: -AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

1.2.3- Contenido muscular de triglicéridos y fosfolípidos

En el análisis de varianza el contenido de TG en músculo gastrocnemio presentó cambios significativos por la sustitución con AGT ($p < 0,05$), sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa en el análisis individual (Figura 18A).

Para el contenido muscular de FL, el análisis estadístico ANOVA (2x2) no mostró modificaciones significativas por ninguno de los tratamientos dietarios. (Figura 18B).

Figura 18- Niveles musculares de triglicéridos (TG) y fosfolípidos (FL)



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

1.2.4- Composición de ácidos grasos en hígado, tejido adiposo, músculo, suero y triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad

En las tablas 4 - 8 puede observarse que, tanto la deprivación de AL, como la sustitución con AGT, han producido numerosos cambios en el perfil de AG en hígado, TAE, músculo gastrocnemio, suero post-prandial y suero enriquecido en TG-VLDL. Dada la diversidad de AG que es posible identificar y cuantificar, se describen más detalladamente aquellos que tienen mayor relevancia cuantitativa y/o metabólica.

En la Tabla 4 pueden observarse que los AGT fueron significativamente incorporados en los animales tanto en la dieta enriquecida como en la deprivada de AL; no obstante, independientemente de que en algunos de ellos, no se observó diferencias significativas, los niveles de cada uno de los isómeros *trans* presentes en la dieta fueron menores en la dieta deprivada de AL. Cabe destacar que la retención de AGT en hígado presentó diferencias en función del isómero considerado. Así, en la Figura 19 puede observarse que, independientemente de los niveles de AL,

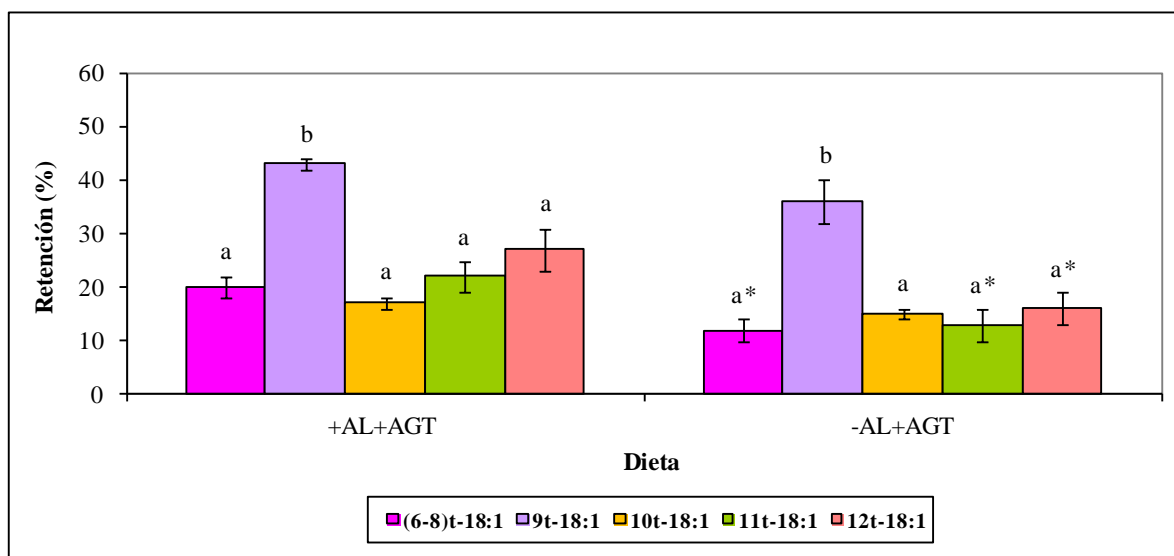
la retención del isómero *9t*-18:1 es mayor que la del resto de los isómeros. Además de los AGT monoénicos provenientes de la dieta ha sido observada una significativa cantidad de AGT dienoicos, específicamente el *9c,11t*-CLA, la cual no fue modificada por el status de AL (Tabla 4).

Tabla 4- Composición de ácidos grasos en hígado

Ácidos Grasos	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+AGT	⁻ AL+ AGT	AL	AGT	AL x AGT
12:0	0,00±0,00 ^a	0,59±0,14 ^b	0,00 ±0,00 ^a	0,45±0,03 ^b	0,000	NS	NS
14:0	0,70±0,07 ^a	2,14±0,18 ^b	0,91±0,10 ^a	1,48±0,10 ^c	0,000	NS	0,002
16:0	23,76±0,76	24,46±0,99	25,27±1,00	23,03±0,47	NS	NS	NS
9c-16:1	2,74±0,05 ^a	5,96±0,40 ^b	4,16±0,46 ^c	5,17±0,46 ^{cb}	0,000	NS	0,010
18:0	9,59±0,40 ^a	15,53±0,66 ^b	9,66±0,4 ^a	15,11±0,56 ^b	0,000	NS	NS
(6-8)t-18:1	-	-	0,32±0,03 ^a	0,20±0,02 ^b	-	-	-
9t-18:1	-	-	0,89±0,01	0,75±0,06	-	-	-
10t-18:1	-	-	0,50±0,03	0,46±0,02	-	-	-
11t-18:1	-	-	0,60±0,05 ^a	0,35±0,06 ^b	-	-	-
12t-18:1	-	-	0,59±0,06 ^a	0,35±0,05 ^b	-	-	-
9c-18:1	18,69±1,33	16,89±0,62	18,61±0,69	17,06±1,43	NS	NS	NS
11c-18:1	3,72±0,20 ^a	6,15±0,41 ^b	4,35±0,24 ^a	5,53±0,27 ^b	0,000	NS	0,046
9c,12c-18:2	21,19±0,63 ^a	5,13±0,20 ^b	12,47±0,75 ^c	7,49±0,95 ^b	0,000	0,000	0,000
6c,9c,12c-18:3	0,33±0,09 ^a	0,10±0,01 ^b	0,20±0,01 ^{ab}	0,00±0,00 ^c	0,000	0,019	NS
11c-20:1	0,16±0,01 ^{ab}	0,12±0,01 ^a	0,12±0,00 ^a	0,17±0,01 ^b	NS	NS	0,000
9c,12c,15c-18:3	0,29±0,03 ^a	0,12±0,01 ^b	0,22±0,00 ^{ab}	0,15±0,0 ^b	0,000	NS	0,004
9c,11t-CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,26±0,01 ^b	0,22±0,01 ^b	0,000	0,000	0,000
11c,14c-20:2	0,34±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	0,15±0,01 ^c	0,00±0,00 ^b	0,000	0,000	0,000
22:0	0,17±0,03 ^a	3,61±0,33 ^b	0,00±0,00 ^c	2,49±0,15 ^d	0,000	0,003	0,002

8c,11c-20:2	0,00±0,00 ^a	0,22±0,04 ^b	0,00±0,00 ^a	0,22±0,02 ^b	0,000	NS	NS
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,27±0,04 ^b	0,00±0,00 ^a	0,12±0,01 ^c	0,000	0,006	0,006
8c,11c,14c-20:3	0,47±0,04 ^{ac}	1,15±0,16 ^b	0,37±0,03 ^c	1,11±0,07 ^b	0,000	NS	NS
11c,14c,17c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,29±0,06 ^b	0,00±0,00 ^a	0,40±0,02 ^b	0,000	NS	NS
5c,8c,11c,14c-20:4	13,82±0,67 ^{ab}	10,90±0,57 ^a	14,69±1,03 ^b	10,51±0,78 ^a	0,000	NS	NS
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6	1,69±0,10 ^a	3,12±0,18 ^b	1,70±0,15 ^{ab}	3,73±0,59 ^c	0,000	NS	NS
Σ NI	1,74±0,19	1,63±0,19	2,66±0,21	1,30±0,03	0,001	NS	0,002
Σ AGS	34,39±0,44 ^a	49,94±0,92 ^b	35,84±0,96 ^a	45,05±0,53 ^b	0,000	NS	0,002
Σ AGM	25,31±1,45	29,12±1,07	30,14±1,10	30,04±1,91	NS	0,040	NS
Σ AGP	38,13±1,42 ^a	21,25±0,99 ^b	30,06±1,88 ^b	23,95±1,61 ^b	0,000	0,112	0,003
Σ AGT	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	3,16±0,15 ^b	2,33±0,15 ^b	0,010	0,000	0,001
Relación 20:3 n-9/20:4 n-6	0,00±0,00 ^a	0,03±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,01±0,00 ^c	0,000	0,005	0,005
Relación 9c,11t-18:2 /11t-18:1	0,00±0,00	1xxxx0±0,09	0,00±0,00	x,xx±0,13 ^b	0,000	NS	NS
Relación 16:1 n-7/16:0	0,12±0,00 ^a	0,24±0,01 ^b	0,16±0,01 ^a	0,22±0,02 ^b	0,000	NS	0,015
Relación 18:1 n-9/18:0	1,96±0,17 ^a	1,10±0,09 ^b	1,94±0,13 ^a	1,15±0,13 ^b	0,000	NS	NS
Relación 20:4 n-6/20:3 n-6	30,64±3,19 ^a	10,03±1,06 ^b	40,84±3,18 ^a	9,50±0,55 ^b	0,000	NS	0,035
Relación 18:3 n-6/18:2 n-6	0,016±0,004 ^a	0,020±0,001 ^a	0,016±0,004 ^a	0,000±0,000 ^b	0,024	0,001	0,001
Relación AA/AL	0,65±0,03 ^a	2,13±0,09 ^b	1,18±0,03 ^c	1,49±0,19 ^c	0,000	NS	0,000
Relación DHA/ALA	5,92±0,46 ^a	26,22±2,06 ^b	7,65±0,60 ^a	24,77±3,72 ^b	0,000	NS	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; Σ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ AGP: sumatoria de AG poliinsaturados. AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico; DHA: ácido docosahexaenoico; ALA: ácido α-linolénico. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe; a excepción del análisis para los niveles de los isómeros individuales donde se empleó el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa. Significancia estadística: p < 0,05.

Figura 19- Retención de ácidos grasos *trans* monoénicos en hígado

Grupos experimentales: ^+AL+AGT : enriquecida en ácido linoleico sustituida con AGT; ^-AL+AGT : deprivada de ácido linoleico sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico para cada tratamiento dietario se realizó mediante un 1x5 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. El análisis estadístico para cada uno de los grupos entre los diferentes tratamientos dietarios se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

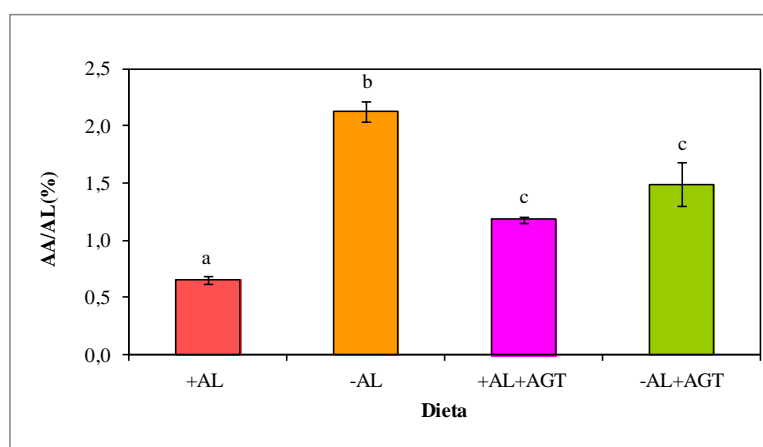
Los niveles de AL mostraron un cambio significativo tanto, por la deprivación de AL, como por la presencia de AGT; específicamente los mismos disminuyeron en los grupos ^-AL y ^-AL+AGT en un 76% y 40% versus los grupos ^+AL y ^+AL+AGT , respectivamente. La presencia de AGT redujo el contenido del AL en un 42% en el grupo ^+AL+AGT con respecto al ^+AL . Paralelamente, los niveles de ALA fueron afectados por la deprivación de AL, pero no por la ingesta de AGT. En las comparaciones no paramétricas individuales el contenido de ALA se vio disminuido por la deprivación de AL en un 76% y en un 32% en los grupos ^-AL y ^-AL+AGT versus los grupos ^+AL y ^+AL+AGT , respectivamente.

Es conocido que la deficiencia de AGE incrementa la elongación y desaturación de AG provenientes de la biosíntesis de novo o de aquellos AGPI o AGS de origen dietarios conduciendo a la formación en niveles cuantitativamente detectables de $5c,8c,11c-20:3$ (conocido como ácido Mead). Como puede observarse en la Tabla 4, los niveles de $8c,11c-20:2$ y $5c,8c,11c-20:3$ estuvieron cuantitativamente presentes en las dietas deprivadas de AL, y la presencia de AGT redujo significativamente el contenido del citado biomarcador de deficiencia de AGE. Cabe destacar que otro indicador ampliamente utilizado en la evaluación de deficiencia de AGE, como es la relación trieno/tetraeno, fue incrementada en los grupos deprivados en AL.

Los derivados del AL en la biosíntesis de AGPI-CL n-6 fueron afectados diferencialmente tanto, por la privación de AL, como por la presencia de AGT. Como era lógico esperar, los niveles de ácido γ -linolénico (GLA) fueron significativamente inferiores en los animales con privación de AL, independientemente de la presencia o no de AGT. En cambio, menores niveles de GLA fueron encontrados en presencia de AGT, alcanzando diferencias estadísticas únicamente en los animales privados en AL. En forma semejante, el 11c,14c-20:2 n-6, derivado de la vía secundaria de formación de AA, fue significativamente reducido por la privación de AL, como también por la presencia de AGT. El contenido de AA no fue modificado por ninguno de los tratamientos dietarios. Cabe destacar que el metabolito intermediario entre el GLA y AA: DGLA incrementó en forma muy significativa sus niveles por la privación de AL independientemente de la presencia de AGT.

La relación producto final/sustrato de la biosíntesis de AGPI-CL n-6 (AA/AL) (Figura 20) fue incrementada por la privación de AL aunque, en presencia de AGT este efecto fue de menor magnitud. La presencia de AGT en el grupo enriquecido en AL también incrementó dicha relación.

Figura 20- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido araquidónico (AA)/ácido linoleico (AL) en hígado

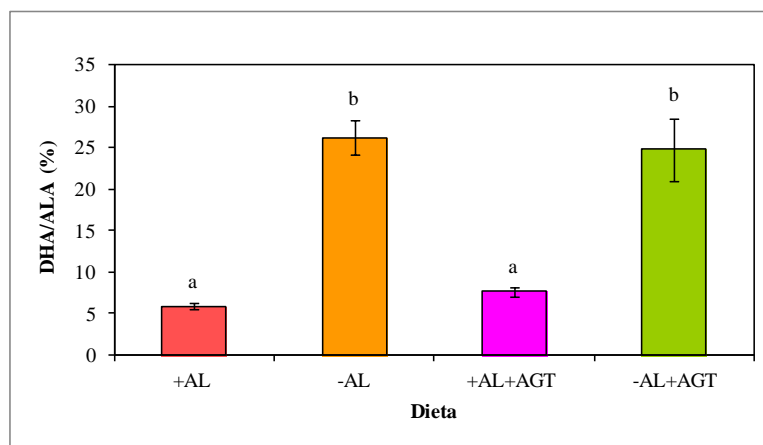


Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Asimismo la privación de AL tuvo un marcado efecto sobre la biosíntesis de AGPI n-3, incrementando la conversión de ALA a DHA (Figura 21), mientras que no hubo efecto por la presencia de AGT en la dieta. Si bien ningún intermediario de la ruta principal de biosíntesis de

DHA ha podido ser cuantitativamente detectado, los niveles de 11*c*,14*c*,17*c*-20:3 mostraron un comportamiento paralelo a los del producto final, DHA.

Figura 21- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en hígado



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Los niveles de 12:0 y 14:0 estuvieron relacionados a los niveles de ingesta, siendo incrementados en los animales alimentados con dietas deprivadas de AL. El contenido de 9*c*-16:1 fue incrementado por la deprivación de AL y por la presencia de AGT, no obstante no presentaron un efecto aditivo. El 11*c*-18:1 sólo presentó un incremento en sus niveles por la deprivación de AL y la misma se observó tanto en presencia como en ausencia de AGT. El contenido de 18:0, siguiendo una relación con los niveles dietarios, incrementó significativamente en los animales con deprivación de AL, no observándose ningún efecto por los AGT. En cambio, el contenido de 9*c*-18:1, que presentaba niveles muy elevados en las dietas ⁺AL y ⁺AL+AGT, no mostró ningún cambio entre los tratamientos dietarios empleados. Otro AG detectado en niveles considerables derivado del 18:0 es el 22:0, el cual también fue incrementado por la deprivación de AL. Contrariamente, los AGT redujeron los niveles de este AG de cadena larga.

La composición relativa de AG en tejido adiposo epididimal de los animales en dietas enriquecidas o deprivadas en AL, suplementadas o no con AGT es presentada en la Tabla 5. Los AGT se incorporaron a nivel de tejido adiposo epididimal en forma significativa reflejando en cierta medida los niveles dietarios, fundamentalmente de tres (9*t*-18:1, 10*t*-18:1 y 11*t*-18:1) de los cuatro AGT monoénicos mayoritarios en la dieta. Como puede observarse en los animales con deprivación

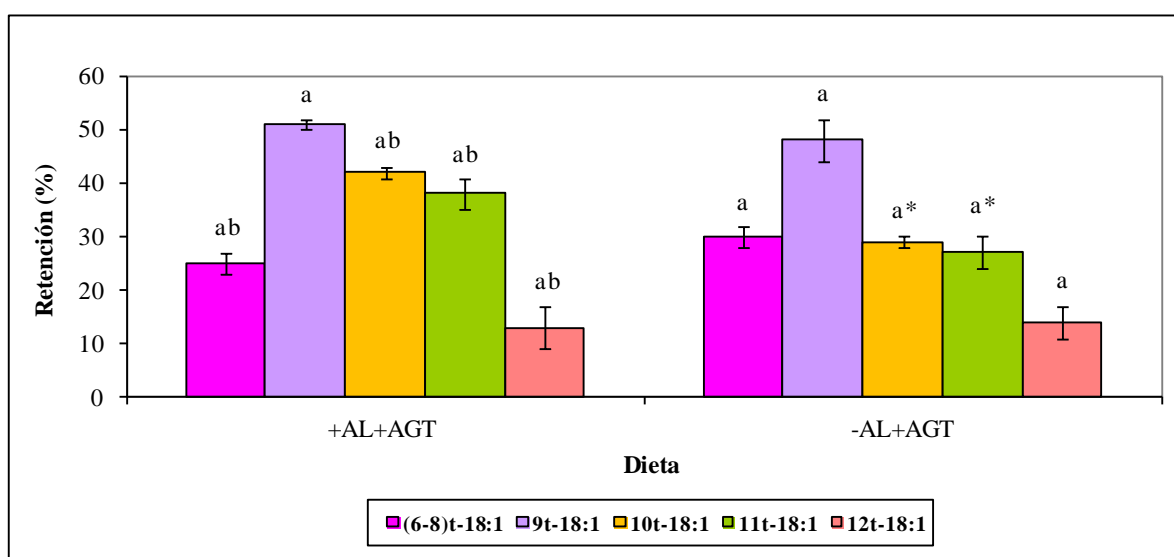
de AL, la incorporación de los AGT fue menor o igual que la de aquellos animales con dietas enriquecidas en AL. Estos resultados se reflejan en la retención de AGT monoénicos representada en la Figura 22. Cabe destacar, que se detectaron cantidades significativas de 9*c*,11*t*-CLA a pesar de no estar presentes en la dieta y las mismas no fueron afectadas por el status de AL.

Tabla 5- Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

Ácidos grasos	Grupos experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+AGT	⁻ AL+ AGT	AL	AGT	AL x AGT
12:0	0,16±0,01 ^a	8,89±0,32 ^b	0,35±0,02 ^a	6,43±0,28 ^c	0,000	0,000	0,000
14:0	1,14±0,10 ^a	8,06±0,12 ^b	1,48±0,06 ^a	6,14±0,13 ^c	0,000	0,000	0,000
16:0	21,78±0,92 ^a	32,08±0,69 ^b	24,96±0,83 ^c	32,83±0,24 ^b	0,000	0,015	NS
9c-16:1	4,44±0,43 ^a	11,84±0,27 ^b	5,95±0,25 ^a	10,27±0,60 ^b	0,000	NS	0,002
18:0	1,99±0,06	2,68±0,27	2,47±0,19	2,84±0,34	0,039	NS	NS
(6-8)t-18:1	-	-	0,41±0,06	0,48±0,06	-	-	-
9t-18:1	-	-	1,07±0,07	0,99±0,15	-	-	-
10t 18:1	-	-	1,27±0,09 ^a	0,87±0,14 ^b	-	-	-
11t-18:1	-	-	1,06±0,05 ^a	0,74±0,13 ^b	-	-	-
12t-18:1	-	-	0,28±0,07	0,31±0,06	-	-	-
9c-18:1	30,30±0,41 ^a	26,86±0,38 ^b	29,53c±0,44 ^a	28,06±0,61 ^b	0,000	NS	NS
11c-18:1	3,42±0,24 ^a	5,14±0,31 ^b	3,55±0,36 ^a	4,60±0,28 ^{ab}	0,000	NS	NS
9c,12c-18:2	34,30±1,00 ^a	1,86±0,08 ^b	24,07±0,75 ^c	1,71±0,10 ^b	0,000	0,000	0,000
6c,9c,12c-18:3	0,05±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,005	0,005	0,005
9c,12c,15c-18:3	0,67±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b	0,50±0,02 ^c	0,00±0,00 ^b	0,000	0,007	0,007
9c,11t-CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,60±0,04 ^b	0,54±0,06 ^b	NS	0,000	NS
8c,11c,14c-20:3	0,07±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,009	0,009	0,009
5c,8c,11c,14c-20:4	0,76±0,07 ^a	0,00±0,00 ^b	0,46±0,03 ^c	0,00±0,00 ^b	0,000	0,001	0,001
∑ NI	0,00±0,00	0,00±0,00	0,62±0,04	0,59±0,02	NS	0,000	NS

Σ AGS	25,07±0,87 ^a	42,82±0,47 ^b	29,26±0,77 ^c	48,24±0,40 ^d	0,000	NS	0,000
Σ AGM	38,16±0,32 ^a	43,84±0,22 ^{bc}	43,12±0,80 ^c	46,32±0,86 ^d	0,000	0,0000	0,021
Σ AGP	35,85±1,06 ^a	1,86±0,08 ^b	25,80±0,90 ^c	2,67±0,40 ^b	0,000	0,000	0,000
Σ AGT	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	4,26±0,42 ^b	3,81±0,44 ^b	NS	0,000	NS
Relación 16:1 n-7/16:0	0,20±0,01 ^a	0,37±0,02 ^b	0,24±0,01 ^a	0,31±0,02 ^b	0,000	NS	0,004
Relación 18:1 n-9/18:0	15,31±0,66 ^a	10,41±0,98 ^b	12,28±1,10 ^{ab}	10,41±1,21 ^b	0,004	NS	NS
Relación AA/AL	0,022±0,002 ^a	0,000±0,000 ^b	0,019±0,001 ^a	0,000±0,000 ^b	0,000	NS	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; Σ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ AGP: sumatoria de AG poliinsaturados. AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe; a excepción del análisis para los niveles de los isómeros individuales donde se empleó el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

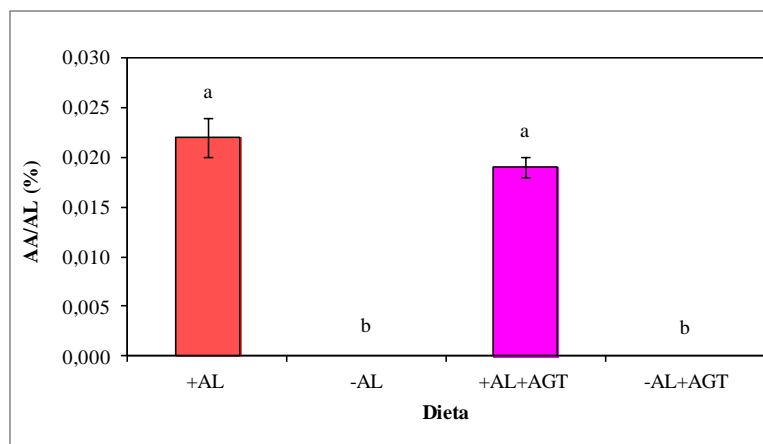
Figura 22- Retención de ácidos grasos *trans* monoénicos en tejido adiposo epididimal

Grupos experimentales: ⁺AL+AGT: enriquecida en ácido linoleico sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: deprivada de ácido linoleico sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico para cada tratamiento dietario se realizó mediante un 1x5 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. El análisis estadístico para cada uno de los grupos entre los diferentes tratamientos dietarios se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

De acuerdo a lo esperado, el contenido de los dos AGE: AL y ALA, fue muy reducido por las dietas deprivadas en AL, no obstante, la presencia de AGT también redujo significativamente los niveles de dichos AG en la dieta enriquecida en AL.

Los AG derivados del AL en la biosíntesis de AGPI-CL de la serie n-6: GLA, DGLA y AA fueron significativamente reducidos por la deprivación de AL, como también por la sustitución con AGT. En el caso de los animales con deprivación de AL el contenido de dichos AG no alcanzó niveles detectables. Mientras que los AGT, sólo presentaron niveles no detectables en los intermediarios de biosíntesis de AA. En la Figura 23 se muestra que la relación AA/AL en tejido adiposo no presentó diferencias por la sustitución con AGT.

Figura 23- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido araquidónico (AA)/ácido linoleico (AL) en tejido adiposo epididimal



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Respecto a la biosíntesis de AGPI-CL de la serie n-3 a partir del ALA, no se detectaron ninguno de los productos distales en todos los grupos analizados.

Los niveles de 12:0 y 14:0 guardan relación con los niveles ingeridos con las dietas experimentales, en cambio los niveles de 16:0 incrementaron por la sustitución con AGT y en mayor medida por la deprivación de AL, no observándose efecto aditivo. Un comportamiento semejante, pero sin alcanzar diferencias significativas, ha sido observado en el 18:0.

La deprivación de AL incrementó el contenido de 9 c -16:1 (167 - 73%) y el de 11 c -18:1 (50 - 30%), sin presentar modificaciones por la sustitución con AGT. Mientras que el del 9 c -18:1 porcentualmente mostró una leve pero significativa reducción por la deprivación de AL.

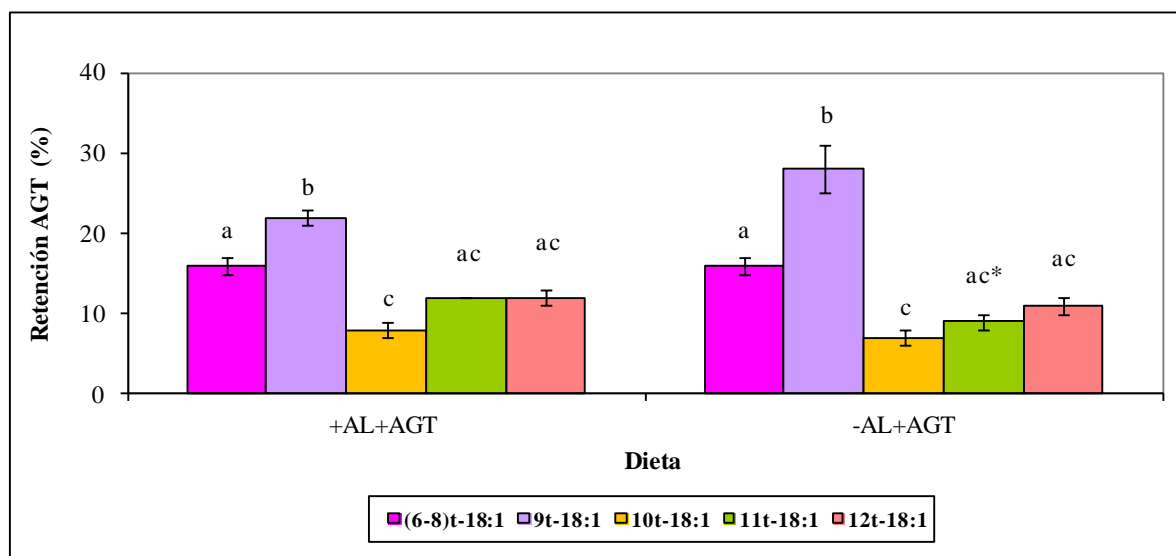
En la Tabla 6 se presenta la composición de AG musculares. Puede observarse que los isómeros *trans* monoénicos presentes en la dieta fueron significativamente incorporados en el músculo de los animales que recibieron tanto la dieta enriquecida, como deprivadas de AL, no mostrando, a excepción del isómero 11 t -18:1, diferencias entre ambas dietas. Estos resultados se corresponden con la retención de AGT, la cual presentó diferencias en función del isómero considerado. Así, en la Figura 24 puede observarse que, independientemente de los niveles de AL, la retención del isómero 9 t -18:1 es mayor que la del resto de los isómeros. Además, tanto en la dieta enriquecida, como en la deprivadas de AL, ha sido encontrado una significativa cantidad de isómero 9 c ,11 t -CLA.

Tabla 6- Composición de ácidos grasos en músculo gastrocnemio

Ácidos Grasos	Grupos experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+AGT	⁻ AL+AGT	AL	AGT	AL x AGT
12:0	0,06±0,01 ^a	5,54±0,08 ^b	0,10±0,03 ^a	2,73±0,56 ^{ab}	0,001	NS	NS
14:0	0,74±0,05 ^a	4,52±0,90 ^b	0,88±0,08 ^a	2,97±0,40 ^{ab}	0,000	NS	NS
16:0	23,37±0,25 ^a	26,20±0,60 ^b	23,12±0,55 ^a	26,17±0,33 ^b	0,000	NS	NS
9c-16:1	2,86±0,34 ^a	9,60±1,17 ^b	4,34±0,54 ^{ac}	7,11±0,43 ^{bc}	0,000	NS	0,022
18:0	8,64±0,19	6,62±1,45	6,80±0,41	7,80±0,53	NS	NS	NS
(6-8) <i>t</i> -18:1	-	-	0,25±0,01	0,26±0,02	-	-	-
9 <i>t</i> -18:1	-	-	0,46±0,03	0,58±0,06	-	-	-
10 <i>t</i> -18:1	-	-	0,25±0,02	0,22±0,02	-	-	-
11 <i>t</i> -18:1	-	-	0,33±0,01	0,26±0,01 [*]	-	-	-
12 <i>t</i> -18:1	-	-	0,26±0,01	0,23±0,03	-	-	-
9c-18:1	12,78±0,60 ^a	28,32±1,84 ^b	14,96±1,29 ^a	18,13±1,63 ^a	0,000	0,023	0,002
11c-18:1	4,19±0,38 ^a	0,06±0,01 ^b	5,46±0,41 ^a	5,88±0,42 ^a	0,001	0,000	0,000
9c,12c-18:2	21,36±1,34 ^a	6,72±0,52 ^b	20,71±1,85 ^a	7,48±0,42 ^b	0,000	NS	NS
6c,9c,12c-18:3	0,04±0,01	0,03±0,01	0,02±0,00	0,03±0,00	NS	NS	NS
11c-20:1	0,06±0,00 ^a	0,04±0,00 ^{ab}	0,06±0,01 ^a	0,02±0,00 ^b	0,000	NS	NS
9c,12c,15c-18:3	0,16±0,02 ^a	0,06±0,02 ^b	0,14±0,02 ^a	0,07±0,01 ^b	0,000	NS	NS
9c,11 <i>t</i> -CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,37±0,05 ^b	0,25±0,03 ^b	NS	0,000	NS
11c,14c-20:2	0,20±0,01 ^a	0,02±0,00 ^b	0,13±0,00 ^c	0,04±0,01 ^b	0,000	0,019	0,002
C 22:0	0,01±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,01±0,01 ^a	0,06±0,02 ^b	NS	0,020	0,048

8c,11c-20:2	0,06±0,02	0,11±0,03	0,07±0,01	0,17±0,03	0,017	NS	NS
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,08±0,02 ^b	0,00±0,00 ^a	0,07±0,02 ^b	0,001	NS	NS
8c,11c,14c-20:3	0,38±0,02	0,33±0,10	0,34±0,03	0,48±0,05	NS	NS	NS
11c,14c,17c-20:3	0,06±0,01 ^a	0,96±0,27 ^b	0,05±0,01 ^a	0,79±0,16 ^b	0,001	NS	NS
5c,8c,11c,14c-20:4	13,08±0,91 ^a	4,66±1,39 ^b	10,32±1,24 ^a	6,18±0,86 ^b	0,001	NS	NS
5c,8c,11c,14c,17c-20:5	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^a	0,05±0,01 ^b	0,000	NS	NS
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6	6,34±0,46 ^a	2,59±0,20 ^b	4,85±0,41 ^a	5,14±1,46 ^a	0,003	NS	0,001
Σ NI	6,59±0,28 ^a	2,20±0,42 ^b	3,27±0,41 ^b	2,66±0,33 ^b	0,000	0,004	0,001
Σ AGS	33,04±0,46 ^a	43,16±0,03 ^b	31,10±0,75 ^a	39,89±0,91 ^c	0,000	0,003	NS
Σ AGM	21,10±1,05 ^a	38,72±3,00 ^b	28,26±1,10 ^{ac}	34,60±2,53 ^{bc}	0,000	NS	0,028
Σ AGP	41,68±0,79 ^a	15,62±2,28 ^b	37,36±0,86 ^a	21,37±1,67 ^b	0,000	NS	0,011
Σ AGT	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,27±0,18 ^b	2,43±0,19 ^b	NS	0,000	NS
Relación 20:3 n-9/20:4 n-6	0,00±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,000	NS	NS
Relación 16:1 n-7/16:0	0,12±0,02 ^a	0,36±0,04 ^b	0,19±0,02 ^{ac}	0,27±0,02 ^{bc}	0,000	NS	0,012
Relación 18:1 n-9/18:0	1,48±0,10 ^a	5,84±0,21 ^b	2,24±0,33 ^a	2,38±0,37 ^a	0,000	0,001	0,000
Relación 20:4 n-6/20:3 n-6	34,66±1,66 ^a	13,98±0,041 ^b	29,99±1,73 ^a	12,71±0,79 ^b	0,000	0,046	NS
Relación 18:3 n-6/18:2 n-6	0,002±0,000 ^a	0,005±0,001 ^b	0,001±0,000 ^a	0,003±0,000 ^{ab}	0,002	NS	NS
Relación AA/AL	0,62±0,08	0,68±0,15	0,52±0,10	0,82±0,08	NS	NS	NS
Relación DHA/ALA	42,05±8,09 ^{ab}	33,06±3,30 ^a	39,29±7,90 ^a	74,35±7,02 ^b	NS	NS	0,011

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; Σ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ AGP: sumatoria de AG poliinsaturados. AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico; DHA: ácido docosahexaenoico; ALA: ácido α -linolénico. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.. El análisis estadístico para para los niveles de los isómeros se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 24- Retención de ácidos grasos *trans* monoénico en músculo gastrocnemio

Grupos experimentales: ⁺AL+AGT: enriquecida en ácido linoleico sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: deprivada de ácido linoleico sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico para cada tratamiento dietario se realizó mediante un 1x5 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. El análisis estadístico para cada uno de los grupos entre los diferentes tratamientos dietarios se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

La dieta deprivadas de AL disminuyó significativamente los niveles de AL y ALA, pero no fueron afectados por la presencia de los AGT.

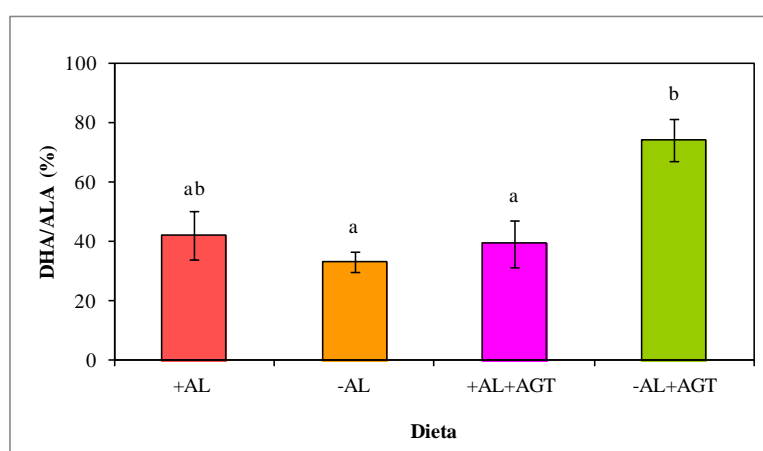
Los niveles de ácido Mead y la relación trieno/tetraeno, reflejaron la deficiencia de AGE sólo en los grupos deprivados en AL. La presencia de AGT no modificó el contenido de los citados marcadores de deficiencia de AGE. Sin embargo, el precursor del ácido Mead, 8c,11c-20:2 estuvo presente en todas las dietas experimentales y, aunque no alcanzó diferencias estadísticamente significativas, sus niveles fueron mayores (83 - 143%) en las deprivadas en AL.

Los derivados del AL en la biosíntesis de AGPI-CL n-6 fueron afectados diferencialmente. Por un lado, los niveles de GLA no fueron modificados por la deprivación de AL, ni por la presencia de AGT dietarios. Sin embargo, el 11c,14c-20:2, derivado de la vía secundaria de formación de AA, fue significativamente reducido tanto por la deprivación de AL, como por la presencia de AGT. El contenido de AA fue menor en ambos grupos de animales con deprivación de AL, no obstante, no fueron observados cambios por la sustitución con AGT. En el presente tejido, los niveles del metabolito intermediario entre el GLA y AA: DGLA no fueron modificados por las variables experimentales. La relación producto final/sustrato de la biosíntesis de AGPI-CL n-6

(AA/AL) no alcanzó diferencias significativas por la deprivación de AL, ni por la presencia de AGT.

La conversión de ALA a DHA estuvo aumentada por la deprivación de AL solo en presencia de AGT (Figura 25). Además, si bien ninguno de los intermediario de la ruta principal de biosíntesis de DHA han podido ser cuantitativamente detectables, los niveles del metabolito alternativo en la biosíntesis de DHA (11*c*,14*c*,17*c*-20:3) mostraron un importante aumento por la deprivación de AL sin ser afectados por la presencia de los AGT.

Figura 25- Relación producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en músculo gastrocnemio



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Los niveles de 12:0 y 14:0 estuvieron relacionados a los niveles de ingesta, siendo más elevados en los animales con deprivación en AL. El contenido de 9*c*-16:1 fue incrementado por la deprivación de AL, mientras que el de 11*c*-18:1 sólo presentó una reducción en sus niveles por la deprivación de AL en ausencia de AGT. El contenido de 18:0 no mostró ningún efecto por la deprivación de AL, ni por los AGT. En cambio, el contenido de 9*c*-18:1 mostró un importante aumento por la deprivación de AL en ausencia de AGT. El 22:0, derivado de la elongación de los AGS, mostró niveles aumentados por la deprivación de AL solo en presencia de AGT.

En la Tabla 7 se muestran los niveles de AGT circulantes, los cuales mostraron ciertas diferencias estadísticas en función del status de AL. Dentro de los AGT, la sumatoria de los monoénicos ha reflejado un leve descenso por la deprivación de AL que se manifiesta estadísticamente sólo en el (6-8)*t*-18:1. Cabe destacar que la retención de AGT monoénicos en el

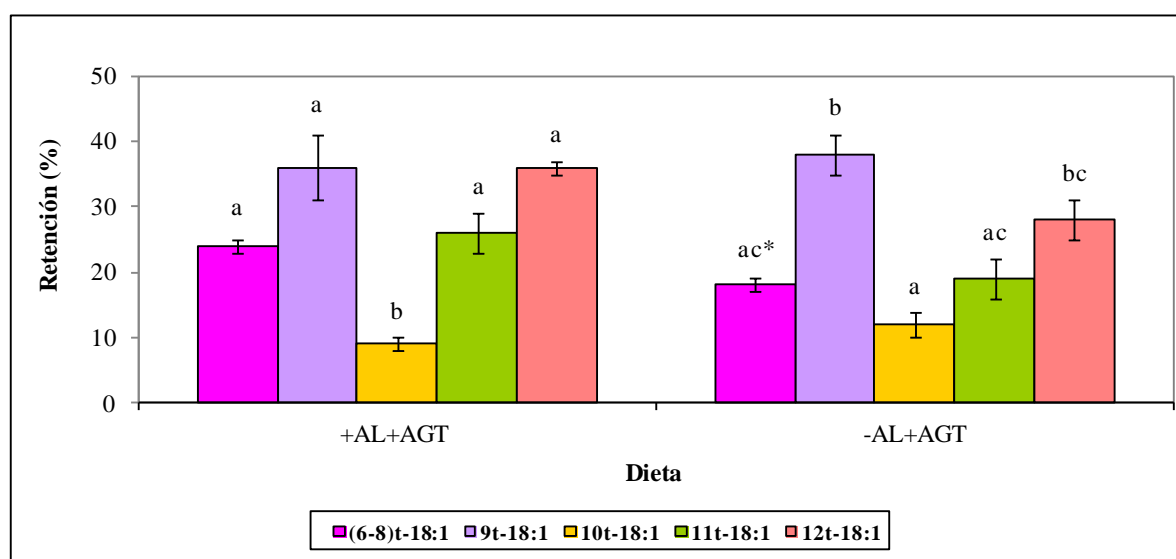
suero (Figura 26) ha mostrado un descenso significativo para el isómero 10*t*-18:1. El 9*c*,11*t*-CLA sólo mostró niveles cuantificables en el grupo de animales que recibieron la dieta $\bar{A}L+AGT$.

Tabla 7- Composición de ácidos grasos en suero

Ácidos grasos	Grupos experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+AGT	⁻ AL+ AGT	AL	AGT	AL x AGT
12:0	0,00±0,00 ^a	1,41±0,19 ^b	0,00±0,00 ^a	0,68±0,22 ^c	0,000	0,022	0,022
14:0	0,31±0,03 ^a	2,35±0,28 ^b	0,40±0,02 ^a	1,34±0,18 ^c	0,000	0,014	0,005
16:0	20,06±0,31	20,66±0,96	18,77±0,44	19,40±0,28	NS	0,039	NS
9c-16:1	0,90±0,22 ^a	4,37±0,13 ^b	1,52±0,04 ^c	3,67±0,58 ^b	0,000	NS	NS
18:0	15,09±1,16	16,95±1,35	16,89±0,81	18,56±1,31	NS	NS	NS
(6-8)t-18:1	-	-	0,39±0,01	0,29±0,02 [*]	-	-	-
9t-18:1	-	-	0,75±0,10	0,80±0,05	-	-	-
10t-18:1	-	-	0,29±0,04	0,36±0,05	-	-	-
11t-18:1	-	-	0,71±0,08	0,52±0,07	-	-	-
12t-18:1	-	-	0,77±0,03	0,61±0,07	-	-	-
9c-18:1	9,65±0,80 ^a	17,03±1,52 ^b	9,73±0,46 ^a	14,90±0,96 ^b	0,000	NS	NS
11c-18:1	2,66±0,17 ^a	5,14±0,21 ^b	2,41±0,24 ^a	4,83±0,18 ^b	0,000	NS	NS
9c,12c-18:2	20,20±0,59 ^a	7,89±0,53 ^b	16,16±0,53 ^c	8,47±0,34 ^b	0,000	0,004	0,000
6c,9c,12c-18:3	0,06±0,02 ^a	0,26±0,02 ^b	0,12±0,00 ^c	0,00±0,00 ^d	0,011	0,000	0,000
11c-20:1	0,11±0,01	0,16±0,03	0,18±0,01	0,11±0,01	NS	NS	0,003
9c,12c,15c-18:3	0,22±0,01 ^a	0,20±0,01 ^a	0,19±0,01 ^a	0,14±0,01 ^b	0,009	0,001	NS
9c,11t-CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,22±0,03 ^b	0,000	0,000	0,000
11c,14c-20:2	0,45±0,03 ^a	0,16±0,04 ^b	0,56±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b	0,000	NS	0,002
22:0	0,00±0,00 ^a	3,60±0,17 ^b	0,34±0,02 ^a	3,93±0,41 ^b	0,000	NS	NS

8c,11c-20:2	0,00±0,00 ^a	0,41±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	0,57±0,09 ^b	0,000	NS	NS
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,36±0,05 ^b	0,00±0,00 ^a	0,29±0,04 ^b	0,000	NS	NS
8c,11c,14c-20:3	0,46±0,04 ^{ac}	1,12±0,07 ^b	0,29±0,04 ^c	1,35±0,09 ^b	0,000	NS	0,005
11c,14c,17c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,35±0,08 ^b	0,00±0,00 ^a	0,78±0,13 ^c	0,000	0,011	0,011
5c,8c,11c,14c-20:4	24,95±0,76 ^a	9,50±0,56 ^b	24,51±0,92 ^a	10,19±0,39 ^b	0,000	NS	NS
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6	1,96±0,18	1,70±0,07	1,62±0,10	2,39±0,40	NS	NS	0,038
Σ NI	1,97±0,15	1,43±0,11	3,05±0,03	2,59±0,23	0,004	0,000	NS
Σ AGS	35,46±1,22 ^a	44,97±1,10 ^b	36,40±0,66 ^a	43,91±1,25 ^b	0,000	NS	NS
Σ AGM	13,32±1,01 ^{ac}	26,70±1,78 ^b	16,75±1,10 ^c	26,09±1,44 ^b	0,000	NS	NS
Σ AGP	48,30±0,93 ^a	21,62±0,35 ^b	43,52±1,26 ^c	24,56±0,31 ^b	0,000	NS	0,001
Σ AGT	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,98±0,27 ^b	2,96±0,17 ^b	0,039	0,000	NS
Relación 20:3 n-9/20:4 n-6	0,00±0,00 ^a	0,04±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,03±0,00 ^b	0,000	NS	NS
Relación 16:1 n-7/16:0	0,05±0,01 ^a	0,21±0,01 ^b	0,08±0,00 ^a	0,19±0,03 ^b	0,000	NS	NS
Relación 18:1 n-9/18:0	0,67±0,10	1,05±0,15	0,58±0,05	0,84±0,12	0,012	NS	NS
Relación 20:4 n-6/20:3 n-6	54,91±2,89 ^a	8,52±0,09 ^b	89,43±11,25 ^c	7,72±0,76 ^b	0,000	0,010	0,008
Relación 18:3 n-6/18:2 n-6	0,003±0,001 ^a	0,034±0,004 ^b	0,007±0,000 ^a	0,000±0,000 ^a	0,000	0,000	0,000
Relación AA/AL	1,24±0,05	1,24±0,13	1,52±0,03	1,21±0,04	0,050	NS	NS
Relación DHA/ALA	8,94±1,18 ^a	8,60±0,93 ^a	8,59±0,16 ^a	17,20±2,56 ^b	0,013	0,013	0,008

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; Σ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; ΣAGP: sumatoria de AG poliinsaturados. AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico; DHA: ácido docosahexaenoico; ALA: ácido α-linolénico. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.. El análisis estadístico para para los niveles de los isómeros se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: p < 0,05.

Figura 26- Retención de ácidos grasos *trans* monoénicos en suero

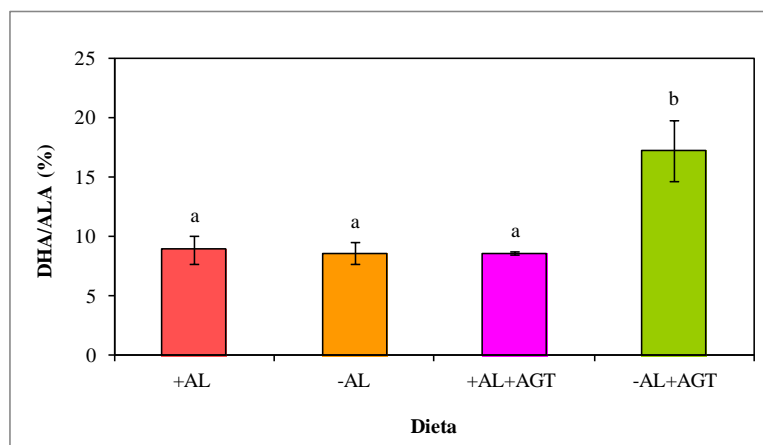
Grupos experimentales: ⁺AL+AGT: enriquecida en ácido linoleico sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: deprivada de ácido linoleico sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico para cada tratamiento dietario se realizó mediante un 1x5 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. El análisis estadístico para cada uno de los grupos entre los diferentes tratamientos dietarios se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

El contenido de AL ha sido disminuido por la deprivación de AL y también por la sustitución con AGT en los animales que recibieron la dieta enriquecida en AL. El producto final de la biosíntesis de AGPI-CL n-6, es decir el AA, se redujo en la misma proporción que el AL por la deprivación de AL, mientras que no mostró diferencia por la sustitución con AGT. Sorprendentemente, los derivados en la vía de biosíntesis de AGPI-CL n-6 que se reflejan en circulación mostraron un perfil muy diferente al del sustrato que le diera origen. Los niveles de GLA mostraron un efecto diferencial en función del tratamiento dietarios así, los grupos ⁻AL y ⁺AL+AGT aumentaron significativamente, mientras que aquellos que recibieron dieta ⁻AL+AGT no presentaron niveles detectables de dicho AG. El DGLA sólo incrementó sus niveles en los animales con deprivación de AL. Otro metabolito, derivado de la vía alternativa de biosíntesis de AGPI-CL n-6, el 11*c*,14*c*-20:2, ha presentado un comportamiento semejante al descrito para el AA, es decir mostró niveles reducidos por la deprivación de AL, sin efecto por la sustitución con AGT.

Los niveles de ALA y su producto final en la biosíntesis de AGPI-CL n-3, es decir DHA, no mostraron efecto por la deprivación de AL, ni por la sustitución con AGT; no obstante, mientras que ambos efectos conjuntos resultaron en una reducción de ALA, los niveles de DHA tendieron a incrementar. Esto resulta en una relación DHA/ALA incrementada en el grupo ⁻AL+AGT (Figura

27). Llamativamente, los niveles de $11c,14c,17c-20:3$ mostraron un aumento por la privación de AL, y este aumento fue más acentuado en el grupo $\bar{AL}+AGT$.

Figura 27- Relación producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en suero



Grupos experimentales: ^+AL : enriquecida en ácido linoleico; \bar{AL} : deprivada de ácido linoleico; ^+AL+AGT : ^+AL sustituida con AGT; $\bar{AL}+AGT$: \bar{AL} sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Los niveles de los AG: $12:0$ y $14:0$ mostraron un efecto significativo por el status de AL y por la sustitución con AGT. Específicamente, la privación de AL incrementó los niveles de ambos AG, pero este incremento fue de menor magnitud cuando se suplementó con AGT. Los niveles de $16:0$ y $18:0$ presentaron valores semejantes independientemente de las variables dietarias.

El contenido de $9c-16:1$, $9c-18:1$ y $11c-18:1$ fue claramente elevado por la privación de AL, pero no por la sustitución con AGT, a excepción del $9c-16:1$ que en la dieta enriquecida en AL incrementó sus niveles. Otro AG detectado en niveles considerables derivado de los AGS es el $22:0$, el cual también fue incrementado por la privación de AL.

Un efecto semejante al de los AG $c-18:1$ fue observado en los derivados metabólicos de los mismos: $8c,11c-20:2$, $5c,8c,11c-20:3$ y en la relación trieno/tetraeno, considerados marcadores de la deficiencia de AGE.

Tabla 8- Composición de ácidos grasos del suero enriquecido en triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad

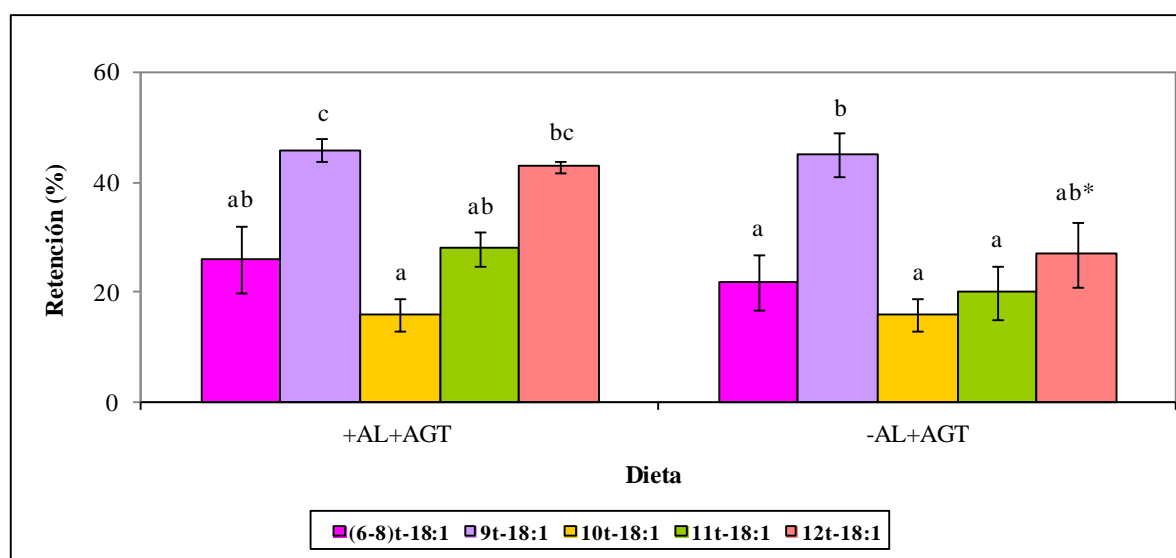
Ácidos Grasos	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+AGT	⁻ AL+ AGT	AL	AGT	AL x AGT
12:0	0,08±0,02 ^a	0,85±0,03 ^b	0,07 ±0,01 ^a	3,47±0,04 ^c	NS	NS	NS
14:0	0,56±0,07 ^a	2,28±0,09 ^b	0,66±0,09 ^a	3,11±0,57 ^b	NS	0,139	0,238
16:0	20,90±0,28	22,59±1,26	19,40±1,07	22,30±0,72	0,027	NS	NS
9 _c -16:1	1,54±0,06 ^a	6,97±0,46 ^b	2,38±0,28 ^a	6,35±0,17 ^b	0,000	NS	0,025
18:0	12,59±1,15	12,37±1,07	11,09±0,51	14,24±0,36	NS	NS	NS
(6-8) <i>t</i> -18:1	-	-	0,43±0,10	0,36±0,07	-	-	-
9 <i>t</i> -18:1	-	-	0,95±0,03	0,93±0,08	-	-	-
10 <i>t</i> -18:1	-	-	0,48±0,11	0,48±0,09	-	-	-
11 <i>t</i> -18:1	-	-	0,78±0,09	0,54±0,13	-	-	-
12 <i>t</i> -18:1	-	-	0,91±0,02	0,59±0,12 [*]	-	-	-
9 _c -18:1	14,17±1,39 ^a	25,30±2,67 ^b	13,22±1,11 ^a	19,00±0,66 ^{ab}	0,000	0,047	NS
11 _c -18:1	1,77±0,05 ^a	3,48±0,18 ^b	1,94±0,21 ^a	2,91±0,30 ^b	0,000	NS	NS
9 _c ,12 _c -18:2	22,87±1,14 ^a	5,02±0,19 ^b	19,22±1,71 ^a	7,40±0,57 ^b	0,000	NS	0,015
6 _c ,9 _c ,12 _c -18:3	0,48±0,10 ^a	0,16±0,03 ^b	0,28±0,03 ^{ab}	0,08±0,01 ^b	0,001	0,027	NS
11 _c -20:1	0,07±0,00 ^a	0,36±0,01 ^b	0,16±0,03 ^c	0,06±0,01 ^a	0,000	0,000	0,000
9 _c ,12 _c ,15 _c -18:3	0,52±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b	0,14±0,01 ^c	0,23±0,02 ^b ^c	0,000	0,013	0,000
9 _c ,11 <i>t</i> -CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,15±0,02 ^b	0,24±0,03 ^c	0,012	0,000	0,012
11 _c ,14 _c -20:2	0,16±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	0,24±0,01 ^c	0,08±0,04 ^d	0,000	0,000	NS

22:0	0,11±0,01 ^a	3,16±0,33 ^b	0,24±0,05 ^a	0,40±0,03 ^a	0,000	0,000	0,000
8c,11c-20:2	0,00±0,00 ^a	0,22±0,01 ^a	0,00±0,00 ^a	2,05±0,16 ^b	0,000	0,000	0,000
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,12±0,05 ^b	0,06±0,00 ^{ab}	0,06±0,00 ^{ab}	0,038	NS	0,021
8c,11c,14c-20:3	0,15±0,02 ^a	0,62±0,09 ^b	0,49±0,04 ^c	0,90±0,05 ^d	0,000	0,000	NS
11c,14c,17c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,18±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	0,35±0,03 ^c	0,000	0,001	0,001
5c,8c,11c,14c-20:4	20,20±1,76 ^a	7,77±1,40 ^b	17,36±0,66 ^a	8,40±0,93 ^b	0,000	NS	NS
5c,8c,11c,14c,17-20:5	0,00±0,00 ^a	0,08±0,01 ^b	0,00±0,00 ^a	0,11±0,01 ^b	0,000	NS	NS
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6	1,40±0,12	1,49±0,18	1,25±0,07	1,89±0,23	0,034	NS	NS
∑ NI	1,78±0,21	1,31±0,19	1,69±0,13	1,61±0,08	NS	NS	NS
∑ AGS	34,24±0,85 ^a	41,25±0,62 ^b	31,46±1,44 ^a	43,52±0,05 ^b	0,000	NS	0,017
∑ AGM	17,55±1,42 ^a	36,11±3,01 ^b	21,25±1,96 ^a	31,22±0,37 ^b	0,000	NS	0,038
∑ AGP	45,78±0,61 ^a	15,66±1,55 ^b	39,19±1,08 ^c	21,79±1,32 ^d	0,000	NS	0,000
∑ AGT	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	3,70±0,33 ^b	3,14±0,50 ^b	NS	0,000	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. ∑ NI: sumatoria de AG no identificados; ∑ AGS: sumatoria de AG saturados; ∑ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; ∑ AGP: sumatoria de AG poliinsaturados. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.. El análisis estadístico para para los niveles de los isómeros se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: p < 0,05.

El hígado secreta TG-VLDL, cuya composición de AG refleja en gran medida la capacidad metabólica del mismo. Así, en suero *post*-inyección de Triton WR 1339, podemos evaluar el perfil de AG e inferir sobre el origen y metabolismo hepático bajo las variables dietarias empleadas. En la tabla 8 se muestra la composición de ácidos grasos del suero enriquecido en TG-VLDL. Como puede observarse, los AGT secretados por el hígado, a excepción del isómero 12*t*-18:1, no mostraron diferencias por la deprivación de AL. No obstante, el análisis individual de la retención de los isómeros *trans* 18:1 mostró un comportamiento diferente en función del isómero considerado, siendo el 9*t*-18:1 el que presentó en ambos grupos la mayor retención (Figura 28). Niveles significativos del isómero 9*c*,11*t*-CLA han sido observados en los animales alimentados con dietas suplementadas con AGT, y los mismos estuvieron más exacerbados en aquellos deprivados en AL.

Figura 28- Retención de ácidos grasos *trans* monoénicos en triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad



Grupos experimentales: ⁺AL+AGT: enriquecida en ácido linoleico sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: deprivada de ácido linoleico sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico para cada tratamiento dietario se realizó mediante un 1x5 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. El análisis estadístico para cada uno de los grupos entre los diferentes tratamientos dietarios se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Los niveles de AL, GLA, 11*c*,14*c*-20:2 y AA estuvieron muy disminuidos por la deprivación de AL, mientras que el DGLA tuvo un efecto opuesto. Los AGT tuvieron un efecto menor y muy diferente que la deprivación de AL en función del AG considerado. Por la presencia

de AGT dietarios, el GLA tendió a disminuir sus niveles, mientras que el DGLA y el 11*c*,14*c*-20:2 incrementaron y no se encontraron diferencias en el contenido de AA.

El contenido de ALA ha disminuído en los grupos $\bar{\text{AL}}$ y $^{+}\text{AL}+\text{AGT}$ vs el grupo ^{+}AL , no obstante en el grupo $\bar{\text{AL}}+\text{AGT}$ se observó un incremento en sus niveles respecto a los animales correspondientes a los grupos $\bar{\text{AL}}$ y $^{+}\text{AL}+\text{AGT}$. No obstante, ningún efecto en el producto final de la biosíntesis de AGPI-CL n-3 ha sido observado por dichos tratamientos. Los productos intermediarios de dicha biosíntesis, el EPA y 11*c*,14*c*,17*c*-20:3, han mostrado un comportamiento llamativo, fundamentalmente por un aumento de sus niveles debido a la deprivación de AL, que en el caso del 11*c*,14*c*,17*c*-20:3 se vio exacerbado en presencia de AGT.

Los niveles de 12:0 mostraron un aumento por la deprivación de AL que fue exacerbado por la presencia de los AGT. El 14:0, los derivados de biosíntesis de novo de AG 9*c*-16:1, 11*c*-18:1 y 9*c*-18:1 han mostrado un marcado incremento por la deprivación de AL, sin modificación por la presencia de AGT. Los niveles de 16:0 y 18:0, pese a tener muy diferentes aportes dietarios en los distintos grupos, no presentaron diferencias en el perfil de AG de los TG-VLDL.

Productos de la elongación y desaturación de AG saturados y monoinsaturados procedentes de la dieta y/o de la biosíntesis *de novo*, mostraron un claro efecto por la deprivación de AL. En forma significativa los niveles de ácido Mead fueron sólo incrementados en el grupo $\bar{\text{AL}}$ vs ^{+}AL , mientras que su precursor (8*c*,11*c*-20:2) estuvo incrementado en ambos grupos deprivados en AL y los mismos fueron exacerbados por los AGT.

I.3- Parámetros relacionados a la regulación del metabolismo de triglicéridos

En virtud de las marcadas modificaciones halladas en los niveles de TG, se profundizó el estudio analizando algunos mecanismos relevantes en su regulación en diferentes tejidos.

I.3.1- Actividad de enzimas lipogénicas en hígado

Para evaluar la síntesis de AG en el hígado se analizó la actividad de tres enzimas lipogénicas que, de diferente manera, cumplen importantes roles en dicho proceso: FAS, EM y G6PDH.

El análisis estadístico ANOVA (2x2) mostró que en la actividad de la enzima FAS sólo la interacción de ambas variables experimentales generó cambios significativos ($p < 0,05$). Sin embargo, para las actividades de las EM y G6PDH, tanto la deprivación de AL, como la presencia de AGT y la interacción de ambas variables tuvieron un efecto significativo ($P < 0,001$). En el análisis estadístico individual puede observarse que, para las tres actividades enzimáticas

estudiadas, la privación de AL aumentó la actividad en relación a sus correspondientes controles (Figura 29).

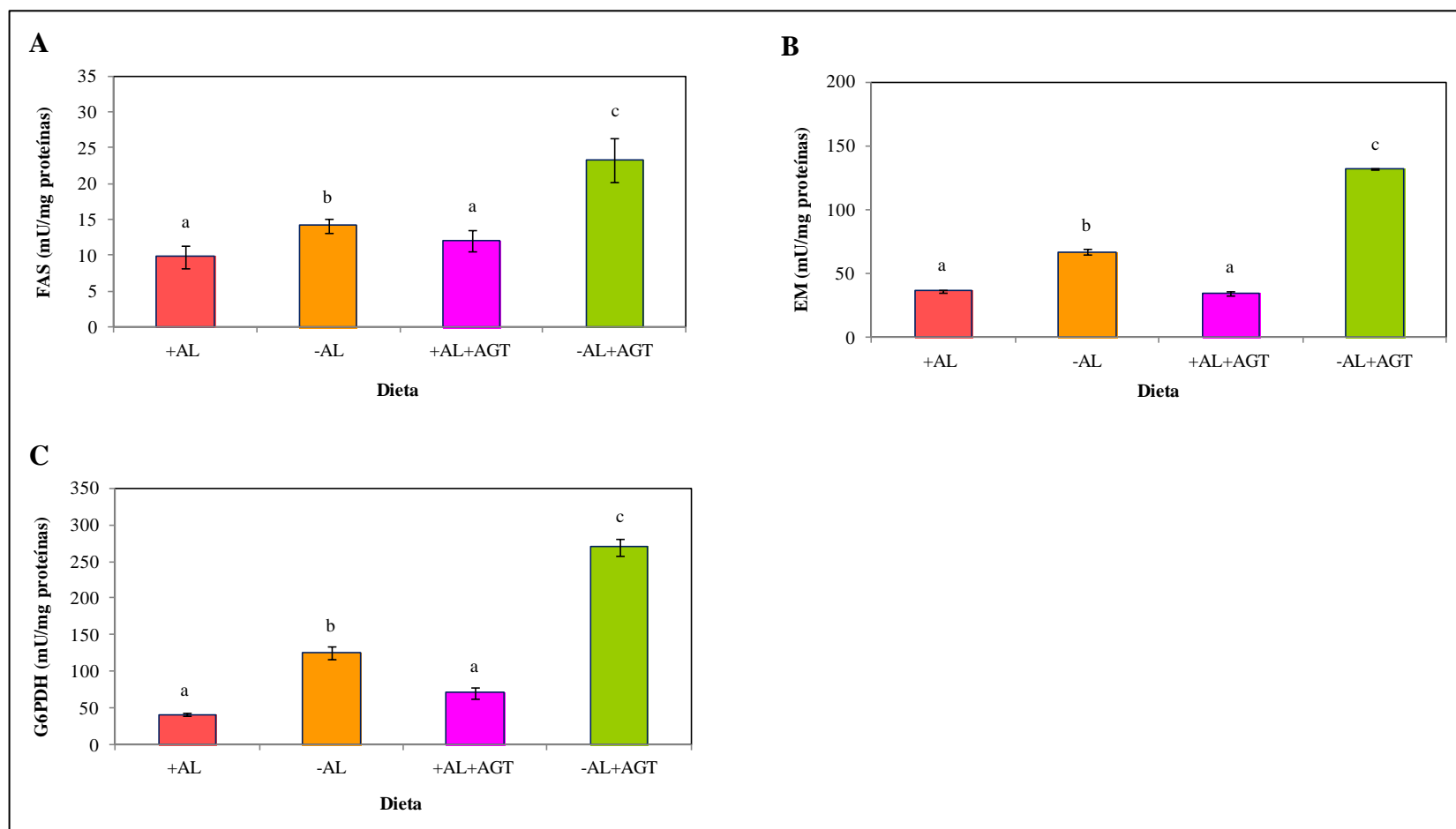
I.3.2- Síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

Las actividades FAS y G6PDH en TAE presentaron cambios tanto por la privación de AL, como por la sustitución con AGT. Mientras que, la actividad EM se vio influenciada por la privación de AL y por la interacción de ésta con los AGT ($p < 0,001$). Individualmente, la actividad de EM y G6PDH estuvieron aumentadas en los grupos privados en AL respecto a sus controles (Figura 30B y 30C), mientras que, para la enzima FAS el aumento alcanzó significancia sólo en el grupo $\bar{AL}+AGT$ vs. el resto de los grupos experimentales (Figura 30A).

Prponemos:

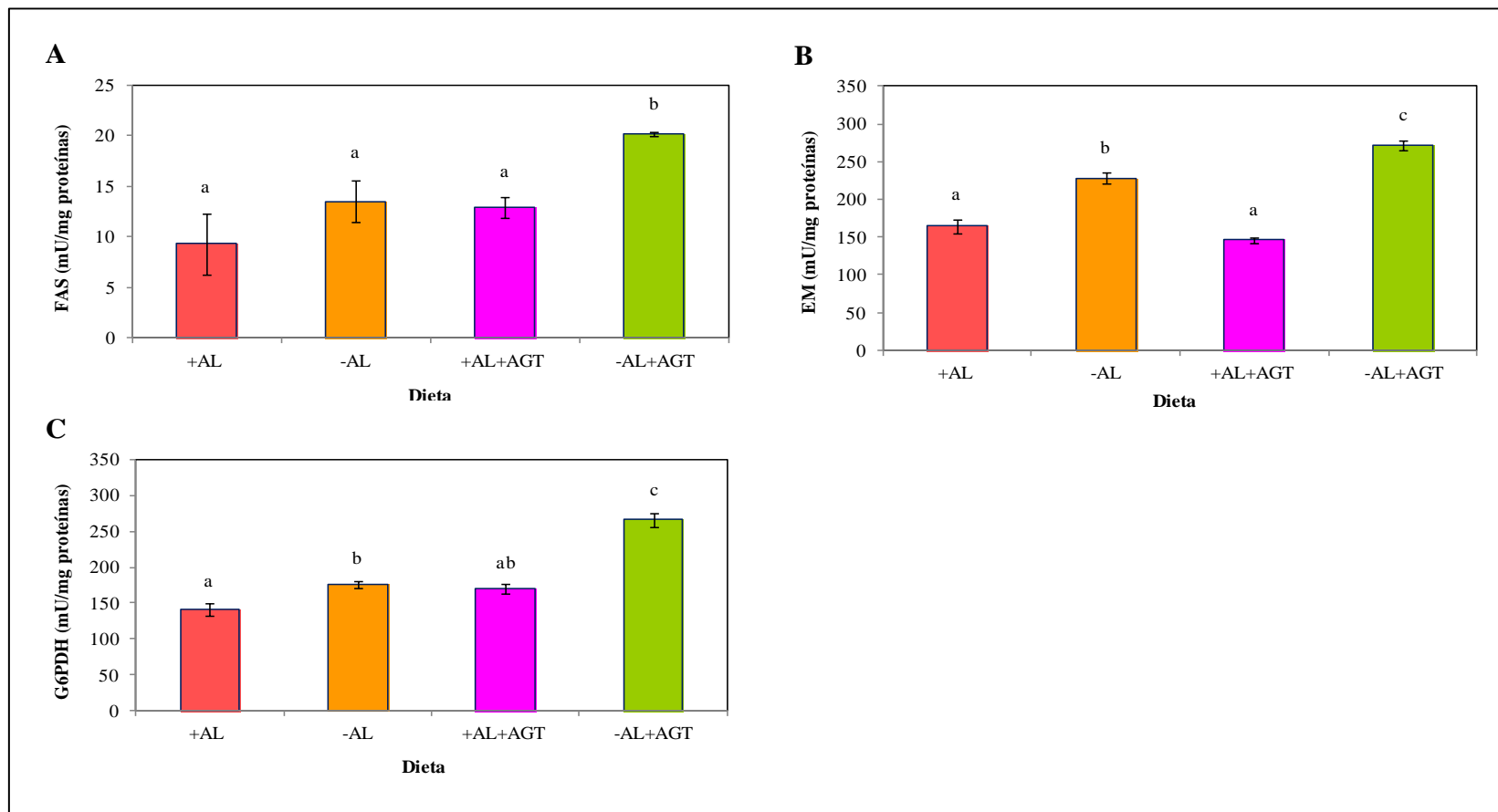
Las actividades EM y G6PDH en TAE presentaron cambios tanto por la privación de AL mientras que las tres enzimas por la interacción de ambas variables,

Individualmente, la actividad de EM y G6PDH estuvieron aumentadas en los grupos privados en AL respecto a sus controles (Figura 30B y 30C), mientras que, para la enzima FAS el aumento alcanzó significancia sólo en el grupo $\bar{AL}+AGT$ vs. el resto de los grupos experimentales (Figura 30A).

Figura 29- Actividad de las enzimas sintasa de ácidos grasos (FAS), málica (EM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en hígado (G6PDH)

Grupos experimentales: +AL: enriquecida en ácido linoleico; -AL: deprivada de ácido linoleico; +AL+AGT: +AL sustituida con AGT; -AL+AGT: -AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 30- Actividad de las enzimas sintasa de ácidos grasos (FAS), málica (EM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en tejido adiposo epididimal

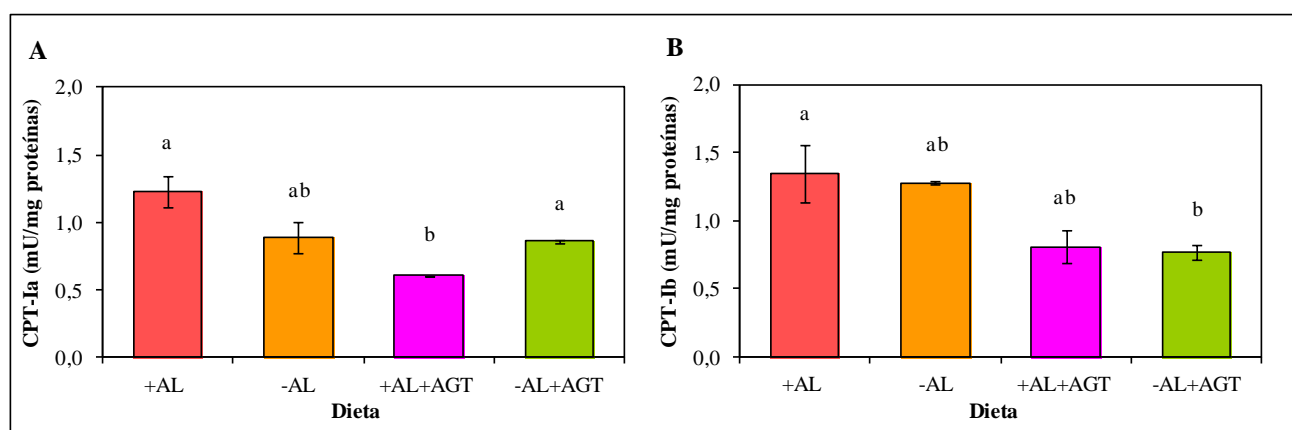


Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

I.3.3- Actividades de enzimas oxidativas de ácidos grasos en hígado y músculo gastrocnemio

Para estimar la oxidación de AG tisulares se evaluó la actividad de la CPT en los principales tejidos oxidativos: hígado (CPT-Ia) y músculo gastrocnemio (CPT-Ib). El análisis estadístico ANOVA (2x2) mostró que tanto en hígado, como en músculo, la capacidad de oxidación estuvo disminuida por la sustitución con AGT ($p < 0,05$ y $p < 0,001$, respectivamente). En el análisis estadístico individual sólo se pudo observar una reducción significativa en la actividad de la enzima CPT-Ia en el grupo ^+AL+AGT respecto al ^+AL (Figura 31A), mientras que en la actividad CPT-Ib sólo una tendencia estuvo presente por efecto de los AGT (Figura 31B).

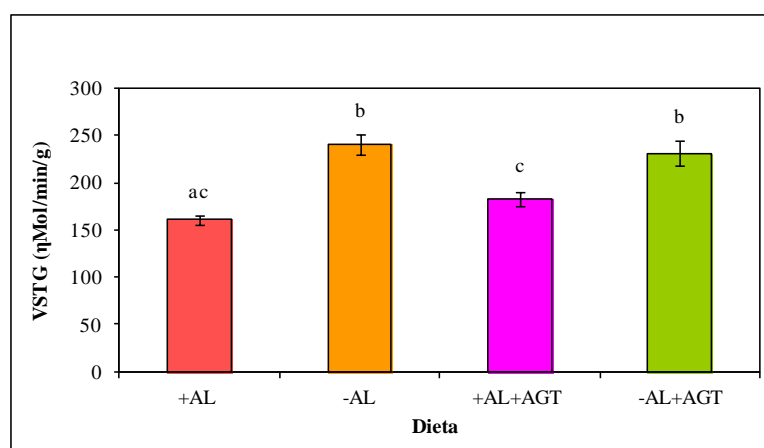
Figura 31- Actividad de las enzimas carnitina palmitoil transferasa-I en hígado (CPT-Ia) y carnitina palmitoil transferasa-I en músculo gastrocnemio (CPT-Ib)



Grupos experimentales: ^+AL : enriquecida en ácido linoleico; ^-AL : deprivada de ácido linoleico; ^+AL+AGT : ^+AL sustituida con AGT; ^-AL+AGT : ^-AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

I.3.4- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos

El análisis estadístico ANOVA (2x2) mostró que la velocidad de secreción hepática de TG (VSTG) estuvo afectada por la deprivación de AL ($p < 0,001$), no así por la presencia de AGT. Las comparaciones no paramétricas mostraron que la VSTG fue aumentada significativamente en el grupo deprivado en AL respecto al control (Figura 32).

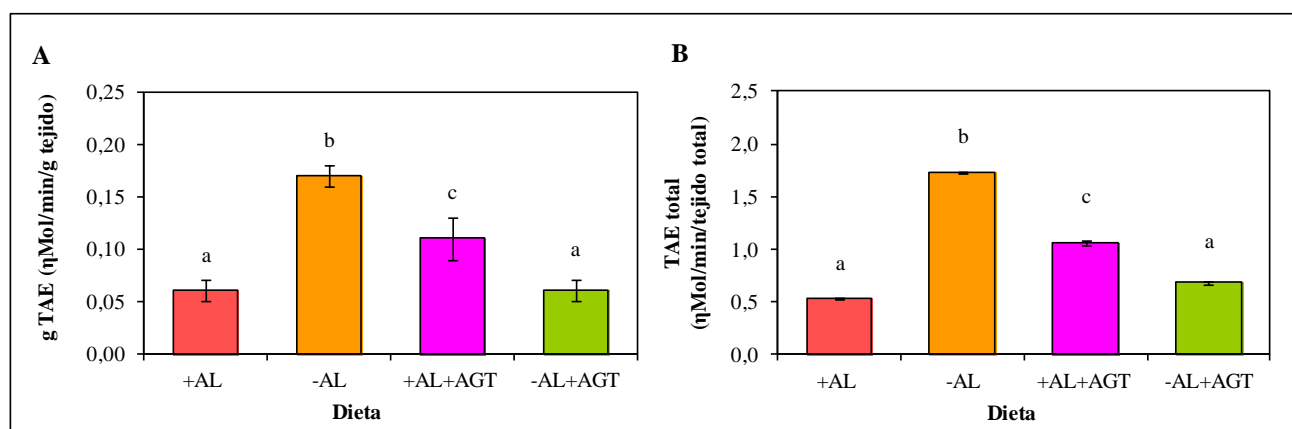
Figura 32- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos (VSTG)

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

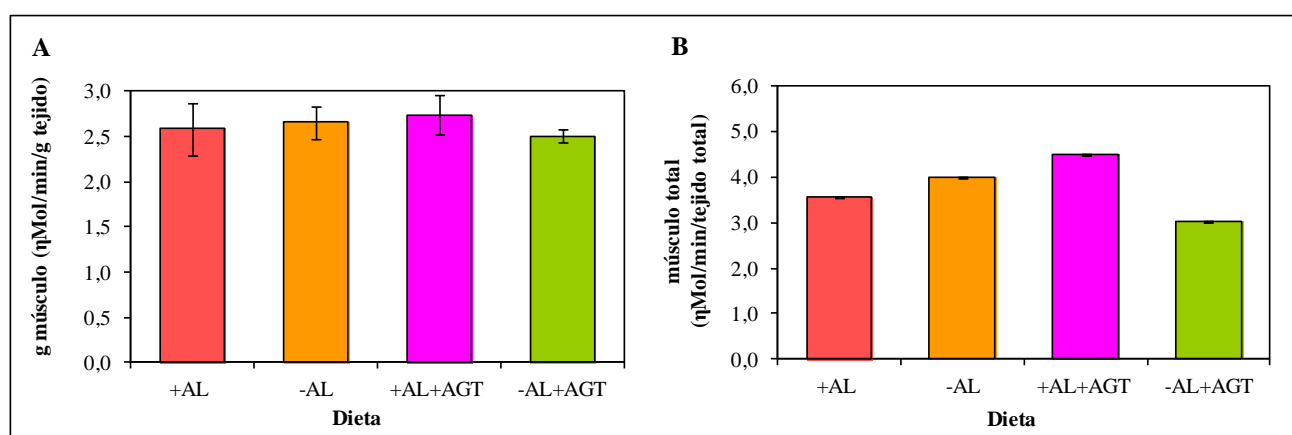
I.3.5- Remoción de triglicéridos séricos: actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio

En el análisis estadístico ANOVA (2x2) de la actividad de la enzima LPL en TAE, independientemente de la forma en que se la exprese: por g de tejido (η Mol/min/g tejido) o en el tejido total (η Mol/min/tejido total), se observó un efecto tanto por la deprivación de AL ($p < 0,05$), como por la presencia de AGT ($p < 0,05$). En las comparaciones individuales, en los grupos ⁻AL y ⁺AL+AGT la actividad enzimática estuvo significativamente aumentada respecto al grupo ⁺AL. Sorprendentemente, el efecto de ambas variables no fue aditivo, más aún se observó una reducción en el grupo ⁻AL+AGT vs. ⁻AL y vs. ⁺AL+AGT (Figuras 33).

En músculo gastrocnemius, la actividad de la enzima LPL, expresada tanto por g de tejido (η Mol/min/g tejido), como por músculo total, no se vio afectada por ninguno de los tratamientos dietarios (Figura 34).

Figura 33- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal (TAE)

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 34- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA.

I.4- Expresión del ARNm de biomoduladores del metabolismo lipídico/inflamatorio en tejido adiposo epididimal

Para profundizar el estudio del metabolismo lipídico se evaluó la expresión del ARNm de dos adipocinas claves que, de diferente manera, regulan el metabolismo de los lípidos: leptina y adiponectina. En el análisis estadístico individual puede observarse que la expresión del ARNm de la leptina fue reducida significativamente en los grupos ⁻AL y ⁺AL+AGT respecto al control, mientras que, un efecto opuesto ha sido evidenciado en la expresión del mensajero de la adiponectina. La acción conjunta de deprivación de AL y sustitución con AGT no mostró un efecto aditivo para ambas adipocinas (Tabla 9).

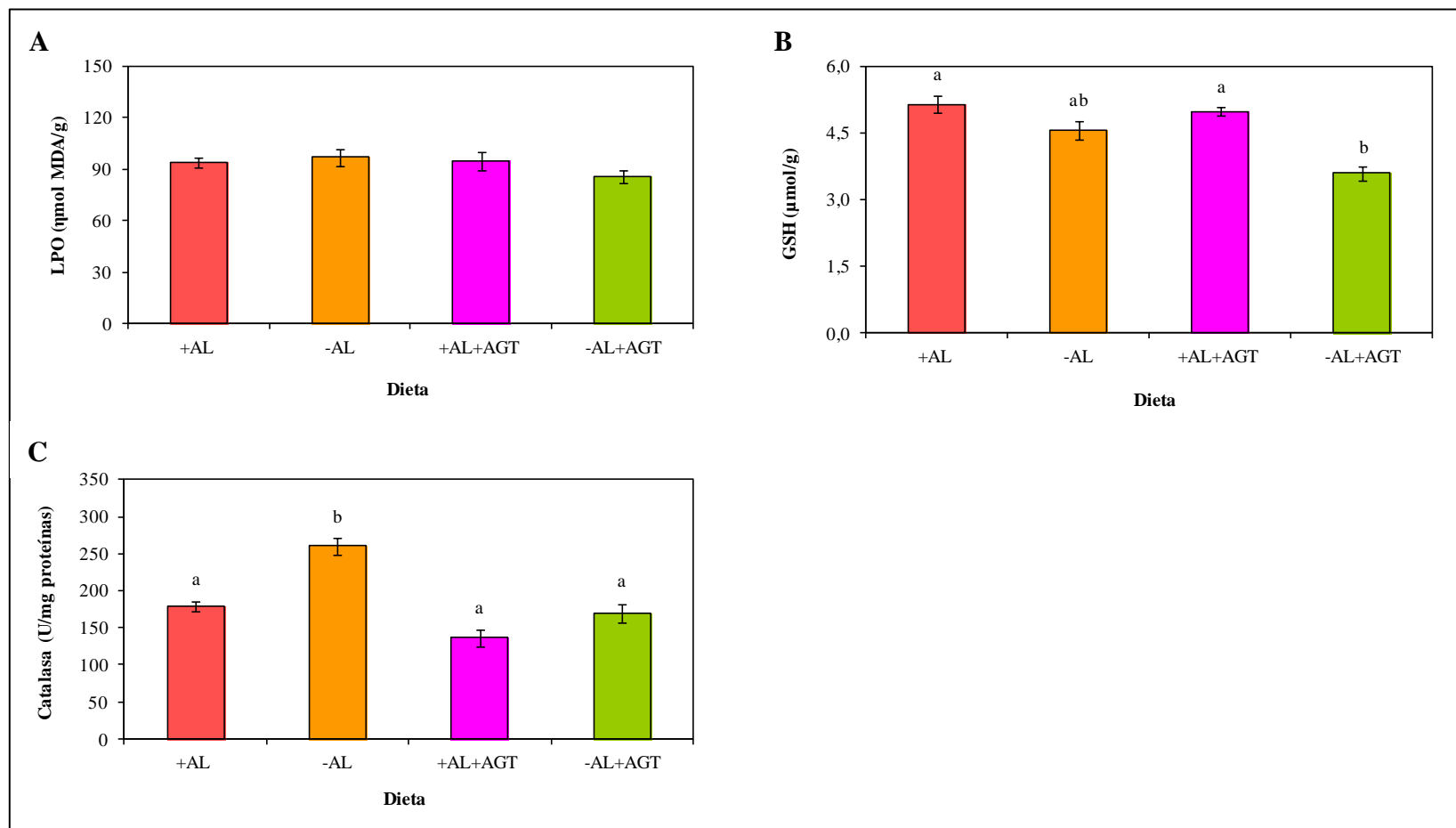
Con el propósito de evaluar algunos parámetros relacionados a la respuesta inflamatoria producida por los diferentes tratamientos dietarios, se cuantificó la expresión del mensajero de la IL1- β , IL6 y TNF- α . La expresión del mensajero del TNF- α estuvo significativamente disminuida en el grupo $\bar{A}L$ respecto al $^+A L$, y la sustitución en este grupo con AGT no modificó dichos niveles. La expresión de IL1- β en tejido adiposo disminuyó tanto por la deprivación de AL, como por la sustitución con AGT. Mientras que la IL6 frente al grupo $^+A L$ incrementó en el grupo $\bar{A}L$ y la sustitución con AGT normalizó dichos valores (Tabla 9).

I.5- Expresión de marcadores inflamatorios en hígado

La expresión génica del TNF- α en tejido hepático mostró una reducción estadísticamente significativa en el grupo $\bar{A}L+AGT$ vs. $^+A L+AGT$. Los niveles de ARNm de IL1- β estuvieron reducidos en ambos grupos deprivados en AL en comparación con sus respectivos grupos controles y la sustitución con AGT exacerbó dicho efecto. Por último, la expresión del ARNm de la IL6 estuvo disminuida significativamente en ambos grupos suplementados con AGT vs. sus correspondientes controles (Tabla 10).

I.6- Estrés oxidativo hepático

El estrés oxidativo fue evaluado a través del grado de LPO. El análisis estadístico ANOVA (2x2) mostró que la LPO no estuvo modificada por la deprivación de AL, ni por la sustitución con AGT. En las defensas antioxidantes, se observó que tanto los niveles de GSH, como la actividad de la enzima catalasa se vieron afectados por la deprivación de AL ($p < 0,001$) y por la sustitución con AGT ($p < 0,01$). El análisis estadístico individual mostró que los niveles de GSH no estuvieron modificados por los AGT, mientras que, la actividad de la enzima catalasa se vio marcadamente aumentada en el grupo $\bar{A}L$ frente a los otros grupos experimentales (Figura 35).

Figura 35- Grado de lipoperoxidación (LPO), niveles de glutatión (GSH) y actividad de la enzima catalasa en hígado

Grupos experimentales: +AL: enriquecida en ácido linoleico; -AL: deprivada de ácido linoleico; +AL+AGT: +AL sustituida con AGT; -AL+AGT: -AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Tabla 9- Niveles de ARNm de biomoduladores del metabolismo lipídico/inflamatorio en tejido adiposo epididimal

Niveles de expresión ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL +AGT	⁻ AL+AGT	AL	AGT	AL x AGT
Leptina	1,00±0,07 ^a	0,13±0,02 ^b	0,19±0,05 ^b	0,68±0,12 ^b	0,023	NS	0,000
Adiponectina	1,00±0,10 ^a	1,65±0,14 ^b	1,86±0,09 ^b	0,98±0,17 ^a	NS	NS	0,000
TNF- α	1,00±0,02 ^a	0,67±0,03 ^b	0,74±0,07 ^{ab}	0,59±0,08 ^b	0,002	0,021	NS
IL1- β	1,00±0,10 ^a	0,52±0,06 ^b	0,52±0,05 ^b	0,83±0,10 ^{ab}	NS	NS	0,000
IL6	1,00±0,08 ^a	1,38±0,05 ^b	1,24±0,08 ^{ab}	1,01±0,09 ^a	NS	NS	0,002

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. TNF- α : factor de necrosis tumoral- α ; IL1- β : interleuquina 1- β ; IL6: interleuquina 6. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Tabla 10- Niveles de ARNm de biomoduladores inflamatorio en hígado

Niveles de expresión ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL +AGT	⁻ AL+AGT	AL	AGT	AL x AGT
TNF- α	1,00±0,06 ^{ab}	0,77±0,18 ^b	1,37±0,02 ^a	0,62±0,02 ^b	0,000	NS	0,031
IL1- β	1,00±0,08 ^a	0,49±0,09 ^b	0,65±0,03 ^{ab}	0,28±0,02 ^c	0,000	0,000	NS
IL6	1,00±0,17 ^a	0,86±0,05 ^a	0,22±0,03 ^b	0,44±0,07 ^c	NS	0,000	0,006

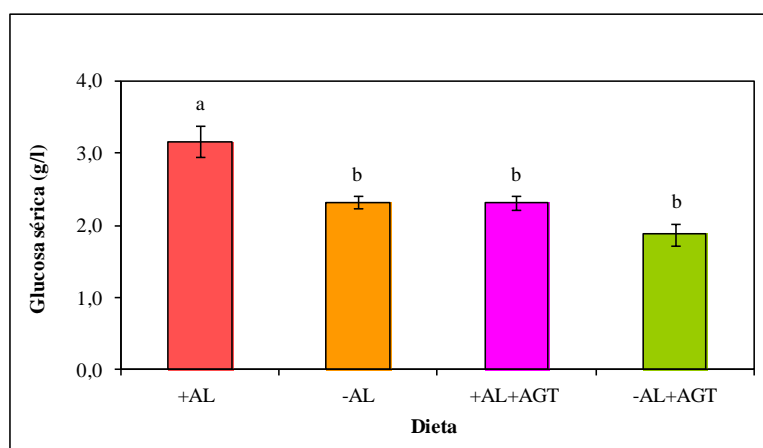
Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. TNF- α : factor de necrosis tumoral- α ; IL1- β : interleuquina 1- β ; IL6: interleuquina 6. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

I.7- Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa

Dado que algunas de las alteraciones lipídicas observadas podrían estar asociadas a alteraciones en el metabolismo de la glucosa, principalmente en músculo esquelético, se estudiaron los niveles séricos de glucosa, como así también la captación, incorporación y oxidación de la glucosa, y síntesis de glucógeno en músculo sóleo, en condiciones basales (B) y bajo dos efectores clave: insulina (+I) y palmitato (+P).

La concentración de glucosa en suero fue modificada tanto por la deprivación de AL, como por la sustitución con AGT ($p < 0,001$). En el análisis estadístico individual, los grupos $^{-}$ AL y $^{+}$ AL+AGT mostraron una disminución significativa en los niveles respecto al grupo control (Figura 36).

Figura 36- Niveles de glucosa sérica



Grupos experimentales: $^{+}$ AL: enriquecida en ácido linoleico; $^{-}$ AL: deprivada de ácido linoleico; $^{+}$ AL+AGT: $^{+}$ AL sustituida con AGT; $^{-}$ AL+AGT: $^{-}$ AL sustituida con AGT. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

En las Tablas 11 - 14 se muestra la capacidad de captación, incorporación, oxidación de la glucosa, y síntesis de glucógeno del músculo soleo en condiciones basales y en presencia de efectores: insulina, palmitato e insulina + palmitato.

En la tabla 11 se muestra la capacidad de captación del músculo soleo en condiciones basales y en presencia de efectores: insulina, palmitato e insulina + palmitato (+I+P). En condiciones basales, la captación de glucosa tendió a incrementar en los grupos $^{-}$ AL y $^{+}$ AL+AGT en comparación con el grupo $^{+}$ AL, y alcanzó significancia estadística en el grupo $^{-}$ AL+AGT. Independientemente del tratamiento dietario, la incubación de los músculos en presencia de insulina incrementó la captación de glucosa frente a los respectivos valores basales. No obstante respecto al

grupo ^+AL , la misma tendió a decrecer en los grupos ^-AL , ^+AL+AGT y ^-AL+AGT . Estos cambios se tornan más evidentes cuando expresamos la respuesta a la insulina como incremento de su valor basal (+I/B), denotando diferencias significativas en los grupos ^+AL+AGT y ^-AL+AGT vs. el grupo ^+AL . La adición de palmitato no produjo una significativa inhibición de la captación de glucosa, no obstante, se perdieron las diferencias entre los distintos grupos dietarios existentes en condiciones basales. Esto se refleja en la falta de diferencias en la respuesta de la captación de glucosa relativa a las condiciones basales (+P/B). La adición de palmitato en presencia de insulina (+I+P), denota una inhibición parcial, pero significativa de la estimulación por la insulina (+I) en los grupos ^+AL , ^-AL y ^-AL+AGT , pero no en el grupo ^+AL+AGT . La respuesta frente al valor basal de la adición de palmitato en presencia de insulina (+I+P/B), respecto al grupo ^+AL , tendió a disminuir en el grupo ^+AL+AGT y alcanzó diferencias significativas en los grupos ^-AL y ^-AL+AGT .

Tabla 11- Captación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato

	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	^+AL	^-AL	^+AL+AGT	^-AL+AGT	AL	AGT	AL x AGT
B	1,88±0,05 ^a	2,22±0,17 ^{ab}	2,21±0,03 ^{ab}	2,39±0,07 ^b	0,024	0,024	NS
+I	5,30±0,15 [*]	4,75±0,35 [*]	4,40±0,20 [*]	4,82±0,22 [*]	NS	NS	NS
+P	1,96±0,09	1,96±0,07	2,09±0,10	2,18±0,12	NS	NS	NS
+I+P	3,88±0,07 ^{ab*#}	3,37±0,09 ^{a*#}	4,19±0,14 ^{b*}	3,56±0,21 ^{ab*#}	0,002	NS	NS
+I/B	2,82±0,10 ^a	2,18±0,19 ^{ab}	1,99±0,11 ^b	2,03±0,15 ^b	NS	0,006	0,036
+P/B	1,05±0,07	0,90±0,06	0,94±0,06	0,91±0,02	NS	NS	NS
+I+P/B	2,07±0,07 ^a	1,55±0,11 ^{bc}	1,90±0,08 ^{ab}	1,49±0,08 ^c	0,000	NS	NS

Grupos experimentales: ^+AL : enriquecida en ácido linoleico; ^-AL : deprivada de ácido linoleico; ^+AL+AGT : ^+AL sustituida con AGT; ^-AL+AGT : ^-AL sustituida con AGT. B: condiciones basales; +I: con el agregado de insulina; +P: con el agregado de palmitato. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM, n = 4 por grupo. El análisis estadístico para cada una de las condiciones experimentales entre los distintos grupos se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido de test de Scheffe. Valores en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($p < 0,05$). El análisis estadístico entre las diferentes condiciones experimentales en cada uno de los grupos se realizó mediante un test t de student. Diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) de las condiciones +I, +P y +I+P frente a las condiciones basales (B) se representan mediante *, y de +I+P frente a +I con #.

La incorporación de glucosa (Tabla 12) en condiciones basales fue similar en todos los grupos, y fue estimulada por la adición de insulina. En forma semejante a los resultados de captación de glucosa, respecto al grupo ^+AL , la incorporación de glucosa en presencia de insulina tendió a decrecer en los grupos ^-AL , ^+AL+AGT y ^-AL+AGT , y este efecto se hace más evidente en

la respuesta a la insulina (+I/B), donde se alcanzan diferencias estadísticamente significativas. Así también, la adición de palmitato no ejerció un efecto inhibitorio sobre la incorporación de glucosa frente a los resultados basales. La adición de palmitato en presencia de insulina (+I+P) inhibió en forma parcial, pero significativa, el efecto sobre la incorporación de glucosa observado por la adición de insulina (+I) en los grupos ⁺AL, ⁻AL y ⁻AL+AGT, pero no en el grupo ⁺AL+AGT. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los distintos grupos dietarios, como tampoco en la respuesta relativa al valor basal (+I+P/B).

Tabla 12- Incorporación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato

	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+AGT	⁻ AL+AGT	AL	AGT	AL x AGT
B	2,02±0,09	2,18±0,15	2,35±0,14	2,36±0,03	NS	0,049	NS
+I	5,33±0,19*	4,21±0,26*	4,40±0,23*	4,72±0,17*	NS	NS	NS
+P	2,01±0,12	1,78±0,15	2,20±0,08	2,25±0,16	NS	0,028	NS
+I+P	3,40±0,24*#	3,23±0,07*#	4,05±0,17*	3,55±0,20*#	NS	0,020	NS
+I/B	2,67±0,17 ^a	1,94±0,12 ^b	1,88±0,11 ^b	2,00±0,10 ^b	0,039	0,016	0,007
+P/B	1,00±0,05	0,83±0,10	0,95±0,08	0,95±0,06	NS	NS	NS
+I+P/B	1,71±0,18	1,49±0,07	1,75±0,16	1,50±0,08	NS	NS	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. B: condiciones basales; +I: con el agregado de insulina; +P: con el agregado de palmitato. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM, n = 4 por grupo. El análisis estadístico para cada una de las condiciones experimentales entre los distintos grupos se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido de test de Scheffe. Valores en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). El análisis estadístico entre las diferentes condiciones experimentales en cada uno de los grupos se realizó mediante un test t de student. Diferencias estadísticas significativas (p < 0,05) de las condiciones +I, +P y +I+P frente a las condiciones basales (B) se representan mediante *, y de +I+P frente a +I con #.

Como puede observarse en la Tabla 13, en condiciones basales, ni la deprivación de AL, ni la sustitución con AGT modificaron la capacidad de oxidación de la glucosa en el músculo soleo. La adición de insulina en el medio de incubación incrementó este parámetro en los grupos ⁺AL y ⁻AL+AGT, y esto se denota claramente en la elevada relación +I/B. La adición de palmitato solo redujo la oxidación de la glucosa en el grupo ⁺AL+AGT frente a los valores basales. La adición de palmitato en el medio de incubación con insulina (+I+P) en los grupos ⁺AL y ⁻AL+AGT, inhibió significativamente el efecto de la insulina (+I), y no modificó los escasos efectos de la insulina observados previamente en los demás grupos experimentales.

Tabla 13- Oxidación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato

	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+AGT	⁻ AL+AGT	AL	AGT	AL x AGT
B	0,40±0,06	0,46±0,08	0,47±0,14	0,52±0,10	NS	NS	NS
+I	1,08±0,03 ^{a*}	0,43±0,10 ^b	0,58±0,13 ^c	1,01±0,08 ^{ac*}	NS	NS	0,000
+P	0,28±0,04 ^a	0,40±0,03 ^a	0,06±0,02 ^{b*}	0,32±0,08 ^a	NS	NS	NS
+I+P	0,39±0,02 [#]	0,40±0,10	0,46±0,18	0,49±0,04 [#]	NS	NS	NS
+I/B	2,51±0,19 ^a	1,12±0,31 ^b	1,46±0,31 ^b	1,75±0,29 ^{ab}	NS	NS	0,035
+P/B	0,84±0,20 ^a	1,18±0,42 ^a	0,16±0,07 ^b	0,73±0,30 ^{ab}	NS	NS	NS
+I+P/B	1,23±0,34	0,91±0,20	1,19±0,42	1,03±0,17	NS	NS	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. B: condiciones basales; +I: con el agregado de insulina; +P: con el agregado de palmitato. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM, n = 4 por grupo. El análisis estadístico para cada una de las condiciones experimentales entre los distintos grupos se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido de test de Scheffe. Valores en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). El análisis estadístico entre las diferentes condiciones experimentales en cada uno de los grupos se realizó mediante un test t de student. Diferencias estadísticas significativas (p < 0,05) de las condiciones +I, +P y +I+P frente a las condiciones basales (B) se representan mediante *, y de +I+P frente a +I con #.

La síntesis de glucógeno en músculo soleo (Tabla 14) no mostró diferencias significativas en los diferentes tratamientos dietarios bajo condiciones basales. El agregado de insulina incrementó significativamente, y en distinta medida, dicho parámetro en todos los grupos dietarios, conduciendo a valores inferiores en los grupos ⁻AL, ⁺AL+AGT y ⁻AL+AGT respecto al grupo ⁺AL. La incubación del músculo soleo en presencia de palmitato produjo ligeros efectos sobre la síntesis de glucógeno. Específicamente, sólo se observó una reducción de dicho parámetro en el grupo ⁻AL respecto al valor basal. La adición de palmitato en presencia de insulina (+I+P) atenuó la estimulación de la síntesis de glucógeno observada por esta hormona en los grupos ⁺AL y ⁻AL+AGT y éste efecto inhibitorio del palmitato no fue observado en los animales de los grupos ⁻AL y ⁻AL+AGT.

Tabla 14- Síntesis de glucógeno en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato

	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+AGT	⁻ AL+AGT	AL	AGT	AL x AGT
B	0,45±0,02	0,50±0,07	0,54±0,09	0,47±0,05	NS	NS	NS
+I	2,00±0,06 ^{a*}	1,09±0,07 ^{b*}	1,33±0,06 ^{b*}	1,23±0,10 ^{b*}	0,004	0,000	0,000
+P	0,48±0,03	0,39±0,04	0,45±0,02	0,37±0,04	0,031	NS	NS
+I+P	0,90±0,03 ^{*#}	0,81±0,10 [*]	1,31±0,18 [*]	0,83±0,08 ^{*#}	0,024	NS	NS
+I/B	4,45±0,17 ^a	2,27±0,20 ^b	2,58±0,26 ^b	2,67±0,10 ^b	0,000	0,002	0,000
+P/B	1,08±0,11	0,81±0,12	0,87±0,09	0,82±0,11	NS	NS	NS
+I+P/B	2,01±0,05	1,63±0,06	2,65±0,55	1,91±0,40	NS	NS	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+AGT: ⁺AL sustituida con AGT; ⁻AL+AGT: ⁻AL sustituida con AGT. B: condiciones basales; +I: con el agregado de insulina; +P: con el agregado de palmitato. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM, n = 4 por grupo. El análisis estadístico para cada una de las condiciones experimentales entre los distintos grupos se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido de test de Scheffe. Valores en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). El análisis estadístico entre las diferentes condiciones experimentales en cada uno de los grupos se realizó mediante un test t de student. Diferencias estadísticas significativas (p < 0,05) de las condiciones +I, +P y +I+P frente a las condiciones basales (B) se representan mediante *, y de +I+P frente a +I con #.

PARTE II

Efecto de la sustitución parcial con conjugados del ácido linoleico a dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico

De manera similar que para los AGT en la Parte I de los Resultados, en el caso de los CLA se consideraron dos variables independientes, específicamente: a) los niveles de AL según cual fuera el aceite fuente de la grasa dietaria (maíz -enriquecido en AL- y coco hidrogenado -deprivado en AL-) y b) presencia o no de CLA (con o sin sustitución parcial con aceite rico en CLA).

II.1- Parámetros nutricionales

II.1.1- Consumo de alimento e ingesta energética

En todos los grupos experimentales, las dietas fueron bien aceptadas, sin manifestarse rechazo o resistencia a la ingesta de las mismas. En la Tabla 15 puede observarse un equivalente consumo medio diario de alimento, sin diferencias significativas por la deprivación de AL, por la presencia de CLA, ni por la interacción de ambos. Dado que las dietas son isocalóricas, la ingesta energética media tampoco mostró diferencias estadísticas.

La absorción aparente de grasas en el análisis estadístico ANOVA (2x2) mostró diferencias significativas tanto por la deprivación de AL, como por la sustitución con CLA. Las comparaciones no paramétricas mostraron que la deprivación de AL, en presencia o ausencia de CLA aumentó la absorción aparente de grasa dietaria respecto al grupo ⁺AL.

II.1.2- Ganancia de peso y composición corporal

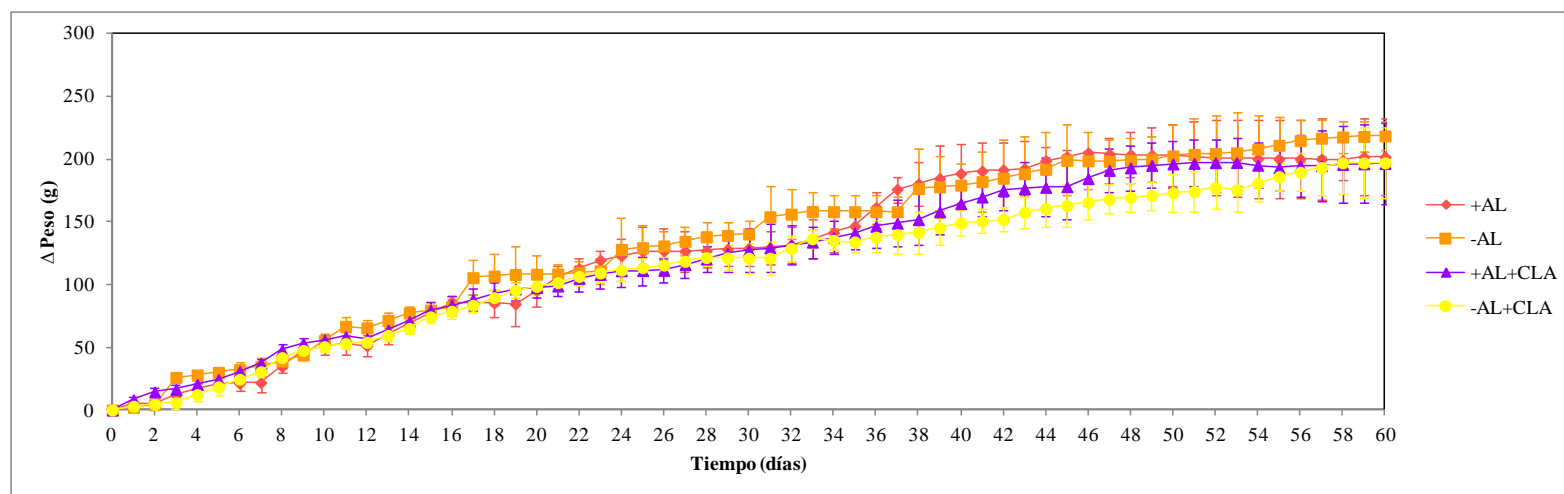
Desde el inicio hasta el final del período experimental se observó un continuo incremento del peso corporal en los animales (Figura 37). La ganancia de peso durante el total de la experiencia (ΔP_{60-0}) mostró diferencias únicamente debido a la sustitución con CLA ($p < 0,05$), sin observarse cambios por la deprivación de AL ($p = 0,170$). El análisis estadístico individual en el incremento de peso entre los días 0 y 60 (ΔP_{60-0}) (Figura 38), no mostró diferencias significativas entre los grupos.

El contenido porcentual de grasas, proteínas y agua en la carcasa no mostró diferencias estadísticas por la deprivación de AL o por la sustitución con CLA (Tabla 15).

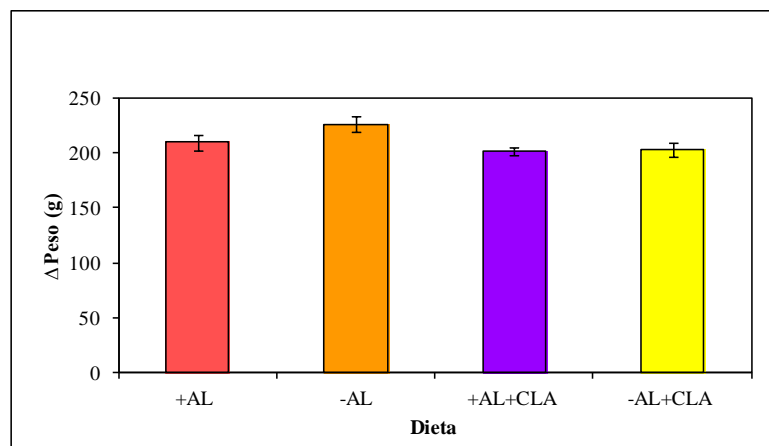
Tabla 15- Consumo de alimento, ingesta energética, absorción aparente de la grasa dietaria y composición de carcasa

	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+CLA	⁻ AL+CLA	AL	CLA	AL x CLA
Consumo de alimento (g/día)	17,71±0,50	18,70±0,35	18,80±1,22	18,16±0,76	NS	NS	NS
Ingesta energética (kJ/día)	293,32±8,29	310,02±5,97	312,00±20,40	300,86±12,84	NS	NS	NS
Ingesta de grasa (g/día)	1,27±0,04	1,38±0,05	1,38±0,09	1,45±0,07	NS	NS	NS
Grasa fecal (mg/día)	27,12±0,80 ^a	18,80±1,22 ^b	24,77±2,40 ^a	15,59±2,86 ^b	0,00	NS	NS
Grasa fecal/Grasa ingerida (%)	2,24±0,05 ^a	1,38±0,10 ^{bc}	1,82±0,09 ^{ab}	1,07±0,15 ^c	0,000	0,003	NS
Absorción aparente de grasa dietaria (%)	97,76±0,04 ^a	98,62±0,10 ^{bc}	98,18±0,09 ^{ab}	98,23±0,15 ^c	0,000	0,003	NS
Composición de carcasa (%)							
Grasa	16,08±0,60	17,29±0,55	16,95±0,41	15,13±0,80	NS	NS	NS
Proteínas	20,85±0,83	21,75±0,28	21,44±0,26	20,33±0,81	NS	NS	NS
Agua	58,52±0,65	56,88±0,73	55,72±0,81	58,91±0,75	NS	NS	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 37- Evolución de la ganancia de peso diaria

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo.

Figura 38- Ganancia de peso entre los días experimentales 0 y 60 (ΔP_{60-0})

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

II.1.3- Retención energética corporal y eficiencia energética

En las Figuras 39 se muestran la RETC, REGC, REPC y EE del alimento, las cuales no arrojaron cambios en el análisis estadístico.

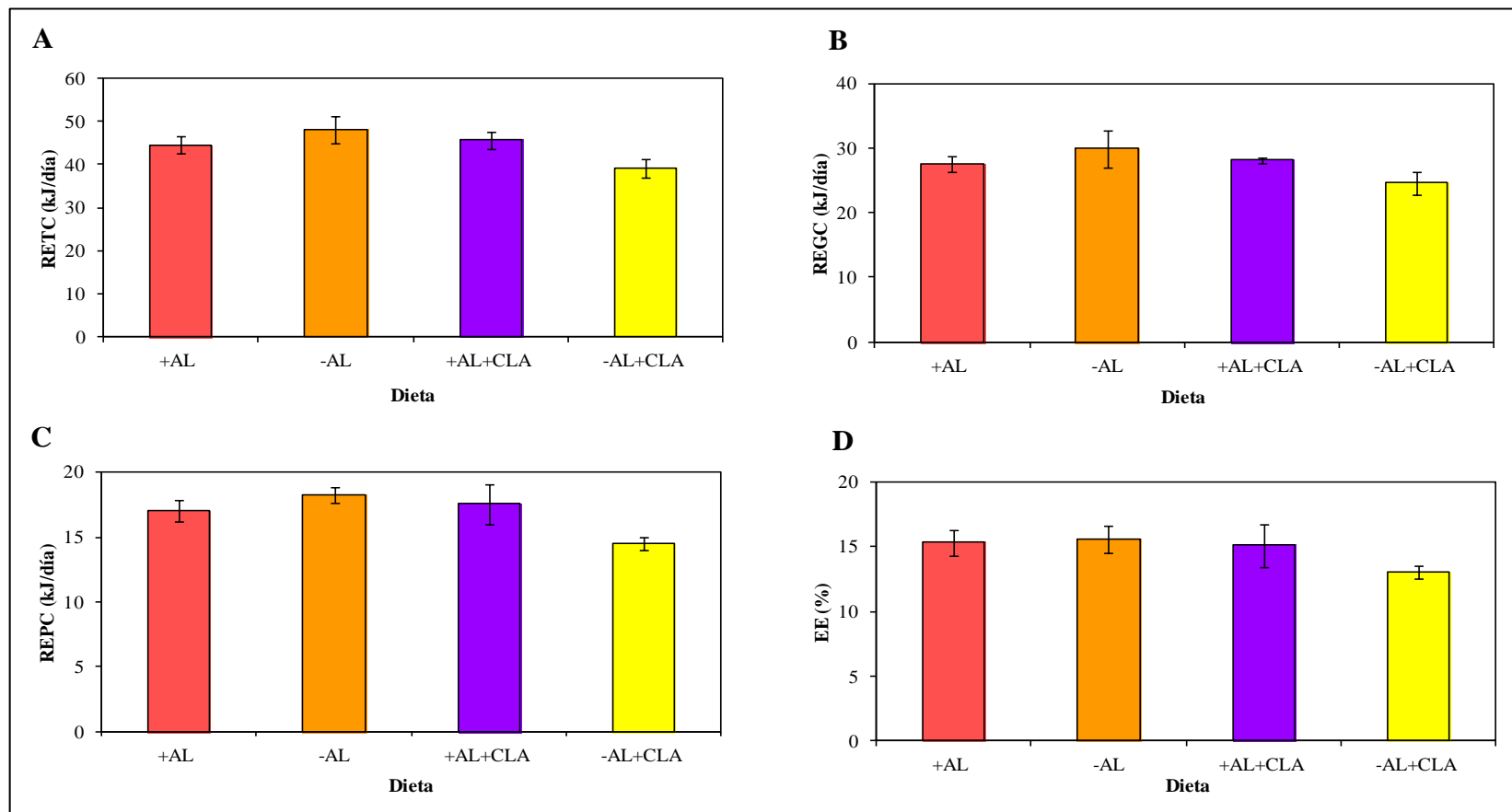
II.1.4- Pesos de hígado, tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal, y músculo gastrocnemio

El análisis de varianza mostró que el peso absoluto del hígado, fue significativamente afectado por la privación de AL, pero no por la sustitución con CLA ($p = 0,299$). Cuando se lo expresó relativo al peso corporal se observó el mismo comportamiento al descrito para el peso hepático absoluto. El análisis estadístico individual mostró, en ambas formas de expresión, una disminución significativa en el grupo \bar{AL} respecto al ^+AL , y un aumento en el grupo $\bar{AL}+CLA$ respecto al \bar{AL} (Figura 40).

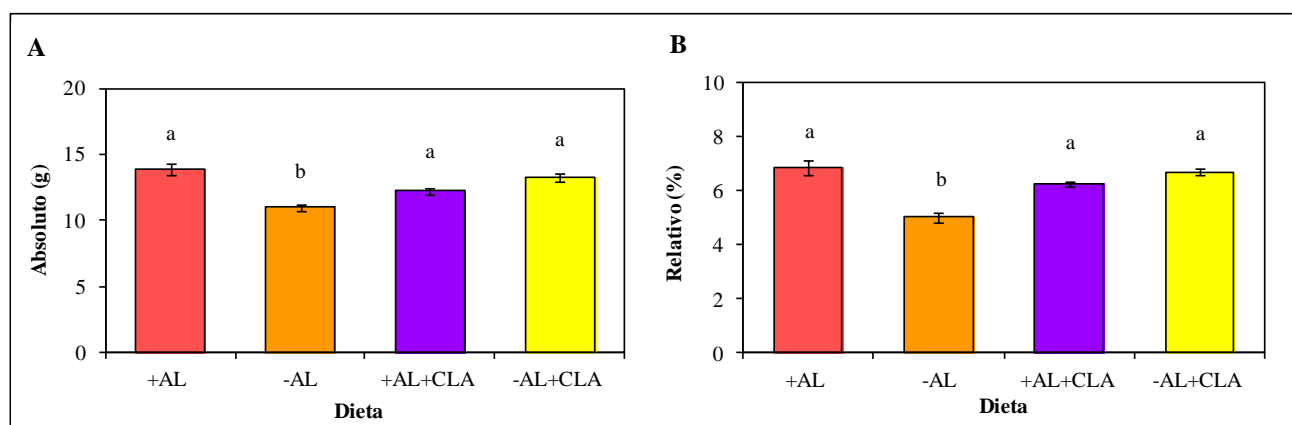
En el análisis 2x2 ANOVA, los pesos del TAE y TARP, tanto absolutos como relativos al peso corporal, mostraron un efecto significativo por la sustitución con CLA ($p < 0,05$). La privación de AL solo tuvo efecto en el TARP para ambas formas de expresión ($p < 0,01$). Las comparaciones no paramétricas mostraron, que en ambas formas de expresión, el grupo $\bar{AL}+CLA$ disminuyó significativamente su peso respecto a los demás grupos experimentales (Figuras 41 y 42).

Tanto el peso absoluto como el relativo del músculo gastrocnemio, no fueron modificados por los tratamientos realizados (privación de AL y sustitución con CLA) (Figura 43).

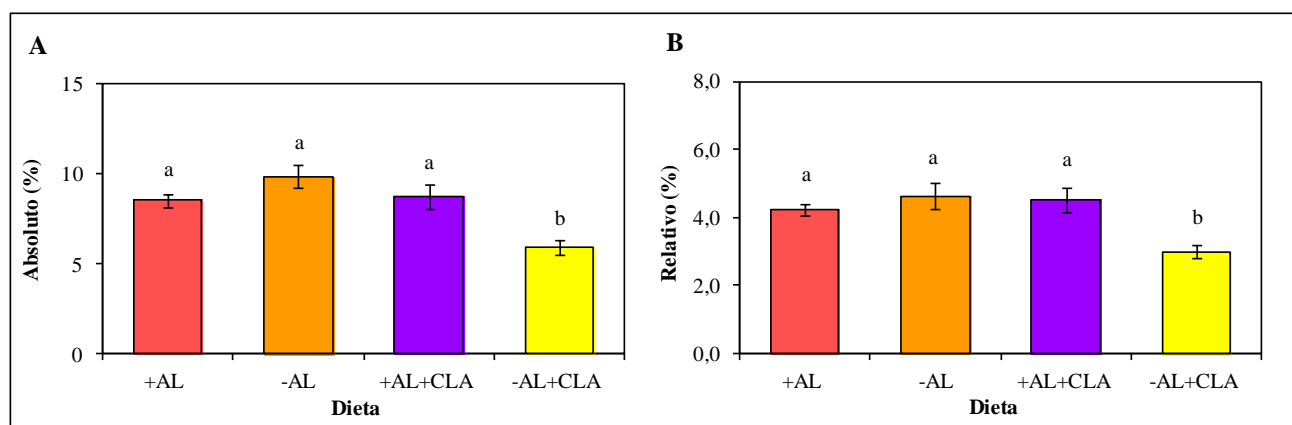
Figura 39- Retención energética total corporal diaria (RETC), retención energética de grasa corporal diaria (REGC), retención energética de proteínas corporales diaria (REPC), eficiencia energética del alimento (EE)



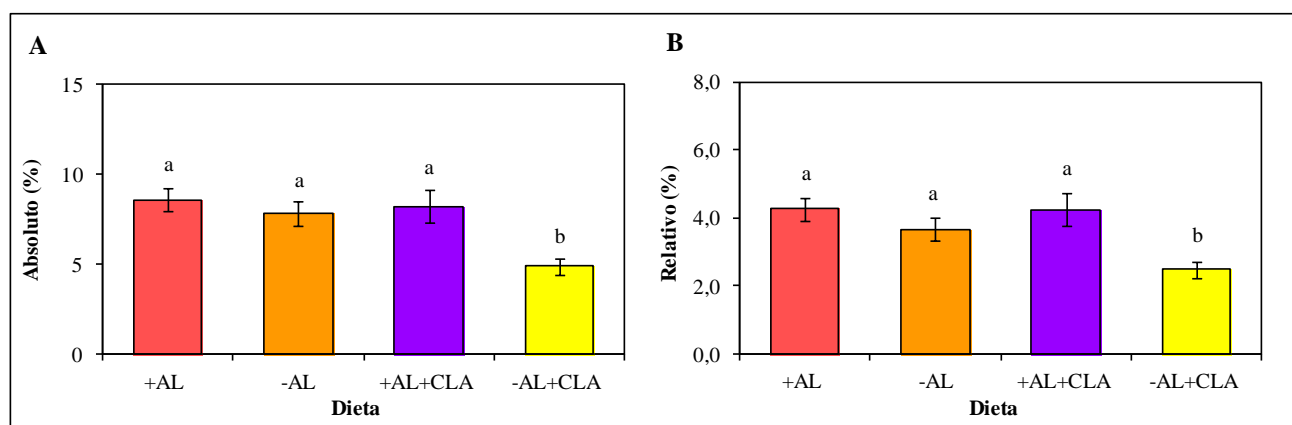
Grupos experimentales: +AL: enriquecida en ácido linoleico; -AL: deprivada de ácido linoleico; +AL+CLA: +AL sustituida parcialmente con CLA; -AL+CLA: -AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 40- Peso del hígado

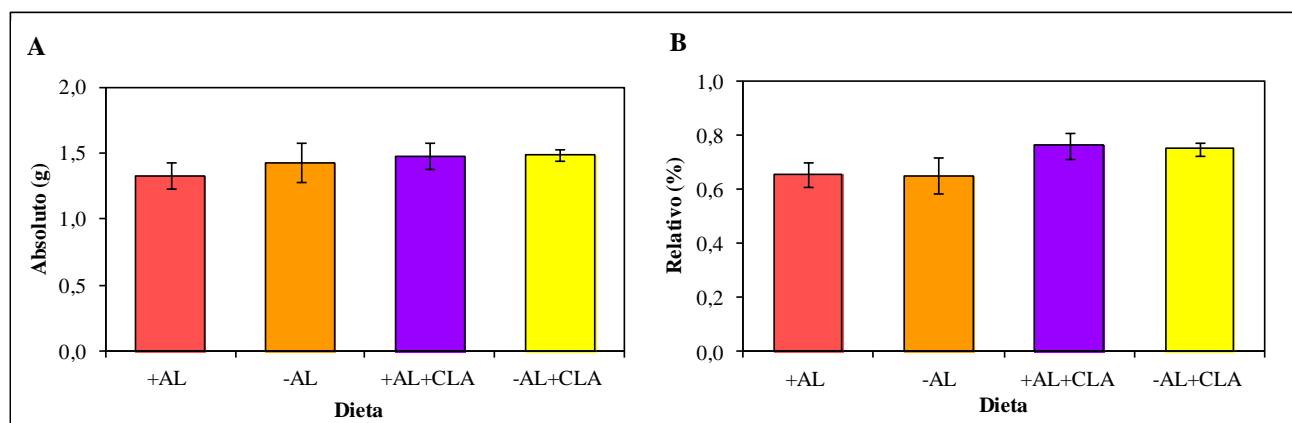
Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 41- Peso del tejido adiposo epididimal

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 42- Peso del tejido adiposo retroperitoneal

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 43- Peso del músculo gastrocnemio

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

II.2- Parámetros lipídicos

II.2.1- Niveles séricos de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol

En las comparaciones individuales se observó que ambos grupos deprivados en AL redujeron significativamente los niveles de TG circulantes respecto a sus correspondientes controles (Figura 44A).

Las concentraciones de FL séricos mostraron diferencias estadísticas por la privación de AL y por los CLA. Así, los grupos \bar{AL} y $^{+}AL+CLA$ mostraron una reducción significativa respecto al grupo control, sin observarse un efecto aditivo de ambas variables (Figura 44B).

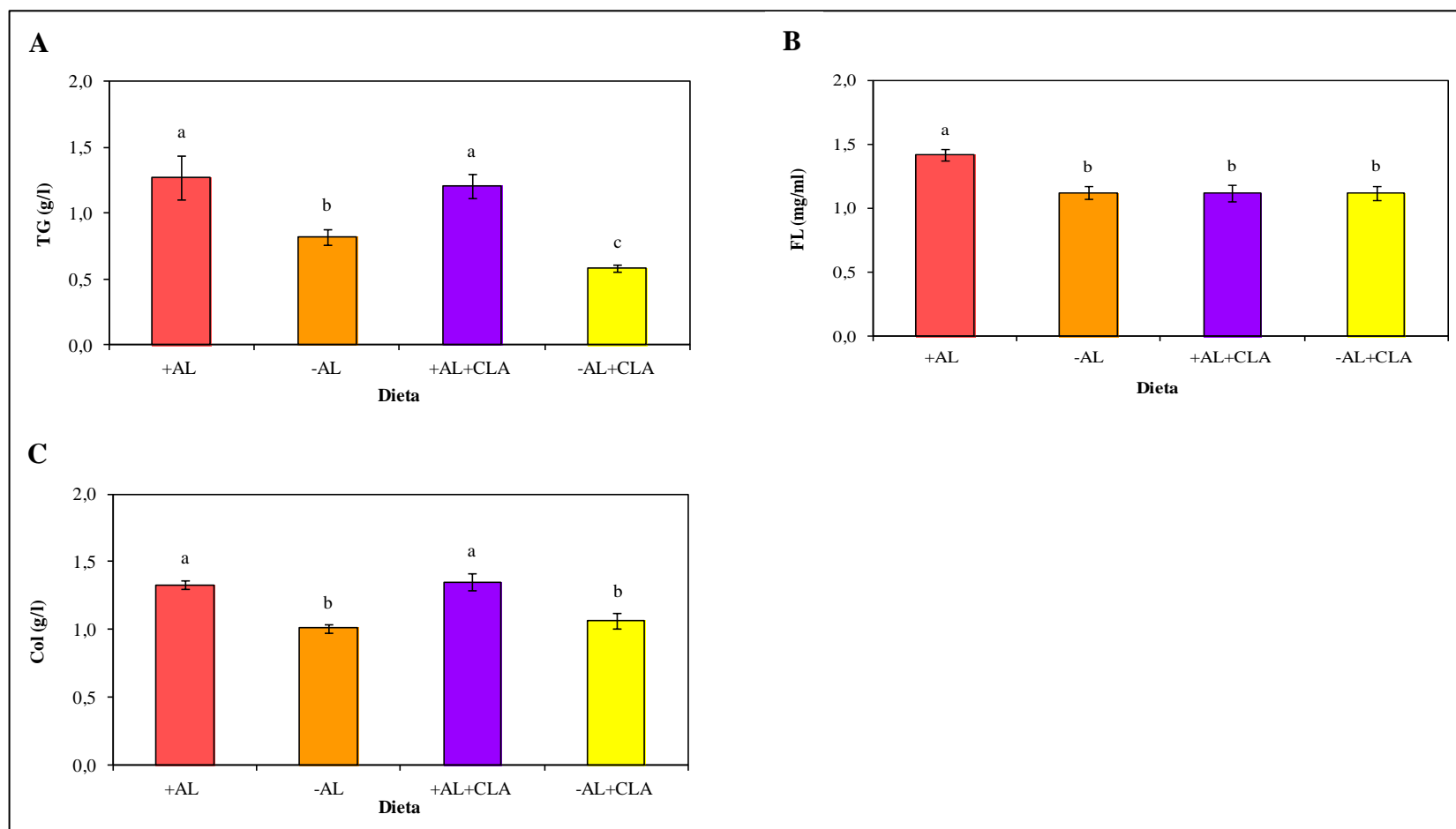
Para las concentraciones de Col sérico, el análisis de varianza mostró diferencias significativas por la privación de AL ($p < 0,001$), mostrando una disminución tanto en el grupo \bar{AL} vs ^{+}AL , como para el grupo $\bar{AL}+CLA$ vs. $^{+}AL+CLA$ (Figura 44C).

II.2.2- Contenido hepático de triglicéridos, fosfolípidos y colesterol

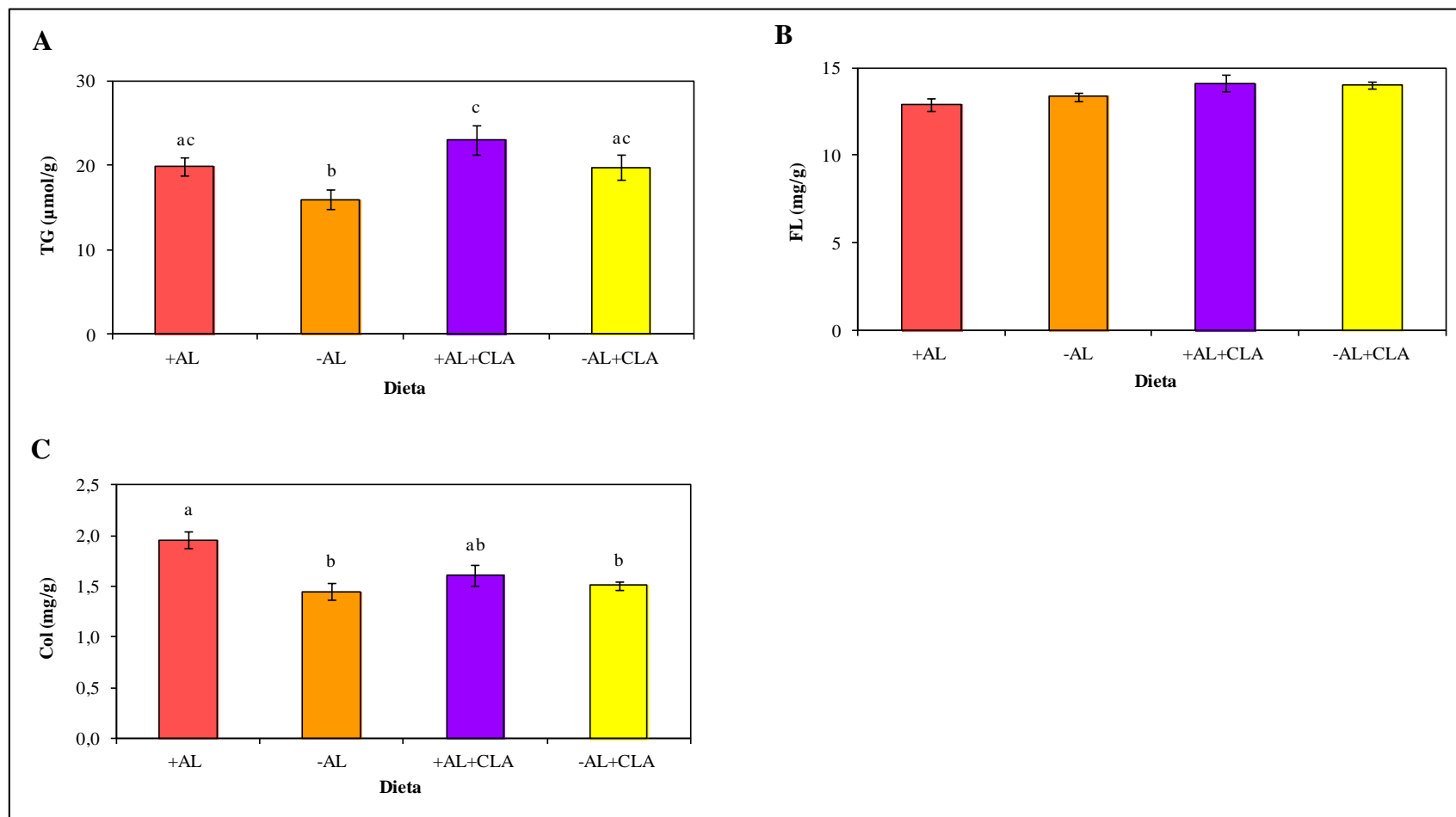
El contenido de TG fue reducido en el grupo \bar{AL} vs. ^{+}AL y la sustitución parcial con CLA en el grupo \bar{AL} restauró los niveles de TG a valores comparables a los del grupo ^{+}AL (Figura 45A).

El contenido hepático de FL no fue afectado estadísticamente por ninguno de los tratamientos (Figura 45B).

El contenido de Col hepático fue afectado por la privación de AL ($p < 0,001$) pero no por la sustitución con CLA ($p = 0,203$). En la figura 45C puede observarse que, en el grupo \bar{AL} , los niveles estuvieron reducidos en forma estadísticamente significativa respecto al control.

Figura 44- Niveles séricos de triglicéridos (TG), fosfolípidos (FL) y colesterol (Col)

Grupos experimentales: +AL: enriquecida en ácido linoleico; -AL: deprivada de ácido linoleico; +AL+CLA: +AL sustituida parcialmente con CLA; -AL+CLA: -AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 45- Niveles hepáticos de triglicéridos (TG), fosfolípidos (FL) y colesterol (Col)

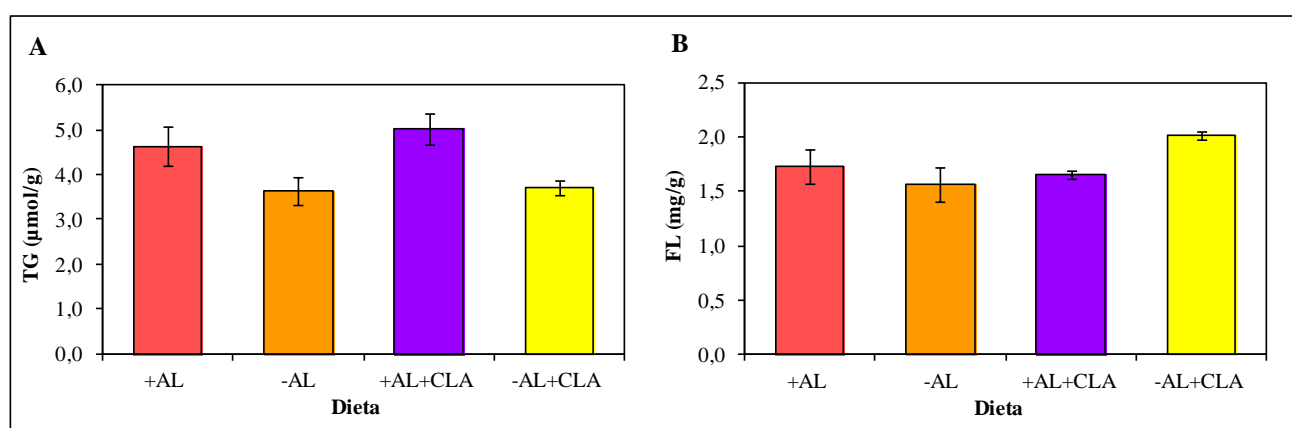
Grupos experimentales: +AL: enriquecida en ácido linoleico; -AL: deprivada de ácido linoleico; +AL+CLA: +AL sustituida parcialmente con CLA; -AL+CLA: -AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

II.2.3- Contenido muscular de triglicéridos y fosfolípidos

Si bien en el análisis de varianza, el contenido muscular de TG presentó cambios estadísticos por la deprivación de AL ($p < 0,01$), las comparaciones individuales para dicho parámetro no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 46A).

Los niveles de FL musculares no mostraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables estudiadas (Figura 46B).

Figura 46- Niveles musculares de triglicéridos (TG) y fosfolípidos (FL)



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

II.2.4- Composición de ácidos grasos en hígado, tejido adiposo, músculo, suero y triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad

En las tablas 16 - 20 puede observarse que los dos isómeros CLA proporcionados con la dieta son incorporados y además produjeron diversos cambios en el perfil de AG en hígado, TAE, músculo gastrocnemio, suero post-prandial y suero enriquecido en TG-VLDL. Se describen con mayor profundidad los AG más relevantes a nivel metabólico y/o cuantitativo.

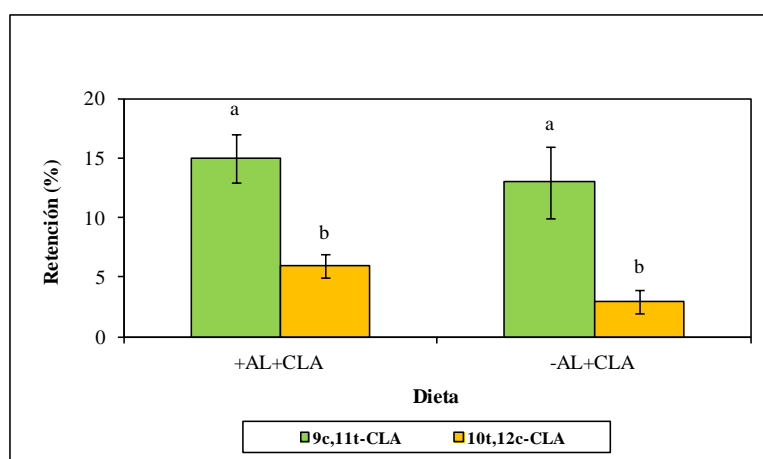
En la Tabla 16 se presenta la composición relativa de AG en hígado de los animales con dietas enriquecidas o deprivadas en AL, suplementados o no con CLA. Como puede observarse, los CLA fueron incorporados en forma semejante y significativa tanto en los animales enriquecidos con AL como en aquellos deprivados en AL. Sin embargo, la retención de CLA en hígado presentó diferencias en función del isómero considerado. En la Figura 47 puede observarse que, independientemente de los niveles de AL, la retención del isómero 9*c*,11*t*-CLA fue mayor que la del 10*t*,12*c*-CLA.

Tabla 16- Composición de ácidos grasos en hígado

Ácidos Grasos	Grupos experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+CLA	⁻ AL+CLA	AL	CLA	AL x CLA
12:0	0,00±0,00 ^a	0,59±0,14 ^b	0,00±0,00 ^a	0,31±0,04 ^{ab}	0,000	NS	NS
14:0	0,70±0,07 ^a	2,14±0,18 ^b	1,03±0,09 ^a	2,01±0,20 ^b	0,000	NS	NS
16:0	23,76±0,76	24,46±0,99	27,45±0,64	27,34±1,19	NS	0,003	NS
9c-16:1	2,74±0,05 ^a	5,96±0,40 ^b	3,91±0,72 ^{ab}	5,52±0,32 ^b	0,000	NS	NS
18:0	9,59±0,40 ^a	15,53±0,66 ^b	11,20±0,54 ^a	17,15±0,75 ^b	0,000	0,016	NS
9c-18:1	18,69±1,33 ^{ab}	16,89±0,62 ^{bc}	14,58±0,60 ^c	14,08±0,80 ^c	NS	0,001	NS
11c-18:1	3,72±0,20 ^a	6,15±0,41 ^b	3,97±0,23 ^a	5,65±0,30 ^b	0,000	NS	NS
9c,12c-18:2	21,19±0,63 ^a	5,13±0,20 ^b	15,78±1,27 ^c	7,40±0,52 ^b	0,000	NS	0,000
6c,9c,12c-18:3	0,33±0,09 ^a	0,10±0,01 ^b	0,19±0,03 ^{ab}	0,00±0,00 ^b	0,000	0,020	NS
11c-20:1	0,16±0,01 ^a	0,12±0,01 ^{ab}	0,11±0,01 ^b	0,00±0,00 ^c	0,000	0,000	0,003
9c,12c,15c-18:3	0,29±0,03 ^a	0,12±0,01 ^b	0,15±0,02 ^b	0,07±0,01 ^b	0,000	0,008	0,007
9c,11t-CLA	-	-	0,86±0,13	0,89±0,07	-	-	-
10t,12c-CLA	-	-	0,33±0,04	0,23±0,03	-	-	-
11c,14c-20:2	0,34±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	0,18±0,02 ^c	0,25±0,01 ^c	0,000	0,006	0,000
C 22:0	0,17±0,03 ^a	3,61±0,33 ^b	0,16±0,01 ^a	2,09±0,10 ^c	0,000	0,000	0,001
8c,11c-20:2	0,00±0,00 ^a	0,22±0,04 ^b	0,00±0,00 ^a	0,43±0,05 ^c	0,000	0,005	0,005
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,27±0,04 ^b	0,00±0,00 ^a	0,22±0,03 ^b	0,000	NS	NS
8c,11c,14c-20:3	0,47±0,04 ^{ac}	1,15±0,16 ^b	0,37±0,04 ^c	0,96±0,04 ^b	0,000	NS	NS
11c,14c,17c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,29±0,06 ^b	0,00±0,00 ^a	0,23±0,01 ^b	0,000	NS	NS

5c,8c,11c,14c-20:4	13,82±0,67 ^a	10,90±0,57 ^b	14,81±0,76 ^a	8,71±0,47 ^b	0,000	NS	0,026
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6	1,69±0,10 ^{ac}	3,12±0,18 ^b	1,72±0,19 ^c	3,73±0,21 ^b	0,000	NS	NS
Σ NI	1,74±0,19 ^a	1,63±0,19 ^a	2,71±0,22 ^b	1,44±0,18 ^a	0,003	NS	0,010
Σ AGS	34,39±0,44 ^a	49,94±0,92 ^b	39,84±0,71 ^c	48,90±0,85 ^b	0,000	0,000	0,044
Σ AGM	25,31±1,45 ^{ab}	29,12±1,07 ^a	22,57±0,89 ^b	25,25±1,18 ^{ab}	0,006	0,009	NS
Σ AGP	38,13±1,42 ^{ac}	21,25±1,02 ^b	34,39±1,04 ^c	23,12±0,95 ^b	0,000	NS	0,035
Σ CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,19±0,14 ^b	1,12±0,08 ^b	NS	0,000	NS
Relación 20:3 n-9/20:4 n-6	0,00±0,00 ^a	0,03±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,03±0,00 ^b	0,000	NS	NS
Relación 16:1 n-7/16:0	0,12±0,00 ^a	0,24±0,01 ^b	0,14±0,02 ^{ac}	0,20±0,01 ^{bc}	0,000	NS	0,025
Relación 18:1 n-9/18:0	1,96±0,17 ^a	1,10±0,09 ^b	1,32±0,10 ^b	0,83±0,07 ^b	0,000	0,001	NS
Relación 20:4 n-6/20:3 n-6	30,64±3,19 ^a	10,03±1,06 ^b	41,66±4,12 ^a	9,06±0,37 ^b	0,000	NS	0,039
Relación 18:3 n-6/18:2 n-6	0,016±0,004 ^a	0,020±0,001 ^a	0,012±0,001 ^a	0,00±0,00 ^b	NS	0,000	0,005
Relación AA/AL	0,65±0,03 ^a	2,13±0,09 ^b	0,97±0,11 ^{ac}	1,20±0,10 ^c	0,000	0,003	0,000
Relación DHA/ALA	5,92±0,46 ^a	26,22±2,06 ^b	11,45±1,69 ^a	68,03±4,11 ^c	0,000	0,000	0,000

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; Σ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ AGP: sumatoria de AG poliinsaturados. AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico; DHA: ácido docosahexaenoico; ALA: ácido α-linolénico. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.. El análisis estadístico para para los niveles de los isómeros se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: p < 0,05.

Figura 47- Retención de isómeros CLA en hígado

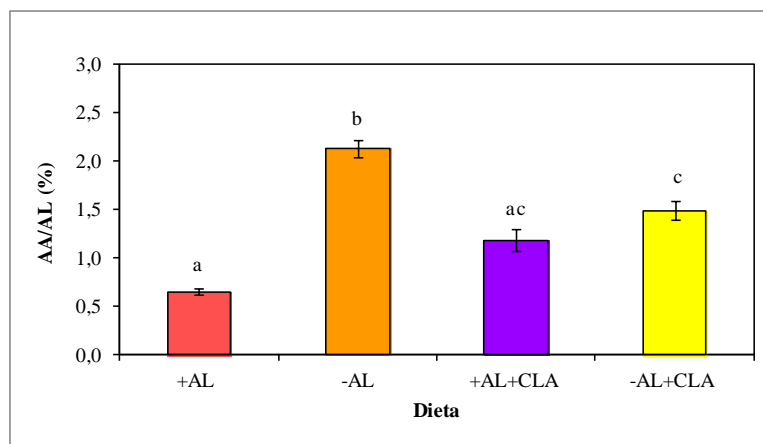
Grupos experimentales: ^+AL+CLA : enriquecida en ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA; ^-AL+CLA : deprivada de ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0,05$).

La presencia de CLA en el grupo ^+AL+CLA redujo tanto el contenido del AL, como el de ALA, en un 25% y un 48% respectivamente, versus el grupo ^+AL , y no modificó el efecto producido por la deprivación de AL.

Como puede observarse en la Tabla 16, los marcadores de deficiencia de AGE: $8c,11c-20:2$ y $5c,8c,11c-20:3$ estuvieron cuantitativamente presentes en el grupo deprivado en AL suplementado con CLA y, a pesar de no estar modificados los niveles de $20:3$ n-9 respecto al grupo ^-AL , sí estuvieron aumentados los de su precursor el $20:2$ n-9. Además, la relación trieno/tetraeno, fue incrementada en ambos grupos deprivados en AL.

La biosíntesis de AGPI-CL n-6 derivados del AL se vio afectada por la presencia de CLA. La sustitución con isómeros CLA en el grupo con ^+AL redujo los niveles de GLA sin alcanzar diferencias significativas, pero en deprivación de AL, hubo un efecto aditivo, reduciéndose este AG a niveles no detectables. El $11c,14c-20:2$, derivado en la vía secundaria de formación de AA, fue significativamente reducido por la presencia de CLA en el grupo ^+AL+CLA y, llamativamente, aumentó significativamente sus niveles en deprivación de AL. El contenido de AA y el de su metabolito intermediario DGLA no fueron modificados por la sustitución con CLA en el grupo enriquecido en AL y ésta tampoco altero el efecto producido por la deprivación de AL. La presencia de CLA incrementó la relación producto final/sustrato de la biosíntesis de AGPI-CL n-6 (AA/AL) respecto al control, sin alcanzar diferencia estadísticamente significativa en suficiencia de AL. Pero, en el grupo deprivado en AL, la sustitución con CLA redujo la relación producto/sustrato respecto al grupo ^-AL (Figura 48).

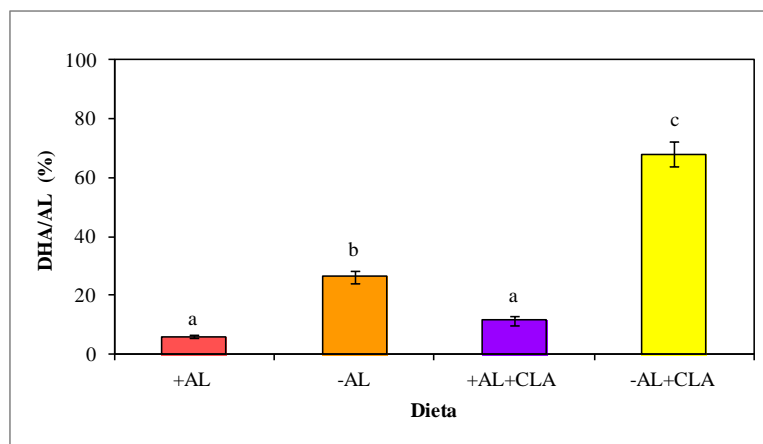
Figura 48- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido araquidónico (AA)/ácido linoleico (AL) en hígado



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Tanto la deprivación de AL como la sustitución con CLA incrementaron la biosíntesis de AGPI n-3. Si bien, los valores en el grupo ⁺AL+CLA fueron aproximadamente el doble que los del grupo ⁺AL no alcanzaron diferencias significativas, y el efecto de ambas variables conjuntas mostraron un efecto aditivo (Figura 49). La deprivación de AL incrementó los niveles de 11c,14c,17c-20:3 independientemente de la presencia de CLA.

Figura 49- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en hígado



Grupos experimentales: $^+$ AL: enriquecida en ácido linoleico; $^-$ AL: deprivada de ácido linoleico; $^+$ AL+CLA: $^+$ AL sustituida parcialmente con CLA; $^-$ AL+CLA: $^-$ AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Los niveles de 12:0, 14:0 estuvieron relacionados a los niveles de ingesta y no mostraron ninguna variación por la presencia de los CLA, además de la ya observada por la deprivación de AL. El contenido de 18:0, 9c-16:1 y 11c-18:1 fue incrementado por la deprivación de AL independientemente de la sustitución con CLA. En cambio, los niveles de 9c-18:1 no fueron afectados por la deprivación de AL, pero estuvieron disminuidos por los CLA en el grupo $^+$ AL+CLA respecto a su control. Otro AGS derivado del 18:0 es el 22:0, el cual no mostró cambios por los CLA en el grupo $^+$ AL+CLA pero redujo sus niveles alcanzados por la deprivación de AL.

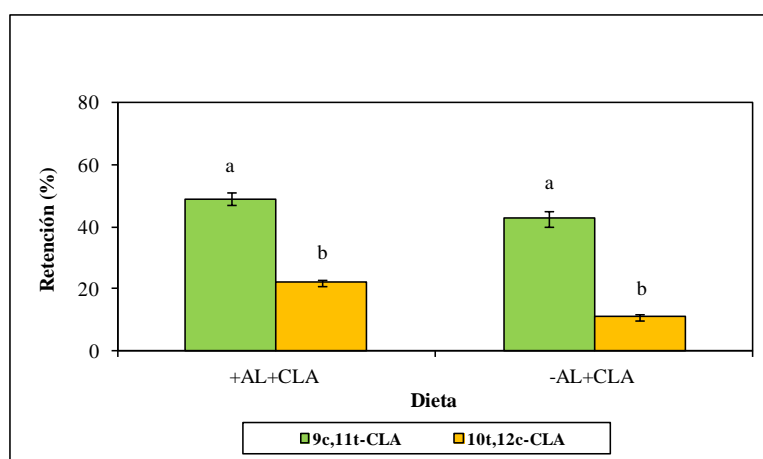
En la Tabla 17 se presenta la composición relativa de AG en tejido adiposo epididimal de los animales con dietas deprivadas o enriquecidas en AL, suplementados o no con CLA. En ella puede observarse que los isómeros CLA fueron incorporados a nivel de tejido adiposo epididimal en forma significativa pero, en los animales con deprivación de AL, la incorporación de ambos isómeros fue menor que en aquellos enriquecidos en AL. Como puede observarse en la Figura 50, la retención del isómero 9c,11t-CLA fue notablemente mayor que la del 10t,12c-CLA, en ambos grupos suplementados con CLA.

Tabla 17- Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

Ácidos grasos	Grupos experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+CLA	⁻ AL+CLA	AL	CLA	AL x CLA
12:0	0,16±0,01 ^a	8,89±0,32 ^b	0,30±0,03 ^a	7,35±0,36 ^c	0,000	0,010	0,003
14:0	1,14±0,10 ^a	8,06±0,12 ^b	1,74±0,09 ^a	7,25±0,29 ^c	0,000	NS	0,001
16:0	21,78±0,92 ^a	32,08±0,69 ^b	26,85±1,14 ^c	33,57±1,41 ^b	0,000	0,007	NS
9c-16:1	4,44±0,43 ^a	11,84±0,27 ^b	3,67±0,39 ^a	10,57±0,55 ^b	0,000	0,027	NS
18:0	1,99±0,06 ^{ab}	2,68±0,27 ^a	2,02±0,10 ^a	1,70±0,18 ^b	NS	0,014	0,010
9c-18:1	30,30±0,41 ^a	26,86±0,38 ^b	26,69±0,43 ^b	25,73±0,84 ^b	0,001	0,001	0,037
11c-18:1	3,42±0,24 ^a	5,14±0,31 ^b	3,03±0,12 ^a	5,05±0,50 ^b	0,000	NS	NS
9c,12c-18:2	34,30±1,00 ^a	1,86±0,08 ^b	28,92±1,27 ^c	2,52±0,42 ^b	0,000	0,011	0,002
6c,9c,12c-18:3	0,05±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,005	0,005	0,005
9c,12c,15c-18:3	0,67±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b	0,48±0,06 ^c	0,00±0,00 ^b	0,000	0,023	0,023
9c,11t-CLA	-	-	2,71±0,09	2,39±0,10 [*]	-	-	-
10t,12c-CLA	-	-	1,23±0,07	0,61±0,05 [*]	-	-	-
8c,11c,14c-20:3	0,07±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,009	0,009	0,009
5c,8c,11c,14c-20:4	0,76±0,07 ^a	0,00±0,00 ^b	0,25±0,02 ^c	0,00±0,00 ^b	0,000	0,000	0,000
∑ NI	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	-	-	-
∑ AGS	25,07±0,87 ^a	42,82±0,47 ^b	30,91±1,22 ^c	49,87±1,27 ^b	0,000	0,016	0,001
∑ AGM	38,16±0,32 ^a	43,84±0,22 ^b	33,39±0,34 ^c	41,35±1,62 ^a	0,000	0,000	NS
∑ AGP	35,85±1,06 ^{ac}	1,86±0,08 ^b	33,59±1,49 ^c	5,52±0,59 ^b	0,000	NS	0,009
∑ CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	3,94±0,12 ^b	3,00±0,11 ^c	0,000	0,000	0,000

Relación 16:1 n-7/16:0	0,20±0,01 ^a	0,37±0,02 ^b	0,14±0,01 ^c	0,32±0,01 ^b	0,000	0,000	NS
Relación 18:1 n-9/18:0	15,31±0,66 ^{ac}	10,41±0,98 ^b	13,34±0,73 ^{abc}	15,70±1,39 ^c	NS	NS	0,002
Relación AA/AL	0,022±0,002 ^a	0,000±0,000 ^b	0,016±0,002 ^c	0,000±0,000 ^b	0,000	0,032	0,032

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; Σ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ AGP: sumatoria de AG poliinsaturados. AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.. El análisis estadístico para para los niveles de los isómeros se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

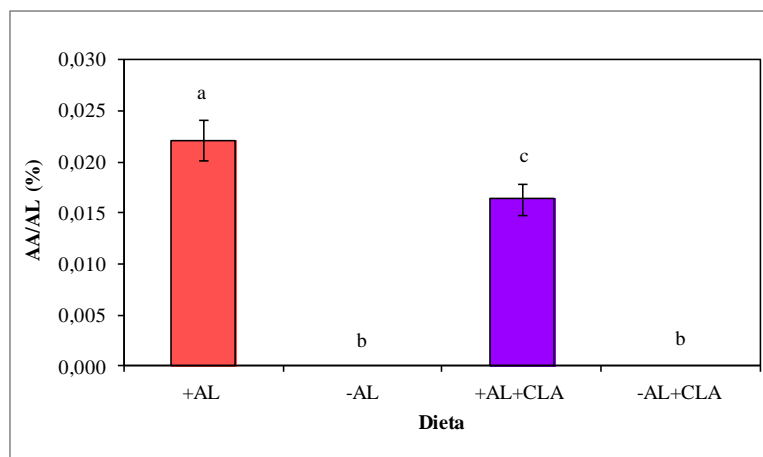
Figura 50- Retención de isómeros CLA en tejido adiposo epididimal

Grupos experimentales: ⁺AL+CLA: enriquecida en ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: deprivada de ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

La presencia de CLA en el grupo ⁺AL+CLA redujo significativamente los niveles de AL y ALA, mientras que, no alteraron los cambios generados por la deprivación de AL.

Los AG derivados del AL en la biosíntesis de AGPI-CL de la serie n-6: GLA, DGLA y AA fueron significativamente reducidos por la sustitución con CLA, alcanzando niveles no detectables, a excepción del AA que disminuyó un 33% en el grupo ⁺AL+CLA respecto al grupo +AL (Figura 51).

Figura 51- Relación producto final/sustrato: ácido araquidónico (AA)/ácido linoleico (AL) en tejido adiposo epididimal



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

No se detectó ninguno de los productos distales de la biosíntesis de AGPI-CL de la serie n-3 a partir del ALA en los grupos analizados.

Los niveles de 12:0 y 14:0 guardaron relación con los niveles ingeridos con las dietas correspondientes, en cambio los niveles de 16:0, al igual que en deprivación de AL, incrementaron por la sustitución con CLA, no observándose efecto aditivo. La sustitución con CLA en el grupo ⁻AL+CLA redujo los niveles de 18:0 alcanzados en el grupo ⁻AL. La deprivación de AL, pero no la sustitución con CLA, incrementó los niveles de 9*c*-16:1 y de 11*c*-18:1. Mientras que el del 9*c*-18:1 mostró, de igual manera que por la deprivación de AL, una leve pero significativa reducción de sus niveles, sin que se observe efecto aditivo.

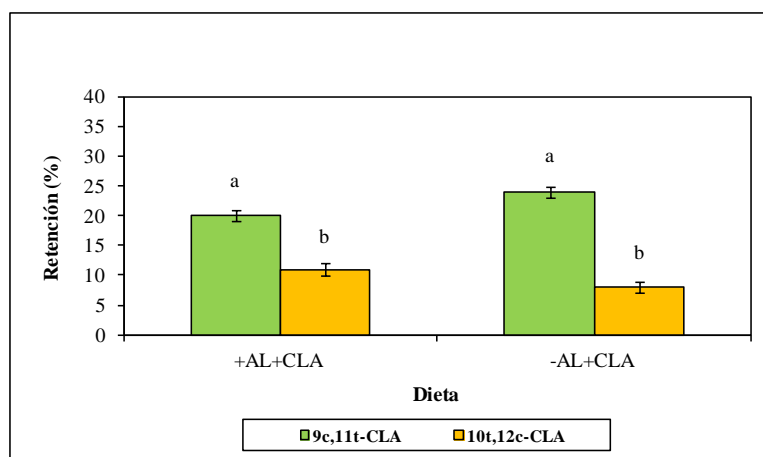
En la Tabla 18 se presenta la composición relativa de AG en músculo. Como puede observarse, los CLA fueron incorporados en forma semejante y significativa tanto en los animales enriquecidos como en aquellos deprivados en AL. Sin embargo, la retención de CLA en músculo presentó diferencias en función del isómero considerado. En la Figura 52 puede observarse que, independientemente de los niveles de AL, la retención del isómero 9*c*,11*t*-CLA fue mayor que la del 10*t*,12*c*-CLA.

Tabla 18- Composición de ácidos grasos en músculo gastrocnemio

Ácidos grasos	Grupos experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+CLA	⁻ AL+CLA	AL	CLA	AL x CLA
12:0	0,06±0,01 ^a	5,54±0,08 ^b	0,11±0,01 ^a	2,69±0,40 ^{ab}	0,001	NS	NS
14:0	0,74±0,05 ^a	4,52±0,90 ^b	1,50±0,28 ^{ac}	3,73±0,31 ^{bc}	0,000	NS	NS
16:0	23,37±0,25 ^a	26,20±0,60 ^{bc}	25,73±0,22 ^b	28,31±0,66 ^c	0,000	0,002	NS
9c-16:1	2,86±0,34 ^a	9,60±1,17 ^b	3,87±0,17 ^a	9,69±0,27 ^b	0,000	NS	NS
18:0	8,64±0,19	6,62±1,45	6,01±1,25	6,90±0,18	NS	NS	NS
9c-18:1	12,78±0,60 ^a	28,32±1,84 ^b	16,50±2,91 ^{ac}	23,99±0,45 ^{bc}	0,000	NS	NS
11c-18:1	4,19±0,38 ^a	0,06±0,01 ^b	4,43±0,25 ^a	0,05±0,01 ^b	0,000	NS	NS
9c,12c-18:2	21,36±1,34 ^a	6,72±0,52 ^b	23,39±2,01 ^a	9,20±0,99 ^b	0,000	NS	NS
6c,9c,12c-18:3	0,04±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,02±0,01	NS	NS	NS
11c-20:1	0,06±0,00 ^a	0,04±0,00 ^{bc}	0,05±0,01 ^{ac}	0,03±0,00 ^b	0,000	0,045	NS
9c,12c,15c-18:3	0,16±0,02 ^a	0,06±0,02 ^b	0,17±0,04 ^a	0,02±0,00 ^b	0,001	NS	NS
9c,11t-CLA	-	-	1,13±0,05	1,34±0,03	0,016	0,000	0,016
10t,12c-CLA	-	-	0,60±0,03	0,47±0,08	NS	0,000	NS
11c,14c-20:2	0,20±0,01 ^a	0,02±0,00 ^b	0,14±0,03 ^a	0,04±0,00 ^b	0,000	NS	NS
C 22:0	0,01±0,00	0,00±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	NS	NS	NS
8c,11c-20:2	0,06±0,02 ^a	0,11±0,03 ^{ab}	0,08±0,02 ^{ab}	0,18±0,02 ^b	0,010	NS	NS
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,08±0,02 ^b	0,00±0,00 ^a	0,03±0,01 ^{ab}	0,003	NS	NS
8c,11c,14c-20:3	0,38±0,02	0,33±0,10	0,20±0,05	0,34±0,02	NS	NS	NS
11c,14c,17c-20:3	0,06±0,01 ^a	0,96±0,27 ^b	0,03±0,00 ^a	0,63±0,09 ^{ab}	0,001	NS	NS

5c,8c,11c,14c-20:4	13,08±0,91 ^a	4,66±1,39 ^b	9,35±0,39 ^a	4,57±0,12 ^b	0,000	NS	NS
5c,8c,11c,14c,17c-20:5	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,01±0,00 ^a	0,05±0,00 ^c	0,000	0,006	0,001
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6	6,34±0,46 ^a	2,59±0,20 ^b	5,03±0,41 ^{ab}	4,32±0,56 ^{ab}	0,005	NS	NS
Σ NI	6,59±0,28 ^a	2,20±0,42 ^b	2,81±0,46 ^b	2,62±0,11 ^b	0,000	0,001	0,000
Σ AGS	33,04±0,46 ^a	43,16±0,03 ^b	33,51±1,49 ^a	41,81±1,16 ^b	0,000	NS	NS
Σ AGM	21,10±1,05 ^a	38,72±3,00 ^b	25,63±2,94 ^{ac}	34,30±0,38 ^{bc}	0,000	NS	NS
Σ AGP	41,68±0,79 ^a	15,62±2,28 ^b	40,16±2,33 ^a	21,22±1,32 ^b	0,000	NS	NS
Σ CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,73±0,09 ^b	1,81±0,09 ^b	NS	NS	NS
Relación 20:3 n-9/20:4 n-6	0,00±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,01±0,00 ^c	0,000	0,001	0,001
Relación 16:1 n-7/16:0	0,12±0,02 ^a	0,36±0,04 ^b	0,15±0,01 ^a	0,34±0,02 ^b	0,000	NS	NS
Relación 18:1 n-9/18:0	1,48±0,10 ^a	5,84±0,21 ^b	1,89±0,13 ^a	3,48±0,14 ^c	0,000	0,000	0,000
Relación 20:4 n-6/20:3 n-6	34,66±1,66 ^a	13,98±0,041 ^b	36,80±0,26 ^a	13,59±0,58 ^b	0,000	NS	NS
Relación 18:3 n-6/18:2 n-6	0,002±0,000 ^a	0,005±0,001 ^b	0,001±0,000 ^a	0,003±0,000 ^{ab}	0,007	NS	NS
Relación AA/AL	0,62±0,08	0,68±0,15	0,40±0,03	0,51±0,05	NS	NS	NS
Relación DHA/ALA	42,05±8,09 ^a	33,06±3,30 ^a	38,74±1,73 ^a	208,60±35,35 ^b	0,002	0,001	0,001

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; Σ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ AGP: sumatoria de AG poliinsaturados. AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico; DHA: ácido docosahexaenoico; ALA: ácido α-linolénico. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.. El análisis estadístico para para los niveles de los isómeros se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: p < 0,05.

Figura 52- Retención de isómeros CLA en músculo gastrocnemio

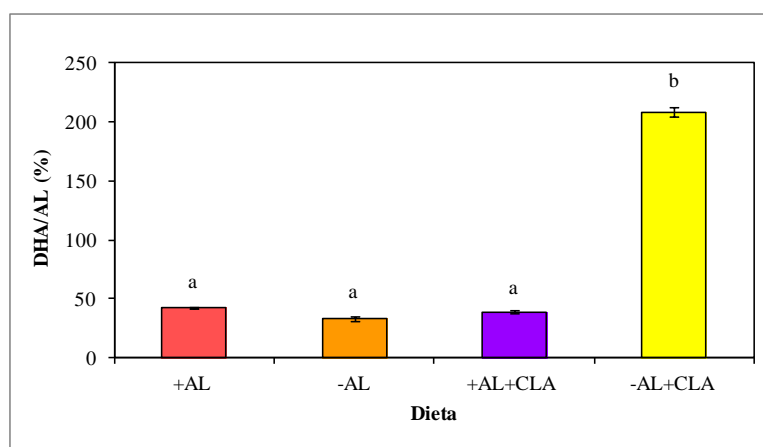
Grupos experimentales: ⁺AL+CLA: enriquecida en ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: deprivada de ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Los niveles de AL y ALA fueron disminuidos por la deprivación de AL, pero no se modificaron por la alimentación suplementada con CLA. El marcador de deficiencia de AGE, *5c,8c,11c-20:3*, como era de esperar, estuvo en niveles considerables en el grupo ⁻AL y la presencia de CLA atenuó dichos niveles. La relación trieno/tetraeno, reflejó la deficiencia de AGE sólo en los grupos deprivados en AL.

La biosíntesis de AGPI-CL n-6 derivados del AL expresados por la relación producto/sustrato, no se vio afectada por la deprivación de AL, ni por la presencia de CLA. Sin embargo, los niveles de AA y del *11c,14c-20:2* n-6, derivado en la vía secundaria de formación de AA, que fueron significativamente disminuidos por la deprivación de AL, no se modificaron por la presencia de CLA. Los metabolitos intermediarios, GLA y DGLA, no fueron afectados por ninguna de las variables experimentales.

La biosíntesis de AGPI-CL n-3 se vio afectada por la presencia de los CLA solo en deprivación de AL (Figura 53). Los niveles de *11c,14c,17c-20:3* fueron ostensiblemente incrementados por la deprivación de AL, pero no por la presencia de CLA.

Figura 53- Relación porcentual producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en músculo gastrocnemio



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Los niveles de 12:0 y 14:0 están relacionados a los niveles de ingesta y no mostraron variación por la presencia de los CLA, además de la ya observada por la deprivación de AL. El contenido de 9*c*-16:1 y de 9*c*-18:1 estuvieron incrementados, mientras que el del 11*c*-18:1 estuvo disminuido por la deprivación de AL, independientemente de la sustitución de CLA.

El contenido de los AG 18:0 y 22:0 no mostró ningún cambio por ninguno de los tratamientos dietarios.

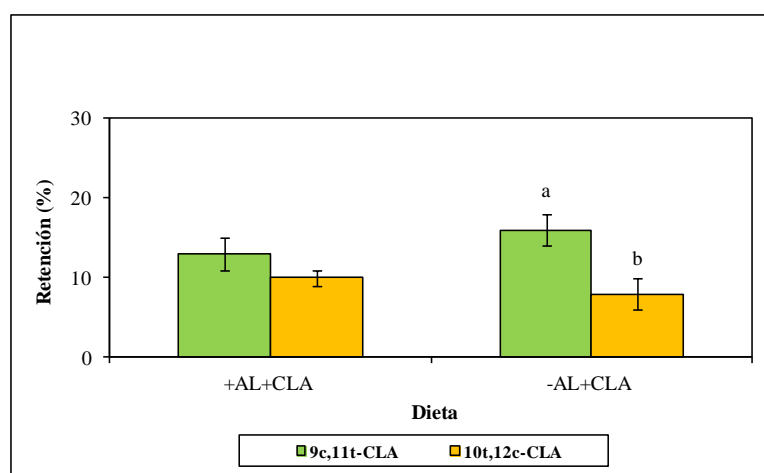
Los AG circulantes, que reflejan la conjunción del aporte de la dieta y de los distintos tejidos, muestran una incorporación semejante de isómeros en ambas grupos suplementados con CLA (Tabla 19). Sin embargo, en deprivación de AL, la retención del isómero 9*c*,11*t*-CLA presentó niveles mayores que el 10*t*,12*c*-CLA, mientras que, en el grupo ⁺AL+CLA, ambos isómeros fueron retenidos en forma semejante (Figura 54).

Tabla 19- Composición de ácidos grasos en suero

Ácidos grasos	Grupos experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+CLA	⁻ AL+CLA	AL	CLA	AL x CLA
12:0	0,00±0,00 ^a	1,41±0,19 ^b	0,00±0,00 ^a	1,01±0,24 ^b	0,000	NS	NS
14:0	0,31±0,03 ^a	2,35±0,28 ^b	0,48±0,05 ^a	1,48±0,16 ^c	0,000	NS	0,006
16:0	20,06±0,31	20,66±0,96	21,98±0,68	20,13±0,69	NS	NS	NS
9c-16:1	0,90±0,22 ^a	4,37±0,13 ^b	1,69±0,38 ^a	3,21±0,35 ^b	0,000	NS	0,004
18:0	15,09±1,16 ^a	16,95±1,35 ^{ab}	14,73±1,06 ^a	21,37±1,42 ^b	0,004	NS	NS
9c-18:1	9,65±0,80 ^a	17,03±1,52 ^b	10,04±0,58 ^a	12,85±1,03 ^{ab}	0,000	NS	0,044
11c-18:1	2,66±0,17 ^a	5,14±0,21 ^b	2,09±0,36 ^a	4,36±0,18 ^b	0,000	NS	NS
9c,12c-18:2	20,20±0,59 ^a	7,89±0,53 ^b	19,91±1,15 ^a	13,42±0,30 ^c	0,000	0,002	0,001
6c,9c,12c-18:3	0,06±0,02 ^a	0,26±0,02 ^b	0,19±0,02 ^b	0,00±0,00 ^a	NS	0,002	0,000
11c-20:1	0,11±0,01 ^a	0,16±0,03 ^a	0,14±0,01 ^a	0,00±0,00 ^b	0,011	0,001	0,000
9c,12c,15c-18:3	0,22±0,01	0,20±0,01	0,24±0,02	0,19±0,03	NS	NS	NS
9c,11t-CLA	-	-	0,74±0,10	0,89±0,11	-	-	-
10t,12c-CLA	-	-	0,55±0,06	0,42±0,11	-	-	-
11c,14c-20:2	0,45±0,03 ^a	0,16±0,04 ^b	0,29±0,03 ^c	0,30±0,03 ^c	0,000	NS	0,000
22:0	0,00±0,00 ^a	3,60±0,17 ^b	0,21±0,03 ^a	3,22±0,36 ^b	0,000	NS	NS
8c,11c-20:2	0,00±0,00 ^a	0,41±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	0,32±0,07 ^c	0,000	0,000	0,000
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,36±0,05 ^b	0,00±0,00 ^a	0,32±0,07 ^b	0,000	NS	NS
8c,11c,14c-20:3	0,46±0,04 ^a	1,12±0,07 ^b	0,46±0,04 ^a	1,33±0,11 ^b	0,000	NS	NS
11c,14c,17c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,35±0,08 ^b	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,000	0,000	0,000

5c,8c,11c,14c-20:4	24,95±0,76 ^a	9,50±0,56 ^b	20,37±1,06 ^c	7,70±0,30 ^b	0,000	0,005	0,045
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6	1,96±0,18 ^{ab}	1,70±0,07 ^{ab}	1,14±0,18 ^a	2,11±0,34 ^b	NS	NS	0,012
Σ NI	1,97±0,15 ^a	1,43±0,11 ^a	2,09±0,31 ^a	0,44±0,06 ^b	0,000	0,030	0,008
Σ AGS	35,46±1,22 ^a	44,97±1,10 ^b	37,40±0,82 ^a	47,21±1,66 ^b	0,000	0,050	NS
Σ AGM	13,32±1,01 ^a	26,70±1,78 ^b	13,96±1,12 ^{ac}	20,42±1,32 ^c	0,000	NS	0,006
Σ AGP	48,30±0,93 ^{ac}	21,62±0,35 ^b	43,89±1,39 ^c	27,00±0,90 ^d	0,000	NS	0,000
Σ CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,29±0,15 ^b	1,31±0,18 ^b	NS	0,000	NS
Relación 20:3 n-9/20:4 n-6	0,00±0,00 ^a	0,04±0,00 ^b	0,00±0,00 ^a	0,04±0,00 ^b	0,000	NS	NS
Relación 16:1 n-7/16:0	0,05±0,01 ^a	0,21±0,01 ^b	0,05±0,002 ^a	0,16±0,02 ^c	0,000	NS	0,013
Relación 18:1 n-9/18:0	0,67±0,10	1,05±0,15	0,71±0,09	0,62±0,08	NS	NS	0,047
Relación 20:4 n-6/20:3 n-6	54,91±2,89 ^a	8,52±0,09 ^b	46,26±5,33 ^a	5,96±0,60 ^b	0,000	NS	NS
Relación 18:3 n-6/18:2 n-6	0,003±0,001 ^{ac}	0,034±0,004 ^b	0,010±0,010 ^a	0,000±0,000 ^c	0,000	0,000	0,000
Relación AA/LA	1,24±0,05 ^a	1,24±0,13 ^a	1,04±0,09 ^a	0,57±0,01 ^b	0,014	0,000	0,015
Relación DHA/ALA	8,94±1,18 ^{ab}	8,60±0,93 ^{ab}	4,86±0,86 ^a	11,61±1,93 ^b	0,025	NS	0,015

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; Σ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ AGP: sumatoria de AG poliinsaturados. AA: ácido araquidónico; AL: ácido linoleico; DHA: ácido docosahexaenoico; ALA: ácido α -linolénico. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.. El análisis estadístico para para los niveles de los isómeros se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

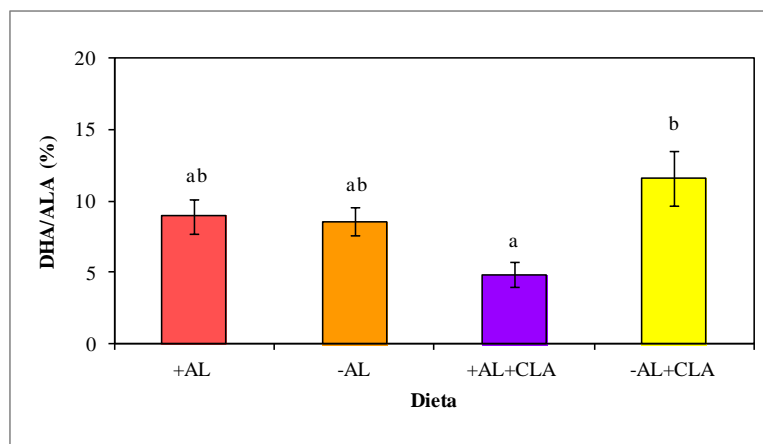
Figura 54- Retención de isómeros CLA en suero

Grupos experimentales: ⁺AL+CLA: enriquecida en ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: deprivada de ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

El contenido de AL en dietas enriquecidas en AL no fue afectado por la presencia de CLA. Sin embargo, los reducidos niveles de AL en el grupo deprivado en AL fueron incrementados por la sustitución con CLA. El producto final de la biosíntesis de AGPI n-6, es decir el AA, fue reducido por la sustitución con CLA en el grupo enriquecido en AL, y más aún por la derivación de AL, sin observarse un efecto aditivo por ambas variables. Los derivados en la vía de biosíntesis de AGPI-CL n-6 en suero muestran un perfil muy diferente al del sustrato original (AL). Los niveles de GLA aumentaron por la sustitución con CLA en el grupo enriquecido en AL; mientras que, en el grupo con deprivación de AL, el GLA alcanzó niveles no detectables. El DGLA incrementó por la deprivación de AL, mientras que no fue modificado por la sustitución con CLA. Otro derivado del AL, el 11c,14c-20:2, mostró niveles reducidos por la deprivación de AL y por la sustitución con CLA.

Los niveles de ALA y su producto final en la biosíntesis de AGPI-CL n-3, es decir DHA, no mostraron efecto por la deprivación de AL, ni por la sustitución con CLA. No obstante, el grupo ⁻AL+CLA mostró mayores niveles de DHA que el grupo ⁺AL+CLA, resultando en una mayor relación DHA/ALA (Figura 55).

Figura 55- Relación sérica producto final/sustrato: ácido docosahexaenoico (DHA)/ácido α -linolénico (ALA) en suero



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Los niveles del 12:0, 14:0, 9 c -16:1, 9 c -18:1 y 11 c -18:1 estuvieron incrementados por la deprivación de AL y no mostraron ningún efecto significativo por la sustitución con CLA. Los niveles de 16:0 presentaron valores semejantes en todos los grupos, y los de 18:0 se vieron aumentados por los CLA en deprivación de AL respecto al grupo ⁺AL+CLA.

Un efecto semejante al de los AG c -18:1 fue observado en el derivado metabólico de los mismos: 5 c ,8 c ,11 c -20:3 y en la relación trieno/tetraeno.

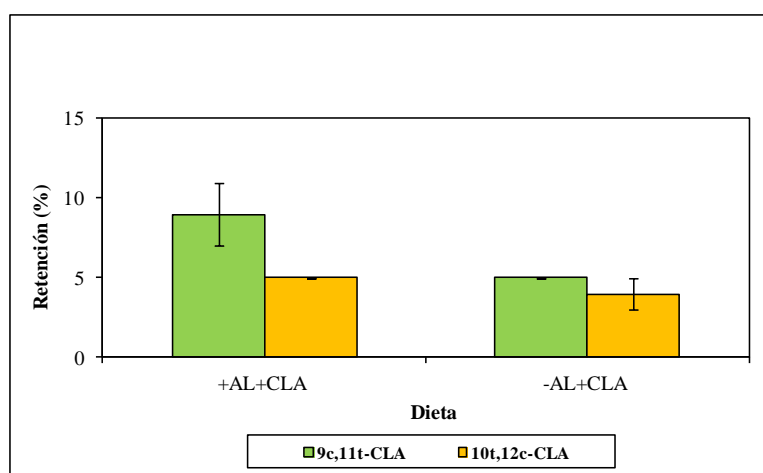
En la Tabla 20 se presenta la composición de AG del suero enriquecido en TG-VLDL secretados por el hígado. Como puede observarse, los niveles de los isómeros CLA, si bien tendió a ser menor en el grupo ⁻AL+CLA vs. ⁺AL+CLA, no alcanzaron a mostrar diferencias estadísticamente significativas. La retención de los isómeros individuales no presentó diferencias entre los dos grupos suplementados con CLA. Sin embargo, la retención del 9 c ,11 t -CLA tendió a ser mayor que la del 10 t ,12 c -CLA independiente del status de AL (Figura 56).

Tabla 20- Composición de ácidos grasos del suero enriquecido en triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad

Ácidos Grasos	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+CLA	⁻ AL+CLA	AL	CLA	AL x CLA
12:0	0,08±0,02 ^a	0,85±0,03 ^b	0,07±0,00 ^a	1,10±0,02 ^c	0,000	0,000	0,000
14:0	0,56±0,07 ^a	2,28±0,09 ^b	0,83±0,14 ^a	2,60±0,09 ^b	0,000	0,013	NS
16:0	20,90±0,28 ^a	22,59±1,26 ^{ab}	22,17±0,48 ^{ab}	25,62±0,72 ^b	0,006	0,017	NS
9c-16:1	1,54±0,06 ^a	6,97±0,46 ^b	1,92±0,43 ^a	8,23±0,36 ^b	0,000	0,045	NS
18:0	12,59±1,15	12,37±1,07	11,97±1,07	13,61±1,70	NS	NS	NS
9c-18:1	14,17±1,39 ^a	25,30±2,67 ^b	13,04±1,23 ^a	18,64±2,59 ^{ab}	0,002	NS	NS
11c-18:1	1,77±0,05 ^a	3,48±0,18 ^b	1,97±0,13 ^a	3,23±0,45 ^b	0,000	NS	NS
9c,12c-18:2	22,87±1,14 ^a	5,02±0,19 ^b	21,85±1,80 ^a	8,90±0,45 ^b	0,000	NS	NS
6c,9c,12c-18:3	0,48±0,10 ^a	0,16±0,03 ^b	0,09±0,01 ^b	0,05±0,02 ^b	0,007	0,001	0,021
11c-20:1	0,07±0,00 ^a	0,36±0,01 ^b	0,28±0,02 ^c	0,12±0,02 ^a	0,000	NS	0,000
9c,12c,15c-18:3	0,52±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b	0,09±0,03 ^b	0,07±0,01 ^b	0,000	0,000	0,000
9c,11t-CLA	-	-	0,52±0,10	0,28±0,02	-	-	-
10t,12c-CLA	-	-	0,30±0,01	0,22±0,03	-	-	-
11c,14c-20:2	0,16±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	0,28±0,01 ^c	0,00±0,00 ^b	0,000	0,000	0,000
22:0	0,11±0,01 ^a	3,16±0,33 ^b	0,10±0,02 ^a	0,23±0,01 ^a	0,000	0,000	0,000
8c,11c-20:2	0,00±0,00 ^a	0,22±0,01 ^a	0,00±0,00 ^a	1,80±0,36 ^b	0,000	0,001	0,001
5c,8c,11c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,07±0,01 ^a	0,00±0,00 ^a	0,54±0,09 ^b	0,000	0,000	0,000
8c,11c,14c-20:3	0,15±0,02 ^a	0,62±0,09 ^b	0,18±0,04 ^a	0,72±0,13 ^b	0,000	NS	NS
11c,14c,17c-20:3	0,00±0,00 ^a	0,18±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	0,14±0,04 ^b	0,000	NS	NS

5c,8c,11c,14c-20:4	20,20±1,76 ^a	7,77±1,40 ^b	18,63±1,73 ^a	8,05±1,58 ^b	0,000	NS	NS
5c,8c,11c,14c,17-20:5	0,00±0,00 ^a	0,08±0,01 ^b	0,00±0,00 ^a	0,07±0,01 ^b	0,000	NS	NS
4c,7c,10c,13c,16c,19c-22:6	1,40±0,12 ^{ab}	1,49±0,18 ^{ab}	1,24±0,12 ^a	2,10±0,27 ^b	0,024	NS	NS
Σ NI	1,78±0,21 ^{ac}	1,31±0,19 ^{ab}	2,28±0,10 ^c	1,33±0,20 ^b	0,000	NS	0,003
Σ AGS	34,24±0,85 ^a	41,25±0,62 ^b	35,14±1,06 ^a	43,16±1,33 ^b	0,000	0,051	NS
Σ AGM	17,55±1,42 ^a	36,11±3,01 ^b	17,21±1,08 ^a	30,22±3,16 ^b	0,000	NS	NS
Σ AGP	45,78±0,61 ^a	15,66±1,55 ^b	43,18±0,54 ^a	22,94±1,90 ^c	0,000	NS	0,010
Σ CLA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,82±0,18 ^b	0,50±0,04 ^c	0,036	0,000	0,036

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Σ NI: sumatoria de AG no identificados; Σ AGS: sumatoria de AG saturados; Σ AGM: sumatoria de AG monoinsaturados; Σ AGP: sumatoria de AG poliinsaturados. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.. El análisis estadístico para para los niveles de los isómeros se realizó mediante un test t de student. * Indica diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: p < 0,05.

Figura 56- Retención de isómeros CLA en triglicéridos-lipoproteínas de muy baja densidad

Grupos experimentales: ⁺AL+CLA: enriquecida en ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: deprivada de ácido linoleico sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante el test t de Student. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Los niveles de AL y AA fueron significativamente reducidos, mientras que los del DGLA fueron incrementados por la deprivación de AL independientemente de la sustitución con CLA. Sin embargo, el GLA disminuyó sus niveles por la deprivación de AL y por presencia de los CLA, no mostrando efecto aditivo. Contrariamente, los niveles de 11c,14c-20:2 en el grupo enriquecido en AL, se vieron aumentados sin modificarse los cambios ya existente por la deprivación de AL.

El contenido de ALA fue reducido por la deprivación de AL y por presencia de CLA. No obstante, ningún efecto en el producto final de la biosíntesis de AGPI-CL n-3 ha sido observado por dicho tratamiento. Los productos intermediarios de dicha biosíntesis, el EPA y 11c,14c,17c-20:3, estuvieron aumentados por la deprivación de AL y no mostraron cambios en sus niveles por el tratamiento con CLA.

Los niveles de 12:0 mostraron un aumento por la deficiencia de AL que fue exacerbado por la presencia de los CLA. El 14:0, los derivados de biosíntesis *de novo* de AG 9c-16:1 y 11c-18:1, y el 9c-18:1, no mostraron modificaciones en sus valores por la presencia de los CLA, pero estuvieron incrementados por la deprivación de AL. Los niveles de 16:0 y 18:0 no fueron modificados por ninguno de los tratamientos dietarios.

Los AG productos de la elongación y desaturación de AG saturados y monoinsaturados procedentes de la dieta y/o de la biosíntesis *de novo* mostraron diversos efectos por la presencia de los CLA. Así, los niveles de 11c-20:1 fueron aumentados por los CLA en el grupo enriquecido en AL, pero en el grupo deprivado de AL disminuyeron los valores respecto al grupo ⁻AL, mientras

que para el 22:0, la presencia de isómeros solo tuvo efecto en privación de AL, reduciendo los valores alcanzados por el grupo $\bar{A}L$. Tanto para el 8c,11c-20:2, como para el 5c,8c,11c-20:3, los CLA no tuvieron ningún efecto en el grupo enriquecido en AL, pero sí presentaron un efecto aditivo con la privación, aumentando los niveles de dichos AG.

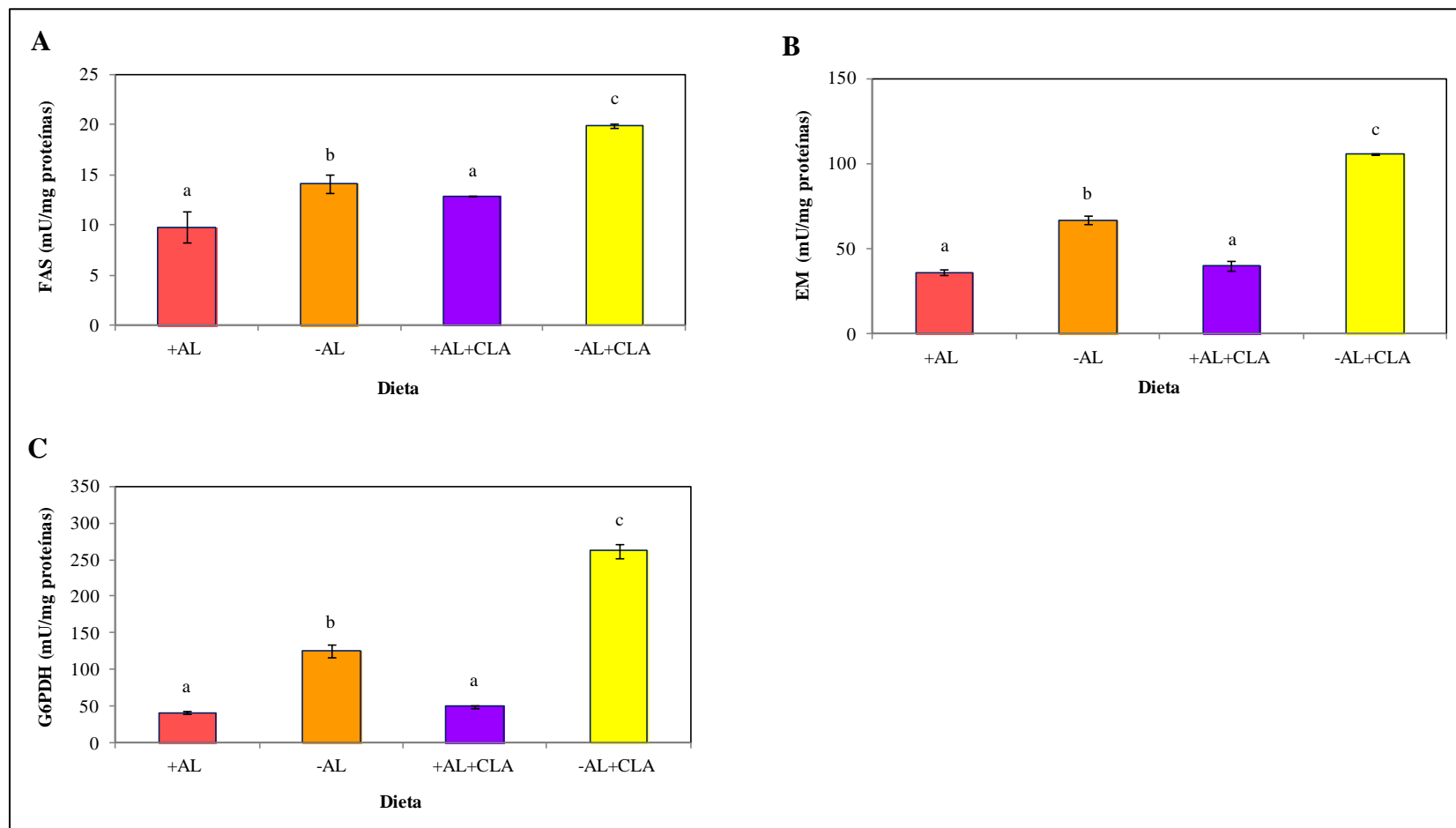
II.3- Parámetros relacionados a la regulación del metabolismo de triglicéridos

II.3.1- Actividad de enzimas lipogénicas en hígado

Como fuera expresado anteriormente, la síntesis de AG en el hígado fue evaluada mediante el análisis de las actividades enzimáticas: FAS, EM y G6PDH. El análisis estadístico ANOVA (2x2) mostró que, para todas ellas la privación de AL, la sustitución con CLA y la interacción de ambas variables produjeron cambios significativos ($p < 0,001$). En el análisis estadístico individual puede observarse que, para las tres enzimas estudiadas, los grupos privados en AL presentaron un aumento estadísticamente significativo en sus actividades respecto a sus correspondientes grupos controles. Si bien los CLA no incrementan dichas actividades enzimáticas en los animales alimentados con dietas enriquecidas en AL, bajo privación de AL se observó un incremento estadísticamente significativo para todas ellas (Figura 57).

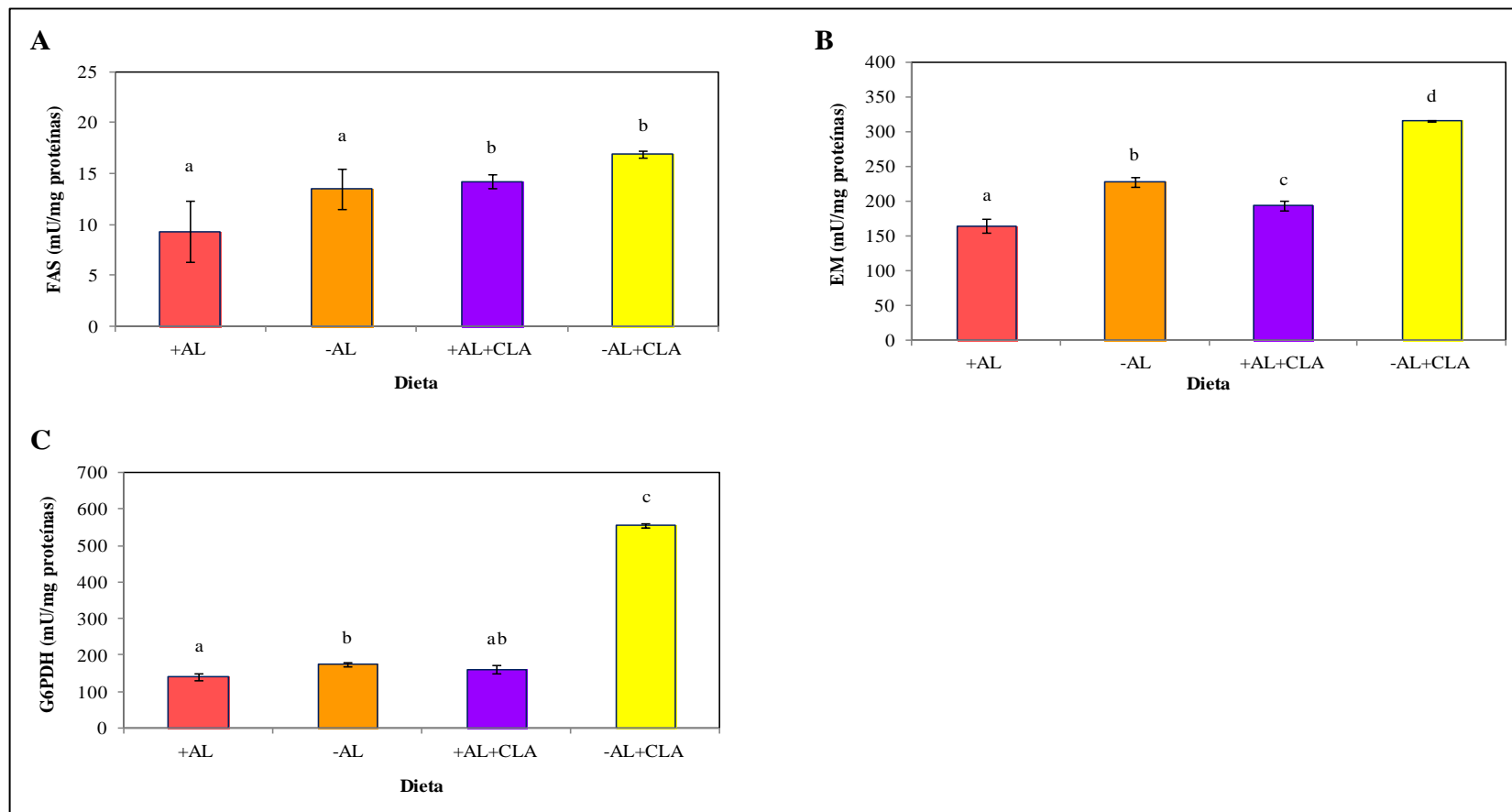
II.3.2- Síntesis de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

En el análisis estadístico ANOVA (2x2) las enzimas FAS, EM y G6PDH mostraron modificaciones significativas en su actividad por la privación de AL ($p < 0,001$), por la presencia de los CLA ($p < 0,001$), y presentaron interacción de éstas variables ($p < 0,05$). Las comparaciones no paramétricas mostraron que la actividad de la enzima FAS estuvo aumentada significativamente en ambos grupos suplementados con CLA respecto a sus correspondientes controles (Figura 58A). La actividad de la EM estuvo aumentada significativamente tanto por la privación de AL como por la sustitución con CLA y notoriamente fue exacerbada por la acción conjunta de ambas variables (Figura 58B). La actividad de la enzima G6PDH estuvo aumentada en ambos grupos privados en AL respecto a sus correspondientes grupos controles y estuvo exacerbada por la sustitución con CLA (Figura 58C).

Figura 57- Actividad de las enzimas sintasa de ácidos grasos (FAS), málica (EM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en hígado

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 58- Actividad de las enzimas sintasa de ácidos grasos (FAS), málica (EM) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en tejido adiposo epididimal

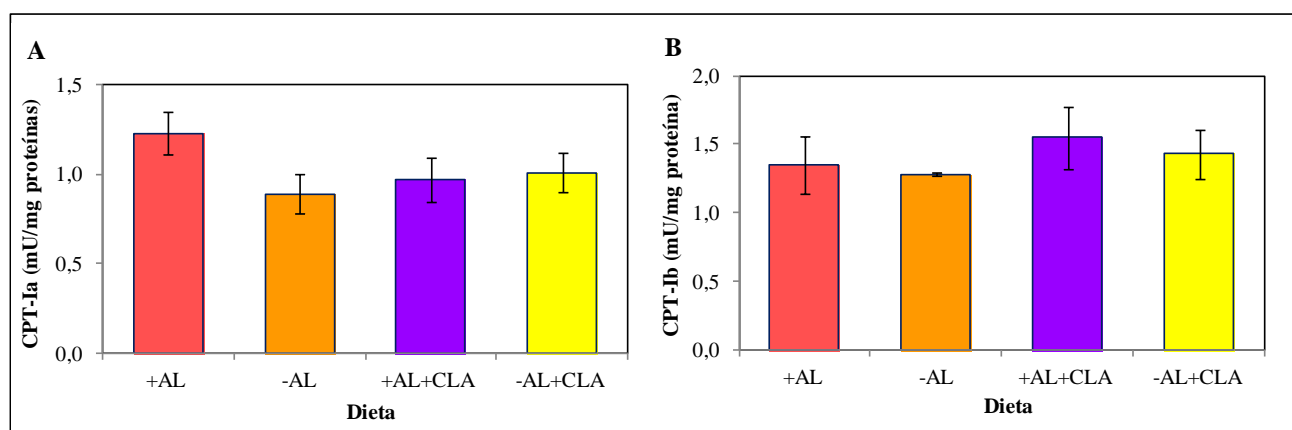


Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

II.3.3- Actividades de enzimas oxidativas de ácidos grasos en hígado y músculo gastrocnemio

La capacidad de oxidación hepática y muscular fue evaluada por la actividad de las enzimas CPT-Ia y CPT-Ib respectivamente. El análisis estadístico mostró que, tanto en hígado como en músculo gastrocnemio, la actividad enzimática no estuvo afectada por los tratamientos recibidos (Figura 59).

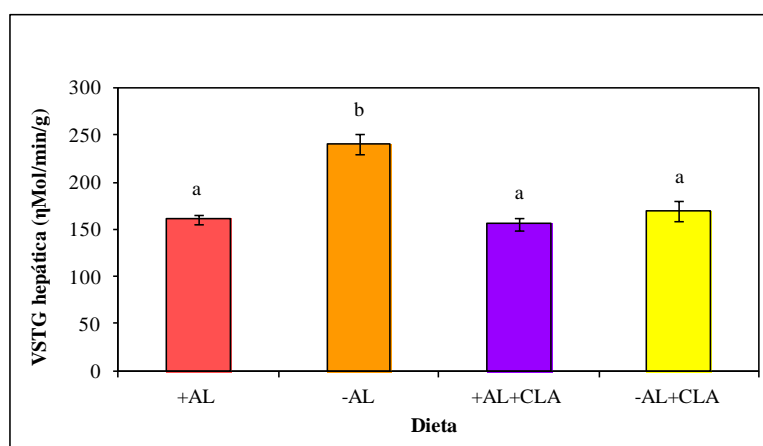
Figura 59- Actividad de las enzimas carnitina palmitoil transferasa-I en hígado (CPT-Ia) y carnitina palmitoil transferasa-I en músculo gastrocnemio (CPT-Ib)



Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA. Significancia estadística: $p < 0,05$.

II.3.4- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos

En ausencia de CLA, la velocidad de secreción hepática de TG-VLDL fue incrementada por la deprivación de AL, y la sustitución parcial de la grasa dietaria por CLA redujo dichos niveles a valores comparables a los del grupo ⁺AL (Figura 60).

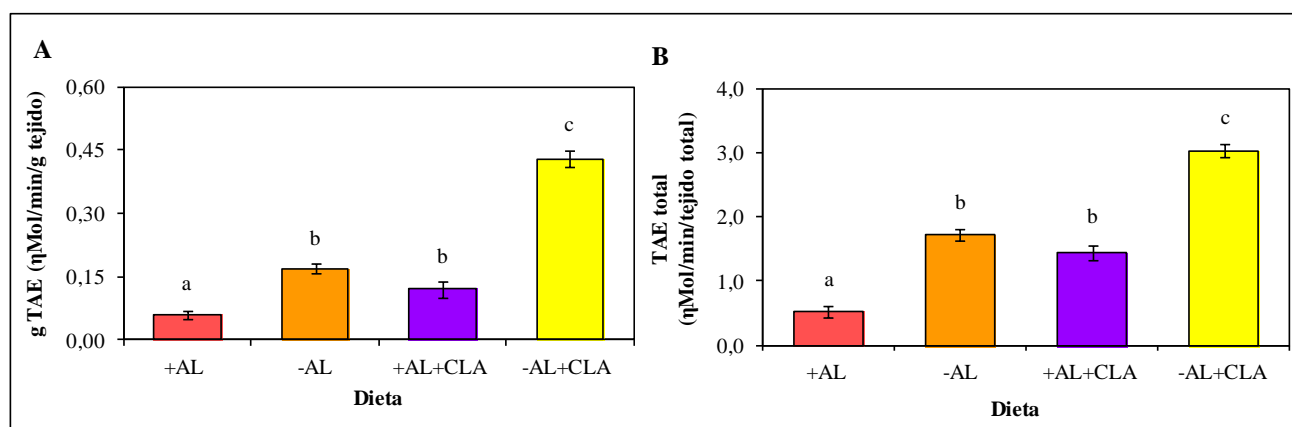
Figura 60- Velocidad de secreción hepática de triglicéridos (VSTG)

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

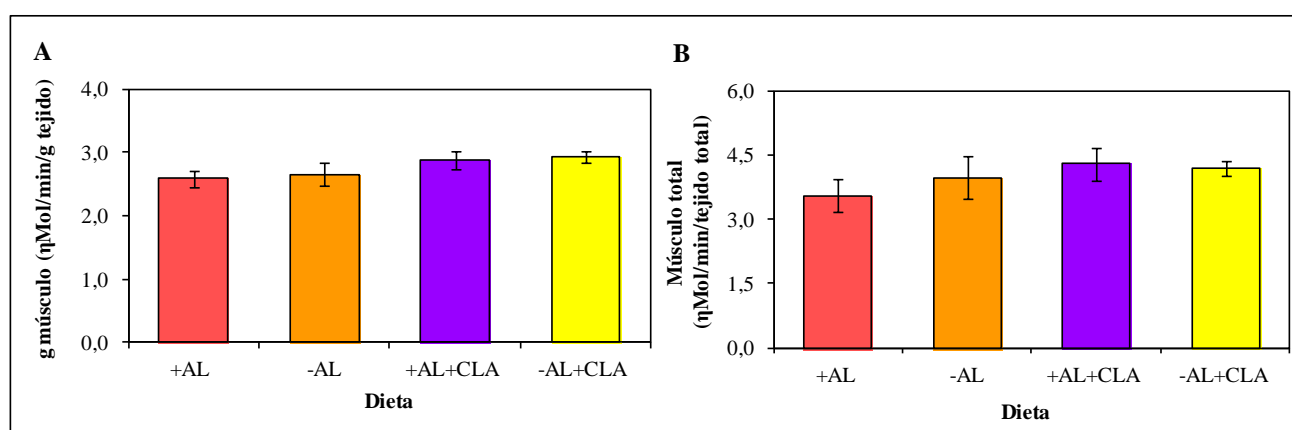
II.3.5- Remoción de triglicéridos séricos: actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio

La actividad de la enzima LPL en TAE, independientemente de la forma de expresión reflejó un marcado incremento de sus niveles por la deprivación de AL ($p < 0,001$), por la sustitución con CLA ($p < 0,001$) y por la interacción de ambas variables ($p < 0,05$). En este parámetro la interacción de ambas variables mostró un significativo efecto aditivo (Figura 61).

En cambio, la actividad de la enzima LPL en músculo gastrocnemios, no se vio afectada por ninguno de los tratamientos, independientemente de su forma de expresión (Figura 62).

Figura 61- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal (TAE)

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Figura 62- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA. Significancia estadística: $p < 0,05$.

II.4- Expresión del ARNm de biomoduladores del metabolismo lipídico/inflamatorio en tejido adiposo epididimal

En el estudio de la expresión del ARNm de las adipoquinas leptina y adiponectina, el análisis estadístico ANOVA (2x2) mostró que la expresión del ARNm de ambas citoquinas estuvo influenciada por la deprivación de AL y por la sustitución con CLA. En el análisis estadístico individual pudo observarse que la expresión del ARNm de la leptina fue reducida significativamente en los grupos deprivados en AL respecto a sus correspondientes grupos

controles. Contrariamente, la expresión del mensajero de la adiponectina estuvo aumentada en los grupos deprivados en AL y además, en deprivación de AL, la sustitución con CLA elevó aún más dichos niveles (Tabla 21).

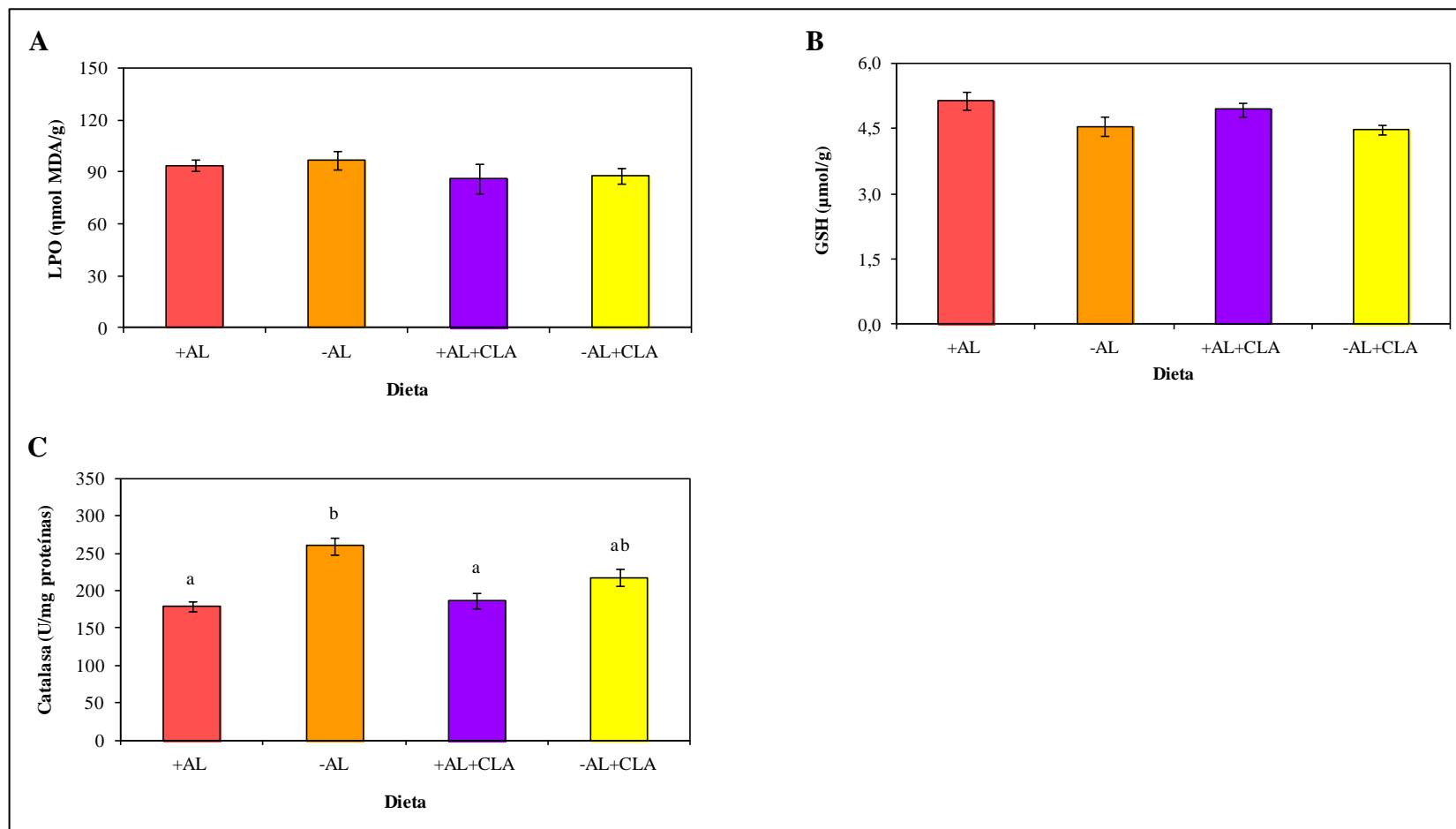
Los niveles de ARNm de TNF- α y de IL1- β fueron reducidos en el grupo $^{-}$ AL vs. $^{+}$ AL, y cuando CLA fue suplementado a las dietas los mismos alcanzaron valores semejantes al grupo $^{+}$ AL (Tabla 21).

II.5- Expresión de marcadores inflamatorios en hígado

La expresión del ARNm de TNF- α fue reducida por la sustitución con CLA en los animales con dietas enriquecidas en AL, pero no en las deprivadas de AL. Mientras que los niveles de ARNm de IL1- β fueron reducidos por la deprivación de AL, como por la presencia de CLA, sin poseer efecto aditivo alguno. La IL6 no estuvo afectada por ninguno de los tratamientos dietarios. El análisis estadístico individual mostró que los niveles de ARNm de IL1- β estuvieron reducidos significativamente en los grupos $^{-}$ AL y $^{+}$ AL+CLA respecto al grupo control, mientras que, los de TNF- α solo se vieron disminuidos significativamente en el grupo $^{+}$ AL+CLA. La IL6 no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales (Tabla 22).

II.6- Estrés oxidativo hepático

En el análisis estadístico ANOVA (2x2) del estrés oxidativo hepático se observó que la LPO no estuvo modificada por ninguno de los tratamientos dietarios. Los niveles GSH y la actividad de la enzima catalasa estuvieron afectados por la deprivación de AL ($p < 0,01$). El análisis estadístico individual, mostró un aumento en la actividad catalasa hepática en el grupo $^{-}$ AL respecto a su grupo control (Figura 63).

Figura 63- Grado de lipoperoxidación (LPO), niveles de glutatión (GSH) y actividad de la enzima catalasa en hígado

Grupos experimentales: +AL: enriquecida en ácido linoleico; -AL: deprivada de ácido linoleico; +AL+CLA: +AL sustituida parcialmente con CLA; -AL+CLA: -AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Tabla 21- Niveles de ARNm de biomoduladores del metabolismo lipídico/inflamatorio en tejido adiposo epididimal

Niveles de expresión ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+CLA	⁻ AL+CLA	AL	CLA	AL x CLA
Leptina	1,00±0,07 ^a	0,13±0,02 ^b	0,92±0,00 ^a	0,07±0,02 ^b	0,000	0,035	NS
Adiponectina	1,00±0,10 ^a	1,65±0,14 ^b	1,02±0,17 ^a	2,95±0,04 ^d	0,000	0,011	0,017
TNF- α	1,00±0,02 ^a	0,67±0,03 ^b	0,87±0,04 ^{ab}	0,95±0,09 ^a	0,018	NS	0,001
IL1- β	1,00±0,10 ^a	0,52±0,06 ^b	1,09±0,22 ^a	0,84±0,13 ^{ab}	0,006	NS	NS
IL6	1,00±0,08 ^a	1,38±0,05 ^b	1,30±0,09 ^a	1,35±0,14 ^a	0,028	NS	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. TNF- α : factor de necrosis tumoral- α ; IL1- β : interleuquina 1- β ; IL6: interleuquina 6. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Tabla 22- Niveles de ARNm de biomoduladores inflamatorio en hígado

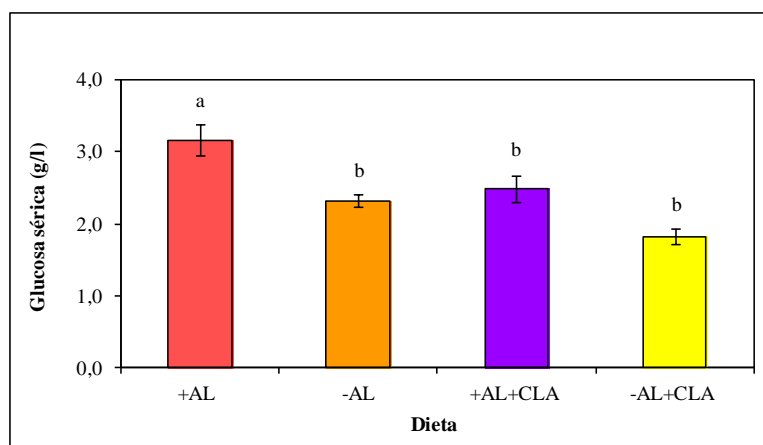
Niveles de expresión ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	Grupos Experimentales				2x2 ANOVA		
	⁺ AL	⁻ AL	⁺ AL+CLA	⁻ AL+CLA	AL	CLA	AL x CLA
TNF- α	1,00±0,06 ^a	0,77±0,18 ^{ab}	0,42±0,08 ^b	0,63±0,05 ^{ab}	NS	0,003	0,043
IL1- β	1,00±0,08 ^a	0,49±0,09 ^b	0,44±0,03 ^b	0,48±0,07 ^b	0,024	0,006	0,007
IL6	1,00±0,17	0,86±0,05	0,80±0,09	1,00±0,15	NS	NS	NS

Grupos experimentales: ⁺AL: enriquecida en ácido linoleico; ⁻AL: deprivada de ácido linoleico; ⁺AL+CLA: ⁺AL sustituida parcialmente con CLA; ⁻AL+CLA: ⁻AL sustituida parcialmente con CLA. TNF- α : factor de necrosis tumoral- α ; IL1- β : interleuquina 1- β ; IL6: interleuquina 6. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

II.7- Parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa

La concentración de glucosa en suero fue modificada tanto por la deprivación de AL ($p < 0,001$), como por los CLA ($p < 0,001$). En el análisis estadístico individual, todos los grupos tratados mostraron una disminución significativa en los niveles de glucemia respecto al control (Figura 64).

Figura 64- Niveles de glucosa sérica



Grupos experimentales: ^+AL : enriquecida en ácido linoleico; ^-AL : deprivada de ácido linoleico; ^+AL+CLA : ^+AL sustituida parcialmente con CLA; ^-AL+CLA : ^-AL sustituida parcialmente con CLA. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante un 2x2 ANOVA, seguido de test de Scheffe. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

Como fuera expresado en la Parte I de los Resultados, se evaluaron posibles alteraciones en el metabolismo de la glucosa a través del estudio de la capacidad de captación, incorporación y oxidación de la glucosa, y síntesis de glucógeno en músculo sóleo en condiciones basales (B) y bajo dos efectores: insulina (+I) y palmitato (+P).

En la Tabla 23 se muestra la capacidad de captación de glucosa en músculo soleo bajo condiciones basales y en presencia de efectores: insulina, palmitato e insulina + palmitato (+I+P). En condiciones basales, en el análisis individual de las diferencias se observó que la captación de glucosa sólo mostró una tendencia a incrementar sus valores en los grupos ^-AL y ^+AL+CLA en comparación con el grupo ^+AL , y alcanzó significancia estadística en el grupo ^-AL+CLA . Independientemente del tratamiento dietario, la incubación de los músculos en presencia de insulina incrementó la captación de glucosa frente a los respectivos valores basales; no obstante, respecto al grupo ^+AL , la misma tendió a decrecer en el grupo ^-AL y ^-AL+CLA , y disminuyó significativamente

en el grupo ^+AL+CLA . Estos cambios se tornan más evidentes cuando expresamos la respuesta a la insulina como incremento de su valor basal (+I/B), denotando diferencias significativas en los grupos ^+AL+CLA y ^-AL+CLA vs el grupo ^+AL . La adición de palmitato no produjo una significativa inhibición de la captación de glucosa, no obstante, se perdieron las diferencias entre los distintos grupos dietarios existentes en condiciones basales. Esto también se refleja en la falta de diferencias en la respuesta de la captación de glucosa relativa a las condiciones basales (+P/B). La adición de palmitato en presencia de insulina (+I+P) denota una inhibición parcial, pero significativa de la estimulación por la insulina (+I) en los grupos ^+AL y ^-AL , pero no en los grupos ^+AL+CLA y ^-AL+CLA . La respuesta frente al valor basal de la adición de palmitato en presencia de insulina (+I+P/B), respecto al grupo ^+AL , tendió a disminuir en los grupos ^-AL y ^+AL+CLA , y alcanzó diferencias significativas en el grupo ^-AL+CLA .

Tabla 23- Captación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato

	^+AL	^-AL	^+AL+CLA	^-AL+CLA	ANOVA		
					AL	CLA	AL x CLA
B	1,88±0,05 ^a	2,22±0,17 ^{ab}	2,21±0,08 ^{ab}	2,65±0,15 ^b	0,009	0,011	NS
+I	5,30±0,15 ^{a*}	4,75±0,35 ^{ab*}	4,13±0,25 ^{b*}	4,43±0,18 ^{ab*}	NS	0,01	NS
+P	1,96±0,09	1,96±0,07	2,11±0,15	2,11±0,06	NS	NS	NS
+I+P	3,88±0,07 ^{*#}	3,37±0,09 ^{*#}	3,52±0,36 [*]	3,67±0,27 [*]	NS	NS	NS
+I/B	2,82±0,10 ^a	2,18±0,19 ^{ab}	1,88±0,15 ^b	1,69±0,13 ^b	0,017	0,000	NS
+P/B	1,05±0,07	0,90±0,06	0,97±0,09	0,81±0,06	NS	NS	NS
+I+P/B	2,07±0,07 ^a	1,55±0,11 ^{ab}	1,61±0,19 ^{ab}	1,40±0,13 ^b	0,016	0,041	NS

Grupos experimentales: ^+AL : enriquecida en ácido linoleico; ^-AL : deprivada de ácido linoleico; ^+AL+CLA : ^+AL sustituida parcialmente con CLA; ^-AL+CLA : ^-AL sustituida parcialmente con CLA. B: condiciones basales; +I: con el agregado de insulina; +P: con el agregado de palmitato. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM, n = 4 por grupo. El análisis estadístico para cada una de las condiciones experimentales entre los distintos grupos se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido de test de Scheffe. Valores en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). El análisis estadístico entre las diferentes condiciones experimentales en cada uno de los grupos se realizó mediante un test t de student. Diferencias estadísticas significativas (p < 0,05) de las condiciones +I, +P y +I+P frente a las condiciones basales (B) se representan mediante *, y de +I+P frente a +I con #.

La incorporación de glucosa (Tabla 24) en condiciones basales en el grupo ^-AL+CLA fue mayor que en el grupo ^+AL y la insulina estimuló dicho parámetro en todos los grupos. En forma semejante a los resultados de captación de glucosa, respecto al grupo ^+AL , la incorporación de glucosa en presencia de insulina tendió a decrecer en el grupo ^-AL y decreció significativamente en

los grupos $^{+}$ AL+CLA y $^{-}$ AL+CLA. Como consecuencia de los cambios descritos, la respuesta a la insulina (+I/B) fue notoriamente menor en los grupos $^{-}$ AL, $^{+}$ AL+CLA y $^{-}$ AL+CLA respecto al grupo $^{+}$ AL. En forma análoga a la captación de glucosa, la adición de palmitato no ejerció un efecto inhibitorio sobre la incorporación de glucosa frente a los resultados basales, asimismo una ausencia de diferencias entre los distintos grupos dietarios también fue encontrada. La adición de palmitato en presencia de insulina (+I+P) inhibió el efecto sobre la incorporación de glucosa observado por la adición de insulina (+I) en los grupos $^{+}$ AL y $^{-}$ AL, pero no en los grupos $^{+}$ AL+CLA y $^{-}$ AL+CLA. Sin embargo, no se observaron diferencias entre los distintos grupos dietarios, como tampoco en la respuesta relativa al valor basal (+I+P/B).

Tabla 24- Incorporación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato

	$^{+}$ AL	$^{-}$ AL	$^{+}$ AL+CLA	$^{-}$ AL+CLA	ANOVA		
					AL	CLA	AL x CLA
B	2,02±0,09 ^a	2,18±0,15 ^{ab}	2,22±0,13 ^{ab}	2,62±0,10 ^b	0,036	0,019	NS
+I	5,33±0,19 ^{a*}	4,21±0,26 ^{ab*}	4,07±0,21 ^{b*}	4,02±0,39 ^{b*}	NS	0,020	NS
+P	2,01±0,12	1,78±0,15	2,16±0,10	2,29±0,26	NS	NS	NS
+I+P	3,40±0,24 ^{*#}	3,23±0,07 ^{*#}	3,87±0,14 [*]	3,77±0,31 [*]	NS	0,035	NS
+I/B	2,67±0,17 ^a	1,94±0,12 ^b	1,84±0,10 ^b	1,53±0,15 ^b	0,003	0,001	NS
+P/B	1,00±0,05	0,83±0,10	0,99±0,09	0,87±0,07	NS	NS	NS
+I+P/B	1,71±0,18	1,49±0,07	1,75±0,07	1,44±0,14	NS	NS	NS

Grupos experimentales: $^{+}$ AL: enriquecida en ácido linoleico; $^{-}$ AL: deprivada de ácido linoleico; $^{+}$ AL+CLA: $^{+}$ AL sustituida parcialmente con CLA; $^{-}$ AL+CLA: $^{-}$ AL sustituida parcialmente con CLA. B: condiciones basales; +I: con el agregado de insulina; +P: con el agregado de palmitato. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM, n = 4 por grupo. El análisis estadístico para cada una de las condiciones experimentales entre los distintos grupos se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido de test de Scheffe. Valores en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). El análisis estadístico entre las diferentes condiciones experimentales en cada uno de los grupos se realizó mediante un test t de student. Diferencias estadísticas significativas (p < 0,05) de las condiciones +I, +P y +I+P frente a las condiciones basales (B) se representan mediante *, y de +I+P frente a +I con #.

Como puede observarse en la Tabla 25, los CLA presentaron una mayor capacidad de oxidación de la glucosa en el músculo soleo en condiciones basales. La adición de insulina en el medio de incubación sólo incrementó la oxidación de glucosa en el grupo $^{+}$ AL respecto a su valor basal, y esto se denota muy claramente en la elevada relación +I/B. La adición de palmitato en el grupo $^{+}$ AL redujo la oxidación de glucosa frente a los valores basales, aunque la misma no alcanzó diferencias significativas; esta tendencia no se observó en los grupos $^{-}$ AL, $^{+}$ AL+CLA y $^{-}$ AL+CLA.

Los grupos $^{+}AL+CLA$ y $^{-}AL+CLA$ mostraron, bajo estas condiciones, mayor oxidación de glucosa que los grupos ^{+}AL y ^{-}AL . La adición de palmitato en el medio de incubación con insulina (+I+P) en el grupo ^{+}AL , inhibió significativamente el efecto de la insulina (+I), y no modificó los escasos efectos de la insulina observados previamente en los demás grupos experimentales.

Tabla 25- Oxidación de la glucosa en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato

	^{+}AL	^{-}AL	$^{+}AL+CLA$	$^{-}AL+CLA$	ANOVA		
					AL	CLA	AL x CLA
B	0,40±0,06 ^a	0,46±0,08 ^a	0,71±0,09 ^b	0,95±0,10 ^b	NS	0,000	NS
+I	1,08±0,03 ^{a*}	0,43±0,10 ^b	0,95±0,06 ^a	1,15±0,18 ^a	NS	0,013	0,001
+P	0,28±0,04 ^a	0,40±0,03 ^a	0,77±0,11 ^b	0,80±0,11 ^b	NS	0,000	NS
+I+P	0,39±0,02 ^{a#}	0,40±0,10 ^a	0,84±0,11 ^{ab}	1,13±0,15 ^b	NS	0,000	NS
+I/B	2,51±0,19 ^a	1,12±0,31 ^b	1,47±0,18 ^b	1,42±0,37 ^b	0,009	NS	0,017
+P/B	0,84±0,20	1,18±0,42	1,23±0,26	0,87±0,10	NS	NS	NS
+I+P/B	1,23±0,34	0,91±0,20	1,24±0,16	1,24±0,18	NS	NS	NS

Grupos experimentales: ^{+}AL : enriquecida en ácido linoleico; ^{-}AL : deprivada de ácido linoleico; $^{+}AL+CLA$: ^{+}AL sustituida parcialmente con CLA; $^{-}AL+CLA$: ^{-}AL sustituida parcialmente con CLA. B: condiciones basales; +I: con el agregado de insulina; +P: con el agregado de palmitato. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM, n = 4 por grupo. El análisis estadístico para cada una de las condiciones experimentales entre los distintos grupos se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido de test de Scheffe. Valores en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). El análisis estadístico entre las diferentes condiciones experimentales en cada uno de los grupos se realizó mediante un test t de student. Diferencias estadísticas significativas (p < 0,05) de las condiciones +I, +P y +I+P frente a las condiciones basales (B) se representan mediante *, y de +I+P frente a +I con #.

La síntesis de glucógeno en músculo soleo (Tabla 26) no mostró diferencias significativas en los diferentes tratamientos dietarios bajo condiciones basales. El agregado de insulina incrementó significativamente, y en distinta medida, dicho parámetro en todos los grupos dietarios, conduciendo a valores inferiores en los grupos ^{-}AL , $^{+}AL+CLA$ y $^{-}AL+CLA$ respecto al grupo ^{+}AL . La incubación del músculo soleo en presencia de palmitato produjo ligeros efectos sobre la síntesis de glucógeno. Específicamente, sólo se observó una reducción de dicho parámetro en el grupo ^{-}AL respecto al valor basal. La adición de palmitato en presencia de insulina (+I+P) atenuó la estimulación de la síntesis de glucógeno observada por esta hormona en el grupo ^{+}AL ; no obstante, el efecto inhibitorio del palmitato no fue observado en los animales de los grupos ^{-}AL , $^{+}AL+CLA$ y $^{-}AL+CLA$.

Tabla 26- Síntesis de glucógeno en condiciones basales y en presencia de los efectores insulina y palmitato

	+AL	-AL	+AL+CLA	-AL+CLA	ANOVA		
					AL	CLA	AL x CLA
B	0,45±0,02	0,50±0,07	0,42±0,01	0,64±0,07	0,026	NS	NS
+I	2,00±0,06 ^{a*}	1,09±0,07 ^{b*}	1,36±0,14 ^{b*}	1,22±0,21 ^{b*}	0,002	NS	0,015
+P	0,48±0,03	0,39±0,04 [*]	0,37±0,03	0,45±0,09	NS	NS	NS
+I+P	0,90±0,03 ^{*#}	0,81±0,10 [*]	1,21±0,25 [*]	1,24±0,13 [*]	NS	0,031	NS
+I/B	4,45±0,17 ^a	2,27±0,20 ^{bc}	3,26±0,38 ^b	1,94±0,31 ^c	0,000	0,018	NS
+P/B	1,08±0,11	0,81±0,12	0,88±0,08	0,70±0,09	0,049	NS	NS
+I+P/B	2,01±0,05 ^{ab}	1,63±0,06 ^a	2,93±0,43 ^b	2,02±0,22 ^{ab}	0,015	0,015	NS

Grupos experimentales: +AL: enriquecida en ácido linoleico; -AL: deprivada de ácido linoleico; +AL+CLA: +AL sustituida parcialmente con CLA; -AL+CLA: -AL sustituida parcialmente con CLA. B: condiciones basales; +I: con el agregado de insulina; +P: con el agregado de palmitato. Los resultados son presentados como el promedio ± SEM, n = 4 por grupo. El análisis estadístico para cada una de las condiciones experimentales entre los distintos grupos se realizó mediante un 2x2 ANOVA seguido de test de Scheffe. Valores en la misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes (p<0,05). El análisis estadístico entre las diferentes condiciones experimentales en cada uno de los grupos se realizó mediante un test t de student. Diferencias estadísticas significativas (p < 0,05) de las condiciones +I, +P y +I+P frente a las condiciones basales (B) se representan mediante *, y de +I+P frente a +I con #.

Discusión

Caracterización del modelo experimental

En el presente trabajo se estudiaron los efectos diferenciales de la sustitución con aceites ricos en AGT o CLA sobre aspectos nutricionales, del metabolismo lipídico y algunos relacionados al metabolismo glucídico en ratas alimentadas con dietas enriquecidas o deprivadas en AL. A nuestro conocimiento, no existen estudios que hayan evaluado aspectos metabólico-nutricionales de la combinación de estas variables. Específicamente, dietas desbalanceadas en AG de las familias n-6/n-3 son características de la población occidental, y estos desbalances, que originan una problemática en muchos países, coexisten con grupos poblacionales de bajas ingestas de AGE. Asimismo, durante las últimas décadas ha cobrado gran importancia el estudio de los efectos nutricionales de los isómeros de AG, tanto de los AGT, por sus conocidos efectos deletéreos, como de los CLA por sus controvertidas propiedades funcionales. En los aspectos nutricionales, el desarrollo del presente trabajo se focalizó en estudios de ganancia de peso, eficiencias dietarias, cambios en la adiposidad y en la composición corporal. Respecto al metabolismo lipídico, se puntualizó en la incorporación tisular de diferentes AG, en los perfiles de lípidos plasmáticos y tisulares, en los mecanismos de regulación de TG tisulares y en el potencial desarrollo de un estado inflamatorio. En relación al metabolismo de la glucosa, se estudiaron la captación, incorporación y oxidación de la misma, y la síntesis de glucógeno en músculo soleo aislado.

Para investigar las 2 condiciones propuestas para la variable AL, se utilizaron dos tipos de aceites comestibles: 1) aceite maíz, el cual contiene altos niveles de AL y bajos de ALA, con un claro desbalance de la relación n-6/n-3, y cuyo perfil en AGE en cierta medida, tienden a mimetizar los desequilibrios observados en la dieta consumida por la población occidental; y 2) aceite de coco altamente hidrogenado, el cual es deprivado en AL, al mismo tiempo que en ALA. Así, la principal diferencia entre ambos aceites radica en los niveles de AL. Independientemente de las variaciones en su composición lipídica, las dietas estuvieron basadas en las recomendaciones de formulación AIN-93G (Reeves, 1993). Específicamente, para la modificación de la fuente de aceite se siguieron las recomendaciones de la dieta AIN-76 (1973). En relación a esta diferencia en la composición de las grasa dietarias, Lien y col. (2001) en ratas alimentadas durante 13 semanas con las dietas AIN-93G y AIN-76 encontraron que ambas promovían el normal crecimiento y desarrollo de los animales, y que ninguna causaba efectos toxicológicos. En concordancia con esto, nuestros animales no mostraron manifestaciones toxicológicas en ninguno de los tratamientos dietarios recibidos y presentaron una similar ingesta de alimento diaria y, por ende, una similar ingesta energética, como así también, una equivalente ganancia de peso.

Por otro lado, dado que manifestaciones severas de una deficiencia de AGE podrían solapar las inducidas por la ingesta de AGT o CLA, en nuestro modelo experimental procuramos inducir un déficit marginal de AL, alimentando los animales durante un período de tiempo relativamente corto con las dietas deprivadas en AL. El clásico síndrome de deficiencia marcada de AGE en tratamientos a largo plazo (de 8 a 14 semanas) (Ling y col., 2010), ha sido caracterizado desde décadas atrás por ciertas manifestaciones tales como: descamación cutánea en las patas y cola (Burr y Burr, 1930), fragilidad capilar (Kramar y Levin, 1953), aumento de la permeabilidad capilar (Ramalingaswami y Sinclair, 1953), alopecia, lesiones oculares, retraso en el crecimiento (Deuel y col., 1955) y defectos en la capacidad reproductiva (Alfin-Slater y Bernick, 1958). Cabe destacar que según Lauritzen y col. (2001) muchos de los síntomas clásicos de la deficiencia marcada de AGE antes mencionados (dermatitis, retardo en el crecimiento, infertilidad) pueden ser revertidos suplementando las dietas sólo con AG de la familia n-6, ya que éstos síntomas, se relacionan principalmente con las funciones biológicas de los AG n-6 y sus derivados de cadena larga. En el presente trabajo, los animales no presentaron ninguna de las manifestaciones antes descritas propias de la deficiencia marcada de AGE, mostrando un buen estado de salud a lo largo de todo el tratamiento experimental y logrando un óptimo desarrollo y crecimiento.

Es importante destacar que, a pesar de ser similar la ingesta de grasa en todos los grupos, en ambos grupos deprivados de AL hubo una reducción en la excreción fecal de grasa debido a un aumento en la absorción aparente de grasa dietaria. Estos resultados no están de acuerdo con los reportados por otros autores (Minich y col., 1997; Werner y col., 2002) quienes han mostrado una malabsorción de grasa en animales deficientes en AGE y consecuentemente una menor ganancia de peso corporal. Esto podría estar relacionado a las diferencias en los protocolos experimentales empleados. Probablemente, en los primeros estadios de deprivación de AL, hay una respuesta compensadora de los animales tendiendo a aumentar la absorción de AGE. Esta hipótesis es avalada por los estudios de Werner y col. (2002) quienes observaron en animales deficientes vs. animales no deficientes en AGE que, el coeficiente de absorción de grasa es similar para los AGE y menor para los AG no esenciales. Esta propuesta no excluye que la mayor absorción intestinal sea también debida a la diferencial velocidad de absorción de los AG constitutivos de las dietas, la cual es menor cuando el número de insaturaciones y/o largo de cadena es mayor (Bernard y Carlier, 1991).

No obstante lo anteriormente descrito, los biomarcadores de deficiencia de AGE se correlacionaron con el status de AL. Es conocido que los niveles de AG presentes en los distintos tejidos y órganos dependen, principalmente, de la cantidad ingerida y de los procesos metabólicos que puedan sufrir dentro de los mismos. En nuestro modelo experimental de animales alimentados

con dietas enriquecidas en AL, no hemos detectado el ácido Mead, característico biomarcador de deficiencia de AGE en suero y tejidos. En cambio, el mismo estuvo presente en hígado, músculo y suero de los grupos deprivados de AL, conduciendo a elevados niveles de la relación trieno/tetraeno. Por otro lado, si bien es conocido que células de tejido adiposo pueden acumular ácido Mead (Hyman y col., 1981), en el presente modelo experimental éste no fue detectado, y es probable que se deba a que, a bajos niveles de AL en circulación, se produzca una liberación de AGPI desde el tejido adiposo hacia circulación que tiende a compensar el déficit. Es importante considerar que, si bien el ácido Mead no es un sustrato para la formación de eicosanoides, el mismo puede ser liberado a circulación para suplir a los AGPI de las familias n-6 y n-3 en las membranas biológicas (Lord y Bralley, 2008). Además, en nuestra experiencia, los animales de los grupos cuyas dietas fueron enriquecidas en AL, pese al desbalance que el aceite de maíz presenta en la relación AL/ALA, mostraron niveles mayores de AL y ALA que los animales que recibieron dietas deprivadas en AL, en la mayoría de los tejidos analizados. Por otro lado, las relaciones de AL/ALA y los niveles tisulares de AGE han sido considerados desde hace varias décadas un índice bioquímico de deficiencia de AGE (Holman, 1968). No obstante, las manifestaciones clínicas de la deficiencia de AGE, generalmente no son observadas hasta que la relación trieno/tetraeno es $> 0,4$ (Holman, 1960; 1971; 1978). Así, siendo en nuestro trabajo dicha relaciones $< 0,4$, nuestros resultados son compatibles con la falta de manifestaciones observadas en los animales de experimentación deprivados de AL.

Esta incrementada biosíntesis de ácido Mead, estuvo asociado a un incremento en la biosíntesis de AG de las familias n-6 y n-3, expresados por las relaciones producto/sustratos: AA/AL y DHA/ALA, respectivamente. Estos resultados son compartidos por otros autores. Entre ellos, Hjelte y col. (1999), quienes encontraron una mayor interconversión de AL a AA bajo condiciones de deficiencia de AGE en hígado e intestino de ratas, como también, Melin y Nilsson (1997) quienes encontraron en células HepG2 deficientes en AGE una mayor interconversión del AL.

No obstante, nuestros resultados de flujos a través de enzimas claves son diferentes a los mecanismos propuestos por diversos autores. En nuestras experiencias la deprivación en AL disminuyó la relación hepática de AA/DGLA, denotando así una disminución en la actividad de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa. Esto no está de acuerdo con lo reportado por Melin y col. (1997) en células HepG2, ni por Blond y col. (1991) en microsomas de ratas, quienes encontraron un aumento en la $\Delta 5$ -desaturasa bajo deficiencia de AGE. Además, es conocido que la actividad de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, clave en la biosíntesis de AGPI-CL, aumenta en deficiencia de AGE (Hjelte y col.,

1991; Dinh y col., 1993; Li y col., 2005; Tu y col., 2010). En nuestro trabajo, la relación producto/sustrato, GLA/AL, indicadora del flujo a través de la $\Delta 6$ -desaturasa hepática, no estuvo modificada. Nuestros resultados en conjunto, nos inducen a sugerir que la mayor interconversión de AL a AA, podría ser debida, al menos en parte, a una mayor actividad de la elongasas que convierten AA y EPA en 22:4 n-6 y 22:5 n-3 (ácido docosapentaenoico -DPA-), respectivamente. En relación a esto, ha sido demostrado que ambas elongasas, 2 y 5, pueden catalizar esta conversión, aunque es poco claro si una o ambas contribuyen a esta biosíntesis (Zadravec y col., 2011; Moon y col., 2009). Así, se ha demostrado que dietas conteniendo niveles muy bajos de AGPI-CL resultan en una elevación en la expresión de la elongasa 2 (Mantzioris y col., 1994; Tu y col., 2010). Por otro lado, Gibson y col. (2011) encontraron que, dietas conteniendo altos niveles de AL y/o ALA tienen la capacidad de inhibir la síntesis de DHA, ya que compiten con el 24:5 n-3 por la $\Delta 6$ -desaturasa. De esta forma, en el presente trabajo, los bajos niveles dietarios de AL en el grupo privado podrían, comparativamente al grupo enriquecido en AL, aumentar la síntesis de DHA y así, desplazar las enzimas hacia esta vía, por la cual es sabido que poseen mayor afinidad (Holman y col., 1964; Innis, 1991; Sardesai, 1992). Además, el hecho de que no se hayan podido cuantificar los niveles de EPA, podría estar indicando, que éste metabolito fue rápidamente, y con gran avidez, transformado en DPA vía elongasas. Finalmente, es conocido el hecho de que los sustrato AL y ALA pueden generar, por una vía alternativa previa a la desaturación, productos de elongación, conduciendo a la formación de los AG: 11c,14c-20:2 y 11c,14c,17c-20:3, respectivamente, los cuales pueden ser convertidos a DGLA y 20:4 n-3 mediante una $\Delta 8$ -desaturasa (Park y col., 2009; Huang y col., 2011). Así, los niveles aumentados de 11c,14c,17c-20:3 (vía elongación) junto con niveles no detectables del 11c,14c-20:2, podrían también estar indicando, un desplazamiento de las enzimas hacia la síntesis de AGPI-CL de la familia n-3. De esta forma, la mayor acción de las enzimas sobre la familia de AG n-3 podría estar frenando la síntesis del AG 22:4 n-6 (metabolito no identificado en nuestro trabajo) a partir del AA, acumulándose éste último y aumentando sus niveles.

Por otro lado, en el músculo gastrocnemio, la biosíntesis de AGPI-CL n-6 y n-3 no fue alterada por la privación de AL y la misma pareciera estar asociada a una disminución del flujo de sustrato a través de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa expresada por la disminuida relación AA/DGLA, la cual es compensada por un aumento en el flujo de sustratos a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa. Al menos a nuestro conocimiento, no existen estudios que demuestren efectos de la deficiencia de AGE y actividad de enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasas en músculo esquelético. Finalmente, como

resultado de estos múltiples mecanismos tendientes a compensar la deprivación de AL, los niveles séricos de las relaciones AA/AL y DHA/ALA no estuvieron alterados en el grupo deprivado en AL.

Además, como era de esperar en el modelo de animales alimentados con dietas deprivadas en AL, el perfil de los AG en los diferentes tejidos y en el suero, mostró un aumento de los niveles de los AGS. Claramente, esta diferencia se debe a las distintas cantidades ingeridas con las dietas experimentales.

Así, una vez presentado el modelo experimental, y dado que nuestro interés fue evaluar los efectos diferenciales de los AGT y CLA en dos status diferentes de AL, de ahora en adelante, la discusión de la presente tesis se centrará, principalmente, en los grupos enriquecidos y deprivados de AL sustituidos parcialmente con algunos de los isómeros en estudio.

PARTE I

Efecto de la sustitución parcial con ácidos grasos *trans* a dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico

I.1- Parámetros nutricionales

Existen resultados experimentales controversiales sobre el efecto de los AGT en la acumulación de grasa y la ganancia de peso corporal. Mientras en estudios previos hemos demostrado que ratas Wistar alimentadas con dietas enriquecidas en AGT a elevados niveles de grasa (20%) presentan una mayor acumulación de tejido adiposo visceral sin cambios en la ganancia de peso corporal (Colandré y col., 2003), los presentes resultados, coincidentemente con otros autores (Dorfman y col., 2009), muestran que ambos grupos suplementados con AGT aumentaron la ganancia de peso corporal, asociado a un mayor depósito de grasa visceral, y una tendencia a mayor acumulo en carcasa. Estas diferencias pudieron ser debidas a que en el trabajo de Colandré y col. (2003) se utilizaron grasas isomerizadas ricas en AE a altos niveles de grasa dietaria, mientras que en el presente trabajo, los AGT fueron obtenidos a partir de PHVO comercial caracterizado por una prevalencia de isómeros: 9*t*-18:1; 10*t*-18:1 y 11*t*-18:1 a niveles recomendados de grasa dietaria. En contraposición, diversos autores en ratas (Giudetti y col., 2003; Kraft y col., 2011) han encontrado una mayor eficiencia energética generada por la sustitución con AGT, sin modificaciones en la ganancia de peso; mientras que en ratones (Atal y col., 1994; Machado y col., 2010) se ha observado una menor ganancia de peso y acumulación grasa.

I.2- Contenido y retención de isómeros de ácidos grasos *trans* en tejidos. Efecto sobre los biomarcadores de deficiencia de ácidos grasos esenciales

Los niveles de los distintos isómeros individuales en los tejidos pueden tener una elevada implicancia en el desarrollo y/o prevención de alteraciones características de enfermedades crónicas no transmisibles. Es sabido que los AGT son incorporados en suero, hígado, músculo y tejido adiposo mostrando diferentes niveles dependiendo del tipo de isómero *trans*, del tejido analizado y de las condiciones experimentales (Dorfman y col., 2009), como asimismo de la cantidad ingerida y de los procesos metabólicos que puedan sufrir.

En el presente trabajo, los niveles de AGT totales alcanzados en tejido adiposo fueron mayores que los de hígado, músculo y suero. Estos resultados fueron compartidos por otros autores, lo que condujo a Baylin y col. (2002) a proponer el concepto de que los niveles de AGT en este tejido podrían ser utilizados como un biomarcador apropiado de la ingesta crónica de AGT. Por otra parte, es importante denotar que el status de AL influyó diferencialmente en el contenido de los isómeros individuales, reduciendo los niveles de estos, dependiendo del tejido e isómero considerado. No tenemos una explicación referencial que soporte este efecto; sin embargo, podría estar asociado a una competencia tisular entre los AGT y los AGS de cadena corta presentes en las

dietas deprivadas en AL. Este mecanismo ha sido demostrado por Bernard y Carlier (1991) a nivel intestinal.

Dado que el contenido dietario de AGT individuales fue diferente, hemos relativizado los niveles tisulares de cada uno de ellos a través de la retención porcentual. Esto es, la relación entre el porcentaje de cada isómero presente en el tejido/el porcentaje de dicho isómero en la dieta. Así, en los animales que recibieron dietas suplementadas con AGT, la baja retención de 10*t*-18:1 podría estar relacionada a una mayor tasa oxidativa de este isómero. A pesar de que no existe información respecto a la tasa oxidativa del isómero individual 10*t*-18:1, nuestra hipótesis estaría respaldada por los hallazgos de Banni y col. (2004a), quienes demostraron que la tasa de metabolización del isómero 10*t*,12*c*-CLA en los peroxisomas es mayor que la del 9*c*,11*t*-CLA. Los potenciales efectos que el isómero 10*t*-18:1 podría tener sobre la salud son inciertos, no existiendo, a nuestro conocimiento, bibliografía que reporte resultados hallados de éste isómero individual.

Por otro lado, el 9*t*-18:1 ha sido el isómero retenido en mayor grado en todos los tejidos evaluados, y esto puede estar relacionado a la menor tasa de oxidación del AE respecto a otros *trans*-18:1, como fuera observado en células hepáticas de ratas (Du y col., 2010). Numerosas correlaciones han sido encontradas entre niveles de 9*t*-18:1 y alteraciones metabólicas, no obstante la asociación con los niveles de colesterol circulante, y por ende, al riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares han sido las que más repercusión han tenido (Nestel y col., 1992; Abbey y Nestel, 1994; Stender y col., 2008).

Bajo nuestras condiciones experimentales, el isómero 11*t*-18:1 fue retenido en cantidades moderadas en relación a los demás isómeros *trans*-18:1. Esto también ha sido observado en humanos (Adlof y col., 2000; Glaser y col., 2002; Loor y col., 2002), sugiriendo que el AV es rápidamente oxidado o convertido en AR. Santora y col. (2000) en ratones alimentados con AV puro encontraron que el AR, obtenido a partir de su desaturación, se encontraba sólo en los TG, mientras que cuando los animales eran alimentados directamente con el CLA, éste se encontraba en ambos, TG y FL, sugiriendo que la desaturación ocurre principalmente en el tejido adiposo. En el presente trabajo, el AR en tejido adiposo alcanzó mayores niveles que en hígado, no obstante la conversión de AV a AR estimada por las relaciones producto/sustratos, no mostró diferencias significativas sugiriendo, a diferencia de Santora y col. (2000), que tanto el hígado como el TA podrían tener una elevada actividad Δ 9-desaturasa. Además, el grado de conversión puede estar influenciado por los niveles dietarios de AGPI y, en animales, se ha demostrado que los AGPI suprimen la actividad de la Δ 9-desaturasa (Ntambi y col., 1999). En ratones alimentados con AV, Santora y col. (2000) encontraron que aumentando la cantidad de AGPI de un 4% a un 10 %, la

conversión de AV a AR decrecía un 30%. Estos hallazgos están en paralelo a nuestros resultados de hígado y tejido adiposo, en los que la deprivación de AL incrementó la conversión de 11*t*-18:1 a 9*c*,11*t*-CLA.

Numerosos estudios confieren los efectos benéficos del AV a su conversión *in vivo* a 9*c*,11*t*-CLA (Glaser y col., 2000; Santora y col., 2000; Loor y col., 2002; Chardigny y col., 2007). Los resultados hallados respecto a los potenciales efectos benéficos del AV sobre la salud en humanos son contradictorios. Por un lado, Gebauer y Chardigny (2011) concluyeron que, a pesar de que la información a partir de modelos experimentales sugiere que el AV puede afectar benéficamente el riesgo de enfermedad cardiovascular y cáncer, se necesitan más investigaciones para determinar los efectos del AV y del 9*c*,11*t*-CLA en humanos.

Los niveles de ácido Mead y la relación trieno/tetraeno denotaron la deficiencia de AGE en la dietas deprivadas en AL. Llamativamente, la sustitución con AGT en los animales deprivados de AL, redujo los niveles de ácido Mead en hígado y mostraron la misma tendencia en suero, con el consecuente descenso de las relaciones trieno/tetraeno. Probablemente, esto estaría asociado a que las enzimas involucradas en la síntesis del ácido Mead presentan cierta afinidad por los AGT, participando en su metabolización, a expensas de la síntesis de dicho marcador de deficiencia. Además, hemos encontrado que la sustitución con AGT a la dieta enriquecida en AL redujo los niveles de AL en hígado y suero, y de AL y ALA en tejido adiposo epididimal; no habiendo sido alterados los niveles de dichos AG en el músculo. Si bien es ampliamente conocido el hecho de que los AGT alteran el metabolismo de los AGE y de esta forma la biosíntesis de AGPI-CL (Privett y col., 1977; Hill y col., 1979; Hill y col., 1982; Kinsella y col., 1981; Koletzko, 1992; Kummerow y col., 2004), a partir de nuestros resultados es posible postular la existencia de una sustitución de los AGE por los AGT en los tejidos.

Por otro lado, análisis comparativos han demostrado que la naturaleza química de los AG tales como: largo de cadena, número y posición de los dobles enlaces, tiene un profundo impacto en el ensamble y secreción de VLDL (Sundaram y Yao, 2010), condicionando el perfil de AG endógenos que son vertidos al torrente sanguíneo. A partir del perfil de AG que hemos observado en las partículas de TG-VLDL podemos inferir que, en términos generales, los patrones de cambios de los AG secretados son semejantes a aquellos observados en el hígado.

I.3- Triglicéridos circulantes y su regulación

En el análisis del metabolismo lipídico, resulta de particular interés el estudio tanto de los niveles de los TG circulantes como de su regulación, debido a las importantes implicancias que tienen sobre la salud. Los niveles de TG plasmáticos se ven regulados por el equilibrio entre la secreción hepática de VLDL y remoción plasmática de TG por el músculo esquelético y tejido adiposo. En el presente trabajo, los niveles séricos de TG tendieron a disminuir, sin alcanzar diferencias significativas, por la sustitución con AGT en la dieta enriquecida en AL. Esta ligera disminución de los TG circulantes pudo estar relacionado a la mayor actividad LPL en tejido adiposo, dado que tanto la actividad LPL muscular, como la secreción hepática de TG no fueron alteradas. El mismo efecto a nivel de tejido adiposo ha sido observado por Assumpção y col. (2004) en ratas hembras post-parto alimentadas con PHVO, lo cual estuvo acompañado de un aumento en el contenido de lípidos, como fuera también denotado en el tejido adiposo epididimal y retroperitoneal de nuestros animales de experimentación.

Estos resultados no están de acuerdo con los reportados por Machado y col. (2010), como tampoco por los reportados anteriormente por nuestro grupo de trabajo (Colandré y col., 2003), donde los AGT aumentaron los niveles circulantes de TG. Este efecto podría estar asociados al empleo de grasas isomerizadas ricas en AE a altos niveles de grasa dietaria; mientras que, en el presente trabajo, los AGT fueron obtenidos a partir de PHVO comercial, donde los isómeros prevalentes fueron 9*t*-18:1, 10*t*-18:1 y 11*t*-18:1 a niveles recomendados de grasa dietaria. Existen controversiales y escasos reportes en referencia a los efectos de los isómeros individuales de AGT sobre la regulación de lípidos, más específicamente sobre los niveles de TG plasmáticos. En este sentido, Wang y col. (2008) demostraron que el AV decrece los niveles de TG séricos en ratas obesas respecto a su correspondiente control. De esta forma, parece claro que el AV no tiene los efectos deletéreos que son reportados para el AE, más aún, podría mejorar los efectos negativos de éste último. Así, podemos inferir que en nuestra experiencia, los efectos negativos del AE podrían ser atenuados por la influencia del AV y, posiblemente, por el AR sintetizado a partir de éste.

Diferencialmente, en los animales deprivados de AL, la sustitución con AGT incrementó los niveles de TG circulantes posiblemente como resultado de la disminución en la clarificación de los TG observada a nivel de tejido adiposo; la cual, en nuestro modelo experimental, pareciera jugar un rol más importante en la regulación de los TG circulantes que la secreción hepática de TG. Así también, Saravanan y col. (2005) en ratas alimentadas con una dieta conteniendo PHVO, encontraron que los AGT en TAE deprimen la síntesis del ARNm de la LPL independientemente de los niveles de AL dietario.

I.4- Niveles de colesterol y fosfolípidos circulantes

Los niveles de FL y Col séricos no fueron modificados por los AGT en las dietas enriquecidas, ni en las deprivadas en AL. Esta falta de efecto de los AGT ha sido observada anteriormente por nuestro grupo en otro modelo experimental (Colandré y col., 2003) y está en contraposición al conocido efecto reportado en humanos (Sundram y col., 1997). Esta diferencia podría deberse al diferente perfil de las lipoproteínas, a los elevados niveles de colesterol-HDL en ratas, lo que hace difícil observar cambios en los niveles de Col.

I.5- Lípidos hepáticos

I.5.1- Niveles de triglicéridos y su regulación

Los niveles de TG hepáticos fueron incrementados por los AGT independientemente de los niveles de AL. No obstante, los mecanismos involucrados fueron diferentes. Así, en la dieta enriquecida en AL, los AGT generaron un aumento de los TG hepáticos los cuales estuvieron relacionados a un desequilibrio entre la lipogénesis y la β -oxidación. En este sentido, los AGT en el grupo enriquecido en AL no modificaron la actividad de las enzimas lipogénicas FAS, EM ni G6PDH, pero sí disminuyeron la actividad de la enzima oxidativa CPT-Ia. Ha sido demostrado por diferentes autores que los AGT modifican tanto la síntesis como la oxidación hepática de AG pero, los resultados hallados son controversiales. En concordancia con nuestros resultados, Giudetti y col. (2003) demostraron que en ratas alimentadas con aceite de soja hidrogenado rico en AGT, existía un aumento en los TG hepáticos como consecuencia de la disminución en la oxidación hepática de AG, sin modificación en las enzimas ACC y FAS. Por su parte, Cho y col. (2011) comparando dietas conteniendo altos y bajos niveles de AGT en un modelo de ratones aterogénicos, también encontraron mayores niveles hepáticos de TG, los cuales, en este caso, estuvieron asociados no solo a una menor actividad de CPT, sino que también, a una mayor actividad de las enzimas G6PDH y EM. Contrariamente, Jeyakumar y col. (2011) en ratas Fisher, alimentadas un período largo de tiempo con dietas conteniendo AGT, encontraron que la oxidación de AG no era adversamente afectada, justificando de esta manera la ausencia de esteatosis e hipertrigliceridemia.

Por otro lado, en los animales deprivados de AL, el incremento de los TG hepáticos inducidos por los AGT fue el resultado de un desbalance generado por una mayor síntesis de AG, sin cambios en la β -oxidación. A nuestro conocimiento, no existen estudios que relacionen los mecanismos regulatorios de los TG hepáticos cuando se combinan la deprivación de AL y la sustitución con AGT. No obstante, al igual que otros investigadores trabajando en deficiencia de

AGE (Williams y col., 1972; Ducheix y col., 2013), observamos una mayor síntesis de AG, denotada por una mayor actividad de las enzimas lipogénicas, debiéndose éste efecto a una mayor demanda de AG generada a raíz de la falta de AGE (Williams y col., 1972). Así, bajo esta situación metabólica, podemos sugerir que los AGT exacerbaban la lipogénesis, como se ha demostrado que ocurre en otros parámetros lipídicos (Privett y col., 1977; Hill y col., 1979).

Independientemente del efecto de los AGT sobre las enzimas lipogénicas, el flujo de sustrato a través de la $\Delta 9$ -desaturasa, expresado por las relaciones 16:1/16:0 y 18:1/18:0, no fue modificado tanto en animales alimentados con dietas enriquecidas, o deprivadas en AL. Estos hallazgos concuerdan con los de Mahfouz y col. (1984), quienes en microsomas hepáticos de ratas alimentadas con PHVO no encontraron diferencias en la actividad de la $\Delta 9$ -desaturasa. Contrariamente, Jeyakumar y col. (2011) y Kraft y col. (2011) encontraron una mayor expresión hepática de la proteína SCD-1 en animales alimentados con una dieta rica en AGT.

I.5.2- Niveles de colesterol y fosfolípidos

Los resultados bibliográficos sobre las variaciones en los niveles de Col y FL hepáticos por la ingesta de AGT son escasos y controversiales. Nuestros resultados no muestran efecto de los AGT sobre el colesterol hepático, como fuera demostrado previamente por nuestro grupo bajo otras condiciones experimentales (Colandré 2003) y por otros investigadores (Chiang y Lu, 1996). No obstante, dependiendo de las condiciones experimentales, otros autores encontraron un descenso de Col hepático cuando se lo comparó con dietas ricas en ácido oleico, pero no frente a dietas ricas en ácido esteárico (Giudetti y col., 2003). En cambio, Jeyakumar y col. (2011) en ratas y Machado y col. (2010) como Cho y col. (2010) en ratones encontraron un aumento en los niveles de Col hepático. El ligero, pero significativo incremento del contenido de FL hepático inducido por los AGT en los animales alimentados con dietas enriquecidas en AL, ha sido también observado por otros autores (Jeyakumar y col., 2001; Giudetti y col., 2003). Los mecanismos implicados en la regulación de los niveles de Col y FL no han sido claramente descriptos, y no fue objetivo de estudio en la presente tesis.

I.5.3- Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

La sustitución con AGT modificó diferencialmente el contenido de AL, ALA y de los AGPI-CL derivados de los mismos, y el efecto estuvo relacionado al status de AL. La sustitución con AGT al grupo enriquecido en AL, incrementó la relación producto final/sustrato (AA/AL), pero la misma no fue asociada a mayores niveles de AA, ni tampoco a mayor flujo de sustratos en las

enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasas, sino que fue debida al descenso en los niveles de AL generado por la presencia de los AGT. Es posible postular que, la disminución en los niveles de AL se deba a una sustitución de los AGE por los AGT en la incorporación a los tejidos. Por otra parte, la vía alternativa de biosíntesis de AGPI-CL n-6 a nivel de la elongasa no pareciera estar modificada, dado que la relación $11c,14c-20:2/AL$ no fue modificada por los AGT. A diferencia de la comparación anterior, los animales que recibieron AGT y fueron privados de AL mostraron una disminución de la biosíntesis de AGPI-CL n-6, consecuencia de una depleción del flujo a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa. En relación a estos resultados, diversos estudios en animales de experimentación (Brenner y col., 1968; Privett y col., 1977; Mahfouz y col., 1980; Hill y col., 1981; Lawson y col., 1983; Mahfouz y col., 1984; Larqué y col., 2001; Kummerow y col., 2004; Larqué y col., 2003), han demostrado que los AGT perjudican la desaturación microsomal y la elongación de los AGE a sus metabolitos poliinsaturados de cadena larga, ya sea por competencia entre los sustratos o entre sus productos de reacción. No podemos descartar que la enzima $\Delta 6$ -desaturasa podría estar siendo empleada para metabolizar los AGT, ya que ha sido demostrado que la desaturación de los isómeros *trans*-18:1 puede formar nuevos e inusuales ácidos dienoicos que probablemente compitan en el metabolismo de los AGE (Mahfouz y col., 1980). Por otro lado, es probable que la actividad enzimática esté siendo desplazada hacia el metabolismo de la familia n-3, lo cual se ve reflejado en una mayor síntesis de DHA en los animales alimentados con dietas privadas de AL y suplementados con AGT, satisfaciendo la teoría descrita por Gibson y col. (2011; 2013).

I.6- Grado de lipoperoxidación y respuesta inflamatoria hepática

La sustitución con AGT, independientemente del status de AL, no modificó el grado de lipoperoxidación, ni los niveles de GSH y sólo un descenso de la actividad de la enzima catalasa fue observado en animales privados de AL. Cassagno y col. (2005) han demostrado que, ratones alimentados con dietas conteniendo AGT, presentan un aumentado estrés oxidativo; mientras que, diversos autores han observado que otros AGT, como los CLA, inducen estabilidad oxidativa (Kim y col., 2005; Palacios y col., 2003), incrementando la síntesis de GSH y evitando el desarrollo de LPO (Arab y col., 2006). Es posible que en nuestras experiencias la bioconversión a AR, observada en los hígados de los animales suplementados con AGT, también esté participando en la prevención del estrés oxidativo hepático.

Si consideramos que la expresión del ARNm de los marcadores de inflamación evaluados se corresponde con los niveles circulantes, podríamos sugerir que los isómeros *trans* presentes en

nuestra dieta no tendrían un efecto inflamatorio. Sin embargo estos hallazgos no se corresponden con los de otros autores, quienes han encontrado elevados niveles de TNF- α e IL6 debido al consumo de AGT (Han y col., 2002; López-García y col., 2005; Mozaffarian y col., 2006; Micha y Mozaffarian, 2009). Así, nuevamente los diferentes tipos de isómeros presentes en la dieta, parecerían jugar un rol preponderante en el efecto global de la sustitución con AGT.

I.7- Tejido adiposo y su regulación

La utilización del tejido adiposo epididimal se sustentó en que el mismo representa uno de los mayores depósitos de tejidos adiposo blanco en roedores, y que los mismos son modulados, entre otros factores, por las grasas dietarias. Además, el tejido adiposo blanco es ampliamente reconocido en la actualidad, no solo como un tejido de depósito de energía, sino también, como un regulador clave de los mecanismos metabólicos homeostáticos del organismo (Wronska y col., 2012).

Los AGT, independientemente del status de AL, aumentaron el peso de los panículos adiposo epididimal y retroperitoneal. Así, en base a los resultados hallados en nuestra experiencia, postulamos que los mecanismos regulatorios involucrados en el aumento del tejido adiposo, en ambos grupos suplementados con AGT, son diferentes dependiendo del status de AL. Por un lado, en el grupo en dietas enriquecidas en AL, la presencia de los isómeros *trans* generó una disminución en los depósitos de AL, ALA y AA, lo que, probablemente, sea un disparador del aumento en la actividad de la enzima LPL con el propósito de normalizar los niveles de AGPI-CL.

Por otro lado, en los animales deprivados de AL, los AG: AL, ALA y AA, han sido marcadamente reducidos, e incluso no detectados. Esto podría estar activando mecanismos más complejos, entre ellos, incrementando la actividad de las enzimas lipogénicas, logrando de esta forma el aumento de peso del tejido adiposo. Cabe denotar que la actividad LPL fue muy incrementada por la deprivación de AL sin sustitución con AGT, lo cual se correspondió con el descenso de los TG séricos, y posiblemente con la elevada demanda de ciertos AG por dicho tejido. Este efecto fue también reportado por otros autores (de Pury y Collins, 1972). Así, probablemente la sustitución con AGT a los animales alimentados con dietas deprivadas en AL incrementó la lipogénesis, disminuyeron la demanda de AG desde la circulación, conduciendo a una disminución en la actividad de la LPL de TA.

Esta mayor capacidad lipogénica, medida a través de las enzimas FAS, EM y G6PDH en tejido adiposo epididimal fue exacerbada por los AGT en deprivación de AL. En este sentido, es sabido que el AL al igual que el ALA, y sus derivados de cadena larga, suprimen la expresión de los

genes de las enzimas lipogénicas en tejido adiposo blanco. En relación a esto, existen diferentes evidencias, entre ellas, en células de adipocitos 3T3-L1 de que los AGPI-CL n-3 suprimieron la expresión de genes lipogénicos por un mecanismo que requirió la producción de ciclooxigenasa y prostaglandina (Jump y col., 1999). Asimismo, Demeyer y col. (1974) demostraron que en células de tejido adiposo epididimal, la lipogénesis aumentaba en aquellos animales que recibieron aceite de coco hidrogenado en la dieta durante 5 semanas, y este aumento estuvo asociado a la deficiencia de AGE. Por otro lado, Du y col. (1972) mostraron que dietas conteniendo AL o aceite de maíz suprimían la lipogénesis mientras que, dietas conteniendo aceite de coco hidrogenado tenían muy poco efecto, y concluyeron que el AL dietario regula la síntesis de AG. El flujo de sustratos a través de las enzimas SCD-1 y SCD-2, que no han mostrado ser incrementadas por los AGT, pero sí por la privación de AL, nos permiten sugerir que el incremento de la lipogénesis no es debida a una mayor actividad de estas enzimas. No obstante, podrían explicar la mayor actividad de las enzimas lipogénicas inducida por los AGT cuando los animales fueron privados de AL. Es escasa la bibliografía que reporta el efecto de los isómeros *trans* sobre estas enzimas en tejido adiposo pero, en el sentido de nuestros resultados, Kadegowda y col. (2010) no encontraron modificaciones en la expresión génica de SCD-1, ni SCD-2 en tejido adiposo de glándula mamaria de ratones hembras alimentados con una dieta conteniendo PHVO. Por otra parte la diferente respuesta del flujo de sustrato a través de las enzimas SCD-1 y SCD-2 en privación de AL podrían deberse al diferente rol fisiológico que presentan. En este sentido, es conocido que la enzima SCD-1 es regulada para producir un alto flujo metabólico en la biosíntesis *de novo* de AG de 16:1 para reserva lipídica. Contrariamente, la SCD-2 parecería ser constitutivamente expresada para mantener, principalmente, el pool de 18:1 en ambos, reserva lipídica y membranas celulares (Kim y col., 1999). El aumento observado en la relación 16:1/16:0, y no en la relación 18:1/18:0 podría ser, en parte, el responsable del aumento en la actividad de las enzimas lipogénicas que conducen a una significativa acreción de TG en tejido adiposo de animales privados de AL. Resultados semejantes fueron observados por otros investigadores (Miyakazi y col., 2003; Ntambi, 2004; Paton y Ntambi, 2009; Strable y Ntambi, 2010).

I.7.1- Expresión génica de leptina, adiponectina y marcadores del estado inflamatorio

Es bien conocido que el tejido adiposo, además de ser un reservorio de energía, posee diversas funciones metabólicas, entre ellas, expresa y secreta una variedad de péptidos bioactivos, conocidos como citoquinas, que actúan a nivel local y sistémico, entre las que se encuentran las adipoquinas: leptina y adiponectina, que son altamente sensibles a cambios en el tejido adiposo.

Los AGT en animales alimentados con dietas enriquecidas en AL disminuyeron los niveles de ARNm de leptina y aumentaron los de adiponectina, a pesar de mostrar una mayor ganancia de peso del tejido adiposo. Esto podría estar asociado a que los AGT marcadamente redujeron los niveles AL (-30%) y AA (-40%), ácidos grasos altamente reconocidos por sus efectos pro-inflamatorios (Young y col., 1998; Toborek y col., 2002; Schmitz y Ecker, 2008). Esto fue acompañado de una esperada disminución de otros marcadores, reflejados por los bajos niveles de ARNm de IL1, como también por una tendencia de menores niveles de TNF- α . Estos hallazgos están en desacuerdo con lo reportado por varios autores, que han encontrado elevados niveles de TNF- α e IL6 debido al consumo de AGT (Han y col., 2002; López-García y col., 2005; Basu y col., 2006; Mozaffarian y col., 2006; Micha y Mozaffarian, 2009). No obstante, se correlacionan con nuestros resultados encontrados en privación de AL, en los que los AGT redujeron la adiponectina, al mismo tiempo que incrementaron la expresión en adiposo de leptina. Pareciera que las grandes diferencias en la respuesta inflamatoria generada por los AGT dependen fundamentalmente de entorno pro-/anti-inflamatorio del tejido y no del tipo de isómeros *trans* presentes en la dieta.

I.8- Niveles de de triglicéridos en el músculo gastrocnemius y su regulación

Las alteraciones inducidas metabólicamente por los AGT en los tejidos antes descritos, también podrían conducir a alteraciones en el contenido muscular de TG y en su regulación. En relación a esto, los animales alimentados con AGT no mostraron variaciones en los niveles de TG, ni en la actividad de las enzimas LPL y CPT-Ib, independientemente de los niveles de AL. Escasa información existe sobre el efecto de los AGT en músculo, y más aún sobre mecanismos reguladores, con los cuales comparar nuestros hallazgos. En concordancia con los presentes resultados, trabajos previos de nuestro grupo en animales alimentados con altos niveles de grasa dietaria suplementadas con AGT, mostraron niveles normales de TG musculares, sin cambios en metabolitos de la glucosa (Bernal y col., 2006). En contraste, Natarajan e Ibrahim (2005), en diafragma de ratas WNIN, observaron que los AGT aumentaban el contenido intramiocelular de TG, y que esto estuvo asociado con un decrecimiento en el transporte de la glucosa estimulado por la insulina.

I.9- Metabolismo de la glucosa

Los niveles séricos de glucosa fueron marcadamente disminuidos por los AGT en los animales alimentados con dietas enriquecidas en AL, mostrando sólo una ligera tendencia en

aquellos alimentados con dietas deprivadas de AL. Este diferente comportamiento pudo estar asociado a una mayor sensibilidad tisular inducida por la adiponectina. Diversas experiencias, tanto en humanos como en animales de experimentación, han demostrado que los AGT tienen efectos adversos en marcadores de resistencia a la insulina comparados con el consumo de carbohidratos, *cis*-AGMI e incluso con AGS (Ibrahim y col., 2005; Natarajan e Ibrehim, 2005; Albuquerque y col., 2006; Kavanagh y col., 2007; Pisani y col., 2008; Silveira-Osso y col., 2008). Diferentes autores sugieren que la incidencia de diabetes mellitus tipo 2 se reduciría más de un 40 % si se reemplazan los AGT por otras fuentes lipídicas (Hu y col., 2001; Salmerón y col., 2001). Sin embargo, también se ha observado en humanos, que la ingesta por períodos cortos de tiempo de dietas conteniendo AGT, no ocasionó efectos adversos en la sensibilidad a la insulina y en el metabolismo de la glucosa (Louheranta y col., 1999; Lovejoy y col., 2002). Además, en pruebas en las que se han incluido individuos con sobrepeso o con resistencia a la insulina establecida, los AGT han mostrado un consistente efecto adverso en la sensibilidad a la insulina con aumento en los niveles sanguíneos de la misma en condiciones de ayuno y postprandiales, sin descenso de los niveles de glucosa (Christiansen y col., 1997, Lefevre y col., 2005).

En las experiencias en músculo sóleo aislado, bajo condiciones basales, los AGT no tuvieron un impacto importante sobre el metabolismo de la glucosa. Así, la captación, incorporación y oxidación de glucosa en condiciones basales mostró una ligera tendencia a incrementar por la presencia de AGT independientemente del status de AL. Este efecto podría estar asociado a la bioconversión del ácido 11*t*-18:1 a 9*c*,11*t*-CLA poniendo de manifiesto el efecto benéfico del AR sobre el metabolismo de la glucosa, como ha sido demostrado que ocurre en muchos modelos animales con éstos isómeros (Houseknecht y col., 1998; Ryder y col., 2001; Choi y col., 2004; Battacharya y col., 2006; Choi y col., 2007). Sin embargo, son pocos los autores que han observado cambios favorables en el metabolismo de la glucosa debido a los *trans*. Más aún, Pisani y col. (2008), en crías de ratas alimentadas con dietas conteniendo AGT durante la gestación y la lactancia, que continuaron recibiendo dietas ricas en AGT hasta los 90 días luego del nacimiento, encontraron que los niveles de glucosa se mantenían normales, por un compensatorio efecto de mayores niveles de adiponectina sérica asociados a hiperinsulinemia y mayores niveles de receptores de insulina. Estos resultados podrían estar reflejando una cierta resistencia insulínica inducida por los AGT y están de acuerdo con nuestros estudios en músculo soleo aislado en los cuales frente a la estimulación con insulina y en idénticas condiciones de las demás variables experimentales, los animales que fueron alimentados con dietas enriquecidas en AL y sustituidos con AGT mostraron una disminución en la respuesta a la insulina en la captación, incorporación y

oxidación de la glucosa, y síntesis de glucógeno. Este efecto no fue observado en los animales alimentados con dietas deprivadas en AL y suplementadas con AGT, lo cual podría estar relacionado a los diferentes niveles de AGPI en las células musculares (Simopoulos, 1994 y de Santa-Olalla y col., 2009). En este sentido, Natarajan e Ibrehim (2005) encontraron que los AGT inducían un descenso en los AGPI-CL de los FL del músculo diafragmático y del contenido de TG intramiocelular, asociados a un disminuido transporte de la glucosa bajo el estímulo de la insulina. Sugiriendo así, que los AGT dietarios, disminuyen la sensibilidad a la insulina en el diafragma. Por otro lado, Kavanagh y col. (2007) en monos alimentados con dietas conteniendo isómeros *trans* (8% de la energía), observaron insulino-resistencia y la asociaron a un daño en la transducción de la señal posterior a la unión al receptor de insulina, ya que los músculos mostraron una reducción significativa en la activación de Akt bajo estimulación con insulina.

Es conocido que la pre-incubación con palmitato reduce la captación e incorporación de la glucosa en el músculo esquelético en condiciones basales y estimuladas por la insulina (Thompson y col., 2000; Alkhateeb y col., 2007), asemejando una situación de resistencia insulínica *in vivo*, inducida por una alta disposición de AG libres en plasma, situación que ocurre frecuentemente en diversas patologías incluyendo obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico, como así también, en animales alimentados con dietas ricas en grasa que conducen a resistencia a la insulina e hiperinsulinemia (Randle y col., 1963; Storlien y col., 1997; Hirabara y col., 2012;). Estos efectos dependen del tipo de AG dietarios, de los potenciales cambios en los FL de membranas, como así también, de los distintos metabolitos bioactivos generados a partir de los diferentes AG (Schmitz-Peiffer, 2000; Andersson y col., 2002). En nuestra experiencia, a excepción de la oxidación de la glucosa, no se observó una significativa respuesta a la adición de palmitato sobre los demás parámetros analizados. Estos resultados en la respuesta a distintos efectores, reafirman la posibilidad de que los AGT induzcan una cierta resistencia insulínica y la misma dependa de los AG de su entorno.

PARTE II

Efecto de la sustitución parcial con conjugados del ácido linoleico a dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico

II.1- Parámetros nutricionales

Los animales alimentados con dietas suplementadas con CLA mostraron una muy buena aceptación de la misma, sin observarse diferencias en la ingesta de alimento y, por ende, en la energía consumida. Durante todo el período experimental, los animales mostraron un buen estado de salud, sin ningún tipo de manifestaciones toxicológicas debido a los tratamientos recibidos. Además, no se observaron signos de alteraciones intestinales por ninguno de los tratamientos, ni se encontraron modificaciones en la ganancia de peso en el período experimental. Sin embargo, la sustitución con CLA mostró un comportamiento diferente en ciertos parámetros nutricionales dependiendo del status de AL. Así, en los animales alimentados con dietas enriquecidas en AL, los CLA no produjeron cambios en la composición corporal, ni en el tamaño de hígado y panículos adiposos. No obstante, en las ratas alimentadas con dietas deprivadas de AL, los CLA tendieron a reducir el contenido de grasa corporal, alcanzando una reducción significativa en el peso de los panículos adiposos, y un incremento en el peso hepático respecto al correspondiente grupo control. Estos cambios no se asociaron a una menor ingesta de alimento, ni de energía, sino a una ligera menor eficiencia energética. Estos efectos son más acentuados en modelos experimentales de ratones (West y col., 1998; DeLany y col., 1999; DeLany y West, 2000; West y col., 2000; Takahashi y col., 2002; Terpstra y col., 2002; Tepstra y col., 2003; Poirier y col., 2005a). Sin embargo, muy pocos efectos o ausencia de ellos, han sido observados en ratas normales o con diferentes estados nutricionales (Andreoli y col., 2007) y con otros modelos de animales (Purushotham y col., 2007; Lasa y col., 2008; Miranda y col., 2009; Martins y col., 2010). Evidentemente, las alteraciones en la composición corporal, y más específicamente los cambios en los depósitos de grasa corporal, parecerían depender tanto de la especie, como de otras causas tales como la dosis de CLA empleada, duración del tratamiento y estado nutricional o fisiopatológico de los animales. Pariza y col. (2001) atribuyeron las diferencias en la sensibilidad a los CLA, al “turnover” de grasa corporal específico de cada especie, el cual es mayor en ratones que en otros roedores o humanos. Esta pronunciada reducción en los depósitos de grasa corporal en los ratones, conduce a una serie de alteraciones metabólicas que han sido caracterizadas bajo el marco de un “síndrome lipoatrófico” (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005a), el cual ha sido específicamente asociado al efecto del 10 α ,12 α -CLA. En referencia al estado nutricional, diversos investigadores han observado una mayor propensión a la pérdida de grasa corporal inducida por los CLA, en ratones, debido al consumo de dietas conteniendo aceite de coco o dietas libres de grasa (Hargrave y col., 2004; Hargrave y col., 2005; Ippagunta y col., 2011). Muy poca información existe respecto a los posibles mecanismos por los cuales el aceite de coco o dietas

deficientes en AGE acentúan la respuesta antiobesogénica (Hargrave y col., 2005; Ippagunta y col., 2011).

En el presente trabajo, al igual que en los de otros autores (Park y Pariza, 2001; Kim y col., 2002; Javadi y col., 2004; Andreoli y col., 2007), no se encontraron diferencias en el nivel de proteínas corporales. Sin embargo, otros investigadores reportaron una inhibición del catabolismo proteico consecuencia de la sustitución con CLA lo cual conduce a un incremento en la acreción proteica (DeLany y West, 2000; Terpstra y col., 2002; Terpstra y col., 2003).

En términos generales sobre parámetros nutricionales, los resultados obtenidos en humanos son aún más controversiales. Así, Blankson y col. (2000) en hombres y mujeres obesos y con sobrepeso alimentados con CLA, observaron un descenso en la masa grasa, pero no pudieron llegar a una conclusión respecto a la dosis y duración de tratamiento óptimos. Thom y col. (2001) encontraron que los CLA, reducen la grasa corporal, pero no el peso corporal en humanos saludables que realizan actividad física. De manera similar, Kreider y col. (2002) evaluaron el efecto de los CLA sobre la composición corporal durante entrenamiento de resistencia, y encontraron que los CLA, parecían no tener un valor ergogénico significativo en atletas experimentados en entrenamiento de resistencia. Por otro lado, números autores han encontrado falta de efecto en la composición corporal en humanos bajo distintas situaciones fisiopatológicas (Risérus y col., 2002; Larsen y col., 2006), como así también en mujeres normales (Petridou y col., 2003).

II.2- Contenido y retención de los conjugados del ácido linoleico en tejidos. Efecto sobre los biomarcadores de deficiencia de ácidos grasos esenciales

En el presente modelo experimental, los mayores niveles de CLA totales fueron observados en tejido adiposo, seguido de músculo, hígado y suero. Estos resultados en su conjunto, confirman la incorporación preferencial de CLA en los tejidos ricos en lípidos neutros (Banni y col., 2001). Por otra parte, el status de AL influyó diferencialmente sobre el contenido de cada uno de los isómeros. Mientras que en hígado, músculo y suero ambos isómeros presentaron niveles semejantes independientemente del status de AL; en el tejido adiposo epididimal el contenido de ambos isómeros: 9*c*,11*t*-CLA y 10*t*,12*c*-CLA, fue menor en los animales que recibieron dietas deprivadas que en las enriquecidas en AL. Esto podría deberse a mayores niveles y expresión de proteínas desacoplantes-I (UCP-I) en tejido adiposo de animales deprivados en AGE, como fuera sostenido por Portillo y col. (1998). Además, es probable que, ante la demanda de AGE por el organismo en las dietas deprivadas de AL, y tomando en cuenta la similitud de los CLA con éste AG, los

adipocitos liberaren a circulación una mayor cantidad de ambos isómeros CLA.

El contenido de isómeros *9c,11t*-CLA y *10t,12c*-CLA, en el hígado depende de diversos factores tales como: cantidad ingerida, tiempo de tratamiento dietario, afinidad para su incorporación tisular, velocidad de secreción del isómero esterificado a los distintos lípidos y capacidad de oxidación. En el presente trabajo, hemos encontrado que, el contenido hepático (reflejado tanto en el perfil de AG, como en la retención) del isómero *9c,11t*-CLA, es mayor que el del *10t,12c*-CLA. Así, dado que la retención de isómeros en los tejidos se estandarizó con el porcentaje presente en la dieta, que la cantidad ingerida por los animales fue equivalente y que la secreción hepática en TG-VLDL del *9c,11t*-CLA fue mayor que la del *10t,12c*-CLA, podemos atribuir esta diferencia a la mayor capacidad de oxidación del *10t,12c*-CLA. Esto también fue sugerido por otros autores (Martin y col., 2000; Banni y col., 2004a). La β -oxidación mitocondrial y peroxisomal de AG está fundamentalmente dada por la actividad de las enzimas CPT-Ia y acetil CoA oxidasa (ACO) peroxisomal, respectivamente. Martin y col. (2000) realizaron estudios cinéticos sobre las enzimas hepáticas CPT-Ia y ACO con derivados CLA-CoA puros y demostraron que los isómeros CLA poseen una canalización diferencial a través de estas vías oxidativas, principalmente a nivel peroxisomal. Así, es sabido, que la enzima CPT-Ia posee la capacidad de discriminar entre sistemas de dobles enlaces conjugados y no conjugados (Ide y col., 1987), pero que no posee la capacidad de distinguir entre isómeros posicionales de los CLA, por lo que ambos isómeros serían degradados de igual forma a través de la β -oxidación mitocondrial. De esta forma, la CPT-Ia no explicaría el mayor contenido de isómeros *9c,11t*-CLA en los lípidos hepáticos y consecuentemente podría justificarse por una mayor oxidación peroxisomal del *10t,12c*-CLA. Esto está ciertamente en concordancia con la mayor proporción de productos conjugados de 16 carbonos provenientes de la β -oxidación parcial del isómero *10t,12c*-CLA que del *9c,11t*-CLA hallado por Banni y col. (2004b) y Sébédio y col. (2001). Por otra parte, el isómero *9c,11t*-CLA posee una mayor tendencia a seguir las vías metabólicas de elongación y desaturación para su incorporación a los lípidos (Banni y col., 2004a). Así, como fuera demostrado, éste isómero posee un mayor grado de conversión a dienos conjugados de 3 insaturaciones y 20 átomos de carbono que el *10t,12c*-CLA (Sébédio y col., 2001), conduciendo a una mayor incorporación en los lípidos polares (Banni y col., 2001).

La cantidad de isómeros CLA en tejido adiposo depende tanto de la captación de éstos desde circulación, como de sus velocidades relativas de metabolización. En nuestra experiencia hemos encontrado que, el contenido de CLA (reflejado en el perfil de AG y en la retención), de manera semejante que para el hígado, mostró niveles más elevados del isómero *9c,11t*-CLA que del

10*t*,12*c*-CLA. Resultados semejantes han sido reportados por otros autores, tanto en tejido adiposo retroperitoneal de ratones (Kelley y col., 2006), como en tejidos adiposos epididimal y retroperitoneal de ratas (Martins y col., 2010). De manera similar que para el hígado, esto podría estar relacionado a la mayor velocidad de oxidación del 10*t*,12*c*-CLA que del 9*c*,11*t*-CLA.

Al igual que para hígado y tejido adiposo, en músculo gastrocnemio hemos encontrado que, el contenido del isómero 9*c*,11*t*-CLA fue mayor que el del 10*t*,12*c*-CLA. Estos resultados son semejantes a lo observado en otros tejidos y coincidentes con los reportados por otros autores en músculo esquelético de diferentes roedores (Park y col. 1999; Szymczyk y col., 2000); y en músculo cardíaco (Kelley y col., 2006). Probablemente en este tejido también coexista una mayor oxidación peroxisomal del 10*t*,12*c*-CLA y una mayor tendencia del 9*c*,11*t*-CLA a seguir las vías metabólicas de elongación y desaturación para su incorporación a los lípidos.

En suero, hemos encontrado que el patrón del contenido de isómeros: 10*t*,12*c*-CLA < 9*c*,11*t*-CLA, fue semejante al de los demás tejidos analizados, sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas en los animales enriquecidos en AL. Un mayor contenido de 9*c*,11*t*-CLA que de 10*t*,12*c*-CLA también ha sido observado por otros investigadores (Li y Watkins 1998).

Los biomarcadores de deficiencia de AGE: ácido Mead y la relación trieno/tetraeno, no mostraron diferencias en hígado, tejido adiposo, músculo esquelético y suero por la sustitución con CLA.

Pudimos observar que la sustitución con CLA redujo los niveles de AL en hígado y tejido adiposo de los animales que recibieron la dieta enriquecida en AL. Esto, podría estar relacionado, a una sustitución en los tejidos del AL por los CLA, ya que comparten ciertos pasos metabólicos (Banni y col., 2004a) y a una incrementada β -oxidación de AGPI inducida por el 10*t*,12*c*-CLA en ratones (Martín y col., 2000; Banni y col., 2004a; House y col., 2005). Así, un incremento en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal podría exacerbar la oxidación propia del AL, y conducir, a un descenso diferencial de éste AG. En forma semejante a nuestros resultados, Hargrave y col. (2005), en hígado, músculo y tejido adiposo observaron que los CLA no modificaron la reducción en los niveles de AL generados por la privación de AL. Los CLA en suero atenuaron la deficiencia de AL en el grupo alimentados con dietas deprivadas de AL, lo cual podría deberse a una tendencia del organismo a mantener normales los niveles de éste AG.

Los CLA en la dieta enriquecida en AL también redujeron los niveles de ALA en hígado y tejido adiposo. Es probable que los CLA, compitan con el ALA por su absorción/incorporación en tejidos y órganos, como asimismo incrementando la β -oxidación como fuera observado para el AL.

Por otro lado, los CLA en el grupo deprivado de AL no mostraron un efecto aditivo en la reducción de los niveles de ALA inducida por la deprivación de AL.

II.3- Triglicéridos circulantes y su regulación

Hemos observado un efecto diferencial de los CLA sobre los niveles de TG circulantes dependiendo del status de AL de la dieta. Específicamente en ratas alimentadas con dietas enriquecidas en AL, los CLA no modificaron los niveles de TG, mostrando un correlato con una normal secreción de TG-VLDL y remoción de los TG por la LPL muscular. Esta ausencia de cambios ocurrió pese a un incremento de la actividad LPL en tejido adiposo. A diferencia de esta situación metabólica, en ratas alimentadas con dietas deprivadas de AL, los CLA presentaron un significativo efecto hipotrigliceridémico, asociado a una menor secreción de TG-VLDL y un simultáneo incremento de la remoción de los mismos por la LPL en tejido adiposo. Estos reducidos niveles plasmáticos de TG encontrados están de acuerdo con los reportados tanto, para la deficiencia de AGE (Werner y col., 2005), como para la sustitución con CLA (Gavino y col., 2000; Macarulla y col., 2005; Andreoli y col., 2009). Probablemente, exista un efecto aditivo de los tratamientos en el aumento de la actividad de la enzima LPL, ya que en nuestro trabajo, al igual que en los de otros autores, tanto la deficiencia de AGE (de Pury y Collins, 1972), como la sustitución con CLA (Merzmann y col., 2002) aumentaron la actividad LPL en tejido adiposo. Cabe aclarar que, en contraposición a nuestros hallazgos, otros autores, bajo diferentes condiciones, en adipocitos aislados (Park y col., 1999; Park y Pariza, 2001) y en tejido adiposo de ratones (Xu y col., 2003) han encontrado que la actividad de la enzima LPL estuvo disminuida por la acción de los CLA. Asimismo, de Deckere y col. (1999) en hámsteres alimentados con una mezcla equimolecular de isómeros CLA o con *10t,12c*-CLA, han observado un incremento en los niveles de TG séricos.

Al igual que en animales de experimentación, en humanos, los CLA han mostrado efectos discrepantes sobre los TG circulantes. Así, numerosos autores han reportado que los niveles de TG no son afectados por el consumo de CLA, tanto en personas normales (Smedman y Vessby, 2001; Roche y col., 2002; Petridou y col., 2003), como con sobrepeso (Naumann y col., 2005). Por otro lado, Tricon y col. (2004), en hombres saludables, demostraron que los niveles de TG plasmáticos eran aumentados por el isómero *10t,12c*-CLA y disminuidos por el *9c,11t*-CLA. Contrariamente, otros autores (Mougios y col., 2001; Noone y col., 2002), han observado que la sustitución con CLA disminuye los niveles de TG. Esta falta de resultados consistentes en humanos podrían 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.

II.4- Niveles de colesterol y fosfolípidos circulantes

Los cambios observados en los niveles de TG circulantes, no fueron acompañados por modificaciones en el mismo sentido en los niveles de FL y Col sérico. El único efecto de los CLA en estos parámetros estuvo relacionado a una disminución de los FL circulantes en las ratas alimentadas con dietas ricas en AL. Este efecto pudo haberse debido a la conjunción con altos niveles de AL, los cuales per se, pueden producir diversas modificaciones en la relación de las especies de lípidos constitutivos de las lipoproteínas circulantes.

La mayoría de los estudios realizados en humanos han demostrado que los CLA no generan cambios sobre los niveles de colesterol séricos (Smedman y Vessby, 2001; Noone y col., 2002; Petridou y col., 2003; Naumann y col., 2005). No obstante, algunos autores han reportado efectos hipocolesterolemicos (Gaullier y col., 2005). Asimismo, los efectos hallados sobre los distintos tipos de lipoproteínas séricas han sido muy discrepantes (Battacharya y col., 2006), poniéndose nuevamente de manifiesto la necesidad de nuevas investigaciones para dilucidar la repercusión que podrían tener los CLA sobre la salud.

II.5- Lípidos hepáticos

II.5.1- Niveles de triglicéridos y su regulación

La sustitución con CLA incrementó los niveles de TG hepáticos en las ratas alimentadas con dietas deprivadas de AL, y sólo mostró una ligera tendencia en las enriquecidas en AL. Este efecto diferencial, estuvo íntimamente relacionado a diferentes mecanismos regulatorios. Resultados controversiales sobre los niveles de TG hepáticos han sido también observados por diversos autores. En este sentido, Takahashi y col. (2003), como Ferramosca y col. (2006) en ratones han observado un incremento de TG hepáticos asociado a una elevada lipogénesis, y a su vez, este efecto ha sido atribuido por distintos investigadores (Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005a; Vyas y col., 2012) al isómero 10*t*,12*c*-CLA. Contrariamente a estos resultados, Purushotham y col. (2007) en ratas normales y Nagao y col. (2005), como Wang y col. (2006) en ratas genéticamente obesas, encontraron que los CLA disminuyeron el contenido de TG en hígado por diferentes mecanismos. Cabe destacar que el incremento de los TG hepáticos en nuestras experiencias no tuvieron la magnitud de los cambios observados en ratones, donde el 10*t*,12*c*-CLA ha inducido una marcada esteatosis (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005a). No

obstante, no podemos descartar que ciertos mecanismos descritos en la inducción de la esteatosis, estén implicados en nuestras experiencias.

El efecto diferencial de los CLA sobre el contenido de TG hepáticos en los animales alimentados con dietas deprivadas respecto los que recibieron dieta enriquecida en AL, estuvo asociado a una baja secreción de TG-VLDL. Estos resultados podrían estar asociados a las observaciones de Lin y col. (2001a), quienes encontraron en células HepG2 que el 10*t*,12*c*-CLA podría disminuir la tasa global de producción de VLDL a través de una menor síntesis de apolipoproteína B-100. Efectos de los CLA semejantes a los hallados en los animales enriquecidos en AL, fueron observados previamente por nuestro grupo (Andreoli y col., 2009) en ratones alimentados con una dieta hiperlipémica conteniendo una mezcla equimolecular de 9*c*,11*t*-CLA y 10*t*,12*c*-CLA. Asimismo, otras investigaciones han mostrado una incrementada secreción de TG y sus efectos también fueron atribuidos al isómero 10*t*,12*c*-CLA (Degrace y col., 2003).

Otro factor importante en la generación de elevados niveles hepáticos de TG fue el desequilibrio entre la síntesis/ β -oxidación de AG, el cual pudo haber sido consecuencia de la deficiencia de AGE, como fuera también demostrado por otros investigadores (Williams y col., 1972; Ducheix y col., 2013), y resultar exacerbado por la sustitución con CLA. Un semejante efecto aditivo de ambas variables en otros parámetros relacionados al metabolismo lipídico, ha sido observado por otros investigadores (Hargrave y col., 2004; Hargrave y col., 2005; Ippagunta y col., 2011).

En la dieta enriquecida en AL, los CLA no tuvieron efecto sobre la actividad de las enzimas lipogénicas: FAS, EM, y G6PDH, como tampoco sobre la enzima CPT-Ia, que refleja la β -oxidación mitocondrial. Estos hallazgos están de acuerdo con los de otros autores (Azain y col., 2000; Martin y col., 2000; Ealey y col., 2002), quienes no han encontrado alterada la oxidación y/o síntesis de AG por la ingesta de CLA en ratas. Sin embargo, numerosos trabajos demostraron alteraciones en la lipogénesis y/o β -oxidación inducidas tanto, por la mezcla equimolecular de isómeros 9*c*,11*t*-CLA y 10*t*,12*c*-CLA, como por el isómero individual 10*t*,12*c*-CLA (Clément y col., 2002; Takahashi y col., 2003; Macarulla y col., 2005; Nagao y col., 2005; Ferramosca y col., 2006; Wang y col., 2006) en hígado de distintas especies animales. En cambio, en los animales alimentados con dieta deprivada de AL, sorprendentemente, los CLA aumentaron la actividad de las enzimas lipogénicas por encima del incremento inducido por la propia deprivación de AL. Nosotros no hemos investigado los posibles factores que podrían conducir a esta mayor lipogénesis, pero otros autores describiendo el síndrome lipoatrófico inducido por los CLA, asocian una hiperinsulinemia crónica como factor que favorece la deposición de grasa en el hígado a través de la

inducción de una mayor captación de AG y de las vías lipogénicas (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005a).

Además, a partir de nuestros resultados de flujo de sustratos a través de la SCD, la mayor lipogénesis observada en el grupo privado de AL no sería debida a una mayor actividad de dicha enzima. Más aún, en los animales alimentados con dietas enriquecidas en AL, la disminución en la relación 18:1/18:0, podría estar denotando una cierta inhibición en la actividad enzimática inducida por los CLA. En relación a esto, ha sido observado que el 10*t*,12*c*-CLA reprime la expresión del ARNm de la SCD en hígado, a pesar de que este AG no contiene un doble enlace en la posición 9, sino que contiene dobles enlaces en las posiciones 6 y 8 desde el carbono ω. El único doble enlace que éste isómero y otros AGPI comparten es en la posición 6, por lo que el efecto inhibitorio podría estar relacionado a la posición y orientación de solo uno de los dobles enlaces presentes. Diversos estudios han confirmado que los CLA disminuyen la actividad de ésta enzima y que la regulación se da decreciendo la abundancia del ARNm en hígado, y que el mecanismo implicado podía ser una menor estabilidad y/o transcripción del ARNm (Lee y col., 1998). Sin embargo, Choi y col. (2001) encontraron que células HepG2 tratadas con 10*t*,12*c*-CLA no modificaba la transcripción génica, ni los niveles de ARNm o de proteína, pero sí que inhibía la actividad enzimática y en consecuencia los niveles de AGMI; así, encontraron que en los lípidos totales las relaciones 16:1/16:0 y 18:1/18:0 estaban disminuidas por éste isómero. En contraposición, resultados de Peters y col. (2001) y de Li y col. (2012) muestran que, tanto la mezcla de isómeros, como el 10*t*,12*c*-CLA, aumentan la expresión génica de la enzima SCD-1 en ratones, y esto podría relacionarse con la inducción de la lipoatrofia que no se observa en las ratas. Cabe mencionar que en ratones, han sido identificadas cuatro isoformas de la enzima (Ntambi, 1999; Miyazaki y col., 2003), mientras que en la rata solo dos (Thiede y col., 1986; Mihara, 1990), con dos homólogos en humanos (Zhang y col., 1999).

Por consiguiente, en nuestras experiencias, el desequilibrio en la síntesis/oxidación de AG pareciera estar modificado por una alterada síntesis, dado que la β-oxidación, expresada por la actividad de la enzima CPT-Ia, no fue modificada por los CLA. Esto concuerda con lo encontrado por Park y col. (1997) en ratones macho alimentados a dos niveles distintos de grasa dietaria suplementados con CLA. Sin embargo, otros autores (Takahashi y col., 2003; Degrace y col., 2004) en ratones observaron una mayor expresión génica de la enzima CPT-I mitocondrial.

Claramente, el impacto de los CLA sobre la acumulación hepática de TG depende, entre otras cosas, de las especies, los isómeros individuales y el status de AL.

II.5.2- Niveles de colesterol y fosfolípidos

Los niveles de Col y FL no fueron modificados por la sustitución con CLA, independientemente de los niveles de AL, y esto está alineado con lo encontrado por Ferramosca y col. (2006), quienes en ratones alimentados con CLA, a pesar de encontrar aumentados los TG hepáticos junto a una aumentada lipogénesis, no observaron alteraciones en el contenido de Col y FL. En forma similar, Deckere y col. (1999) en hámsteres alimentados con dietas conteniendo una mezcla equimolecular de 9*c*,11*t*-CLA y 10*t*,12*c*-CLA o cada uno de los isómeros por separado, no encontraron diferencias significativas en los niveles de Col entre los grupos. En cambio, Takahashi y col. (2003) en ratones alimentados con CLA observaron un incremento de los niveles hepáticos de Col y FL; y en el mismo sentido, Li y col. (2012) reportaron que ambos isómeros incrementaron la cetogénesis a través de un incremento en la expresión génica de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa. No obstante, esta explicación no descarta que otros potenciales mecanismos, entre ellos mediados por el SREBP-1 y SREBP-2, que son inducidos por el 10*t*,12*c*-CLA puedan estar involucrados (Ringseis y col., 2006) en la mayor síntesis de colesterol.

II.5.3- Biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

El contenido de AL, ALA y de los AGPI-CL derivados de los mismos estuvo diferencialmente modificado por la sustitución con CLA según el status de AL. Específicamente, la sustitución con CLA en los animales alimentados con dietas enriquecidas en AL, no modificó la biosíntesis de AA, mientras que en aquellos con dietas deprivadas de AL estuvo reducida. Esta inhibición en la biosíntesis de AGPI n-6 específicamente se relacionó con un menor flujo de sustrato a través de la enzima Δ 6-desaturasa hepática. Este efecto observado sobre la familia n-6 y la Δ 6-desaturasa está de acuerdo con los trabajos que muestran que la mezcla de isómeros CLA (Javadi y col., 2004), como así también, los isómeros individuales 9*c*,11*t*-CLA y 10*t*,12*c*-CLA (Bretillon y col., 1999; Ederf y col., 2002), reducen la biosíntesis de AGPI-CL, inhibiendo las enzimas Δ 5 y Δ 6-desaturasas. Contrariamente a nuestros hallazgos, Belury y Kempa-Steczko (1997) mostraron en hígado de ratones una similar conversión enzimática del ^{14}C -CLA y del ^{14}C -AL a productos de 18:3 carbonos, lo cual permitiría postular que la reducción de la formación de AA podría también ser debido a una competencia de sustratos, que conduciría a derivados conjugados de cadena larga que podrían dar eicosanoides con propiedades muy diferentes a los generados a partir del AA. Esta teoría de competitividad entre sustratos en la formación de AGPI-CL también está avalada por el trabajo de Takahashi y col. (2003), quienes, sorprendentemente, observaron en hígados de ratones alimentados con CLA, un aumento en la

expresión de las enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasas. Esta teoría de competitividad entre sustratos podría explicar porque, en nuestro trabajo, en el grupo enriquecido en AL la inhibición de los CLA sobre la $\Delta 6$ -desaturasa y los AGPI-CL de la familia n-6, demostrada por otros autores, no se puso de manifiesto, mientras que, en el grupo privado en AL (donde el contenido de AL como sustrato para la competencia enzimática es baja) el efecto estuvo manifiesto. En los animales alimentados con dietas ricas en AL, la sustitución con CLA derivó un bajo flujo a los productos de elongación que pueden generarse por la vía alterna (11c,14c-20:2), mientras que esta vía estuvo incrementada en los animales privados en AL. Estos resultados soportan nuestros hallazgos de que la $\Delta 6$ -desaturasa se encuentra inhibida por los CLA en los animales privados de AL.

Respecto a la familia n-3, la sustitución con CLA no modificó la biosíntesis de AGPI-CL n-3 en los animales enriquecidos en AL pero, sí la incrementó notoriamente en los privados. Este efecto, probablemente sea el resultado de dos situaciones diferentes. Por un lado, como se ha explicado anteriormente, es probable que los bajos niveles dietarios de AL en el grupo privado, estén aumentando la síntesis de DHA y desplazando el flujo de sustratos hacia esta vía metabólica, y por otro lado, si consideramos que los CLA estarían generando una inhibición en la biosíntesis de AA por la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, es probable que incremente el flujo de sustratos de la familia n-3 (ALA) (Holman y col., 1964; Innis, 1991; Sardesai, 1992; Gibson y col., 2013;), y aumente de esta forma la síntesis de DHA.

Así, los presentes resultados, junto con los de otros autores (Bretillon y col., 1999; Javadi y col., 2004) sugieren que la modulación por los CLA dietarios de la actividad de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa y la reducción en el contenido de AA, resultaría en una disminución global de los eicosanoides derivados del mismo. Este efecto junto con la elevada síntesis de DHA y de sus derivados, podrían tener una repercusión favorable sobre el estado inflamatorio y enfermedades relacionadas.

II.6- Grado de lipoperoxidación y respuesta inflamatoria hepática

La sustitución con CLA, independientemente del status de AL, no modificó el grado de lipoperoxidación, como tampoco, la actividad de la enzima catalasa, ni los niveles de GSH.

En este aspecto, si bien hay escasos estudios mostrando efectos negativos de los CLA sobre la lipoperoxidación, estos isómeros han mostrado tener un potente efecto preventivo de la misma. Entre los efectos positivos reportados de los CLA, Palacios y col. (Palacios y col., 2003) demostraron, a través del análisis simultáneo del índice de peroxidación, quimioluminiscencia y composición de AG, que los CLA son más efectivos que la vitamina A en proteger los microsomas

o la mitocondria del daño peroxidativo en ratas. Livisay y col. (2000) observaron que los CLA previenen el incremento de la LPO, sin afectar otros marcadores de oxidación, como resultado de una disminución de los AGPI de membranas. En este mismo sentido, Kim y col. (2005), observaron que, la sustitución con CLA resultaba en menores niveles de AGPI susceptibles a la oxidación en plasma y membranas hepáticas, lo que se relacionó con una menor LPO respecto a ratas deficientes en vitamina E. Finalmente, Arab y col. (2006) concluyeron que los CLA son los únicos AGPI-CL capaces de aumentar la síntesis de GSH sin generar ningún cambio en el balance oxidativo.

Si bien son escasos los estudios realizados en hígado sobre la acción de los CLA en parámetros relacionados al estado inflamatorio, en la presente tesis hemos encontrado una cierta respuesta antiinflamatoria en los animales alimentados con dietas ricas en AL, mostrando reducidos niveles de ARNm de IL1- β y de TNF- α . En relación a esto, Turek y col. (1998) observaron que la modulación de la producción de citoquinas en macrófagos por los CLA, dependía de la relación dietaria de AGPI n-6/n3, mostrando una respuesta antiinflamatoria con menores niveles de IL6 cuando la dieta de las ratas contenía altos niveles de AGPI n-6. Estos resultados están directamente correlacionados con los observados en nuestros animales con dietas enriquecidas en AL. Además, Nagao y col. (2005) en ratas Zucker alimentadas con una dieta suplementada con CLA, encontraron niveles reducidos en la expresión génica del TNF- α en hígado y se lo atribuyeron a los niveles elevados de adiponectina.

II.7- Tejido adiposo y su regulación

En el campo del estudio de los efectos benéficos de los CLA, éstos isómeros han mostrado resultados promisorios sobre el tejido adiposo. En consecuencia, dado que los panículos adiposos epididimal y retroperitoneal siguieron los cambios de la composición corporal inducida por los CLA, y que poseen un rápido recambio lipídico, se utilizó el tejido adiposo epididimal para estudiar algunos mecanismos vinculados a la movilización de grasa, y el rol de éste tejido en la regulación de vías metabólicas homeostáticas del organismo que pudieran ser afectados por el status de AL.

Como fuera discutido anteriormente, los isómeros CLA tuvieron un efecto diferencial sobre la acreción de lípidos en tejido adiposo en función del status de AL. Así, mientras que en los animales alimentados con dietas enriquecidas en AL no se modificaron el peso de los tejidos adiposos, en aquellos deprivados en AL, se redujeron tanto, los panículos adiposos epididimal, como retroperitoneal. Estos cambios en los depósitos de grasa han sido ampliamente demostrados en ratones (West y col., 1998; DeLany y col., 1999; DeLany y West, 2000; West y col., 2000; Takahashi y col., 2002; Terpstra y col., 2002; Tepstra y col., 2003; Poirier y col., 2005a); sin

embargo, muy pocos o ausencia de efectos han sido observados en modelos de ratas normales y otras especies animales (Purushotham y col., 2007; Lasa y col., 2008; Miranda y col., 2009; Martins y col., 2010). Estas diferentes respuestas se enmarcan en los numerosos reportes bibliográficos controversiales acerca de la modulación de la homeostasis de los lípidos por los CLA. Dentro de los mecanismos bioquímicos implicados, se ha propuesto que los CLA podrían actuar a través de los factores de transcripción PPAR (Houseneknecht y col., 1998), ya que comparten ciertas características estructurales con ácidos grasos reconocidos como proliferadores de peroxisomas. En nuestra experiencia, los mecanismos regulatorios involucrados en el efecto de los CLA sobre el tejido adiposo, parecieran depender del status de AL. Así, en el grupo enriquecido en AL, los CLA aumentaron la actividad LPL en el TAE, independientemente de la forma de expresión y de la actividad de las enzimas lipogénicas. Un efecto similar de los CLA sobre la actividad LPL ha sido observado, por otros autores, en cultivos de células 3T3-L1 (Lin y col., 2001b). En cambio, una disminución en la actividad de la enzima LPL debido a la sustitución con CLA ha sido reportada por diversos investigadores, tanto en cultivos celulares (Park y col., 1997; Park y Pariza, 2001;), como en estudios *in vivo* (Xu y col., 2003; Andreoli y col., 2009), adjudicando dicha acción al isómero 10*t*,12*c*-CLA (Park y col., 1999; Lin y col., 2001b; Park y col., 2004). Los cambios que hemos encontrado sobre la actividad LPL y el incremento en la actividad de las enzimas lipogénicas, no se acompañaron de modificaciones en el peso del tejido adiposo. Así, es posible que exista una aumentada actividad de la enzima HS-LPL, lo que generaría una mayor lipólisis y liberación de AG libres desde el tejido adiposo, como ha sido demostrado que ocurre por efecto de los CLA en cultivos celulares (Park y col., 1997; Park y col., 1999; Mersmann, 2002). También podría ser que el incremento de la captación lipídica, se dé en respuesta a una aumentada β -oxidación, como ha sido observado que ocurre en el tejido adiposo blanco y marrón de ratas alimentadas con CLA (Rahman y col., 2001); o que existan mayores niveles y expresión de UCP-I como ha sido demostrado que ocurre en tejido adiposo de animales deprivados en AGE (Portillo y col. 1998).

Por otro lado, en el grupo deprivado en AL, tanto la actividad de la enzima LPL, como la de las enzimas lipogénicas, estuvieron exacerbadas. Este efecto podría deberse a una mayor captación de AG como mecanismo compensador de la marcada reducción del tejido adiposo. Resultados imprevistos, y en el mismo sentido, han sido también encontrados por Zabala y col. (2006), en hámster alimentados con dieta aterogénica suplementada con diferentes dosis de 10*t*,12*c*-CLA, en la cual la disminución del tejido adiposo epididimal, estuvo asociado a un aumento en la actividad de las enzimas FAS, EM, G6PFDH y ACC, y a una disminución en la expresión del ARNm de ACC,

FAS, SREBP-1a y SREBP-1c. Asimismo, Faulconnier y col. (2004) mostraron en ratas adultas, que el consumo de mezcla de isómeros CLA o de $10t,12c$ -CLA aumentaba la actividad de las enzimas lipogénicas en tejido adiposo, sin modificar el peso, ni la celularidad del mismo. En nuestra experiencia, estos mecanismos tendientes a incrementar el acumulo de lípidos parecerían no alcanzar a contrarrestar la elevada lipólisis y β -oxidación que podría estar ocurriendo por efecto de los CLA (Park y col., 1997; Park y col., 1999; Rahman y col., 2001; Mersmann, 2002). Así, a partir de estos resultados, es factible postular que la privación de AL podría generar en las ratas ciertas alteraciones que las vuelven más sensibles al efecto de los CLA, o bien, que en dietas muy ricas de AL, los CLA no afectarían significativamente las vías de metabolización de los AGPI n-6, razón por la cual no se observaron alteraciones importantes en la movilización lipídica. También podría ser que, a bajos niveles de AL, exista una mayor conversión de CLA a ciertos metabolitos activos que permitirían la observación de ciertos efectos comúnmente presentes en el ratón. En relación a esto, ha sido demostrado que, las respuestas en menor grado encontradas en las ratas respecto a los ratones por los CLA, son atribuibles a diferencias especie-específicas en el metabolismo hepático lipídico, y han sido relacionadas con las distintas capacidades que poseen las especies para metabolizar los precursores de ligandos de los PPAR α (Abraham y col., 1977; Tobias y Hamilton, 1979; Elcombe y col., 1985). Estas diferencias podrían resultar en una conversión alterada de los CLA a diferentes metabolitos y/o alteraciones en la síntesis de AG (Moya-Camarena y col., 1999).

La hipótesis antes mencionada también se puede sustentar en que, el incremento de la actividad de las enzimas evaluadas no fue acompañado por un mayor flujo de sustratos a través de otras enzimas claves, como la SCD-1 y SCD-2. Así, la relación 16:1/16:0, que refleja principalmente el flujo a través de la SCD-1, se vio disminuida por los CLA en los animales alimentados con dietas enriquecidas en AL. Esto podría conducir a un selectivo impacto que reduciría la biosíntesis de AG 16:1, destinados a los depósitos lipídicos. En forma semejante, Kang y col. (2004) y House y col. (2005), en ratones alimentados con $10t,12c$ -CLA, observaron una menor relación 16:1/16:0, con incremento o falta de cambio en la relación 18:1/18:0, corroborando el rol que podría tener la enzima SCD-1 en el efecto sobre el tejido adiposo. Asimismo, Choi y col. (2000) en preadipocitos 3T3-L1 tratados con $10t,12c$ -CLA, observaron una disminución en la expresión del gen SCD-1 que fue dependiente de la dosis. Por otro lado, ésta reducción en el flujo de sustratos a través de la enzima SCD-1 podría correlacionarse con la menor síntesis del AG adipogénico AA, denotada en la menor relación AA/AL. En este sentido, los prostanoides producidos a partir del metabolismo del AA, han demostrado promover la diferenciación de adipocitos (Kliwer y col., 1995; Kliwer y col., 1997).

A diferencia de lo observado en la dieta enriquecida en AL, en los animales deprivados de AL, los CLA incrementaron la relación 18:1/18:0 en tejido adiposo. Este efecto también ha sido reportado por otros autores (Kang y col., 2004; House y col., 2005), y ocurrió en paralelo al aumento en la actividad de las enzimas lipogénicas, lo cual se ha visto que es consecuencia, al menos en parte, de una mayor actividad de la enzima SCD-1 (Miyakazi y col., 2003; Ntambi, 2004; Paton y Ntambi, 2009; Strable y Ntambi, 2010).

Los efectos de los CLA sobre el tejido adiposo humano, han mostrado resultados menos concluyentes. Existen estudios que observaron efectos antiobesogénicos (Blankson y col., 2000; Risérus y col., 2001), no obstante, otros autores no encontraron respuesta a los CLA (Zambell y col., 2000; Petridou y col., 2003). Estas diferencias, son atribuidas a diversidades en los diseños experimentales entre las cuales se encuentran: tipo de isómeros CLA empleados, dosis y duración de tratamiento, como también género, peso, edad y estado metabólico de los sujetos estudiados. No obstante, en cultivos de adipocitos y pre-adipocitos humanos, fueron reproducidos algunos de los mecanismos observados en modelos animales (Brown y col., 2003; Kennedy y col., 2008).

II.7.1- Expresión génica de leptina, adiponectina y marcadores del estado inflamatorio

Los CLA no modificaron la expresión génica de leptina y adiponectina en las ratas alimentadas con dietas ricas en AL; mientras que incrementaron los de adiponectina, en los animales deprivados de AL. Otros autores han encontrado una menor expresión en tejido adiposo y/o niveles circulantes de leptina en ratones alimentados con CLA (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Kang y col., 2001; Warren y col., 2003; Poirier y col., 2006), en ratas diabéticas Zucker (Ryder y col., 2001) y en ratas OLETF (Raham y col., 2001), junto con una reducción en los depósitos grasos. Por otro lado, los resultados reportados para la adiponectina, en relación al tratamiento con CLA, son más controversiales. Así, la elevada expresión del ARNm de adiponectina hallada en nuestro trabajo, se corresponde con los hallazgos de Nagao y col. (2003) en ratas diabéticas Zucker y de Inoue y col. (2004) en ratas hipertensas. Sin embargo, otros autores han observado niveles disminuidos de adiponectina en ratones alimentados con CLA (Poirier y col., 2005b; Poirier y col., 2006), y en adipocitos tratados con CLA (Pérez-Matute y col., 2007).

Los cambios encontrados en las adipoquinas en el grupo suplementado con CLA deprivado de AL, no se correspondieron con cambios en los marcadores del estado inflamatorio evaluados.

Nuevamente se pone de manifiesto la resistencia de las ratas a manifestar los efectos usualmente observados de los CLA en el ratón, y la sensibilización generada cuando se combinan los CLA con la deprivación de AL.

II.8- Niveles de de triglicéridos en el músculo gastrocnemio y su regulación

Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, los niveles de TG musculares no estuvieron modificados por los CLA, y los mismos estuvieron acompañados de una normal captación de TG y oxidación de AG, representadas por la actividad LPL y CPT-Ib, respectivamente. En relación a estos resultados, otros autores han observado, en animales con alteraciones metabólicas, que la sustitución con mezcla de isómeros CLA o con 10*t*,12*c*-CLA, generó una disminución en los niveles de TG musculares (Henriksen y col., 2003) asociados a una menor captación por la LPL (Andreoli y col., 2009), y/o a un aumento en la CPT-Ib (Zabala y col., 2009). Asimismo, diversos autores, han observado un incremento en la actividad de la enzima oxidativa CPT-Ib en músculo esquelético de ratones (Park y col., 1997) y ratas (Rahman y col., 2001). Peters y col. (2001), han observado que este efecto estimulador en la actividad de la CPT-I muscular podría estar mediado por la activación del PPAR- α , y/o por otros mecanismos; ya que, en ratones deplecionados del gen PPAR- α , también hallaron que la expresión de la enzima CPT-I fue estimulada por los CLA en músculo esquelético. Es importante denotar que ciertos efectos observados por diversos autores han sido relacionados al tipo de CLA empleado, o a las condiciones fisiológicas de los animales. Así, a diferencia de los observado para el isómero 10*t*,12*c*-CLA y la mezcla de isómeros, el 9*c*,11*t*-CLA no ha demostrado tener efecto sobre la expresión de la enzima CPT-I en músculo esquelético de ratones sometidos a ejercicio (Kim y col., 2012).

En relación a la síntesis *de novo*, la presencia de los CLA no modificó la actividad de la enzima SCD-1 en ninguno de los grupos suplementados.

II.9- Metabolismo de la glucosa

Las diversas alteraciones en el metabolismo lipídico antes discutidas, y la reducción en los niveles de glucosa inducidas por los CLA, podrían estar asociados a modificaciones en la utilización de la glucosa y síntesis de sus reservas como glucógeno. Por esta razón, hemos decidido estudiar algunos parámetros relacionados al metabolismo de la glucosa en musculo sóleo aislado.

La reducción de los niveles séricos de glucosa, inducida por los CLA, mostró una correspondencia, en condiciones basales, con el aumento de la oxidación de glucosa en el músculo sóleo aislado; el cual estuvo más acentuado en deprivación de AL. Esta mayor metabolización de glucosa fue acompañada de una ligera, pero no significativa, mayor captación e incorporación de glucosa la cual también estuvo más marcada en las ratas deprivadas de AL. En relación a estos resultados, existen una gran controversia. Ha sido demostrado que los CLA mejoran la glucemia y la tolerancia a la glucosa en ratas obesas-diabéticas Zucker (Henriksen y col., 2003) y en otros

modelos de roedores obesos y resistentes a la insulina inducido por dietas ricas en grasa (Choi y col., 2004). No obstante, ausencia de efectos, como así también efectos negativos han sido observados en otros modelos experimentales. Numerosos autores no han observaron alteraciones en los niveles de glucosa sérica en animales normales alimentados con CLA (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Poirier y col., 2005b; Poirier y col., 2006), como tampoco en ratones diabéticos tratados con 10*t*,12*c*-CLA (Jourdan y col., 2009). En nuestro grupo de trabajo, recientemente hemos demostrado (Andreoli y col., 2012) en ratones alimentados con dietas ricas en grasa, que la sustitución con una mezcla equimolecular de isómeros 9*c*,11*t*-CLA y 10*t*,12*c*-CLA previno parcialmente alteraciones en la vía glicolítica en el hígado, pero no en músculo, asociado a efectos adversos como hiperglucemia y acumulación hepática de lactato. Específicamente, en el músculo gastrocnemio de estos ratones que poseían una marcada acumulación de TG, los CLA normalizaron el contenido de los depósitos grasos, lo cual condujo a una inhibición de la vía glicolítica, probablemente a través del ciclo intracelular glucosa-AG (Randle y col., 1963; Randle y col., 1965). A diferencia de esto, en el presente trabajo, donde los niveles de TG y la oxidación de AG musculares fueron normales, los CLA incrementaron la oxidación de la glucosa, y más marcadamente en los deprivados de AL, pudiendo ser este efecto el desencadenante de una mayor demanda de glucosa celular, que conduce a un incremento de la captación e incorporación de la misma, permaneciendo inalterable la síntesis de glucógeno.

Si bien, en condiciones basales los CLA incrementaron la utilización de la glucosa, se observó una menor respuesta a la insulina sobre la captación, incorporación y oxidación de la glucosa, como también sobre la síntesis de glucógeno en los músculos aislados de animales alimentados a ambos niveles de AL. Estos resultados están alineados con las observaciones de Tsuboyama-Kasaoka y col. (2000) quienes encontraron que ratones hembras alimentados con dietas suplementadas con 1% de CLA presentaron una elevada expresión de GLUT-4 en músculo esquelético asociada a una resistencia insulínica con hiperinsulinemia. La menor sensibilidad a la insulina fue relacionada al decrecimiento de los niveles de leptina sérica. Resultados semejantes han sido demostrados en ratones alimentados con dietas ricas en grasa suplementadas con mezcla de isómeros CLA (Liu y col., 2007). En nuestro trabajo, los cambios en la respuesta a la insulina parecerían no tener relación con la leptina ya que, las modificaciones observadas en el metabolismo de la glucosa, fueron de similar magnitud en ambos grupos suplementados con CLA. En contraposición a nuestros resultados, un efecto benéfico de los CLA en presencia de insulina ha sido encontrado por otros investigadores sobre la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno en ratas obesas diabéticas (Ryder y col., 2001; Henrinsek y col., 2003), quienes han asociado dichos efectos,

entre otros factores, a un incremento de los niveles de adiponectina, lo que condujo a una reducción en la fosforilación de los residuos serina del IRS-1 (Kadowaki y col., 2006; Choi y col., 2007). A diferencia de las ratas, la mejora en la sensibilidad a la insulina observada en ciertos estudios en ratones genéticamente obesos suplementados con CLA, ha sido relacionado a la respuesta de los PPAR- α y PPAR- γ a largo tiempo, pero no a corto plazo (Wargent y col., 2005).

En respuesta *in vitro* al efector palmitato, se observó una modificación diferencial en el metabolismo de la glucosa mediado por la acción de la insulina. Específicamente, en los grupos suplementados con CLA, independientemente de los niveles de AL, el palmitato no inhibió la acción de la insulina sobre la captación e incorporación de glucosa. Estos resultados muestran claramente que los CLA previnieron la inhibición del palmitato en la captación e incorporación de la glucosa bajo el estímulo de la insulina. Es posible proponer que modificaciones a nivel de membrana plasmática muscular, lo cual es conocido que modula la captación de la glucosa (Borkman y col., 1993), estén presentes en los animales alimentados con CLA. Ha sido demostrado que una baja relación AGPI/AGS empeora la sensibilidad a la insulina y el transporte de glucosa a través de una reducción de la fluidez de membranas (Field y col., 1990). Además, otros autores han observado que, el enriquecimiento de la membrana con AGPI aumenta el tiempo de residencia de los GLUT-1 y GLUT-4 en la membrana plasmática, incrementan la fluidez de membrana y número de receptores (Simopoulos, 1994; Martín de Santa-Olalla y col., 2009).

En los presentes resultados nuevamente se pone de manifiesto que la acción de los CLA depende de diferentes factores, entre ellos, de la especie, del estado metabólico y del tiempo de tratamiento. Además, nuevamente la privación de AL ha generado una cierta sensibilización que exagera el efecto de los CLA, siendo los resultados hallados similares en algunos aspectos a los encontrados en animales con trastornos metabólicos.

La interpretación de la posible repercusión de los CLA en humanos bajo diferentes situaciones fisiológicas y/o experimentales resulta aún más compleja debido a los diversos y controversiales efectos encontrados (Risérus y col., 2002; Brown y col., 2003; Eylofson y col., 2004; Brown y col., 2004; Moloney y col., 2004).

Conclusiones

Tanto los isómeros AGT, como los CLA, se incorporaron en los lípidos circulantes y tisulares de ratas alimentadas con dietas enriquecidas o deprivadas en AL, no obstante, los efectos metabólico-nutricionales dependieron del status de AL.

En relación a los efectos de los AGT, los resultados más relevantes muestran que:

- La incorporación de AGT fue mayor en tejido adiposo, que en hígado, músculo y suero, tanto en animales alimentados con dietas deprivadas, como enriquecidas en AL.
- De los principales isómeros ingeridos, el 9*t*-18:1 fue el que mostró mayor grado de retención en tejido hepático, en las lipoproteínas secretadas por el hígado y en músculo.
- La bioconversión de 11*t*-18:1 a 9*c*,11*t*-18:2-CLA en hígado y TA, no mostró diferencias por el status de AL.
- Los AGT incrementaron la ganancia de peso de los animales, y la misma se asoció a un incremento en la acreción de lípidos en tejido adiposo, fundamentalmente en aquellos animales alimentados con una dieta deprivada en AL.
- Los AGT incrementaron los niveles de TG séricos en animales deprivados de AL como resultado de una menor clarificación de los mismos en tejido adiposo, pero no se vieron afectados en aquellos con dietas enriquecidas de AL.
- Los AGT elevaron el contenido de TG hepático independientemente del status de AL; no obstante, los mecanismos involucrados fueron diferentes. En la dieta enriquecida en AL fue consecuencia de una disminución de la oxidación de AG, mientras que en la deprivada en AL estuvo aumentada la lipogénesis.
- Los AGT incrementaron la biosíntesis hepática de AGPI-CL n-6 en los animales enriquecidos en AL, mientras que, un efecto opuesto fue observado en aquellos deprivados de AL como consecuencia de un menor flujo a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa.
- Los AGT aumentaron los pesos de los panículos adiposos, tanto epididimal como retroperitoneal, alcanzando significancia estadísticas en los animales deprivados de AL, la cual estuvo correlacionada con una incrementada actividad de enzimas lipogénicas y flujo de sustratos a través de la SCD-1.
- Los AGT redujeron los niveles de glucosa circulante en los animales enriquecidos, pero no en los deprivados de AL, pudiendo relacionarse a la mayor sensibilidad tisular a la insulina inducida por la adiponectina.
- En músculo soleo aislado, bajo condiciones basales, la utilización de la glucosa sólo mostró un ligero, pero no significativo, incremento por la ingesta de AGT, tanto en los animales deprivados,

como en los enriquecidos en AL. Sin embargo, frente al estímulo de la insulina, se observó una menor respuesta en la captación, incorporación y oxidación de la glucosa, y síntesis de glucógeno muscular en los animales enriquecidos, pero no en los deprivados en AL.

Mensajes claves:

- ✓ Los AGT, a niveles equivalentes de los que podrían ser consumidos por la población humana, producen efectos deletéreos sobre animales de experimentación, fundamentalmente incrementando la acreción de lípidos en hígado y tejido adiposo.
- ✓ La deprivación de AL genera cambios en el entorno metabólico de los animales influyendo tanto sobre el efecto de los AGT, como en los mecanismos de acción de éstos.
- ✓ Los niveles de 11*t*-18:1, como asimismo su bioconversión a 9*c*,11*t*-CLA podrían estar atenuando los efectos deletéreos reportados por diversos investigadores para aceites enriquecidos en 9*t*-18:1.

En relación a los efectos de los CLA, los resultados más relevantes muestran que:

- Los isómeros CLA se incorporan en los tejidos analizados, mostrando mayor retención el 9*c*,11*t*-CLA que el 10*t*,12*c*-CLA, independientemente de los niveles de AL.
- Mientras que los CLA no produjeron significativos efectos en los animales alimentados con dietas ricas en AL, en los animales deprivados se observó un descenso de los panículos adiposos y de la grasa corporal, acompañados de un incremento del peso del hígado.
- Los CLA en dietas deprivadas, pero no en las enriquecidas en AL, mostraron un efecto hipotrigliceridémico, asociado a una menor secreción de TG-VLDL y a un incremento de la remoción de los mismos por la LPL en tejido adiposo.
- Los CLA en hígado de animales deprivados, pero no en los enriquecidos en AL, incrementaron los niveles de TG asociado a una baja secreción de TG-VLDL y a una aumentada actividad de las enzimas lipogénicas.
- Los CLA en las dietas deprivadas, pero no en las enriquecidas, inhibieron la biosíntesis de AA lo cual se relacionó con un menor flujo de sustrato a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa. Al mismo tiempo incrementaron la biosíntesis de AGPI-CL n-3.
- La reducción de la acreción de lípidos en tejido adiposo epididimal y retroperitoneal inducida por los CLA en animales deprivados de AL, pudo haberse debido a una mayor lipólisis de TG, dado que la actividad de la enzima LPL, como la de las enzimas lipogénicas estuvieron exacerbadas.

- En músculo soleo aislado, en condiciones basales, los CLA indujeron un aumento de la oxidación acompañado de una ligera mayor captación e incorporación de glucosa, y este efecto estuvo exacerbado en privación de AL. Contrariamente, se observó una menor respuesta a la insulina sobre la captación, incorporación y oxidación de la glucosa, como también sobre la síntesis de glucógeno en los músculos aislados de animales suplementados con CLA, independientemente de los niveles de AL. Además, en los animales que recibieron CLA, el palmitato no inhibió la acción de la insulina sobre la captación e incorporación de glucosa, independientemente de los niveles de AL.

Mensajes claves:

- ✓ Los CLA poseen efectos metabólicos diferentes en función del status de AL.
- ✓ A bajos niveles de ingesta de AL es posible una alta interacción con los CLA conduciendo a ciertos efectos biológicos benéficos, como: reducción de la acumulación de grasa, reducción de los TG circulantes, incremento en la biosíntesis de AGPI-CL n-3 asociado a una reducción de la biosíntesis de AGPI-CL n-6 y mejoramiento de la utilización de la glucosa.
- ✓ Los CLA en dietas privadas de AL conducen en la rata a modificaciones metabólicas atenuadas de aquellas descritas en el ratón.
- ✓ Es factible postular que la baja ingesta de AL podría generar en las ratas una mayor sensibilidad a los CLA, o bien, que en dietas muy ricas en AL, los CLA no compitan en la metabolización de los AGPI n-6, conduciendo a efectos diferenciales en ambas situaciones metabólicas. Esto no descarta la posibilidad que diferentes niveles de metabolitos bioactivos se puedan generar a partir de los CLA consumidos.

Los resultados de la presente tesis contribuyen al conocimiento de los efectos benéficos y deletéreos de los isómeros de AG, como también a los mecanismos de acción de los mismos, bajo situaciones que emulan experimentalmente posibles condiciones nutricionales de la población.

Bibliografía

-
- Abbey, M. y Nestel, P. J. (1994) *Plasma cholesteryl ester transfer protein activity is increased when trans-elaidic acid is substituted for cis-oleic acid in the diet*. *Atherosclerosis*. 106: 99-107.
- Abraham, S.; McGraph, H. y Rao, G.A. (1977) *Stimulation of hepatic lipogenesis by eicosa-5,8,11,14-tetraenoic acid in mice fed a high linoleate diet*. *Lipids* 12: 446-449.
- 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.; Iwata, T.; Yamauchi, Y.; Tsutsumi, K. y Sugano, M. (2003) *Metabolic effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rats*. *Nutrition Research*. 23: 1691-1701.
- Albuquerque, K. T.; Sardinha, F. L. C.; Telles, M. M.; Watanabe, R. L. H.; Nascimento, C. M. O.; Tavares do Carmo, M. G. y Ribeiro, E. B. (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.
- Alfin-Slater, R.B. y Bernick, S. (1958) *Changes in tissue lipids and tissue histology resulting from essential fatty acid deficiency in rats*. *Am. J. Clin. Nutr.* 6: 613-624.
- Allison, D.B.; Egan, S.K.; Barraj, L.M.; Caughman, C.; Infante, M. y Heimbach, J.T. (1999) *Estimated intakes of trans fatty and other fatty acids in the US population*. *J. Am. Diet. Assoc.* 99: 166-174.
- Almendingen, K.; Jordal, O.; Kierulf, P.; Sandstad, B. y Pedersen, J.I. (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.
- Anderson, R.L.; Fullmer, C.S., Jr. y Hollenbach, E.J. (1975) *Effects of the trans isomers of linoleic acid on the metabolism of linoleic acid in rats*. *J. Nutr.* 105: 393-400.
- 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.F.; Scalerandi, M.V.; Borel, I.M. y Bernal, C.A. (2007) *Effects of CLA at different dietary fat levels on the nutritional status of rats during protein repletion*. Nutrition. 23: 827-835.

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

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

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

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

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

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

Assumpção, R. P.; Dos Santos, F. D.; De Mattos Machado Andrade, P.; Barreto, G. F. y Das Graças Tavares do Carmo, M. (2004) *Effect of variation of trans-fatty acid in lactating rats' diet on lipoprotein lipase activity in mammary gland, liver, and adipose tissue*. Nutrition. 20: 806-811.

Atal, S.; Zarnowski, M. J.; Cushman, S. W. y Sampugna, J. (1994) *Comparison of body weight and adipose tissue in male C57Bl/6J mice fed diets with and without trans fatty acids*. Lipids. 29: 319-325.

-
- Azain, M.J.; Hausman, D.B.; Sisk, M.B.; Flatt, W.P. y Jewell, D.E. (2000) *Dietary conjugated linoleic acid reduces rat adipose tissue cell size rather than cell number*. J. Nutr. 130: 1548-1554.
- Baddini-Feitoza A.; Fernandes Pereira A.; Ferreira da Costa N. y B., G.R. (2009) *Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition and lipid profile*. Nutr Hosp. 24: 422-428.
- Baer, D.J.; Judd, J.T.; Clevidence, B.A. y Tracy, R.P. (2004) *Dietary fatty acids affect plasma markers of inflammation in healthy men fed controlled diets: a randomized crossover study*. Am. J. Clin. Nutr. 79: 969-973.
- Bagga, D.; Wang, L.; Farias-Eisner, R.; Glaspy, J.A. y Reddy, S.T. (2003) *Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion*. Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 1751-1756.
- Bakker, N.; Van't Veer, P. y Zock, P.L. (1997) *Adipose fatty acids and cancers of the breast, prostate and colon: an ecological study*. EURAMIC Study Group. Int. J. Cancer 72: 587-591.
- Banni, S.; Carta, G.; Angioni, E.; Murru, E.; Scanu, P.; Melis, M.P.; Bauman, D.E.; Fischer, S.M. y Ip, C. (2001) *Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver*. J Lipid Res. 42: 1056-1061.
- Banni, S.; Petroni, A.; Blasevich, M.; Carta, G.; Cordeddu, L.; Murru, E.; Melis, M.P.; Mahon, A. y Belury, M.A. (2004a) *Conjugated linoleic acids (CLA) as precursors of a distinct family of PUFA*. Lipids. 39: 1143-1146.
- Banni, S.; Petroni, A.; Blasevich, M.; Carta, G.; Angioni, E.; Murru, E.; Day, B.W.; Melis, M.P.; Spada, S. y Ip, C. (2004b) *Detection of conjugated C16 PUFAs in rat tissues as possible partial beta-oxidation products of naturally occurring conjugated linoleic acid and its metabolites*. Biochim Biophys Acta. 1682: 120-127.
- Bauman, D.E.; Baumgard, L.H.; Corl, B.A. y Griinari, J.M. (1999) *Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants*. Proc Am Soc Anim Sci. 1-15.
- Baylin, A.; Kabagambe, E. K.; Siles, X. y Campos, H. (2002) *Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake*. Am J Clin Nutr. 76: 750-757.

-
- Bell, R.R.; Spencer, M.J. y Sherriff, J.L. (1995) *Diet-induced obesity in mice can be treated without energy restriction using exercise and/or a low fat diet*. J. Nutr.. 125: 2356-2363.
- Beltowski, J. (2003) *Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue*. Med. Sci. Monit. 9: RA55-RA61.
- Belury, M.A. y Kempa-Steczko, A. (1997) *Conjugated linoleic acid modulates hepatic lipid composition in mice*. Lipids. 32: 199-204.
- Belury, M.A.; Mahon, A.; Banni, S. (2003) *The conjugated linoleic acid (CLA) isomer, t10c12-CLA, is inversely associated with changes in body weight and serum leptin in subjects with type 2 diabetes mellitus*. J. Nutr. 133: 257S-260S.
- 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. T.; Haugaard, S. B.; Larsen, T. M.; 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.
- Beresford, S.A.; Johnson, K.C.; Ritenbaugh, C.; Lasser, N.L.; Snetselaar, L.G.; Black, H.R.; Anderson, G.L.; Assaf, A.R.; Bassford, T.; Bowen, D.; Brunner, R.L.; Brzyski, R.G.; Caan, B.; Chlebowski, R.T.; Gass, M.; Harrigan, R.C.; Hays, J.; Heber, D.; Heiss, G.; Hendrix, S. L.; Howard, B. V.; Hsia, J.; Hubbell, F. A.; Jackson, R. D.; Kotchen, J. M.; Kuller, L. H.; LaCroix, A. Z.; Lane, D., S.; Langer, R., D.; Lewis, C. E.; Manson, J. E.; Margolis, K. L.; Mossavar-Rahmani, Y.; Ockene, J. K.; Parker, L. M.; Perri, M. G.; Phillips, L.; Prentice, R. L.; Robbins, J.; Rossouw, J. E.; Sarto, G. E.; Stefanick, M. L.; Van Horn, L.; Vitolins, M. Z.; Wactawski-Wende, J.; Wallace, R. B.; Whitlock, E. (2006) *Low-Fat Dietary Pattern and Risk of Colorectal Cancer. The Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial*. Jama. 295: 643-654.

-
- Bernal, C.A.; Basílico, M.Z.; Gutman, R. y Lombardo, Y.B. (1989) *Secretion and removal rates of very low density lipoprotein triglycerides at three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet*. Nutrition Reports International. 46: 71-83.
- Bernal, C.A.; Rovira, J.; Colandre, M.E.; Cusso, R.; Cadefau, J.A. (2006) *Effects of dietary cis and trans unsaturated and saturated fatty acids on the glucose metabolites and enzymes of rats*. Br. J. Nutr. 95: 947-954.
- Bernard, A. y Carlier, H. (1991) *Absorption and intestinal catabolism of fatty acids in the rat: effect of chain length and unsaturation*. Exp Physiol. 76: 445-455.
- Bhattacharya, A.; Rahman, M.M.; McCarter, R.; O'Shea, M. y Fernandes, G. (2006) *Conjugated linoleic acid and chromium lower body weight and visceral fat mass in high-fat-diet-fed mice*. Lipids 41: 437-444.
- Bieber, L.L.; Abraham, T. y Helmrath, T. (1972) *A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase*. Anal Biochem. 50: 509-518.
- Binukumar, B. y Mathew, A. (2005) *Dietary fat and risk of breast cancer*. World J Surg Oncol. 3: 45.
- Blankson, H.; Stakkestad, J.A.; Fagertun, H.; Thom, E.; Wadstein, J. y Gudmundsen, O. (2000) *Conjugated linoleic acid reduces body fat mass in overweight and obese humans*. J. Nutr. 130: 2943-2948.
- Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959) *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol. 37: 911-917.
- Blond, J.P. y Bezard, J. (1991) *Delta 5-desaturation of dihomogammalinolenic acid (20:3(n-6)) into arachidonic acid (20:4(n-6)) by rat liver microsomes and incorporation of fatty acids in microsome phospholipids*. Biochim. Biophys. Acta 1084: 255-260.
- Booker, C. S. y Mann, J. I. (2008) *Trans fatty acids and cardiovascular health: translation of the evidence base*. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 18: 448-56.

-
- Borkman, M.; Storlien, L.H.; Pan, D.A.; Jenkins, A.B.; Chisholm, D.J. y Campbell, L.V. (1993) *The relation between insulin sensitivity and the fatty-acid composition of skeletal-muscle phospholipids*. N. Engl. J. Med. 328: 238-244.
- Bray, G.A.; Paeratakul, S. y Popkin, B.M. (2004) *Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies*. Physiol Behav. 83: 549-555.
- Bretillon, L.; Chardigny, J.M.; Gregoire, S.; Berdeaux, O. y Sebedio, J.L. (1999) *Effects of conjugated linoleic acid isomers on the hepatic microsomal desaturation activities in vitro*. Lipids. 34: 965-969.
- Brown, J.M.; Boysen, M.S.; Jensen, S.S.; Morrison, R.F.; Storkson, J.; Lea-Currie, R.; Pariza, M.; Mandrup, S. y McIntosh, M.K. (2003) *Isomer-specific regulation of metabolism and PPARgamma signaling by CLA in human preadipocytes*. J Lipid Res. 44: 1287-1300.
- Brown, J.M.; Boysen, M.S.; Chung, S.; Fabiyi, O.; Morrison, R.F.; Mandrup, S.; 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.
- Bruckner, G.; Grunewald, K.K.; Tucker, R.E.; Mitchell, G.E., Jr. (1984) *Essential fatty acid status and characteristics associated with colostrum-deprived gnotobiotic and conventional lambs. Growth, organ development, cell membrane integrity and factors associated with lower bowel function*. J. Anim Sci. 58: 971-978.
- Bruhl, L. (1995) *Determination of trans fatty acids in cold pressed oils*. Eur. J. Med. Res. 1: 89-93.
- Burr, G.O. y Burr, M.M. (1930) *On the nature and role of the fatty acids essential in nutrition*. J Biol Chem. 86: 587.
- Butz, D.E.; Li, G. y Cook, M.E. (2006) *t10,c12 Conjugated linoleic acid induces compensatory growth after immune challenge*. J. Nutr. Biochem. 17: 735-741.
- Calvani M.y Benatti P. (2003) *Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA)*. Sigma-tau S.p.A.-Scientific Department: 1-55.
- Canolty, N.L. y Koong, L.J. (1976) *Utilization of energy for maintenance and for fat and lean gains by mice selected for rapid postweaning growth rate*. J. Nutr. 106: 1202-1208.

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

Carvalho-Filho, M.A.; Ueno, M.; Hirabara, S.M.; Seabra, A.B.; Carvalheira, J.B.; de Oliveira, M.G.; Velloso, L.A.; Curi, R.; Saad, M.J. (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.

Cassagno, N.; Palos-Pinto, A.; Costet, P.; Breilh, D.; Darmon, M. y Berard, A.M. (2005) *Low amounts of trans 18:1 fatty acids elevate plasma triacylglycerols but not cholesterol and alter the cellular defence to oxidative stress in mice*. Br. J. Nutr. 94: 346-352.

Challiss, R.A.; Espinal, J. y Newsholme, E.A. (1983) *Insulin sensitivity of rates of glycolysis and glycogen synthesis in soleus, stripped soleus, epitrochlearis, and hemi-diaphragm muscles isolated from sedentary rats*. Biosci. Rep. 3: 675-679.

Chardigny, J.-M.; Clouet, P.; Combe, N.; Quignard-Boulangé, A.; Schmitt, B.; Lagarde, M. y Léger, C.L. (2007) *Metabolism of trans and conjugated fatty acids*. Eur J Lipid Sci Technol. 109: 930-934.

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

Chiang, M.T. y Lu, Y.S. (1996) *Variation of plasma cholesterol levels in rats fed trans fatty acids or cis fatty acids*. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 66: 263-269.

Cho, Y. Y.; Kwon, E. Y.; Kim, H. J.; Jeon, S. M.; Lee, K. T. y Choi, M. S. (2011) *Differential effect of corn oil-based low trans structured fat on the plasma and hepatic lipid profile in an atherogenic mouse model: comparison to hydrogenated trans fat*. Lipids Health Dis. 10: 15.

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

-
- Choi, Y.; Park, Y.; Pariza, M.W. y Ntambi, J.M. (2001) *Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells*. *Biochem Biophys Res Commun*. 284: 689-693.
- Choi, J. S.; Jung, M. H.; Park, H. S. 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.S.; Koh, I.U.; Jung, M.H. y Song, J. (2007) *Effects of three different conjugated linoleic acid preparations on insulin signalling, fat oxidation and mitochondrial function in rats fed a high-fat diet*. *Br. J. Nutr.*. 98: 264-275.
- 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.M.; Sandberg, M.B. y McIntosh, M. (2005) *Trans-10,cis-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signaling*. *J Lipid Res*. 46: 885-895.
- Clément, L.; Poirier, H.; Niot, I.; Bocher, V.; Guerre-Millo, M.; Krief, S.; Staels, B. y Besnard, P. (2002) *Dietary trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse*. *J Lipid Res*. 43: 1400-1409.
- Colandre, M.E.; Diez, R.S.; Bernal, C.A. (2003) *Metabolic effects of trans fatty acids on an experimental dietary model*. *Br. J. Nutr.* 89: 631-639.
- Comba, A.; Maestri, D.M.; Berra, M.A.; Garcia, C.P.; Das, U.N.; Eynard, A.R. y Pasqualini, M.E. (2010) *Effect of omega-3 and omega-9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model*. *Lipids Health Dis*. 9: 112.
- 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.
- Cooney, G. J.; Thompson, A. L.; Furler, S. M.; Ye, J. y Kraegen, E. W. (2002) *Muscle long-chain acyl CoA esters and insulin resistance*. *Ann N Y Acad Sci*. 967: 196-207.

Costa, I.; Moral, R.; Solanas, M.; Andreu, F.J.; Ruiz de Villa, M.C.; 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.

Crettaz, M.; Prentki, M.; Zaninetti, D. y Jeanrenaud, B. (1980) *Insulin resistance in soleus muscle from obese Zucker rats. Involvement of several defective sites*. Biochem. J. 186: 525-534.

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

De Groot M. (1986) *Probability and statistics*. Reading: Addison-Wesley.

de Roos, N.; Schouten, E. y Katan, M. (2001) *Consumption of a solid fat rich in lauric acid results in a more favorable serum lipid profile in healthy men and women than consumption of a solid fat rich in trans-fatty acids*. J. Nutr. 131: 242-245.

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

De Pury, G.G. y Collins, F.D. (1972) *Very low density lipoproteins and lipoprotein lipase in serum of rats deficient in essential fatty acids*. J. Lipid Res. 13: 268-275.

Decsi, T.; Koletzko, B. (1995) *Do trans fatty acids impair linoleic acid metabolism in children?* Ann. Nutr. Metab 39: 36-41.

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

-
- Degrace, P.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Chardigny, J.M.; Sébédio, J.L. y Clouet, P. (2003) *Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypotriglyceridaemia in C57BL/6j mice fed trans-10,cis-12-linoleic acid*. FEBS Lett. 546: 335-339.
- Del Prado, M.; Hernandez-Montes, H. y Villalpando, S. (1994) *Characterization of a fluorometric method for lipoprotein lipase*. Arch Med Res. 25: 331-335.
- DeLany, J.P.; Blohm, F.; Truett, A.A.; Scimeca, J.A. y West, D.B. (1999) *Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake*. Am J Physiol. 276: R1172-R1179.
- DeLany, J.P. y West, D.B. (2000) *Changes in body composition with conjugated linoleic acid*. J Am Coll Nutr. 19: 487S-493S.
- Demeyer, D. I.; Tan, W. C. y Privett, O. S. (1974) *Effect of essential fatty acid deficiency on lipid metabolism in isolated fat cells of epididymal fat pads of rats*. Lipids. 9: 1-7.
- Deuel, H.J.; Alfin-Slater, R.B.; Wells, A.F.; Kryder, G.D. y Aftergood, L. (1955) *The effect of fat level of the diet on general nutrition. XIV Further studies on the effect of hydrogenated coconut oil on essential fatty acid deficiency in the rat*. J Nutr. 55: 337.
- Diekman, C.; Elmadfa, I.; Koletzko, B.; Puska, P.; Uauy, R. y Zevenbergen, H. (2009) *Summary statement of the International Expert Meeting: health significance of fat quality of the diet. Barcelona, Spain, February 1-2, 2009*. Ann Nutr Metab. 54 Suppl 1: 39-40.
- Dinh, T.K.; Bourre, J.M. y Durand, G. (1993) *Effect of age and alpha-linolenic acid deficiency on delta 6 desaturase activity and liver lipids in rats*. Lipids 28: 517-523.
- Dorfman, S. E.; Laurent, D.; Gounarides, J. S.; Li, X.; Mullarkey, T. L.; Rocheford, E. C.; Sari-Sarraf, F. et al. (2009) *Metabolic implications of dietary trans-fatty acids*. Obesity. 17: 1200-1207.
- Du, J. T. y Kruger, F. A. (1972) *Effect of essential fatty acids on the fatty acid synthesis in epididymal fat cells of the rat*. J. Nutr.. 102: 1033-8.
- Du, Z. Y.; Degrace, P.; Gresti, J.; Loreau, O. y Clouet, P. (2010) *Dissimilar properties of vaccenic versus elaidic acid in beta-oxidation activities and gene regulation in rat liver cells*. Lipids. 45: 581-591.

-
- Ducheix, S.; Montagner, A.; Polizzi, A.; Lasserre, F.; Marmugi, A.; Bertrand-Michel, J.; Podechard, N. et al. (2013) *Essential fatty acids deficiency promotes lipogenic gene expression and hepatic steatosis through the liver X receptor*. J Hepatol. 58: 984-992.
- Dulloo, A.G. y Girardier, L. (1992) *Influence of dietary composition on energy expenditure during recovery of body weight in the rat: implications for catch-up growth and obesity relapse*. Metabolism. 41: 1336-1342.
- Dorfman, S. E.; Laurent, D.; Gounarides, J. S.; Li, X.; Mullarkey, T. L.; Rocheford, E. C.; Sari-Sarraf, F. et al. (2009) *Metabolic implications of dietary trans-fatty acids*. Obesity. 17: 1200-1207.
- Ealey, K.N.; El-Soheemy, A. y Archer, M.C. (2002) *Effects of dietary conjugated linoleic acid on the expression of uncoupling proteins in mice and rats*. Lipids 37: 853-861.
- Eckel, R.H. (2005) *Obesity*. Circulation. 111: e257-259.
- Ederf, 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.
- Enig, M.G.; Munn, R.J. y Keeney, M. (1978) *Dietary fat and cancer trends--a critique*. Fed. Proc. 37: 2215-2220.
- El-Badry, A.M.; Graf, R. y Clavien, P.A. (2007) *Omega 3 - Omega 6: What is right for the liver?*. J Hepatol. 47: 718-725.
- Ellman, G. y Lysko, H. (1979) *A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups*. Anal Biochem. 93: 98-102.
- Espinal, J.; Dohm, G.L. y Newsholme, E.A. (1983) *Sensitivity to insulin of glycolysis and glycogen synthesis of isolated soleus-muscle strips from sedentary, exercised and exercise-trained rats*. Biochem. J. 212: 453-458.
- Eyjolfson, V.; Spriet, L.L. y Dyck, D.J. (2004) *Conjugated linoleic acid improves insulin sensitivity in young, sedentary humans*. Med Sci Sports Exerc. 36: 814-820.
- FAO. (2012) *Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos*. Edición española.

-
- Faulconnier, Y.; Arnal, M.A.; Patureau Mirand, P.; Chardigny, J.M. y Chilliard, Y. (2004) *Isomers of conjugated linoleic acid decrease plasma lipids and stimulate adipose tissue lipogenesis without changing adipose weight in post-prandial adult sedentary or trained Wistar rat*. J. Nutr. Biochem. 15: 741-748.
- Fedacko, J.; Vargova, V.; Singh, R. B.; Anjum, B.; Takahashi, T.; Tongnuka, M.; Dharwadkar, S. et al. (2012) *Association of High w-6/w-3 Fatty Acid Ratio Diet with Causes of Death Due to Noncommunicable Diseases Among Urban Decedents in north India*. Open Nutraceuticals J. 5: 113-123.
- Fernandez-Quintela, A.; Rodríguez, V. M. y Portillo, M. P. (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.
- Field, C.J.; Ryan, E.A.; Thomson, A.B. y Clandinin, M.T. (1990) *Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals*. J. Biol. Chem. 265: 11143-11150.
- Field, A.E.; Willett, W.C.; Lissner, L. y Colditz, G.A. (2007) *Dietary fat and weight gain among women in the Nurses' Health Study*. Obesity (Silver Spring). 15: 967-976.
- Folch, J.; Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. (1957) *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem. 226: 497-509.
- Gardner, C.D.; Kiazand, A.; Alhassan, S.; Kim, S.; Stafford, R.S.; Balise, R.R.; Kraemer, H.C. y King, A.C. (2007) *Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A TO Z Weight Loss Study: a randomized trial*. JAMA. 297: 969-977.
- Gaullier, J.M.; Halse, J.; Hoye, K.; Kristiansen, K.; Fagertun, H.; Vik, H. y Gudmundsen, O. (2004) *Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans*. Am J Clin Nutr. 79: 1118-1125.

-
- Gaullier, J.M.; Halse, J.; Hoye, K.; Kristiansen, K.; Fagertun, H.; Vik, H. y Gudmundsen, O. (2005) *Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans*. J. Nutr.. 135: 778-784.
- Gavino, V.C.; Gavino, G.; Leblanc, M.J. y Tuchweber, B. (2000) *An isomeric mixture of conjugated linoleic acids but not pure cis-9, trans-11-octadecadienoic acid affects body weight gain and plasma lipids in hamsters*. J. Nutr.. 130: 27-29.
- Gebauer, S.K.; Chardigny, J.M.; Jakobsen, M.U.; Lamarche, B.; Lock, A.L.; Proctor, S.D. y Baer, D.J. (2011) *Effects of ruminant trans fatty acids on cardiovascular disease and cancer: a comprehensive review of epidemiological, clinical, and mechanistic studies*. Adv. Nutr. 2: 332-354.
- Gibson, R.A.; Muhlhausler, B.; 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 Suppl 2: 17-26.
- Gibson, R.A.; Neumann, M.A.; Lien, E.L.; Boyd, K.A. y Tu, W.C. (2013) *Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid is inhibited by diets high in polyunsaturated fatty acids*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 88: 139-146.
- Gillingham, L.G.; Harris-Janz, S. y Jones, P.J. (2011) *Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors*. Lipids. 46: 209-228.
- Giudetti, A.M.; Beynen, A.C.; Lemmens, A.G.; Gnoni, G.V. y Geelen, M.J. (2003) *Hepatic fatty acid metabolism in rats fed diets with different contents of C18:0, C18:1 cis and C18:1 trans isomers*. Br. J. Nutr. 90: 887-893.
- Glaser, K.R.; Wenk, C. y Scheeder, M.R. (2002) *Effects of feeding pigs increasing levels of C 18:1 trans fatty acids on fatty acid composition of backfat and intramuscular fat as well as backfat firmness*. Arch. Tierernahr. 56: 117-130.
- Ha, Y.L.; Grimm, N.K. y Pariza, M.W. (1987) *Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid*. Carcinogenesis. 8: 1881-1887.

-
- Hammarstedt, A.; Jansson, P. A.; Wesslau, C.; Yang, X. y Smith, U. (2003) *Reduced expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance*. Biochem Biophys Res Comm. 301: 578-582.
- Han, S. N.; Leka, L. S.; Lichtenstein, A. H.; Ausman, L. M.; Schaefer, E. J. y Meydani, S. N. (2002) *Effect of hydrogenated and saturated , relative to polyunsaturated , fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia*. J Lipid Res. 43: 445-452.
- Hargrave, K.M.; Meyer, B.J.; Li, C.; Azain, M.J.; Baile, C.A. y Miner, J.L. (2004) *Influence of dietary conjugated linoleic Acid and fat source on body fat and apoptosis in mice*. Obes Res. 12: 1435-1444.
- Hargrave, K.M.; Azain, M.J. y Miner, J.L. (2005) *Dietary coconut oil increases conjugated linoleic acid-induced body fat loss in mice independent of essential fatty acid deficiency*. Biochim. Biophys. Acta 1737: 52-60.
- Hariri, N.; Gougeon, R. y Thibault, L. (2010) *A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content*. Nutr Res. 30: 632-643.
- Henriksen, E.J.; Teachey, M.K.; Taylor, Z.C.; Jacob, S.; Ptock, A.; Kramer, K. y Hasselwander, O. (2003) *Isomer-specific actions of conjugated linoleic acid on muscle glucose transport in the obese Zucker rat*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 285: E98-E105.
- Hill, Eldon G, Johnson, S. B. y Holman, A. T. (1979) *Intensification of essential fatty acid deficiency in the rat by dietary trans fatty acids*. J. Nutr.. 1759-1765.
- Hill, E G, Johnson, S. B.; Lawson, L. D.; Mahfouz, M. M. y Holman, R. T. (1982) *Perturbation of the metabolism of essential fatty acids by dietary partially hydrogenated vegetable oil*. Proc Natl Acad Sci USA. 79: 953-7.
- Hirabara, S.M.; Curi, R.; Maechler, P. (2010) *Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells*. J. Cell Physiol 222: 187-194.
- Hirabara, S.M.; Gorjao, R.; Vinolo, M.A.; Rodrigues, A.C.; Nachbar, R.T.; Curi, R. (2012) *Molecular targets related to inflammation and insulin resistance and potential interventions*. J. Biomed. Biotechnol. 2012: 379024.

-
- Hjelte, L.; Melin, T.; Nilsson, A. y Strandvik, B. (1990) *Absorption and metabolism of [3H]arachidonic and [14C]linoleic acid in essential fatty acid-deficient rats*. Am. J. Physiol 259: G116-G124.
- Holman, R. T. (1960) *The ratio of trienoic: tetraenoic acids in tissue lipids as a measure of essential fatty acid requirement*. J. Nutr.. 70: 405-410.
- Holman, R.T.; Caster, W.O.; Wiese, H.F. (1964) *The essential fatty acid requirement of infants and the assesment of their dietary intake of linoleate by serum fatty acid analysis*. Am. J. Clin. Nutr. 14: 70-75.
- Holman, R.T. (1968) *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*. Vol. 9, p.279.
- Holman, R. T. (1971) *Essential fatty acids deficiency*. Prog Chem Fats Other Lipids. 9: 275-348.
- Holman, R.T. (1998) *The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health*. J. Nutr. 128: 427S-433S.
- Holmes, M.D.; Hunter, D.J.; Colditz, G.A.; Stampfer, M.J.; Hankinson, S.E.; Speizer, F.E.; Rosner, B. y Willett, W.C. (1999) *Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer*. JAMA 281: 914-920.
- House, R.L.; Cassady, J.P.; Eisen, E.J.; Eling, T.E.; Collins, J.B.; Grissom, S.F. y Odle, J. (2005) *Functional genomic characterization of delipidation elicited by trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid (t10c12-CLA) in a polygenic obese line of mice*. Physiol Genomics. 21: 351-361.
- Houseknecht, K. L.; Vanden Heuvel, J. P.; Moya-Camarena, S. Y.; Portocarrero, C. P.; Peck, L. W.; Nickel, K. P. y Belury, M. A. (1998) *Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat*. Biochem Biophys Res Comm. 244: 678-682.
- Howard, B.V.; Manson, J.E.; Stefanick, M.L.; Beresford, S.A.; Frank, G.; Jones, B.; Rodabough, R.J.; Snetselaar, L.; Thomson, C.; Tinker, L.; Vitolins, M. y Prentice, R. (2006) *Low-fat dietary pattern and weight change over 7 years: the Women's Health Initiative Dietary Modification Trial*. JAMA. 295: 39-49.
- Hsu, R.Y. y Lardy, H.A. (1969) *Malic enzyme*. Methods enzymol. 17: 230-235.

-
- Hu, F.B.; van Dam, R.M. y Liu, S. (2001) *Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate*. Diabetologia 44: 805-817.
- Huang, Y. S.; Huang, W. C.; Li, C. W. y Chuang, L. T. (2011) *Eicosadienoic acid differentially modulates production of pro-inflammatory modulators in murine macrophages*. Mol Cel Biochem. 358: 85-94.
- Hyman, B.T.; Stoll, L.L. y Spector, A.A. (1981) *Accumulation of (n-9)-eicosatrienoic acid in confluent 3T3-L1 and 3T3 cells*. J. Biol. Chem. 256: 8863-8866.
- Ibrahim, A. y Natarajan, S. (2005) *Dietary trans-fatty acids alter adipocyte plasma membrane fatty acid composition and insulin sensitivity in rats*. Metabolism. 54: 240-246.
- Ide, T.; Watanabe, M.; Sugano, M. y Yamamoto, I. (1987) *Activities of liver mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation enzymes in rats fed trans fat*. Lipids. 22: 6-10.
- Innis, S.M. (1991) *Essential fatty acids in growth and development*. Prog. Lipid Res. 30: 39-103.
- Inoue, N.; Nagao, K.; Hirata, J.; Wang, Y.M. y Yanagita, T. (2004) *Conjugated linoleic acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously hypertensive rats*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 323: 679-684.
- Ip, M.M.; McGee, S.O.; Masso-Welch, P.A.; Ip, C.; Meng, X.; Ou, L. y Shoemaker, S.F. (2007) *The t10,c12 isomer of conjugated linoleic acid stimulates mammary tumorigenesis in transgenic mice over-expressing erbB2 in the mammary epithelium*. Carcinogenesis. 28: 1269-1276.
- Ippagunta, S.; Hadenfeldt, T.J.; Miner, J.L. y Hargrave-Barnes, K.M. (2011) *Dietary conjugated linoleic acid induces lipolysis in adipose tissue of coconut oil-fed mice but not soy oil-fed mice*. Lipids. 46: 821-830.
- Ippagunta, S.; Angius, Z.; Sanda, M. y Barnes, K.M. (2013) *Dietary CLA-induced Lipolysis Is Delayed in Soy Oil-Fed Mice Compared to Coconut Oil-Fed Mice*. Lipids. 48: 1145-1155.
- Javadi, M.; Beynen, A.C.; Hovenier, R.; Lankhorst, A.; Lemmens, A.G.; Terpstra, A.H. 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.

-
- Jeyakumar, S. M.; Prashant, A.; Rani, K. S.; Laxmi, R.; Vani, A.; Kumar, P. U. y Vajreswari, A. (2011) *Chronic consumption of trans-fat-rich diet increases hepatic cholesterol levels and impairs muscle insulin sensitivity without leading to hepatic steatosis and hypertriglyceridemia in female Fischer rats*. *Ann Nutr Metab*. 58: 272-280.
- Jourdan, T.; Djaouti, L.; Demizieux, L.; Gresti, J.; Verges, B. y Degrace, 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.
- Jump, D.B. y Clarke, S.D. (1999) *Regulation of gene expression by dietary fat*. *Annu. Rev. Nutr*. 19: 63-90.
- Jump, D.B. (2002) *The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids*. *J Biol Chem* 277: 8755-8758.
- Kadegowda, A.K.; Connor, E.E.; Teter, B.B.; Sampugna, J.; Delmonte, P.; Piperova, L.S. y Erdman, R.A. (2010) *Dietary trans fatty acid isomers differ in their effects on mammary lipid metabolism as well as lipogenic gene expression in lactating mice*. *J. Nutr*. 140: 919-924.
- Kadowaki, T.; Yamauchi, T.; Kubota, N.; Hara, K.; Ueki, K. y Tobe, K. (2006) *Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome*. *J. Clin. Invest* 116: 1784-1792.
- Kang, K.; Miyazaki, M.; Ntambi, J.M. y Pariza, M.W. (2004) *Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity*. *Biochem Biophys Res Commun*. 315: 532-537.
- Kant, A.K. (2010) *Dietary patterns: biomarkers and chronic disease risk*. *Appl. Physiol Nutr Metab*. 35: 199-206.
- Kavanagh, K.; Jones, K.L.; Sawyer, J.; Kelley, K.; Carr, J.J.; Wagner, J.D. y Rudel, L.L. (2007) *Trans fat diet induces abdominal obesity and changes in insulin sensitivity in monkeys*. *Obesity*. (Silver. Spring) 15: 1675-1684.

-
- Kelley, D.S.; Bartolini, G.L.; Newman, J.W.; Vemuri, M. y Mackey, B.E. (2006) *Fatty acid composition of liver, adipose tissue, spleen, and heart of mice fed diets containing t10, c12-, and c9, t11-conjugated linoleic acid*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 74: 331-338.
- Kelley, N.S.; Hubbard, N.E. y Erickson, K.L. (2007) *Conjugated linoleic acid isomers and cancer*. J. Nutr. 137: 2599-2607.
- Kelly, G.S. (2001) *Conjugated linoleic acid: a review*. Altern. Med. Rev. 6: 367-382.
- Kennedy, A.; Chung, S.; LaPoint, K.; Fabiyi, O. y McIntosh, M.K. (2008) *Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid antagonizes ligand-dependent PPARgamma activity in primary cultures of human adipocytes*. J. Nutr.. 138: 455-461.
- Kennedy, A.; Martinez, K.; Schmidt, S.; Mandrup, S.; LaPoint, K. y McIntosh, M. (2010) *Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid*. J. Nutr. Biochem. 21: 171-179.
- Keys, A. (1995) *Mediterranean diet and public health: personal reflections*. Am J Clin Nutr. 61: 1321S-1323S.
- Kim, M.R.; Park, Y.; Albright, K.J. y Pariza, M.W. (2002) *Differential responses of hamsters and rats fed high-fat or low-fat diets supplemented with conjugated linoleic acid*. Nutrition Research. 22: 715-722.
- Kim, H.K.; Kim, S.R.; Ahn, J.Y.; Cho, I.J.; Yoon, C.S. y Ha, T.Y. (2005) *Dietary conjugated linoleic acid reduces lipid peroxidation by increasing oxidative stability in rats*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 51: 8-15.
- 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.
- Kinsella, J.E.; Bruckner, G.; Mai, J. y Shimp, J. (1981) *Metabolism of trans fatty acids with emphasis on the effects of trans, trans-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: an overview*. Am. J. Clin. Nutr. 34: 2307-2318.

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.

Kliwer, S.A.; Lenhard, J.M.; Willson, T.M.; Patel, I.; Morris, D.C. y Lehmann, J.M. (1995) *A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation*. Cell 83: 813-819.

Kliwer, S.A.; Sundseth, S.S.; Jones, S.A.; Brown, P.J.; Wisely, G.B.; Koble, C.S.; Devchand, P.; Wahli, W.; Willson, T.M.; Lenhard, J.M. y Lehmann, J.M. (1997) *Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 94: 4318-4323.

Koletzko, B. (1992) *Trans fatty acids may impair biosynthesis of long-chain polyunsaturates and growth in man*. Acta Paediatr. 81: 302-306.

Koletzko, B. y Decsi, T. (1997) *Metabolic aspects of trans fatty acids*. Clin. Nutr. 16: 229-237.

Koronowicz, A.; Dulinska-Litewka, J.; Pisulewski, P. y Laidler, P. (2009) *[Effect of conjugated linoleic acid isomers on proliferation of mammary cancer cells]*. Roczn. Panstw. Zakl. Hig. 60: 261-267.

Korotkova, M. y Strandvik, B. (2000) *Essential fatty acid deficiency affects the fatty acid composition of the rat small intestinal and colonic mucosa differently*. Biochim. Biophys. Acta 1487: 319-325.

Korotkova, M.; Gabrielsson, B.; Hanson, L.A.; Strandvik, B. (2002) *Maternal dietary intake of essential fatty acids affects adipose tissue growth and leptin mRNA expression in suckling rat pups*. Pediatr. Res. 52: 78-84.

Kramar, J. y Levine, V.E. (1953) *Influence of fats and fatty acids on the capillaries*. J. Nutr. 50: 149-160.

Kraft, J.; Hanske, L.; Mockel, P.; Zimmermann, S.; Hartl, A.; Kramer, J.K.; 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.

Kraft, J.; Spiltoir, J.I.; Salter, A.M. y Lock, A.L. (2011) *Differential effects of the trans-18:1 isomer profile of partially hydrogenated vegetable oils on cholesterol and lipoprotein metabolism in male F1B hamsters*. J. Nutr. 141: 1819-1826.

Krauss, R. M.; Eckel, R. H.; Howard, B.; Appel, L., J.; Daniels, S. R.; Deckelbaum, R. J.; Erdman, J. W.; Kris-Etherton, P.; Goldberg, I. J.; Kotchen, T. A.; Lichtenstein, A. H.; Mitch, W. E.; Mullis, M.; Robinson, K.; Wylie-Rosett, J.; Jeor S.; Suttie, J.; Tribble. D. L.; Bazzarre, T. L. (2000) *AHA Dietary Guidelines. Revision 2000: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee of the American Heart Association*. AHA Scientific Statement. Circulation 102: 2284-2299.

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

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

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

Kummerow, F.A.; Zhou, Q.; Mahfouz, M.M.; Smiricky, M.R.; Grieshop, C.M. y Schaeffer, D.J. (2004) *Trans fatty acids in hydrogenated fat inhibited the synthesis of the polyunsaturated fatty acids in the phospholipid of arterial cells*. Life Sci. 74: 2707-2723.

Lagrost, L. (1992) *Differential effects of cis and trans fatty acid isomers, oleic and elaidic acids, on the cholesteryl ester transfer protein activity*. Biochim. Biophys. Acta 1124: 159-162.

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

Larqu e, E.; Zamora, S. y Gil, A. (2001) *Dietary trans fatty acids in early life: a review*. Early Hum Dev. 65: S31-41.

-
- Larqué, E.; García-Ruiz, P.; Perez-Llamas, F.; Zamora, S. y Gil, A. (2003) Biochemical and Molecular Actions of Nutrients Dietary Trans Fatty Acids Alter the Compositions of Microsomes and Mitochondria and the Activities of Microsome Δ 6-Fatty Acid Desaturase and Glucose-6-Phosphatase in Livers of Pregnant Rats. *J. Nutr.* 133: 2526-2531.
- Larsen, T.M.; Toubro, S.; Gudmundsen, O. y Astrup, A. (2006) *Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain.* *Am J Clin Nutr.* 83: 606-612.
- Larsson, S.C.; Bergkvist, L. y Wolk, A. (2009) *Conjugated linoleic acid intake and breast cancer risk in a prospective cohort of Swedish women.* *Am J Clin Nutr.* 90: 556-560.
- Lasa, A.; Churrua, I.; Simon, E.; Fernandez-Quintela, A.; Rodriguez, V.M. y Portillo, M.P. (2008) *Trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid does not increase body fat loss induced by energy restriction.* *Br. J. Nutr.* 100: 1245-1250.
- Laurell, S. (1966) *A method for routine determination of plasma triglycerides.* *Scand J Clin Lab Invest.* 18: 668-672.
- Lauritzen, L.; Hansen, H.S.; Jorgensen, M.H. y Michaelsen, K.F. (2001) *The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina.* *Prog. Lipid Res.* 40: 1-94.
- Lawrence, G.D. (2013) *Dietary fats and health: dietary recommendations in the context of scientific evidence.* *Adv Nutr.* 4: 294-302.
- Lawson, L.D.; Hill, E.G.; Holman, R.T. (1983) *Suppression of arachidonic acid in lipids of rat tissues by dietary mixed isomeric cis and trans octadecenoates.* *J. Nutr.* 113: 1827-1835.
- Lee, K.N.; Pariza, M.W. y Ntambi, J.M. (1998) *Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression.* *Biochem Biophys Res Commun.* 248: 817-821.
- Lefevre, M.; Lovejoy, J. C.; Smith, S. R.; Delany, J. P.; Champagne, C.; Most, M. M.; Denkins, Y. et al. (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.

-
- Leighton, B.; Budohoski, L.; Lozeman, F.J.; Challiss, R.A. y Newsholme, E.A. (1985) *The effect of prostaglandins E1, E2 and F2 alpha and indomethacin on the sensitivity of glycolysis and glycogen synthesis to insulin in stripped soleus muscles of the rat*. *Biochem. J.* 227: 337-340.
- Li, Y. y Watkins, B.A. (1998) *Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo prostaglandin E2 biosynthesis in rats fed n-6 or n-3 fatty acids*. *Lipids.* 33: 417-425.
- Li, Y.; Nara, T. Y. y Nakamura, M. T. (2005) *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is required for feedback regulation of highly unsaturated fatty acid synthesis*. *J Lipid Res.* 46: 2432-2440.
- Li, J.; Viswanadha, S. y Loor, J.J. (2012) *Hepatic Metabolic, Inflammatory, and Stress-Related Gene Expression in Growing Mice Consuming a Low Dose of Trans-10, cis-12-Conjugated Linoleic Acid*. *Journal of Lipids.* 2012: 571281.
- Lichtenstein, A.H.; Schwab, U.S. (2000) *Relationship of dietary fat to glucose metabolism*. *Atherosclerosis* 150: 227-243.
- Lien, E. L.; Boyle, F. G.; Wrenn, J. M.; Perry, R. W.; Thompson, C. A. y Borzelleca, J. F. (2001) *Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: a 13-week study in rats*. *Food Chem Toxicol.* 39: 385-92.
- Lin, Y.; Schuurbiens, E.; Van der Veen, S. y De Deckere, E.A. (2001a) *Conjugated linoleic acid isomers have differential effects on triglyceride secretion in Hep G2 cells*. *Biochim Biophys Acta.* 1533: 38-46.
- Lin, Y.; Kreeft, A.; Schuurbiens, J.A. y Draijer, R. (2001b) *Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes*. *J. Nutr. Biochem.* 12: 183-189.
- Ling, P.R.; De Leon, C.E.; Le, H.; Puder, M.; Bistran, B.R. (2010) *Early development of essential fatty acid deficiency in rats: fat-free vs. hydrogenated coconut oil diet*. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 83: 229-237.
- Liu, L.F.; Purushotham, A.; Wendel, A.A. y Belury, M.A. (2007) *Combined effects of rosiglitazone and conjugated linoleic acid on adiposity, insulin sensitivity, and hepatic steatosis in high-fat-fed mice*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 292: G1671-G1682.

-
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (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.A.; Zhou, S.; Ip, C. y Decker, E.A. (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.
- Loor, J.J.; Lin, X. y Herbein, J.H. (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.
- Lopez-Garcia, E.; Schulze, M.B.; Meigs, J.B.; Manson, J.E.; Rifai, N.; Stampfer, M.J.; Willett, W.C. y Hu, F.B. (2005) *Consumption of trans fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction*. *J. Nutr.* 135: 562-566.
- Lopez-Miranda, J.; Perez-Jimenez, F.; Ros, E.; De, C.R.; Badimon, L.; Covas, M.I.; Escrich, E.; Ordovas, J.M.; Soriguer, F.; Abia, R.; de la Lastra, C.A.; Battino, M.; Corella, D.; Chamorro-Quiros, J.; Delgado-Lista, J.; Giugliano, D.; Esposito, K.; Estruch, R.; Fernandez-Real, J.M.; Gaforio, J.J.; La, V.C.; Lairon, D.; Lopez-Segura, F.; Mata, P.; Menendez, J.A.; Muriana, F.J.; Osada, J.; Panagiotakos, D.B.; Paniagua, J.A.; Perez-Martinez, P.; Perona, J.; Peinado, M.A.; Pineda-Priego, M.; Poulsen, H.E.; Quiles, J.L.; Ramirez-Tortosa, M.C.; Ruano, J.; Serra-Majem, L.; Sola, R.; Solanas, M.; Solfrizzi, V.; Torre-Fornell, R.; Trichopoulou, A.; Uceda, M.; Villalba-Montoro, J.M.; Villar-Ortiz, J.R.; Visioli, F.; Yiannakouris, N. (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.
- Lord, R.S. y Bralley, J.A. (2008). *Laboratory evaluations for integrative and functional medicine*. Metametrix Institute, Duluth.
- Louheranta, A.M.; Turpeinen, A.K.; Vidgren, H.M.; Schwab, U.S. y Uusitupa, M.I. (1999) *A high-trans fatty acid diet and insulin sensitivity in young healthy women*. *Metabolism* 48: 870-875.
- Lovejoy, J.C.; Smith, S.R.; Champagne, C.M.; Most, M.M.; Lefevre, M.; DeLany, J.P.; Denkins, Y.M.; Rood, J.C.; Veldhuis, J. y Bray, G.A. (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.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem. 193: 265-275.

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

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

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

Machado, R. M.; Stefano, T.; Oliveira, C. P. M. S.; Mello, E. S.; Ferreira, F. D.; Nunes, V. S.; Lima, M. R. D. et al. (2010) *Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content*. J. Nutr.. 140: 1127-1132.

Mahfouz, M.M.; Johnson, S. y Holman, R.T. (1980) *The effect of isomeric trans-18:1 acids on the desaturation of palmitic, linoleic and eicosa-8,11,14-trienoic acids by rat liver microsomes*. Lipids 15: 100-107.

Mahfouz, M.M.; Smith, T.L.; Kummerow, F.A. (1984) *Effect of dietary fats on desaturase activities and the biosynthesis of fatty acids in rat-liver microsomes*. Lipids 19: 214-222.

Mantzioris, E.; James, M.J.; Gibson, R.A. y Cleland, L.G. (1994) *Dietary substitution with an alpha-linolenic acid-rich vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations in tissues*. Am. J. Clin. Nutr. 59: 1304-1309.

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

Martín de Santa Olalla, L.; Sánchez Muniz, F. J. y Vaquero, M. P. (2009) *N-3 fatty acids in glucose metabolism and insulin sensitivity*. Nutr Hosp. 24: 113-127.

Martins, S.V.; Lopes, P.A.; Alfaia, C.M.; Rodrigues, P.O.; Alves, S.P.; Pinto, R.M.; Castro, M.F.; Bessa, R.J. y Prates, J.A. (2010) *Serum adipokine profile and fatty acid composition of adipose*

tissues are affected by conjugated linoleic acid and saturated fat diets in obese Zucker rats. Br. J. Nutr. 103: 869-878.

Massao-Hirabara, H.S.; de Oliveira Carvalho, C.R.; Mendonca, J.R.; Piltcher, H.E.; Fernandes, L.C. y Curi, R. (2003) *Palmitate acutely raises glycogen synthesis in rat soleus muscle by a mechanism that requires its metabolism (Randle cycle).* FEBS Lett. 541: 109-114.

Mater, M.K.; Pan, D.; Bergen, W.G. y Jump, D.B. (1998) *Arachidonic acid inhibits lipogenic gene expression in 3T3-L1 adipocytes through a prostanoid pathway.* J. Lipid Res. 39: 1327-1334.

Matthan, N.R.; Welty, F.K.; Barrett, P.H.; Harausz, C.; Dolnikowski, G.G.; Parks, J.S.; Eckel, R.H.; Schaefer, E.J.; Lichtenstein, A.H. (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.F.; Lichtenstein, A.H.; Ausman, L.M.; Jalbert, S.M.; 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.

McKelvey, W.; Greenland, S.; Chen, M.J.; Longnecker, M.P.; Frankl, H.D.; Lee, E.R. y Haile, R.W. (1999) *A case-control study of colorectal adenomatous polyps and consumption of foods containing partially hydrogenated oils.* Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 8: 519-524.

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

Melin, T. y Nilsson, A. (1997) *Delta-6-desaturase and delta-5-desaturase in human Hep G2 cells are both fatty acid interconversion rate limiting and are upregulated under essential fatty acid deficient conditions.* Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 56: 437-442.

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

-
- Mersmann, H.J. (2002) *Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition*. J Anim Sci. 80: 126-134.
- Meyer, K.A.; Kushi, L.H.; Jacobs, D.R., Jr. y Folsom, A.R. (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.
- Mihara, K. (1990) *Structure and regulation of rat liver microsomal stearoyl-CoA desaturase gene*. J. Biochem. 108: 1022-1029.
- Minich, D. M.; Vonk, R. J. y Verkade, H. J. (1997) *Intestinal absorption of essential fatty acids under physiological and essential fatty acid-deficient conditions*. J Lipid Res. 38: 1709-1721.
- Miranda, J.; Churrua, I.; Fernández-Quintela, A.; Rodríguez, V.M.; Macarulla, M.T.; Simón, E. y Portillo, M.P. (2009) *Weak effect of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid on body fat accumulation in adult hamsters*. Br. J. Nutr.. 102: 1583-1589.
- Mitmesser, S.H.; Carr, T.P. (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.
- Miyazaki, M.; Gomez, F.E. y Ntambi, J.M. (2002) *Lack of stearoyl-CoA desaturase-1 function induces a palmitoyl-CoA Delta6 desaturase and represses the stearoyl-CoA desaturase-3 gene in the preputial glands of the mouse*. J. Lipid Res. 43: 2146-2154.
- Moloney, F.; Yeow, T.P.; Mullen, A.; Nolan, J.J. y Roche, H.M. (2004) *Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus*. Am. J. Clin. Nutr. 80: 887-895.
- Moon, H.S.; Lee, H.G.; Seo, J.H.; Chung, C.S.; Kim, T.G.; Kim, I.Y.; Lim, K.W.; Seo, S.J.; Choi, Y.J. y Cho, C.S. (2006) *Down-regulation of PPARgamma2-induced adipogenesis by PEGylated conjugated linoleic acid as the pro-drug: Attenuation of lipid accumulation and reduction of apoptosis*. Arch Biochem Biophys. 456: 19-29.
- Moon, Y. A.; Hammer, R. E. y Horton, J. D. (2009) *Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice*. J Lipid Res. 50: 412-423.

-
- Mougiou, V.; Matsakas, A.; Petridou, A.; Ring, S.; Sagredos, A.; Melissopoulou, A.; Tsigilis, N. y Nikolaidis, M. (2001) *Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat*. J. Nutr. Biochem. 12: 585-594.
- Moya-Camarena, S.Y.; Vanden Heuvel, J.P.; Blanchard, S.G.; Leesnitzer, L.A. y Belury, M.A. (1999) *Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPARalpha*. J Lipid Res. 40: 1426-1433.
- Mozaffarian, D.; Pischon, T.; Hankinson, S.E.; Rifai, N.; Joshipura, K.; Willett, W.C.; Rimm, E.B. (2004a) *Dietary intake of trans fatty acids and systemic inflammation in women*. Am. J. Clin. Nutr. 79: 606-612.
- Mozaffarian, D.; Rimm, E.B.; King, I.B.; Lawler, R.L.; McDonald, G.B.; Levy, W.C. (2004b) *trans fatty acids and systemic inflammation in heart failure*. Am. J. Clin. Nutr. 80: 1521-1525.
- Mozaffarian, D.; Katan, M. B.; Ascherio, A.; Stampfer, M. J.; Willett, W. C. y Food, T. (2006) *Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease*. New Engl J Med. 1601-1613.
- Mozaffarian, D.; Aro, A. y Willett, W.C. (2009) *Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence*. Eur J Clin Nutr. 63: S5-21.
- Nagao, K.; Inoue, N.; Wang, Y.M. 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.
- Nagao, K.; Higa, K.; Shirouchi, B.; Nomura, S.; Inoue, N.; Inafuku, M.; Yanagita, T. (2008) *Effect of Vaccinium ashei reade leaves on lipid metabolism in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 72: 1619-1622.
- Natarajan, S. y 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.A.; Saebo, A.; Lassel, T.S.; Chardigny, J.M.; Sebedio, J.L. y Mensink, R.P. (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.

Nestel, P.; Noakes, M.; Belling, B.; McArthur, R.; Clifton, P.; Janus, E. y Abbey, M. (1992) *Plasma lipoprotein lipid and Lp[a] changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. J Lipid Res.* 33: 1029-1036.

Noone, E.J.; Roche, H.M.; Nugent, A.P. y Gibney, M.J. (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.

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

Ntambi, J. (2004) *Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. Prog Lipid Res.* 43: 91-104.

Oh, W.; Abu-Elheiga, L.; Kordari, P.; Gu, Z.; Shaikenov, T.; Chirala, S.S.; Wakil, S.J. (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. y Yagi, K. (1979) *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem.* 95: 351-358.

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

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.

Palacios, A.; Piergiacomini, V. y Catala, A. (2003) *Antioxidant effect of conjugated linoleic acid and vitamin A during non enzymatic lipid peroxidation of rat liver microsomes and mitochondria. Mol. Cell Biochem.* 250: 107-113.

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

-
- Pariza, M.W.; Park, Y. y Cook, M.E. (2000) *Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation*. Proc Soc Exp Biol Med. 223: 8-13.
- Pariza, M.W.; Park, Y. y Cook, M.E. (2001) *The biologically active isomers of conjugated linoleic acid*. Prog. Lipid. Res. 40: 283-298.
- Park, Y.; Albright, K.J.; Liu, W.; Storkson, J.M.; Cook, M.E. y Pariza, M.W. (1997) *Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice*. Lipids. 32: 853-858.
- Park, Y.; Storkson, J.M.; Albright, K.J.; Liu, W. y Pariza, M.W. (1999) *Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice*. Lipids. 34: 235-241.
- Park, Y. y Pariza, M.W. (2001) *The effects of dietary conjugated nonadecadienoic acid on body composition in mice*. Biochim Biophys Acta. 1533: 171-174.
- Park, Y.; Storkson, J.M.; Liu, W.; Albright, K.J.; Cook, M.E. y Pariza, M.W. (2004) *Structure-activity relationship of conjugated linoleic acid and its cognates in inhibiting heparin-releasable lipoprotein lipase and glycerol release from fully differentiated 3T3-L1 adipocytes*. J. Nutr. Biochem. 15: 561-568.
- Park, W. J.; Kothapalli, K. S. D.; Lawrence, P.; Tyburczy, C. y Brenna, J. T. (2009) *An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product Delta8-desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3*. J Lipid Res. 50: 1195-1202.
- Parodi, P.W. (1977) *Conjugated Octadecadienoic Acids of Milk Fat*. Dairy Sci. 60: 1550-1553.
- Paton, C.M. y Ntambi, J.M. (2009) *Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase*. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab 297: E28-E37.
- Perdomo, M.C.; Santos, J.E. 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.
- Peters, J.M.; Park, Y.; Gonzalez, F.J. y Pariza, M.W. (2001) *Influence of conjugated linoleic acid on body composition and target gene expression in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice*. Biochim Biophys Acta. 1533: 233-242.

-
- Petridou, A.; Mougios, V. y Sagredos, A. (2003) *Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum lipids and effect on body fat of women*. *Lipids*. 38: 805-811.
- Pietinen, P.; Ascherio, A.; Korhonen, P.; Hartman, A.M.; Willett, W.C.; 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.
- Pisani, L. P.; Oller do Nascimento, C. M.; Bueno, A. a, Biz, C.; Albuquerque, K. T.; Ribeiro, E. B. y Oyama, L. M. (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.
- Portillo, M.P.; Serra, F.; Simon, E.; Del Barrio, A.S. y Palou, A. (1998) *Energy restriction with high-fat diet enriched with coconut oil gives higher UCP1 and lower white fat in rats*. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 22: 974-979.
- Privett, O. S.; Phillips, F.; Shimasaki, H.; Nozawa, T. y Nickell, E. C. (1977) *Studies of effects of trans fatty acids in the diet on lipid metabolism in essential fatty acid deficient rats*. *Am J Clin Nutr.* 30: 1009-1017.
- Purushotham, A.; Shrode, G.E.; Wendel, A.A.; Liu, L.F. y Belury, M.A. (2007) *Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats*. *J. Nutr. Biochem.* 18: 676-684.

-
- Rafecas, I.; Esteve, M.; Fernandez-Lopez, J.A.; Remesar, X. y Alemany, M. (1994) *Whole-rat protein content estimation: applicability of the N x 6.25 factor*. Br. J. Nutr.. 72: 199-209.
- Rahman, S.M.; Wang, Y.; Yotsumoto, H.; Cha, J.; Han, S.; Inoue, S. y Yanagita, T. (2001) *Effects of conjugated linoleic acid on serum leptin concentration, body-fat accumulation, and beta-oxidation of fatty acid in OLETF rats*. Nutrition. 17: 385-390.
- Ramalingaswami, V. y Sinclair, H.M. (1953) *The relation of deficiencies of vitamin A and of essential fatty acids to follicular hyperkeratosis in the rat*. Br. J. Dermatol. 65: 1-22.
- Randle, P.J.; Garland, P.B.; Newsholme, E.A. y Hales, C.N. (1965) *The glucose fatty acid cycle in obesity and maturity onset diabetes mellitus*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 131: 324-333.
- Randle, P. J.; Garland, P. B.; Hales, C. N. y Newsholme, E. A. (1963) *The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus*. Lancet. 1: 785-789.
- Ratnayake, W.M.; Chen, Z.Y.; Pelletier, G. y Weber, D. (1994) *Occurrence of 5c,8c,11c,15t-eicosatetraenoic acid and other unusual polyunsaturated fatty acids in rats fed partially hydrogenated canola oil*. Lipids 29: 707-714.
- Rasooly, R.; Kelley, D.S.; Greg, J. y Mackey, B.E. (2007) *Dietary trans 10, cis 12-conjugated linoleic acid reduces the expression of fatty acid oxidation and drug detoxification enzymes in mouse liver*. Br. J. Nutr.. 97: 58-66.
- Reeves, P.G.; Nielsen, F.H. y Fahey, G.C., Jr. (1993) *AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet*. J. Nutr. 123: 1939-1951.
- Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies (1973). J. Nutr. 1340–1348.
- Riccardi, G.; Giacco, R. y Parillo, M. (2003) *Lifestyle modification to prevent type 2 diabetes*. International congress series. 1253: 231-236.

-
- Ringseis, R.; Konig, B.; Leuner, B.; Schubert, S.; Nass, N.; Stangl, G. y Eder, K. (2006) *LDL receptor gene transcription is selectively induced by t10c12-CLA but not by c9t11-CLA in the human hepatoma cell line HepG2*. *Biochim Biophys Acta*. 1761: 1235-1243.
- 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. (2002) *Treatment with dietary trans10cis12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome*. *Diabetes Care*. 25: 1516-1521.
- Risérus, U.; Vessby, B.; Arnlov, J. y Basu, S. (2004) *Effects of cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid supplementation on insulin sensitivity, lipid peroxidation, and proinflammatory markers in obese men*. *Am J Clin Nutr*. 80: 279-283.
- Roche, H.M.; Noone, E.; Sewter, C.; Mc Bennett, S.; Savage, D.; Gibney, M.J.; O'Rahilly, S. y Vidal-Puig, A.J. (2002) *Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXRA α* . *Diabetes*. 51: 2037-2044.
- Roden, M. (2004) *How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle*. *News Physiol Sci*. 19: 92-96.
- Rodriguez-Cruz, M.; Tovar, A.R.; del Prado, M. y Torres, N. (2005) *Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud*. *Rev Invest Clin*. 57: 457-472.
- Rosenthal, M.D. y Doloresco, M.A. (1984) *The effects of trans fatty acids on fatty acyl delta 5 desaturation by human skin fibroblasts*. *Lipids*. 19: 869-874.
- Roy, A.; Chardigny, J.M.; Bauchart, D.; Ferlay, A.; Lorenz, S.; Durand, D.; Gruffat, D.; Faulconnier, Y.; Sebedio, J.L. y Chilliard, Y. (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.
- Ryder, J.W.; Portocarrero, C.P.; Song, X.M.; Cui, L.; Yu, M.; Combatsiaris, T.; Galuska, D.; Bauman, D.E.; Barbano, D.M.; Charron, M.J.; Zierath, J.R. y Houseknecht, K.L. (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.A.; 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.
- Sakamoto, K.; Holman, G.D. (2008) *Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic*. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 295: E29-E37.
- Salmeron, J.; Hu, F.B.; Manson, J.E.; Stampfer, M.J.; Colditz, G.A.; Rimm, E.B. y Willett, W.C. (2001) *Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women*. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 1019-1026.
- Sanders, T.A.; Oakley, F.R.; Cooper, J.A.; Miller, G.J. (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.C.; Nieto, S.K. y Valenzuela, A.B. (2002) *Acido linoleico conjugado: un acido graso con isomeria trans potencialmente beneficioso*. *Rev. Chil. Nutr.* 29. Versión On-line ISSN 0717-7518.
- Santora, J.E.; Palmquist, D.L. y Roehrig, K.L. (2000) *Trans-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice*. *J. Nutr.* 130: 208-215.
- Sardesai, V.M. (1992) *Biochemical and nutritional aspects of eicosanoids*. *J Nutr Biochem.* 3: 562-579.
- Satia, J.A. (2010) *Dietary acculturation and the nutrition transition: an overview*. *Appl. Physiol Nutr Metab.* 35: 219-223.

Saravanan, N.; Haseeb, A.; Ehtesham, N.Z.; Ghafoorunissa (2005) *Differential effects of dietary saturated and trans-fatty acids on expression of genes associated with insulin sensitivity in rat adipose tissue*. Eur. J. Endocrinol. 153: 159-165.

Sargent, J. R.; Bell, J. G.; Bell, M. V.; Henderson, R. J. y Tocher, D. R. (1995) *Requirement criteria for essential fatty acids*. J. Appl. Ichthyol. 11: 183-198.

Scalerandi, M.V.; Gonzalez, M.A.; Sain, J.; Farina, A.C.; 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.

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

Shiraishi, R.; Iwakiri, R.; Fujise, T.; Kuroki, T.; Kakimoto, T.; Takashima, T.; Sakata, Y.; Tsunada, S.; Nakashima, Y.; Yanagita, T. y Fujimoto, K. (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.B.; 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. S. B.; Teixeira, M. T.; Pereira, R. O.; Tavares do Carmo, M. D. G. 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.T.; Fernandez-Quintela, A.; Rodriguez, V.M. y Portillo, M.P. (2005) *Body fat-lowering effect of conjugated linoleic acid is not due to increased lipolysis*. J Physiol Biochem. 61: 363-369.
- Simopoulos, A.P. (1994) *Is insulin resistance influenced by dietary linoleic acid and trans fatty acids?* Free Radic. Biol. Med. 17: 367-372.
- Simopoulos, A.P. (1999) *Essential fatty acids in health and chronic disease*. Am. J. Clin. Nutr. 70: 560S-569S.
- Simopoulos, A.P. (2008) *The omega-6/omega-3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease*. Asia Pac. J. Clin. Nutr. 17 Suppl 1: 131-134.
- Slattery, M.L.; Benson, J.; Ma, K.N.; Schaffer, D. y Potter, J.D. (2001) *Trans-fatty acids and colon cancer*. Nutr. Cancer 39: 170-175.
- Smedman, A. y Vessby, B. (2001) *Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects*. Lipids. 36: 773-781.
- Smit, L.A.; Mozaffarian, D. y Willett, W. (2009) *Review of fat and fatty acid requirements and criteria for developing dietary guidelines*. Ann Nutr Metab. 55: 44-55.
- Specter, S.E.; Hamilton, J.S.; Stern, J.S. y Horwitz, B.A. (1995) *Chronic protein restriction does not alter energetic efficiency or brown adipose tissue thermogenic capacity in genetically obese (fa/fa) Zucker rats*. J. Nutr.. 125: 2183-2193.
- Stachowska, E. (2008) *Conjugated dienes of linoleic acid and tumorigenesis*. Ann Acad Med Stetin. 54: 122-125.
- Stender, S. y Dyerberg, J. (2004) *Influence of trans fatty acids on health*. Ann. Nutr. Metab 48: 61-66.
- Stender, S.; Astrup, A. y Dyerberg, J. (2008) *Ruminant and industrially produced trans fatty acids: health aspects*. Food Nutr Res. 52. 1-8.

-
- Storlien, L. H.; Kriketos, A. D.; Calvert, G. D.; Baur, L. A. y Jenkins, A. B. (1997) *Fatty acids, triglycerides and syndromes of insulin resistance*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 57: 379-385.
- Strable, M.S. y Ntambi, J.M. (2010) *Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity*. Crit Rev. Biochem. Mol. Biol. 45: 199-214.
- Sugano, M.; Ikeda, I. (1996) *Metabolic interactions between essential and trans-fatty acids*. Curr. Opin. Lipidol. 7: 38-42.
- 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.
- Sundaram, M. y Yao, Z. (2010) *Recent progress in understanding protein and lipid factors affecting hepatic VLDL assembly and secretion*. Nutr. Metab (Lond) 7: 35.
- Sundram, K.; Ismail, A.; Hayes, K.C.; Jeyamalar, R. y Pathmanathan, R. (1997) *Trans (elaidic) fatty acids adversely affect the lipoprotein profile relative to specific saturated fatty acids in humans*. J. Nutr. 127: 514S-520S.
- Sundram, K.; French, M.A. y Clandinin, M.T. (2003) *Exchanging partially hydrogenated fat for palmitic acid in the diet increases LDL-cholesterol and endogenous cholesterol synthesis in normocholesterolemic women*. Eur. J. Nutr. 42: 188-194.
- Szymczyk, B.; Pisulewski, P.; Szczurek, W. y Hanczakowski, P. (2000) *The effects of feeding conjugated linoleic acid (CLA) on rat growth performance, serum lipoproteins and subsequent lipid composition of selected rat tissues*. J Sci Food Agric. 80: 1553-1558.
- Takahashi, Y.; Kushiro, M.; Shinohara, K. y Ide, T. (2002) *Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice*. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 133: 395-404.
- Takahashi, Y.; Kushiro, M.; Shinohara, K. y Ide, T. (2003) *Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid*. Biochim Biophys Acta. 1631: 265-273.

-
- Taylor, C.G. y Zahradka, P. (2004) *Dietary conjugated linoleic acid and insulin sensitivity and resistance in rodent models*. Am. J. Clin. Nutr. 79: 1164S-1168S.
- Terpstra, A.H.; Beynen, A.C.; Everts, H.; Kocsis, S.; Katan, M.B. y Zock, P.L. (2002) *The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta*. J. Nutr.. 132: 940-945.
- Terpstra, A.H.; Javadi, M.; Beynen, A.C.; Kocsis, S.; Lankhorst, A.E.; Lemmens, A.G. y Mohede, I.C. (2003) *Dietary conjugated linoleic acids as free fatty acids and triacylglycerols similarly affect body composition and energy balance in mice*. J. Nutr.. 133: 3181-3186.
- Thiede, M.A.; Ozols, J. y Strittmatter, P. (1986) *Construction and sequence of cDNA for rat liver stearyl coenzyme A desaturase*. J. Biol. Chem. 261: 13230-13235.
- Tholstrup, T.; Ehnholm, C.; Jauhiainen, M.; Petersen, M.; Hoy, C.E.; Lund, P.; 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.; Marckmann, P.; Jespersen, J.; 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.; 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.
- Thom, E.; Wadstein, J. y Gudmundsen, O. (2001) *Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans*. J Int Med Res. 29: 392-396.
- Thompson, A.L.; Lim-Fraser, M.Y.; Kraegen, E.W. y Cooney, G.J. (2000) *Effects of individual fatty acids on glucose uptake and glycogen synthesis in soleus muscle in vitro*. Am. J. Physiol Endocrinol. Metab 279: E577-E584.
- Tobias, L.D. y Hamilton, J.G. (1979) *The effect of 5,8,11,14-eicosatetraenoic acid on lipid metabolism*. Lipids 14: 181-193.

Toborek, M.; Lee, Y.W.; Garrido, R.; Kaiser, S. y Hennig, B. (2002) *Unsaturated fatty acids selectively induce an inflammatory environment in human endothelial cells*. Am. J. Clin. Nutr. 75: 119-125.

Tricon, S.; Burdge, G.C.; Kew, S.; Banerjee, T.; Russell, J.J.; Jones, E.L.; Grimble, R.F.; Williams, C.M.; Yaqoob, P. y Calder, P.C. (2004) *Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans*. Am J Clin Nutr. 80: 614-620.

Tsuboyama-Kasaoka, N.; Takahashi, M.; Tanemura, K.; Kim, H.J.; Tange, T.; Okuyama, H.; Kasai, M.; Ikemoto, S. y Ezaki, O. (2000) *Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice*. Diabetes. 49: 1534-1542.

Turek, J.J.; Li, Y.; Schonlein, I.A.; Allen, K. y Watkins, B.A. (1998) *Modulation of macrophage cytokine production by conjugated linoleic acids is influenced by the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio*. Nutr Biochem. 9: 258-266.

Tvrzicka, E.; Kremmyda, L.S.; Stankova, B.; 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.

Umesha, S.S.; Naidu, K.A. (2012) *Vegetable oil blends with alpha-linolenic acid rich Garden cress oil modulate lipid metabolism in experimental rats*. Food Chem. 135: 2845-2851.

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.

Vaileille, K.; Ferezou, J.; Amsler, G.; Quignard-Boulangé, A.; Parquet, M.; Gripois, D.; Dorovska-Taran, V. y Martin, J.C. (2005) *A cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 289: H652-659.

van Dam, R.M.; Rimm, E.B.; Willett, W.C.; Stampfer, M.J. y Hu, F.B. (2002) *Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men*. Ann. Intern. Med. 136: 201-209.

Vergoesen, A.J. (1975) *The role of fats in human nutrition*. ISBN 0127180508

Vinolo, M. A. R.; Ferguson, G. J.; Kulkarni, S.; Damoulakis, G.; Anderson, K.; Bohlooly, Y. M.; Stephens, L. et al. (2011) *SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor*. PloS one. 6: e21205.

Vyas, D.; Kadegowda, A.K. y Erdman, R.A. (2012) *Dietary conjugated linoleic Acid and hepatic steatosis: species-specific effects on liver and adipose lipid metabolism and gene expression*. J. Nutr. Metab. 2012: 932928.

Wang, C.F. y Hegsted, D.M. (1949) *Determination of blood and plasma volumes, thiocyanate space, and bromsulfalein clearance in rats*. Am J Physiol. 156: 227-232.

Wang, Y. y Jones, P.J. (2004) *Dietary conjugated linoleic acid and body composition*. Am. J. Clin. Nutr. 79: 1153S-1158S.

Wang, Y.M.; Nagao, K.; Inoue, N.; Ujino, Y.; Shimada, Y.; Nagao, T.; Iwata, T.; Kamegai, T.; Yamauchi-Sato, Y. y Yanagita, T. (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. R.; Goruk, S. D.; Reaney, M. J.; Glimm, D. R.; Vine, D. F. et al. (2008) *Trans-11 vaccenic acid dietary supplementation induces hypolipidemic effects in JCR:LA-cp rats*. J. Nutr. April: 2117-2122.

Wargent, E.; Sennitt, M.V.; Stocker, C.; Mayes, A.E.; Brown, L.; O'Dowd, J.; Wang, S.; Einerhand, A.W.; Mohede, I.; Arch, J.R. y Cawthorne, M.A. (2005) *Prolonged treatment of genetically obese mice with conjugated linoleic acid improves glucose tolerance and lowers plasma insulin concentration: possible involvement of PPAR activation*. Lipids Health Dis. 4: 3.

Warren, J.M.; Simon, V.A.; Bartolini, G.; Erickson, K.L.; Mackey, B.E. y Kelley, D.S. (2003) *Trans-10,cis-12 CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: possible roles of specific lipid metabolism genes*. Lipids. 38: 497-504.

Werner, A.; Minich, D.M.; Havinga, R.; Bloks, V.; Van, G.H.; Kuipers, F. y Verkade, H.J. (2002) *Fat malabsorption in essential fatty acid-deficient mice is not due to impaired bile formation*. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol 283: G900-G908.

-
- Werner, A.; Havinga, R.; Bos, T.; Bloks, V.W.; Kuipers, F.; Verkade, H.J. (2005) *Essential fatty acid deficiency in mice is associated with hepatic steatosis and secretion of large VLDL particles*. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol 288: G1150-G1158.
- West, D.B.; Delany, J.P.; Camet, P.M.; Blohm, F.; Truett, A.A. y Scimeca, J. (1998) *Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse*. Am J Physiol. 275: R667-672.
- West, D.B.; Blohm, F.Y.; Truett, A.A. y DeLany, J.P. (2000) *Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression*. J. Nutr.. 130: 2471-2477.
- Williams, M. a, Tamai, K. T.; Hincenbergs, I. y McIntosh, D. J. (1972) *Hydrogenated coconut oil and tissue fatty acids in EFA-depleted and EFA-supplemented rats*. J. Nutr.. 102: 847-55.
- Windham, W. (1999) *Animal feed*. En: *Official Methods of Analysis of AOAC International* (Eds.: Cunniff, P.) AOAC International, Gaithersburg, MD, p. 4.1-4.45.
- Wronska, A. y Kmiec, Z. (2012) *Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots*. Acta physiologica. 205. 194-208.
- Xu, X.; Storkson, J.; Kim, S.; Sugimoto, K.; Park, Y. y Pariza, M.W. (2003) *Short-term intake of conjugated linoleic acid inhibits lipoprotein lipase and glucose metabolism but does not enhance lipolysis in mouse adipose tissue*. J. Nutr.. 133: 663-667.
- Young, V.M.; Toborek, M.; Yang, F.; McClain, C.J. y Hennig, B. (1998) *Effect of linoleic acid on endothelial cell inflammatory mediators*. Metabolism 47: 566-572.
- Zabala, A.; Churrua, I.; Macarulla, M.T.; Rodríguez, V.M.; Fernández-Quintela, A.; Martínez, J.A. y Portillo, M.P. (2004) *The trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid reduces hepatic triacylglycerol content without affecting lipogenic enzymes in hamsters*. Br. J. Nutr.. 92: 383-389.
- Zabala, A.; Fernández-Quintela, A.; Macarulla, M.T.; Simón, E.; Rodríguez, V.M.; Navarro, V. y Portillo, M.P. (2006) *Effects of conjugated linoleic acid on skeletal muscle triacylglycerol metabolism in hamsters*. Nutrition. 22: 528-533.

Zadravec, D.; Tvrdek, P.; Guillou, H.; Haslam, R.; Kobayashi, T.; Napier, J. a, Capecchi, M. R. et al. (2011) *ELOVL2 controls the level of n-6 28:5 and 30:5 fatty acids in testis, a prerequisite for male fertility and sperm maturation in mice*. J Lipid Res. 52: 245-255.

Zambell, K.L.; Keim, N.L.; Van Loan, M.D.; Gale, B.; Benito, P.; Kelley, D.S. y Nelson, G.J. (2000) *Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effects on body composition and energy expenditure*. Lipids. 35: 777-782.

Zhang, L.; Ge, L.; Parimoo, S.; Stenn, K. y Prouty, S.M. (1999) *Human stearyl-CoA desaturase: alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites*. Biochem. J. 340 (Pt 1): 255-264.

Żbikowska, A. (2010) *Formation and properties of trans fatty acids- A review*. Acta Sci Pol Technol Aliment. 60: 107-114.

Anexo

Nomenclatura de ácidos grasos

Denominación nutricional	Nombre sistémico según IUPAC	Nombre trivial	Nombre abreviado	Abreviatura
6:0	hexanoico	butírico	6:0	
8:0	octanoico	caproico	8:0	
10:0	decanoico	cáprico	10:0	
11:0	undecanoico		11:0	
12:0	dodecanoico	láurico	12:0	
13:0	tridecanoico		13:0	
14:0	tetradecanoico	mirístico	14:0	AM
16:0	hexadecanoico	palmítico	16:0	AP
16:1n-7	<i>cis</i> -9-hexadecenoico	palmitoleico	9 <i>c</i> -16:1	APO
17:0	heptadecanoico		17:0	
18:0	octadecanoico	esteárico	18:0	AE
18:1 n-12	<i>cis</i> -6-octadecenoico		6 <i>c</i> -18:1	
18:1 n-11	<i>cis</i> -7-octadecenoico		7 <i>c</i> -18:1	
18:1 n-10	<i>cis</i> -8-octadecenoico		8 <i>c</i> -18:1	
18:1 n-9	<i>cis</i> -9-octadecenoico	oleico	9 <i>c</i> -18:1	AO
18:1 n-8	<i>cis</i> -10-octadecenoico		10 <i>c</i> -18:1	
18:1 n-7	<i>cis</i> -11-octadecenoico	vaccénico	11 <i>c</i> -18:1	AV
18:1 n-12	<i>trans</i> -6-octadecenoico		6 <i>t</i> -18:1	
18:1 n-11	<i>trans</i> -7-octadecenoico		7 <i>t</i> -18:1	
18:1 n-10	<i>trans</i> -8-octadecenoico		8 <i>t</i> -18:1	
18:1 n-9	<i>trans</i> -9-octadecenoico	elaídico	9 <i>t</i> -18:1	AE
18:1 n-8	<i>trans</i> -10-octadecenoico		10 <i>t</i> -18:1	
18:1 n-7	<i>trans</i> -11-octadecenoico		11 <i>t</i> -18:1	
18:1 n-6	<i>trans</i> -12-octadecenoico		12 <i>t</i> -18:1	

18:1 n-5	<i>trans</i> -13-octadecenoico		13 <i>t</i> -18:1	
18:1 n-4	<i>trans</i> -14-octadecenoico		14 <i>t</i> -18:1	
18:1 n-3	<i>trans</i> -15-octadecenoico		15 <i>t</i> -18:1	
19:0	nanoico	pelargónico	19:0	
18:2 n-7	<i>cis</i> 9, <i>trans</i> 11-octadecadienoico	conjugado del ácido linoleico	9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> -18:2	AR
18:2 n-6	<i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienoico	linoleico	9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> -18:2	AL
18:2 n-6	<i>trans</i> 10, <i>cis</i> 12-octadecadienoico	conjugado del ácido linoleico	10 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -18:2	
18:2 n-5	<i>cis</i> 11, <i>trans</i> 13-octadecadienoico	conjugado del ácido linoleico	11 <i>t</i> ,13 <i>t</i> -18:2	
18:2 n-6	<i>cis</i> 9, <i>trans</i> 12-octadecadienoico		9 <i>c</i> ,12 <i>t</i> -18:2	
18:2 n-6	<i>trans</i> 9, <i>cis</i> 12-octadecadienoico		9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> -18:2	
18:2 n-6	<i>trans</i> 9, <i>trans</i> 12-octadecadienoico		9 <i>t</i> ,12 <i>t</i> -18:2	
18:3 n-6	all <i>cis</i> -6,9,12-octadecatrienoico	γ-linolénico	6 <i>c</i> ,9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> -18:3	GLA
18:3 n-3	all <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienoico	α-linolénico	9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i> -18:3	ALA
20:0	eicosanoico	araquídico	20:0	
20:1 n-12	<i>cis</i> -8-eicosenoico		8 <i>c</i> -20:1	
20:1 n-9	<i>cis</i> -11-eicosenoico	gondoico	11 <i>c</i> -20:1	
20:2 n-9	<i>cis,cis</i> -8,11-eicosadienoico		8 <i>c</i> ,11 <i>c</i> -20:2	
20:2 n-6	<i>cis,cis</i> -11,14-eicosadienoico		11 <i>c</i> ,14 <i>c</i> -20:2	
20:3 n-9	all <i>cis</i> -5,8,11-eicosatrienoico	Mead	5 <i>c</i> ,8 <i>c</i> ,11 <i>c</i> -20:3	
20:3 n-6	all <i>cis</i> -8,11,14-eicosatrienoico	dihomo-γ-linolénico	8 <i>c</i> ,11 <i>c</i> ,14 <i>c</i> -20:3	DGLA
20:3 n-3	all <i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienoico		11 <i>c</i> ,14 <i>c</i> ,17 <i>c</i> -20:3	
20:4 n-6	all <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico	araquidónico	5 <i>c</i> ,8 <i>c</i> ,11 <i>c</i> ,14 <i>c</i> -20:4	AA
20:5 n-3	all <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	timnodónico	5 <i>c</i> ,8 <i>c</i> ,11 <i>c</i> ,14 <i>c</i> ,17 <i>c</i> -20:5	EPA

22:0	docosanoico	behénico	22:0	
22:5 n-3	all <i>cis</i> - 7,10,13,16,19- docosapentaenoico		7 <i>c</i> ,10 <i>c</i> ,13 <i>c</i> ,16 <i>c</i> ,19 <i>c</i> -20:5	DPA
22:6 n-3	all <i>cis</i> - 4,7,10,13,16,19- docosahexaenoico	clupadónico	4 <i>c</i> ,7 <i>c</i> ,10 <i>c</i> ,13 <i>c</i> ,16 <i>c</i> ,19 <i>c</i> - 20:5	DHA
24:0	tetracosanoico	lignocérico	24:0	