

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

**INCORPORACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS TRANS Y CLA
DIETARIOS EN LÍPIDOS TISULARES Y SU POTENCIAL
IMPLICANCIA METABÓLICA EN ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN**

Bioquímica Paola G. Illesca

Director de Tesis: Dr. Claudio A. Bernal

Cátedra de Bromatología y Nutrición. Departamento de Ciencias
Biológicas.

FBCB-UNL

-2015-

“Y es posible que mañana, cuando tus sueños se concreten,
recuerdes que alguna vez te parecieron imposibles.”

John Lennon.

Agradecimientos

En pocas palabras quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que hicieron posible la realización y concreción de este trabajo de tesis doctoral.

A mi querida Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por permitirme alcanzar un objetivo más en la vida y hago extensivo el agradecimiento a la Universidad Nacional del Litoral.

A mi director, el Dr. Claudio Bernal, por brindarme espacio en su grupo de trabajo para el desarrollo de la presente tesis y especialmente por apoyo brindado en esta última etapa, que fue de gran valor e hizo muy ameno y agradable el trayecto final.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y al CONICET, por las becas que me otorgaron para la realización de este doctorado.

A las instituciones que financiaron el presente trabajo de investigación, enmarcado en los siguientes proyectos:

“Estudio Bioquímico-Nutricional de los Efectos de los Ácidos Grasos trans y CLA en animales de experimentación”. Director: Claudio A. Bernal. Proyecto de Investigación Científica y Tecnológica (PICT 2004) N° 25750 – Agencia Nacional de Promoción Científica, Tecnológica y de Innovación (ANPCyT).

“Efectos de los Ácidos Grasos trans y CLA sobre el metabolismo de lípidos en ratas con deficiencia en Ácidos Grasos Esenciales”. Director: Claudio A. Bernal. Proyecto de Investigación Plurianual (PIP) N° 112-200801-02831 – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET.

“Efectos Bioquímicos y Nutricionales de los Isómeros de Ácidos Grasos en animales deficientes de Ácidos Grasos esenciales”. Director: Claudio A. Bernal. Subsidio U.N.L. CAI+D 2011 Tipo II. 2013-2015. N°: 501 201101 00165 LI.

Red Temática 208RT0343 “Ácidos Grasos Isoméricos trans y CLA: Intervención interdisciplinaria tendientes a reducir el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles” - Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Director: Claudio A. Bernal. Madrid, 14/01/08.

A todos las personas que integran el Departamento de Ciencias Biológicas, compañeros de largas horas de trabajo, por brindarme su apoyo y compañía diariamente.

Finalmente quiero agradecer la infinita paciencia que tuvieron conmigo mis amigos y familiares durante este camino.

Asimismo, quiero dedicar el presente trabajo a las personas amadas que ya no están conmigo físicamente, porque el amor y la educación que me dieron me dan valor para seguir adelante cada día y me abren muchas puertas.

Publicaciones y presentaciones a congresos.

Artículos Publicados.

- Illesca, P.G.; Lavandera, J.V.; Gerstner, C.D.; González, M.A.; Bernal, C.A. (2015). *Trans fatty acids modify nutritional parameters and triacylglycerol metabolism in rats: differential effects at recommended and high-fat levels*. Nutr Hosp. 32(2):738-748.
- Masson, L.; Alfaro, T.; Camiloa, C.; Carvalho, A.; Illesca, P.; Torres, R. y col. (2015). *Fatty acid composition of soybean/sunflower mix oil, fish oil and butterfat applying the AOCS Ce 1j-07 method with a modified temperature program*. Grasas Aceites. 66 (1).
- González, M.; Tomatis, V., Illesca, P.; Andreoli, M.F. y Bernal, C. (2008). *Secreción biliar y estrés oxidativo hepático en animales alimentados con conjugados del ácido linoleico (CLA)*. Actualización en Nutrición. Revista de la Sociedad Argentina de Nutrición. 9 (1): 43-50.

Presentaciones a congresos.

- Illesca, P.; Lavandera, J.; Gerstner, C.; González, M.; Bernal, C. (2015). *Efectos diferenciales de los Ácidos grasos trans a niveles recomendados y elevados de grasa sobre la regulación lipídica en ratas*. I Congreso Latinoamericano del Foro de la Alimentación, la Nutrición y la Salud (FANUS) y V CONGRESO DE ALIMENTOS SIGLO XXI. XXXVIII Reunión del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN).

- Bernal, C.; Illesca, P.; y González, M. (2012). *Effects of isomeric fatty acids at different levels of fats on bile flow and biliary composition in rats*. International Conference and Exhibition on Nutritional Science & Therapy. Philadelphia, USA.
- Illesca, P.; Martinelli, M; Andreoli, MF, Bernal, C. (2009). *Retención de Isómeros de Ácidos Grasos en Suero y Tejidos de Animales de experimentación Alimentados con Diferentes Dosis de AG-t y CLA*. XV Congreso Latinoamericano de Nutrición. XVI Jornadas Chilenas de Nutrición. Santiago de Chile. Noviembre de 2009. Publicado en: Revista Chilena de Nutrición. Volumen 36, Suplemento 1.p 754.
- Castro, G.F.S.; Andreoli, M.F.; Illesca, P.G.; Ovdio, P.P.; Vanucchi, H.; Jordao, A.A.; Bernal, C.A. *Efeitos da realimentacao com dietas ricas em óleo de soja, ácido linoleico conjugado (cla) e gordura animal sobre perfil de ácidos graxos e outros parametrso séricos*. XV Congreso Latinoamericano de Nutrición. XVI Jornadas Chilenas de Nutrición. Santiago de Chile. Noviembre de 2009. Publicado en: Revista Chilena de Nutrición (2009).Volumen 36, Suplemento 1.p 525.
- Illesca, P.; González, M.; Martinelli, M.; Williner, M.; Bernal, C. (2009). *Influence of Dietary Isomeric Fatty Acids (FA) on Bile Flow and Incorporation in to Liver and Bile*. 19 th International Congress of Nutrition. Bangkok Tahilandia.
- Martinelli M.; Illesca P.; Bernal C. *Efecto del consumo de Ácidos Grasos trans y Conjugados del Ácido Linoleico sobre la absorción de grasa y la composición de ácidos grasos del tejido adiposo en animales de experimentación*. (2009). III Congreso de Alimentos Siglo XXI. XII Reunión Anual del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN). Facultad de Bioquímica y Farmacia. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires.

- Bernal, C.; Andreoli, M.F.; González, M.; Illesca, P.; Fariña, A. *Biliar Secretion Oxidative Stress: Influence of Conjugated Linoleic Acid.* (2008). 6th Eurofed Lipid Congress. Grecia.
- Illesca, P.G.; González, M.A.; Martinelli, M.I.; Bernal, C.A. (2008). *Status Oxidativo Hepático y Secreción Biliar en Animales de Experimentación Alimentados con Ácidos Grasos Trans.* II Congreso Internacional de Alimentos del Siglo XXI – XXXI Reunión Anual del Capítulo Argentino de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición (CASLAN). Mendoza. Argentina.
- González, M.A.; Tomatis, V.; Andreoli, M.F.; Illesca, P.G.; Bernal, C.A. (2007). *Efecto de los CLA sobre el estrés oxidativo y la secreción biliar en animales de experimentación.* XVI Congreso Argentino de Nutrición. Sociedad Argentina de Nutrición. Buenos Aires. Argentina. Publicado en: Actualización en Nutrición. Volumen 8, Suplemento 1, p 40.
- Tomatis, V.; González, M.A.; Andreoli, M.F.; Illesca, P.; Bernal, C. (2007). *Efecto de los Ácidos Grasos Isoméricos sobre la secreción biliar en animales de experimentación.* XXX Reunión Anual del Capítulo Argentino Sociedad Latinoamericana de nutrición CASLAN. IV Congreso y 8º Encuentro Bioquímico del Litoral. IV Jornadas de “Alimentos, Nutrición y salud”. Universidad Nacional de Rosario. Rosario. Argentina.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	8
ÍNDICE DE FIGURAS	16
ÍNDICE DE TABLAS	20
ABREVIATURAS	22
RESUMEN	25
ABSTRACT	29
INTRODUCCIÓN	33
1. NUTRICIÓN Y SALUD	33
2. LÍPIDOS DIETARIOS Y SALUD.....	34
3. ÁCIDOS GRASOS. CONCEPTOS GENERALES.....	36
4. ÁCIDOS GRASOS ISOMÉRICOS.....	37
4.1. ÁCIDOS GRASOS TRANS	39
4.1.1. Fuentes y consumo de ácidos grasos trans	39
4.1.2. Reglamentación y rotulado nutricional de los ácidos grasos trans.....	42
4.2. INCORPORACIÓN Y METABOLISMO TISULAR DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS	43
4.3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS	44
4.3.1. Ácidos grasos trans y riesgo de enfermedades cardiovasculares	44
4.3.2. Ácidos grasos trans y biosíntesis de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga	46
4.3.3. Ácidos grasos trans, depósitos grasos e inflamación.....	47
4.3.4. Ácidos grasos trans, sensibilidad a la insulina y diabetes	47
4.3.5. Ácidos grasos trans y cáncer	48
4.4. CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO	49
4.4.1. Fuentes y consumo de Conjugados del Ácido Linoleico	50
4.5. INCORPORACIÓN Y METABOLISMO TISULAR DE LOS CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO	54

4.6. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO.....	54
4.6.1. Conjugados del Ácido Linoleico y carcinogénesis	55
4.6.2. Conjugados del Ácido Linoleico, peso y composición corporal.....	56
4.6.3. Conjugados del Ácido Linoleico, lípidos plasmáticos y metabolismo lipídico	57
OBJETIVOS	60
Objetivo general	60
Objetivos específicos	61
METODOLOGÍA GENERAL	63
1. ANIMALES	63
2. DIETAS EXPERIMENTALES.....	63
3. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS NUTRICIONALES	67
3.1. INGESTA DIETARIA, ABSORCIÓN APARENTE DE GRASA Y GANANCIA DE PESO	67
3.1.1. Ingesta dietaria.....	67
3.1.2. Absorción aparente de lípidos dietarios	68
3.1.3. Ganancia de peso	68
3.2. COMPOSICIÓN CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA	68
3.2.1. Determinación de proteínas	68
3.2.2. Determinación de grasa	69
3.2.3. Determinación de agua.....	69
3.2.4. Retención energética corporal. Eficiencia energética.....	69
3.2.5. Eficiencia energética.....	70
3.3. UTILIZACIÓN Y BALANCE DE NITRÓGENO.....	70
3.3.1. Determinación de Nitrógeno	70
3.3.2. Cálculo del balance nitrogenado	71
4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO Y TEJIDOS	71
5. DETERMINACIONES PLASMÁTICAS Y TISULARES.....	72
5.1. PARÁMETROS SÉRICOS.....	72
5.1.1. Triacilglicéridos séricos	72
5.1.2. Colesterol sérico	73

5.1.3. Cuantificación de la actividad de enzimas marcadoras de daño hepático.....	73
5.2. DETERMINACIONES TISULARES.....	74
5.2.1. Contenido de triacilglicéridos en hígado y músculo	74
5.2.2. Contenido de colesterol en hígado	74
6. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS, TISULARES Y DE SECRECIÓN BILIAR.....	75
6.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIPÍDICO	75
6.2. DERIVATIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS.....	76
6.3. ANÁLISIS DE LOS METILÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS	76
7. PARÁMETROS ASOCIADOS AL METABOLISMO LIPÍDICO.....	77
7.1. SECRECIÓN HEPÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS PRE- β -LIPOPROTEÍNAS.....	77
7.2. REMOCIÓN PLASMÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS PRE- β -LIPOPROTEÍNAS.....	78
7.2.1. Actividad de LPL en tejido adiposo epididimal	78
7.2.2. Actividad de LPL en músculo gastrocnemius	79
7.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACETIL-CoA CARBOXILASA HEPÁTICA	80
8. EXTRACCIÓN, ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE ARN Y POR PCR EN TIEMPO REAL	80
9. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL STRESS OXIDATIVO HEPÁTICO.....	82
9.1. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE LIPOPEROXIDACIÓN.....	82
9.2. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA	82
9.3. CONTENIDO DE GLUTATION REDUCIDO (GSH)	83
10. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA	84
10.1. DETERMINACIÓN DEL FLUJO BILIAR.....	84
10.2. NIVELES DE LÍPIDOS BILIARES.....	84
10.2.1. Ácidos Biliares	84
10.2.2. Colesterol en bilis	84
10.2.3. Proteínas en bilis	85
10.2.4. Contenido de fosfolípidos en bilis.....	85

10.3. VELOCIDAD DE EXCRECIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BILIS	85
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	86
RESULTADOS - PARTE I	88
EFFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS A NIVELES RECOMENDADOS O ELEVADOS DE GRASA DIETARIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL.....	88
I.1. PARÁMETROS NUTRICIONALES.....	88
I.1.1. INGESTA DIETARIA, DIGESTIBILIDAD GRASA Y GANANCIA DE PESO.....	88
I.1.2. COMPOSICIÓN CORPORAL. EFICIENCIA ENERGÉTICA	90
I.1.3. BALANCE NITROGENADO	91
I.1.4. PESOS DE ÓRGANOS Y TEJIDOS.....	92
I.2. PARÁMETROS ASOCIADOS AL METABOLISMO LÍPIDICO.....	94
I.2.1. NIVELES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS Y TISULARES.....	94
I.2.2. SECRECIÓN HEPÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS PRE- β -LIPOPROTEÍNAS.....	96
I.2.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LIPOPROTEÍNA LIPASA	97
I.2.3.1. Actividad Lipoproteína Lipasa en tejido adiposo epididimal	97
I.2.3.2. Actividad LPL en músculo gastrocnemio.....	97
I.3. EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE GENES LIPOGÉNICOS Y OXIDATIVOS EN HÍGADO.....	98
I.4. ACTIVIDAD DE ENZIMAS RELACIONADAS CON LA LIPOGÉNESIS.	100
I.5. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADO	101
I.6. FLUJO BILIAR, CONCENTRACIÓN-EXCRECIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BILIS.....	102
I.6.1. FLUJO BILIAR	102
I.6.2. CONCENTRACIÓN Y VELOCIDAD DE EXCRECIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BILIS.....	102

I.7. RETENCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS TRANS Y MODIFICACIONES EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LÍPIDOS TOTALES DE SUERO, TEJIDOS Y SECRECIONES	105
I.7.1. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS SÉRICOS.....	107
I.7.2. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS HEPÁTICOS	111
I.7.3. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS SECRETADOS POR EL HÍGADO	120
I.7.4. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS BILIARES.....	124
I.7.5. ÁCIDOS GRASOS DEL TEJIDO ADIPOSO	125
RESULTADOS -PARTE II	131
EFFECTOS DE LOS CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO A NIVELES RECOMENDADOS O ELEVADOS DE GRASA DIETARIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL.....	131
II.1. PARÁMETROS NUTRICIONALES.....	131
II.1.1. INGESTA DIETARIA, DIGESTIBILIDAD GRASA Y GANANCIA DE PESO	131
II.1.2.COMPOSICIÓN CORPORAL.EFICIENCIA ENERGÉTICA	133
II.1.3. BALANCE NITROGENADO	134
II.1.4. PESOS DE ÓRGANOS Y TEJIDOS	135
II.2. PARÁMETROS ASOCIADOS AL METABOLISMO LÍPIDICO.....	138
II.2.1. NIVELES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS Y TISULARES	138
II.2.2. SECRECIÓN HEPÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS PRE- β -LIPOPROTEÍNAS.....	140
II. 2.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LIPOPROTEÍNA LIPASA	141
II.2.3.1. Actividad Lipoproteína Lipasa en tejido adiposo epididimal	141
II.2.3.2. Actividad LPL en músculo gastrocnemio	141
II.3. EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE GENES LIPOGÉNICOS Y OXIDATIVOS EN HÍGADO.....	142
II.4. ACTIVIDAD DE ENZIMAS RELACIONADAS CON LA LIPOGÉNESIS	144
II.5. PARÁMETROS RELACIONADOS Con El ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADO	144

II.6. FLUJO BILIAR, CONCENTRACIÓN-EXCRECIÓN DE LOS COMPONENTES DE BILIS.....	145
II.6.1. FLUJO BILIAR	146
II.6.2. CONCENTRACIÓN Y VELOCIDAD DE EXCRECIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BILIS.....	146
II.7. RETENCIÓN DE CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO Y MODIFICACIONES EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LÍPIDOS TOTALES DE SUERO, TEJIDOS Y SECRECIONES.....	149
II.7.1. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS SÉRICOS.....	150
II.7.2. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS HEPÁTICOS	151
II.7.3. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS SECRETADOS POR EL HÍGADO	160
II.7.4. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS BILIARES	163
II.7.5. ÁCIDOS GRASOS DE TEJIDO ADIPOSO	165
DISCUSIÓN-PARTE I	170
EFFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS A NIVELES RECOMENDADOS Y ELEVADOS DE GRASA DIETARIA.....	170
I.1. MODELO EXPERIMENTAL	170
I.2. PARÁMETROS NUTRICIONALES.....	172
I.3. INCORPORACIÓN Y RETENCIÓN DE ISÓMEROS DE ÁCIDOS GRASOS TRANS EN SUERO, TEJIDOS Y SECRECIONES	174
I.4. METABOLISMO LIPÍDICO	179
I.4.1. LÍPIDOS SÉRICOS Y REGULACIÓN DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS CIRCULANTES.....	179
I.4.2. LÍPIDOS HEPÁTICOS Y REGULACIÓN DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS	181
I.4.3. VELOCIDAD DE SECRECIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS HEPÁTICOS	184
I.4.4. ÍNDICES DE LAS ENZIMAS DESATURASAS. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS DE CADENA LARGA EN HÍGADO.....	185
I.5. FLUJO BILIAR.....	188
I.6. ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO y DEFENSAS ANTIOXIDANTES.....	190

I.7. TEJIDO ADIPOSO Y SU REGULACIÓN	191
DISCUSIÓN-PARTE II	193
EFFECTOS DE LOS CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO A NIVELES RECOMENDADOS Y ELEVADOS DE GRASA DIETARIA.....	193
II.1. MODELO EXPERIMENTAL	193
II.2. PARÁMETROS NUTRICIONALES.....	194
II.3. INCORPORACIÓN Y RETENCIÓN DE CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO EN SUERO, TEJIDOS Y SECRECIONES.....	196
II.4. METABOLISMO LIPÍDICO	200
II.4.1. LÍPIDOS SÉRICOS Y REGULACIÓN DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS CIRCULANTES.....	200
II.4.2. LÍPIDOS HEPÁTICOS Y REGULACIÓN DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS	201
II.4.3. VELOCIDAD DE SECRECIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS HEPÁTICOS	204
II.4.4. ÍNDICES DE LAS ENZIMAS DESATURASAS. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS DE CADENA LARGA EN HÍGADO.....	205
II.5. FLUJO BILIAR	205
II.6. ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES	206
II.7. TEJIDO ADIPOSO Y SU REGULACIÓN.....	207
CONCLUSIONES	210
REFERENCIAS	215
ANEXO	268
ESTUDIOS PRELIMINARES	268
1. INTRODUCCIÓN	268
2. DESARROLLO Y PUESTA A PUNTO DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS AG ISOMÉRICOS POR GLC.....	275
2.1. METODOLOGÍA GENERAL	275
2.1.1. Soluciones estándares.....	275

2.1.2. Instrumental.....	276
2.1.3. Condiciones analíticas.....	276
2.1.4. Preparación de las soluciones estándares.....	277
2.1.5. Preparación de las muestras.....	277
2.1.6. Cálculos.....	278
3. RESULTADOS.....	278
3.1. Programa de temperatura propuesto.....	278
3.2. Identificación de FAME y zonas de elución.....	279
4. CONCLUSIÓN.....	288

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Isómeros de Ácidos Grasos.....	38
Figura 2: Composición de Ácidos Grasos Trans de Aceite Vegetal Parcialmente Hidrogenado y de Grasa Láctea	40
Figura 3: Isómeros posicionales conjugados.....	50
Figura 4: Formación de Conjugados del Ácido Linoleico a través de la biohidrogenación ruminal	52
Figura 5: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la evolución del peso corporal	89
Figura 6: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la ganancia de peso.....	90
Figura 7: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el peso de diferentes tejidos	93
Figura 8: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre los niveles de lípidos plasmáticos	94
Figura 9: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el contenido de lípidos hepáticos	95
Figura 10: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el contenido de triacilglicéridos en músculo gastrocnemio.....	95
Figura 11: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la secreción hepática de triacilglicéridos pre- β -lipoproteínas.....	96
Figura 12: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la expresión de enzimas y factores de transcripción relacionados con el metabolismo lipídico	99
Figura 13: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa	100
Figura 14: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el flujo biliar, concentración de ácidos biliares y velocidad de excreción de ácidos biliares	103
Figura 15: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la retención de trans-18:1 en suero	109
Figura 16: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la retención de trans-18:1 en hígado	112
Figura 17: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la bioconversión de ácido trans vaccénico a ácido ruménico en hígado	113

Figura 18: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la relación porcentual ácido araquidónico/ ácido linoleico en hígado	115
Figura 19: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la relación porcentual ácido docosahexanoico/ ácido α -linolénico en hígado	116
Figura 20: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima Δ 6-desaturasa expresado por la relación porcentual ácido γ - linolénico/ ácido linoleico en hígado	117
Figura 21: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima Δ 5-desaturasa expresado por la relación porcentual ácido araquidónico/ ácido dihomo γ -linolénico en hígado	117
Figura 22: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima elongasa expresado por la relación porcentual: ácido cis-vaccénico/ ácido palmitoleico en hígado	118
Figura 23: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima Δ -9 desaturasa expresado por la relación porcentual ácido palmitoleico/ ácido palmítico (A) y ácido oleico/ácido esteárico (B) en hígado.....	119
Figura 24: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la retención de trans-18:1 secretados por el hígado	122
Figura 25: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la restención de isómeros trans-18:1 en tejido adiposo epididimal	127
Figura 26: Efectos de los Ácidos Grasos Trans sobre la bioconversión del ácido trans-vaccénico a ácido ruménico en tejido adiposo epididimal	128
Figura 27: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima Δ 9-desaturasa expresado por la relación porcentual ácido palmitoleico/ácido palmítico (A) y ácido oleico/ ácido esteárico (B) en tejido adiposo epididimal.....	130
Figura 28: Efecto de los Conjugados de Ácido Linoleico sobre la evolución del peso corporal.....	132
Figura 29: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la ganancia de peso	132
Figura 30: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el peso de diferentes tejidos	137

Figura 31: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre los niveles de lípidos plasmáticos	138
Figura 32: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el contenido de lípidos hepáticos	139
Figura 33: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el contenido de triacilglicéridos en músculo gastrocnemio.....	139
Figura 34: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la secreción hepática de pre- β -lipoproteínas	140
Figura 35: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico Conjugado sobre la expresión de enzimas y factores de transcripción relacionados con el metabolismo lipídico en hígado	143
Figura 36: Efectos de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa en hígado	144
Figura 37: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el flujo biliar, concentración de ácidos biliares y velocidad de excreción de ácidos biliares	147
Figura 38: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la retención de los isómeros 9c,11t-18:2 y 10t,12c-18:2	152
Figura 39: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico Conjugado sobre la relación porcentual de ácido araquidónico/ ácido linoleico en hígado	155
Figura 40: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la relación porcentual ácido docosahexanoico/ ácido α -linolénico en hígado	156
Figura 41: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la relación ácido α -linolénico/ ácido linoleico en hígado	157
Figura 42: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la relación porcentual ácido araquidónico/ ácido dihomo γ -linolénico en hígado.....	158
Figura 43: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el flujo a través de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa expresado por la relación porcentual: ácido palmitoleico/ ácido palmítico (A) y ácido oleico/ ácido esteárico (B) en hígado.....	159
Figura 44: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el flujo a través de la enzima elongasa expresado por la relación porcentual ácido cis-vaccénico/ ácido palmitoleico en hígado.....	160
Figura 45: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la retención de los isómeros 9c,11t-18:2 y 10t.12c-18:2 en suero secretado por el hígado	161

Figura 46: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico Conjugado sobre la retención de los isómeros 9c,11t-18:2 y 10t,12c-18:2 en tejido adiposo epididimal	165
Figura 47: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el flujo a través de la enzima Δ^9 -desaturasa expresado por la relación porcentual ácido palmitoleico/ ácido palmítico (A) y ácido oleico/ ácido esteárico (B) en tejido adiposo epididimal	168
Figura 48: Formación de dímeros de ácidos grasos.....	269
Figura 49: Perfil de FAME completo del estándar GLC-463	282
Figura 50: Perfil de FAME del estándar GLC-463 desde el inicio hasta el ácido palmítico	282
Figura 51: Perfil de los FAME del estándar GLC-463 desde el ácido palmítico hasta el ácido esteárico	283
Figura 52: Perfil de los FAME del estándar GLC-463 en la zona de los ácidos grasos oleico y linoleico	283
Figura 53: Perfil de los FAME del estándar GLC-463 en la zona del ácido α -linolénico y los Conjugados del Ácido Linoleico	284
Figura 54: Perfil de los FAME del estándar GLC-463 en la zona final de elución	284
Figura 55: Perfil de los FAME de AVPH dietario. A) Cromatograma completo. B) Detalle de separación de isómeros 18:1	285
Figura 56: Perfil de los FAME de extracto de hígado de ratas alimentadas con AGT. A) Cromatograma completo. B) Detalle de separación de isómeros 18:1	286
Figura 57: Perfil de los FAME en hígado de ratas alimentadas con Conjugados del Ácido Linoleico. A) Cromatograma completo. B) Detalle de separación de isómeros 18:2.....	287

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición de las dietas experimentales	65
Tabla 2: Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales	66
Tabla 3: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre parámetros nutricionales y composición corporal	91
Tabla 4: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la ingesta, excreción y balance de nitrógeno.....	92
Tabla 5: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo y tejido adiposo epididimal.....	97
Tabla 6: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre parámetros relacionados al estrés oxidativo en hígado	101
Tabla 7: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la concentración de colesterol, fosfolípidos y proteínas	104
Tabla 8: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la retención de isómeros	106
Tabla 9: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la composición porcentual de ácidos grasos de lípidos séricos.....	110
Tabla 10: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la composición porcentual de ácidos grasos de lípidos hepáticos.....	114
Tabla 11: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la composición porcentual de ácidos grasos secretados por el hígado	123
Tabla 12: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la composición porcentual de ácidos grasos de los lípidos biliares.....	125
Tabla 13: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la composición porcentual de ácidos grasos del tejido adiposo.....	129
Tabla 14: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre parámetros nutricionales y composición corporal	134
Tabla 15: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico Conjugado sobre la ingesta, excreción y balance de nitrógeno.....	135
Tabla 16: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo y tejido adiposo epididimal.....	141

Tabla 17: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre parámetros relacionados al estrés oxidativo en hígado	145
Tabla 18: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la concentración de colesterol, fosfolípidos y proteínas de la bilis.....	148
Tabla 19: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la retención de isómeros.....	149
Tabla 20: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de ácidos grasos de lípidos séricos	151
Tabla 21: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de ácidos grasos de lípidos hepáticos.....	153
Tabla 22: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de lípidos secretados por el hígado	162
Tabla 23: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de ácidos grasos de lípidos de la bilis	164
Tabla 24: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de lípidos del tejido adiposo epididimal.....	167
Tabla 25: Instrumental y condiciones analíticas de los Métodos Oficiales para el análisis de ácidos grasos isoméricos.....	273

ABREVIATURAS

AA: araquidonic acid
AB: ácidos biliares
ACC: Acetil-CoA carboxilasa
AG: ácido graso
AGT: ácidos grasos trans
ALA: α -linolenic acid
ALAT: Alanina Amino Transferasa
AVPH: aceite vegetal parcialmente hidrogenado
ASAT: Aspartato Amino Transferasa
CE: colesterol esterificado
CEPT: cholesteryl ester transfer protein
CLA: conjugados del ácido linoleico
CPT-Ia: carnitina-palmitoil transferasa Ia
DGLA: di-homo γ -linolenic acid
DHA: docosahexanoic acid
DMT2: diabetes mellitus tipo 2
EA: elaidic acid
EAT: epididymal adipose tissue
ECNT: enfermedades crónicas no transmisibles
ECV: enfermedades cardiovasculares
EE: eficiencia energética
EPA: eicosapentanoic acid
FAME: fatty acid methy ester
FDA: Food and Drug Administration
FAL: Fosfatasa Alcalina
FAME: fatty acid methy ester
FAO: Food and Agriculture Organization
FAS: fatty acid synthase
FB: flujo biliar
FL: fosfolípidos

GLA: γ - linolenic acid
GLC: gas liquid chromatography
GSH: glutati3n reducido
HDL: lipoprote3na de alta densidad
IE: ingesta energ3tica
IL-6: interleuquina 6
LA: linoleic acid
LDL: lipoprote3na de baja densidad
LPL: lipoprote3na lipasa
LC-PUFA: long chain polyunsaturated fatty acids
MUFA: monounsaturated fatty acids
NCD: non-communicable disease
OA: oleic acid
OMS: Organizaci3n Mundial de la Salud
PPAR: peroxisome proliferator- activated receptor
PUFA: polyunsaturated fatty acids
RA: rumenic acid
RETC: retenci3n energ3tica total de carcasa
RGD: retenci3n de grasa diaria
RPD: retenci3n proteica diaria
RT: retention time
RRT: relative retention time
SCD: stearoyl CoA desaturase
SFA: saturated fatty acids
SREBP: sterol regulatory element binding protein
TAE: tejido adiposo epididimal
TAG: triacilglic3ridos - triacylglycerides
TAGSR: triacylglycerides secretion rate
TBARS: sustancias reactivas al 3cido tiobarbit3rico
TNF- α : factor de necrosis tumoral α
TFA: trans fatty acids
VA: vaccenic acid
VLDL: lipoprote3nas de muy baja densidad
VSTAG: velocidad de secreci3n de triacilglic3ridos

RESUMEN/ABSTRACT

RESUMEN

Numerosos estudios han relacionado la cantidad y calidad de la grasa dietaria con los factores de riesgo asociados al desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). En este sentido, el consumo elevado de grasas con una composición desbalanceada en la relación de ácidos grasos (AG) n-6/n-3, característico de las dietas occidentales, como así también de grasas ricas en isómeros de AG adquirió gran relevancia en las últimas décadas. Dentro de los isómeros, los AG trans (AGT) y Conjugados del Ácido Linoleico (CLA) han mostrado un ejercer un importante y diferencial impacto sobre las ECNT. Diversas alteraciones bioquímico-metabólicas observadas en humanos y en modelos experimentales animales han sido asociadas a dietas ricas en AGT de origen industrial con alto contenido de ácido eláídico (9t-18:1). No obstante, se ha demostrado que algunos AGT de origen natural, presentes en carne y productos lácteos derivados de rumiantes como el ácido trans vaccénico (VA, 11t-18:1) y CLA pueden prevenir alteraciones asociadas a las ECNT. Los mecanismos mediante los cuales los isómeros de AG actúan, no están completamente dilucidados, aunque se ha demostrado que los niveles de isómeros específicos alcanzados en tejidos impactan sobre funciones metabólicas y celulares. Por otro lado, los potenciales efectos biológicos de los AG isoméricos son dependientes de diferentes factores como la dosis, tiempo de tratamiento, especie, diseño experimental, como así también de la composición de la dieta y del estado nutricional de los animales o individuos tratados. Además, los diferentes tipos de AG que componen la grasa dietaria y la cantidad relativa de los isómeros con respecto a estos, serían otros factores que modularían su impacto.

Los efectos de un moderado o bajo contenido de isómeros de AG (AGT o CLA) sobre el metabolismo lipídico en dietas de niveles recomendados o elevados de grasa son muy poco conocidos. Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis se propuso como objetivo investigar los potenciales efectos de AGT y CLA sobre aspectos bioquímicos y nutricionales en un modelo experimental animal a niveles recomendados o elevados de grasa dietaria. Es importante destacar que las cantidades de isómeros utilizadas en la elaboración de las dietas del presente trabajo

son factibles de ser consumidas por la población, como porcentaje de energía, y que el aceite dietario es rico en AG n-6 y bajo en AG n-3.

Para alcanzar el objetivo propuesto, ratas macho jóvenes de la cepa Wistar, luego del destete, fueron alimentadas durante 30 días con alguna de las siguientes dietas experimentales, producto de la combinación de dos variables: 7% o 20% de grasa y la sustitución con 1% o 2,86 % de aceite rico en isómeros de AG (AGT o CLA). Las dietas conformadas fueron: C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con AGT; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control con elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con AGT; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. En dichos animales se evaluaron parámetros nutricionales y relacionados al metabolismo de triacilglicéridos (TAG). Entre ellos: ganancia de peso, eficiencia energética de las dietas, composición corporal y retención energética corporal, retención de isómeros en diferentes tejidos, suero y secreciones, actividades de enzimas y expresión de enzimas y factores de transcripción que regulan los lípidos circulantes y hepáticos.

Los isómeros AGT fueron retenidos en hígado, tejido adiposo epididimal (TAE), suero y secreciones hepática y biliar, siendo mayor a elevados niveles de grasa dietaria. Su grado de retención, a ambos niveles de grasa, fueron: tejido adiposo > hígado > suero, siendo mayor para el isómero 9t-18:1 y menor para el 10t-18:1. Además, la bioconversión de VA a RA en tejido adiposo e hígado fue más elevada a niveles recomendados de grasa. Los AGT a niveles recomendados de grasa dietaria, pero no a niveles elevados, incrementaron el peso corporal y los depósitos grasos. Los TAG circulantes fueron incrementados por los AGT a niveles recomendados de grasa y por los elevados niveles de grasa dietaria. La ausencia de un efecto aditivo en la triacilgliceridemia estuvo relacionada a una elevada remoción de TAG por el tejido adiposo. La mayor acumulación de TAG en hígado producida por los AGT a niveles recomendados de grasa dietaria estuvo asociada a una aumentada actividad de la enzima ACC y a una mayor expresión génica de SREBP-1c y menor de CPT-1a. A niveles elevados de grasa dietaria, los AGT atenuaron la acreción de TAG ocasionada por la dieta rica en grasa a través de una mayor VSTAG, un menor incremento de la expresión del SREBP-1c y de la enzima SCD1, sumado a una disminución del índice de SCD1 y de la actividad de la enzima ACC. Además, los

AGT a niveles recomendados de grasa redujeron el contenido de LA, ALA y AA en hígado; mientras que a niveles elevados disminuyeron el LA y ALA sin afectar el AA y DHA, sugiriendo un efecto diferencial sobre la síntesis de LC-PUFA dependiente del nivel de grasa dietaria. Por otro lado, los AGT a niveles elevados de grasa dietaria incrementaron el flujo biliar dependiente de ácidos biliares modulando el contenido de colesterol hepático. Los panículos de TAE aumentaron por los AGT en los animales alimentados a niveles recomendados de grasa, asociado a aumento de la actividad de la LPL; mientras que a niveles elevados de grasa, no acrecentaron el depósito de lípidos ya elevado por la dieta rica en grasa.

En relación a los CLA, los mismos también fueron retenidos más en TAE que en hígado y suero, y los niveles alcanzados fueron mayores en dietas ricas en grasas. El contenido del isómero 9c,11t-18:2 encontrado en tejidos y suero fue mayor que los de 10t,12c-18:2, posiblemente debido a la alta tasa de metabolización de este último. Los CLA, a través de una elevada VSTAG, incrementaron los TAG séricos a niveles recomendados de grasa, pero no acrecentaron más la triacilgliceridemia ya aumentada por el nivel de grasa debido a un aumento en la remoción de los TAG por la LPL del tejido adiposo. A niveles recomendados de grasa los CLA incrementaron los TAG hepáticos asociado a un desbalance en la relación lipogénesis/ β -oxidación. Específicamente los CLA incrementaron la actividad de la enzima ACC y redujeron los niveles de ARNm de PPAR- α y CPT-1a. A niveles elevados de grasa, una mayor VSTAG y una menor expresión del factor de transcripción SREBP-1c y de las enzimas FAS y SCD1 estuvieron asociados con la ausencia de incremento de los TAG, ya aumentados por la dieta rica en grasa. La sustitución con CLA a niveles recomendados de grasa dietaria disminuyó la síntesis de LC-PUFA n-6 asociado a un menor índice de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa; mientras que a elevados niveles de grasa no modificaron esta vía metabólica, como tampoco la síntesis de LC-PUFA n-3 en ninguno de los niveles de grasa evaluados. En animales alimentados a niveles elevados de grasa aumentaron el flujo biliar asociado a un aumento en la excreción de AB y mayor excreción de colesterol en bilis, sin modificar el contenido de colesterol hepático. Además, los CLA redujeron la acumulación de grasa en el tejido adiposo retroperitoneal a ambos niveles de grasa dietaria, mientras que no modificaron los depósitos grasos en tejido adiposo epididimal, aunque la actividad LPL en este tejido estuvo aumentada.

De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que la sustitución parcial de dietas ricas en grasas desbalanceadas en PUFA con isómeros de AGT o con isómeros CLA, tienen efectos diferentes según el contenido de grasa de la dieta. Así, la presente tesis contribuye a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción y las implicancias metabólicas del consumo de isómeros de AG dietarios a niveles de ingesta alcanzables por la población. Asimismo, se espera que los aportes de este trabajo sean de utilidad para comprender el impacto de la interacción entre la composición y la cantidad de grasa ingerida en el desarrollo de ECNT que permitan posteriormente tomar decisiones tendientes a disminuir su incidencia.

ABSTRACT

It is very well known that the amount and type of dietary fat might modify the risk factors associated with chronic non-communicable diseases (NCD). In this regards, during the recent decades the high fat consumption enriched in n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA), as well as fats rich in isomeric fatty acid (FA) have taken significant importance. Among the isomers, trans-FA (TFA) and conjugated linoleic acid (CLA) have shown to play a significant and differential role on the NCD. Several biochemical and metabolic alterations observed in humans and experimental animal models have been associated with chronic intake of industrial TFA enriched with elaidic acid (9t-18:1). However, it has been shown that some naturally occurring TFA, as trans-vaccenic acid (VA, 11t-18:1) and CLA, derived from ruminants could prevent some alterations associated NCD. The mechanisms of action of the isomeric FA are not fully elucidated, however it has been shown that the isomer levels achieved in the specific tissues might exert a crucial role on the metabolic and cellular changes. On the other hand, the potential biological effects of the isomeric FA are related to several factors such as dose, time of treatment, species, experimental design, as well as, the diet composition and nutritional status of the experimental animals. In addition, the FA composition of the dietary fat and the proportion of the isomers in the diet might also modulate the metabolic FA impact.

The effects of moderate or low levels of FA isomers (TFA or CLA) at recommended or high fat levels on lipid metabolism are very poorly understood. Therefore, the aim of the present thesis was to investigate the potential effects of TFA and CLA on nutritional and biochemical parameters in an experimental animal model at recommended or high fat levels. It is important to note that the amounts of the dietary isomers, as percentage of energy, are feasible to be achieved by the human, and that the final composition of diets is enriched in PUFA n-6 and depleted in PUFA n-3.

Male Wistar rats were fed (30 days) diets containing recommended (7%, w/w) or high fat (20%, w/w) levels, supplemented or not with the isomers: TFA or CLA. The diets were C7: control diet, TFA7: diet partially substituted with TFA at recommended fat levels, CLA7: diet partially substituted with CLA at recommended

fat levels, C20: control diet at high fat levels, TFA20: diet partially substituted with TFA at high fat levels and CLA7: diet partially substituted with CLA at high fat levels. In animals of the six experimental groups, parameters related with nutritional and triacylglycerol (TAG) regulation were evaluated. Specifically, weight gain, energy efficiency, body composition, body energy retention, isomer retention in different tissues, serum and TAG and bile secretions, enzyme activities, as well as the expression of key enzymes and transcription factors involved in the regulation of serum and liver lipids were determined.

TFA isomers were retained in liver, epididymal adipose tissue (EAT), serum, as well as the hepatic and biliar secretions, being greater at high fat levels. The degree of TFA retentions were: EAT > liver > serum, and higher for the isomer 9t-18:1 and lower for the 10t-18:1, regardless of the dietary fat level. In addition, the bioconversion of VA to RA in EAT and liver was higher at recommended fat levels. The TFA isomers at recommended, but not at high fat levels, increased body weight and fat depots. The serum TAG levels were increased by dietary TFA at recommended and high fat levels. The absence of an additive effect on the serum TAG changes was related to an increased TAG removal for the adipose tissue LPL. The highest hepatic TAG accretion induced by TFA at recommended fat levels was associated with an elevated ACC activity, and an increased gene expression of SREBP-1c and reduced gene expression of CPT-1a. While at high fat levels, the TFA attenuated the hepatic TAG accretion induced by high fat diet. This effect was related to an increased hepatic TAG secretion rate (TAGSR), and moderated increase of the SREBP-1c and SCD1 gene expression, as well as associated with a decreased SCD1 index and ACC enzyme activity. In addition, TFA at recommended fat levels reduced the hepatic LA, ALA and AA content; while at high fat levels the hepatic LA and ALA decreased, without changes in the AA and DHA content. These results suggest a differential effect of TFA on the LC-PUFA biosynthesis at both fat levels. Furthermore, the TFA at high fat levels increased the bile flow dependent of the bile acid modulating the hepatic cholesterol content. The EAT pads increased by TFA in animals fed at recommended fat levels, associated to an increased LPL activity; while at high fat levels did not increase the elevated depots of lipids induced by high fat diet.

As far as CLA are concern, they were also retained more in EAT > liver > serum, and the levels were greater in animals fed high fat diets. The content of 9c,

11t-18:2 in tissues and serum was higher than of the 10t,12c-18:2. This effect could be due to the higher oxidation rate of 10t,12c-18:2. At recommended fat levels, the CLA induced a high hepatic TAGSR leading to hypertriacylglyceridaemia, but at high fat levels an increase in adipose tissue LPL avoided an additional increase in the serum TAG levels.

The CLA at recommended fat levels increased the liver TAG content associated with an unbalance of the lipogenesis/ β -oxidation ratio. Specifically, CLA increased the ACC enzyme activity and reduced the mRNA levels of PPAR- α and CPT-Ia. At high fat levels, a greater TAGSR and a lower expression of the SREBP-1c, FAS and SCD1 was associated with the lack of an additional increase of the hypertriacylglyceridaemia induced by high fat diet. The dietary substitution with CLA at recommended dietary fat levels decreased the LC-PUFA n-6 biosynthesis with a lower $\Delta 6$ -desaturase index; while at high fat levels CLA did not change this metabolic pathway. In animals fed high fat, the CLA increased the bile flow associated with a higher bile acid and cholesterol excretion. In addition, the CLA reduced the fat accretion into the retroperitoneal adipose tissue at both levels of fat, and even the LPL activity in EAT was increased, the CLA did not modified the fat depots in this tissue.

Based on these results, it can be concluded that partial substitution of fat dietary fat in diets characterized by an unbalanced of the PUFA n-6/ PUFA n-3 ratio with TFA or CLA isomers have different effects depending on the dietary fat content. Thus, this thesis might contribute to expand the knowledge about the mechanisms of action and the metabolic implications of the isomer at achievable levels that can be consumed by the population. It is also expected that the contributions of this work will be useful to understand the impact of the interaction between the FA composition and the amount of fat in the development of chronic diseases, and them led to take decisions in order to reduce its incidence.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. NUTRICIÓN Y SALUD

Las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) están asociadas principalmente a factores genéticos, ambientales y nutricionales. Entre las ECNT se encuentran las enfermedades cardiovasculares (ECV), la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y el cáncer. Además existen, estrechamente vinculados, una serie trastornos metabólicos considerados factores de riesgo para las ECNT dónde, en términos de morbi-mortalidad, el principal es la hipertensión seguido por el sobrepeso/obesidad, la hiperglucemia e hiperlipemia (Organización Mundial de la Salud, 2015). El conjunto de factores riesgo individuales interrelacionados, sumado a otros como: intolerancia a la glucosa, resistencia insulínica, obesidad abdominal, estado pro-inflamatorio/pro-trombótico son determinantes del Síndrome Metabólico. Dietas desequilibradas en nutrientes y/o en calorías, que generalmente están acompañadas de conductas o hábitos poco saludables, como el sedentarismo, impactan negativamente en la salud promoviendo el desarrollo y progresión de estas ECNT.

Si bien a lo largo de la historia, el hombre ha modificado sus actividades o modos de supervivencia, los consecuentes cambios dietarios asociados a un incremento en los factores de riesgos promovieron fuertemente el desarrollo de enfermedades relacionadas con la nutrición (Simopoulos, 2001). La mecanización-planificación de la agricultura y la ganadería (segunda mitad del siglo XX), que modificó la forma de producción y distribución de alimentos, sumado al desarrollo de la tecnología alimentaria generó una gran abundancia y variedad de alimentos, algunos “muy calóricos y apetecibles”, dando inicio a una época marcada por el exceso de consumo de nutrientes y energía que se acrecienta cada año en países desarrollados, y más aún en aquellos en vías de desarrollo. (Campillo, 2010; Popkin, 2006). Estudios epidemiológicos han demostrado que el desarrollo económico-social está ligado a la alta prevalencia de factores de riesgo metabólico, mientras que son muy poco frecuentes en sociedades subdesarrolladas donde la forma de vida se ajusta a un modelo agrícola ganadero tradicional (Campillo, 2010).

Estadísticas sanitarias globales publicadas en el año 2014 por la Organización Mundial de la Salud informaron que el 68% de las muertes global se debieron a ECNT, dentro de las cuales 46% se debieron a ECV, 22% a cáncer y el resto a enfermedades respiratorias (Organización Mundial de la Salud, 2014). Estos datos ponen de manifiesto el serio problema sanitario-económico que las ECNT representan para las autoridades internacionales y locales, y la necesidad de intervenciones de diferentes sectores (político, industrial, científico) que contribuyan a mejorar la salud de la población.

2. LÍPIDOS DIETARIOS Y SALUD

La grasa dietaria puede tener un gran impacto en la salud, tanto en la prevención, como así también en el desarrollo de ECNT. Es reconocida su importancia en el crecimiento y desarrollo, como también en el mantenimiento de la salud. Además de ser los nutrientes con la mayor densidad energética; vehiculizan vitaminas liposolubles, pigmentos carotenoides y esteroides. Como componentes estructurales celulares tienen un rol fundamental en funciones de membrana, tales como permeabilidad, transporte y actividad enzimática. Aportan colesterol, precursor de ácidos biliares y hormonas. Son fuente de los ácidos grasos: linoleico (LA, del inglés linoleic acid) y α -linolénico (ALA, del inglés alpha linolenic acid), que tienen el carácter de esenciales (Burr y Burr, 1929) debido a que no pueden ser sintetizados por el organismo; éstos, a su vez, son precursores de eicosanoides, compuestos con reconocida actividad biológica que intervienen en la respuesta inflamatoria y regulan funciones celulares y del sistema inmunológico (Vergoesen y Crawford, 1989; Leray, 2015). Además, pueden modular los niveles de lípidos plasmáticos, el sistema inmune y la sensibilidad a la insulina; debido a ello, son asociadas al desarrollo y progresión, como también prevención de las ECNT.

Diferentes estudios han relacionado tanto a la cantidad, como a la calidad de la grasa dietaria a los factores de riesgo de ECNT (Casas-Agustench y col., 2008; Erkkilä y col., 2008). La grasa dietaria conduce a una elevada incorporación calórica debido a su alta densidad energética; mientras que su palatabilidad y sus efectos relativamente débiles sobre la saciedad pueden conducir a una alta ingesta (Blundell y col., 1993; Blundell y Sttubs, 1999; Westerterp, 2006; Jebb y col., 2006). Sin

embargo, la discusión acerca del impacto de cantidad de grasa total ingerida sobre la obesidad y otros factores de riesgo asociados a las ECNT es controversial. En 1994 la FAO y la OMS concluyeron que el consumo excesivo de grasas en la dieta contribuye a incrementar estos factores de riesgo (Smit y col., 2009). En este sentido, algunos estudios soportan esta afirmación, ya que encontraron una correlación positiva entre la ingesta total de grasa y la obesidad (Blundell y MacDiarmid, 1997; Ravussin y Tatarani, 1997; Bray y col., 2004; Hill y col., 2000; Peters, 2003); mientras que otros investigadores hallaron escasa o ninguna asociación entre la ingesta de grasa total y factores de riesgo de ECNT (Hu y col., 1997; He y col., 2003; Kushi y Giovannucci, 2002; Xu y col., 2006; Prentice y col., 2006; Field y col., 2007). Existen evidencias mostrando que el exceso de grasa dietaria puede influir sobre la sensibilidad a la insulina y el desarrollo de DMT2, al mismo tiempo que sobre ECV (Marshall y Bessesen., 2002; Riccardi y col., 2003; Cañete y col., 2007). Estas evidencias condujeron a recomendaciones nutricionales limitando a un máximo de 30% de la energía consumida como grasas dietarias. Las mismas posteriormente han sido reevaluadas y modificadas en los últimos años (Smit y col., 2009; Diekman y col., 2009; Lawrence, 2013) conduciendo a las recomendaciones actuales de grasas totales para adultos sanos de 20 a 35% del total de la energía. En un trabajo de revisión reciente, Aranceta y Pérez- Rodrigo (2012) reunieron diferentes recomendaciones reportados por organismos internacionales, tanto de ingesta total de grasas, como de sus componentes, mostrando una amplia variabilidad de criterios y valores, por ejemplo, para grasa total de 15% a 40% de las calorías diarias.

En la actualidad, las recomendaciones respecto de la grasa dietaria enfatizan principalmente en la calidad o tipo de grasa más que en la cantidad. Cabe señalar que la calidad de la grasa hace referencia fundamentalmente a la composición de sus AG. Esta fue modificándose conforme el hombre fue cambiando sus hábitos alimentarios (Simopoulos, 2001). Así, puede observarse que durante el período de cazador-recolector el hombre consumía una cantidad adecuada de grasas con una relación balanceada de ácidos grasos saturados (SFA, del inglés: saturated fatty acids), ácidos grasos monoinsaturados (MUFA, del inglés monounsaturated fatty acids) y ácidos grasos poli-insaturados (PUFA, del inglés polyunsaturated fatty acids); esto se mantuvo hasta el desarrollo de la agricultura, momento en que comienza a aumentar la grasa total en la dieta, a expensas del consumo de SFA. En las últimas décadas, y luego de la revolución industrial, aumentó el consumo de

PUFA de la familia n-6 paralelo a una disminución de los de la familia n-3, además, producto de la hidrogenación de los aceites vegetales, aumentó significativamente la ingesta de ácidos grasos trans (AGT). Este perfil de AG, de elevado contenido de SFA, PUFA n-6 y AGT, caracteriza la conocida dieta occidental, y ha sido fuertemente asociado a un aumento en la prevalencia de ECNT (Popkin, 2006; Simopoulos, 2008). La alta ingesta de SFA y de AGT fue asociada con el desarrollo de obesidad, resistencia insulínica (Cañete y col., 2007; Hariri y col., 2010), alteraciones de los lípidos plasmáticos (Katan y col., 1995; Ascherio y Willet, 1994; Aro y col., 1997; Mensink y col., 2003; Denke, 2006) y riesgo de infarto de miocardio (Ascherio y Willet, 1994; Hu y col., 1997). Mientras que el elevado consumo de LA sumado a un marcado desbalance en la relación n-6/n-3 se relacionaron con un incremento de eicosanoides derivados de la familia n-6, los que favorecen el desarrollo de un estado proinflamatorio/ protrombótico (Simopoulos, 2008) y de resistencia a la insulina (Cañete y col., 2007). Por otro lado, el bajo aporte de PUFA n-3 de este tipo de dieta se asocia con enfermedades inflamatorias, dermatitis atópica, artritis reumatoidea, colitis ulcerosa y cáncer (Schmitz y Ecker, 2008). Estas evidencias ponen de manifiesto que el tipo de grasa alimentaria merece gran atención en la salud humana, más allá de la cantidad de grasa total ingerida.

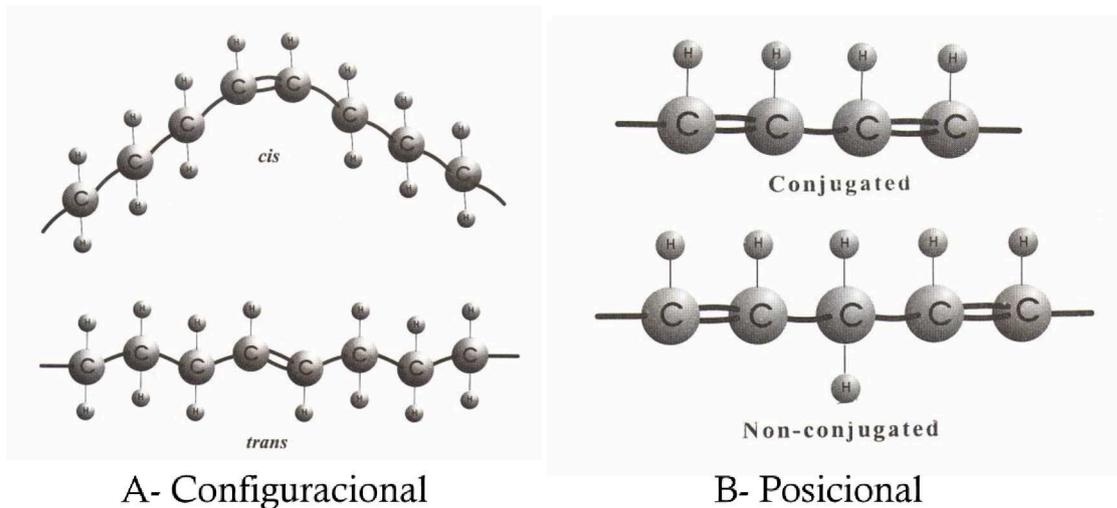
3. ÁCIDOS GRASOS. CONCEPTOS GENERALES

En la naturaleza los AG se encuentran principalmente unidos mediante enlace tipo éster a moléculas de glicerol ó colesterol; formando los triacilglicéridos (TAG), fosfolípidos (FL) y colesterol esterificado (CE). Los mismos generalmente están formados por una cadena hidrocarbonada lineal, con un número par de átomos de carbono y longitud variable. En el extremo terminal poseen un grupo metilo y en el otro un grupo carboxilo. La mayoría de los AG presentes en los seres vivos contienen entre 12 y 24 átomos de carbono, siendo los más abundantes los de 16 a 18 carbonos. En función del número de insaturaciones pueden ser: saturados, donde todos los carbonos están unidos por enlace simple, y el resto de los electrones disponibles están totalmente ocupados (“saturados”) por hidrógeno; ó insaturados, donde dos ó más carbonos se encuentran unidos por dobles enlaces. El número de insaturaciones es variable, dando lugar a la clasificación de los AG en monoinsaturados cuando poseen

sólo un doble enlace o poliinsaturados cuando los AG presentan más de un doble enlace en su estructura. La posición de las insaturaciones en la cadena de los AG permite que estos puedan agruparse conforme a una misma estructura terminal que les confiere propiedades y roles biológicos diferentes, dando origen así a las distintas familias de AG insaturados.

4. ÁCIDOS GRASOS ISOMÉRICOS

Los isómeros de AG son compuestos que poseen la misma fórmula química, pero diferente posición o configuración de sus insaturaciones. Existen dos clases de isómeros de AG insaturados: los isómeros geométricos o configuracionales (Figura 1A) que pueden presentar dobles enlaces con configuración *cis* o *trans*, y los isómeros posicionales donde los dobles enlaces sufren una traslocación posicional que modifica su ubicación dentro de la cadena acíclica (Figura 1 B). La configuración isomérica se denomina *cis* cuando los hidrógenos del enlace están en el mismo plano tomando como referencia el doble enlace y es la más frecuente en la naturaleza. La configuración se denomina *trans* cuando los hidrógenos involucrados en el enlace se sitúan en diferente plano uno respecto de otro. La presencia de dobles enlaces *trans*, determina que la molécula presente una disposición espacial recta asemejándose a la de los SFA. En el caso de los isómeros posicionales dienoicos y polienoicos, la migración del doble enlace a un carbono adyacente puede provocar que desaparezca un grupo metileno intermedio y los enlaces se dispongan de manera continua, generando así isómeros conjugados.

Figura 1: Isómeros de Ácidos Grasos

El enlace tipo trans confiere a los AG propiedades fisicoquímicas y biológicas diferentes a la de los AG insaturados cis y a los SFA. La presencia de dobles enlaces trans en los AG aumenta la estabilidad química de los AG. Por su disposición espacial, el enlace trans es químicamente más estable que el cis, en parte debido a una mayor simetría. Consecuentemente, numerosas reacciones químicas ocurren más rápidamente en los AG cis que en los AG con enlaces trans. La alta estabilidad que le confiere el enlace trans a los AG es la causa por la que son menos susceptibles al ataque de radicales libres y auto-oxidación; también es la razón por la cual las reacciones de isomerización se desplazan hacia la formación de dichos isómeros. Un ligero cambio en la conformación, tiene además gran implicancia en las propiedades físicas de los AG; así, la presencia de enlaces trans aumenta el punto de fusión de los AG con respecto a los AG insaturados cis, ubicándose en un punto intermedio entre los AG insaturados cis y SFA (Allison y col., 1995). Éstas son ventajas muy valoradas por la industria alimentaria, ya que le confiere a los productos una textura y palatabilidad particular. En las últimas décadas, estos AG con isomería trans han despertado un gran interés en el campo de la nutrición, debido a que son compuestos biológicamente activos a los que se le ha demostrado numerosos efectos deletéreos para la salud, aunque actualmente sobre ciertos isómeros trans específicos se han descrito efectos benéficos (Mozzafarian y col., 2009; Bendsen y col., 2011).

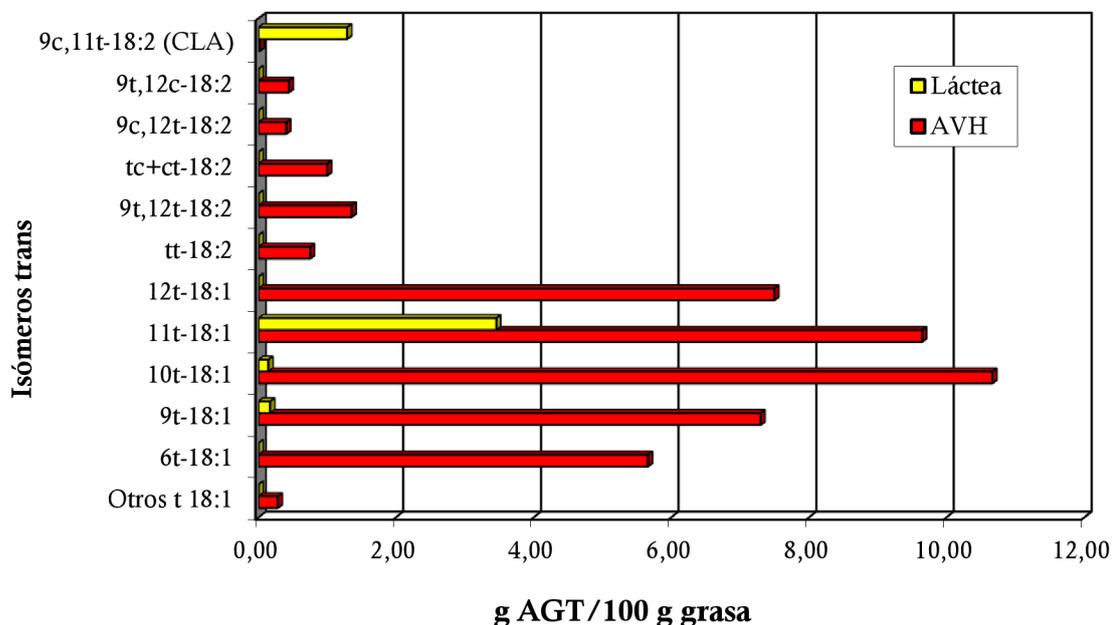
4.1. ÁCIDOS GRASOS TRANS

4.1.1. Fuentes y consumo de ácidos grasos trans

Los aceites vegetales parcialmente hidrogenados (AVPH) representan la mayor fuente de AGT de origen sintético o industrial. Se producen principalmente durante el proceso químico denominado hidrogenación (Sabatier y Senderens, 1902; Normann, 1903), mediante el cual se adiciona hidrógeno a los dobles enlaces de los AG insaturados de los aceites, convirtiéndolos parcialmente en SFA. Debido a que la hidrogenación normalmente es incompleta, se generan un gran número de AG isoméricos, tanto posicionales como geométricos (Allen, 1960). Las grasas parcialmente hidrogenadas resultantes pueden tener una cantidad variable de AGT según las condiciones de hidrogenación (catálisis, temperatura, presión y tiempo) y un amplio rango de puntos de fusión, que depende del contenido de AGT y otros AG (Koletzko y Decsi, 1997). Los AGT predominantes en los AVPH (Figura 2) son los monoénicos de 18 carbonos, con una distribución gaussiana que tiene centro en los isómeros EA; 10t-18:1 y VA, siendo el EA el que se encuentra normalmente en mayor cantidad (Craig-Schmidt, 1992; Kummerow, 2009). Este predominio de isómeros trans del ácido oleico (OA) se debe a la selectividad de la reacción de hidrogenación, ya que se hidrogenan a mayor velocidad los PUFA, incrementando el contenido de OA y, en consecuencia, sus isómeros (Allen, 1960; Clayton y col., 2007; Kummerow, 2009). Otra fuente de AGT son los aceites comestibles sometidos a muy altas temperaturas o reutilizados y los aceites vegetales obtenidos por extracción con solventes orgánicos y/o sometidos a refinamiento. Allí pueden encontrarse cantidades menores y variables de AGT, siendo los isómeros trans derivados del LA y ALA los más frecuentes (Kummerow, 2009). Por último, una pequeña parte de los AGT dietarios provienen de fuentes naturales (Figura 2). El ácido vaccénico (VA, del inglés vaccenic acid) y los conjugados del ácido linoleico (CLA, del inglés conjugated linoleic acid) representan los principales AGT de origen natural. Ambos se encuentran principalmente en grasa láctea y, en menor cantidad, en carnes (Koletzko y Decsi, 1997). El VA es producido por la biohidrogenación parcial del LA y del ALA por bacterias del rumen de animales poligástricos (Greyer

y col., 1947); en tanto que los CLA se originan por biohidrogenación ruminal del LA y por conversión de VA en tejidos de mamíferos (Griinari y Bauman, 1999). El mayor isómero CLA encontrado en leche, es el 9c,11t-18:2, representa el 80-90% de los CLA y es llamado comúnmente ácido ruménico (RA, del inglés rumenic acid), aunque bajo ciertas condiciones dietarias, el contenido de isómero 10t,12c-18:2 puede incrementarse (Bauman y col., 1999).

Figura 2: Composición de Ácidos Grasos Trans de Aceite Vegetal Parcialmente Hidrogenado y de Grasa Láctea



El contenido de AGT en alimentos elaborados con AVPH varía ampliamente dentro del mismo tipo de producto y entre diferentes productos. La mayoría de los productos procesados tales como: panificados, comidas rápidas, alimentos fritos, sopas en polvo y snacks fueron elaborados frecuentemente con AVPH y estos podían contener relativamente alta cantidad de AGT (Kummerow, 2009). Valores superiores al 40-50% de AGT fueron tradicionalmente encontrados en las margarinas, shortenings (grasas utilizadas en productos de panadería) y aceites provenientes de frituras (Organización Panamericana de la Salud, 2008). El

contenido de AGT en margarina en distintos países durante muchos años fue elevado, alcanzando niveles máximos cercanos al 50%. Los AGT predominantes en estas grasas fueron los isómeros trans del OA, que representaban aproximadamente el 85% del total de AGT, el 15% restante lo componían AGT derivados del LA y del ALA (Allison y col., 1995; Ratnayake y Zehaluk, 2005; Kummerow, 2009). Una serie de reportes publicados entre 1990 y 2002 sobre consumo de AGT mostraron que en Canadá y EEUU el 60% de los AGT consumidos provenían de alimentos procesados y un 11% de las margarinas. Asimismo, se observó que en Europa la ingesta de AGT era menor que en EEUU ya que la grasa de origen animal representaba entre el 40 y 70% de la grasa total ingerida (Kummerow, 2009). El reporte de la Organización Panamericana de la Salud de 2008 mostró una gran variabilidad en el consumo estimado de AGT, siendo <1g/persona/día en países asiáticos/pacíficos y aproximadamente de 10 g/persona/día en países occidentales (Organización Panamericana de la Salud, 2008). Sobre el consumo de AGT en países de América, el mismo trabajo indicó que la información era incompleta, pero se estimaron valores de ingesta de 4,5 a 7,2 g/día para EEUU (2 a 3% de la energía), 7,2 g/día en Argentina, 4,5 g/día en Chile y en 2,6 g/día en Costa Rica.

Considerando los AGT individuales consumidos por la población humana, los isómeros prevalentes son los t-18:1 (85-95%), seguidos de los t-18:2 (8-22%), mientras que las cantidades de t-18:3 y t-16:1 menores al 10 % (Zbikowska, 2010). Dentro de los t-18:1, el EA es el isómero que mostró un mayor consumo (Larqué y col., 2001).

La cantidad de AGT en productos naturales es más constante que en los productos elaborados con AVPH. La carne puede contener hasta 1g de AGT/100g y la leche entera hasta 0,1 g AGT/100g (Wolff y col., 1998). El contenido en grasa de leche o manteca es de 2 a 8 g AGT/100 g de grasa, de los cuales bajo porcentaje corresponde a CLA y la mayoría son isómeros t-18:1, principalmente VA (Allison y col., 1995; Ratnayake y Zehaluk, 2005). Estudios más recientes hablan de una relación lineal entre el contenido de VA y CLA en productos derivados de rumiantes, esta relación es aproximadamente 3:1 (Jutzeler van Wijlen y Colombani, 2010).

4.1.2. Reglamentación y rotulado nutricional de los ácidos grasos trans

Ante las evidencias reunidas en los últimos años respecto de los efectos deletéreos de los AGT sobre la salud y atendiendo a recomendaciones de sociedades científicas, en diferentes países se implementaron acciones tendientes a disminuir los niveles de AGT en alimentos, como asimismo, diferente reglamentación para regular su consumo. En EEUU, la FDA (Food and Drug Administration), exigió de manera obligatoria la declaración de los AGT en el etiquetado de los alimentos (tabla "Nutrition Facts") a partir de Enero de 2006. La legislación en países del MERCOSUR también se ocupó de los AGT; estableciendo como obligatoria la declaración del contenido de AGT en el etiquetado a partir del mismo año. En Argentina, 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; aunque 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". El plazo previsto para la adecuación a la nueva reglamentación fue diciembre de 2014, entrando en plena vigencia la norma a partir de esa fecha.

La industria alimentaria tuvo que enfrentar el desafío de desarrollar estrategias que permitieran reemplazar el uso de grasas trans en la elaboración de productos, esto fue posible sustituyendo gradualmente los AGT por grasas saturadas, interesterificadas o monoinsaturadas. Actualmente, gracias al accionar conjunto de organismos y empresas, en muchos países se logró una disminución en el consumo de AGT de aproximadamente un 26%.

4.2. INCORPORACIÓN Y METABOLISMO TISULAR DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS

Ha sido demostrado que los AGT dietarios son incorporados a los lípidos tisulares (Kummerow, 1975; Kummerow, 1974; Kummerow, 1979; Emken, 1979). La cantidad y el tipo de AGT que se incorpora en los diferentes tejidos, así como su distribución, dependen del tipo de tejido e isómero, de la cantidad ingerida y del tiempo de tratamiento dietario (Wood, 1979a; Wood, 1979b; Sugano e Ikeda., 1996). Algunos tejidos tienen mayor selectividad que otros a la incorporación de los AGT; así, el corazón y el cerebro, los incorporan en muy baja cantidad, a diferencia del tejido adiposo y del hígado que lo hacen en forma muy dinámica (Schrock y Connor, 1975; Heckers y col., 1977; Cook, 1981; Pettersen y Opstvedt, 1992; Larqué y col., 2001). Se ha demostrado, en humanos, que se incorporan a todas las clases de lípidos de diferentes tejidos, glóbulos rojos y plasma (Ohlrogge y col., 1982; Rocquelin y col., 1985). Los AGT son también incorporados dentro de las lipoproteínas del suero, y se ha discutido, el posible impacto en relación al desarrollo de aterosclerosis (Kummerow, 1974). Los AGT incorporados, se acumulan principalmente en tejidos ricos en TAG, como el tejido adiposo e hígado, y en FL de las membranas celulares, ocupando las posiciones normalmente utilizadas por los SFA (Ohlrogge y col., 1982). En los TAG son esterificados preferencialmente en las posiciones sn-1 y sn-3 (Beare-Rogers y col., 1979) sugiriendo una fácil metabolización, siendo su destino principal la β -oxidación (Cook, 1980). Dado que la estructura y propiedades fisicoquímicas asemejan a los SFA, la incorporación de AGT los FL disminuye la fluidez de las membranas celulares alterando la función de enzimas, receptores, transportadores.

La suspensión del aporte dietario de AGT, resultó en la desaparición de éstos en los tejidos donde se acumulan, indicando que son oxidados (Menon y col., 1983; Ide y Sugano, 1984; Valenzuela, 2008). Algunos autores reportaron que el EA se metaboliza más lentamente que los cis, OA (Lawson y Kummerow, 1979; Mahfouz y col., 1980) favoreciendo su retención en los tejidos; mientras que otros investigadores encontraron velocidades de oxidación de los AGT comparables con los AG cis (Coats, 1964; Anderson y col., 1967; Stearns y col., 1967; Lawson y Kummerow., 1979; Wood, 1979a).

Además de oxidarse, los AGT pueden ser metabolizados por otras vías, las mismas que comparten los AG cis y SFA. Fue reportado que varios isómeros posicionales de los AGT 18:1 pueden ser sustrato de la enzima Δ^9 -desaturasa, compitiendo con el ácido esteárico (18:0) por la utilización de esta enzima (Mahfouz y col., 1980). Asimismo, fue demostrado que los isómeros CLA son convertidos a metabolitos conjugados de mayor número de insaturaciones y longitud de cadena por las enzimas elongasas y desaturasas de AG (Banni y col., 1999). De esta manera, la incorporación de AGT puede interferir en rutas metabólicas, inhibiendo competitivamente la síntesis de ácido araquidónico (AA) a partir de LA y de ácido eicosapentanoico (EPA) a partir de ALA (Mahfouz y col., 1980); o alterando la síntesis de eicosanoides (Moore y Dhopeswarkar, 1981; Sugano y col., 1989; Ratnayake y col., 1994).

4.3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS

4.3.1. Ácidos grasos trans y riesgo de enfermedades cardiovasculares

Hacia la década de 1990 surgen publicaciones que relacionan el consumo de AGT con las enfermedades cardiovasculares (ECV) (Booyens y col., 1988; Ascherio y col., 1999). En esos años, estudios realizados en EEUU confirman los efectos negativos del consumo de AGT sobre la salud (Willett, 1993; Willet, 1995; Lichtenstein, 1999). Este tema se torna aún más relevante cuando estimaciones en ese país muestran que el consumo de elevadas cantidades de AGT proyectaba la alarmante cifra de 30.000 muertes al año por enfermedad coronaria (Willet y Ascherio, 1994; Lábbé, 2009). Con el devenir de estudios epidemiológicos y metabólicos se extendieron fuertemente las evidencias de la asociación entre la ingesta de AGT con las alteraciones del perfil lipídico plasmático y el incremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares (Mensink y Katan, 1990; Koletzko y Decsi, 1997; Sundram y col., 1997; Lichtenstein y col., 1999; de Roos y col., 2001; Sundram y col., 2003; Stender y Dyerberg., 2004; Mozaffarian y col., 2006). En estudios no se discriminaba el tipo de AGT y el riesgo de ECV se correlacionaba positivamente con el consumo de AGT totales (Pietinen y col., 1997; Oomen et al., 2001). Análisis

combinados de 4 estudios de cohorte prospectivos, involucrando cerca de 140.000 sujetos, han permitido estimar esta relación, demostrando 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). Más aún, demostraron que los efectos adversos de AGT eran más deletéreos que los de los SFA. En un riguroso estudio metabólico, Mensink y Katan (1990) demostraron que reemplazando 10% de la energía de la dieta proveniente de OA por AGT incrementaron los niveles de colesterol-LDL y disminuyeron los de colesterol-HDL, mientras que reemplazando el OA por SFA, solo aumentaba el colesterol LDL sin modificarse la fracción HDL. Como resultado, la relación LDL/HDL fue significativamente mayor cuando por la sustitución con AGT que con SFA. Aunque este estudio utilizó niveles muy elevados de AGT, los resultados fueron corroborados posteriormente con niveles de AGT más representativos del consumo habitual (Nestel y col., 1992). Lagrost (1992), mostró que las modificaciones de las distintas fracciones de colesterol plasmático por los AGT, y más específicamente el EA, estaban asociados a un incremento en la actividad de la proteína CEPT (del inglés Cholesteryl Ester Transfer Protein) plasmática, involucrada en la transferencia de ésteres de colesterol desde las HDL a otras lipoproteínas. Esto fue posteriormente confirmado por diferentes investigadores (Abbey y Nestel, 1994; Van Tol y col., 1995). El efecto de los AGT sobre la relación LDL/HDL se estimó ser el doble que el que podían generar los SFA (Ascherio y col., 1999).

Además de las alteraciones sobre la colesterolemia, se demostró que la ingesta de AGT incrementaban los niveles TAG circulantes más que otras grasas dietarias (Mensink y col., 2003). En hepatocitos aislados fue demostrado que los AGT alteraban la producción de lipoproteínas, incrementando la secreción de apolipoproteína B100, modificando la composición de lipídica, aumentando el contenido de colesterol y reduciendo el tamaño de las partículas secretadas (Dashti y col., 2002; Mitmesser y Carr., 2005). Estas alteraciones de las lipoproteínas demostradas “in vitro” evidenciaron efectos potencialmente aterogénico inducidos por los AGT, independiente de su acción sobre las fracciones de colesterol plasmático. Estudios realizados con AGT en humanos también encontraron reducción en el tamaño de las lipoproteínas y alteraciones en la metabolización de las LDL (Mauger y col., 2003; Matthan y col., 2004).

Trabajos más recientes han diferenciado el riesgo de ECV respecto de la fuente de los AGT dietarios. Bendsen y col. (2011) han mostrado que la ingesta de AGT de origen industrial, pero no los AGT de origen natural, correlacionaban positivamente con los eventos y casos fatales de ECV. En este sentido, también se 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 ECV (Mozaffarian y col., 2009). Por lo tanto, el efecto de los AGT sobre los lípidos plasmáticos y las ECV dependería específicamente de los AGT individuales.

La ingesta de AGT ha sido asociada a aumento de niveles de marcadores de disfunción endotelial como la selectina E y moléculas de adhesión celular (López García y col., 2005), los cuales incrementan el riesgo de aterogénesis. Un aumento en la selectina E circulante causado por alta ingesta de AGT también ha sido reportado en un estudio aleatorio en hombres (Baer y col, 2004). Por otro lado, de Roos y col. (2001) observaron una reducida vasodilatación por los AGT cuando fue comparado con una dieta rica en SFA.

4.3.2. Ácidos grasos trans y biosíntesis de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga

Investigaciones empleando diferentes modelos en cultivos celulares, animales de experimentación y humanos han demostrado que los AGT podrían alterar la síntesis de LC-PUFA. En estudios in vitro en cultivos de tejidos de roedores (Mahfouz y col., 1984; Koletzko, 1992) o de fibroblastos humanos (Rosenthal y Doloresco, 1984) fue demostrado que los AGT inhiben la desaturación y elongación de LA y ALA. Trabajos de investigación en ratas también demostraron que dietas conteniendo AGT alteran el metabolismo de los ácidos grasos esenciales (AGE) (Anderson y col., 1975; Lawson y col., 1983). El efecto inhibitorio más potente ha sido encontrado en el ácido linolelaídico (9t,12t-18:2), cuyo aporte dietario es muy bajo (Christiansen y col., 1997). Otros AGT como el EA y mezclas de AGT también mostraron tener un efecto deletéreo sobre la síntesis de LC-PUFA (Lichtenstein y col., 2003).

4.3.3. Ácidos grasos trans, depósitos grasos e inflamación

Resultados controversiales han sido asociados a la ingesta de AGT y la adiposidad. Estudios realizados en humanos mostraron un aumento en la adiposidad como consecuencia de la ingesta de AGT (Matthan y col., 2001; Smit y col., 2010), mientras que trabajos de otros investigadores reportaron un efecto opuesto (Atal y col., 1994; Faulconnier y col., 2006). Los cambios en la adiposidad tienen un estrecho vínculo con el desarrollo de inflamación ya que el tejido adiposo secreta una serie de moléculas bioactivas consideradas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleuquina 6 (IL-6), resistina, llamadas adipocitoquinas. Estas además tienen un importante rol en diferentes desórdenes metabólicos (Fruhbeck y col., 2001; Trayhurn y Beattie, 2001; Rajala y Scherer, 2003; Trayhurn y Wood, 2004; Scherer, 2006) como inflamación crónica, resistencia a la insulina y aterosclerosis (Trayhurn y col., 2006). En animales de experimentación alimentados con AGT las alteraciones observadas en el tejido adiposo fueron relacionadas a cambios en la expresión génica de PPAR- γ , resistina y LPL (Saravanan y col., 2005). En este sentido en humanos con alto índice de masa corporal, ingestas elevadas de AGT fueron asociadas a elevados niveles de actividad del TNF- α (Mozaffarian y col., 2004), como así también de IL-6 y proteína C reactiva (Lopez-Garcia y col., 2005).

4.3.4. Ácidos grasos trans, sensibilidad a la insulina y diabetes

Los resultados obtenidos acerca de una posible relación entre la ingesta de AGT y la diabetes son aún menos consistentes que las alteraciones antes enunciadas. En humanos, los efectos de los AGT parecerían estar influenciados por una predisposición subyacente a la insulino-resistencia. En individuos con sobrepeso o diabetes mellitus establecida, las dietas con AGT mostraron tener un efecto adverso en la sensibilidad a la insulina, acompañado de un incremento de los niveles de insulina en ayunas y postprandial sin cambios de la glucosa circulante (Christiansen y col., 1997; Larqué y col. 2001; Meyer y col., 2001; Lefevre y col., 2005). No obstante, en individuos sanos y de peso corporal normal, no se encontró relación entre la ingesta de AGT y la sensibilidad a la insulina (Louheranta y col., 1999;

Lovejoy y col., 2002). Estudios prospectivos que investigaron la incidencia de la ingesta de AGT en la diabetes, reportaron una asociación positiva (Hu y col., 2001); mientras que otros investigadores no hallaron una relación significativa (van Dam y col., 2002). La evidencia emergente de estos trabajos indica que el consumo de AGT podría incrementar la adiposidad visceral, la resistencia insulínica y el riesgo de diabetes mellitus en individuos con predisposición a estas alteraciones (Micha y col., 2009).

Investigaciones realizadas en modelos animales indicaron consistentemente que la ingesta de AGT tiene efectos adversos sobre marcadores de resistencia insulínica, cuando se comparó con dietas ricas en MUFA o SFA. Estos marcadores de resistencia insulínica incluyen, hiperinsulinemia posprandial (Ibrahim y col., 2005; Kavanagh y col., 2007; Pisani y col., 2008), hiperglucemia (Albuquerque y col., 2006; Axen y col., 2003) y reducción de la captación de la glucosa por el músculo esquelético (Kavanagh y col., 2007; Natarajan e Ibrahim., 2005) y músculo cardíaco (Osso y col., 2008). Sin embargo, resultados obtenidos en animales de experimentación por nuestro grupo de investigación sugieren que los AGT no tendrían efecto sobre las vías de metabolización de la glucosa, tanto en hígado como en músculo esquelético de ratas (Bernal y col., 2006) alimentadas con altos contenidos de grasas.

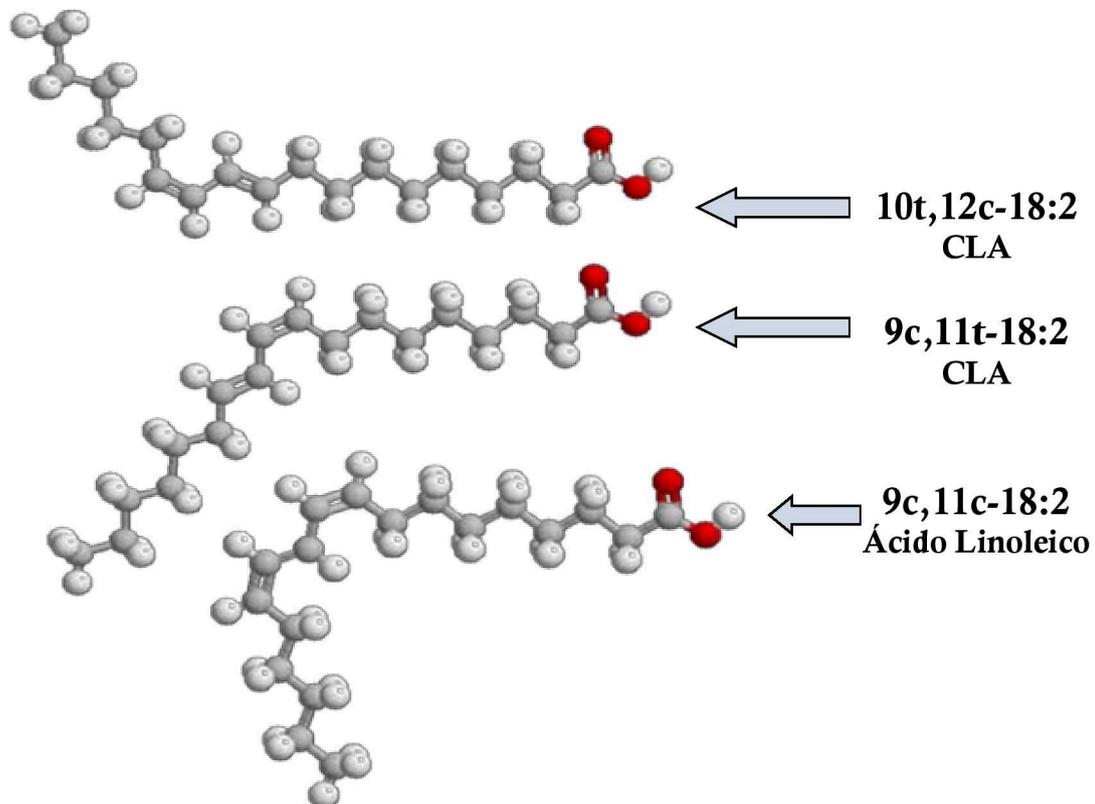
4.3.5. Ácidos grasos trans y cáncer

Resultados de varios estudios epidemiológicos han sugerido una asociación entre los elevados niveles de grasa dietaria y la incidencia de cáncer. No obstante, la relación específica entre los AGT y el riesgo de padecer cáncer fue evaluada en escasos trabajos y, aunque se realizaron en poblaciones que consumían elevada cantidad de AGT, se encontró poca evidencia que estableciera una correlación positiva (Thompson y col., 2008). Algunos estudios han sugerido que el contenido de AGT en tejido adiposo estaría relacionado con el cáncer de mama, colon y próstata (Bakker y col., 1997; Slattery y col., 2001); aunque los mismos no fueron concluyentes. La mayor información existente sobre los AGT y el cáncer está referida al cáncer de mama. Algunos estudios en humanos, encontraron una correlación positiva entre el consumo de AGT y la incidencia de cáncer mamario (Voorrips y

col., 2002; Rissanen y col., 2003; Chajes y col., 2008), mientras que otros investigadores no han podido determinar dicha asociación (Holmes y col., 1999; Byrne y col., 2002; Kim y col., 2006). En tanto que las evaluaciones realizadas en modelos animales no han provisto evidencias suficiente claras que soporte una asociación entre la ingesta de AGT y el desarrollo de tumores mamarios (Thompson y col., 2008). Las investigaciones realizadas sobre otros tipos de cáncer como el de próstata y colon son escasas. Algunos estudios prospectivos mostraron una correlación positiva entre los AGT y el cáncer de próstata (Chavarro y col., 2008; King y col., 2005). Mientras que con respecto al cáncer de colon, los datos epidemiológicos son limitados, y mostraron una débil evidencia que soporte los efectos adversos de la ingesta de AGT sobre este tipo de cáncer. Más aún, los estudios en animales fueron inconclusos, incluso cuando se suministraron elevadas dosis de AGT (Thompson y col., 2008).

4.4. CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO

El término CLA comprende una serie de isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico que se caracterizan por haber perdido el grupo metilénico que separa dos dobles enlaces contiguos conformando las estructuras conjugadas. A su vez la mayoría de los CLA tienen al menos un doble enlace con isomería trans. Si bien existen potencialmente un gran número de isómeros posibles para los CLA (Roach y col., 2002), los más importantes por su abundancia y efectos biológicos, tanto en animales como en humanos, son el 9c,11t-18:2, también llamado ácido ruménico (RA), y el isómero 10t,12c-18:2 (Baunman y col.,2000) (Figura 3).

Figura 3: Isómeros posicionales conjugados

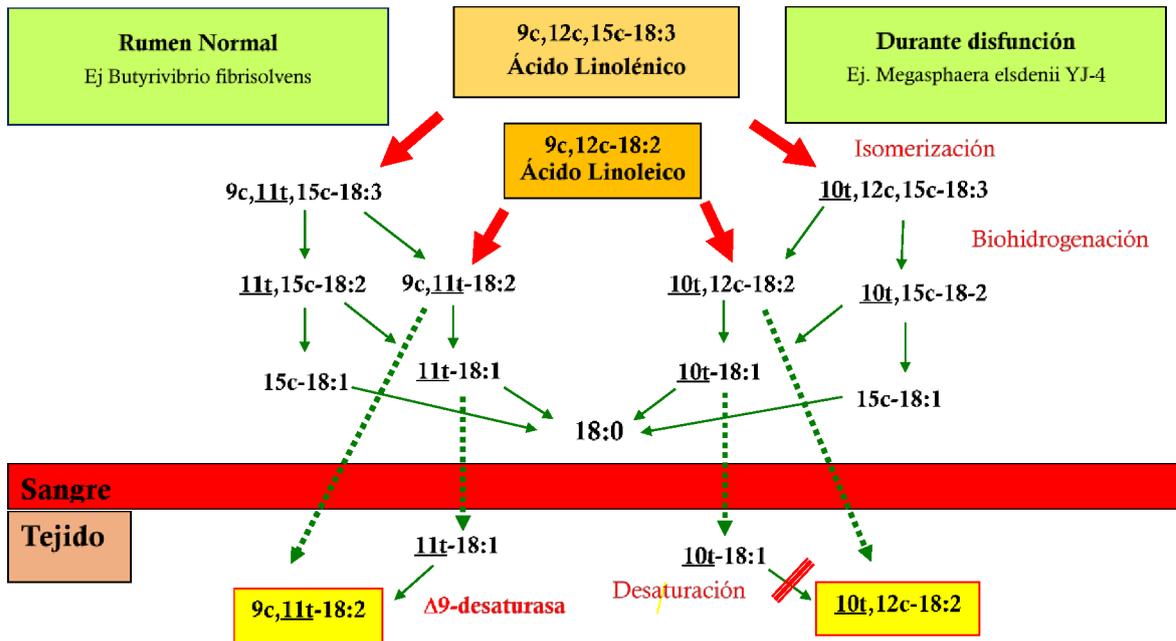
4.4.1. Fuentes y consumo de Conjugados del Ácido Linoleico

Las principales fuentes de CLA son las grasas de animales rumiantes, y en particular la grasa láctea. Como fuera mencionado anteriormente, los CLA son originados por la biohidrogenación ruminal incompleta del LA en los animales poligástricos y la bioconversión del RA a partir del VA en tejidos de mamíferos (Griinari y Bauman, 1999) (Figura 4). Este proceso es llevado a cabo por bacterias. Durante mucho tiempo, la única bacteria conocida capaz de realizarlo era el *Butyrivibrio fibrinosolvens*, luego se identificó un diverso rango de bacterias del rumen que pueden hidrogenar PUFA (Harfoot y Hazlewood, 1988). Estas fueron divididas en 2 grupos según las reacciones y los productos finales. Las bacterias del Grupo A hidrogenan el LA, siendo su mayor producto final el VA; el primer paso de esta reacción es la isomerización del doble enlace cis-12, seguido de la formación del

doble enlace conjugado, generando así RA como producto intermedio. Posteriormente se hidrogena el enlace cis-9 para formar VA. Las bacterias del Grupo B utilizan al VA como un sustrato para sintetizar ácido esteárico. El VA también puede ser sintetizado por bacterias del rumen a partir de los ácidos α y γ -linolénico (GLA, del inglés gamma linolenic acid) (Baumann y col., 1999). La síntesis endógena de RA o bioconversión del VA a RA se realiza mediante la desaturación del VA por acción de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa. Esta síntesis endógena de RA vía SCD1 representa la principal fuente de CLA en grasa de leche y grasa corporal de rumiantes (Baumann y col., 1999). Asimismo, una vez absorbido el VA puede ser bioconvertido a AR en los tejidos del huésped. Esta tasa de conversión de VA a RA-CLA estimada comprende un rango que va de 5 a 12% en roedores y de 19 a 30% en humanos (Turpeinem y col., 2002).

Bajo ciertas condiciones dietarias (ej: dieta bajas en fibra), el pH del rumen puede modificarse, y esto resulta en variaciones de la población bacteriana con consecuentes cambios en los patrones de biohidrogenación. Así, se altera el perfil de AG t-18:1 de los tejidos de rumiantes y, en esta situación, el isómero predominante en la grasa láctea es el 10t-18:1 (Griinari y Bauman, 1999). La síntesis de 10t-18:1 involucra a la enzima isomerasa bacteriana que forma el 10t,12c-CLA, como producto intermedio, incrementando su contenido en grasa de leche.

Figura 4: Formación de Conjugados del Ácido Linoleico a través de la biohidrogenación ruminal*



*Kramer et al. Am J Clin Nutr 2004; 79 (suppl): 1137S–45S.

Aunque el VA y los CLA son principalmente de origen natural, cabe consignar que los AVPH son otra fuente de VA y pueden contribuir de manera considerable a la ingesta de este isómero (Wolf y col., 2000); además ciertos procesos y la manipulación industrial de los aceites pueden generar cantidades variables de CLA (Banni y Martin, 1998).

Además, los CLA pueden ser sintetizados a partir de aceites ricos en LA mediante una reacción de isomerización alcalina en presencia de catalizadores metálicos (Bernas y col., 2003). Estos procesos se realizan a partir de aceites vegetales, generando mezclas de CLA, las cuales se comercializan como suplementos dietarios. La cantidad final de isómeros CLA depende de la cantidad de LA en el aceite original y las mismas contienen principalmente RA y 10t,12c-18:2 en cantidades equimoleculares, estos isómeros representan aproximadamente el 85-90% del total y otros 10 isómeros menores son el remanente 10-15% (Pariza y Hargraves, 1985; Kelly, 2001). Los CLA también pueden ser producidos mediante el uso de bacterias específicas (Kishino y col., 2003), método mediante el cual se puede obtener isómeros de mayor pureza y máxima actividad biológica.

La concentración típica de CLA en productos lácteos y cárnicos de rumiantes abarca un rango de 3 a 9 mg CLA/g de grasa donde el RA representa entre el 73 y 93 % del total (Ratnayake y Zehaluk, 2005). Sin embargo, ha sido documentado que el contenido del CLA en leche de vaca puede alcanzar valores de hasta 20 mg/g de grasa. Estas variaciones que pueden observarse son debidas a múltiples factores relacionados con la dieta de los animales que afectan el contenido de CLA en productos derivados de rumiantes (Jutzeler van Wijlen y Colombani, 2010). Además existe una variación estacional a lo largo del año ya que la leche producida al principio de la primavera (estación de rápido crecimiento de pasturas) puede contener el doble de CLA que la leche producida en los meses de invierno (Pariza y Hargraves, 1985; Jutzeler van Wijlen y Colombani, 2010). El contenido de CLA en rumiantes puede incrementarse a través de la alimentación de los animales con pasturas naturales, como también a través del suministro de suplementos dietarios que contengan aceites ricos en PUFA n-6 y n-3 (Pariza y Hargraves, 1985; Gagliostro y col. 2004; Jutzeler van Wijlen y Colombani, 2010; Gagliostro, 2015). Es importante denotar que la composición de los AG de la dieta de los animales no afecta solo el contenido de CLA, sino que también modifica la cantidad de AGT naturales totales y otros AG (Allison y col., 1995; Ratnayake y Zehaluk, 2005; Jutzeler van Wijlen y Colombani, 2010).

Numerosos estudios estimaron el consumo del CLA en diferentes poblaciones. Un trabajo de revisión reunió datos de consumo de CLA de 24 estudios realizados en diferentes países (Europa, América del Norte y Australia). El valor promedio reportado fue de 300 mg/día/persona, con ingestas que abarcan un rango de 200 a 1000 mg/día/persona. Estas diferencias se deben fundamentalmente a la variación del contenido de CLA en la dieta y en los alimentos, así como también al diseño de los diferentes estudios empleados para evaluar la ingesta (Jutzeler van Wijlen y Colombani, 2010). En el estudio TRANSFAIR fue estimada la ingesta de VA proveniente tanto de fuente naturales como de AVPH en Europa. Los valores reportados están comprendidos en un rango de 1 a 3,5 g de VA/persona/día. El porcentaje de AGT de origen natural consumidos encontrados fue de 30 a 80%, que se tradujo en una ingesta aproximada de 1g de VA/día /persona (Jutzeler van Wijlen y Colombani, 2010). No se disponen hasta el momento de datos de consumo de VA y CLA en América Latina.

4.5. INCORPORACIÓN Y METABOLISMO TISULAR DE LOS CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO

Numerosos trabajos han reportado que los CLA ingeridos en la dieta son incorporados en las distintas fracciones lipídicas de la mayoría de los tejidos. Asimismo, diferentes metabolitos derivados de la elongación, desaturación y β -oxidación de los CLA han sido encontrados en varios estudios (Park y Pariza, 2007).

Una vez que los distintos isómeros CLA son incorporados a los tejidos, ellos pueden ser metabolizados, secretados/excretados o retenidos en las estructuras celulares o de depósitos. Resultados de nuestras investigaciones (Scalerandi, 2014; Fariña, 2015b) han demostrado que el tejido adiposo tiene una mayor retención de CLA que otros tejidos, mientras que el cerebro tiene una tasa de retención prácticamente cercana a la sensibilidad metodológica. Además, del tipo de tejido, la retención de isómeros CLA mostró ciertas diferencias, dependiendo de la composición de los demás AG dietarios.

4.6. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO

El descubrimiento de las propiedades de los CLA ocurre cuando Pariza y colaboradores encuentran un factor anticarcinogénico en carne vacuna, que consiste en una serie de isómeros conjugados del LA (Bauman y col., 1999). Posteriormente, numerosos trabajos demostraron que los CLA disminuyeron la incidencia de tumores en modelos animales de cáncer de mama, estómago, colon y piel. No obstante, los efectos positivos para la salud asociados al consumo de CLA en modelos experimentales no se limitan al cáncer, además se les atribuye la capacidad de disminuir la masa grasa corporal, disminuir la aterogénesis, incrementar la mineralización de los huesos, efectos antidiabetogénicos y ser moduladores de los lípidos plasmáticos y del sistema inmune (Pariza y col., 1979; Pariza y Hargraves 1985; Banni y Martins, 1998).

Si bien el término CLA hace referencia a un conjunto de AG, las propiedades biológicas son atribuidas a sus isómeros predominantes: RA y 10t,12c-18:2, las cuales

son isómero específicas. Así, el descenso de la grasa corporal es el principal efecto demostrado del isómero 10t,12c-18:2 (Belury y Kempa-Steczko, 1997; Pariza y col, 2000). En tanto que el RA tiene reconocidos efectos benéficos sobre la modulación de los lípidos plasmáticos y preventivos sobre el cáncer (Ip y col., 1997; Valeille y col., 2005). Ambos CLA son reconocidos ligandos de los PPAR, mecanismo por el cual se pueden explicar sus efectos en hígado y tejido adiposo (Moya-Camarena y col., 1999, Muzio y col., 2007; Miller y col., 2008).

Es importante destacar que la respuesta a los CLA en modelos experimentales presenta variaciones, mostrando diferente susceptibilidad según la especie utilizada. Los ratones son los más sensibles, seguido de hámsteres y ratas (Kim y col, 2002). En humanos, los resultados hallados en diferentes estudios son controversiales, principalmente debido a las características de los individuos y de los modelos experimentales que hacen difícil la interpretación de los resultados. Algunos autores encontraron efectos benéficos de los CLA sobre la grasa corporal, el peso corporal y los niveles de lípidos plasmáticos (Thom y col, 2001; Gaullier y col, 2005); mientras que otros no han encontrado efectos sobre estos parámetros (Noone y col, 2002; Petridou y col, 2003) y más aún, algunos autores reportaron efectos adversos tales como disminución de la sensibilidad insulínica o incremento en los marcadores de inflamación y de estrés oxidativo (Riserus y col., 2002; Riserus y col., 2004; Desroches y col, 2005; Poirier y col., 2006).

4.6.1. Conjugados del Ácido Linoleico y carcinogénesis

Numerosos estudios en modelos experimentales animales y en líneas celulares han demostrado efectos benéficos de los CLA sobre el cáncer en distintos tejidos, principalmente sobre el cáncer de mama. No obstante, el rol de los CLA en la inhibición del crecimiento tumoral y de su capacidad metastásica, así como los mecanismos de acción aún no son completamente conocidos (Belury, 2002). En este sentido, algunos autores proponen que los efectos podrían estar relacionados a una inhibición de la angiogénesis (Sikorski y col., 2008), a alteraciones en la peroxidación lipídica, metabolismo de eicosanoides y expresión génica; así como también a la expresión de la proteína p53 (Kelley y col., 2007; Stachowska, 2008). En modelos animales se ha demostrado que los CLA inhiben el desarrollo de tumores de mama,

piel y colon inducidos químicamente; como así también metástasis peritoneal en ratas y ratones (Stachowska, 2008; Shiraishi y col., 2010). Sin embargo, en humanos, aún no se ha establecido una relación directa entre los CLA dietarios y los resultados de diferentes investigaciones son escasos y nada concluyentes, por lo que son necesarios más estudios controlados para determinar esta asociación (Dilzer y Park, 2012).

4.6.2. Conjugados del Ácido Linoleico, peso y composición corporal

Park y col. (1997) fueron los primeros en demostrar que los CLA dietarios disminuían la adiposidad en incrementaban la retención proteica en ratones. Desde entonces, diferentes trabajos de investigación han evaluado el efecto de los CLA sobre la composición corporal en diferentes animales de experimentación. Fue demostrado que la suplementación dietaria con una mezcla comercial conteniendo cantidades equimoleculares de los dos principales CLA, o sólo con el isómero 10*t*,12*c*-18:2, disminuía los depósitos grasos en animales de experimentación; mientras que muy pocos trabajos asociaron al RA con este efecto (Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005; Akahoshi y col., 2003; de Roos y col., 2005; Scalerandi y col., 2014). Por lo tanto, los cambios en la composición corporal se atribuyen fundamentalmente al isómero 10*t*,12*c*-18:2.

Como posibles mecanismos involucrados, se ha sugerido un incremento del gasto energético, aumento de la transcripción de proteínas desacoplantes y mayor oxidación de lípidos asociado a un incremento en la expresión de la enzima carnitina palmitoil transferasa-I (CPT-I) (Takahashi y col., 2002; LaRosa y col., 2006). Otro mecanismo propuesto es la inhibición de la lipogénesis, el mismo ha sido asociado a menores niveles de expresión y actividad de las enzimas acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintasa (FAS), y estearil-CoA desaturasa (SCD1) (Brown y col., 2004; LaRosa y col., 2006). En algunos trabajos se ha reportado una menor actividad de la enzima LPL que contribuiría a modular los depósitos grasos (Xu y col., 2003; Andreoli y col., 2009). Un incremento en la lipólisis por efecto de los CLA fue reportado por algunos autores en adipocitos aislados y en tejido adiposo (Chung y col., 2005; Moon y col., 2006; Ippagunta y col., 2011; Ippagunta y col., 2013); mientras que otros autores no encontraron efectos (Simón y col., 2005). Muchos

efectos asociados a los CLA pueden estar modulados por su acción sobre factores de transcripción que regulan la lipogénesis, como el PPAR- γ y el SREBP-1c. Por otro lado, los CLA mediante su acción antagonista sobre PPAR- γ podrían interferir en la diferenciación de los adipocitos, como así también inducir la apoptosis elevando la expresión de TNF- α (Poirier y col., 2006; Tsuboyama-Kasaoka y col., 2006).

Los resultados obtenidos en modelos animales y los mecanismos dilucidados no son totalmente extrapolables a estudios en humanos, donde los CLA han mostrado escasa efectividad sobre el peso corporal. Las diferencias encontradas en estos estudios fueron atribuidas a las dosis administradas, edad, peso corporal, grasa corporal y/o estado metabólico de los individuos evaluados (Wang y Jones, 2004; Silveira y col., 2007).

4.6.3. Conjugados del Ácido Linoleico, lípidos plasmáticos y metabolismo lipídico

Efectos controversiales de los CLA sobre el perfil de lípidos plasmáticos y factores de riesgo aterogénicos han sido reportados. Una disminución en los niveles circulantes de colesterol, TAG y colesterol-LDL acompañados de niveles normales o aumentados de colesterol-HDL fueron hallados por diferentes investigadores (Baddini-Feitoza y col., 2009; Battacharya y col., 2006). En hamsteres con hipercolesterolemia, los CLA redujeron los niveles plasmáticos de colesterol total y de los TAG (Nicolosi y col., 1997). No obstante, otros autores hallaron concentraciones elevadas de TAG y VLDL séricas asociadas a consumo de mezclas de RA y 10t,12c-18:2 como del isómero 10t,12c-18:2 individual (Gavino y col., 2000). El efecto de los CLA sobre los lípidos plasmáticos es consecuencia del impacto de los isómeros en el metabolismo en tejidos, principalmente en hígado y tejido adiposo. Estos cambios metabólicos han sido estudiados en modelos animales, donde además de efectos benéficos, también han sido observados efectos deletéreos de los CLA. Así en ratones alimentados con el isómero 10t,12c-18:2 individual han sido descritas una serie de alteraciones que conforman el denominado “síndrome lipoatrófico” (Poirier y col., 2005). El mismo está caracterizado por una marcada hepatomegalia y esteatosis como consecuencia de la redistribución de los depósitos grasos (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002). Esto genera una

gran afluencia de AG al hígado, incremento de la lipogénesis sumado a una alterada capacidad de oxidación de AG y de secreción de TAG-VLDL (Vyas y col., 2012). Poirier y col. (2005) propusieron que la disminución de adiposidad inducida por el isómero 10t,12c-18:2 conduce a una disminución en los niveles de leptina y adiponectina que reducen la sensibilidad insulínica periférica. Esto lleva a la hiperplasia de las células β -pancreáticas e hiperinsulinemia que aumenta la acumulación de TAG en hígado. Los mecanismos subyacentes están relacionados con un aumento de la expresión de SREBP-1c y PPAR- γ hepático (Clément y col., 2002; Rasooly y col., 2007). Las alteraciones metabólicas de los CLA descritas para el “síndrome lipotrófico” en ratones, no han sido observadas en otras especies alimentadas con mezclas de CLA ó isómeros individuales (Faulconnier y col., 2004; Zabala y col., 2004; Purushotham y col., 2007).

Los estudios realizados en humanos también hallaron resultados controversiales. Mientras que en individuos sanos y/o con sobrepeso-obesidad algunos autores no encontraron modificaciones en los lípidos y lipoproteínas circulantes (Smedman y Vessby, 2001; Risérus y col., 2004; Mele y col., 2013); otros investigadores hallaron efectos benéficos en el perfil de lípidos plasmáticos en pacientes normales y con sobrepeso (Gaulhier y col., 2005). Contrariamente, fue reportado un incremento de los niveles de TAG y de la relación LDL/HDL en hombres sanos que consumieron 10t,12c-18:2 (Tricon y col., 2004).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesis se basa en: 1) estudios en animales en experimentación alimentados con dietas ricas en grasas han demostrado numerosas alteraciones metabólicas que también están presentes en personas con ECNT, 2) los isómeros AGT industriales han sido reconocidos tener potentes efectos deletéreos sobre el metabolismo lipídico incrementando el riesgo de enfermedades cardiovasculares, 3) los CLA son compuestos potencialmente biológicamente activos que podrían prevenir alteraciones en el metabolismo lipídico y mejorar el estado nutricional y 4) al menos a nuestro conocimiento, existen muy pocas evidencias de los potenciales efectos deletéreos o benéficos de los AGT y de los CLA en un modelo experimental con dietas ricas en grasas.

Cabe consignar que los resultados del presente desarrollo temático podría tener una alta repercusión en la profundización del conocimiento de las propiedades de los isómeros de AG, como de los mecanismos bioquímicos y moleculares de acción, permitiendo colaborar con una posterior intervención o prevención de alteraciones producidas nutricionalmente.

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

OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente plan de trabajo de tesis es determinar el grado de incorporación de AGT y/o CLA dietarios en lípidos de diferentes tejidos y sus potenciales efectos sobre el estado bioquímico-nutricional en animales de experimentación alimentados a niveles recomendados y elevados de grasa dietaria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A) Optimizar la metodología para la cuantificación de isómeros de ácidos grasos en muestras de grasas dietarias, como también de tejidos y suero.

B) Analizar durante los tratamientos dietarios con AGT y/o CLA las variables nutricionales: ingesta de alimentos y de energía, ganancia de peso y absorción de grasa dietaria. eficiencia dietaria.

C) Evaluar al final del período dietario con AGT y/o CLA: composición corporal, retención energética corporal y eficiencia energética, como también el peso de ciertos órganos y tejidos.

D) Investigar la incorporación y retención de los diferentes isómeros en suero, bilis y tejidos claves del metabolismo lipídico.

E) Estimar el impacto sobre el perfil de los diferentes AG en suero, bilis, hígado y tejido adiposo.

F) Evaluar los efectos sobre composición de lípidos plasmáticos, tisulares y de secreción biliar.

G) Investigar las potenciales modificaciones en el flujo y secreciones de componentes biliares.

H) Determinar ciertas alteraciones en el estado oxidativo en hígado.

I) Analizar los mecanismos involucrados en la regulación de triglicéridos en plasma e hígado, evaluando la secreción hepática y remoción plasmática de TG pre- β lipoproteínas, actividades de enzimas reguladoras y niveles de ARNm de ciertos factores de transcripción y enzimas claves involucrados en el metabolismo lipídico.

METODOLOGÍA

METODOLOGÍA GENERAL

1. ANIMALES

Para todos los estudios experimentales biológicos se emplearon ratas macho Wistar provistas por el Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (FAVE-UNL; Esperanza, Santa Fe) o propios reproducidos en las instalaciones del Bioterio del Departamento de Ciencias Biológicas (FBCB-UNL; Santa Fe). Durante el período experimental los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) y ciclo luz-oscuridad de 12 horas. Todas las experiencias con animales se llevaron a cabo 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 esta Facultad.

A partir del destete, los animales tuvieron libre acceso al agua y a una dieta estándar de laboratorio con los niveles recomendados de nutrientes hasta alcanzar 110-120 g de peso. Posteriormente, fueron distribuidos aleatoriamente en 6 grupos ($n= 5$ ó 6 , dependiendo de la experiencia) y alimentados durante 30 días con alguna de las dietas experimentales, conformándose así los distintos grupos experimentales. En todas las experiencias donde fueron determinadas la ingesta, eficiencia energética, absorción de lípidos dietarios y balance nitrogenado los animales fueron alojados en jaulas metabólicas individuales, mientras que en el resto de las experiencias fueron ubicados en jaulas colectivas.

2. DIETAS EXPERIMENTALES

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 (AIN, 1977). Las dietas presentaron como variables independientes: 1) el nivel de grasa: recomendado (7%) o elevado de grasa (20%) y 2) la presencia o

ausencia de AG isoméricos (AGT o CLA) (Tabla 1). En consecuencia, los grupos dietarios fueron:

- C7: dieta control basada en recomendación AIN-93G (Reeves y col. 1973) conteniendo 7% de grasa dietaria como aceite de maíz (AIN-76).

- AGT7: dieta AGT a niveles recomendados de grasa, obtenida por sustitución de 1% (p/p) de aceite de maíz de la dieta C7 por 1% (p/p) de AVPH rico en AGT (51%).

- CLA7: dieta CLA a niveles recomendados de grasa, obtenida por la sustitución de 1% (p/p) de aceite de maíz de la dieta C7 por 1% (p/p) de aceite rico en CLA (75,6%).

- C20: dieta control a niveles elevados de grasa (20%, p/p), obtenida a partir de la sustitución de 13% (p/p) de los hidratos de carbono (almidón) de la dieta C7 por 13% (p/p) de aceite de maíz.

- AGT20: dieta AGT a niveles elevados de grasa, obtenida por la sustitución de 2,86% (p/p) de aceite de maíz de la dieta C20 por 2,86% de AVPH rico en AGT (51%).

- CLA20: dieta CLA a niveles elevados de grasa, obtenida por la sustitución de 2,86 % (p/p) de aceite de maíz de la dieta C20 por 2,86% de aceite rico en CLA (75,6%).

El nivel de grasa, y en consecuencia la densidad energética (38,5%), de las dietas C20, AGT20 y CLA20 fue superior al nivel recomendado en normas alimentarias específicas de diferentes sociedades científicas, aunque estuvo basado en un alto consumo observado frecuentemente en nuestra población. Todas las dietas excedieron las recomendaciones de AG esenciales. El aceite de maíz utilizado fue seleccionado como fuente de PUFA y por su alto contenido en LA. Cada dieta fue preparada semanalmente, conservada a 4°C y ofrecida a los animales diariamente durante el período experimental (30 días).

Para la suplementación con AGT se utilizó AVPH con elevado contenido de AGT (51%) provisto por C.A.L.S.A. (Compañía Argentina de Levaduras S.A., Buenos Aires, Argentina), el mismo contiene una mezcla de AGT donde los tres isómeros mayoritarios son: OA, 10t-18:1 y VA. La contribución energética de los AGT (% de energía) fue 1,17 % en la dieta AGT7 y 2,87% en la dieta AGT20. Los CLA fueron aportados por una mezcla comercial conteniendo cantidades equimoleculares de RA (37,7%) y 10t,12c-18:2 (37,9%) gentilmente provista por

Lipid Nitriton B.V. La composición relativa de los AG individuales (Tabla 2) fue idéntica entre los grupos C7 vs. C20, AGT7 vs. AGT20 y CLA7 vs. CLA20.

Con el objetivo de optimizar el uso de animales de experimentación para comparar separadamente los efectos de los AGT del de los CLA a ambos niveles de grasa, se realizaron las experiencias con los 6 grupos al mismo tiempo. No obstante, los estudios comparativos se realizaron separadamente para AGT y CLA.

Tabla 1: Composición de las dietas experimentales

g/kg dieta^(*)	C7	AGT7	CLA7	C20	AGT20	CLA20
Almidón	529,5	529,5	529,5	399,5	399,5	399,5
Sacarosa	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Caseína	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0	200,0
Aceite de maíz	70,0	60,0	60,0	200,0	170,0	170,0
AVPH	-	10,0	-	-	30,0	-
Mezcla CLA	-	-	10,0	-	-	30,0
Fibras	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Vitaminas	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Minerales	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
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 (MJ/kg)	16,6	16,6	16,6	19,2	19,2	19,2

(*) Las dietas fueron preparadas de acuerdo a las recomendaciones de la AIN-93G, excepto por la fuente de AG que corresponde a la AIN-76 y los niveles de grasas dietarias.

C7: dieta control conteniendo aceite de maíz a niveles recomendados de grasa; AGT7: dieta AGT a niveles recomendados de grasa con sustitución de aceite rico en AGT (1%); CLA7: dieta CLA a niveles recomendados de grasa con sustitución de aceite rico en CLA (1%); C20: dieta control conteniendo aceite de maíz a elevados niveles de grasa; AGT20: dieta AGT a elevados niveles de grasa con sustitución de aceite rico en AGT (2,86%); CLA20: dieta CLA a elevados niveles de grasa con sustitución de aceite rico en CLA (2,86%).

Tabla 2: Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales

Ácidos grasos ^(**)	C7	AGT7	CLA7	C20	AGT20	CLA20
14:0	0,05	0,06	0,04	0,05	0,06	0,04
16:0	12,29	12,11	11,27	12,29	12,11	11,27
7c-16:1	0,11	0,09	0,09	0,11	0,09	0,09
17:0	0,07	0,06	0,06	0,07	0,06	0,06
18:0	1,90	3,17	1,95	1,90	3,17	1,95
(6-8)t-18:1	0,00	0,81	0,00	0,00	0,81	0,00
EA	0,00	1,04	0,00	0,00	1,04	0,00
10t-18:1	0,00	1,52	0,00	0,00	1,52	0,00
VA	0,00	1,38	0,00	0,00	1,38	0,00
12t-18:1	0,00	1,07	0,00	0,00	1,07	0,00
(6-8)c+(13-14)t-18:1	0,00	1,18	0,00	0,00	1,18	0,00
OA	30,39	27,90	27,78	30,39	27,90	27,78
11c-18:1	1,15	1,45	1,12	1,15	1,45	1,12
19:0	0,00	0,08	0,00	0,00	0,08	0,00
9t,12t-18:2	0,00	0,19	0,00	0,00	0,19	0,00
9c,12t-18:2	0,00	0,11	0,00	0,00	0,11	0,00
9t,12c-18:2	0,00	0,10	0,00	0,00	0,10	0,00
RA	0,00	0,00	5,38	0,00	0,00	5,38
10t,12c-18:2	0,00	0,00	5,42	0,00	0,00	5,42
LA	52,34	44,95	45,08	52,34	44,95	45,08
ALA	0,96	0,83	0,82	0,96	0,83	0,82
20:0	0,45	0,39	0,39	0,45	0,39	0,39
8c-20:1	0,20	0,18	0,17	0,20	0,18	0,17
22:0	0,00	0,05	0,00	0,00	0,05	0,00
Σ NI	0,00	1,29	0,42	0,00	1,29	0,42
Σ AGT	0,00	6,22	10,80	0,00	6,22	10,80
Σ SFA	14,76	15,92	13,71	14,76	15,92	13,71
Σ MUFA	31,85	30,80	29,17	31,85	30,80	29,17
Σ PUFA	53,30	45,78	45,91	53,30	45,78	45,91

(**) Los valores de cada ácido graso están presentados como porcentaje de FAME. C7: dieta control conteniendo aceite de maíz a niveles recomendados de grasa; AGT7: dieta AGT a niveles recomendados de grasa con sustitución de aceite rico en AGT (1%); CLA7: dieta CLA a niveles recomendados de grasa con sustitución de aceite rico en CLA (1%); C20: dieta control conteniendo aceite de maíz a elevados niveles de grasa; AGT20: dieta AGT a elevados niveles de grasa con sustitución de aceite rico en AGT (2,86%); CLA20: dieta CLA a elevados niveles de grasa con sustitución de aceite rico en CLA (2,86%). NI: ácidos grasos no identificados. ΣAGT: sumatoria de ácidos grasos trans. ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados. ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis. ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis.

3. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS NUTRICIONALES

Un lote de 42 animales fue utilizado para las evaluaciones nutricionales. Al comienzo del período experimental (día 0) 6 ratas fueron sacrificadas (9.00 – 11.00 AM) bajo anestesia (1 mg de acepromacina + 100 mg de ketamina / kg de peso corporal) con el fin de determinar la composición corporal y el contenido energético inicial de la carcasa. El resto de los animales (n=36), se distribuyeron en los 6 grupos experimentales siendo alojados en jaulas metabólicas individuales y recibieron cada una de las dietas experimentales mencionadas anteriormente. Los animales diariamente fueron pesados, se registró la comida ofrecida y se recolectaron los restos de alimento, heces y orina durante todo el tratamiento dietario (30 días). Luego de registrar el peso de los restos de alimento y materia fecal, las muestras fueron llevadas a sequedad hasta peso constante y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. La orina fue recogida en recipientes con H₂SO₄ (2M) para mantener el pH < 2 y evitar pérdidas de nitrógeno (N). Una vez registrado el volumen total de 24 hs., las muestras de orina fueron centrifugadas y el sobrenadante conservado a -20°C para la posterior cuantificación de N.

3.1. INGESTA DIETARIA, ABSORCIÓN APARENTE DE GRASA Y GANANCIA DE PESO

3.1.1. Ingesta dietaria

La ingesta dietaria se determinó por la diferencia entre la comida ofrecida y la remanente. Para corregir los cambios en el contenido de agua, éstas últimas fueron llevadas a sequedad hasta peso constante y posteriormente fueron corregidas por el factor de base seca estimado con una cantidad determinada (aproximadamente 10 g) de comida ofrecida.

3.1.2. Absorción aparente de lípidos dietarios

Para determinar la absorción aparente de grasa muestras de alimento y heces fueron sometidas a extracción con solventes por el método de Twysselman. Las grasas totales extraídas fueron cuantificadas gravimétricamente (Windham, 1999). La absorción aparente (AA) de grasa dietaria, como índice de biodisponibilidad, fue calculada como el porcentaje de grasa ingerida que no fue excretada en materia fecal:

$$AA (\%) = \frac{\text{Grasa ingerida (mg/día)} - \text{Grasa fecal (mg/día)} \times 100}{\text{Grasa ingerida (mg/día)}}$$

3.1.3. Ganancia de peso

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

3.2. COMPOSICIÓN CORPORAL Y EFICIENCIA ENERGÉTICA

De la misma manera que fuera descrito el sacrificio de los 6 animales al inicio de la experiencia, los 36 animales que cumplieron los tratamientos nutricionales fueron anestesiados y sacrificados para evaluar la composición corporal y el contenido energético final de la carcasa. Los cuerpos de los animales, tanto a día 0 como a 30, fueron rasurados para eliminar el pelo en su totalidad. Posteriormente se realizó una incisión abdominal y fueron eviscerados. Las carcasas fueron pesadas y llevadas a estufa a 60 °C hasta pesada constante, para lograr el secado total de las mismas. Cada una de las carcasas secas fueron trituradas hasta obtener una muestra homogénea, a partir de la cual, distintas alícuotas fueron utilizadas para las determinaciones de los contenidos de proteínas, grasas y agua.

3.2.1. Determinación de proteínas

Alícuotas de carcasas secas, previamente trituradas y perfectamente homogeneizadas, fueron utilizadas para cuantificar el contenido nitrógeno N por el

método de Kjeldahl (Windham, 1999). Las muestras fueron digeridas con H₂SO₄ concentrado, de esta manera la materia orgánica fue destruida por oxidación. El proceso fue acelerado por el uso de catalizadores como CuSO₄, y con la elevación de la temperatura de ebullición del H₂SO₄ mediante el agregado de Na₂SO₄ anhidro. Toda la materia orgánica de la muestra fue convertida CO₂ y H₂O, posteriormente eliminados por calentamiento. El N liberado y convertido en NH₃ fue retenido como (NH₄)₂SO₄. Posteriormente el NH₄⁺ fue transformado nuevamente en NH₃ por adición de una solución de alcalina (NaOH concentrado). Este NH₃ fue arrastrado por vapor de agua y recibido en un frasco colector con HCl 0,1N, donde formó NH₄Cl. El exceso de HCl que no reaccionó con el NH₃, fue titulado con NaOH 0,1N. Así, los miliequivalentes de N proteico corresponden a la diferencia entre los miliequivalentes de HCl totales presentes en el frasco colector y los miliequivalentes de HCl en exceso. El contenido total de N de las carcasas secas fue multiplicado por un factor de conversión de 6,25 para estimar la cantidad de proteínas presentes (Rafecas y col., 1994). Los resultados fueron expresados como g de proteínas/ 100 g de carcasa.

3.2.2. Determinación de grasa

El contenido de grasa total fue determinado mediante el método de Twysselman (Whindham, 1999). Alícuotas homogéneas de carcasas secas y trituradas fueron sometidas a la extracción con solvente (éter de petróleo). Luego el contenido de grasa se cuantificó por gravimetría. Los resultados fueron expresados en g de grasa/ 100g de carcasa.

3.2.3. Determinación de agua

El contenido de agua fue determinado mediante método de secado térmico (Whindham, 1999). Para ello, se evaluó la pérdida de agua en alícuotas trituradas de carcasas llevadas a estufa a 60 °C hasta peso constante. Los resultados fueron expresados en g de agua/ 100g de carcasa.

3.2.4. Retención energética corporal. Eficiencia energética

El contenido de proteínas y lípidos de la carcasa, cuantificados según se explicara anteriormente, fueron utilizados para calcular la retención energética

corporal y la eficiencia energética. Para tal fin, ambos contenidos fueron afectados por los factores de conversión de Canolty (1976): 18,62 kJ/ g de proteína y 39,12 kJ/ g de lípido, respectivamente, para transformarlos en energía (kilojoules -kJ-). La retención proteica diaria (RPD) y la retención grasa diaria (RGD) fueron estimadas a partir de la diferencia en los contenidos de energía como proteínas y grasas al final de la experiencia menos los respectivos valores iniciales divididos el tiempo experimental. Luego, la retención energética total de la carcasa (RETC) fue calculada a través de la suma de las retenciones de proteínas y grasa expresadas en unidades de energía (kJ).

$$\text{RETC (kJ/día)} = \text{RPD (kJ)} + \text{RGD (kJ)}$$

3.2.5. Eficiencia energética

La eficiencia energética (EE) durante el período experimental fue calculada como el cociente entre la ganancia de energía diaria de la carcasa y la ingesta energética diaria (IE) (Dulloo y Girardier, 1992; Bell y col., 1995; Specter y col., 1995). La ingesta energética corresponde a la cantidad de alimento consumido (g/día) multiplicando por el número de kJ aportados por gramo de dieta (Tabla 1). Así la eficiencia energética se calculó como la relación:

$$\text{EE} = \frac{\text{RETC (kJ/día)}}{\text{IE (kJ/día)}}$$

3.3. UTILIZACIÓN Y BALANCE DE NITRÓGENO.

3.3.1. Determinación de Nitrógeno

En alícuotas de las muestras de orina, materia fecal y alimento recolectadas diariamente fue cuantificado el N mediante el método de Kjeldahl (Whindham, 1999) según se describió anteriormente. Los resultados fueron expresadas como g N

excretados en orina/24 hs., g N excretados en materia fecal/24hs. o g N ingerido/24 hs.

3.3.2. Cálculo del balance nitrogenado

Conociendo la cantidad y contenido de N de la comida ingerida, de la orina y de las heces de cada animal, fue calculado el balance nitrogenado (BN) diario como la diferencia entre N ingerido (Ning) y el N excretado en orina (Nu) y materia fecal (Nmf), según la siguiente ecuación:

$$BN = Ning - (Nu + Nmf)$$

El N excretado correspondiente a los tegumentos (piel, pelos, uñas. etc.), fue omitido en la ecuación por considerarse cuantitativamente despreciable frente a las demás pérdidas de nitrógeno.

4. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SUERO Y TEJIDOS

Una serie de 36 animales (n = 6 por grupo experimental) alimentados con las diferentes dietas experimentales, se sacrificaron como se describiera anteriormente (anestesia: 1 mg acepromacina + 100 mg ketamina/ kg peso) con el fin de obtener muestras de sangre, tejidos y órganos para su posterior evaluación. Muestras de sangre de vena cava, con ó sin anticoagulante según corresponda, fueron extraídas y centrifugadas a 4°C. Alícuotas de plasma y/o suero fueron congeladas a -20°C hasta el momento de su valoración. Hígado, músculo gastrocnemio y el tejido adiposo epididimal (TAE) completos fueron inmediatamente extraídos, congelados con una pinza enfriada en nieve carbónica, pesados, morterizados y conservados en ultrafreezer (-80°C) hasta su procesamiento.

El músculo representa aproximadamente el 45 % del peso corporal y para su evaluación se seleccionó el músculo gastrocnemio, ya que, por su constitución en tipos de fibras, es representativo del tejido muscular total, el cual posee una elevada capacidad oxidativa y de utilización de glucosa y AG. Con respecto al tejido adiposo, a pesar de que en roedores 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 en condiciones post-prandiales. Debido a esto, se utilizó el TAE como representativo para el estudio del metabolismo lipídico.

5. DETERMINACIONES PLASMÁTICAS Y TISULARES

5.1. PARÁMETROS SÉRICOS

En las muestras de suero o plasma se determinaron los niveles de TAG y colesterol; así como también las actividades de las enzimas Aspartato Amino Transferasa (ASAT), Alanina Amino Transferasa (ALAT) y Fosfatasa Alcalina (FAL).

5.1.1. Triacilglicéridos séricos

La concentración de triacilglicéridos (TAG) en suero fue determinada mediante un método enzimático empleando un kit comercial (SB, Santa Fe, Argentina). El método se basa en la hidrólisis enzimática (lipasas) de los Triglicéridos generando glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado a glicerol-fosfato en presencia de la enzima glicerokinasa y ATP, luego este derivado fosforilado es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de glicerol fosfato oxidasa. El producto final de color es una 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 505 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de TAG presentes en la muestra. Los resultados fueron expresados en mmol/l.

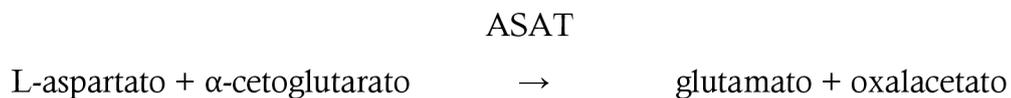
5.1.2. Colesterol sérico

El Colesterol en suero fue determinado mediante kit comercial (SB, Santa Fe, Argentina). Por este método los ésteres de colesterol son hidrolizados por la enzima colesterol esterasa (CE) y el colesterol libre producido más el colesterol libre existente en suero es oxidado por la enzima colesterol oxidasa con formación de peróxido de hidrógeno. Este último en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4-aminofenazona/ fenol a un compuesto color rojo. Los resultados fueron expresados en mmol/l.

5.1.3. Cuantificación de la actividad de enzimas marcadoras de daño hepático

En muestras de suero se determinaron las actividades de enzimas marcadoras de daño hepático: ASAT, ALAT y FAL utilizando kits comerciales (Wiener Lab, Rosario, Argentina).

La ASAT cataliza la reacción:



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

La ALAT cataliza la reacción:



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

La FAL desdobla al fenilfosfato de sodio en medio alcalino tamponado con aminometil propanol (AMP). El fenol liberado se determina por reacción con 4-aminoantipirina y ferricianuro como agente oxidante. El color desarrollado es directamente proporcional a la actividad enzimática y se mide a 520 nm. Los resultados se expresaron en UI/l.

5.2. DETERMINACIONES TISULARES

5.2.1. Contenido de triacilglicéridos en hígado y músculo

Para cuantificar el contenido de TAG tisulares alícuotas de muestras de tejidos conservados a - 80 °C fueron homogeneizadas con diez volúmenes de solución fisiológica fría (4 °C, dilución 1:10). El contenido de TAG fue determinado mediante la técnica propuesta por Laurell (1966). Los TAG fueron extraídos utilizando una mezcla éter isopropílico: etanol (95:5; v/v) y luego fueron saponificados con una solución KOH 6N: etanol (0,5:9,5; v/v). El glicerol liberado fue cuantificado mediante el ensayo de Lambert y Neish (1950) que consiste en la oxidación del glicerol con peryodato generando un mol de ácido fórmico y dos moles de formaldehído por cada mol de sustrato. El formaldehído reacciona a 100°C con ácido cromotrópico para dar un compuesto violeta, cuya intensidad de color se mide a 570 nm y es proporcional a la cantidad de TAG presentes en la muestra. Los resultados fueron expresados como μmol de TAG/g tejido húmedo.

5.2.2. Contenido de colesterol en hígado

Muestras de tejido hepático fueron homogeneizadas con un volumen apropiado de solución fisiológica fría (4°C) para obtener una dilución 1:2. En

alícuotas de estos homogenados fue realizada la extracción de lípidos por el método de Folch (1957). El extracto lipídico obtenido fue transferido a otro tubo de extracción y el solvente fue evaporado bajo corriente de gas N₂. Este extracto fue resuspendido y el contenido de colesterol fue cuantificado mediante kit comercial (SB, Santa Fe). Los resultados fueron expresados como μmol de colesterol/g tejido húmedo.

6. COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS, TISULARES Y DE SECRECIÓN BILIAR

La composición de AG totales fue determinada por cromatografía gaseosa (GLC, del inglés gas liquid chromatography), metodología que requiere una preparación previa de la muestra. En una primera etapa los lípidos totales fueron extraídos; posteriormente, los AG esterificados del extracto fueron convertidos a ésteres metílicos (derivatización) y analizados cromatográficamente. Los ésteres metílicos de los AG (FAME, del inglés fatty acids methyl esters), fueron identificados por comparación con los tiempos de retención relativos a estándares comerciales.

6.1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO LIPÍDICO

Los lípidos totales fueron extraídos por el método de Bligh y Dyer (1959). Este método permite una rápida extracción de lípidos de tejidos, suero y/o secreciones. Brevemente, las muestras fueron homogeneizadas con cloroformo, metanol y agua en proporciones 1:2:0,8 para formar una sola fase miscible con la muestra, extrayendo de esta forma, tanto la grasa libre, como la estructural. El volumen de suero o los gramos equivalentes de tejido a extraer, deben aportar el 80% de humedad al sistema, por consiguiente la misma fue ajustada agregando la cantidad de agua necesaria para conservar las mencionadas proporciones de la mezcla que permiten la formación del sistema homogéneo. Posteriormente se cambian las proporciones cloroformo, metanol y agua del sistema para lograr la separación de fases. Luego, los

extractos fueron centrifugados, la fase acuosa fue descartada y la fase orgánica evaporada bajo corriente de gas N₂. Los extractos lipídicos así obtenidos continuaron con su procesamiento o fueron resuspendidos en Hexano y conservados en viales apropiados herméticamente cerrados bajo corriente de N₂ gas, a -80° C para su posterior análisis.

6.2. DERIVATIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS

El punto de ebullición anormalmente alto de los AG, impide su análisis directo por GLC. Por esta razón los AG, esterificados y libres, presentes en la muestra fueron convertidos en FAME utilizando BF₃ en metanol, de acuerdo al procedimiento de derivatización de la Norma ISO 5509 (2000). Los FAME obtenidos fueron luego extraídos con 5 ml de Hexano (calidad HPLC) para conseguir una concentración final aproximada de 15 a 20 mg/ml, quedando listos para su análisis por GLC.

6.3. ANÁLISIS DE LOS METILÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS

Los FAME de las distintas muestras fueron analizados en un cromatógrafo de gases GC-2014 (Shimadzu) e identificados mediante comparación de sus tiempos de retención absolutos (RT) y relativos (RRT) con los de estándares comerciales. El método utilizado para analizar los AG por GLC fue desarrollado en el marco del Proyecto CYTED 208RT0343 (Ver Anexo I “Estudios Preliminares”) y parcialmente publicados (Masson y col., 2015). Los resultados de los FAME individuales fueron calculados como porcentaje FAME totales. Aquellos AG con concentraciones inferiores a 0,5% fueron considerador como menores y expresados como sumatoria.

La retención de AG en los tejidos fue calculada aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Retención de AG} = \frac{\% \text{ AG tejido} \times 100}{\% \text{ AG dieta}}$$

7. PARÁMETROS ASOCIADOS AL METABOLISMO LIPÍDICO

7.1. SECRECIÓN HEPÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS PRE- β -LIPOPROTEÍNAS

Dado que los niveles de TAG plasmáticos son regulados por la velocidad de secreción hepática (VSTAG) y remoción plasmática de TAG, fueron estudiados algunos mecanismos regulatorios de los niveles de TAG. La velocidad de secreción de pre- β lipoproteínas TAG “in vivo” fue determinada mediante la metodología propuesta por Otway y colaboradores (1967), posteriormente adaptada (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. Así, los TAG se acumulan en el sistema vascular en forma proporcional a la velocidad con la que son secretados por el hígado.

Animales ayunados 12-18 hs. fueron anestesiados como se mencionó anteriormente. Luego, Triton WR 1339 al 10 % (v/v) en cloruro de sodio 0,9 % (dosis: 600 mg/kg peso) fue administrado por vía endovenosa. Muestras de sangre fueron tomadas para la separación del suero y cuantificación de TAG a tiempo 0 y 120 minutos (previo y dos horas posteriores a la administración de la droga). El volumen plasmático (Vp) fue determinado en una experiencia paralela mediante la técnica de dilución del Azul de Evans (Wang y col., 1949).

La velocidad de secreción de triglicéridos fue calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{VSTAG (nmol/100g/min)} = ([\text{TAG120}] - [\text{TAG0}]) \times \text{Vp} / (\text{P} \times \text{t})$$

Donde [TAG120] y [TAG0] corresponden a las concentraciones de TAG a tiempo 120 y 0 min, respectivamente post-administración del Triton WR 1339 y expresadas en $\mu\text{mol/ml}$, P: el peso en gramos del animal, Vp en ml y t en minutos.

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

7.2. REMOCIÓN PLASMÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS PRE- β -LIPOPROTEÍNAS

7.2.1. Actividad de LPL en tejido adiposo epididimal

El tejido adiposo de la rata representa sólo un 7-10% de su peso corporal y recibe menos del 5% del flujo sanguíneo, pese a ello fue demostrado que es el principal tejido responsable de la remoción de las lipoproteínas ricas en TAG presentes en circulación. La actividad LPL en tejido adiposo epididimal (TAE) se determinó mediante el método fluorométrico descrito por Del Prado (1994). Para tal fin, una cantidad de TAE se homogeneizó con buffer Tris-HCl 0,2M, pH 8,2 a 4°C, en una relación 0,2 g de tejido/mL de buffer y se homogeneizó en frío. Una alícuota del homogenado fue utilizada para la preparación del 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 doble extracción con éter dietílico frío. El polvo de acetona se llevó a sequedad bajo corriente de N₂ durante 1 h. a 4 °C y se resuspendió en 1 ml de buffer NH₄Cl 25 mM, pH 8,1 con 1 UI/ml de heparina. La concentración de proteínas en el resuspendido se determinó por el método de Lowry (1979).

El método fluorimétrico para determinar la actividad de la enzima LPL descrito por Del Prado, utiliza di-butiril fluoresceína (DBF) como sustrato enzimático, el mismo fue sintetizado a partir de la mezcla de fluoresceína con piridina y anhídrido butírico. La mezcla fue almacenada a temperatura ambiente por 24 hs., previa adición de etanol absoluto. Finalmente, la mezcla se guardó en freezer a -20°C por 18 hs. El DBF fue cristalizado en 95% de etanol en sucesivas veces hasta remover las trazas de fluoresceína libre. La pureza del producto final se evaluó

realizando un espectro de emisión, comprobando que no existía pico de excitación de fluoresceína a 490 nm.

La reacción enzimática se llevó a cabo a 37°C en buffer fosfato 0,1M, pH 8,0, conteniendo 5% de 2-etoxietanol, 10 mM de DBF y extracto enzimático resuspendido, teniendo en cuenta de no superar 15 mg de proteína en la mezcla de reacción. La cuantificación de la actividad LPL se determinó midiendo por 5 min el aumento de fluorescencia (λ de excitación= 490 nm; λ de emisión= 530 nm) producto de la liberación de fluoresceína como consecuencia de la hidrólisis enzimática del DBF. Paralelamente, el mismo ensayo fue llevado a cabo en presencia de NaCl 1M para inhibir la actividad enzimática específica. La actividad LPL del tejido adiposo se determinó sustrayendo la actividad lipolítica no específica (determinada en presencia de NaCl) 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 por tejido adiposo epididimal total (nmol de fluoresceína/min/TAE).

7.2.2. Actividad de LPL en músculo gastrocnemius

El músculo gastrocnemio conservado a -80°C fue homogeneizado (dil 1:10) en una solución buffer NH₄Cl/NH₄OH – heparina (50 mM, pH 8,6, conteniendo 4 UI/ml de heparina). Luego de reposar 15 min a 4°C los homogenados fueron centrifugados a 2600 g a 4°C durante 15 min obteniéndose los extractos crudos frescos tisulares. La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo por 5 min el aumento de fluorescencia (λ de excitación= 490 nm; λ de emisión= 530 nm) producto de la liberación de fluoresceína como consecuencia de la hidrólisis enzimática del DBF. La reacción enzimática se llevó a cabo a 37°C en buffer fosfato 0,1M, pH 8,0, conteniendo 5% de 2-etoxietanol, 10 mM de DBF y extracto enzimático resuspendido, teniendo en cuenta de no superar 15 mg de proteína en la mezcla de reacción. La actividad LPL medida fue expresada como nmol de fluoresceína liberada por min por gramo de músculo (nmol de fluoresceína/min/g).

7.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ACETIL-CoA CARBOXILASA HEPÁTICA

Para la determinación de la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa se realizó un homogenado a partir de tejido hepático conservado a -80 °C en buffer fosfato pH: 7.0 (KH₂PO₄ 9 mM, K₂HPO₄ 85 mM, ditioneitol 1 mM y KHCO₃ 70 mM) en relación 1:10, el cual fue posteriormente centrifugado a 100.000 g a 4 °C durante 60 minutos. Un volumen del sobrenadante de centrifugación fueron incubados 10 min a 37 °C con el medio de reacción (Tris-HCl 50 mM, citrato de potasio 10 mM, MgCl₂ 10 mM, glutatión reducido 3,75 mM, albúmina sérica bovina 0,75 mg/ml, acetil-CoA 0,125 mM, fosfoenolpiruvato 0,50 mM, NADH 0,125 mM, piruvato kinasa 5,6 U/ml y lactato deshidrogenasa 5,6 U/ml), ATP 150mM y KHCO₃. La actividad de la enzima se determinó siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 340 nm por oxidación del NADH durante 3 minutos y se expresó como nmol NADH/min/mg proteína (Zimmermann y col., 2003). La concentración de proteínas se estimó en el sobrenadante utilizando la técnica de Lowry (1951).

8. EXTRACCIÓN, ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE ARN Y POR PCR EN TIEMPO REAL

El ARN total fue aislado a partir de 100 mg de hígado utilizando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de ARN fueron tratadas con kit DNA-free (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) para remover cualquier contaminación con ADN genómico. El rendimiento y calidad del ARN fue evaluado por medidas de absorbancia a 260, 280 y 310 nm y por electroforesis en gel de agarosa 1,3 %. De cada muestra, 1,5 µg de ARN total fue sometido a transcripción reversa para sintetizar la primera cadena de ADN complementaria (ADNc) usando el kit de síntesis M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Argentina).

Se analizaron los niveles de ARNm de las enzimas vinculadas a la lipogénesis, sintetasa de ácidos grasos (FAS), Δ 9-desaturasa (SCD1) y de la principal enzima

vinculada a la β -oxidación: carnitina palmitoil transferasa- Ia (CPT-Ia). También se evaluó el nivel de expresión de los factores de transcripción: SREBP-1c y PPAR- α .

Los niveles de ARN fueron cuantificados usando PCR en tiempo real con un equipo de detección StepOne TM Real-Time PCR (Applied Biosystems). Los niveles de β -actina fueron medidos de la misma manera y utilizados como gen de referencia. Se tomaron 0,1 μ l de cada ADNc que fueron agregados a la mezcla de reacción de PCR, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) con los primers (pares de oligonucleótidos) correspondientes (600nmol/l para FAS y SCD1, y 900nmol/l para CPT-Ia, PPAR- α y SREBP-1c). Los oligonucleótidos específicos fueron diseñados utilizando información en Genbank, sintetizados comercialmente (Invitrogen Custom Primers) y las secuencias fueron:

FAS: 5'-AGCCCCTCAAGTGCACAGTG-3' (sentido);
 5'-TGCCAATGTGTTTTCCCTGA-3' (antisentido).

SREBP-1c: 5'-GGAGCCATGGATTGCACATT-3' (sentido);
 5'-GCTTCCAGAGAGGAGCCCAG-3' (antisentido).

CPT-Ia: 5'-ACGTGAGTGACTGGTGGGAAGAAT-3' (sentido);
 5'-TCTCCATGGCGTAGTAGTTGCTGT-3' (antisentido).

SCD1: 5'-TGGGTTGGCTGCTTGTG-3' (sentido);
 5'-GCGTGGGCAGGATGAAG-3' (antisentido).

PPAR α : 5'-CCCCACTTGAAGCAGATGACC-3' (sentido);
 5'-CCCTAAGTACTGGTAGTCCGC' (antisentido).

Las condiciones de amplificación de la PCR fueron: 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 anillado 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 usando el método recomendado de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y col., 2001).

9. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL STRESS OXIDATIVO HEPÁTICO

El daño peroxidativo a nivel hepático fue analizado mediante las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y parámetros relacionados a las defensas tisulares antioxidantes, como las actividades de enzimas claves detoxificantes y niveles de glutathion.

9.1. DETERMINACIÓN DE NIVELES 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 en solución salina enfriada a 4°C y secados. La determinación fue realizada en homogenados hepáticos preparados en una proporción de 1/10 (p/v) con KCl 1,15% de acuerdo al método de Ohkawa y col. (1979). El método consiste en la reacción del ácido tiobarbitúrico con un producto secundario de la peroxidación lipídica, identificado como malondialdehído (MDA), formado durante la incubación de homogenados tisulares bajo condiciones aeróbicas, para producir en medio acético y en caliente, un cromógeno rojo con un pico de absorción espectrofotométrica a 532 nm. Los resultados se expresaron en nmol MDA/g tejido húmedo.

9.2. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA CATALASA

La actividad de la enzima catalasa fue determinada por el método de Cohen y colaboradores (1970). Para ello se obtuvieron homogenados hepáticos con buffer

fosfato 50 mM a pH 7.0 en una relación de 1/10 (p/v), los cuales fueron luego centrifugados a 700 g durante 10 minutos a 4 °C, para remover los núcleos y restos celulares. La determinación de la actividad catalasa se fundamenta en la cantidad de H₂O₂ degradada por la enzima, medida en buffer fosfato 50 mM, pH 7.0 conteniendo Triton X-100 al 1%. La disminución en el contenido de H₂O₂ fue medida espectrofotométricamente a 240 nm durante 30 segundos. La actividad enzimática fue expresada 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; Cohen y col., 1970). La concentración de proteínas en el sobrenadante obtenido luego de la centrifugación de los homogenados fue determinada por el método de Lowry (1951).

9.3. CONTENIDO DE GLUTATION REDUCIDO (GSH)

La determinación de GSH se realizó en homogenados hepáticos obtenidos en una proporción 4:1 con ácido tricloroacético al 5%. Se obtuvo el sobrenadante por centrifugación y se determinó GSH según la técnica de Ellman (1979). Muestras de tejido hepático fueron homogeneizadas en ácido tricloroacético al 5% en HCl 0,01 M en una relación 1:4, para obtener así los tioles no proteicos, por precipitación de las proteínas. Luego, el homogenado fue centrifugado a 4°C a 500 g durante 5 minutos. Una alícuota del sobrenadante fue neutralizada con NaOH 1 M, posteriormente se realizó la determinación con 50 μl de sobrenadante neutralizado y 2 ml de DTNB (5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico) 0,1 mM en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. El desarrollo de color se midió espectrofotométricamente a 412 nm y se cuantificó el contenido de GSH frente a la absorbancia de un testigo de concentración conocida. Los resultados se expresaron como μmol de GSH/g de tejido húmedo.

10. EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN HEPÁTICA

10.1. DETERMINACIÓN DEL FLUJO BILIAR

Para el estudio “in vivo” del flujo biliar (FB) en condiciones basales, animales de cada grupo dietario fueron anestesiados; posteriormente se procedió a cateterizar el colédoco con un catéter P10. Muestras de secreción biliar fueron recolectadas cada 15 min durante 1 hora. El FB se estimó gravimétricamente asumiendo una densidad de la bilis de 1 g/ml. Los valores fueron expresados en $\mu\text{l}/\text{min}/100 \text{ g}$ de rata. Muestras de bilis fueron congeladas y conservadas a la temperatura de -80°C hasta su procesamiento. Se estimó además, el flujo biliar independiente de ácidos biliares (FBIAB) por extrapolación de la recta de regresión obtenida luego de correlacionar el flujo biliar y la velocidad de excreción biliar, a cero de excreción de ácidos biliares.

10.2. NIVELES DE LÍPIDOS BILIARES

Alícuotas de la bilis recolectada y conservada a -80°C fueron empleadas para evaluar su composición y cuantificar los niveles de ácidos biliares (AB), colesterol, fosfolípidos (FL) y proteínas.

10.2.1. Ácidos Biliares

En la bilis obtenida se analizaron los niveles de ácidos biliares por el método de Talalay (1960) este se fundamenta en la oxidación del grupo hidroxilo 3- α del núcleo de los ácidos biliares por la enzima 3- α hidroxisteroide deshidrogenasa, formando NADH. Por cada mol de AB oxidado se origina 1 mol de NADH. Los resultados fueron expresados como $\mu\text{mol}/\text{ml}$.

10.2.2. Colesterol en bilis

Los niveles de colesterol en bilis se determinaron por un método espectrofotométrico (descrito en la sección 9.1.3), utilizando un kit enzimático (SB, Santa Fe). Los resultados fueron expresados como mmol/ml .

10.2.3. Proteínas en bilis

Para la determinación de proteínas en bilis se empleó el método de Lowry (1979). Los resultados fueron expresados como mg/ml.

10.2.4. Contenido de fosfolípidos en bilis

Los FL totales de la bilis fueron determinados por el método de Böttcher y col. (1960). Inicialmente, luego de la extracción de los lípidos por el método de Bligh y Dyer (1959), el solvente (Hexano) conteniendo la muestra a analizar o los estándares fue evaporado en una manta calefactora de bloque seco, a una temperatura controlada de 80 a 100 °C. Posteriormente, en el mismo equipo, fue realizada la digestión de las muestras con ácido perclórico a temperatura controlada de 180 °C durante 40 min, y fue detenida por enfriamiento rápido en baño de agua. El método colorimétrico utilizado se fundamenta en el pasaje de los grupos fosfato a ácido fosfomolibdico en medio ácido, el que luego es reducido por acción del ácido ascórbico. La reacción fue realizada en baño de agua a 100 °C y detenida por enfriamiento rápido en baño de agua. Seguidamente la absorbancia de los compuestos formados fue medida espectrofotométricamente a 800 nm, dentro de los 15 min posteriores al enfriamiento de los tubos de reacción. Los resultados fueron expresados como nmol/ml.

10.3. VELOCIDAD DE EXCRECIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BILIS

Las velocidades de excreción de los diferentes componentes de la bilis fueron calculadas como el producto entre el FB y la concentración de cada uno de ellos. Los resultados fueron expresados de la manera siguiente:

Velocidad de excreción de AB: $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ rata

Velocidad de excreción de colesterol: $\text{mmol}/\text{min}/100\text{g}$ rata

Velocidad de excreción de FL: $\text{nmol}/\text{min}/100\text{g}$ rata

Velocidad de excreción de Proteínas: $\text{mg}/\text{min}/100\text{g}$ rata

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los diferentes parámetros evaluados se realizó en forma separada para los grupos de animales que recibieron AGT a las 2 dosis y CLA a las 2 dosis. Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM de seis animales por grupo. Los datos se analizaron estadísticamente mediante test de análisis de varianza de dos vías (ANOVA 2x2) utilizando los niveles de grasa dietaria y la suplementación con AGT o CLA como variables independientes. Todas las comparaciones múltiples post hoc fueron realizadas utilizando el test de Scheffé. En aquellos casos que se compararon sólo 2 grupos, los mismos fueron analizados estadísticamente por test de Student's. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas para $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS - PARTE I

EFFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS A NIVELES RECOMENDADOS O ELEVADOS DE GRASA DIETARIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL

Conforme a los objetivos planteados para evaluar los posibles efectos de la ingesta de AGT en el presente modelo experimental, se describen a continuación las experiencias realizadas considerando dos variables independientes fijadas en el protocolo:

- a) el nivel de grasa en las dietas: recomendado y elevado.
- b) presencia o no de AGT: sustitución parcial del aceite dietario con aceite rico en isómeros trans.

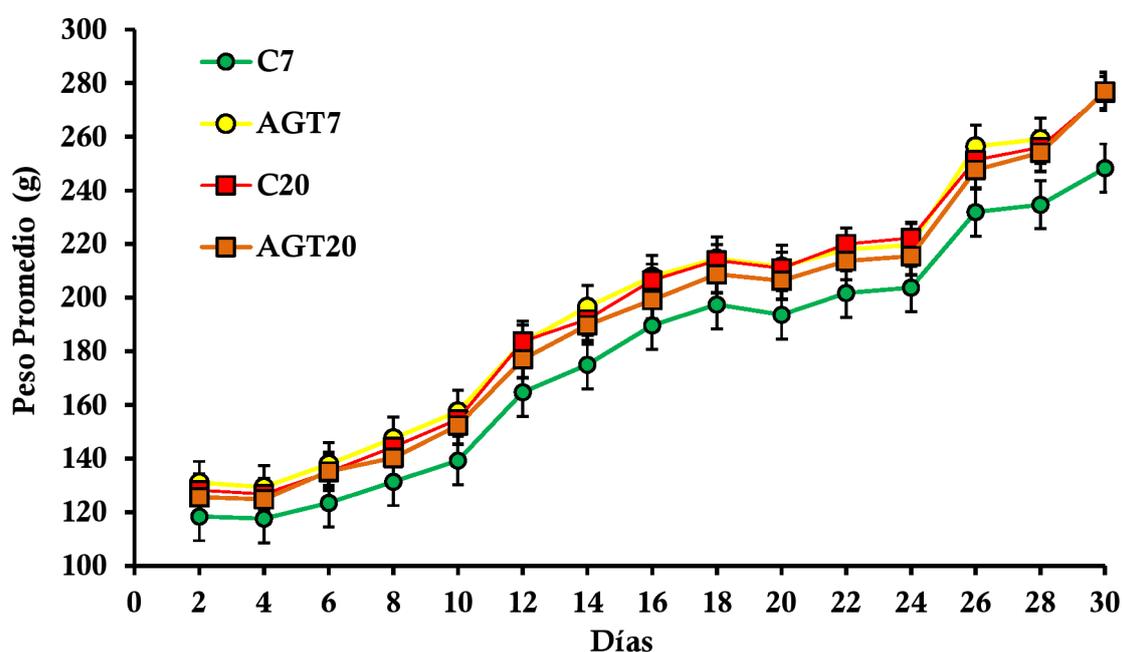
I.1. PARÁMETROS NUTRICIONALES.

I.1.1. INGESTA DIETARIA, DIGESTIBILIDAD GRASA Y GANANCIA DE PESO

Las dietas fueron bien aceptadas por los cuatro grupos experimentales con un promedio de ingesta diaria de comida (g/día) de $15,2 \pm 1,0$ para C7; $15,0 \pm 0,5$ para AGT7; $13,2 \pm 0,6$ para C20; $13,8 \pm 0,8$ para el grupo AGT20. La ingesta de dietas ricas en grasas disminuyó el consumo de alimento, sin afectar la ingesta energética (Tabla 1), mientras que la sustitución parcial con AGT no tuvo efecto sobre estos dos parámetros. La absorción aparente de grasa no mostró diferencias por la presencia de AGT a niveles recomendados de grasa, aunque sí por el nivel de grasa en la dieta en presencia de AGT.

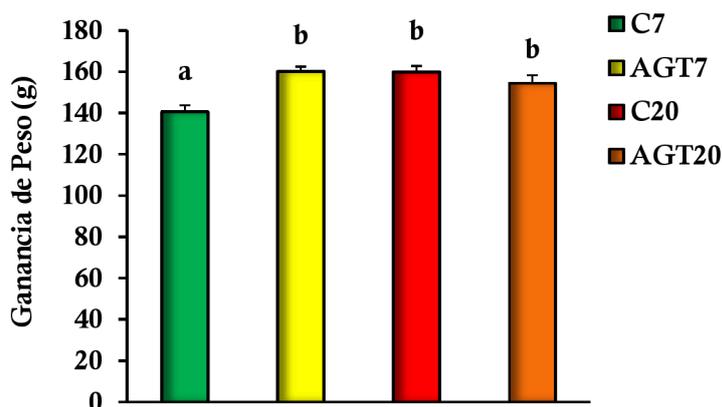
Al inicio del estudio, los pesos promedio de los animales de los cuatro grupos experimentales fueron similares; al final de la experiencia, la ganancia de peso corporal incrementó ligera, aunque significativamente, por efecto de la presencia de AGT y la cantidad de grasa de la dieta, sin un efecto aditivo de ambas variables (Figura 5 y Figura 6).

Figura 5: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la evolución del peso corporal



Valores expresados como el promedio \pm SEM (n=6). C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

No se observaron signos de daño hepático en los animales por la ingesta de las diferentes dietas, el mismo fue evaluado a través de las actividades de las enzimas ASAT, ALAT y FAL. Los resultados fueron (UI/l): ASAT, C7: $41,7 \pm 2,7$; AGT7: $41,6 \pm 2,0$; C20: $41,6 \pm 2,2$; AGT20: $48,0 \pm 2,2$. ALAT, C7: $18,4 \pm 1,1$; AGT7: $15,9 \pm 0,9$; C20: $19,0 \pm 0,9$; AGT20: $19,1 \pm 2,0$. FAL, C7: $605,4 \pm 33,3$; AGT7: $626,2 \pm 53$; C20: $732,9 \pm 34,8$; AGT20: $618,1 \pm 43,8$.

Figura 6: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la ganancia de peso

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

I.1.2. COMPOSICIÓN CORPORAL. EFICIENCIA ENERGÉTICA

Los posibles cambios en la composición corporal inducidos por las diferentes dietas se evaluaron mediante los contenidos de proteínas, grasa y agua en las carcasas correspondientes a los animales de cada grupo. La composición corporal no se modificó por la presencia de AGT en la dieta, aunque se pudo observar una tendencia hacia un mayor contenido de grasa corporal en las carcasas de animales que consumieron dietas ricas en grasa (Tabla 3).

La retención energética total corporal (RETC) se estimó a partir de la composición corporal centesimal y de la ganancia de peso al finalizar el período experimental. Como se muestra en la Tabla 3, un ligero aumento, aunque no significativo, se observó en la RETC de los animales que recibieron dieta con AGT a niveles recomendados de grasa, mientras que dicho parámetro incrementó significativamente en los animales alimentados con elevados niveles de grasa dietaria. Esto estuvo asociado a un significativo aumento en la retención energética como grasa y proteínas. Estos resultados condujeron a un incremento en la eficiencia energética (EE) de los animales que recibieron dietas ricas en grasa.

Tabla 3: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre parámetros nutricionales y composición corporal

	C7	AGT7	C20	AGT20	ANOVA
Ingesta (kJ/30 días)	7676 ± 359	7567 ± 131	7795 ± 191	7574 ± 275	NS
Absorción aparente de grasa (%)	90,2 ± 0,9 ^a	92,4 ± 1 ^{a,b}	95,5 ± 0,5 ^b	95,2 ± 0,7 ^b	G
Composición de carcasa (g/100g)					
Proteínas	18,9 ± 0,8	17,4 ± 0,7	17,8 ± 0,7	18,4 ± 0,9	NS
Grasa	12,0 ± 0,9	12,1 ± 1,3	13,0 ± 1,1	12,8 ± 0,9	NS
Agua	63,5 ± 1,0	63,4 ± 1,4	61,6 ± 1,1	62,1 ± 1,9	NS
Energía retenida en carcasa (kJ)					
Grasa	952 ± 18 ^a	1083 ± 20 ^{a,b}	1210 ± 48 ^b	1223 ± 40 ^b	G
Proteínas	672 ± 7 ^a	679 ± 12 ^a	764 ± 20 ^b	782 ± 35 ^b	G
Total	1616 ± 21 ^a	1762 ± 18 ^{a,b}	1984 ± 31 ^b	2005 ± 20 ^b	G
Eficiencia energética (%)	14,0 ± 0,3 ^a	16,0 ± 0,4 ^{a,b}	18,1 ± 0,2 ^b	19,2 ± 0,7 ^b	G,T

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p < 0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; T, p<0,05 para el efecto de la adición de AGT; GxT, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a recomendados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

I.1.3. BALANCE NITROGENADO

La ingesta de nitrógeno (N) no se modificó por presencia de AGT (Tabla 4), pero disminuyó en los grupos alimentados con dietas con elevado nivel de grasa. La menor ingesta de N fue compensada por una disminución en las excretas de N en los grupos C20 y AGT20 en orina (36% para C20 vs. C7 y 20% para AGT20 vs. AGT7) y en materia fecal (16% para C20 vs. C7 y 23% para AGT20 vs. AGT7), de manera

que no se observó un efecto diferencial sobre el BN en ninguno de los grupos experimentales.

Tabla 4: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la ingesta, excreción y balance de nitrógeno

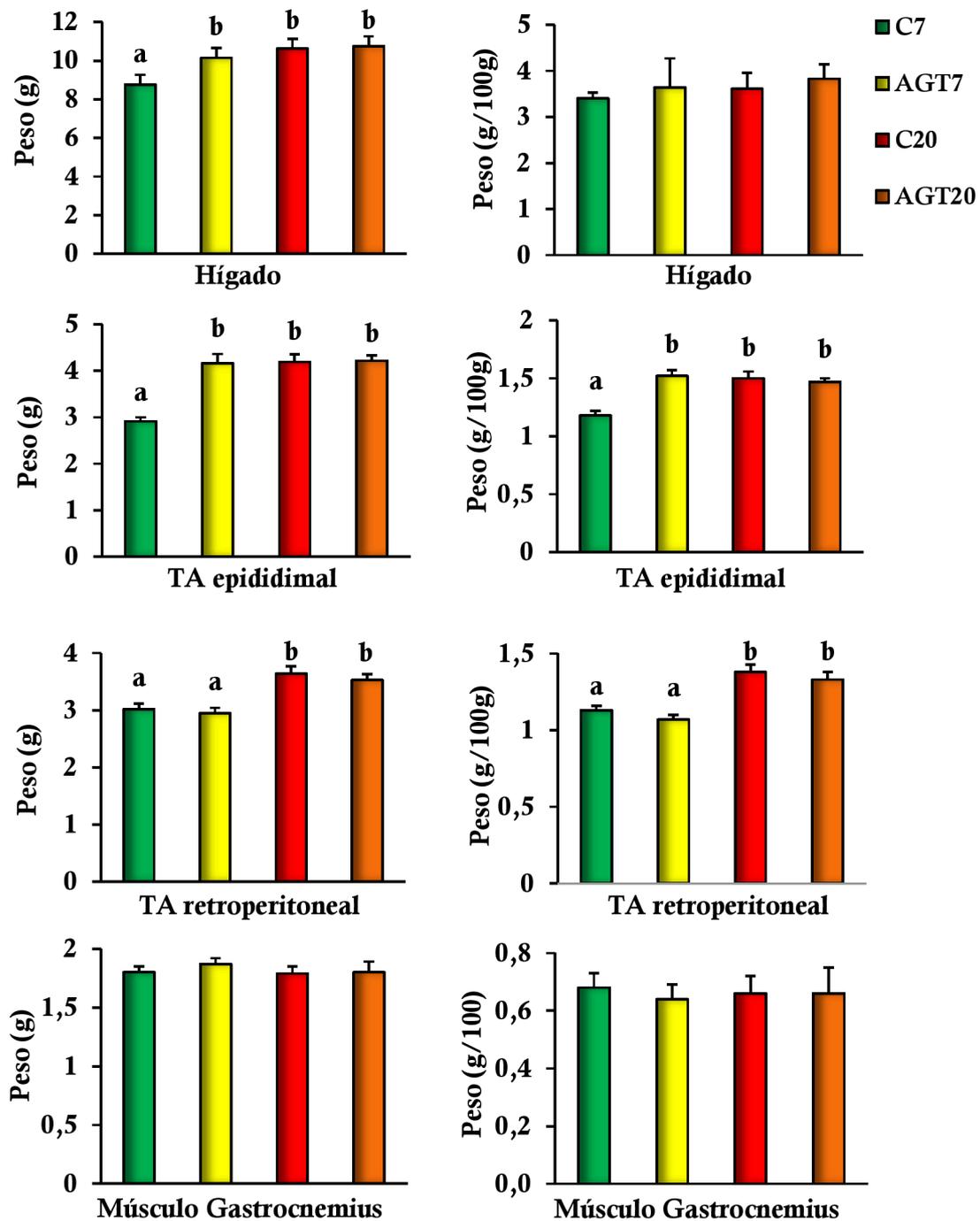
	C7	AGT7	C20	AGT20	ANOVA
N Ingerido (mg/día)	515 ± 42 ^a	509 ± 19 ^a	460 ± 21 ^b	495 ± 10 ^{a,b}	G
N Urinario (mg/día)	213 ± 29 ^a	200 ± 17 ^a	137 ± 12 ^b	160 ± 22 ^b	G
N Fecal (mg/día)	33,7 ± 3,3 ^a	37,8 ± 1,8 ^a	28,2 ± 1,6 ^b	29,3 ± 0,6 ^b	G
BN Diario(mg/día)	269 ± 21	276 ± 17	294 ± 18	305 ± 21	NS

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p < 0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; T, p<0,05 para el efecto de la adición de AGT; GxT, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT. N: nitrógeno, BN: balance nitrogenado.

I.1.4. PESOS DE ÓRGANOS Y TEJIDOS

El peso absoluto del hígado se incrementó significativamente por la presencia de AGT y el nivel de grasa de la dieta, aunque estas variables no mostraron un efecto aditivo. Cuando los resultados fueron expresados en forma relativa al peso corporal (g hígado/100g de peso corporal) no se observaron diferencias en ninguno de los grupos experimentales. El peso del tejido adiposo epididimal (TAE) incrementó, en forma absoluta y relativa al peso del animal, por efecto de los AGT a nivel recomendado de grasa y del nivel elevado de grasa dietaria; mientras que el peso del tejido adiposo retroperitoneal (TARP) aumentó sólo en los animales alimentados con dietas ricas en grasa, también en forma absoluta y relativa al peso corporal. (Figura 7).

Figura 7: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el peso de diferentes tejidos



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

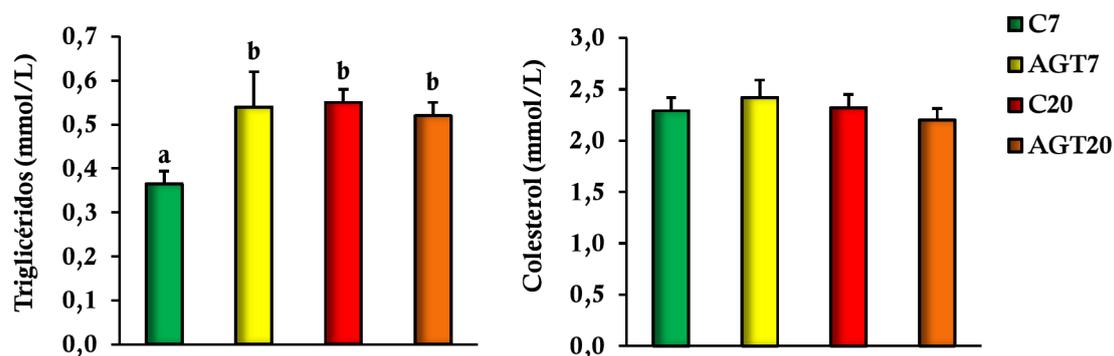
I.2. PARÁMETROS ASOCIADOS AL METABOLISMO LÍPIDICO

I.2.1. NIVELES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS Y TISULARES

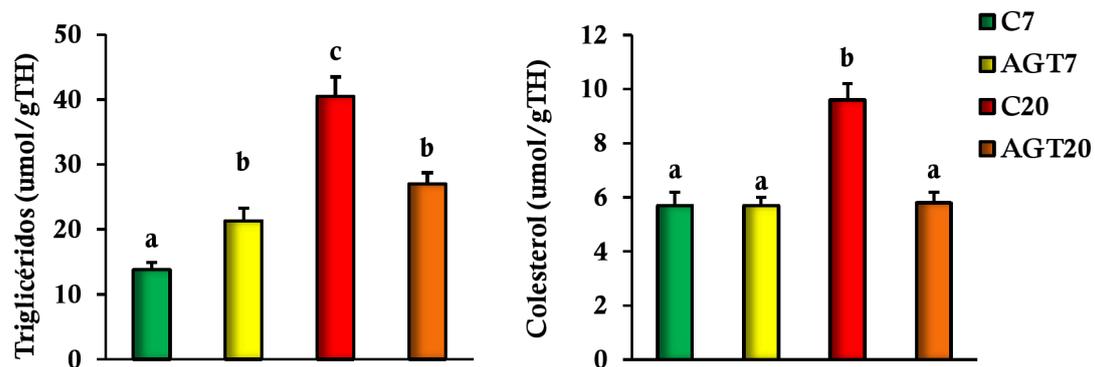
La ingesta de dietas AGT7, C20 y AGT20 produjeron un aumento en los TAG plasmáticos (Figura 8) aunque no se observó un efecto aditivo por la presencia de AGT a altos niveles de grasa. Los niveles de colesterol circulantes no fueron modificados por la sustitución parcial con AGT, ni con la cantidad de grasa dietaria.

Comparado con C7, el contenido hepático de TAG aumentó significativamente en los animales que consumieron AGT7, C20 y AGT20. Los animales alimentados con dieta C20 mostraron los mayores niveles de TAG en hígado y la sustitución parcial con AGT a elevados niveles de grasa atenuó el incremento observado en C20. Los niveles de colesterol en hígado de animales alimentados con dieta C20 mostraron un aumento del 67% respecto a los grupos que consumieron niveles recomendados de grasa. Similar a lo observado con los TAG, la sustitución parcial con AGT a elevados niveles de grasa atenuó el incremento de colesterol hepático observado en el grupo C20 (Figura 9).

Figura 8: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre los niveles de lípidos plasmáticos

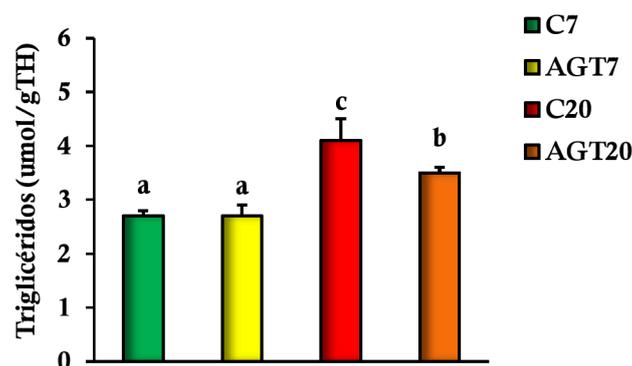


Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

Figura 9: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el contenido de lípidos hepáticos

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

En músculo gastrocnemio, el consumo de dietas ricas en grasa condujo a una marcada acumulación de TAG, observándose una atenuación de este aumento en el grupo alimentado con la dieta AGT20 (Figura 10).

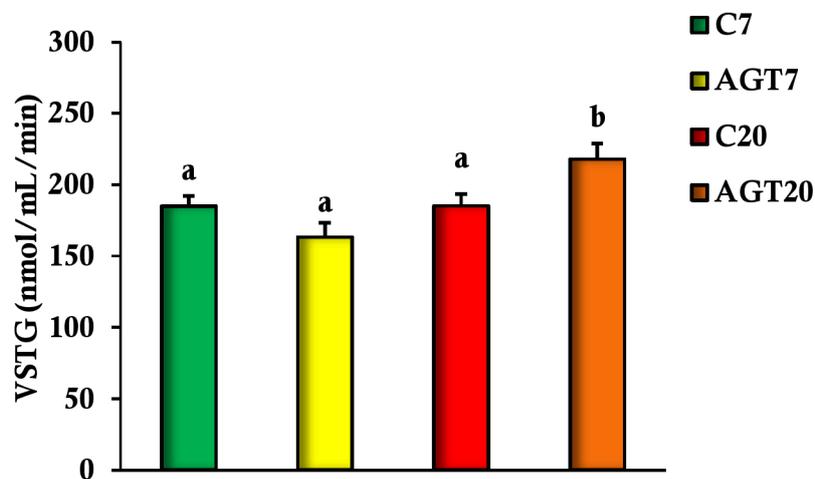
Figura 10: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el contenido de triglicéridos en músculo gastrocnemio

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

I.2.2. SECRECIÓN HEPÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS PRE- β - LIPOPROTEÍNAS

La velocidad de secreción de TAG (VSTAG) no se modificó por ingesta de dietas AGT7 y C20; mientras que AGT20 aumentó significativamente este parámetro (Figura 11).

Figura 11: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la secreción hepática de triacilglícéridos pre- β - lipoproteínas



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT. VSTAG: velocidad de secreción de triacilglícéridos-pre- β -lipoproteína.

I.2.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LIPOPROTEÍNA LIPASA

I.2.3.1. Actividad Lipoproteína Lipasa en tejido adiposo epididimal

La presencia de AGT y nivel de grasa dietaria aumentaron significativamente la actividad de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) en el tejido adiposo epididimal; más aún, se observó un efecto aditivo por la presencia de dichos isómeros y la alta cantidad de grasa. La actividad LPL en este tejido mostró el mismo comportamiento ya sea expresado por gramo de tejido o referida al tejido total (Tabla 5).

I.2.3.2. Actividad LPL en músculo gastrocnemio

La sustitución parcial con AGT y el nivel de grasa dietaria redujeron la actividad LPL del músculo gastrocnemius. Este efecto fue mantenido cuando ambas variables estuvieron presentes, no obstante el efecto no fue aditivo (Tabla 5).

Tabla 5: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo y tejido adiposo epididimal

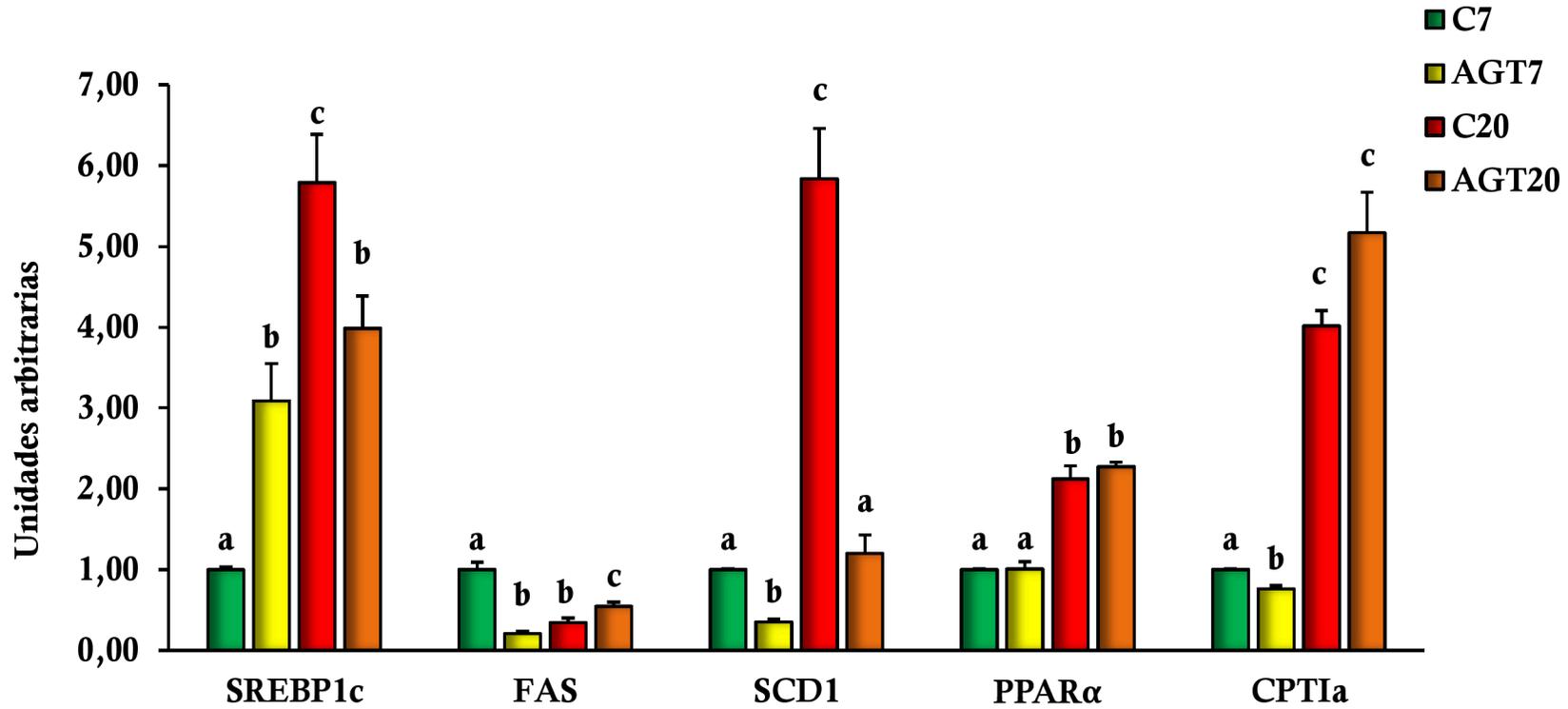
	C7	AGT7	C20	AGT20	ANOVA
Actividad tisular de LPL					
Músculo gastrocnemius (nmol F/min/g TH)	3,33±0,07 ^a	2,73±0,09 ^b	2,86±0,08 ^b	3,00±0,02 ^b	G,T
Tejido adiposo epididimal (nmol F/min/g TH)	0,37±0,06 ^a	0,58±0,06 ^b	0,58±0,10 ^b	0,75±0,03 ^c	G,T,GxT
Tejido adiposo epididimal (nmol F/min/g Tejido total)	1,08±0,07 ^a	2,41±0,09 ^b	2,40±0,17 ^b	3,15±0,04 ^c	G,T,GxT

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p < 0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; T, p<0,05 para el efecto de la adición de AGT; GxT, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT. LPL: lipoproteína lipasa.

I.3. EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE GENES LIPOGÉNICOS Y OXIDATIVOS EN HÍGADO

Para complementar el estudio tendiente a dilucidar los mecanismos implicados en la regulación de la lipogénesis y oxidación a nivel de tejido hepático, se evaluaron las expresiones de algunas enzimas y factores de transcripción claves relacionados con la lipogénesis: sintasa de ácidos grasos (FAS), $\Delta 9$ -desaturasa (SCD1) y la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c). Asimismo, asociados a la oxidación de AG: carnitina palmitoiltransferasa Ia (CPT-Ia) y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR- α). Los resultados obtenidos pueden observarse en la Figura 12.

Figura 12: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la expresión de enzimas y factores de transcripción relacionados con el metabolismo lipídico

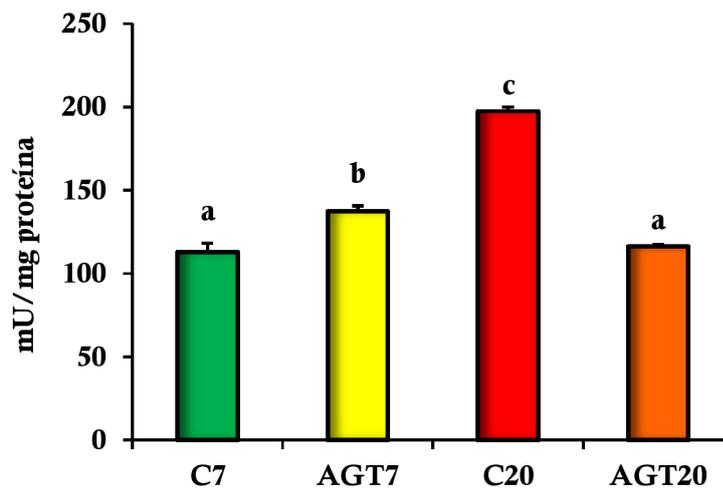


Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

I.4. ACTIVIDAD DE ENZIMAS RELACIONADAS CON LA LIPOGÉNESIS.

La actividad de la enzima relacionada a la síntesis de AG acetil-CoA carboxilasa (ACC) fue determinada en hígado. La misma se incrementó por la presencia de AGT a niveles recomendados de grasa dietaria y por el elevado nivel de grasa, mientras que este aumento de la actividad ACC fue atenuado por la presencia de AGT en el grupo AGT20 (Figura 13).

Figura 13: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

I.5. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADO

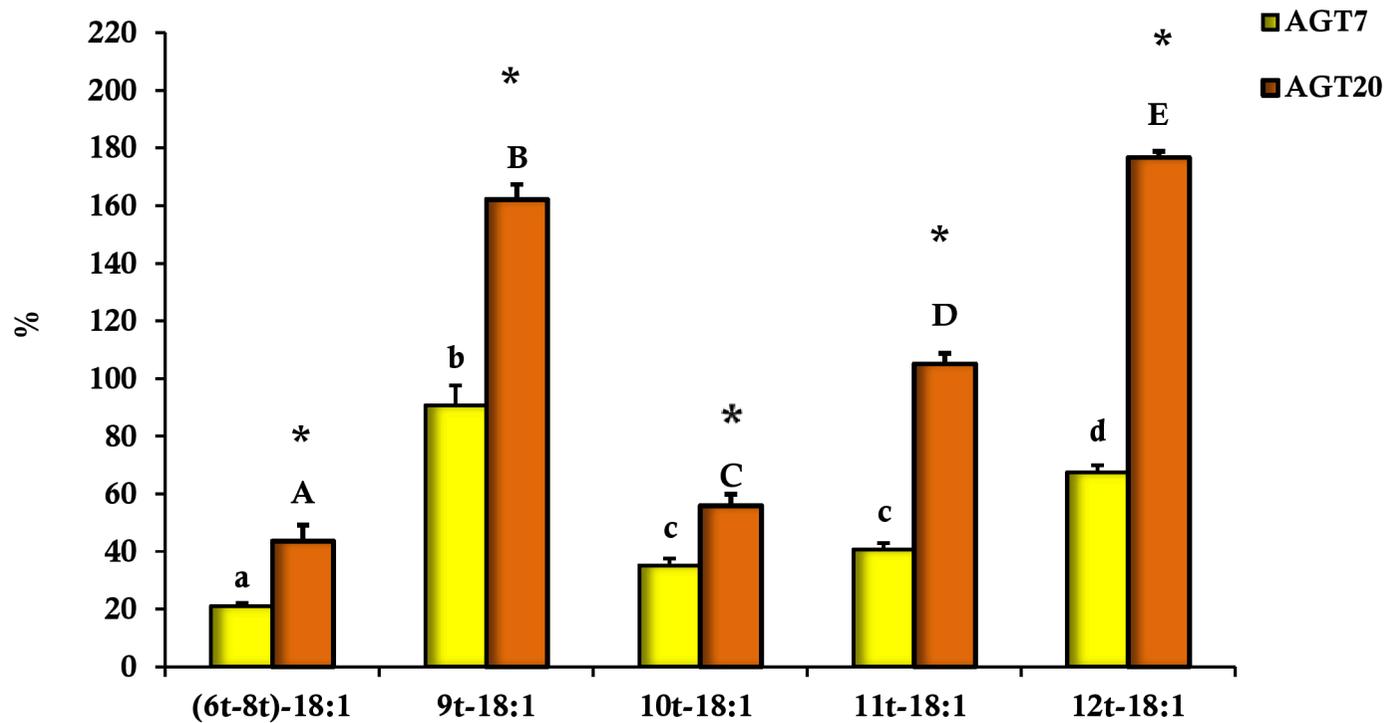
Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), parámetro indicativo de la peroxidación lipídica, disminuyó significativamente por la presencia de AGT a ambos niveles de grasa dietarias. Las defensas antioxidantes enzimáticas, estimada a través de la actividad de la enzima catalasa aumentaron en presencia de AGT a ambos niveles de grasa dietaria; mientras que los niveles de GSH, defensa antioxidante no enzimática, aumentaron significativamente por la presencia de AGT y el nivel de grasa (Tabla 6).

Tabla 6: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre parámetros relacionados al estrés oxidativo en hígado

	C7	AGT7	C20	AGT20	ANOVA
TBARS (nmol MDA/ gTH)					
	115,3 ± 1,7 ^a	89,2 ± 1,1 ^b	108,3 ± 2,6 ^a	86,4 ± 1,4 ^b	T
Catalasa (U/mg Proteína)					
	117,5 ± 2,4 ^a	138,5 ± 2,6 ^b	108,7 ± 1,5 ^a	161,9 ± 1,5 ^c	T,GxT
GSH (µmol/gTH)					
	1,86 ± 0,01 ^a	2,50 ± 0,05 ^b	2,46 ± 0,06 ^b	2,35 ± 0,06 ^b	G,T

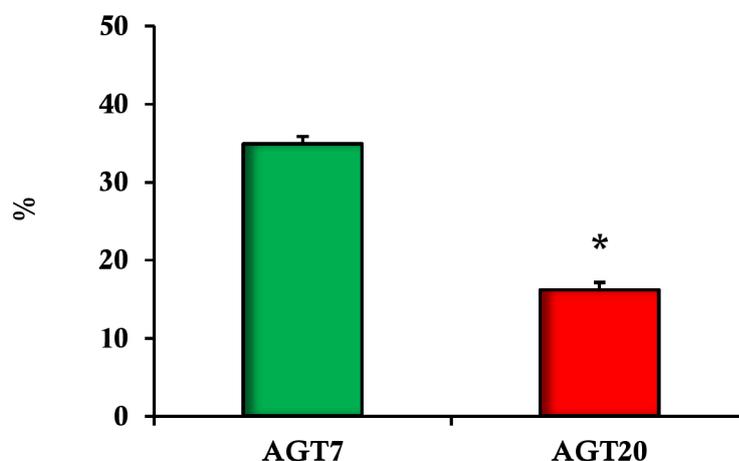
Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p < 0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; T, p<0,05 para el efecto de la adición de AGT; GxT, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados

Figura 16: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la retención de trans-18:1 en hígado



Resultados expresados como promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico: ANOVA One-way seguido del test de Scheffé y test de Student. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras diferentes en mayúsculas y minúsculas indican diferencia significativa entre los AGT dentro del mismo grupo dietario; (*) indica diferencia significativa por t-test de cada AGT entre los distintos grupos dietarios. AGT7, dieta de niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; AGT20, dieta de elevado nivel de grasa sustituida parcialmente con AGT.

Figura 17: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la bioconversión de ácido trans vaccénico a ácido ruménico en hígado



Resultados expresados como promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico: Test de Student. Nivel de significancia $p < 0,05$. El símbolo (*) indica diferencia significativa en la bioconversión VA a RA entre los distintos grupos suplementados con AGT. AGT7, dieta de niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

Los cambios observados en los niveles de PUFA hepáticos se relacionaron a la presencia de AGT y a la cantidad de grasa suministrada en la dieta. Una disminución de LA se observó en los animales que consumieron dieta AGT7, mientras que en el grupo C20 este AG aumentó significativamente. El GLA disminuyó por la presencia de AGT y el nivel de grasa, observándose un efecto aditivo de ambas variables. El ácido dihomo γ -linolénico (DGLA, su sigla en inglés dihomo-gamma-linolenic acid) disminuyó por la presencia de AGT a ambos niveles de grasa respecto de sus controles e incrementó por el nivel de grasa dietaria; mientras que el contenido de AA, disminuyó en AGT7 y C20 vs. C7 y alcanzó niveles similares a C7 en el grupo AGT20.

Tabla 10: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la composición porcentual de ácidos grasos de lípidos hepáticos

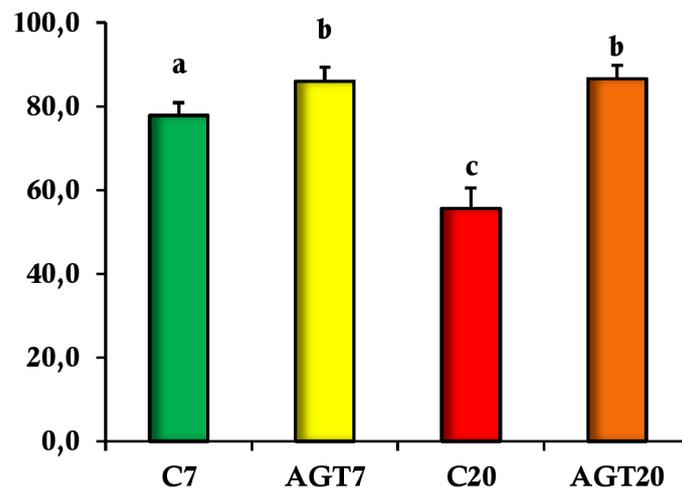
Ácidos grasos	C7	AGT7	C20	AGT20	ANOVA
16:0	19,99±0,15 ^a	21,61±1,08 ^a	17,0±0,50 ^b	15,64±0,44 ^b	G
18:0	11,85±0,16 ^a	10,87±0,42 ^a	10,63±0,35 ^a	13,29±0,48 ^b	G,T
9c-16:1	1,22±0,31 ^a	1,73±0,03 ^b	0,30±0,07 ^c	0,12±0,01 ^c	G,T,GxT
OA	13,00±0,29 ^a	16,16±0,14 ^b	16,91±1,45 ^b	11,95±0,79 ^a	NS
11c-18:1	2,27±0,17 ^a	1,98±0,84 ^a	1,42±0,07 ^b	1,41±0,07 ^b	G
(t6-t8)-18:1	0,00±0,00 ^a	0,17±0,01 ^b	0,00±0,00 ^a	0,35±0,05 ^c	G,T,GxT
EA	0,00±0,00 ^a	0,94±0,08 ^b	0,00±0,00 ^a	1,69±0,07 ^c	G,T,GxT
10t-18:1	0,00±0,00 ^a	0,53±0,11 ^b	0,00±0,00 ^a	0,85±0,06 ^c	G,T,GxT
VA	0,00±0,00 ^a	0,56±0,08 ^b	0,00±0,00 ^a	1,45±0,07 ^c	G,T,GxT
12t-18:1	0,00±0,00 ^a	0,72±0,06 ^b	0,00±0,00 ^a	1,89±0,02 ^c	G,T,GxT
11c-20:1	0,16±0,01 ^a	0,00±0,00 ^b	0,28±0,02 ^c	0,00±0,00 ^b	G,T,GxT
LA	24,38±1,31 ^a	19,32±1,36 ^b	29,64±1,32 ^c	22,15±0,81 ^{a,b}	G,T
RA	0,00±0,00 ^a	0,30±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	0,28±0,04 ^b	T, GxT
GLA	0,84±0,04 ^a	0,53±0,04 ^b	0,34±0,01 ^c	0,21±0,01 ^d	G,T,GxT
ALA	0,29±0,01 ^a	0,31±0,01 ^a	0,34±0,01 ^a	0,25±0,01 ^b	T
11c,14c-20:2	0,32±0,02 ^a	0,08±0,01 ^b	0,58±0,05 ^c	0,19±0,01 ^d	G,T
DGLA	0,31±0,02 ^a	0,21±0,01 ^b	0,52±0,04 ^c	0,30±0,01 ^a	G,T
AA	18,97±0,12 ^a	16,45±0,39 ^b	16,26±0,91 ^b	19,19±0,39 ^a	NS
EPA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,52±0,03 ^b	G,T
7,c10,13c,16c -22:4	1,15±0,10 ^a	0,47±0,03 ^b	1,20±0,10 ^a	0,52±0,03 ^b	T
4c,7c,10c,13c,16c -22:5	2,12±0,04 ^a	0,88±0,04 ^b	0,98±0,04 ^b	0,67±0,04 ^c	G,T,GxT
7c,10c,13c,16c,19c-22:5	0,36±0,01 ^a	0,47±0,02 ^b	0,45±0,02 ^b	0,52±0,02 ^b	G,T
DHA	1,82±0,06 ^a	1,42±0,07 ^a	1,82±0,10 ^a	2,53±0,08 ^b	G,T
Σ t-18:2 (no conjugados)	0,00±0,00 ^a	0,45±0,07 ^b	0,00±0,00 ^a	0,39±0,04 ^b	T
Σ AGT	0,00±0,00 ^a	3,78±0,49 ^b	0,00±0,00 ^a	6,90±0,14 ^c	G,T,GxT
Σ SFA	31,85±0,17 ^a	32,48±0,61 ^a	27,63±0,32 ^b	28,92±0,30 ^b	G
Σ MUFA	16,64±0,31 ^a	19,87±0,20 ^b	18,91±1,54 ^b	13,49±0,64 ^c	G,T,GxT
Σ PUFA	50,57±0,25 ^{a,b}	40,37±1,08 ^b	52,52±1,14 ^a	46,32±0,45 ^c	G,T
Menores-NI	1,54±0,44	3,59±0,58	1,06±0,26	2,65±0,95	

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. NS, $p > 0,05$, no significativo; G, $p < 0,05$ para el efecto de la grasa dietaria; T, $p < 0,05$ para el efecto de la adición de AGT; GxT, $p < 0,05$ para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT. NI: ácidos grasos no identificados. ΣAGT: sumatoria de ácidos grasos trans. ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados. ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis. ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis.

Con respecto a los niveles de PUFA de la familia n-3, el ALA sólo disminuyó en el grupo AGT20; mientras que el docosapentanoico se incrementó por la presencia de AGT y el nivel de grasa dietaria. El DHA en hígado aumentó significativamente por la presencia de AGT a altos niveles de grasa dietaria.

La biosíntesis de LC-PUFA de la serie n-6 expresada por la relación porcentual producto/sustrato: AA/LA (Figura 18) mostró una dependencia del nivel de grasa dietaria evidenciando una inhibición por la cantidad de grasa suministrada que no se observó en el grupo AGT20.

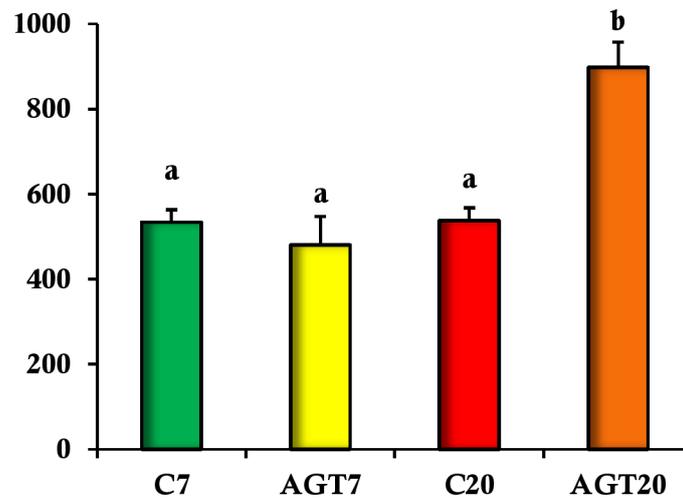
Figura 18: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la relación porcentual ácido araquidónico/ ácido linoleico en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a recomendados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

La biosíntesis de LC- PUFA de la serie n-3, representada por la relación de los AG: DHA/ALA (Figura 19), mostró un aumento en los animales alimentados con dieta rica en grasa sustituida parcialmente con AGT.

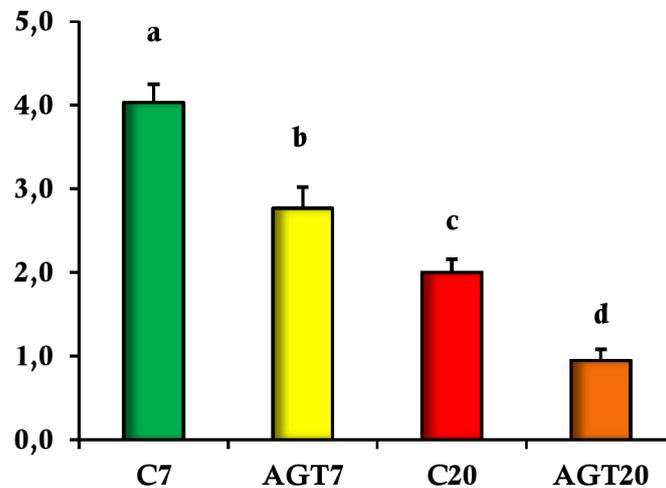
Figura 19: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la relación porcentual ácido docosahexanoico/ ácido α -linolénico en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT

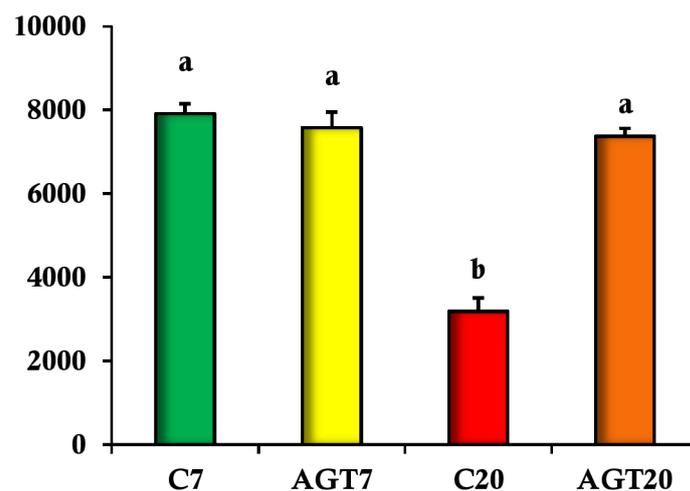
El índice de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, clave en la síntesis de AA, fue estimado por la relación GLA/LA (Figura 20). La presencia de AGT y elevados niveles de grasa dietaria redujeron dicho índice. Otra enzima importante en la síntesis de LC-PUFA de cadena larga es la $\Delta 5$ -desaturasa, cuyo índice fue calculado por la relación AA/DGLA (Figura 21) la cual mostró modificaciones por el nivel de grasa dietaria, pero no por la sustitución parcial con AGT.

Figura 20: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa expresado por la relación porcentual ácido γ -linolénico/ ácido linoleico en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

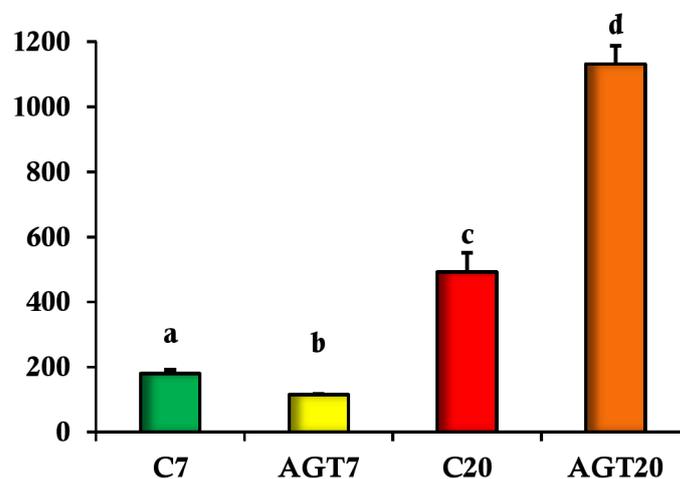
Figura 21: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa expresado por la relación porcentual ácido araquidónico/ ácido dihomo γ -linolénico en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

Los niveles de ácido palmitoleico y cis-vaccénico, intermediarios claves en la síntesis de novo de AG, fueron afectados por el nivel de grasa y la presencia de AGT. La relación entre ambos MUFA, índice mediante del cual se puede estimar el flujo de sustratos a través la enzima elongasa de la serie n-7, incrementó en los grupos que recibieron dietas ricas en grasa y además se observó un efecto aditivo por la presencia de AGT (Figura 22).

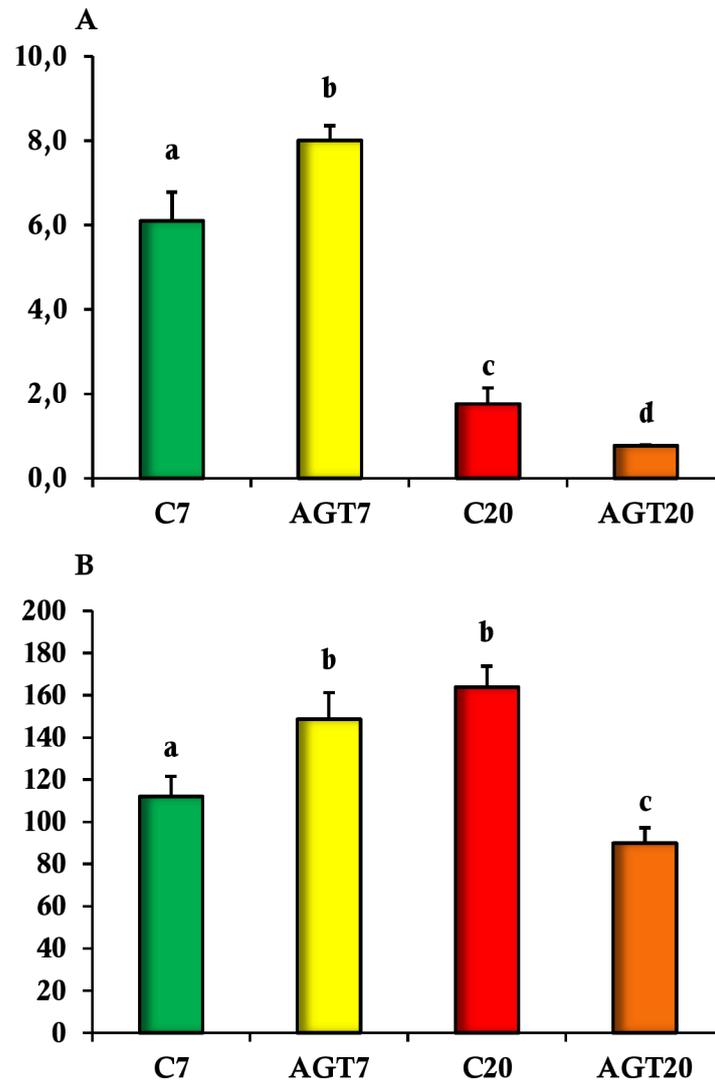
Figura 22: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima elongasa expresado por la relación porcentual: ácido cis-vaccénico/ ácido palmitoleico en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

La relación de MUFA/SFA en los tejidos puede ser modificada por el tipo de AG de la dieta y por el grado de desaturación que sufren los SFA. Las relaciones del ácido palmitoleico/ ácido palmítico (Figura 23-A) y ácido oleico/ esteárico (Figura 23-B) dependen de la contribución de estos AG de la dieta y de la acción de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa (SCD-1), las cuales fueron modificadas por la presencia de AGT y el nivel de grasa dietaria.

Figura 23: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima Δ -9 desaturasa expresado por la relación porcentual ácido palmitoleico/ ácido palmítico (A) y ácido oleico/ácido esteárico (B) en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

La presencia de AGT aumentó el índice 16:1/16:0 y 18:1/18:0 a niveles normales de grasa dietaria, mientras que el elevado nivel de grasa dietaria redujo el índice 16:1/16:0; mientras que la relación 18:1/18:0 sólo disminuyó en AGT20 vs. C20.

I.7.3. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS SECRETADOS POR EL HÍGADO

En las lipoproteínas secretadas, en concordancia con lo observado en los sueros analizados en condiciones de ayuno, se observó la presencia de AG trans-18:1 en el suero de los animales alimentados con ambos niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT. El contenido de dichos AGT fue significativamente más elevado en el grupo alimentado AGT20 vs AGT7. Además, pudo detectarse RA y su nivel se observó elevado más de 3 veces en el grupo que recibió AGT20 vs. AGT7 (Tabla 11). La retención de AG trans-18:1 totales fue $50,0 \pm 2,1$ y $97,8 \pm 2,3$ para los grupos AGT7 y AGT20, respectivamente. Mientras que el orden de retención de isómeros individuales fue: $9t-18:1 > 11t-18:1 > 12t-18:1 > 10t-18:1 \approx (6-8)t-18:1$ para AGT7, y $9t-18:1 > 12t-18:1 > 10t-18:1 > 11t-18:1 \approx (6-8)t-18:1$ para el grupo AGT20 (Figura 24).

La composición de AG en suero de animales ayunados post- inyección de Triton WR 1339, refleja en gran medida la composición de AG las pre- β lipoproteínas VLDL secretadas por el hígado (Tabla 11).

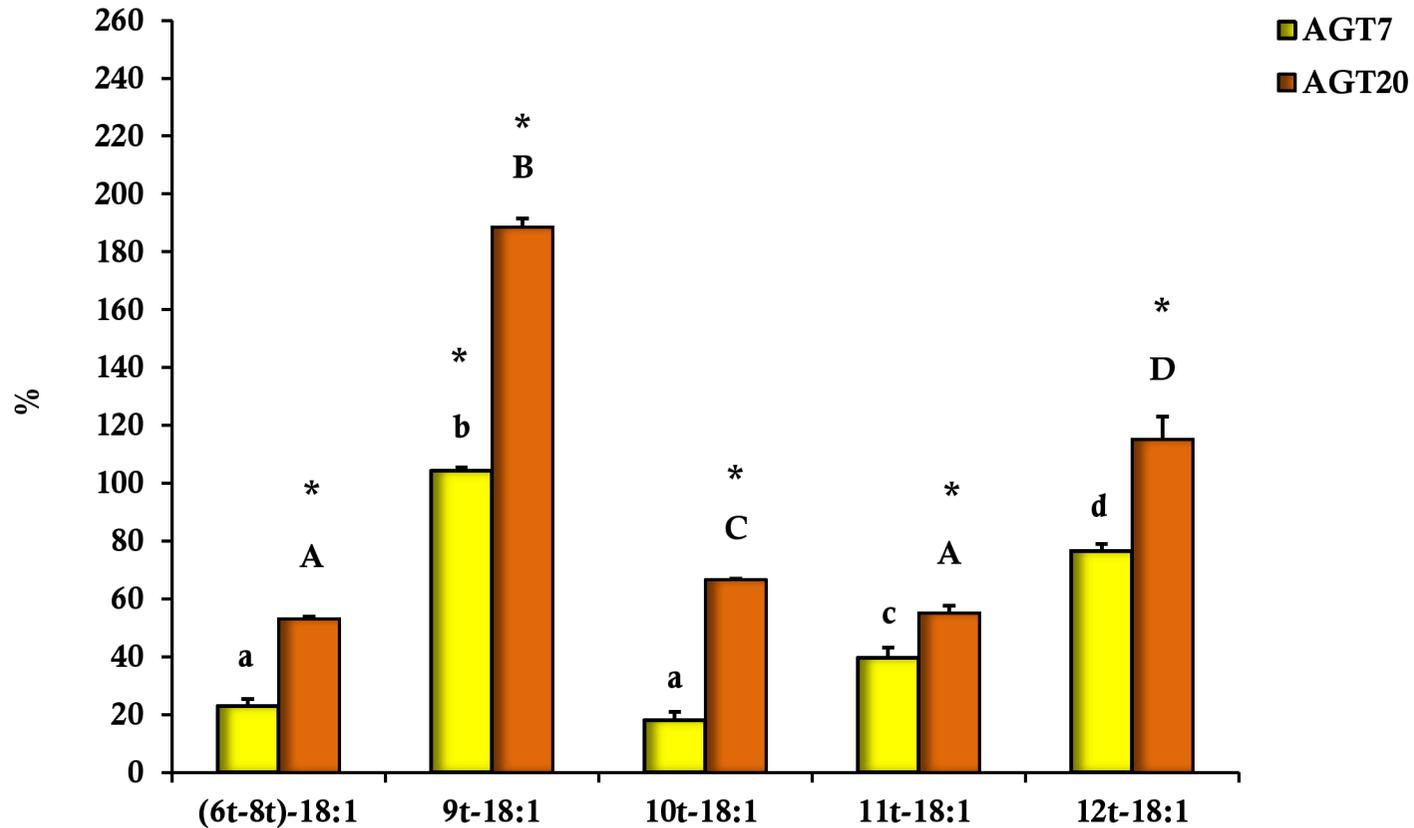
Los SFA: palmítico y esteárico, fueron modificados significativamente por la presencia de AGT a ambos niveles de grasa dietaria, pero en sentido opuesto; el ácido palmítico aumentó por la presencia de AGT, mientras que el ácido esteárico disminuyó. En la sumatoria de SFA totales, éstos se observaron ligeramente aumentados por la sustitución parcial con AGT a altos niveles de grasa.

Los niveles de ácido palmitoleico en las lipoproteínas secretadas por el hígado, fueron afectados por el contenido de grasa de la dieta y por la sustitución parcial con AGT a alto nivel de grasa. Mientras que el grupo C20 disminuyó significativamente el contenido de este AG, sorprendentemente, en AGT20 el mismo incrementó. Similar comportamiento se observó con el ácido cis-vaccénico en el grupo AGT20. Notoriamente, el ácido oleico no fue afectado por el nivel de grasa, aunque sí aumentó significativamente por la presencia de AGT a ambos niveles, observándose un efecto aditivo por el nivel de grasa y los AGT en el grupo AGT20. El resultado en el contenido de MUFA totales fue un incremento significativo por la presencia de

AGT a ambos niveles de grasa y un efecto exacerbado a elevado nivel de grasa y en presencia de AGT.

Los niveles de LA fueron incrementados significativamente por el nivel de grasa dietaria en ausencia de AGT; mientras que la presencia de AGT disminuyó significativamente los niveles de dicho AG, mostrando un efecto muy marcado en los sueros de animales que recibieron dieta AGT20. El GLA se observó disminuido en los sueros de animales que recibieron dieta AGT7, C20 y AGT20, el AA mostró el mismo comportamiento, observándose en ambos AG un efecto aditivo del nivel de grasa y la presencia de AGT. Los PUFA n-3: ALA y ácido docosapentanoico disminuyeron significativamente por efecto de la dieta AGT20 en los lípidos de las VLDL secretadas, no obstante ello, no se modificaron los niveles de DHA. Así, los niveles totales de PUFA disminuyeron significativamente por la presencia de AGT a ambos niveles de grasa, y en mayor medida por efecto del nivel de grasa y la presencia de AGT.

Figura 24: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la retención de trans-18:1 secretados por el hígado



Resultados expresados como promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico: ANOVA One-way seguido del test de Scheffé y test de Student. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras diferentes en mayúsculas y minúsculas indican diferencia significativa entre los AGT dentro del mismo grupo dietario; (*) indica diferencia significativa por t-test de cada AGT entre los distintos grupos dietarios. AGT7, dieta de niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; AGT20, dieta de elevado nivel de grasa sustituida parcialmente con AGT.

Tabla 11: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la composición porcentual de ácidos grasos secretados por el hígado

Ácidos grasos	C7	AGT7	C20	AGT20	ANOVA
16:0	21,53±0,81 ^a	23,93±0,49 ^b	21,41±0,54 ^a	24,76±0,06 ^b	T
18:0	15,10±0,59 ^a	12,28±0,17 ^b	15,20±0,69 ^a	13,71±0,10 ^{a,b}	T
9c-16:1	1,15±0,10 ^a	1,73±0,04 ^b	0,42±0,06 ^c	4,50±0,13 ^d	G,T,GxT
OA	10,19±0,64 ^a	12,77±0,08 ^b	10,18±0,47 ^a	18,82±0,30 ^c	G,T,GxT
11c-18:1	1,75±0,05 ^a	1,78±0,07 ^a	1,23±0,05 ^b	2,28±0,04 ^c	T
(t6-t8)-18:1	0,00±0,00 ^a	0,19±0,02 ^b	0,00±0,00 ^a	0,43±0,01 ^c	G,T,GxT
EA	0,00±0,00 ^a	1,08±0,01 ^b	0,00±0,00 ^a	1,96±0,03 ^c	G,T,GxT
10t-18:1	0,00±0,00 ^a	0,27±0,05 ^b	0,00±0,00 ^a	1,01±0,01 ^c	G,T,GxT
VA	0,00±0,00 ^a	0,55±0,04 ^b	0,00±0,00 ^a	0,76±0,07 ^c	G,T,GxT
12t-18:1	0,00±0,00 ^a	0,82±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	1,23±0,08 ^c	G,T,GxT
LA	21,53±0,81 ^a	18,97±0,36 ^b	25,93±0,75 ^c	8,56±0,11 ^d	G,T,GxT
RA	0,00±0,00 ^a	0,20±0,02 ^b	0,00±0,00 ^a	0,69±0,01 ^c	G,T,GxT
GLA	0,62±0,06 ^a	0,52±0,04 ^b	0,54±0,01 ^b	0,17±0,02 ^c	G,T,GxT
ALA	0,58±0,03 ^a	0,52±0,03 ^b	0,56±0,06 ^a	0,47±0,01 ^c	G,T,GxT
11c,14c-20:2	0,14±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b	0,37±0,04 ^c	0,00±0,00 ^b	G,T,GxT
DGLA	0,20±0,01 ^a	0,21±0,02 ^a	0,14±0,03 ^b	0,22±0,02 ^a	G,T
AA	21,69±0,44 ^a	18,04±0,71 ^b	18,84±0,26 ^b	12,64±0,45 ^c	G,T,GxT
7c,10c,13c,16c-22:4	0,69±0,06 ^a	0,58±0,09 ^b	0,64±0,06 ^a	0,09±0,01 ^c	G,T,GxT
4c,7c,10c,13c,16c-22:5	1,00±0,07 ^a	1,11±0,06 ^a	0,86±0,03 ^b	0,34±0,01 ^c	G,T,GxT
7c,10c,13c,16c,19c-22:5	0,20±0,07 ^a	0,23±0,02 ^a	0,19±0,02 ^a	0,05±0,01 ^b	G,T,GxT
DHA	1,68±0,16	1,58±0,13	1,39±0,14	1,61±0,18	NS
Σ t-18:2 (no conjugados)	0,00±0,00 ^a	0,23±0,02 ^b	0,00±0,00 ^a	1,00±0,05 ^c	G,T,GxT
Σ AGT	0,00±0,00 ^a	3,07±0,09 ^b	0,00±0,00 ^a	7,10±0,07 ^c	G,T,GxT
Σ SFA	36,62±0,82 ^a	36,21±0,56 ^a	36,61±0,85 ^a	38,47±0,16 ^b	G,T
Σ MUFA	13,09±0,85 ^a	16,28±0,07 ^b	11,83±0,66 ^c	25,60±0,39 ^d	G,T,GxT
Σ PUFA	48,64±0,80 ^a	41,56±0,87 ^b	48,78±0,33 ^a	23,84±0,49 ^c	G,T,GxT
Menores-NI	1,65±0,27	2,89±0,43	2,77±0,82	5,00±0,02	

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. NS, $p > 0,05$, no significativo; G, $p < 0,05$ para el efecto de la grasa dietaria; T, $p < 0,05$ para el efecto de la adición de AGT; GxT, $p < 0,05$ para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT, C20, dieta control a elevados niveles de en grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT. NI: ácidos grasos no identificados. ΣAGT: sumatoria de ácidos grasos trans. ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados. ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis. ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis.

I.7.4. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS BILIARES

De manera llamativa, los AGT fueron incorporados en los AG de bilis, e igualmente que en hígado, esto estuvo relacionado con la cantidad ofrecida en la dieta, es decir a mayor ingesta, mayor cantidad de isómeros. El isómero RA producto de la bioconversión a partir del VA no fue detectado en bilis (Tabla 12).

Los SFA mostraron una dependencia del nivel de grasa y de la presencia de AGT. Así, se observó una disminución significativa de los SFA en bilis de ratas que recibieron dietas C20; aunque, a diferencia del hígado, la presencia de AGT disminuyó significativamente el contenido de SFA en bilis tanto en los animales alimentados con niveles recomendados de grasa, así como también en los alimentados con dietas ricas en grasa. En los animales que recibieron la dieta AGT20, se observó un efecto aditivo de las dos variables. Las variaciones mencionadas se correlacionaron con la disminución de ácido palmítico, sin cambio en el contenido de ácido esteárico.

Los MUFA en bilis mantuvieron relación con lo observado en hígado, mostrando dependencia de la presencia de AGT en la dieta y del nivel de grasa; así, el ácido palmitoleico disminuyó significativamente en bilis de animales alimentados con dietas rica en grasa, tanto en presencia, como en ausencia de AGT, mientras que el contenido de ácido oleico aumentó por la presencia de AGT a ambos niveles de grasa. El contenido de ácido cis-vaccénico disminuyó en los animales que consumieron dieta rica en grasa. Las modificaciones observadas en los MUFA totales de bilis mostraron una dependencia tanto de la presencia de AGT como del nivel de grasa dietaria.

Los PUFA totales en bilis fueron afectados por la presencia de AGT y el nivel de grasa. Si bien el contenido de LA no se modificó por los tratamientos dietarios, los niveles de AA en la bilis incrementaron tanto por la presencia de AGT, como por los altos niveles de grasa. En el caso de los PUFA de la familia n-3, solo fue detectado el DHA en bilis, y dicho AG no mostró cambios por los tratamientos dietarios.

Tabla 12: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la composición porcentual de ácidos grasos de los lípidos biliares

Ácidos grasos	C7	AGT7	C20	AGT20	ANOVA
16:0	45,9±0,44 ^a	40,39±1,49 ^b	38,66±0,36 ^b	33,19±0,38 ^c	G,T,GxT
18:0	6,68±0,34	6,10±0,30	6,88±0,21	6,44±0,06	NS
9c-16:1	1,04±0,13 ^a	1,40±0,07 ^b	0,47±0,01 ^c	0,41±0,02 ^c	G
OA	4,65±0,20 ^a	5,90±0,09 ^b	4,28±0,06 ^a	5,35±0,30 ^b	T
11c-18:1	1,31±0,09 ^a	1,20±0,10 ^{a,b}	0,91±0,02 ^{b,c}	0,83±0,01 ^c	G
(t6-t8)-18:1	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,15±0,04 ^b	G,T,GxT
EA	0,00±0,00 ^a	0,55±0,04 ^b	0,00±0,00 ^a	1,16±0,10 ^c	G,T,GxT
10t-18:1	0,00±0,00 ^a	0,27±0,05 ^b	0,00±0,00 ^a	0,59±0,05 ^c	G,T,GxT
VA	0,00±0,00 ^a	0,62±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	1,22±0,14 ^c	G,T,GxT
12t-18:1	0,00±0,00 ^a	0,39±0,02 ^b	0,00±0,00 ^a	0,96±0,13 ^c	G,T,GxT
LA	24,29±0,82	22,90±0,84	25,73±1,43	26,81±0,63	NS
GLA	0,32±0,01 ^a	0,33±0,01 ^a	0,27±0,01 ^{a,b}	0,25±0,01 ^b	G
ALA	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,15±0,02 ^b	0,16±0,03 ^b	G
AA	14,34±0,44 ^a	17,84±0,47 ^b	20,14±0,55 ^c	17,99±0,55 ^b	G,T
DHA	0,98±0,07	1,03±0,12	1,23±0,07	1,06±0,15	NS
Σ AGT	0,00±0,00 ^a	1,83±0,11 ^b	0,00±0,00 ^a	4,08±0,41 ^c	G,T,GxT
Σ SFA	52,31±0,69 ^a	46,49±1,30 ^b	45,54±0,57 ^b	39,63±0,24 ^c	G,T,GxT
Σ MUFA	7,01±0,34 ^a	8,50±0,09 ^b	5,66±0,09 ^c	6,59±0,30 ^a	G,T
Σ PUFA	39,93±0,56 ^a	42,09±1,36 ^a	47,52±0,81 ^b	46,27±0,41 ^b	G
Menores-NI	0,75±0,27	1,09±0,10	1,28±0,14	3,43±0,17	

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. NS, $p > 0,05$, no significativo; G, $p < 0,05$ para el efecto de la grasa dietaria; T, $p < 0,05$ para el efecto de la adición de AGT; GxT, $p < 0,05$ para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta de niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT. NI: ácidos grasos no identificados. ΣAGT: sumatoria de ácidos grasos trans. ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados. ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis. ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis.

I.7.5. ÁCIDOS GRASOS DEL TEJIDO ADIPOSO

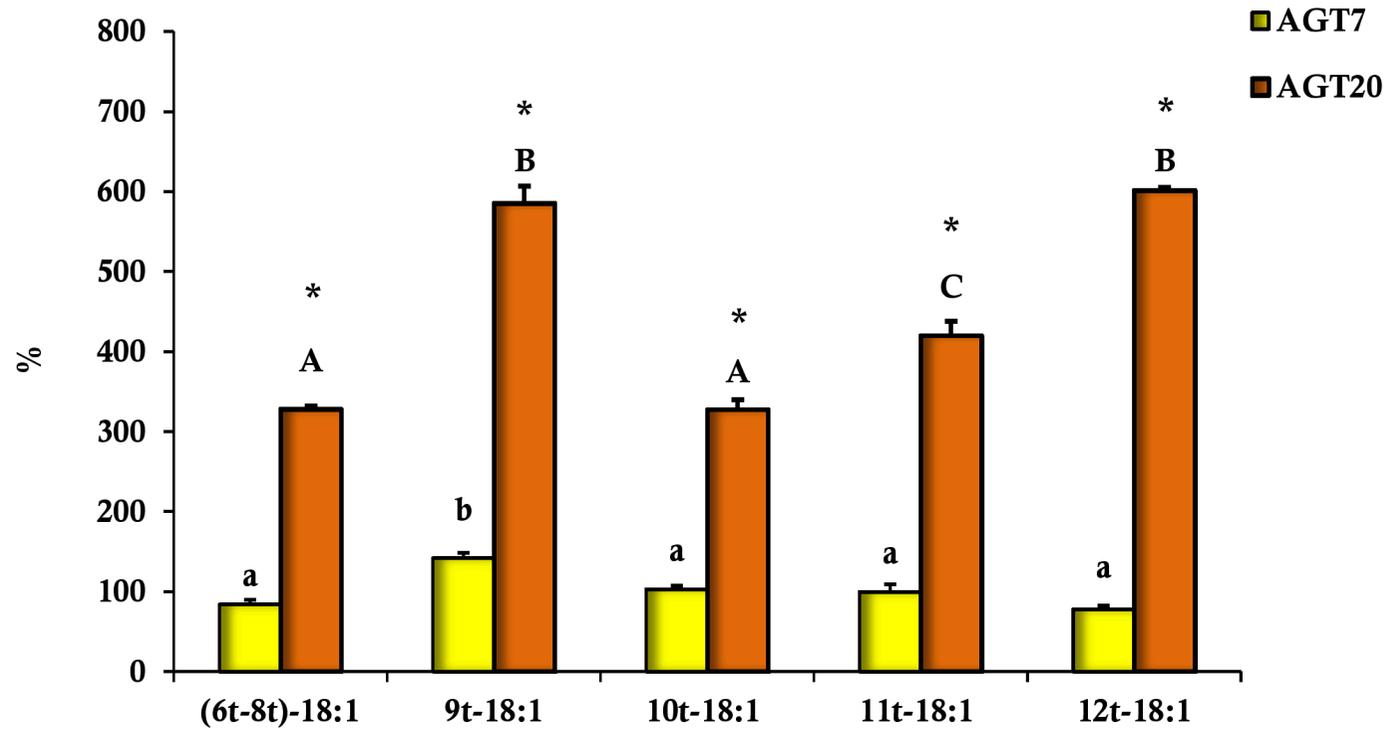
Los AG trans-18:1 fueron incorporados a un mayor nivel de retención en los animales AGT20 vs AGT7. El orden de retención diferencial de los isómeros 18:1 en TAE fue: 9t-18:1 \approx 12t-18:1 > 11t-18:1 > 10t-18:1 > (6-8)t-18:1 (Figura 25). En este tejido se observó un porcentaje de bioconversión de ácido VA a RA, que fue significativamente menor en los tejidos de los animales que consumieron alto nivel de grasa sustituida parcialmente (Figura 26).

Los niveles de SFA totales en TAE fueron significativamente disminuidos por el nivel de grasa dietaria, esto estuvo asociado a la disminución significativa de ácido palmítico. El ácido esteárico no se modificó por la presencia de AGT a niveles recomendados de grasa, ni a elevados niveles de grasa. Sólo en los animales alimentados con AGT20 los niveles de dicho AG se incrementaron significativamente (Tabla 13).

El ácido palmitoleico disminuyó significativamente por el nivel de grasa dietaria, mientras que el ácido oleico aumentó por el nivel de grasa y una disminuyó a alto nivel de grasa en presencia de AGT. El ácido cis-vaccénico aumentó significativamente por la presencia de AGT a ambos niveles de grasa dietaria, respecto a sus controles y disminuyó por el nivel de grasa. Los LC-PUFA totales disminuyeron significativamente por la presencia de AGT, mientras que aumentaron por el nivel de grasa. Esto estuvo en concordancia con la disminución de LA observada por la sustitución parcial con AGT en ambos niveles y su aumento por el elevado nivel de grasa en ausencia de AGT.

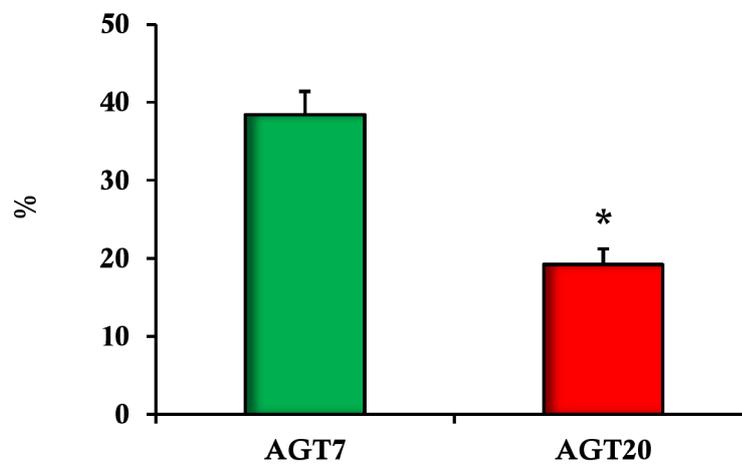
El resto de los LC-PUFA de las familias n-6 y n-3 disminuyeron significativamente por la presencia de AGT, y no mostraron cambios por el nivel de grasa dietaria.

Figura 25: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la restención de isómeros trans-18:1 en tejido adiposo epididimal



Resultados expresados como promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico: ANOVA One-way seguido del test de Scheffé y test de Student. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras diferentes en mayúsculas y minúsculas indican diferencia significativa entre los AGT dentro del mismo grupo dietario; (*) indica diferencia significativa por t-test de cada AGT entre los distintos grupos dietarios. AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; AGT20, dieta de elevado nivel de grasa sustituida parcialmente con AGT.

Figura 26: Efectos de los Ácidos Grasos Trans sobre la bioconversión del ácido trans-vaccénico a ácido ruménico en tejido adiposo epididimal



Resultados expresados como promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico: Test de Student. Nivel de significancia $p < 0,05$. El símbolo (*) indica diferencia significativa en la bioconversión VA a RA entre los distintos grupos suplementados con AGT. AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; AGT20, dieta de elevado nivel de grasa sustituida parcialmente con AGT.

Tabla 13: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre la composición porcentual de ácidos grasos del tejido adiposo

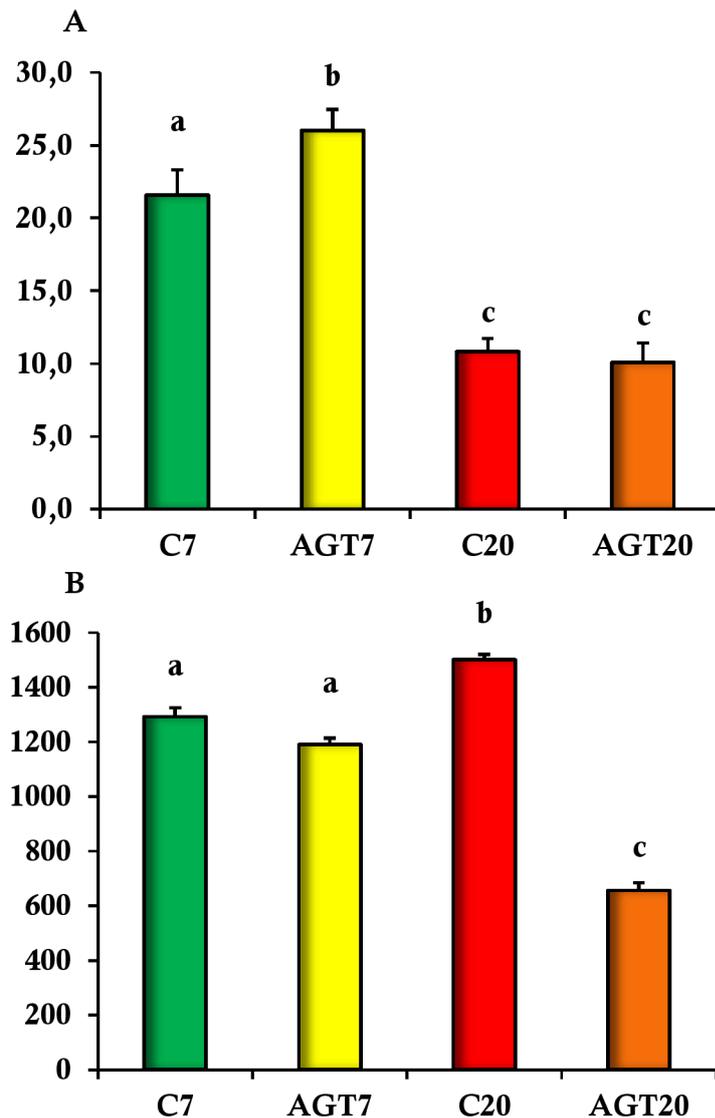
Ácidos grasos	C7	AGT7	C20	AGT20	ANOVA
16:0	21,19±0,45 ^a	22,71±0,21 ^a	14,60±0,27 ^b	13,52±0,53 ^b	G
18:0	2,34±0,16 ^a	2,46±0,03 ^a	2,12±0,02 ^a	4,16±0,16 ^b	G,T
9c-16:1	4,58±0,32 ^a	5,96±0,37 ^b	1,58±0,14 ^c	1,39±0,06 ^c	G,T,GxT
OA	29,88±0,30 ^a	29,23±0,41 ^a	31,86±0,51 ^a	27,16±0,81 ^b	T
11c-18:1	3,01±0,19 ^a	4,08±0,24 ^b	1,27±0,21 ^c	3,55±0,04 ^{a,b}	G,T
(t6-t8)-18:1	0,00±0,00 ^a	0,68±0,05 ^b	0,00±0,00 ^a	2,79±0,04 ^c	G,T,GxT
EA	0,00±0,00 ^a	1,48±0,07 ^b	0,00±0,00 ^a	6,38±0,24 ^c	G,T,GxT
10t-18:1	0,00±0,00 ^a	1,57±0,06 ^b	0,00±0,00 ^a	5,24±0,20 ^c	G,T,GxT
VA	0,00±0,00 ^a	1,38±0,13 ^b	0,00±0,00 ^a	6,09±0,27 ^c	G,T,GxT
12t-18:1	0,00±0,00 ^a	0,83±0,05 ^b	0,00±0,00 ^a	6,74±0,04 ^c	G,T,GxT
LA	34,29±0,63 ^a	22,06±0,55 ^b	44,50±0,53 ^c	11,99±0,19 ^d	T,GxT
RA	0,00±0,00 ^a	0,86±0,05 ^b	0,00±0,00 ^a	1,45±0,04 ^c	G,T,GxT
GLA	0,11±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b	0,09±0,01 ^a	0,03±0,01 ^c	G,T,GxT
ALA	0,85±0,06 ^a	0,67±0,05 ^b	0,88±0,08 ^a	0,45±0,06 ^c	G,T,GxT
11c,14c-20:2	0,18±0,03 ^a	0,08±0,01 ^b	0,25±0,04 ^c	0,08±0,01 ^b	G,T
DGLA	0,12±0,02 ^a	0,04±0,01 ^b	0,14±0,01 ^a	0,08±0,01 ^c	G,T
AA	0,83±0,07 ^a	0,38±0,06 ^b	1,02±0,19 ^a	0,09±0,01 ^c	G,T,GxT
7,c10,13c,16c-22:4	0,19±0,02 ^a	0,06±0,01 ^b	0,22±0,04 ^a	0,00±0,00 ^c	G,T,GxT
4c,7c,10c,13c,16c-22:5	0,07±0,01 ^a	0,03±0,01 ^b	0,13±0,02 ^a	0,00±0,00 ^c	G,T,GxT
7c,10c,13c,16c,19c-22:5	0,04±0,01 ^a	0,03±0,01 ^a	0,05±0,01 ^a	0,00±0,00 ^b	G,T,GxT
DHA	0,05±0,01 ^a	0,03±0,01 ^b	0,07±0,02 ^a	0,00±0,00 ^c	T,GxT
Σ t-18:2 (no conjugados)	0,00±0,00 ^a	1,35±0,15 ^b	0,00±0,00 ^a	3,35±0,17 ^c	G,T,GxT
Σ AGT	0,00±0,00 ^a	8,15±0,41 ^b	0,00±0,00 ^a	32,03±0,64 ^c	G,T,GxT
Σ SFA	23,54±0,65 ^a	25,16±0,27 ^a	16,72±0,30 ^b	17,68±0,55 ^b	G
Σ MUFA	37,46±0,67 ^a	39,28±0,55 ^a	34,71±0,29 ^b	32,10±0,62 ^c	G
Σ PUFA	36,41±0,61 ^a	23,32±0,78 ^b	46,97±0,44 ^c	12,57±0,23 ^d	T, GxT
Menores-NI	2,59±0,23	4,29±0,42	1,60±0,25	5,63±0,12	-

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p < 0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; T, p<0,05 para el efecto de la adición de AGT; GxT, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta de niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT. NI: ácidos grasos no identificados. ΣAGT: sumatoria de ácidos grasos trans. ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados. ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis. ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis

La relación palmítico/ palmitoleico aumentó en TAE de animales que consumieron la dieta AGT7, mientras que disminuyó significativamente por el nivel de grasa suministrada independientemente de la presencia/ausencia de AGT. La

relación oleico/ esteárico aumentó significativamente por el nivel de grasa en ausencia de AGT, pero disminuyó cuando consumieron dieta AGT20 (Figura 27).

Figura 27: Efecto de los Ácidos Grasos Trans sobre el índice de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa expresado por la relación porcentual ácido palmitoleico/ácido palmítico (A) y ácido oleico/ ácido esteárico (B) en tejido adiposo epididimal



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; AGT7, dieta a niveles recomendados de grasa control sustituida parcialmente con AGT; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; AGT20, dieta de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT.

RESULTADOS -PARTE II

EFFECTOS DE LOS CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO A NIVELES RECOMENDADOS O ELEVADOS DE GRASA DIETARIA EN UN MODELO EXPERIMENTAL

De manera similar que para los resultados de AGT, en el caso de los CLA se consideraron dos variables independientes:

- a) el nivel de grasa dietaria: recomendado y elevado.
- b) presencia o no de CLA: sustitución parcial del aceite dietario con aceite rico en isómeros CLA.

II.1. PARÁMETROS NUTRICIONALES

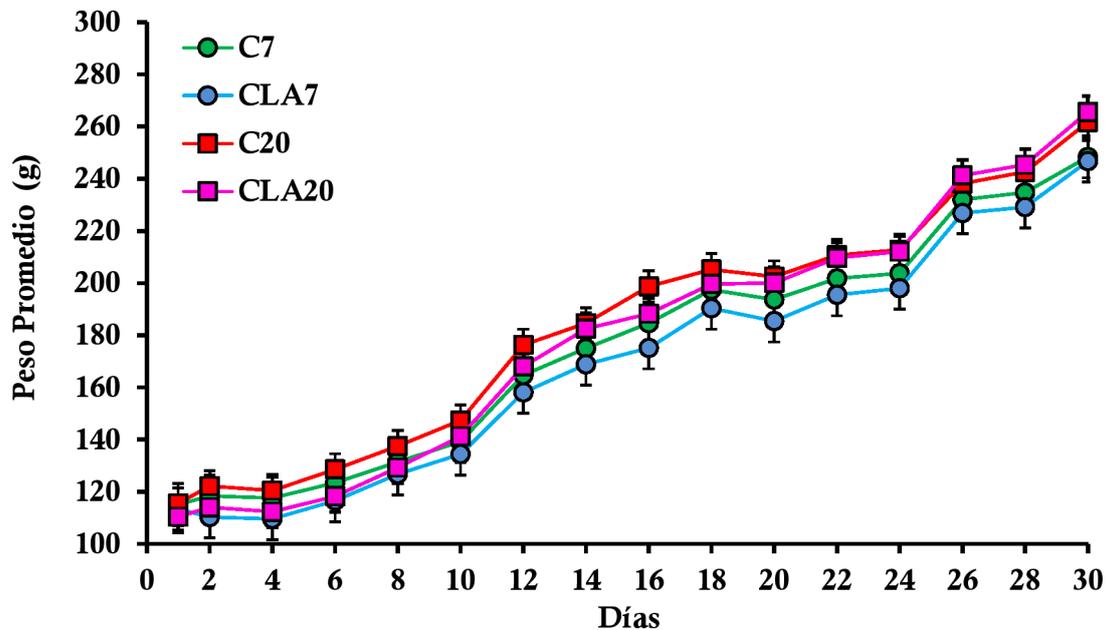
II.1.1. INGESTA DIETARIA, DIGESTIBILIDAD GRASA Y GANANCIA DE PESO

Las dietas suministradas a los grupos experimentales fueron bien aceptadas, siendo el promedio de ingesta diaria de comida (g/día); C7: $15,2 \pm 1,0$; CLA7: $15,0 \pm 0,6$; C20: $13,2 \pm 0,6$; CLA20: $13,6 \pm 1,0$. Como se mostró en la parte I de Resultados, la ingesta de dietas ricas en grasa disminuyó el consumo de alimento, sin afectar la ingesta energética (Tabla 14), mientras que la presencia de CLA no tuvo efecto sobre estos parámetros. La digestibilidad de grasa no mostró diferencias por el nivel de grasa, ni por la presencia de isómeros CLA en la dieta.

Los pesos de los animales al inicio del estudio fueron similares en los cuatro grupos experimentales y tuvieron un continuo incremento del peso durante toda la experiencia. Al final de la misma, se observó un incremento significativo de la

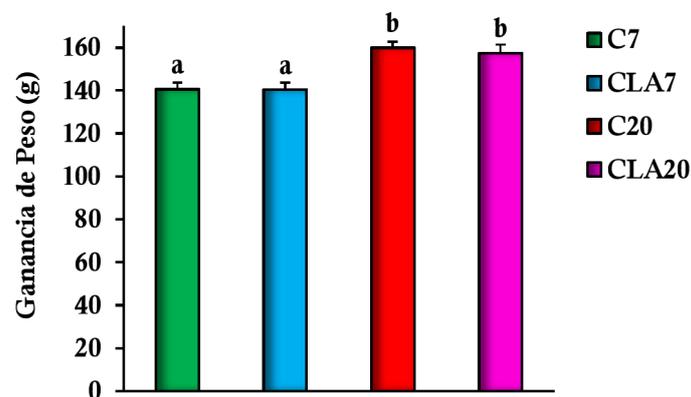
ganancia de peso sólo por efecto de la cantidad de grasa de la dieta. (Figura 28 y Figura 29).

Figura 28: Efecto de los Conjugados de Ácido Linoleico sobre la evolución del peso corporal



Valores expresados como el promedio \pm SEM (n=6). C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con CLA, C20, dieta control a elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

Figura 29: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la ganancia de peso



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

Las dietas experimentales parcialmente sustituidas con CLA no ocasionaron daño hepático en los animales experimentales. Esto fue reflejado en las actividades de las enzimas ASAT, ALAT y FAL a nivel plasmático (UI/l; ASAT, C7: $41,7 \pm 2,7$; CLA7: $44,9 \pm 2,6$; C20: $41,6 \pm 2,2$; CLA20: $40,9 \pm 1,3$. ALAT, C7: $18,4 \pm 1,1$; CLA7: $17,9 \pm 1,3$; C20: $19,0 \pm 0,9$; CLA20: $16,8 \pm 0,73$. FAL, C7: $605,4 \pm 33,3$; CLA7: $587,8 \pm 36,7$; C20: $732,9 \pm 34,8$; CLA20: $564,9 \pm 53,7$).

II.1.2.COMPOSICIÓN CORPORAL.EFICIENCIA ENERGÉTICA

Como fuera presentado para el estudio de los AGT, la composición de proteínas, grasas y agua corporal, evaluado mediante el estudio de la composición de carcasas, no mostró diferencias significativas (Tabla 14) por el nivel de grasa, ni por la presencia de CLA.

La RETC fue mayor en los animales alimentados con elevados niveles de grasa dietaria, asociado a un significativo aumento de la retención energética como grasa y proteínas, pero no fue alterada por la sustitución con CLA. En concordancia con estos resultados, y como se observaba también en los resultados de AGT, la EE fue significativamente mayor en los animales que recibieron dietas ricas en grasa, sin cambios por los CLA.

Tabla 14: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre parámetros nutricionales y composición corporal

	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
Ingesta (kJ/30 días)					
	7676 ± 359	7599 ± 174	7795 ± 191	7980 ± 397	NS
Absorción aparente de grasa (%)					
	90,2 ± 0,9 ^a	91,3 ± 1,2 ^a	95,5 ± 0,5 ^b	93,6 ± 0,6 ^{a,b}	G
Composición de carcasa (g/100g)					
Proteínas	18,9 ± 0,8	18,6 ± 0,5	17,8 ± 0,7	18,5 ± 0,4	NS
Grasa	12,0 ± 0,9	12,2 ± 0,7	13,0 ± 1,1	13,6 ± 1,1	NS
Agua	63,5 ± 1,0	61,7 ± 1,6	61,6 ± 1,1	60,8 ± 1,2	NS
Energía retenida en carcasa (kJ)					
Grasa	952 ± 18 ^a	1083 ± 20 ^{a,b}	1210 ± 48 ^b	1227 ± 20 ^b	G
Proteínas	672 ± 7 ^a	679 ± 12 ^a	764 ± 20 ^b	751 ± 31 ^b	G
Total	1616 ± 21 ^a	1678 ± 73 ^a	1984 ± 31 ^b	1979 ± 17 ^b	G
Eficiencia energética (%)					
	14,0 ± 0,3 ^a	14,7 ± 0,8 ^a	18,1 ± 0,2 ^b	18,0 ± 0,3 ^b	G

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p 0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; CLA, p<0,05 para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA, C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

II.1.3. BALANCE NITROGENADO

La ingesta de nitrógeno mostró una tendencia a disminuir en los grupos alimentados con dieta parcialmente sustituida con CLA, así como en los grupos que recibieron dietas ricas en grasa. Este efecto fue compensado, en los grupos CLA7 y C20 por una disminución en las excretas de N en orina y materia fecal, resultando

en un BN similar a C7; mientras que, el BN incrementó por la presencia de CLA a alto nivel de grasa en el grupo CLA20 (Tabla 15).

Tabla 15: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico Conjugado sobre la ingesta, excreción y balance de nitrógeno

	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
N Ingerido (mg/día)	515 ± 42	463 ± 58	460 ± 21	470 ± 42	NS
N Urinario (mg/día)	213 ± 29 ^a	162 ± 16 ^{a,b}	137 ± 12 ^b	128 ± 2 ^b	G
N Fecal (mg/día)	33,7 ± 3,3 ^a	30,2 ± 1,4 ^{a,b}	28,2 ± 1,6 ^b	28,0 ± 1,3 ^b	G
BN Diario(mg/día)	269 ± 21 ^a	270 ± 53 ^a	294 ± 18 ^a	327 ± 11 ^b	G,CLA

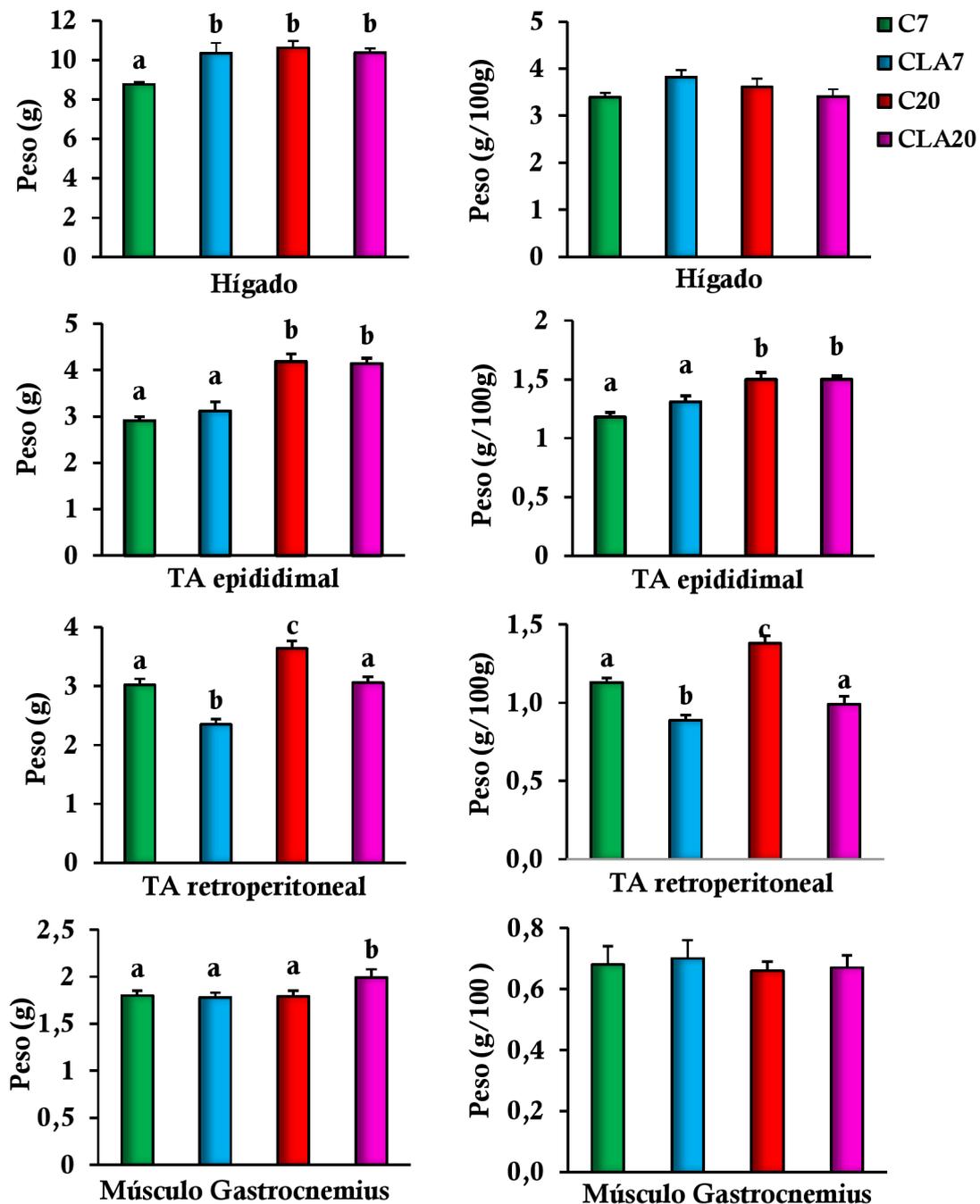
Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p<0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; CLA, p<0,05 para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA, C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. N: nitrógeno, BN: balance nitrogenado.

II.1.4. PESOS DE ÓRGANOS Y TEJIDOS

El peso absoluto del hígado aumentó por la presencia de CLA y nivel de grasa de la dieta, aunque no se observó un efecto aditivo. No obstante, estos resultados expresados como pesos relativos (g de hígado/ 100g de peso corporal) fueron similares en los cuatro grupos experimentales. El mayor contenido de grasa, y por ende la mayor contribución energética, en la dieta incrementó el peso del TAE independientemente de la presencia de CLA, tanto en forma absoluta como relativa al peso del animal. Si bien el peso absoluto del TARP también aumentó significativamente en el grupo C20 vs. C7, la sustitución con CLA disminuyó este parámetro a ambos niveles de grasa y este comportamiento se observó de igual forma al expresar los resultados relativos al peso del animal. El peso absoluto del músculo gastrocnemio mostró un aumento significativo por efecto del nivel de grasa en

presencia CLA, pero no se observó diferencias significativas en su expresión como peso relativo (Figura 30).

Figura 30: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el peso de diferentes tejidos



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

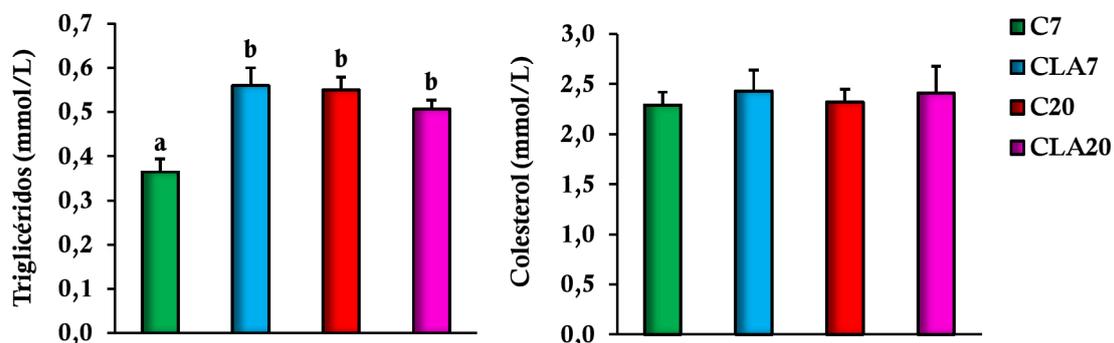
II.2. PARÁMETROS ASOCIADOS AL METABOLISMO LÍPIDICO

II.2.1. NIVELES DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS Y TISULARES

Los niveles de lípidos plasmáticos en condiciones de ayuno se muestran en la Figura 31. La presencia de CLA y la ingesta de elevados niveles de grasa produjeron un aumento en los TAG circulantes, aunque no se observó un efecto aditivo de estas variables. En cambio, la concentración de colesterol en plasma no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales.

La presencia de CLA y el incremento de grasa dietaria aumentaron significativamente el contenido de TAG en hígado, mostrando una dependencia de la presencia de isómero y del nivel de grasa. Si bien, los CLA a nivel recomendado de grasa aumentaron los niveles de TAG hepáticos; a altos niveles de grasa dietaria se observó una tendencia opuesta. Los niveles de colesterol en hígado, elevados en C20 vs. C7 tendieron a disminuir en el grupo CLA20, comportamiento semejante al observado para TAG (Figura 32).

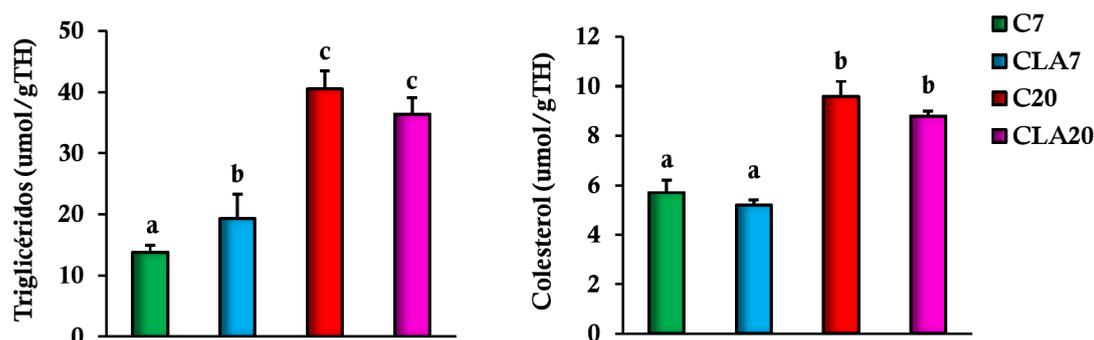
Figura 31: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre los niveles de lípidos plasmáticos



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

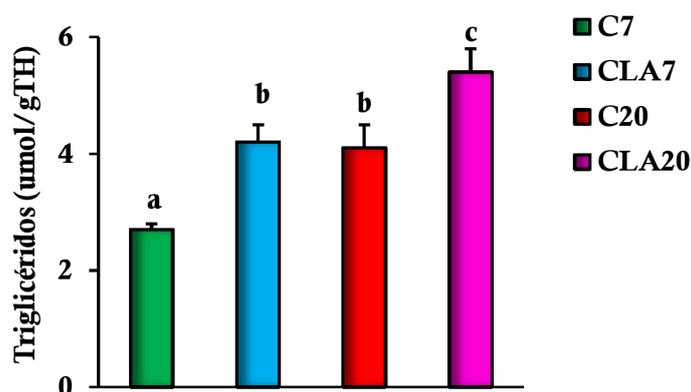
Tanto la presencia de CLA, como las dietas ricas en grasa, condujeron a una marcada acumulación de TAG en músculo gastrocnemio, mostrando un efecto aditivo de ambas variables sobre este parámetro (Figura 33).

Figura 32: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el contenido de lípidos hepáticos



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

Figura 33: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el contenido de triacilglicéridos en músculo gastrocnemio

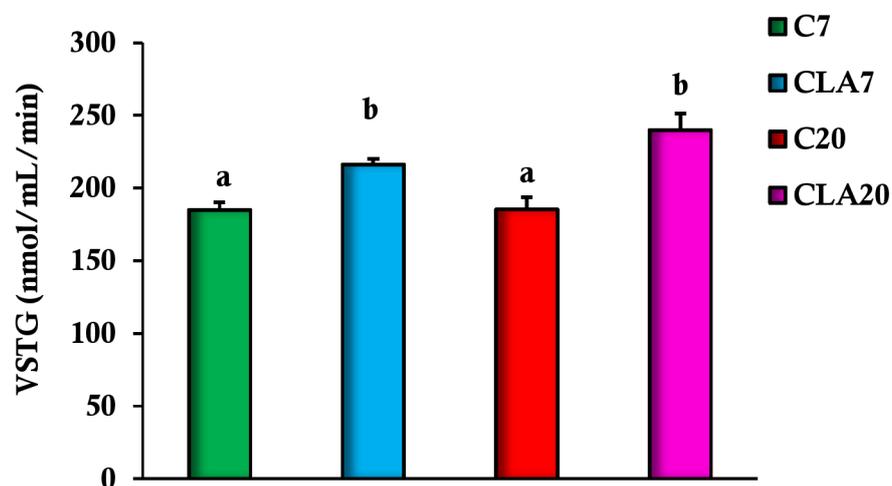


Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

II.2.2. SECRECIÓN HEPÁTICA DE TRIACILGLICÉRIDOS PRE- β -LIPOPROTEÍNAS

Los CLA incrementaron la VSTAG a niveles recomendados y altos de grasa dietaria (Figura 34). Como se mencionó anteriormente, al presentar los resultados de AGT, la ingesta de dieta de elevados niveles de grasa (C20) no modificó este parámetro.

Figura 34: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la secreción hepática de pre- β -lipoproteínas



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. VSTG: velocidad de secreción de pre- β -lipoproteína.

II. 2.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA LIPOPROTEÍNA LIPASA

II.2.3.1. Actividad Lipoproteína Lipasa en tejido adiposo epididimal

La presencia del CLA y nivel de grasa dietaria incrementaron significativamente la actividad de la enzima LPL en TAE, aunque no se observó un efecto aditivo por la presencia de CLA y la alta cantidad de grasa. Este efecto fue observado tanto cuando la actividad enzimática fue expresada por gramo de tejido, como por tejido total (Tabla 16).

II.2.3.2. Actividad LPL en músculo gastrocnemio

La sustitución parcial con CLA a niveles recomendados de grasa dietaria mostró una ligera disminución de la actividad LPL en músculo gastrocnemio, sin alcanzar diferencias significativas; mientras que los elevados niveles de grasa en la dieta disminuyeron la actividad de esta enzima en músculo, sin mostrar un efecto adicional por la sustitución con CLA (Tabla 16).

Tabla 16: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo y tejido adiposo epididimal

	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
Actividad LPL					
Músculo gastrocnemius (nmolF/min/g TH)	3,33±0,07 ^a	3,16±0,05 ^{a,b}	2,86±0,08 ^b	2,91±0,08 ^b	G
Tejido adiposo epididimal (nmolF/min/g TH)	0,37±0,06 ^a	0,61±0,10 ^b	0,58±0,10 ^b	0,64±0,11 ^b	G,CLA
Tejido adiposo epididimal (nmolF/min/g Tejido total)	1,08±0,07 ^a	1,94±0,13 ^b	2,40±0,17 ^b	2,66±0,18 ^b	G,CLA

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p<0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; CLA, p<0,05 para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. LPL: lipoproteína lipasa.

II.3. EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE GENES LIPOGÉNICOS Y OXIDATIVOS EN HÍGADO

Como se realizara para el estudio de los efectos de los AGT, se evaluaron las expresiones de algunas enzimas y factores de transcripción claves en el metabolismo de los lípidos. Se evaluaron los niveles de ARNm de: sintasa de ácidos grasos (FAS), $\Delta 9$ -desaturasa (SCD1) y la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) en relación a la lipogénesis; carnitina palmitoiltransferasa Ia (CPT-Ia) y el receptor activado por proliferadores de peroxisomas alfa (PPAR- α) vinculados a la oxidación de AG (Figura 35).

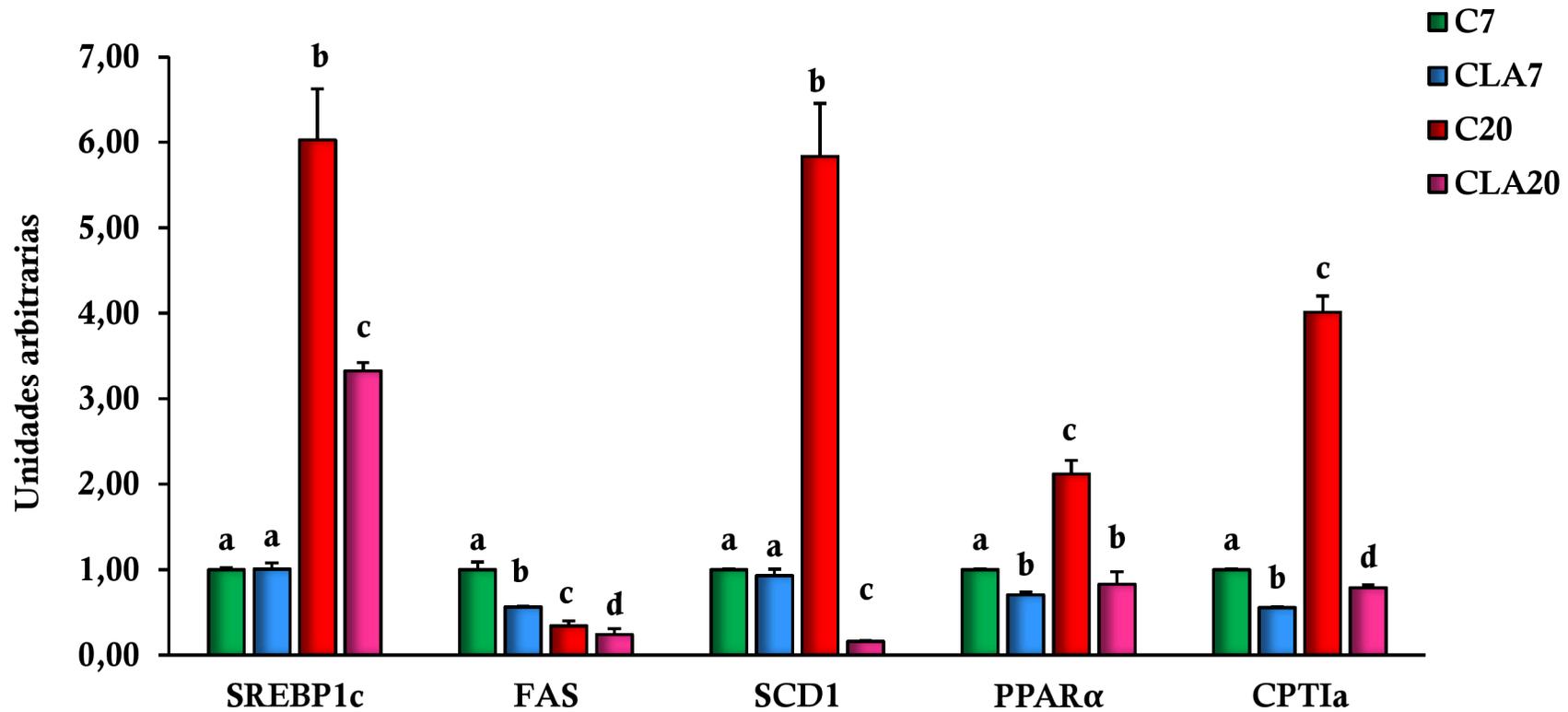
La expresión génica del SREBP-1c en hígado no fue modificada por la presencia de CLA a niveles recomendados de grasa dietaria, aunque incrementó al aumentar el nivel de grasa en la dieta. No obstante, la sustitución con CLA a elevados niveles de grasa, atenuó este efecto.

Los niveles de ARNm de la FAS, disminuyeron por la presencia de CLA y por el nivel de grasa observándose un efecto aditivo de ambas variables.

La expresión génica de SCD1 en hígado no cambió por la presencia de CLA a niveles recomendados de grasa dietaria y aumentó significativamente al incrementar el nivel de grasa. Notoriamente, se observó una marcada disminución en el grupo que recibió CLA a altos niveles de grasa dietaria.

Relacionado a la oxidación de AG, la expresión génica en hígado de PPAR- α disminuyó por la presencia de CLA a ambos niveles de grasa e incrementó por el nivel de grasa dietaria en ausencia de CLA. Los cambios en la expresión de la enzima CPT-Ia siguieron un comportamiento similar al PPAR- α , disminuyendo también por la presencia de CLA e incrementando por el nivel de grasa, incluso en presencia de CLA.

Figura 35: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico Conjugado sobre la expresión de enzimas y factores de transcripción relacionados con el metabolismo lipídico en hígado

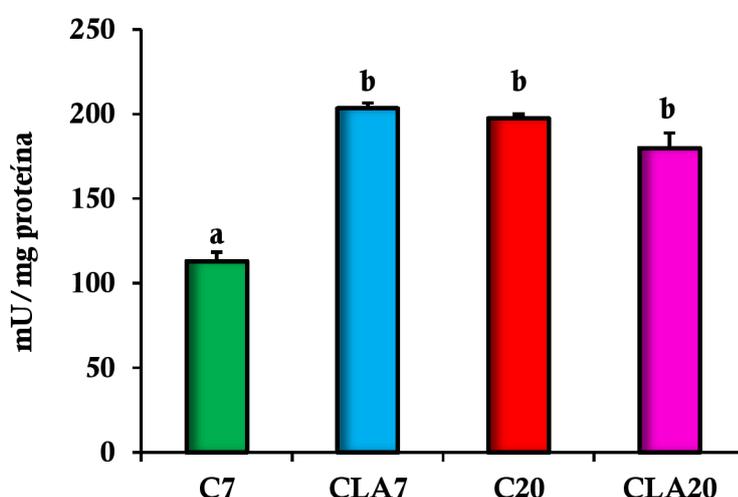


Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

II.4. ACTIVIDAD DE ENZIMAS RELACIONADAS CON LA LIPOGÉNESIS

La actividad de la enzima ACC determinada en hígado aumentó por la sustitución parcial con CLA a niveles recomendados de grasa dietaria y también por los elevados niveles de grasa en ausencia de CLA (Figura 36).

Figura 36: Efectos de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

II.5. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTRÉS OXIDATIVO EN HÍGADO

La medida de lipoperoxidación hepática, medida por las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), no fueron modificadas por la presencia de CLA, ni

por el nivel de grasa dietaria. Las defensas antioxidantes enzimáticas, estimadas a través de la actividad de la enzima catalasa aumentaron en presencia de CLA a ambos niveles de grasa; mientras que los niveles de GSH, aumentaron significativamente por la presencia de CLA en el grupo CLA7 y por el nivel de grasa, pero no se observó un efecto aditivo por la sustitución con CLA en la dieta rica en grasa CLA20 (Tabla 17).

Tabla 17: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre parámetros relacionados al estrés oxidativo en hígado

	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
TBARS (nmol MDA/gTH)	115,3 ± 1,7	111,2 ± 1,7	108,3 ± 2,5	108,5 ± 3,0	NS
Catalasa (U/mg Proteína)	117,5 ± 2,4 ^a	171,1 ± 4,8 ^b	108,7 ± 1,5 ^a	178,6 ± 4,8 ^b	CLA
GSH (µmol/gTH)	1,86 ± 0,01 ^a	2,39 ± 0,05 ^b	2,46 ± 0,06 ^b	2,56 ± 0,10 ^b	G,CLA

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p<0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; CLA, p<0,05 para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. TBARS: sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico; GSH: glutatión reducido.

II.6. FLUJO BILIAR, CONCENTRACIÓN-EXCRECIÓN DE LOS COMPONENTES DE BILIS

En concordancia con lo expresado en la sección anterior, se realizó esta parte del estudio con el fin evaluar el efecto de la sustitución parcial con CLA y diferentes niveles de grasa sobre el flujo biliar y de sus componentes.

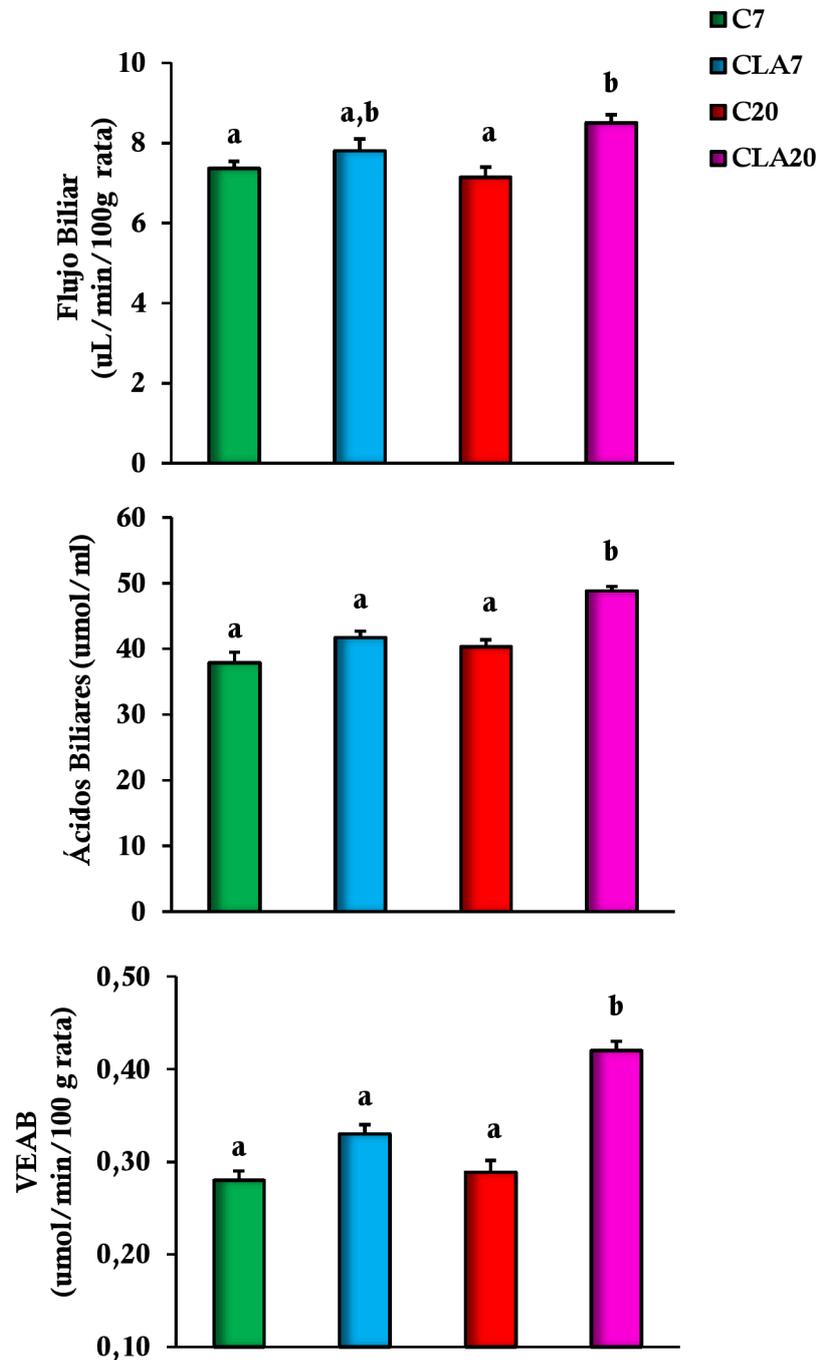
II.6.1. FLUJO BILIAR

La sustitución parcial de la grasa dietaria por CLA incrementó el FB sólo a niveles elevados de grasa dietaria, sin observarse cambios significativos por la sustitución con CLA a niveles recomendados de grasa, ni por el nivel elevado de grasa en la dieta (Figura 37).

II.6.2. CONCENTRACIÓN Y VELOCIDAD DE EXCRECIÓN DE LOS COMPONENTES DE LA BILIS

La presencia de CLA aumentó significativamente el contenido de AB en bilis y la VEAB a elevados niveles de grasa (Figura 37). El colesterol en bilis aumentó por el nivel de grasa dietaria, sin efecto por la presencia de CLA. En la VEC en bilis se observa una tendencia a aumentar en el grupo C20 e incrementó en los animales que consumieron dieta CLA20. El contenido de FL en bilis y la VEFL, no se vieron afectados por la presencia de CLA, ni por la cantidad de grasa en los distintos grupos experimentales. La concentración proteínas en bilis no mostró dependencia del nivel de grasa. La VEP aumentó en el grupo de ratas que recibieron dieta CLA20 por el leve incremento de la concentración de proteínas y el elevado FB que presenta este grupo experimental (Tabla 18).

Figura 37: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el flujo biliar, concentración de ácidos biliares y velocidad de excreción de ácidos biliares



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. VEAB: velocidad de excreción de ácidos biliares.

Tabla 18: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la concentración de colesterol, fosfolípidos y proteínas de la bilis

	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
Concentración					
Colesterol (mmol/ml)	0,40 ± 0,02 ^a	0,41 ± 0,02 ^a	0,48 ± 0,01 ^b	0,48 ± 0,02 ^b	G
Fosfolípidos (nmol/ml)	2,03 ± 0,03	1,96 ± 0,11	2,12 ± 0,08	1,95 ± 0,07	NS
Proteínas (mg/ml)	4,0 ± 0,3	4,6 ± 0,2	4,0 ± 0,2	4,9 ± 0,1	NS
Velocidad de excreción					
Colesterol (nmol/min/100g rata)	3,0 ± 0,2 ^a	3,2 ± 0,2 ^a	3,4 ± 0,1 ^{a,b}	4,1 ± 0,1 ^b	G,CLA
Fosfolípidos (nmol/min/100g rata)	15,2 ± 0,5	16,5 ± 1,2	15,2 ± 0,8	16,6 ± 0,6	NS
Proteínas (mg/min/100g rata)	29,3 ± 1,4 ^a	35,9 ± 2,3 ^{a,b}	28,3 ± 1,9 ^a	41,3 ± 1,1 ^b	CLA

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p<0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; CLA, p<0,05 para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C7, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

II.7. RETENCIÓN DE CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO Y MODIFICACIONES EN EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN LÍPIDOS TOTALES DE SUERO, TEJIDOS Y SECRECIONES

Si bien la composición de AG en las dietas C7 vs. C20 y CLA7 vs. CLA20 fueron iguales (Tabla 19), la sustitución con CLA indujo modificaciones significativas diferentes en los perfiles de AG de suero, tejidos y secreciones a los dos niveles de grasa dietaria.

La retención de CLA totales mostró dependencia de la grasa dietaria (Tabla 19), siendo en TAE, hígado y suero: 29 %, 79 % y 87 % respectivamente más altas en el grupo CLA 20 que en CLA7. La retención, independientemente del nivel de grasa fue TAE > Hígado > Suero y, a su vez, significativamente más elevada para 9c,11t-18:2 que para el 10t,12c-18:2.

Tabla 19: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la retención de isómeros

Ácidos grasos	Retención de Isómeros (%)	
	CLA7	CLA20
Suero		
RA	7,0 ± 0,8 ^a	12,4 ± 0,6 ^b
10t,12c-18:2	3,9 ± 0,6 ^a	8,0 ± 0,6 ^b
Hígado		
RA	20,7 ± 1,2 ^a	31,7 ± 2,1 ^b
10t,12c-18:2	5,0 ± 1,0 ^a	14,4 ± 1,4 ^b
Tejido adiposo epididimal		
RA	57,6 ± 2,6 ^a	72,2 ± 2,2 ^b
10t,12c-18:2	34,6 ± 2,0 ^a	47,1 ± 3,2 ^b

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6) calculados como porcentaje de isómero CLA medidos en suero o tejidos/ porcentaje de isómero CLA en la dieta multiplicado por 100. Análisis estadístico test de Student's. Nivel de significancia: p<0,05. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con CLA; CLA20, dieta control de elevados niveles de grasa sustituida parcialmente con CLA.

II.7.1. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS SÉRICOS

El contenido de isómeros CLA detectados en los lípidos séricos de los animales alimentados con CLA7 y CLA20 tuvo relación con la cantidad de grasa dietaria, aun cuando la composición de la misma conservó igual proporción de cada uno de estos isómeros. Así, el contenido de 9c,11t-CLA y 10t,12c-CLA en el suero de los animales alimentados con CLA20 fue 78% y 110% respectivamente mayor que en el grupo CLA7. Además, los niveles encontrados del isómero 10t,12c-18:2 en suero de los animales alimentados con CLA a 7 y 20% de grasa dietaria fueron significativamente menores (56 % y 66 %, respectivamente) que los del RA. La composición de AG séricos se muestra en la Tabla 20.

Los SFA totales disminuyeron por la presencia de CLA y el nivel de grasa, observándose un efecto aditivo de ambas variables. Estos cambios estuvieron asociados a una disminución significativa de los niveles de ácido palmítico sólo en los animales que consumieron CLA20 y a una disminución del ácido esteárico en los grupos CLA7, C20 y CLA20.

Los niveles de ácido palmitoleico disminuyeron significativamente en los animales que consumieron dietas altas en grasa, C20 y CLA20. El contenido sérico de ácido oleico no fue modificado, mientras que el ácido cis-vaccénico disminuyó por la presencia de CLA, siendo significativo en el grupo CLA7. Esto determinó que los MUFA totales disminuyeran por la presencia de CLA a ambos niveles de grasa dietaria.

El contenido de LA aumentó por el elevado nivel de grasa dietaria consumida, mientras que el nivel de GLA sérico disminuyó por la presencia de CLA y el nivel elevado de grasa. El contenido de AA, aumentó por efecto de CLA y el elevado nivel de grasa dietaria, mostrando un efecto aditivo de ambas variables en el grupo CLA20.

Los AG de la familia n-3 en suero fueron modificados principalmente por el nivel de grasa suministrada en la dieta. Así, el ALA aumentó en los animales que consumieron dieta C20, mientras que la presencia de CLA a ambos niveles de grasa dietaria no afectó su contenido en suero. En concordancia con estos resultados, el ácido docosapentanoico aumentó por el nivel de grasa en C20, mientras que el contenido de DHA no fue modificado. El resultado global fue un incremento de los PUFA totales por efecto del elevado nivel de grasa dietaria.

Tabla 20: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de ácidos grasos de lípidos séricos

Ácidos grasos	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
16:0	22,97±0,63 ^a	22,55±0,41 ^a	20,82±0,63 ^{a,b}	17,8±0,74 ^b	G,CLA
18:0	20,27±0,89 ^a	16,41±0,29 ^b	15,17±0,77 ^c	16,95±0,64 ^b	G,CLA
9c-16:1	0,71±0,05 ^a	0,66±0,11 ^a	0,20±0,01 ^b	0,16±0,01 ^b	G
OA	6,87±0,71 ^{a,b}	5,96±0,39 ^a	7,68±0,67 ^b	6,43±0,84 ^{a,b}	CLA
11c-18:1	1,81±0,17 ^a	1,35±0,05 ^b	1,06±0,03 ^{b,c}	0,87±0,07 ^c	G,CLA,GxCLA
LA	14,43±0,65 ^a	16,45±0,68 ^b	21,54±0,52 ^c	20,15±0,87 ^c	G
RA	0,00±0,00 ^a	0,36±0,04 ^b	0,00±0,00 ^a	0,64±0,07 ^c	G,CLA,GxCLA
10t,12c-18:2	0,00±0,00 ^a	0,20±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	0,42±0,09 ^c	G,CLA,GxCLA
GLA	0,35±0,01 ^a	0,26±0,01 ^b	0,22±0,01 ^b	0,20±0,01 ^b	G,CLA
ALA	0,28±0,01 ^a	0,24±0,03 ^a	0,37±0,01 ^b	0,29±0,03 ^a	G,CLA
11c,14c-20:2	0,14±0,01 ^a	0,18±0,01 ^a	0,31±0,02 ^b	0,27±0,03 ^b	G
DGLA	0,19±0,02 ^a	0,24±0,03 ^a	0,28±0,01 ^b	0,13±0,03 ^c	CLA
AA	24,88±1,31 ^a	27,89±0,82 ^b	27,34±0,56 ^b	31,15±0,46 ^c	G,CLA,GxCLA
7c,10c,13c,16c-22:4	0,65±0,04 ^a	0,61±0,08 ^a	0,85±0,02 ^b	0,51±0,08 ^a	G,CLA
4c,7c,10c,13c,16c-22:5	1,06±0,15 ^a	1,28±0,09 ^a	0,68±0,03 ^b	0,74±0,07 ^b	G,CLA
7c,10c,13c,16c,19c-22:5	0,30±0,06 ^a	0,36±0,05 ^a	0,56±0,14 ^b	0,31±0,02 ^a	G,CLA
DHA	1,77±0,11	1,68±0,10	2,16±0,21	1,94±0,23	NS
Σ SFA	43,23±1,12 ^a	38,97±0,91 ^b	35,87±1,33 ^b	34,09±0,56 ^c	G,CLA,GxCLA
Σ MUFA	9,39±0,90 ^a	7,97±0,47 ^b	8,94±0,67 ^{a,b}	7,46±0,79 ^b	G,CLA
Σ PUFA	43,77±0,18 ^a	48,40±1,01 ^b	54,20±0,61 ^c	55,58±0,59 ^c	G,CLA
Menores-NI	1,97±0,52	4,10±0,46	0,99±0,18	1,81±1,00	

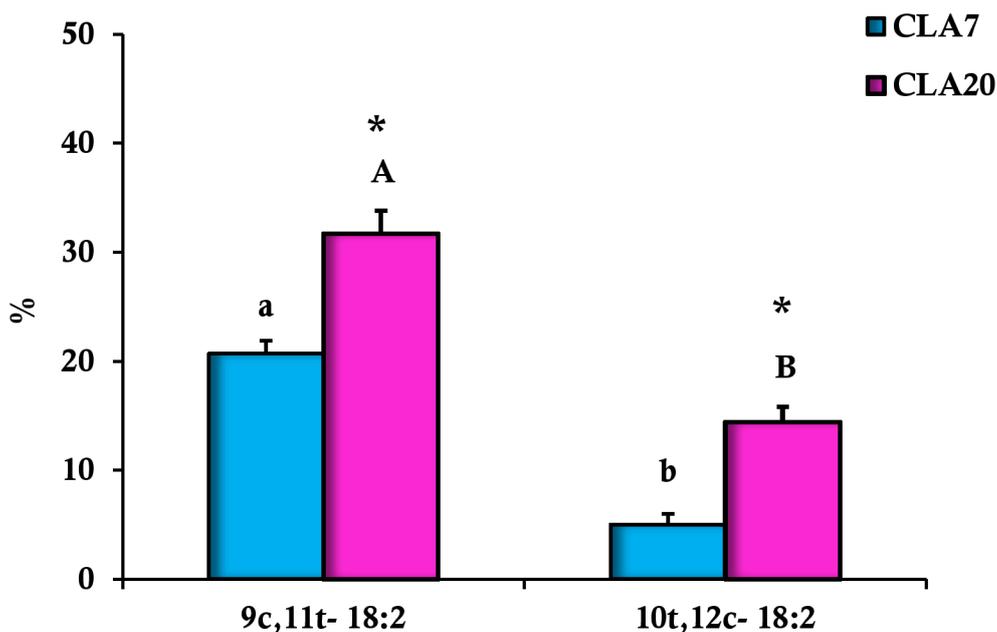
Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p<0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; CLA, p<0,05 para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. NI: ácidos grasos no identificados, ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados, ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis, ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis.

II.7.2. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS HEPÁTICOS

Los isómeros CLA presentes en las dietas fueron incorporados en hígado mostrando una dependencia con el nivel de grasa, tanto para el RA como para el isómero 10t,12c-18:2 (Figura 38). Por otro lado, se observó que aunque las dietas

contenían cantidades equimoleculares de RA y 10t,12c-18:2, la retención del isómero RA fue 4 veces mayor que la del isómero 10t,12c-18:2 a niveles recomendados de grasa y 2 veces mayor a elevados niveles de grasa dietaria.

Figura 38: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la retención de los isómeros 9c,11t-18:2 y 10t,12c-18:2



Resultados expresados como promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico: test de Student. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras diferentes en mayúsculas y minúsculas indican diferencia significativa entre los CLA dentro del mismo grupo dietario; (*) indica diferencia significativa de cada CLA entre los distintos grupos dietarios. CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa dietaria parcialmente sustituida con CLA; CLA20, dieta de elevados niveles de grasa parcialmente sustituida con CLA.

El perfil de AG de hígado fue modificado en distinto grado por la presencia de CLA y por el nivel de grasa ofrecida (Tabla 21).

Tabla 21: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de ácidos grasos de lípidos hepáticos

Ácidos grasos	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
16:0	19,99±0,15 ^a	21,84±0,28 ^b	17,0±0,50 ^c	17,76±0,37 ^c	G,CLA
18:0	11,85±0,16 ^{a,b}	12,75±0,27 ^b	10,63±0,35 ^a	11,44±1,07 ^{a,b}	G,CLA
9c-16:1	1,22±0,31 ^a	0,89±0,11 ^b	0,30±0,07 ^c	0,27±0,05 ^c	G,CLA,GxCLA
OA	13,00±0,29 ^a	11,13±0,34 ^b	16,91±1,45 ^c	14,66±0,36 ^a	G,CLA
11c-18:1	2,27±0,17 ^a	1,84±0,05 ^b	1,42±0,07 ^c	1,11±0,01 ^d	G,CLA,GxCLA
11c-20:1	0,16±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	0,27±0,02 ^c	0,00±0,00 ^b	G,CLA,GxCLA
LA	24,38±1,31 ^a	23,87±0,81 ^a	29,64±1,32 ^b	29,52±0,63 ^b	G
RA	0,00±0,00 ^a	1,06±0,10 ^b	0,00±0,00 ^a	1,62±0,13 ^c	G,CLA,GxCLA
10t,12c-18:2	0,00±0,00 ^a	0,26±0,04 ^b	0,00±0,00 ^a	0,75±0,08 ^c	G,CLA,GxCLA
GLA	0,84±0,04 ^a	0,48±0,01 ^b	0,34±0,01 ^c	0,47±0,02 ^b	G,CLA,GxCLA
ALA	0,29±0,01	0,35±0,04	0,34±0,01	0,38±0,06	NS
11c,14c-20:2	0,32±0,02 ^a	0,16±0,01 ^b	0,58±0,05 ^c	0,36±0,01 ^a	G,CLA,GxCLA
DGLA	0,31±0,02 ^a	0,20±0,01 ^b	0,52±0,04 ^c	0,19±0,01 ^b	G,CLA
AA	19,0±0,1 ^a	18,2±0,6 ^a	16,3±0,9 ^b	15,4±0,4 ^b	G
7c,10c,13c,16c-22:4	1,15±0,10 ^a	0,89±0,04 ^{a,b}	1,20±0,10 ^a	0,84±0,07 ^b	CLA
4c,7c,10c,13c,16c-22:5	2,12±0,04 ^a	1,68±0,21 ^{a,b}	0,98±0,04 ^c	1,12±0,22 ^{b,c}	G,CLA
7c,10c,13c,16c,19c-22:5	0,36±0,01 ^a	0,41±0,06 ^a	0,45±0,02 ^a	0,24±0,01 ^b	G,CLA
DHA	1,82±0,06	2,10±0,22	1,82±0,10	1,85±0,15	NS
Σ SFA	31,85±0,17 ^a	34,59±0,51 ^b	27,63±0,32 ^c	29,29±0,58 ^a	G,CLA,GxCLA
Σ MUFA	16,64±0,31 ^a	13,85±0,40 ^b	18,91±1,54 ^c	16,04±0,71 ^a	G,CLA,GxCLA
Σ PUFA	50,57±0,25 ^a	47,48±0,56 ^b	52,52±1,14 ^a	49,44±0,64 ^{a,b}	G,CLA
Menores-NI	1,54±0,44		1,06±0,26		

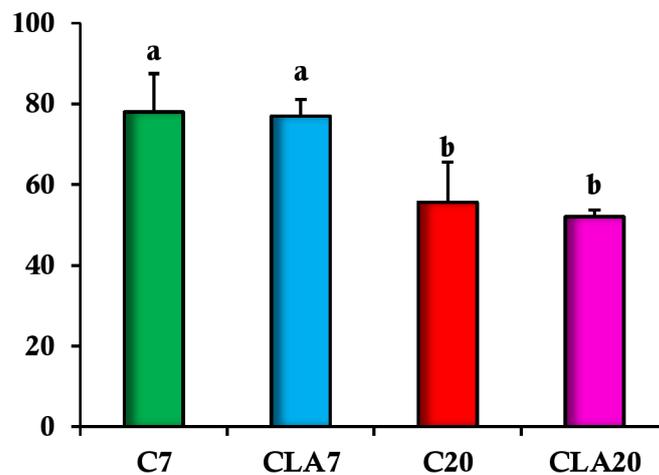
Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p<0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; CLA, p<0,05 para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. NI: ácidos grasos no identificados, ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados, ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis, ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis.

Los SFA totales aumentaron a niveles recomendados de grasa en presencia de CLA asociado a un aumento de los ácidos palmítico y esteárico. En los animales que recibieron las dietas C20 y CLA20 los niveles de los AGS disminuyeron, mostrando una tendencia a niveles más elevados en aquellos animales que recibieron CLA. Estos cambios estuvieron relacionados con una disminución significativa de ácido palmítico.

Los ácidos palmitoleico y cis-vaccénico se encontraron disminuidos significativamente en hígado por la presencia de CLA y por la alta cantidad de grasa, observándose un efecto aditivo de ambas variables. El ácido oleico disminuyó en CLA7 vs. C7; mientras que en C20 aumentó significativamente vs. C7, la sustitución con CLA a elevados niveles de grasa restauró los niveles encontrados en el grupo C7. Los niveles hepáticos de LC-PUFA totales fueron modificados por la adición de CLA a recomendados niveles de grasa. El análisis individual de los LC-PUFA mostró un aumento significativo de LA en los animales que recibieron las dietas C20 y CLA20. El GLA disminuyó por la presencia de CLA y el nivel de grasa; el DGLA incrementó por el nivel de grasa dietaria y disminuyó en presencia de CLA independientemente del nivel de grasa; mientras que el contenido de AA sólo disminuyó a alto nivel de grasa. Con respecto a los LC-PUFA de la familia n-3, los niveles de ALA no fueron modificados por la adición de CLA, ni por nivel de grasa; mientras que el ácido docosapentanoico disminuyó en el grupo CLA20 y el contenido de DHA no fue modificado.

La biosíntesis hepática de LC-PUFA de la serie n-6, expresada por la relación porcentual producto/sustrato: AA/LA (Figura 39), mostró una dependencia del nivel de grasa dietaria y no de los isómeros CLA. Así, la misma fue significativamente reducida en los grupos C20 y CLA20 vs. C7 y CLA7, respectivamente.

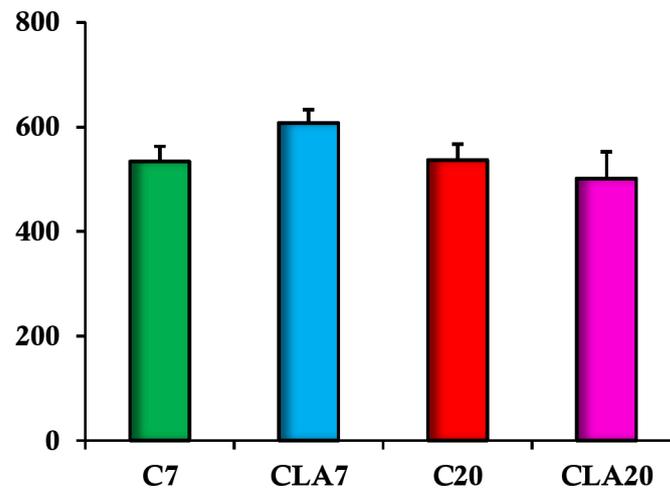
Figura 39: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico Conjugado sobre la relación porcentual de ácido araquidónico/ ácido linoleico en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

A diferencia de la biosíntesis de LC-PUFA de la familia n-6, la de los n-3 representados por la relación porcentual de DHA/ALA (Figura 40) no mostró modificaciones en los distintos grupos dietarios.

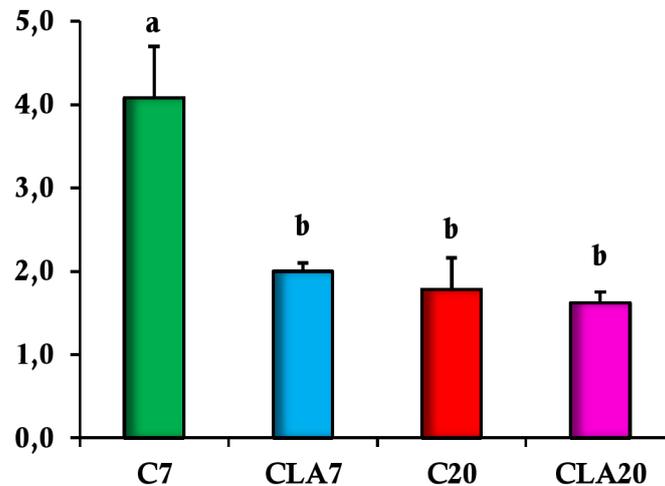
Figura 40: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la relación porcentual ácido docosahexanoico/ ácido α -linolénico en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

El índice de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa (estimado por la relación GLA/LA), clave en la síntesis de AA, disminuyó por la presencia de CLA y el nivel de grasa dietaria (Figura 41).

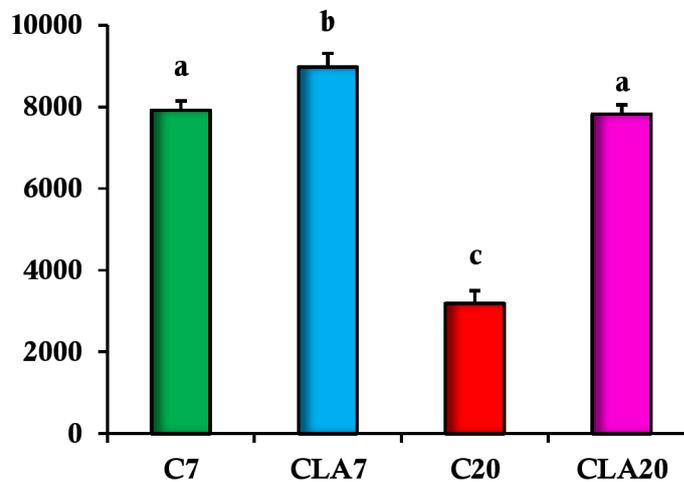
Figura 41: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la relación ácido α -linolénico/ ácido linoleico en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

El índice de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa, representado por la relación AA/DGLA incrementó por la sustitución con CLA a nivel recomendado de grasa y disminuyó significativamente a elevado nivel de grasa dietaria, la presencia de CLA en el grupo CLA20 atenuó el efecto del nivel de grasa y este índice alcanzó valores similares a los observados en el grupo C7 (Figura 42).

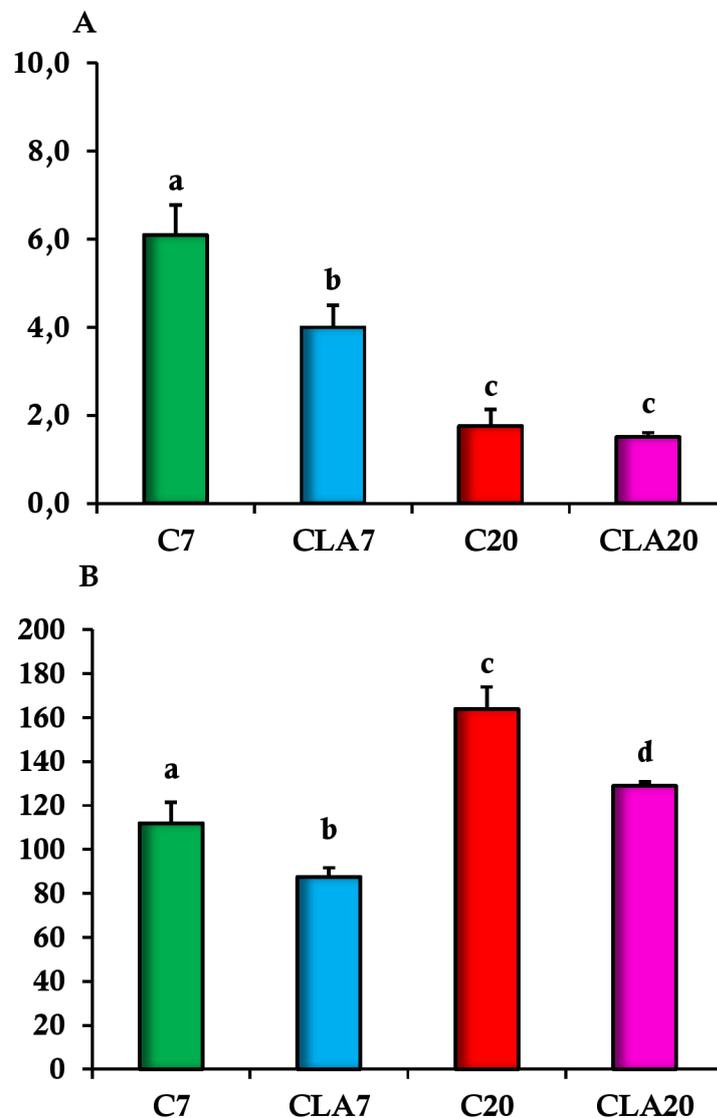
Figura 42: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la relación porcentual ácido araquidónico/ ácido dihomo γ -linolénico en hígado



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

Las relaciones del ácido palmitoleico/ ácido palmítico y ácido oleico/ esteárico reflejan el índice de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa (SCD-1). Las mismas fueron afectadas por la presencia de CLA y el nivel de grasa dietaria. La adición de CLA a niveles recomendados, como a alto nivel de grasa, disminuyeron significativamente la relación 16:1/16:0 (Figura 43-A). La relación 18:1/18:0 disminuyó por la presencia de CLA a niveles recomendados y elevados de grasa y aumentó significativamente por altos niveles de grasa suministrada (Figura 43-B).

Figura 43: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el flujo a través de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa expresado por la relación porcentual: ácido palmitoleico/ ácido palmítico (A) y ácido oleico/ ácido esteárico (B) en hígado

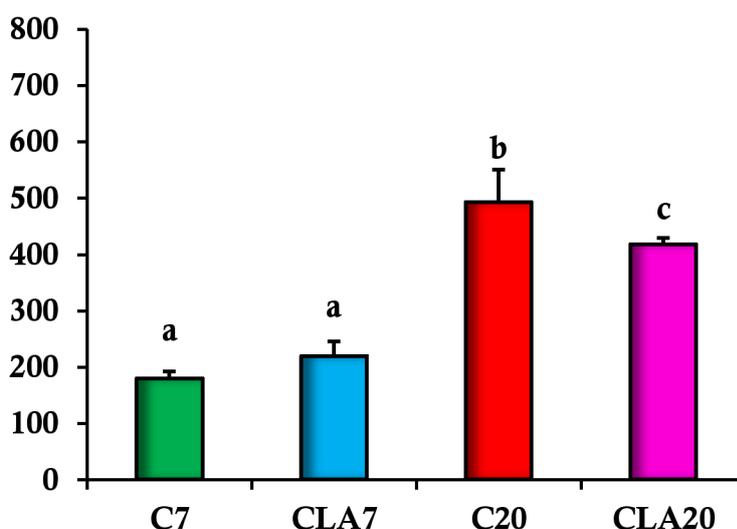


Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

Los niveles de ácido palmitoleico y cis-vaccénico, intermediarios clave en la síntesis de novo de AG, fueron afectados principalmente por el nivel de grasa de la dieta. La relación entre ambos MUFA, que refleja el flujo a través de la enzima

elongasa de la serie n-7, se mostró significativamente incrementada en los grupos que recibieron dietas ricas en grasa y se observó que este aumento fue menos marcado cuando los animales recibieron dieta CLA20 (Figura 44).

Figura 44: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el flujo a través de la enzima elongasa expresado por la relación porcentual ácido cis-vaccénico/ ácido palmitoleico en hígado



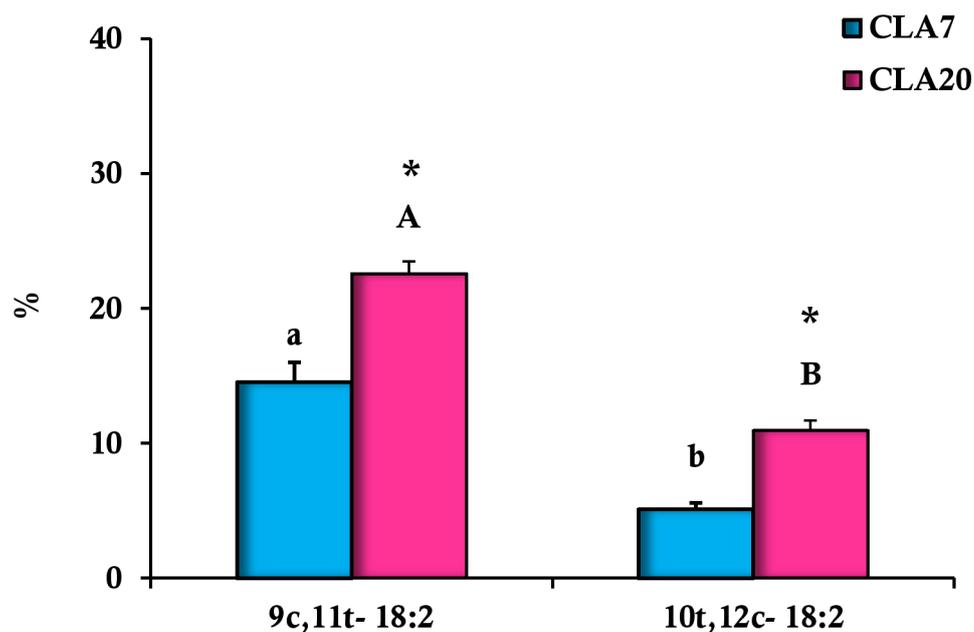
Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

II.7.3. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS SECRETADOS POR EL HÍGADO

La presencia de CLA se observó en los lípidos secretados por el hígado a la circulación en los animales alimentados con ambos niveles de grasa parcialmente sustituida con dichos isómeros. Su retención fue mayor en el grupo alimentado con elevados niveles de grasa y, como se observara en suero en ayunas, el isómero

10t,12c-18:2 fue menos retenido que el RA en ambos grupos, CLA7 y CLA20 (Figura 45).

Figura 45: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la retención de los isómeros 9c,11t-18:2 y 10t,12c-18:2 en suero secretado por el hígado



Resultados expresados como promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico: test de Student. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras diferentes en mayúsculas y minúsculas indican diferencia significativa entre los CLA dentro del mismo grupo dietario; (*) indica diferencia significativa de cada CLA entre los distintos grupos dietarios. CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa dietaria parcialmente sustituida con CLA; CLA20, dieta de elevados niveles de grasa parcialmente sustituida con CLA.

La composición de AG en suero de animales ayunados post-inyección de Triton WR 1339 se muestra en la Tabla 22.

Los SFA totales fueron modificados significativamente por la presencia de CLA a ambos niveles de grasa dietaria y estos resultados estuvieron asociados a un aumento del ácido esteárico, mientras que el ácido palmítico no fue modificado.

Tabla 22: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de lípidos secretados por el hígado

Ácidos grasos	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
16:0	21,53±0,81	22,80±0,43	21,41±0,54	22,51±0,68	NS
18:0	15,10±0,59 ^a	17,78±0,29 ^b	15,20±0,69 ^a	17,00±0,31 ^b	CLA
9c-16:1	1,15±0,10 ^a	0,94±0,04 ^a	0,42±0,06 ^b	0,20±0,01 ^c	G,CLA,GxCLA
OA	10,19±0,64 ^{a,b}	9,69±0,54 ^a	10,18±0,47 ^{a,b}	10,69±0,48 ^b	G
11c-18:1	1,75±0,05 ^a	1,47±0,02 ^b	1,23±0,05 ^b	0,96±0,01 ^c	G,CLA,GxCLA
LA	21,53±0,81 ^a	19,22±0,26 ^a	25,93±0,75 ^b	24,91±0,14 ^b	G,CLA
RA	0,00±0,00 ^a	0,75±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	1,16±0,05 ^c	G,CLA,GxCLA
10t,12c-18:2	0,00±0,00 ^a	0,27±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	0,57±0,04 ^c	G,CLA,GxCLA
GLA	0,62±0,06 ^a	0,42±0,05 ^b	0,54±0,01 ^{a,b}	0,34±0,04 ^c	G,CLA,GxCLA
ALA	0,58±0,03 ^a	0,75±0,08 ^b	0,56±0,06 ^a	1,16±0,05 ^c	G,CLA,GxCLA
11c, 14c-20:2	0,14±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b	0,37±0,04 ^c	0,00±0,00 ^b	G,CLA,GxCLA
DGLA	0,20±0,01 ^a	0,09±0,02 ^b	0,14±0,03 ^b	0,24±0,03 ^a	G,GxCLA
AA	21,69±0,44 ^a	21,77±0,29 ^a	18,84±0,26 ^b	17,64±0,11 ^b	G
7c,10c,13c,16c-22:4	0,69±0,06 ^a	0,54±0,03 ^b	0,64±0,06 ^a	0,59±0,12 ^b	CLA
4c,7c,10c,13c,16c-22:5	1,00±0,07 ^a	1,04±0,05 ^a	0,86±0,03 ^b	1,00±0,03 ^a	G,CLA
7c,10c,13c,16c,19c-22:5	0,20±0,07 ^a	0,00±0,00 ^b	0,19±0,02 ^a	0,00±0,00 ^b	CLA
DHA	1,68±0,16 ^a	1,72±0,01 ^a	1,39±0,14 ^{a,b}	1,26±0,20 ^b	G
Σ SFA	36,62±0,82 ^a	40,57±0,55 ^b	36,61±0,85 ^a	39,51±0,52 ^b	CLA
Σ MUFA	13,09±0,85	12,10±0,58	11,83±0,66	11,85±0,47	NS
Σ PUFA	47,96±0,77 ^a	44,77±0,76 ^b	48,24±0,34 ^a	43,79±0,67 ^b	CLA
Menores-NI	2,33±0,22	2,03±0,64	3,31±0,85	2,83±0,52	

Resultados expresados como el promedio ± SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: p<0,05. NS, p>0,05, no significativo; G, p<0,05 para el efecto de la grasa dietaria; CLA, p<0,05 para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, p<0,05 para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. NI: ácidos grasos no identificados, ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados, ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis, ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis.

Los niveles de ácido palmitoleico en las lipoproteínas secretadas por el hígado, fueron significativamente disminuidos por el contenido de grasa de la dieta, mostrando un efecto aditivo por la sustitución con CLA a elevado nivel de grasa. El ácido oleico no mostró cambios, mientras que el cis-vaccénico disminuyó significativamente por la presencia de CLA y por elevados niveles de grasa, mostrando un efecto aditivo en CLA20.

Los niveles de LA fueron incrementados significativamente por altos niveles de grasa dietaria. El GLA disminuyó significativamente por la presencia de CLA, mientras que el AA disminuyó por el nivel de grasa dietaria. El ALA aumentó por la presencia de CLA en la dieta a ambos niveles de grasa, siendo mayor el aumento en CLA20. El ácido docosapentaenoico disminuyó por debajo del nivel de detección en las dietas sustituida parcialmente con CLA a ambos niveles de grasa, mientras que el DHA de los lípidos de las VLDL secretadas por el hígado, se mostró ligeramente disminuido por la presencia de CLA a altos niveles de grasa dietaria. Los niveles totales de LC-PUFA disminuyeron significativamente por la presencia de CLA a ambos niveles de grasa.

II.7.4. ÁCIDOS GRASOS DE LÍPIDOS BILIARES

Los CLA fueron incorporados en los AG de bilis, e igualmente que en hígado su retención estuvo relacionada con la cantidad ofrecida en la dieta, es decir a mayor ingesta, mayor contenido de isómeros en los lípidos biliares (Tabla 23).

Los SFA totales en bilis mostraron una dependencia de la presencia de CLA y del nivel de grasa. Así, se observó que disminuyó significativamente su contenido por la presencia de CLA a niveles recomendados de grasa, como también disminuyó a elevados niveles de grasa en ausencia de CLA. La adición de CLA a altos niveles de grasa ocasionó valores de SFA totales similares a los del grupo C7. Las variaciones mencionadas se correlacionaron con cambios en el nivel de ácido palmítico en bilis, sin mostrar modificaciones en el contenido de ácido esteárico.

Tabla 23: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de ácidos grasos de lípidos de la bilis

Ácidos grasos	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
16:0	45,63±0,54 ^a	40,72±1,08 ^b	38,66±0,36 ^b	46,05±0,52 ^a	CLA
18:0	6,68±0,34	6,09±0,21	6,88±0,21	6,67±0,14	NS
9c-16:1	1,04±0,13 ^a	0,89±0,09 ^a	0,47±0,01 ^b	0,33±0,07 ^b	G,CLA
OA	4,65±0,20	4,53±0,32	4,28±0,06	4,03±0,45	NS
11c-18:1	1,31±0,09 ^a	1,14±0,14 ^{a,b}	0,91±0,02 ^{a,b}	0,73±0,10 ^b	G,CLA
LA	24,29±0,82	24,64±0,44	25,73±1,43	23,46±0,05	NS
RA	0,00±0,00 ^a	0,20±0,03 ^b	0,00±0,00 ^a	0,30±0,03 ^c	G,CLA,GxCLA
10t,12c-18:2	0,00±0,00 ^a	0,18±0,01 ^b	0,00±0,00 ^a	0,34±0,02 ^c	G,CLA,GxCLA
AA	14,34±0,44 ^a	18,61±0,48 ^b	20,14±0,55 ^c	15,80±0,95 ^a	G
DHA	0,98±0,07 ^a	0,92±0,01 ^a	1,23±0,07 ^b	0,83±0,01 ^a	G,CLA
Σ SFA	52,31±0,69 ^a	46,81±1,22 ^b	45,54±0,57 ^b	52,73±0,67 ^a	CLA
Σ MUFA	7,01±0,34 ^a	6,56±0,12 ^a	5,66±0,09 ^b	5,09±0,52 ^b	G
Σ PUFA	39,61±0,55 ^a	44,18±0,83 ^b	47,10±0,81 ^b	40,09±0,88 ^a	G,CLA
Menores-NI	1,07±0,30	2,08±0,25	1,70±0,14	1,45±0,52	

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. NS, $p > 0,05$, no significativo; G, $p < 0,05$ para el efecto de la grasa dietaria; CLA, $p < 0,05$ para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, $p < 0,05$ para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. NI: ácidos grasos no identificados, ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados, ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis, ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis.

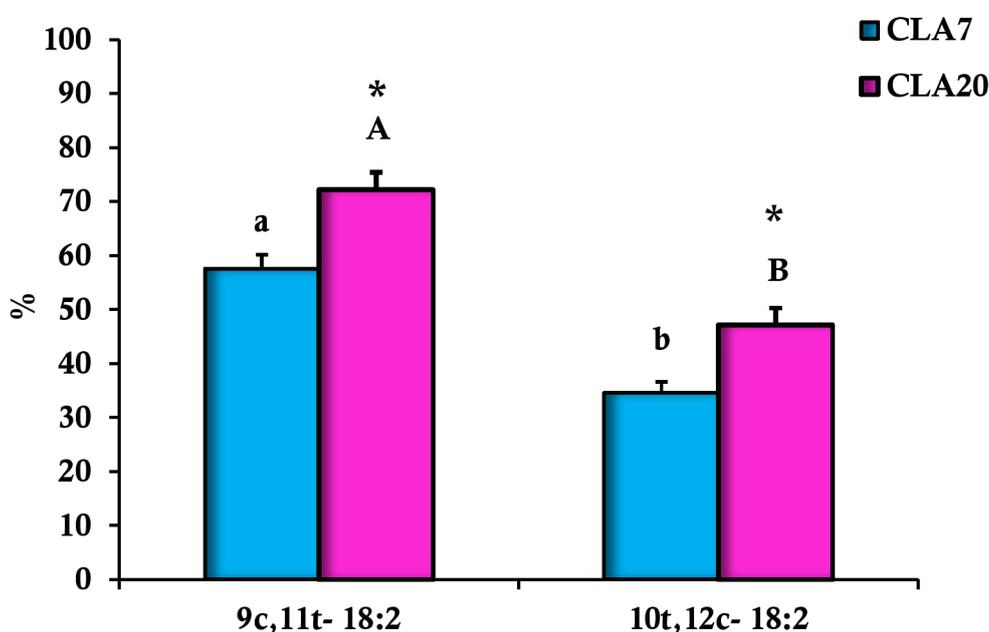
Los MUFA totales en bilis disminuyeron por del nivel de grasa de la dieta, y esta disminución estuvo asociada a un contenido significativamente menor de ácido palmitoleico y cis-vaccénico en bilis de animales alimentados con dieta C20, mientras que el contenido de ácido oleico no mostró modificaciones en ninguno de los grupos dietarios.

Los LC-PUFA totales en bilis fueron afectados por la presencia de CLA y el nivel de grasa. Se observó un aumento significativo de AA en la bilis de animales alimentados con CLA7, así como también con altos niveles de grasa, aunque, llamativamente, en el grupo CLA20 se observaron valores de AA similares a los encontrados en bilis de ratas alimentadas con dieta C7. Los niveles de LA y GLA no se modificaron. De los LC-PUFA de la familia n-3, solo fue detectado el DHA en bilis, no mostrando cambios por los tratamientos dietarios.

II.7.5. ÁCIDOS GRASOS DE TEJIDO ADIPOSO

Como fuera mencionado anteriormente los isómeros CLA fueron incorporados y retenidos en TAE en relación a la cantidad de grasa consumida, siendo 30,5% más elevada la retención en el grupo CLA20 vs. CLA7 (Figura 46). Asimismo, los niveles del isómero 10t,12c-18:2 fueron significativamente menores a los del 9c,11t-18:2.

Figura 46: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico Conjugado sobre la retención de los isómeros 9c,11t-18:2 y 10t,12c-18:2 en tejido adiposo epididimal



Resultados expresados como promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico: test de Student. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras diferentes en mayúsculas y minúsculas indican diferencia significativa entre los CLA dentro del mismo grupo dietario; (*) indica diferencia significativa de cada CLA entre los distintos grupos dietarios. CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa dietaria parcialmente sustituida con CLA; CLA20, dieta de elevados niveles de grasa parcialmente sustituida con CLA.

Los CLA modificaron los AG del TAE (Tabla 24). Los niveles de SFA totales en TAE aumentaron por la presencia de CLA a niveles recomendados de grasa y disminuyeron en los grupos que recibieron dieta con elevado nivel de grasa, independientemente de la presencia de CLA. Esto estuvo asociado a cambios en los

niveles de ácido palmítico en estos grupos. El contenido de ácido esteárico no presentó modificaciones.

Los niveles de ácido palmitoleico disminuyeron significativamente por la presencia de CLA a niveles recomendados y más aún a alto nivel de grasa dietaria, mientras que el ácido oleico disminuyó por la presencia de CLA y aumentó por la elevada cantidad de grasa. El contenido de ácido cis-vaccénico en TAE disminuyó significativamente por el nivel de grasa.

Los LC-PUFA totales disminuyeron por la sustitución con CLA y aumentaron por el nivel de grasa. Esto estuvo en concordancia con una reducción significativa del LA y AA por el elevado nivel de grasa y un aumento de los mismos en ambos niveles por la presencia de CLA. El resto de los LC-PUFA de las series n-6 y n-3, disminuyeron significativamente por la presencia de CLA e incrementaron por cambios por el nivel de grasa dietaria.

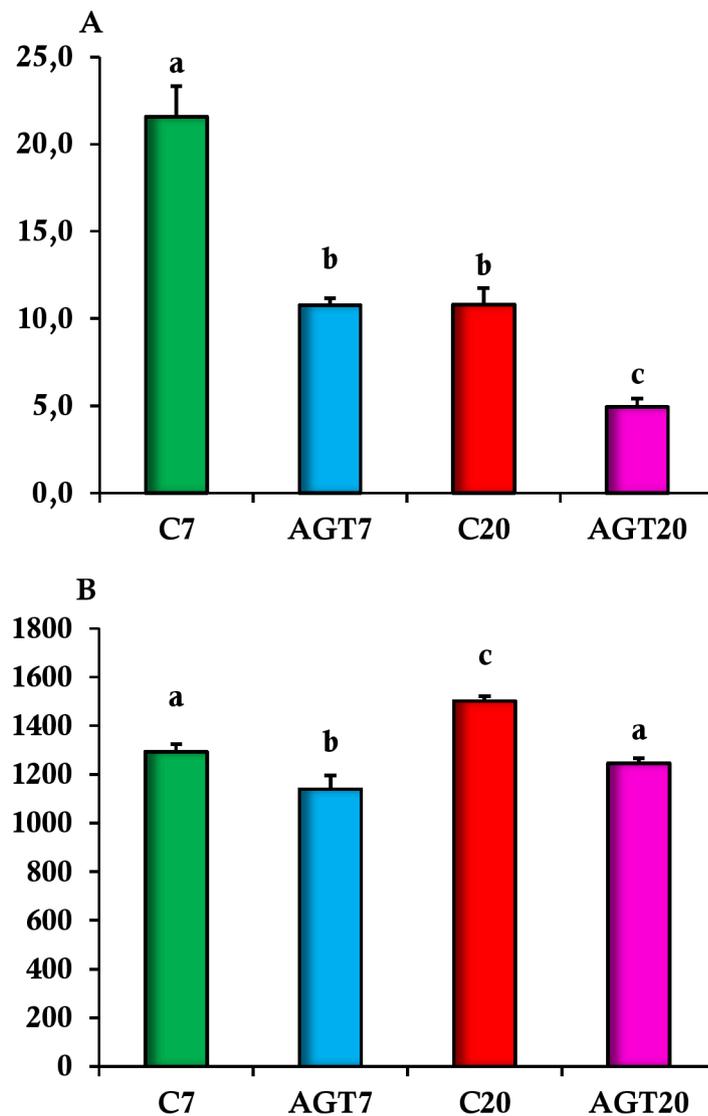
Tabla 24: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre la composición porcentual de lípidos del tejido adiposo epididimal

Ácidos grasos	C7	CLA7	C20	CLA20	ANOVA
16:0	21,19±0,45 ^a	25,36±0,48 ^b	14,60±0,27 ^c	14,76±0,61 ^c	G,CLA
18:0	2,34±0,16	2,36±0,06	2,12±0,02	2,36±0,04	NS
9c-16:1	4,58±0,32 ^a	2,74±0,18 ^b	1,58±0,14 ^c	0,72±0,06 ^d	G,CLA,GxCLA
OA	29,88±0,30 ^a	26,76±0,27 ^b	31,86±0,51 ^c	29,41±0,52 ^a	G,CLA
11c-18:1	3,01±0,19 ^a	3,02±0,19 ^a	1,27±0,21 ^b	1,56±0,08 ^b	G
LA	34,29±0,63 ^a	30,17±1,04 ^b	44,50±0,53 ^c	41,17±0,42 ^d	G,CLA
RA	0,00±0,00 ^a	2,95±0,13 ^b	0,00±0,00 ^a	3,70±0,15 ^c	G,CLA,GxCLA
10t,12c-18:2	0,00±0,00 ^a	1,80±0,04 ^b	0,00±0,00 ^a	2,48±0,15 ^c	G,CLA,GxCLA
GLA	0,11±0,01 ^a	0,00±0,00 ^b	0,09±0,01 ^a	0,00±0,00 ^b	CLA
ALA	0,85±0,06 ^a	0,66±0,01 ^b	0,88±0,08 ^a	0,80±0,04 ^a	G,CLA
11c,14c-20:2	0,18±0,03 ^a	0,09±0,02 ^b	0,25±0,04 ^c	0,16±0,01 ^a	G,CLA
DGLA	0,12±0,02 ^a	0,03±0,01 ^b	0,14±0,01 ^a	0,05±0,01 ^b	G,CLA
AA	0,83±0,07 ^a	0,32±0,03 ^b	1,02±0,19 ^a	0,46±0,04 ^c	G,CLA
7c,10c,13c,16c-22:4	0,19±0,02 ^a	0,05±0,01 ^b	0,22±0,04 ^a	0,07±0,01 ^b	G,CLA
4c,7c,10c,13c,16c-22:5	0,07±0,01 ^a	0,03±0,01 ^b	0,13±0,02 ^a	0,05±0,01 ^b	G,CLA
7c,10c,13c,16c,19c-22:5	0,04±0,01 ^a	0,02±0,01 ^b	0,05±0,01 ^a	0,00±0,00 ^c	CLA
DHA	0,05±0,01 ^a	0,04±0,01 ^a	0,07±0,02 ^b	0,04±0,01 ^a	G,CLA
Σ SFA	23,54±0,65 ^a	27,72±1,36 ^b	16,72±0,30 ^b	17,12±0,64 ^b	G,CLA
Σ MUFA	37,46±0,67 ^a	32,52±0,28 ^b	34,71±0,29 ^{a,b}	31,69±0,56 ^b	G,CLA
Σ PUFA	36,41±0,61 ^a	31,29±1,43 ^b	46,97±0,44 ^c	42,59±0,41 ^d	G,CLA,GxCLA
Menores-NI	2,59±0,23	3,71±0,12	1,60±0,25	2,44±0,11	-

Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. NS, $p > 0,05$, no significativo; G, $p < 0,05$ para el efecto de la grasa dietaria; CLA, $p < 0,05$ para el efecto de la adición de CLA; GxCLA, $p < 0,05$ para el efecto de la interacción de las dos variables. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control a elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA. NI: ácidos grasos no identificados, ΣSFA: sumatoria de ácidos grasos saturados, ΣMUFA: sumatoria de ácidos grasos monoinsaturados cis, ΣPUFA: sumatoria de ácidos grasos poliinsaturados cis.

La relación palmítico/ palmitoleico disminuyó significativamente por el nivel de grasa suministrada y por la presencia de CLA a ambos niveles de grasa, observándose un efecto aditivo (Figura 47-A). La relación oleico/ esteárico aumentó significativamente por el nivel de grasa, pero disminuyó cuando consumieron CLA a ambos niveles de grasa (Figura 47-B).

Figura 47: Efecto de los Conjugados del Ácido Linoleico sobre el flujo a través de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa expresado por la relación porcentual ácido palmitoleico/ ácido palmítico (A) y ácido oleico/ ácido esteárico (B) en tejido adiposo epididimal



Resultados expresados como el promedio \pm SEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (2X2) seguido de test de Scheffé. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos. C, dieta control; CLA7, dieta a niveles recomendados de grasa parcialmente sustituida con CLA; C20, dieta control de elevados niveles de grasa; CLA20, dieta de elevado nivel de grasa parcialmente sustituida con CLA.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN-PARTE I

EFFECTOS DE LOS ÁCIDOS GRASOS TRANS A NIVELES RECOMENDADOS Y ELEVADOS DE GRASA DIETARIA

Debido a que actualmente existen numerosas controversias sobre los efectos de los ácidos grasos trans (AGT) a niveles recomendados de grasa sobre el estado nutricional y regulación metabólica de los lípidos, la primer parte de este trabajo de tesis investigó, en un modelo experimental animal, el efecto diferencial de AGT industriales en dietas con niveles recomendados y altos de grasa sobre parámetros nutricionales y mecanismos implicados en la regulación de triacilglicéridos (TAG).

Se evaluaron aspectos nutricionales como la ganancia de peso, el balance de N, la eficiencia energética de las dietas, composición corporal y retención energética corporal. En referencia al metabolismo lipídico, se enfatizó en la incorporación y retención de los diferentes AGT de la grasa dietaria en suero, diferentes tejidos y secreciones; en las modificaciones del perfil de ácidos grasos (AG), lípidos plasmáticos y tisulares; potenciales cambios metabólicos y posibles mecanismos involucrados en la regulación de los TAG. Asimismo, con el fin de dilucidar dichos mecanismos, se evaluó actividad y la expresión de enzimas que intervienen en la síntesis y oxidación de AG, como así también de los factores de transcripción que modulan su expresión.

I.1.MODELO EXPERIMENTAL

Esta Tesis se desarrolló en un modelo experimental animal empleando ratas macho de la cepa Wistar. En la especie elegida se pueden inducir alteraciones metabólicas observadas en humanos y obtener mayor precisión al evaluar las variaciones en diferentes parámetros nutricionales. La utilización de animales

machos se basó en la necesidad de minimizar los efectos de las hormonas sexuales sobre diferentes efectos en el metabolismo lipídico. Al inicio del tratamiento dietario se consideró que los animales se encontraban en pleno desarrollo, esto permitió evaluar el potencial impacto de las dietas en un período etario de alta demanda nutricional y alta tasa de recambio metabólico. La incorporación de AGT en la etapa de crecimiento, así como también su metabolización, podrían provocar serias alteraciones en el metabolismo lipídico y eventualmente predisponer al desarrollo de alteraciones observadas en ciertas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT). Asimismo, este trabajo de tesis forma parte de una línea de investigación que se viene desarrollando dentro del grupo, en la cual se evaluaron los efectos de distintos isómeros de AG en diversos diseños experimentales. El presente estudio permitió observar efectos diferenciales de isómeros de AG en dietas conteniendo niveles recomendados y elevados de grasa dietaria mimetizando consumos alcanzables por la población humana.

La fuente de grasa principal elegida fue aceite de maíz, el cual es rico en ácido linoleico (LA), para lograr dietas desequilibradas en las relaciones de AG de las familias n-6: n-3, las cuales caracterizan al consumo de la población occidental. Las dietas con niveles recomendados de grasa se basaron en las recomendaciones del Comité ad hoc del “American Institute of Nutrition” para roedores en crecimiento, AIN-93G (Reeves y col., 1993); mientras que el elevado contenido de grasa en los otros grupos dietarios son compatibles con los niveles observados frecuentemente en diversas poblaciones. La fuente de AGT seleccionada fue un aceite vegetal parcialmente hidrogenado (AVPH), habitualmente utilizado por la industria alimenticia para la elaboración de productos de consumo humano. Es importante consignar que este AVPH está compuesto principalmente por los isómeros: ácido eláidico (EA), ácido trans-vaccénico (VA), 10t-18:1, más otros AGT en cantidades menores. Los niveles relativos de estos isómeros individuales fueron 10t-18:1 > VA > 12t18:1 > EA > (6-8)t-18:1.

Si bien existen en la bibliografía una serie de trabajos en los que se estudiaron efectos específicos de algunos AGT (Meijer y col., 2001; Lovejoy y col., 2002; Faulconnier y col., 2006; Roy y col., 2007; Field y col., 2009; Wang y col., 2008; Du y col., 2010; Shao y Ford, 2014), pocos trabajos evaluaron los efectos de dietas conteniendo mezclas de AGT con equivalentes proporciones de aquellos con conocidos efectos benéficos o deletéreos, como en el caso del AVPH comercial

empleado en el presente trabajo. Además, es dable considerar que mezclas de aceites dietarios conteniendo diferentes cantidades y tipos de AGT podrían tener un efecto metabólico distinto que el de los isómeros individuales (Tyburczy y col., 2009). Por otro lado, el impacto de la ingesta de altos niveles de AGT han sido evaluados en numerosos estudios, pero luego de que su consumo disminuyera en los últimos años, a nuestro conocimiento, aún hay escasas evidencias en modelos experimentales animales de los efectos de una ingesta baja o moderada de los mismos.

En la presente tesis, en las dietas experimentales conteniendo AGT, se sustituyó parte del aceite de maíz por AVPH, por lo cual los efectos observados fueron considerados consecuencia de la composición de AG derivada de la combinación de ambas fuentes de grasas, así como también de la cantidad de grasa ofrecida en cada dieta. Por otro lado, dado que la proporción AG en la dieta influye en la retención de AG en los tejidos, y por lo tanto en sus efectos biológicos (Saín y col., 2013; Scalerandi y col., 2014), se combinaron los aceites de manera tal que la composición relativa de los isómeros individuales AGT y los otros AG en las dietas AGT7 y AGT20 fuera idéntica. El contenido de AGT fijado para las dietas AGT7 y AGT20 representa el 1,17% y el 2,86 % de la energía total respectivamente, y asemejan niveles de consumo factibles de ser alcanzados por la población.

I.2. PARÁMETROS NUTRICIONALES

En diversos trabajos sobre los efectos de los AGT se ha evaluado su impacto sobre parámetros nutricionales, aunque los resultados obtenidos fueron controversiales. Las variables introducidas en los diseños experimentales; principalmente la especie animal elegida, período experimental, como así también la cantidad y composición de AG de las materias grasas utilizadas en las dietas pudieron haber incidido sobre tales efectos. Recientes resultados de este grupo de investigación mostraron que ratas Wistar alimentadas con dietas a niveles recomendados de grasa ricas en ácido linoleico (LA) sustituidas parcialmente con AGT aumentaron la ganancia de peso corporal, asociado a mayores panículos grasos y a una tendencia a mayor retención de grasa en la carcasa (Fariña y col., 2015a). Estos datos son coincidentes con lo observado en el presente trabajo; mientras que, a

altos niveles de grasa los AGT no potenciaron el aumento de peso corporal y acumulación de grasa incrementados por el elevado nivel de grasa dietaria. Cabe consignar que en ambos estudios se utilizó AVPH con igual composición de AGT, así como también se mantuvieron las relaciones de AG en las mezclas utilizadas en la dieta.

En resultados previos de nuestro grupo se ha encontrado que ratas Wistar alimentadas con dietas enriquecidas en AGT a elevados niveles de grasa (20%) incrementaron el tejido adiposo epididimal (TAE) y tejido adiposo retroperitoneal (TARP) sin modificar la ganancia de peso corporal (Colandré y col., 2003). A diferencia de dicho trabajo, en la presente tesis la mayor acreción de los depósitos grasos y retención energética grasa en la carcasa estuvieron asociadas a una mayor ganancia de peso corporal. Estas diferencias encontradas pudieron deberse a la composición de AGT de los AVPH, dado que Colandré y col. (2003) utilizaron un aceite isomerizado rico en EA, mientras que el AVPH empleado en el presente estudio fue predominantemente una mezcla de isómeros EA, VA y 10t-18:1 en cantidades similares.

En concordancia con nuestros resultados Dorfman y col. (2009) reportaron un incremento en la ganancia de peso corporal y en los depósitos grasos en ratas alimentadas a niveles recomendados de grasa con sustitución de AGT; asimismo, observaron similares alteraciones en ratas alimentadas con dietas ricas en grasa. Dhibi y col. (2011) también encontraron que los AGT tienden a aumentar el peso corporal en grupos de ratas Wistar alimentadas con altos niveles de aceite de soja y margarina, sin cambios en la eficiencia energética (EE). Ha sido reportado que dietas conteniendo distintos niveles de AGT y diferentes niveles de grasa provocaron una menor ingesta y EE sin cambios en el peso corporal en ratas Wistar (Giudetti y col., 2003) y en hámsteres (Kraft y col., 2011). Mientras que otros investigadores no observaron diferencias en la ingesta, ganancia de peso corporal, ni en la masa de tejido adiposo en ratas Wistar (Tardy y col., 2008; Sabarensé y Mancini Filho, 2003) o Sprague-Dawley (Gatto y col., 2002). En contraposición, Machado y col. (2010) observaron disminución en el peso y la acumulación grasa en ratones alimentados con dietas de alto contenido graso sustituidas con AGT; resultados concordantes con los reportados por Sain y col. (2013) en ratones alimentados con diferentes fuentes grasas con sustitución parcial de AGT, estos animales mostraron una tendencia a disminuir la ganancia de peso corporal y retención energética.

I.3. INCORPORACIÓN Y RETENCIÓN DE ISÓMEROS DE ÁCIDOS GRASOS TRANS EN SUERO, TEJIDOS Y SECRECIONES

Existen evidencias que demuestran que los isómeros AGT monoénicos 18:1, son absorbidos, captados, incorporados y metabolizados por los tejidos con escasa ó ninguna discriminación respecto de los AG cis-18:1 (Sébédio y Christie, 2009; Emken, 2007). En modelos experimentales animales, se ha demostrado que los AGT son incorporados en muchos tejidos (Moore y Dhopeswarkar, 1980, 1981; Kinsella y col., 1981; Dorfman y col., 2009), particularmente en tejido adiposo, hígado y músculo; y además, pueden encontrarse en suero y secreciones (Fariña y col., 2015a; Saín y col., 2015). El grado de incorporación y retención de los distintos isómeros de AGT en los tejidos tiene gran relevancia ya que puede incidir en el desarrollo o prevención de las ECNT relacionadas con la nutrición.

Además de diversas variables inherentes al modelo experimental (especie animal, sexo, edad, etc) y de los procesos metabólicos en los que puedan participar, los AGT individuales pueden alcanzar diferentes niveles tisulares en función al tipo isómero AGT considerado, a la cantidad ingerida (Johnston y col., 1958) y a su interacción con otros AG presentes en la grasa dietaria. Trabajos recientemente publicados por nuestro grupo de investigación, desarrollados en diferentes modelos experimentales, corroboraron estos hallazgos demostrando que los niveles de AGT retenidos en un tejido particular dependen del tejido, de los AGT específicos y de la composición de la AG de la dieta (Fariña y col., 2015a; Saín y col., 2015).

En el presente estudio, los niveles de AGT totales e individuales alcanzados en tejido adiposo fueron mayores que los observados en hígado y suero; esto está en concordancia con resultados recientes a niveles recomendados de grasa (Fariña y col., 2015a; Saín y col., 2015), y trabajos previos de otros autores (Fritsche y col., 1998; Baylin y col., 2002; Hodson y col., 2008) quienes sugirieron el contenido de AGT totales en tejido adiposo como un biomarcador sensible de ingesta de AGT.

Considerando que el contenido de cada AGT individual en la grasa dietaria presenta ligeras diferencias y que el efecto sobre el metabolismo lipídico de los distintos AGT dietarios sería isómero-específico, con el fin de facilitar la

interpretación de los resultados, se relativizaron los niveles tisulares de cada AGT a través de la retención porcentual. La misma representa la relación entre cada isómero presente en el tejido/ el mismo isómero en la dieta. Notablemente, la retención de AGT totales e individuales en los tejidos fue afectada por el nivel de grasa dietaria, la retención aumentó en relación directa con la cantidad de grasa ofrecida, aun cuando se mantuvo la misma composición relativa de AG individuales. El efecto del nivel de grasa sobre la retención de AGT fue mayor en el TAE, seguido por el tejido hepático, y más leve en el perfil de AG del suero. Estos resultados sugieren que la retención en el suero tendría asociación con la composición relativa de AGT de la dieta, mientras que la retención de AGT en el hígado y TAE estaría relacionada con la cantidad total de AGT consumidos y la tasa oxidativa o destino metabólico de cada isómero AGT.

Con respecto a los AGT individuales, el isómero que presentó el menor nivel de retención fue el 10t-18:1. Este efecto se observó tanto en muestras de TAE e hígado, como en suero de animales alimentados a ambos niveles de grasa dietaria, efecto que podría estar asociado a una tasa de oxidación más alta de este isómero. La velocidad de oxidación, así como muchos de los potenciales efectos biológicos individuales de los AGT 18:1 permanecen aún desconocidos. Previamente, en otros modelos experimentales con niveles recomendados de grasa dietaria parcialmente sustituida con AGT (Fariña y col., 2015a), hemos encontrado una menor retención relativa de 10t-18:1 en hígado y suero de ratas; pero, a partir del presente trabajo, los resultados se extienden a dietas de elevado nivel de grasa. Si bien, a nuestro conocimiento, existe poca información bibliográfica que reporte datos sobre la metabolización de éste AGT en particular (Du y col., 2010), la hipótesis de una mayor velocidad de oxidación es soportada en parte por investigaciones de Sébédio y col. (2001), Banni y col. (2004b) y Martin y col. (2000) quienes hallaron una mayor tasa de metabolización del isómero 10t,12c-18:2 vs. 9c,11t-18:2 (RA) vía β -oxidación peroxisomal. A partir de estos estudios comparativos, la similitud estructural del AG isomérico 10t-18:1 con el CLA 10t,12c-18:2 y, principalmente, la posición de la insaturación trans podrían sugerir que el 10t-18:1 es más rápidamente oxidado que otros AGT 18:1. En relación a los efectos biológicos asociados a este isómero se sugirió que podría aumentar los niveles de TAG séricos en ratas (Anadón y col., 2010). No obstante, en un modelo experimental de ratón, no se observaron cambios en la grasa corporal cuando fueron alimentados con 10t-18:1 (Park y col., 2004).

En contraposición, el isómero 9t-18:1 (EA), fue altamente retenido en todos los tejidos evaluados y principalmente en el TAE. Asimismo, el nivel de retención fue mayor en todas las muestras de animales alimentados con altos niveles de grasa sustituida parcialmente con AGT. El hecho de que el EA fuera mayoritariamente conservado en los tejidos y suero evaluados, podría estar relacionado a la menor tasa de oxidación de este isómero, como fuera observado en células hepáticas de rata (Du y col., 2010). Esto requiere especial atención ya que muchas alteraciones metabólicas perjudiciales relacionadas a la ingesta de AGT de origen industrial tales como: aumento del colesterol, lípidos y lipoproteínas circulantes (Stender y col., 2008), disfunción endotelial, incremento del riesgo de padecer ECV ó mayor incidencia de algunos tipos de cáncer (Mozzafarian y col., 2009; Thompson y col., 2008; Brouwer y col., 2010), han sido asociadas a los niveles de EA presente en los AVPH.

De acuerdo a resultados reportados anteriormente en ratas (Fariña y col., 2015a), en las condiciones experimentales del presente modelo, el isómero 11t-18:1 (VA) fue retenido moderadamente en los tejidos en relación a otros isómeros trans-18:1. Al igual que para los isómeros AGT antes discutidos, la retención fue más elevada en el grupo AGT20 que en el AGT7, asimismo se observó mayor contenido de VA en TAE que en hígado y suero. La relativamente moderada cantidad de VA hallada está relacionada con el destino metabólico de este AGT. Bauman y col. (1999) demostraron que el VA es precursor de la síntesis endógena de RA mediante la acción de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa. Estudios en ratas alimentadas con VA mostraron una significativa conversión a RA en diversos tejidos (Banni y col., 2001b). La misma bioconversión metabólica, ha sido observada en humanos y otras especies (Adlof y col., 2000; Glaser y col., 2002; Loor y col., 2002). Santora y col. (2000) sugirieron que la desaturación ocurre principalmente en el TA, ya que sólo fue encontrado RA en carcasa en ratones alimentados con VA+RA, mientras que en el grupo de animales alimentados con VA puro, sólo hallaron RA en TA. En el actual modelo experimental, el RA alcanzó mayores niveles en TAE que en hígado; mostrando dependencia del nivel de grasa de la dieta sólo en el tejido adiposo. No obstante, la bioconversión de VA a RA estimada por la relación producto/sustrato, no mostró diferencias significativas entre estos tejidos a ambos niveles de grasa estudiados. Cabe destacar que esta conversión relativa se redujo en los altos niveles de grasas en ambos tejidos (RA/VA en hígado: AGT7 vs. AGT20: $0,54 \pm 0,01$ vs. $0,19 \pm 0,02$; y en TAE: AGT7 vs. AGT20: $0,62 \pm 0,06$ vs. $0,24 \pm 0,02$). Los resultados

observados de bioconversión en TAE e hígado están en concordancia con datos previos (Fariña y col., 2015a) y en contraposición con lo hallado por Santora y col. (2000). Además, es importante señalar que los niveles similares de RA observados en hígado de los animales alimentados con AGT7 y AGT20, podría sugerir que los niveles hepáticos de este AG se corresponden con la proporción de VA en la dieta, mientras que en TAE podrían haber sido afectados por el nivel de grasa de la dieta y la cantidad de VA consumido.

Cabe consignar que el grado de bioconversión puede estar influenciado por múltiples variables del modelo experimental entre las que se puede citar: especie (Santora y col., 2000; Turpeinen y col., 2002; Gruffat y col., 2005), tejido (Lund y col., 2006) y tipo de grasa dietaria (Ntambi, 1999). Además, se ha demostrado que la actividad de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa hepática es inhibida por los PUFA (Jeffcoat y col. 1975; Ntambi 1992) y más específicamente por AA (Ntambi, 1992), compatible con los resultados observados en el grupo AGT20. En relación a esto, se encontró en ratones alimentados con VA (Santora y col., 2000) que un aumento de los niveles de PUFA dietarios de un 4 a 10% disminuía en un 30% la conversión de VA a RA. Nuestros resultados coinciden con este efecto, dado que al incrementar los niveles de grasa del 7 al 20 % se incrementa la ingesta de PUFA conduciendo a una reducción en la conversión de VA a RA (50%). Asimismo, Fariña y col. (2015a) reportaron que frente a la misma ingesta de VA, a mayor ingesta de LA se observó una menor conversión a RA. En este mismo sentido, Saín y col. (2015), encontraron menor nivel de conversión de VA a RA en ratones alimentados con dieta ricas en PUFA (aceite de maíz ó canola) comparado con los tejidos de aquellos que recibieron dieta rica en MUFA (aceite de oliva).

Efectos potencialmente beneficiosos para la salud fueron atribuidos al VA per se (Wang y col., 2008; Tyburczy y col., 2009; Anadón y col., 2010), así como también al RA endógeno, producto de su metabolización (Chardigny y col., 2008; Glaser y col., 2000; Loor y col., 2002). Sin embargo, no hay consenso sobre los efectos benéficos del VA en la salud humana, ya que diferentes estudios muestran resultados controversiales respecto del impacto sobre niveles de lípidos plasmáticos, el riesgo de ECV y de cáncer. En una extensa revisión realizada por referentes en el tema (Gebauer y col., 2011) se concluyó que son necesarios más estudios para determinar si los efectos benéficos observados en modelos experimentales se pueden reproducir en humanos.

La composición e incorporación de AGT fue también analizada en sueros de secreción hepática. Efectos diferenciales de AG dietarios sobre la secreción in vivo de TAG-VLDL, así como en estudios in vitro, han sido reportados por diferentes estudios (Sundaram y Yao, 2010; Côte y col., 2014). Estos trabajos sugieren una consistente asociación entre las características químicas de los AG y su impacto en el ensamble y secreción de TAG-VLDL por parte del hígado. Aunque los mecanismos involucrados en este proceso deben ser definidos, se propuso que los AG podrían modificar la expresión de genes relacionados con la síntesis de TAG, y el milieu de AG de membrana afectando el tráfico, transporte y ensamblaje de las VLDL ricas en TAG. Más aún, en estudios in vivo, se observó que no solo la naturaleza químicas de los AG, sino también la dosis y duración del tratamiento influyen sobre este parámetro (Sundaram y Yao, 2010). En el presente trabajo los cambios en la composición de AG observados en los sueros ricos en VLDL de ratas alimentadas con AGT a ambos niveles de grasa dietaria fueron comparables, en términos generales, con las modificaciones de los perfiles de AG de hígado. Estos resultados guardaron relación con aquellos reportados anteriormente por este grupo de investigación (Fariña y col., 2015a) y se correspondieron, además, con los niveles de AGT observados en suero en ayunas en ambos estudios. Por otro lado, los niveles de RA encontrados fueron mayores en los sueros de animales alimentados a alto nivel de grasa, evidenciando una mayor secreción de este AG por parte del hígado, asociado a la baja retención hepática de RA en las ratas que recibieron AGT20. Esta observación está en concordancia con la revisión de Sundaran y Yao (2010) respecto de las diferencias halladas en las VLDL según la especie, tipo de grasa y dosis utilizadas en estudios in vivo; así como también en relación a los AG de membrana hepática y la composición de AG de las lipoproteínas. No obstante, los datos obtenidos en rata difieren de los observados en un modelo experimental de ratón y con diferentes tipos de grasa dietaria sustituida parcialmente con AGT (Saín y col., 2015) dónde no se vio asociación entre la composición de los AG de hígado y secretados.

I.4. METABOLISMO LIPÍDICO

I.4.1. LÍPIDOS SÉRICOS Y REGULACIÓN DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS CIRCULANTES

El análisis del perfil de lípidos séricos y su regulación tiene gran relevancia ya que cualquier alteración puede potencialmente impactar en la salud, constituyendo un factor de riesgo de ECNT. En el modelo experimental del presente trabajo, los niveles de colesterol sérico no presentaron cambios por los tratamientos dietarios, pero se observaron diferentes respuestas a los AGT según la cantidad de grasa ofrecida en la dieta en los niveles de TAG y su regulación.

La regulación de la triacilgliceridemia viene dada por la secreción hepática de VLDL y la remoción periférica de TAG, realizadas principalmente por el tejido muscular esquelético y el tejido adiposo. Así, a nivel recomendado de grasa se observó un incremento de TAG séricos, inducido por la sustitución con AGT, asociado a una disminución de la captación de TAG por parte del músculo esquelético; mientras que a nivel elevado de grasa dietaria, la sustitución con AGT no incrementó la hipertriacilgliceridemia ocasionada por el alto contenido de grasa en la dieta, a pesar de haber aumentado la VSTAG. Los niveles similares TAG circulantes entre los grupos C20 y AGT20 podrían explicarse por un efecto compensatorio de la remoción de TAG por parte del TAE. Esto refuerza resultados previos de nuestro laboratorio en otro modelo experimental en ratas, alimentadas con el mismo AVPH (Fariña y col., 2015a), donde la captación de TAG por el tejido adiposo parecería desempeñar un papel más importante que la VSTAG hepática en la regulación de los TAG séricos, efecto que estaría relacionado a la composición de AGT de la dieta. Por otro lado, en el mismo trabajo, el grupo alimentado a niveles recomendados de grasa no presentó modificaciones en el nivel de TAG séricos y esto también estaría asociado a mayor captación por parte del TAE, ya que la remoción por parte del músculo esquelético permaneció sin cambio. Las diferencias con el presente trabajo pueden ser atribuidas al mayor porcentaje de sustitución con AGT y período experimental más prolongado.

Los datos obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los reportados por Machado y col. (2010), en ratones alimentados con niveles recomendados de grasa

sustituida con AVPH. No obstante, en ratas alimentadas con niveles elevados de grasa en presencia de AGT, se observó hipertriacilgliceridemia (Colandré y col., 2003), diferencia que podría atribuirse a que el AGT predominante en el AVPH fue EA, mientras que en el presente estudio los AGT principales fueron 10t-18:1 y VA. De acuerdo con esta explicación, Anadón y col. (2010) mostraron que las ratas tratadas con grasa ricas en VA no aumentaron, incluso tendían a disminuir los niveles de TAG en suero.

La mayoría de los estudios en modelos experimentales de roedores que emplearon dietas ricas en grasa de origen animal o vegetal han reportado hipertriacilgliceridemia en ayunas (Buettner y col., 2006), aunque existe en la bibliografía diversos resultados según la especie utilizada y la composición del AG dietaria. En general, se ha observado que las dietas ricas en grasa compuesta por SFA aumentan los niveles de TAG séricos (Buettner y col., 2006; Barson y col. 2012), aunque otros estudios no observaron dichos efectos (Delgado y col., 2009; de Castro y col., 2013). En contraste, en modelos animales con dietas de elevados niveles de grasa compuesta principalmente por PUFA de la familia n-6, diferentes autores encontraron una disminución o ningún cambio en los TAG séricos (Bravo y col., 1998; Colandré y col., 2003; Buettner y col. 2006) comparados con dietas estándar o ricas en grasa saturada. Más aún, se observó que cambios en relación de SFA/MUFA/PUFA en dietas ricas en grasa, pueden tener diferente efecto sobre los lípidos plasmáticos (Yang y col., 2012).

Aún más escasos y controversiales son los trabajos en referencia a efectos de los AGT individuales sobre los niveles de lípidos plasmáticos y su regulación. Un estudio realizado en humanos (Chardigny col., 2008) reportó mayores niveles de TAG séricos en aquellos que recibieron dieta conteniendo AGT de origen natural, principalmente: VA y RA, comparado con aquellos que recibieron dieta con AVPH, compuesta por cantidades semejantes de diferentes AGT 18:1; aunque mostró un descenso de colesterol HDL atribuido a los AGT de origen industrial. A partir de estos resultados es posible pensar que los efectos observados en nuestro modelo podrían deberse al conjunto de isómeros AGT, como así también a la relación entre ellos y otros AG presentes en la grasa dietaria. Otro estudio (Wang y col., 2008) demostró que el VA disminuye los TAG circulantes en ratas obesas. Asimismo, cabe considerar que los efectos observados en ratas alimentadas con VA podrían deberse en parte a la sumatoria de efectos por parte este isómero y del RA sintetizado a partir

de éste. Por lo tanto, del análisis bibliográfico y de los presentes resultados podemos inferir que el impacto deletéreo reportado para los AG trans-18:1 son principalmente atribuibles al EA y, más aún, que la presencia de otros AG trans-18:1, como el VA, podrían contrarrestar estos efectos.

I.4.2. LÍPIDOS HEPÁTICOS Y REGULACIÓN DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS

Los diferentes cambios en el contenido de TAG en hígado y su regulación observados por la presencia de AGT y los distintos niveles de grasa en la dieta reflejan una compleja interrelación metabólica. Así, a niveles recomendados de grasa, el incremento de los TAG hepáticos inducido por los AGT se asoció a un aumento de la biosíntesis de AG y a una menor β -oxidación. La expresión de algunos genes relacionados con factores de transcripción y enzimas claves implicadas en la regulación hepática TAG, podrían explicar, al menos en parte, los elevados niveles de TAG en hígado. En el grupo AGT7 se observó una mayor expresión génica del SREBP-1c y menor de la CPT-Ia. Un incremento en la expresión del SREBP-1c podría aumentar la lipogénesis a través de la enzima ACC, independientemente que no aumentó la expresión de genes que codifican las enzimas FAS y SCD1. La mayor actividad ACC observada en este grupo podría contribuir a una alta producción de ~~la enzima~~ malonil-CoA, aumentando la síntesis de AG e inhibiendo la oxidación mitocondrial de AG a través de la enzima CPT-Ia. Más aún, la expresión reducida de la enzima CPT-Ia favorecería el desequilibrio de la relación biosíntesis/ β -oxidación de AG. Estos resultados son comparables a los observados previamente por este grupo de investigación, donde la sustitución parcial con AVPH de igual composición en una dieta enriquecida en LA, aumentó los niveles de TAG hepáticos de ratas Wistar asociado a una disminución en la actividad de la enzima oxidativa CPT-Ia, sin modificar la actividad de las enzimas lipogénicas FAS, EM y G6PDH (Fariña y col., 2015a). Por otro lado, a pesar de que no incrementó la expresión de la enzima Δ 9-desaturasa, el índice SCD1, que representa el flujo de sustrato a través de esta enzima expresado por las relaciones de AG 16:1/16:0 y 18:1/18:0, aumentó por la presencia de AGT. Cambios en la expresión y/o actividad de la SCD1 han sido

asociados con la regulación de la lipogénesis/ β -oxidación y con los niveles de TAG hepáticos y circulantes (Ntambi y col., 2002).

Resultados de diferentes trabajos han demostrado que los AGT pueden modificar tanto la síntesis, como la oxidación hepática de AG. Un incremento de TAG en hígado acompañado de menor actividad de la enzima CPT, sin cambios en las enzimas lipogénicas ACC y FAS, fue reportado anteriormente en un modelo de rata Wistar alimentadas con AVPH rico en AGT bajo otras condiciones experimentales (Giudetti y col., 2003). En un modelo animal aterogénico (Cho y col., 2011) se demostró que, en comparación con una dieta de bajo contenido en isómeros trans-18:1, una dieta con elevada cantidad de AGT aumentó la esteatosis hepática mediante un incremento de las actividades de las enzimas lipogénicas G6PDH y EM, sumado a la reducción de la β -oxidación. En contraste, en un modelo experimental con ratas Fisher alimentadas a largo plazo con dietas conteniendo niveles recomendados de grasa de diferentes composiciones (Jeyakumar y col., 2011), se encontró un ligero aumento de TAG en los hígados del grupo que recibió AGT, comparado con aquel que recibió PUFA n-6, sin observarse esteatosis, ni hipertriacilgliceridemia. Estos resultados estuvieron relacionados con una aumentada actividad de la enzima lipogénica G6PDH, sin modificaciones en los niveles de proteínas asociadas a la oxidación. Por su parte, alteraciones inducidas en ratones por la sustitución con AVPH de igual composición de AGT a niveles recomendados de grasa parecieran estar relacionadas con diferentes mecanismos de acción (Saín y col., 2013), lo que sugeriría que no sólo la composición de AGT, sino también la especie animal utilizada y otros AG de la dieta interactúan proporcionando distintos resultados.

Un efecto diferente sobre la regulación de TAG hepática se observó en dietas con alto contenido de grasa. La dieta de elevado nivel de grasa rica en PUFA n-6 condujo a una mayor acumulación de TAG hepática que la dieta conteniendo niveles recomendados de grasa sustituida parcialmente con AGT. Este incremento estuvo asociado a un acentuado aumento de la expresión génica de SREBP-1c y SCD1, como asimismo del índice de SCD1 y de la actividad de la enzima ACC. No obstante, la expresión de CPT-Ia aumentó, aunque el efecto sobre la oxidación de AG no pareciera compensar las modificaciones observadas en la expresión de genes relacionados con la lipogénesis. Es importante destacar que, a pesar de la elevada

cantidad de grasa ofrecida en la dieta C20, la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad no se modificó con respecto al grupo C7, esto podría estar contribuyendo al aumentado acúmulo de TAG en el hígado. En diferentes modelos experimentales donde se utilizaron elevados niveles de grasa con alto contenido de PUFA n-6 se observó incremento de TAG hepáticos (Bravo y col., 1998; Lieber y col., 2004; Andreoli y col., 2009). Trabajos de otros investigadores relacionaron el incremento de TAG en este órgano con aumento en la expresión de factores de transcripción y enzimas relacionados con la lipogénesis como el SREBP-1c, ACC, FAS (Browning y Horton, 2004; Byrne y col., 2010); además, algunos autores reportaron modificaciones en la secreción de VLDL (Andreoli y col., 2009; de Castro y col., 2013). Es importante consignar que la esteatosis es mayormente atribuida a un desbalance de la relación n-6/n-3 PUFA (Araya y col., 2004; Sullivan y col., 2010; Galbo y col., 2013).

Sorpresivamente, la sustitución con AGT a elevado nivel de grasa no potenció la acreción de TAG en hígado, más aún, atenuó el incremento observado en ausencia de AGT. Además, este efecto se asoció a un incremento en la VSTAG hepática. Estos resultados observados en hígado podrían ser explicados, al menos en parte, por un menor incremento de los niveles ARNm que codifican el factor de transcripción SREBP-1c y la enzima SCD1, en paralelo con una disminución relativa del índice de SCD1 y de la actividad de la enzima ACC. En este sentido, los presentes resultados pueden relacionarse con el trabajo antes citado (Jeyakumar y col., 2011) que mostró ausencia de esteatosis hepática en ratas alimentadas con AGT aun denotando elevada actividad ACC, FAS y SCD1 y aumentados niveles de proteína SREBP-1c. Resultados similares fueron reportados en hámsteres con AVPH de diferente origen, con perfil de AGT similar al del presente estudio (Kraft y col., 2011) donde los TAG hepáticos no se modificaron e incluso disminuyeron mientras que aumentó la expresión de SREBP-1c, ACC, FAS y SCD1. Fariña y col. (2015a) observaron que el índice SCD1 no fue modificado en animales alimentados con dietas enriquecidas, como deficientes en LA, en concordancia con lo reportado en microsomas hepáticos de ratas alimentadas con AGT donde no se modificó la actividad de la $\Delta 9$ -desaturasa (Mahfouz y col., 1984).

Las divergencias en los mecanismos implicados en la regulación TAG hepática con otros investigadores podrían estar asociadas a los modelos experimentales. Sin embargo, la presente investigación sugiere que el melieu

metabólico de AG genera diferente respuesta inducidas por los AGT a niveles recomendados y elevados de grasa sobre la regulación de los TAG hepáticos.

Los datos bibliográficos sobre las modificaciones en el nivel de colesterol hepático son controversiales, nuestros resultados muestran que elevado nivel de grasa rica en PUFA n-6 incrementó el colesterol en hígado, sin embargo, ese efecto fue atenuado cuando la grasa de la dieta fue sustituida parcialmente por AGT. En este sentido, Bravo y col. (1998) reportaron elevados niveles de colesterol en hígado de ratas alimentadas con dietas ricas en LA. El incremento de este parámetro en hígado ha sido observado en otros estudios a causa del consumo de dietas ricas en PUFA n-6 (Feldman y col., 1979). Sugano y col. (1984) compararon el efecto de dietas con 10% aceite vegetal o AVPH suministrado a ratas y encontraron disminuido el colesterol hepático en los animales que recibieron AVPH. Sugano y col. (1984) y otros autores (Elson y col., 1981) sugirieron que estos efectos controversiales de AGT observados experimentalmente podrían adjudicarse a diferencias en el tipo y cantidad de AGT ingerida, así como también a la cantidad de LA en las mezclas de aceites y a otros AG PUFA y/o SFA, que puede afectar la magnitud de la respuesta de los AGT. Contrariamente, resultados previos de este laboratorio en un modelo de ratas alimentadas con elevados niveles AGT obtenidos por isomerización no observaron incremento de colesterol en hígado (Colandré y col., 2003). Asimismo, tampoco se modificó el nivel de colesterol hepático en ratas que recibieron dieta rica en LA sustituida parcialmente con AVPH (Fariña, 2015b); mientras que otros trabajos en ratas y ratones (Jeyakumar y col., 2011; Machado y col., 2010; Cho y col., 2011) informaron incremento del colesterol en hígado.

I.4.3. VELOCIDAD DE SECRECIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS HEPÁTICOS

Un importante mecanismo involucrado en la regulación de los TAG hepáticos, además de aquellos que intervienen en la síntesis y oxidación de AG, como en la esterificación de TAG es el ensamble y secreción de lipoproteínas VLDL. En el presente estudio el incremento de TAG hepáticos ocasionado por el elevado de nivel de grasa fue atenuado cuando la grasa dietaria fue sustituida parcialmente con AGT, y esto estuvo asociado a un incremento de la VSTAG. La mayor secreción de

TAG puede estar relacionada con incremento en la síntesis de apolipoproteína-B. Ha sido demostrado en cultivo de células HepG2 que la acumulación de TAG intracelular incrementó la secreción de apo-B (Arrol y col., 2000). En el mismo tipo de cultivo celular otros autores encontraron que el EA vs. OA incrementó la secreción de apo-B (Mittesser y col., 2005); datos que sugieren que los AGT podrían estimular la secreción de VLDL por estos mecanismos. Además, otros autores (Dashti y col., 2002) mostraron que el EA tiene diferente efecto que el ácido palmítico y OA en la secreción de lipoproteínas por parte de los hepatocitos. Por otro lado, nuestros resultados a niveles recomendados de grasa coinciden con lo hallado por Fariña y col. (2015a), en los que ningún cambio fue observado en la secreción de TAG en ratas alimentadas con el mismo AVPH.

Es importante consignar que el incremento de la VSTAG hepática en grupo alimentado con elevado nivel de grasa con sustitución parcial de AGT no acrecentó los ya aumentados TAG plasmáticos, esto estuvo asociado probablemente a la remoción de los mismos por parte de tejidos extrahepáticos.

I.4.4. ÍNDICES DE LAS ENZIMAS DESATURASAS. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS DE CADENA LARGA EN HÍGADO

Es ampliamente conocido y aceptado que el tipo de AG de la dieta es un factor que puede modular el metabolismo lipídico hepático. Ha sido demostrado que la síntesis de LC-PUFA puede ser modificada por la ingesta de dietas con distinta composición de AG en animales de experimentación (Mahfouz y col., 1984; Takeuchi y col., 2001, Hurtado de Catalfo y col., 2012). Diversos estudios reportaron que los AGT dietarios pueden interferir en la biosíntesis de LC-PUFA de las familias n-6 y n-3, afectando la desaturación y elongación de AG, por competencia entre los sustratos de reacción o alterando la conversión a sus respectivos metabolitos de cadena larga (Mahfouz y col., 1980a,b; Hill y col., 1982; Lawson y col., 1983; Mahfouz y col., 1984; Larqué y col., 2001; Kummerow y col., 2004; Larqué y col., 2003). Posibles modificaciones en la biosíntesis de LC-PUFA n-6 y n-3 pueden estimarse a través de las relaciones de AA/LA y DHA/ALA respectivamente. En el presente modelo, los AGT afectaron de diferente manera la síntesis de LC-PUFA en

hígado según el contenido de grasa en la dieta. Se pudo observar que a niveles recomendados, la sustitución con AGT redujo la incorporación de LA; a su vez, disminuyó el contenido de AA, aunque la relación producto/sustrato aumentó respecto al grupo control, mientras que el DHA mostró una tendencia a disminuir, sin afectar la relación con el ALA. Así, los menores niveles de LA observados podrían estar asociados a la sustitución de AG por la incorporación de AGT en el tejido y la disminución de AA podría sugerir un efecto inhibitorio de los AGT en la síntesis de PUFA de la serie n-6. En cambio, en el grupo AGT20 el contenido de LA y ALA hepático se redujo, pero los niveles de AA y DHA aumentaron incrementando las relaciones producto/sustrato de las series n-6 y n-3. Estos resultados sugieren que los AGT a elevados niveles de grasa dietaria, no reducen la síntesis de LC-PUFA n-3 y podrían explicarse, en parte, por la teoría propuesta por Gibson y col. (2011). El autor revisa la biosíntesis de LC-PUFA y postula que el mismo set de enzimas es utilizado en varios pasos metabólicos por los precursores y metabolitos de las familias n-6 y n-3, que compiten por su utilización; además, propone que el balance LA/ALA es crítico para la síntesis de LC-PUFA. En relación a lo observado en nuestro trabajo, Gibson infiere que con dietas bajas en ALA los tejidos son capaces de mejorar los niveles de DHA, contando con una mínima cantidad de ALA. Además, un trabajo de otro grupo (Cleland y col., 1992) mostró que la capacidad potencial de los aceites dietarios para incrementar el contenido de DHA en plasma y tejidos aumentaron cuando el contenido de ALA de las mismas fue menor. Estas conclusiones coinciden con lo observado en el perfil de AG del grupo AGT20, el mismo presenta menor contenido de ALA que los demás grupos experimentales, incrementó su nivel de DHA y, además, es en el único grupo en el que se detecta el intermediario de esta serie, ácido eicosapentaenoico (EPA). Esto indicaría una mayor actividad de la vía metabólica a favor de la síntesis de LC-PUFA de la familia n-3.

La vía alternativa de biosíntesis de PUFA n-6 en hígado por la cual se sintetiza ácido eicosadienoico (11c,14c-20:2) a partir de elongación del LA (Horrobin, 1981; 1993; Huang y col., 2011; Park y col., 2009) se vio disminuída por los AGT y más acentuada a recomendados niveles de grasa. Investigaciones realizadas por este grupo de investigación en animales alimentados con el mismo AVPH a niveles recomendados de grasa, mostraron un efecto similar en ratas (Fariña, 2015b), aunque en ratón no se observaron cambios en este índice por la sustitución con AGT en

dietas con aceite de maíz (Saín y col., 2015). Diferentes trabajos reportaron una inhibición de las enzimas elongasas por parte de los AGT (Thomassen y col., 1984; Blomstrand y col., 1985; Dorfman y col., 2009), este efecto se observó en nuestro modelo a niveles recomendados de grasa. No obstante, a niveles elevados de grasa, la sustitución con AGT atenuó la disminución sobre la elongación comparada con el grupo AGT7, indicando que los AGT presentes en el AVPH tendrían efectos diferentes según el nivel de grasa dietaria. Cabe consignar que la formación de ácido eicosadienoico a partir de LA es una vía menor que compensaría efectos de los AGT en la síntesis de AG n-6 de cadena larga. Además, el aumento en el grupo AGT20 de la relación ácido cis-vaccénico/ácido palmitoleico, índice asociado a la actividad de las enzimas elongasas de AG, evidencia mayor actividad de estas enzimas en el hígado de los animales que recibieron AGT a elevado nivel de grasa.

Por otro lado, la disminución en la relación GLA/LA, que refleja el flujo a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, estaría asociado a una menor actividad de esta enzima en la síntesis de GLA por la presencia de AGT y los elevados niveles de grasa. No obstante, en el grupo AGT20, el flujo a través de esta enzima favorecería la síntesis de DHA. Si bien resultados de otros investigadores sugieren que los AGT inhibirían la actividad de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa (Kinsella y col., 1981; Mahfouz y col., 1984; Sugano y col., 1989; Larque y col., 2003), a elevados niveles de grasa dietaria los AGT parecieran tener un efecto opuesto, posiblemente debido a la composición del AVPH.

La actividad de la enzima $\Delta 5$ -desaturasa, estimada por la relación AA/DGLA no fue afectada por la presencia de AGT en la dieta a ambos niveles de grasa. La disminución observada en el grupo C20, coincidente con lo observado para la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, podría asociarse a un exceso de sustratos por la alta cantidad de LA de esta dieta.

Podemos inferir a partir de los resultados observados en el perfil de AG hepáticos que los AGT tendrían un efecto diferencial sobre la biosíntesis de LC-PUFA de las familias n-6 y n-3, afectando principalmente el flujo de sustratos a través de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa. La actividad de la misma pareciera estar disminuida por los AGT a niveles recomendados, mientras que a niveles elevados de grasa su utilización estaría desplazada hacia la síntesis de PUFA n-3, favoreciendo la síntesis de DHA. Este efecto podría asociarse parcialmente a los bajos niveles de ALA en la dieta, como al contenido elevado de diferentes AG trans-18:1. En este sentido, las

diferencias observadas en el presente estudio respecto a los trabajos que reportan inhibición de la $\Delta 6$ -desaturasa por los AGT podrían atribuirse a que estos últimos utilizan grasas enriquecidas en EA y no evalúan el efecto simultáneo de diferentes isómeros.

Aparte de afectar la síntesis de LC-PUFA, las dietas experimentales modificaron el índice de la enzima $\Delta 9$ -desaturasa, como se mencionó anteriormente. La presencia de AGT a niveles recomendados de grasa incrementó este parámetro y esto coincidió con el incremento de TAG en hígado indicando un estímulo de la lipogénesis. No obstante, a elevados niveles de grasa dietaria la sustitución con AGT mostró un efecto opuesto, disminuyendo el índice SCD1, acompañado de un descenso de los TAG hepáticos que podría sugerir un mecanismo de acción diferente o compensatorio de los AGT en las dietas ricas en grasa, modulando la acrecentada síntesis de AG ocasionada por el alto contenido de LA.

I.5. FLUJO BILIAR

La síntesis y excreción de ácidos biliares (AB), es un reconocido regulador del contenido de colesterol hepático. El hígado mantiene la homeostasis del colesterol, entre otros mecanismos, excretándolo a la bilis como tal o luego de convertirlo en AB (Bravo y col., 1998; Navarro y col., 2009). En el presente modelo, ni la sustitución con AGT a niveles recomendados de grasa, ni los elevados niveles de grasa en ausencia de AGT, estuvieron asociados a cambios significativos en el flujo biliar (FB). No obstante, se encontró un incremento del colesterol en hígado y en bilis en el grupo C20, que sugiere que los elevados niveles de grasa favorecerían la síntesis de colesterol y no la de AB, ya que el contenido de AB hallado en bilis de este grupo no cambió respecto de C7. En este sentido, Bravo y col. (1998) encontraron en ratas alimentadas con aceite de maíz a elevados niveles de grasa un incremento del colesterol en hígado, asociado a un aumento en la actividad de la enzima acil-CoA colesterol aciltransferasa (ACAT) y de la relación de ACAT: mCEH (colesterol éster hidrolasa microsomal) que promovería la acumulación de colesterol en este órgano. Estos autores también reportaron que esta dieta rica en PUFA n-6 aumentó el colesterol en bilis sin modificar el contenido de AB, ni la expresión de la enzima

colesterol 7- α hidroxilasa, clave en la síntesis de AB. Resultados similares en ratones fueron hallados por Cheema y col. (1997), quienes asociaron la ingesta PUFA n-6 con una menor abundancia relativa de mRNA de 7 α -hidroxilasa en hígado y menor contenido de AB en bilis. Además otros autores (Björkhem y col., 1978) demostraron un efecto inhibitorio de la trioleína y trilinoleína sobre la actividad de la 7 α -hidroxilasa.

Por otro lado, es importante mencionar que en el presente trabajo se encontró un desbalance en la relación lipogénesis/ β -oxidación en hígado por la sustitución con AGT y el elevado nivel de grasa, evidenciado por cambios en las expresiones de factores de transcripción y enzimas relacionadas. Este desequilibrio podría favorecer la producción de acetil-CoA, sustrato para la síntesis de colesterol, promoviendo su formación y posterior síntesis de AB.

A nuestro nivel de conocimiento, existen escasos estudios que evalúen los potenciales efectos de los AGT sobre la secreción biliar. Si bien, a niveles recomendados de grasa dietaria, la sustitución con AGT no evidenció cambios significativos en el FB, sorpresivamente, a elevados niveles de grasa los AGT incrementaron la síntesis de AB y el FB a expensas de la fracción dependiente de AB; además, aumentaron la excreción de colesterol. Estos cambios estarían relacionados con la disminución de los niveles de colesterol en hígado observada en el grupo AGT20.

Resultados obtenidos por Sugano y col. (1984) mostraron que ratas alimentadas con una dieta conteniendo AGT redujeron los niveles de colesterol hepático comparado con una dieta rica en MUFA, asociado a incremento en la actividad de las enzimas HMG-CoA reductasa y 7 α -hidroxilasa, claves en la síntesis de colesterol y AB, respectivamente. En concordancia con la reducción del colesterol hepático e incremento de AB encontrado en nuestros estudios, los autores demostraron que el aumento de la actividad en la enzima 7 α -hidroxilasa sería más marcado que el de la HMG-CoA reductasa en el grupo que recibió AGT, favoreciendo la vía de síntesis de AB.

I.6. ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Un estado pro-oxidante, caracterizado por cambios en parámetros relacionados al estrés oxidativo, se asocia a la esteatosis hepática (Videla y col. 2004). En el presente trabajo, asociado al aumento de lípidos en hígado, diferentes parámetros relacionados al estrés oxidativo fueron modificados por las dietas experimentales. La presencia de AGT previno o evitó la peroxidación lipídica en los grupos que recibieron dieta sustituida parcialmente con AVPH; mientras que los niveles elevados de grasa no modificaron este parámetro. Estos bajos niveles de lipoperoxidación estuvieron asociados al aumento de GSH en los grupos que recibieron AGT y dieta rica en grasa, y a un incremento de la actividad de la enzima antioxidante catalasa en los grupos alimentados con AGT a ambos niveles de grasa dietaria. En relación a estos resultados, ha sido demostrado en ratones (Cassagno y col., 2005) que moderados niveles trans-18:1 incrementan marcadores de estrés oxidativo y disminuyen las defensas antioxidantes en plasma; aunque otros autores reportaron que AGT, como los CLA, pueden generar estabilidad oxidativa (Kim y col., 2005; Palacios y col., 2003), incrementando la síntesis de GSH y evitando la peroxidación lipídica (Arab y col., 2006). Esto último concuerda con nuestros resultados, sugiriendo que la bioconversión de VA a RA estaría previniendo el desarrollo de estrés oxidativo hepático incrementando las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas.

Por otro lado, ha sido reportado que ratas alimentadas con dietas ricas en grasa pueden presentar daño oxidativo. Esto ha sido asociado a una depleción de LC-PUFA n-3 en hígado, que junto a otros factores como una disminuida capacidad de desaturación ó un desbalance de la relación LC-PUFA n-6/n-3 dietaria, actuarían promoviendo la esteatosis (Valenzuela y col., 2012). En nuestro modelo no se observó incremento de la lipoperoxidación por los elevados niveles de grasa dietaria en ausencia de AGT, asociado a un incremento de los niveles de GSH, que indicarían una activación de las defensas antioxidantes no enzimáticas. Estos resultados se contraponen a lo observado en otras investigaciones en animales alimentados con dietas ricas en grasa, desbalanceadas en LC-PUFA. En ratas Sprague-Dawley, se reportó esteatosis hepática con aumento de marcadores de estrés oxidativo, colágeno

y progresión a esteatohepatitis (Lieber y col., 2004); mientras que en ratones, se encontraron disminuídos niveles de GSH junto con elevados niveles de carbonilos proteicos en hígado (Matsuzawa-Nagata y col., 2008; Valenzuela y col., 2012). No obstante, la composición de PUFA de las dietas y las especies de estos trabajos difiere con el presente modelo, y se ha sugerido que estos factores condicionan el desarrollo de NAFLD y estrés oxidativo hepático (Kanuri y col., 2013).

I.7. TEJIDO ADIPOSO Y SU REGULACIÓN

Almacenamiento energético, aislamiento térmico y protección mecánica son los roles que tradicionalmente han sido atribuidos al tejido adiposo blanco; aunque actualmente es reconocido como órgano clave de la regulación metabólica (Wronska y col., 2012). El contenido TAG en los adipocitos, células constitutivas del tejido adiposo, refleja el balance neto entre la deposición y movilización de lípidos (Frayn y col., 2003). Asimismo, los adipocitos producen adipoquinas que están involucradas en la regulación de la homeostasis energética (señales de saciedad, metabolismo de lípidos y carbohidratos), proliferación y diferenciación de adipocitos, angiogénesis, respuesta inmune y regulación de la presión sanguínea (Wronska y col., 2012). Además, los macrófagos del tejido adiposo secretan citoquinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleuquina 6 (IL-6) que tienen gran intervención en estos procesos (Sethi y Vidal-Puig., 2007). Debido a que los TAG son el mayor constituyente del tejido adiposo, al estudiar este tejido adquieren relevancia los mecanismos que regulan su contenido. Si bien el tejido adiposo es capaz de sintetizar AG de novo, la mayor contribución de AG proviene de la hidrólisis de lipoproteínas plasmáticas ricas en TAG mediada por la enzima LPL (Wang y col., 2009). El tejido adiposo es que tiene mayor actividad LPL (Coppack y col., 1992); así, la actividad de esta enzima es clave en la regulación de la adiposidad y en la remoción de TAG del plasma.

En el presente trabajo, el incremento de los depósitos grasos en el TAE ocasionado por los AGT a niveles recomendados de grasa dietaria, esto estuvo asociado con un aumento de la actividad de la enzima LPL en este tejido; mientras que la adiposidad en el TARP no fue modificada por la sustitución con AGT. En

cambio, AGT20 no incrementó el peso del TAE ya acrecentado por los elevados niveles de grasa dietaria, a pesar del aumento de la actividad LPL. Un resultado similar se observó en el peso del TARP en ratas alimentadas con AGT a elevados niveles de grasa. Estos efectos diferenciales de los AGT en el tejido adiposo sugieren que diferentes mecanismos estarían interviniendo en la regulación de la adiposidad cuando son suministrados a distintos niveles de grasa dietaria. La elevada actividad LPL en TAE del grupo AGT20 confirma la contribución de este tejido en la remoción de TAG plasmáticos, que mantiene los niveles de TAG comparables con C20, aun cuando se incrementó la VSTAG. En contraposición a nuestros resultados, niveles disminuidos de mRNA de la enzima LPL en tejido adiposo junto a una elevada tasa de lipólisis y aumentados TAG plasmáticos fueron reportados (Saravanan y col., 2005) en ratas alimentadas con dos niveles de AGT y LA, aunque el AVPH utilizado en este trabajo contiene EA como principal isómero t18:1. Otros autores (Pereira-Assumpcao y col., 2004; Silva y col., 2006) no encontraron cambios en la actividad LPL de tejido adiposo de ratas alimentadas con un AVPH, similar al utilizado en el presente trabajo de tesis; aunque también se demostró que los AGT pueden disminuir los depósitos de grasa (Atal y col., 1994; Faulconnier y col., 2006). Estos efectos controversiales de los AGT sobre la adiposidad parecen estar asociados al tipo de isómero trans en las dietas, la presencia de RA y la especie. En el presente modelo, las diferencias observadas en el tejido adiposo del grupo AGT20 podrían estar relacionadas con el nivel de retención de 10t-18:1, VA y de bioconversión a RA, mayores que en AGT7. El isómero 10t-18:1 ha sido relacionado a un efecto reductor de los depósitos grasos en forma similar al observado para el isómero 10t,12c-18:2 (Atal y col., 1994; Faulconnier y col., 2006), sugiriendo que podrían valerse de mecanismos comunes; mientras que para el RA se ha reportado una leve disminución de la adiposidad (de Roos y col., 2001; Scalerandi y col., 2014) ó ausencia de efecto, sin que resulten claros los mecanismos involucrados (Lopes y col., 2008). En el presente trabajo de tesis los elevados niveles de 10t-18:1 y el RA en AGT20 podrían estar atenuando el efecto de los elevados niveles de grasa sobre la adiposidad, aún con una incrementada actividad LPL, explicando en parte la diferente respuesta a niveles recomendados y elevados de grasa.

DISCUSIÓN-PARTE II

EFFECTOS DE LOS CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO A NIVELES RECOMENDADOS Y ELEVADOS DE GRASA DIETARIA

La segunda parte de este trabajo de tesis evaluó la incorporación y efectos diferenciales de la sustitución parcial del aceite de maíz con un aceite rico en una mezcla equimolecular de 9c,11t-18:2 y 10t,12c-18:2 en ratas alimentadas con dietas conteniendo niveles recomendados y altos de grasa. Se evaluaron parámetros nutricionales, incorporación y retención de los diferentes CLA en distintas muestras biológicas y las potenciales modificaciones del perfil de AG; como asimismo, los posibles cambios metabólicos producidos en la regulación de los TAG y mecanismos involucrados.

II.1. MODELO EXPERIMENTAL

El diseño experimental de esta parte del trabajo de tesis fue similar al utilizado el estudio precedente. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, en etapa de crecimiento. La fuente de grasa principal fue igualmente aceite de maíz rico en LA a niveles recomendados y elevados de grasa dietaria. La fuente de CLA fue un aceite rico en estos isómeros conteniendo principalmente cantidades equimoleculares de 10t,12c-18:2 y RA. La sustitución de aceite de maíz con CLA fue realizada con el fin de obtener una composición relativa de AG idéntica en las dietas CLA7 y CLA20. Asimismo, como fuera puntualizado en la sección anterior, los efectos observados fueron considerados como resultado de la composición en AG derivada de la combinación de ambas fuentes grasas, así como también de la cantidad de grasa ofrecida en cada dieta.

II.2. PARÁMETROS NUTRICIONALES

Los animales alimentados con dietas suplementadas con CLA aceptaron adecuadamente las mismas en los dos niveles de grasa suministrados, sin observarse diferencias en la ingesta de alimento, ni en la energía consumida. La sustitución con CLA no produjo cambios en el peso, la composición corporal, la retención energética de la carcasa, ni en el tamaño de hígado y TAE; mientras que el elevado contenido de grasa dietaria aumentó el peso corporal y esto estuvo asociado a una mayor retención energética en la carcasa e incremento en el peso del TAE. Si bien los CLA no modificaron la mayoría de los parámetros nutricionales evaluados, los panículos adiposos del TARP alcanzaron una reducción significativa de su peso como consecuencia de la suplementación de CLA. Numerosos trabajos han evaluado los efectos antiadipogénicos de los CLA en vivo. Asimismo se ha reportado que los CLA dietarios pueden modificar la composición corporal disminuyendo la acumulación de tejido adiposo en varias especies de mamíferos (Domeneghini y col., 2006). Se ha demostrado en ratas Sprague-Dawley hembras que niveles bajos de CLA no causan efecto sobre el crecimiento, ingesta y peso del hígado; aunque disminuyeron los depósitos de grasa parametrial y retroperitoneal asociado a una menor cantidad y tamaño de los adipocitos (Azain y col., 2000). Azain y col. (2000) como así también DeLany y col. (1999) sugieren que el TARP es más sensible a los CLA. Estos resultados concuerdan con lo observado en el presente trabajo a ambos niveles de grasa. De manera contrastante, otros autores (Lopes y col., 2008) no encontraron una respuesta diferente entre distintos tejidos adiposos en ratas alimentadas con CLA. No obstante, este trabajo presenta ciertas limitaciones en su modelo experimental dado que utiliza un control experimental alimentado con dietas ricas en SFA.

Las condiciones experimentales inherentes a los animales tales como edad, especie, estado nutricional o fisiopatológico; así como las relacionadas con la dieta, tipo de isómero, nivel y duración del tratamiento, parecen incidir sobre la manera en que los CLA afectan la composición corporal (Choi y col., 2004 y 2007). La suplementación con los isómeros individuales RA y 10t,12c-18:2 o con un mix-CLA redujeron los tejidos adiposos epididimal y perirenal en rata (Akahoshi y col., 2003). Otros investigadores (Yamasaki y col., 2003) demostraron que el efecto de los CLA

sobre la composición corporal y el peso de los tejidos en ratas depende del nivel de grasa dietaria y cantidad relativa de los CLA en la grasa. De manera contrastante con nuestros resultados, estos investigadores observaron efectos más marcados a bajos niveles de grasa dietaria (4%), sin encontrar grandes diferencias entre los animales alimentados con niveles normales (7%) y levemente elevados (10%). En otros modelos animales (Purushotham y col., 2007; Lasa y col., 2008; Miranda y col., 2009; Martins y col., 2010) fueron hallados efectos atenuados; mientras que efectos pronunciados de los CLA sobre la composición corporal han sido reportados principalmente 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 y 2003). La marcada reducción en los depósitos grasos en ratones conducen al desarrollo de una serie de alteraciones metabólicas que en conjunto caracterizan el “síndrome lipodistrófico” (Tsuboyama-Kasaoka y col., 2000; Clément y col., 2002), las cuales se asocian específicamente a la presencia del isómero 10t,12c-18:2. Es importante consignar que la ingesta de CLA también puede modificar la composición corporal de animales criados para consumo. En este sentido, se demostró que los CLA disminuyen la deposición grasa en conejos (Corino y col., 2002) y también similares efectos han sido reportados en cerdos y otras especies (Ostrowska y col., 1999; Ramsay y col., 2001). En nuestro estudio la retención de energía no cambió por la presencia de CLA en las dietas, esto coincide con los resultados encontrados por varios autores (Martin y col., 2000; Kloss y col., 2005; Inoue y col., 2006; PatureauMirand y col., 2004; Hwang y col., 2007); aunque otros investigadores demostraron que los CLA podrían mejorar la eficiencia energética en crías de ratas alimentadas con CLA (Chin y col., 1994), así como también hallaron una disminución en este parámetro en modelos experimentales de ratones (West y col., 2000; Terpstra y col., 2002). 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; además asociaron el efecto positivo sobre el crecimiento y la eficiencia energética al isómero 9c,11t-18:2, mientras que el isómero 10t,12c-18:2 podría tener un efecto opuesto. Asimismo los efectos de los CLA, especialmente a nivel de tejido adiposo, serían mediados por el isómero 10t,12c-18:2, al igual que los efectos sobre el metabolismo lipídico en general (Park y col., 1999; Clément y col., 2002; Hargrave y col., 2002; Warren y col., 2003);

mientras que pocos estudios encontraron efectos semejantes por el isómero 9c,11t-18:2 (Akahoshi y col., 2003; Choi., y col. 2004; de Roos y col., 2005).

Efectos diferenciales de los CLA según el sexo del animal fueron evaluados por Poulos y col (2001), donde encontraron un menor tamaño del tejido adiposo en hembras y un mayor incremento de los pesos de los músculos soleus y gastrocnemius en machos. En este sentido, es reconocido que los CLA pueden mejorar el status proteico incrementando la masa corporal magra (Park y col, 1997; Evans y col, 2002) y reduciendo el catabolismo proteico (Cook y col, 1993; Miller y col, 1994; DeLany y West, 2000; Terpstra y col., 2002; Terpstra y col., 2003). En el presente trabajo los CLA no modificaron el contenido de proteínas en carcasa, coincidiendo con los resultados reportados por otros autores (Park y Pariza, 2001; Kim y col., 2002; Javadi y col., 2004; Andreoli y col., 2007). No obstante, en el grupo alimentado con elevados niveles de grasa, la suplementación con CLA incrementó el peso del músculo gastrocnemius y mostró un BN aumentado asociado a una menor eliminación de N urinario.

A pesar de que muchos trabajos evidenciaron los efectos antiobesogénicos en animales, los resultados de los CLA en el tratamiento de la obesidad en humanos no han sido concluyentes. En algunos estudios se observó una disminución significativa de la masa grasa (Gaulhier y col, 2004; Blankson y col, 2000; Thom y col, 2001; Smedman y Vessby, 2001), pero en la mayoría no se observaron cambios (Risérus y col., 2002; Larsen y col., 2006, Petridou y col., 2003). Por lo tanto, no existen claras evidencias que demuestren que los CLA tienen un efecto manifiesto sobre la composición corporal en humanos.

II.3. INCORPORACIÓN Y RETENCIÓN DE CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO EN SUERO, TEJIDOS Y SECRECIONES

Los CLA dietarios fueron incorporados en los lípidos de suero, tejido y secreciones. Los mayores niveles de retención de CLA totales fueron hallados en tejido adiposo, seguido de hígado y suero. Resultados similares fueron reportados

por Yamasaki y col. (2000) quienes encontraron en animales alimentados con dietas conteniendo 2% de CLA, una retención 5 veces mayor de CLA en tejido adiposo que hígado. Esto concuerda con el estudio realizado por Banni y col. (2001a) en el que se demostró que la fracción lipídica de preferencia para la incorporación de CLA y otros dienos conjugados en tejidos fueron los lípidos neutros, clase de lípido más abundante en tejido adiposo; mientras que en tejidos con más contenido de fosfolípidos, como el hígado, se incorporan menos (Alasnier y col., 2002). La retención de ambos isómeros CLA en todas las muestras analizadas mostró dependencia del nivel de grasa dietaria. A niveles elevados de grasa dietaria suplementada con CLA hubo mayor retención de isómeros, guardando relación con la cantidad de CLA suministrada, a pesar de la idéntica composición relativa de AG individuales en ambas dietas CLA. Estos resultados coinciden con lo discutido anteriormente respecto de la retención de AG trans-18:1. Aunque ambos CLA estuvieron presentes en cantidades equimoleculares en las dietas, el isómero 10*t*,12*c*-18:2 fue menos retenido que el RA en suero y tejidos, independientemente de la cantidad de grasa dietaria. La retención de AG isoméricos en los tejidos puede variar de acuerdo a la cantidad ingerida, tiempo de tratamiento dietario, afinidad para su incorporación tisular y capacidad de oxidación. En este estudio, la relación de isómeros CLA ingerida por los animales fue equivalente a ambos niveles de grasa dietaria, el período experimental fue el mismo para todos los grupos y dado que la retención fue estandarizada respecto de la cantidad de CLA ingerida en la dieta, la diferencia en la retención de 10*t*,12*c*-18:2 vs. RA puede atribuirse en parte a una mayor tasa de oxidación del isómero 10*t*,12*c*-18:2, y a una mayor capacidad de incorporación a los tejidos del RA. Nuestros resultados soportan los estudios de otros investigadores (Martin y col., 2000; Sébedio y col., 2001; Banni y col., 2004b) quienes hallaron diferencias entre la oxidación de ambos isómeros. Es conocido que el flujo de los AG a través de las vías de β -oxidación mitocondrial y peroxisomal está determinado principalmente por la actividad de las enzimas CPT-Ia y acetil CoA oxidasa (ACO) peroxisomal, respectivamente. Asimismo, fue demostrado que la enzima CPT-Ia posee la capacidad de discriminar entre sistemas de dobles enlaces conjugados y no conjugados (Ide y col., 1987), aunque no puede distinguir entre isómeros posicionales. Esto sugiere que la β -oxidación mitocondrial no explicaría la degradación diferencial entre el 10*t*,12*c*-18:2 y el RA, ni el mayor contenido de RA

en las muestras biológicas, dado que ambos isómeros serían igualmente oxidados por esta vía. Posteriormente, datos cinéticos de las enzimas CPT-I y ACO, obtenidos en un estudio en ratas alimentadas con preparaciones puras de isómeros 10t,12c-18:2 y RA, demostraron que existe una mayor disponibilidad del isómero 10t,12c-18:2 para ser degradado por la vía de β -oxidación peroxisomal en hígado (Martin y col., 2000). Otros investigadores (Sébédio y col., 2001; Banni y col., 2004b) respaldan estos hallazgos demostrando elevada cantidad de AG conjugados de 16 carbonos derivados de la β -oxidación del 10t,12c-18:2 comparado con el RA. Más aún, se demostró que el RA tiene una mayor tendencia a seguir vías metabólicas de elongación y desaturación para su incorporación a los lípidos (Banni y col., 2004a), principalmente por su conversión a dienos conjugados de 20 carbonos y 3 insaturaciones (Sébédio y col., 2001), que permitiría mayor incorporación en lípidos polares (Banni y col., 2001a). Estos estudios que demostraron la metabolización diferencial de los dos principales isómeros CLA, claramente explican los niveles de incorporación en suero y tejidos observados en nuestros resultados.

Analizando en particular los perfiles de AG de cada muestra biológica evaluada se observó que el contenido hepático de RA fue superior al 10t,12c-18:2, de manera tal que la retención del RA fue cuatro veces más elevada a niveles recomendados y el doble a niveles elevados de grasa dietaria. De acuerdo con nuestros resultados, ha sido demostrado por otros investigadores (Stangl y col., 2000) que el grado de incorporación de CLA en carcasa y lípidos hepáticos en rata está directamente relacionado con el nivel de CLA en la dieta. Asimismo, en los sueros de secreción de TAG-VLDL, el isómero presente en mayor proporción fue el AR, lo que sugeriría que las diferencias de retención encontradas en hígado podrían estar asociadas con una mayor tasa de oxidación peroxisomal hepática del isómero 10t,12c-18:2 a ambos niveles de grasa, tal como fue propuesto por Martin y col., (2000).

En cuanto al tejido adiposo, el contenido y nivel de retención de CLA depende del contenido de isómero en la dieta, de la captación desde la circulación, así como de las velocidades de metabolización relativa de cada isómero. Los niveles de retención mostraron una dependencia del nivel de grasa dietaria y, similar a lo observado en hígado, un efecto diferencial de retención de RA vs. 10t,12c-18:2. Estos resultados estarían asociados a una mayor β -oxidación de 10t,12c-18:2 en este tejido,

tanto en el grupo CLA7, como en CLA20, y están en concordancia con los reportados por otros investigadores que encontraron mayores niveles de RA en TAE y TARP de rata (Martins y col., 2010), así como también en TARP de ratones (Kelley y col., 2006). Con respecto al contenido de isómeros CLA circulantes, determinado en suero en ayunas, hemos encontrado similitud con lo observado en tejidos y en el suero de secreción hepática. Un mayor contenido de RA vs. 10t,12c-18:2 en suero fue reportado por otros investigadores (Li y Watkins 1998). El isómero presente en mayor cantidad fue el RA y la incorporación de ambos isómeros mostró dependencia del nivel de grasa dietaria, siendo significativamente mayor en el grupo CLA20 que en el CLA7.

La suplementación con CLA a niveles recomendados de grasa dietaria no modificó los niveles de LA hepáticos, aunque estuvo asociada a una disminución de los AG de la misma familia, GLA y AA. Esto sugeriría que los CLA no sustituyeron el LA tisular, aunque su incorporación estarían afectando la vía de metabolización de los PUFA n-6. Esto concuerda con lo propuesto por Banni y col. (2004a), quienes sugieren que la competencia de los CLA con el LA sería diferente en los distintos tejidos; en hígado estaría principalmente dada al nivel de la formación de metabolitos, mientras que en tejidos extrahepáticos ocurriría más a nivel de la incorporación, como se ha observado en tejido adiposo y mamario, los cuales son ricos en lípidos neutros. Otro mecanismo que podría estar involucrado en la reducción los LC-PUFA es la β -oxidación peroxisomal de los mismos, inducida por el 10t,12c-18:2, como fuera demostrado en ratones (Martin y col., 2000; Banni y col., 2004b; House y col., 2005). Por otro lado, ha sido reportado que la incorporación y metabolización de los CLA es sensible a diferentes factores de la dieta; así, se ha sugerido que cambios en los niveles de PUFA dietarios pueden perturbar el metabolismo de los CLA y de los demás LC-PUFA (Banni y col., 2004a). En este sentido, nuestros resultados muestran que en las dietas conteniendo elevados niveles de LC-PUFA n-6, la presencia de CLA no estuvo asociada a cambios en los niveles de GLA y AA, ya disminuidos en el grupo C20. Además, los niveles de ALA y otros LC-PUFA de la familia n-3 encontrados indicarían que los CLA y el alto contenido de grasa dietaria, no afectan la incorporación y metabolización de AG de esta serie en hígado.

Los niveles de LC-PUFA en suero en ayunas y TAG-VLDL secretados por el hígado se correspondieron con las modificaciones observadas en hígado. No

obstante, en el TAE, la sustitución con CLA estuvo asociada a una marcada disminución del contenido de LA a ambos niveles de grasa dietaria, como asimismo, de los niveles de GLA y AA. Esto concuerda con lo propuesto por Banni y col. (2004a) evidenciando un predominio de la incorporación sobre la metabolización en tejidos con alto nivel de lípidos neutros. Con respecto a la familia n-3, el contenido de ALA en TAE disminuyó por la presencia de CLA a niveles recomendados de grasa dietaria; en este sentido, es probable que exista una competencia entre estos AG por su incorporación, como también un incremento en la oxidación en este tejido.

II.4. METABOLISMO LIPÍDICO

II.4.1. LÍPIDOS SÉRICOS Y REGULACIÓN DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS CIRCULANTES

Los niveles de TAG circulantes fueron modificados por la presencia de CLA mostrando un comportamiento diferencial dependiendo de la cantidad de grasa dietaria. Por un lado, los CLA incrementaron los TAG séricos en el grupo CLA7, asociado a una mayor secreción hepática de VLDL. Sin embargo, no acrecentaron la hipertriacilgliceridemia ya observada a elevados niveles de grasa, a pesar de haber incrementado la VSTAG en el grupo CLA20. Estos resultados pueden explicarse por el efecto de la remoción de TAG por parte del TAE y del músculo esquelético. A recomendados niveles de grasa, la remoción de TAG por el tejido adiposo no pareciera compensar el aumento de la secreción de TAG, mientras que a elevados niveles de grasa el efecto del TAE permitiría mantener los niveles de TAG circulantes a un nivel comparable a los del grupo C20. La ausencia de cambios en la actividad LPL del músculo esquelético por la presencia de CLA a ambos niveles de grasa dietaria contribuiría a mantener los TAG séricos elevados en estos grupos. Si bien muchos estudios en animales han evidenciado un efecto hipotriacilglicéridémico por la ingesta de CLA (Gavino y col., 2000; Macarulla y col., 2005; Andreoli y col., 2009); en otros trabajos han encontrado un efecto opuesto. En concordancia con nuestros resultados, ha sido reportado un incremento en los TAG séricos en

hámsteres alimentados con una mezcla equimolecular de CLA ó con 10t,12c-18:2 (de Deckere y col., 1999). Asimismo, un efecto hipertriacilgliceridémico ha sido encontrado recientemente por este grupo de investigación en un modelo de ratones alimentados con grasas insaturadas de diferente origen suplementadas con RA ó con la misma mezcla de CLA utilizada en el presente trabajo (Scalerandi y col., 2014).

Evaluaciones realizadas en humanos también han arrojado resultados controversiales; aunque, en términos generales, fueron escasos los efectos hallados de los CLA sobre los TAG séricos. Una serie de trabajos reportaron que la triacilgliceridemia no es modificada por el consumo de CLA en individuos sanos o con sobrepeso (Smedman y Vessby, 2001; Roche y col., 2002; Petridou y col., 2003; Naumann y col., 2005), mientras que otros autores observaron reducción de la misma (Mougios y col., 2001; Noone y col., 2002). También fueron hallado efectos diferenciales según el tipo de isómero suministrado a hombres sanos; así los TAG séricos fueron aumentados por el isómero 10t,12c-18:2 y disminuidos por el RA (Tricon y col., 2004). Con las evidencias existentes pareciera que la respuesta de los CLA sobre los TAG séricos en animales y humanos es controversial, y depende de la especie, estado metabólico, diseño experimental, tipo de isómero y composición de AG de la dieta utilizados (Clément y col., 2002; Bhattacharya y col., 2006).

II.4.2. LÍPIDOS HEPÁTICOS Y REGULACIÓN DE LOS TRIACILGLICÉRIDOS

Efectos diferenciales por la suplementación con CLA fueron observados en el contenido de TAG hepáticos, así como también en los mecanismos involucrados en su regulación, mostrando una dependencia del nivel de grasa en la dieta. A niveles recomendados de grasa dietaria, el incremento de los TAG en hígado por los CLA estuvo relacionado con un aumento de la síntesis hepática de AG y una disminución de la β -oxidación. Estos efectos podrían explicarse parcialmente por un desequilibrio en la relación lipogénesis/ β -oxidación, evidenciados por el incremento de la actividad de la enzima ACC hepática y la menor expresión génica del factor de transcripción PPAR- α y de la enzima CPT-Ia, claves en la regulación de la oxidación de AG en hígado. La elevada actividad de la ACC hepática podría estar

contribuyendo al acúmulo de TAG en hígado observado en estas ratas por dos vías: incrementando la síntesis de AG y disminuyendo la oxidación mitocondrial de AG por inhibición de la CPT-Ia a través del malonil-CoA. Sorpresivamente, los niveles de ARNm de otros factores de transcripción y enzimas relacionados con la lipogénesis como SREBP-1c y SCD1 no fueron modificados; y más aún, en la enzima FAS disminuyeron, sugiriendo que los CLA no estarían modulando la síntesis de AG a través de su expresión. Refuerza esta observación el menor índice de la enzima SCD1 hepática representado por la relación producto/sustrato de los AG palmitoleico/ palmítico y oleico/ esteárico. Por otro lado, la incrementada VSTAG observada en este grupo no pareciera compensar el efecto sobre la lipogénesis, favoreciendo la acumulación de TAG en hígado. Diferentes autores han encontrado en ratones un incremento de los TAG hepáticos asociados a una elevada actividad de enzimas, así como también mayor expresión de genes relacionados con la lipogénesis (Takahashi y col., 2003; Ferramosca y col., 2006, Vyas y col., 2012). La esteatosis ha sido atribuida al isómero 10t,12c-18:2 (Clément y col., 2002; Poirier y col., 2005a) el cual incrementa la síntesis y captación de AG superando la tasa de oxidación (Vyas y col., 2012). Además, en otras especies animales, se encontraron diferentes cambios en la relación lipogénesis/ β -oxidación inducidas por el isómero 10t,12c-18:2 ó mezclas equimoleculares de RA y 10t,12c-18:2 (Nagao y col., 2005; Macarulla y col., 2005). Escasos estudios han evaluado el efecto de los CLA en rata y los resultados encontrados en estos modelos fueron controversiales. En contraposición a nuestros resultados, en ratas normales así como genéticamente obesas, ha sido reportado que los CLA disminuyeron los niveles de TAG hepáticos (Nagao y col. 2005; Wang y col., 2006; Purushotham y col., 2007).

Los CLA a elevados niveles de grasa dietaria afectaron de diferente manera la regulación de los TAG hepáticos. La suplementación con CLA no acrecentó aún más el contenido de TAG ya elevados por el alto contenido de grasa de la dieta. Este resultado estuvo asociado al aumento en la VSTAG y a una menor expresión de los factores de transcripción SREBP-1c y de las enzimas FAS y SCD1 relacionados con la lipogénesis en hígado. Si bien los niveles ARNm de PPAR- α y CPT-Ia disminuyeron por la presencia de CLA y la actividad de la ACC hepática no cambió con respecto al grupo C20, la relación lipogénesis/ β -oxidación estaría disminuída por los CLA. El conjunto de resultados sugiere que a elevados niveles de grasa dietaria los

CLA modularían el nivel de TAG en hígado incrementando la secreción de VLDL ricas en TAG y regulando la lipogénesis. En este sentido, aunque es conocido que las dietas ricas en grasa incrementan el contenido de TAG en hígado generando esteatosis acompañada de diferentes alteraciones metabólicas, a nuestro conocimiento, existen pocos estudios que hayan evaluado el efecto de la suplementación con CLA en dietas de elevado contenido graso. En relación con nuestros resultados, Purushotham y col. (2006) reportaron que los CLA redujeron los lípidos hepáticos asociado a una disminución de la expresión del factor de transcripción SREBP-1c y de las enzimas SCD1 y FAS; y postularon que la inhibición de la SCD1 podría estar relacionada con un aumento en la β -oxidación en ratas con esteatosis hepática inducida con una dieta rica en grasa. Choi y col. (2004) encontraron un leve descenso de los TAG de hígado de ratas que recibieron una dieta grasa semejante a la dieta occidental suplementada con 1% de CLA; y esto estuvo relacionado con un incremento en los niveles de ARNm de las enzimas UCP2, UCP3 y acil-CoA oxidasa hepáticas, sin cambios en la expresión de SREBP-1c y la enzima FAS en hígado. De manera contrastante con nuestros hallazgos, otros autores encontraron que los CLA dietarios mejoraron la esteatosis hepática en ratas obesas incrementando la actividad CPT-Ia sin modificar su expresión (Nagao y col., 2005; Wang y col., 2006). Por lo tanto, el presente estudio, al igual que el de otros autores, muestra que si bien los mecanismos por los cuales los CLA modulan los TAG hepáticos no fueron completamente dilucidados, están estrechamente vinculados con el balance lipogénesis/ β -oxidación. Además, demuestran que los cambios en el metabolismo lipídico inducido por los CLA en modelos animales dependen en gran medida de la cantidad de grasa de la dieta, de la composición de AG de la misma (SFA, PUFA, EFA), de la cantidad relativa de cada isómero CLA y de la duración del tratamiento (Choi y col., 2007). Asimismo, trabajos previos de este grupo de investigación reportaron menor contenido de TAG en hígado de ratas alimentadas con una dieta rica en grasa suplementada con CLA post-depleción proteica (Andreoli y col., 2007), mientras que en ratones que recibieron CLA a elevados niveles de grasa encontraron una considerable hepatomegalia asociada a esteatosis (Andreoli y col., 2009); evidenciando marcados efectos diferenciales de los CLA según la especie.

II.4.3. VELOCIDAD DE SECRECIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS HEPÁTICOS

La VSTAG fue incrementada por la presencia de CLA a niveles recomendados de grasa, y este efecto pudo haber sido un mecanismo compensatorio para regular el contenido de TAG hepáticos aumentados. Este mismo efecto sobre la secreción de VLDL se observó a elevados niveles de grasa, donde los CLA aumentaron la secreción de TAG hepática posiblemente para evitar un incremento de TAG mayor al provocado por los elevados niveles de grasa dietaria. Estudios realizados en cultivos de células HepG2 (Lin y col., 2001) demostraron que el RA es un activador más potente de la secreción de VLDL-TAG que el isómero 10t,12c-18:2. Este efecto de los CLA sobre la secreción de TAG, puede estar relacionado con la activación de PPAR- α , de los cuales se sabe que los CLA son agonistas. La activación en hígado de PPAR- α aumenta los niveles de apoB-100 y, a su vez, la expresión de la proteína de unión de AG hepática (LFABP: liver fatty acid binding protein). Dicha proteína que participa en el ensamblaje y secreción de lipoproteínas ricas en apoB-100 contribuye a regular la cantidad de lipoproteínas secretadas por el hígado (Lindén y col., 2002). Además, se demostró que la activación de PPAR- α disminuye la biosíntesis de TAG por el hígado (Linden y col., 2002), este sería otro mecanismo mediante el cual los CLA podrían modular el contenido hepático de TAG. Diferentes estudios que respaldan esta hipótesis, demostraron que los CLA son potentes activadores de los PPAR, principalmente del PPAR- α , y que el RA sería más eficiente activador de este factor de transcripción que el 10t-12c, 18:2 (Moya-Camarena y col., 1999; Clement y col., 2002). En nuestros resultados, si bien la expresión del PPAR- α en hígado no aumentó por la suplementación con CLA, la mayor VSTAG a ambos niveles de grasa dietaria sugiere que la activación de este factor de transcripción por parte de los CLA sería el mecanismo subyacente modulando la secreción de TAG. Resultados previos de este grupo de investigación en un modelo experimental de rata con restricción proteica previa soportan los hallazgos del presente trabajo, ya que demostraron que el principal mecanismo por el cual los CLA previnieron la esteatosis hepática a elevados niveles de grasa fue el incremento de la VSTAG (Andreoli. y col., 2010).

II.4.4. ÍNDICES DE LAS ENZIMAS DESATURASAS. BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS DE CADENA LARGA EN HÍGADO

La presencia de CLA no estuvo relacionada con cambios en la síntesis de LC-PUFA de las familias n-6 y n-3, estimada por las relaciones de AA/LA y DHA/ALA respectivamente, en los dos niveles de grasa dietaria suministrados. No obstante, diferentes cambios en los índices de las enzimas $\Delta 5$ - y $\Delta 6$ -desaturasas fueron observados por la sustitución con CLA según la cantidad de grasa ofrecida en la dieta. Por un lado, el menor índice de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa, representado por la relación GLA/LA, indicaría un efecto inhibitorio de los CLA en la actividad de esta enzima a niveles recomendados de grasa dietaria; aunque a elevados niveles de grasa no intensificarían el efecto sobre este índice, ya disminuido por exceso de sustrato (LA). Por otra parte, el aumento del índice $\Delta 5$ -desaturasa, representado por la relación AA/DGLA, sugeriría una mayor actividad de esta enzima relacionada con la presencia de CLA a ambos niveles de grasa dietaria. En relación a este efecto, diferentes autores hallaron que tanto los isómeros individuales de RA y 10t,12c-18:2, como la mezcla de ambos, reducen la biosíntesis de LC-PUFA inhibiendo las enzimas $\Delta 5$ - y $\Delta 6$ -desaturasas (Bretillon y col., 1999; Ederf y col., 2002; Javadi y col., 2004). Sorprendentemente, otros investigadores encontraron incrementada la expresión de estas enzimas en hígado de ratón (Takahashi y col., 2003), por lo tanto el efecto de los CLA sobre la síntesis de LC-PUFA depende de las condiciones experimentales. Considerando nuestros resultados, podríamos decir que tanto el nivel de grasa, así como también la composición relativa de AG de la dieta modificaron la acción de los CLA en la biosíntesis de LC-PUFA. La ausencia de un efecto inhibitorio de los CLA a elevados niveles de grasa, puede ser debido a la excesiva oferta de LA en la dieta CLA20.

II.5. FLUJO BILIAR

La suplementación con CLA a niveles elevados de grasa aumentó el FB relacionado a un incremento significativo en la excreción de AB; asimismo se

observó una mayor excreción de colesterol en bilis, aunque estos cambios no estuvieron asociados a una disminución significativa del contenido de colesterol hepático. A nuestro nivel de conocimiento, existen escasos trabajos donde se reporte el efecto de los CLA sobre el metabolismo del colesterol, y ninguno que evalúe los posibles cambios sobre el FB. Fue reportado que el RA disminuye la actividad de la ACAT evitando la acumulación de colesterol en hígado de hámsteres (Navarro y col., 2007). Esto estaría en el sentido de nuestros resultados donde se observó una tendencia a disminuir el colesterol hepático por la suplementación con CLA, aunque no alcanzó significancia estadística. Asimismo, algunos autores sugieren que la suplementación con CLA fue asociada a alteraciones en la cantidad y composición de la bilis en ratones y estos cambios fueron asociados a una mayor expresión de SREBP1c, HMG-CoA reductasa y 7- α hidroxilasa (Zabala, 2008). Estos resultados, junto con los del presente trabajo, sugieren que los CLA podrían intervenir en el metabolismo del colesterol aunque los efectos podrían ser especie específicos.

II.6. ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO Y DEFENSAS ANTIOXIDANTES

La suplementación con CLA, a recomendados y elevados niveles de grasa dietaria, no afectó el grado de lipoperoxidación en hígado. Esta ausencia de cambios en los niveles de lipoperoxidación estuvo asociada a un incremento en los niveles de GSH por la presencia de CLA a ambos niveles de grasa dietaria, así como también por el elevado contenido de grasa dietaria en ausencia de CLA. Además, un aumento en la actividad de la enzima catalasa, parte del sistema de defensa antioxidante enzimático, fue hallado en hígado de los animales que recibieron CLA a ambos niveles de grasa dietaria. De acuerdo con estos resultados, Kim y col. (2005) reportaron menor lipoperoxidación por la sustitución con CLA en membranas hepáticas de ratas deficientes en vitamina A, asociado a un menor nivel de PUFA susceptibles a la oxidación. Choi y col. (2007) demostraron que los CLA modulan la disfunción mitocondrial hepática inducida por dietas ricas en grasa, resultando en mayor capacidad de producción de energía y menor producción de ROS; asimismo encontraron que el RA incrementó los niveles de GSH, la actividad de la enzima

SOD (superóxido dismutasa) previniendo la lipoperoxidación. Otros investigadores concluyeron que los CLA son capaces de aumentar la síntesis de GSH sin evidenciar cambios en el balance oxidativo (Arab y col., 2006). Por lo tanto, los niveles elevados de GSH hallados por la suplementación con CLA, como asimismo, la incrementada actividad catalasa hepática, sugieren que los CLA podrían tener un cierto efecto protector sobre el potencial daño peroxidativo ocasionado por el acúmulo de TAG en hígado.

II.7. TEJIDO ADIPOSO Y SU REGULACIÓN

Como fuera discutido anteriormente, la suplementación con CLA no modificó el peso del TAE en ninguno de los dos niveles de grasa estudiados. No obstante, la actividad de la enzima LPL en este tejido incrementó por la presencia de CLA a niveles recomendados de grasa dietaria, aunque esto no estuvo asociado a un aumento en la masa de tejido adiposo. Estos resultados están en concordancia con estudios previos en ratas Wistar donde la suplementación con CLA aumentó el “turnover” lipídico en tejido adiposo, sin alterar la adiposidad (Patureau Mirand y col., 2004). A elevados niveles de grasa, los CLA no modificaron la masa del TAE y tampoco la actividad LPL ya aumentadas por el alto contenido graso de la dieta. Sorpresivamente, los CLA disminuyeron el TARP a ambos niveles de grasa dietaria. Los resultados observados en TAE y TARP en nuestro modelo, pueden estar relacionados con los demostrados efectos de los CLA en la reducción del tejido adiposo: aumento del gasto energético asociado a una mayor expresión de proteínas desacoplantes (UCP2) y de la actividad CPT-I que favorecería la oxidación de AG, la lipólisis e inhibición de la diferenciación-proliferación de adipocitos con aumento de la apoptosis (Kennedy y col., 2008). Además, no se puede descartar que otros mecanismos que regulan los depósitos grasos, como la expresión y activación de factores de transcripción relacionados con la lipogénesis y la oxidación podrían estar involucrados. Ha sido reportado en ratones, que los CLA modulan la adiposidad disminuyendo la expresión de PPAR- γ , efecto principalmente relacionado con el isómero 10t,12c-18:2 (Poirier y col., 2005). Asimismo, Choi y col. (2004) sugieren que los CLA podrían actuar activando el PPAR- α sin modificar su expresión. En el caso del TAE, los CLA podrían estar modulando la adiposidad sin modificar el peso

del tejido, impidiendo la acumulación de lípidos aun cuando la captación por parte de la LPL estuvo aumentada. Esto podría estar relacionado a un mayor turnover de lípidos en tejido adiposo (Ippagunta y col., 2013; Barnes y col., 2015). Por otro lado, el menor índice de la enzima SCD1 observado en TAE de las ratas que recibieron CLA sugiere que otro mecanismo regulador de los niveles lípidos en tejido adiposo estaría actuando. Si bien en el presente trabajo no se realizaron estudios de mecanismos biológicos en el TARP, la menor acreción de grasa en dicho tejido podría sugerir una disminuida relación entre la captación y liberación o entre la síntesis y oxidación de AG.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis, efectos diferenciales de los isómeros de ácidos grasos AGT y CLA fueron observados, mostrando dependencia el nivel de grasa en la dieta. Los isómeros AGT y CLA, suministrados a recomendados o elevados niveles de grasa dietaria, fueron incorporados a los lípidos tisulares, séricos y de secreciones de ratas modificando parámetros nutricionales, bioquímicos y metabólicos.

Los resultados más destacables asociados a la ingesta de AGT mostraron que:

- Los AGT fueron incorporados y retenidos en mayor medida en tejido adiposo, que en hígado y suero, tanto en animales alimentados con dietas a niveles recomendados como elevados de grasa, mostrando, además, dependencia de la cantidad de grasa dietaria.
- De los isómeros con probados efectos biológicos, el 9t-18:1, fue el que mostró mayor grado de retención en tejido adiposo, hepático, suero y en las lipoproteínas secretadas por el hígado a ambos niveles de gras dietaria.
- El isómero 10t-18:1 fue el que presentó menor grado de retención en tejido adiposo, hígado y suero de animales alimentados con AGT a ambos niveles de grasa, posiblemente asociado a una mayor tasa de oxidación.
- La bioconversión de VA a RA fue similar en tejido adiposo e hígado a ambos niveles de grasa dietaria. No obstante, fue menor en ambos tejidos en los ratas alimentadas con elevados niveles de grasa.
- A niveles recomendados de grasa dietaria, los AGT incrementaron la ganancia de peso de los animales, asociado a un incremento del tejido adiposo y contenido graso de carcasa.

- A niveles elevados de grasa dietaria, los AGT no acrecentaron la ganancia de peso ni los depósitos grasos en ratas, ya aumentados por la dieta rica en grasa en ausencia de AGT.
- Los AGT aumentaron los TAG séricos en animales alimentados a niveles recomendados de grasa, asociado a una menor remoción de los mismos por parte del músculo esquelético.
- La sustitución con AGT a niveles elevados de grasa dietaria, no incrementó los TAG séricos de ratas, ya aumentados por el alto contenido de grasa dietaria.
- Los AGT aumentaron el contenido de TAG hepáticos a niveles recomendados de grasa dietaria, asociado a un incremento en la biosíntesis y disminución de la β -oxidación.
- La sustitución con AGT atenuó el incremento de TAG hepáticos observados en animales alimentados con elevados niveles de grasa dietaria, y esto estuvo relacionado con la regulación de factores de transcripción y enzimas relacionadas con la lipogénesis y con una mayor secreción de TAG.
- Los AGT a niveles recomendados de grasa redujeron el contenido de LA, ALA y AA en hígado; mientras que a niveles elevados disminuyeron el LA y ALA sin afectar el AA y DHA, sugiriendo un efecto diferencial sobre la síntesis de LC-PUFA que depende del nivel de grasa dietaria.
- La sustitución con AGT incrementó el flujo biliar en ratas alimentadas con niveles elevados de grasa dietaria, asociado a un incremento de la síntesis de ácidos biliares y a una atenuación del contenido de colesterol hepático.
- Los AGT incrementaron los panículos de TAE en animales alimentados a niveles recomendados de grasa, asociado a aumento de la actividad de la LPL; mientras que a niveles elevados de grasa, no aumentaron más el depósito de lípidos ya incrementados por la dieta rica en grasa en este tejido.

En relación a los efectos de los CLA, los resultados más importantes mostraron que:

- Ambos isómeros CLA fueron incorporados y retenidos en mayor medida en tejido adiposo, que en hígado y suero de animales alimentados a niveles recomendados o elevados de grasa dietaria, observándose dependencia del nivel de grasa.
- El RA fue más retenido que el isómero 10*t*,12*c*-18:1 en todas las muestras analizadas, a excepción de la bilis, con dependencia del nivel de grasa dietaria suministrado a los animales.
- Los CLA redujeron los panículos del tejido adiposo retroperitoneal en los animales alimentados a ambos niveles de grasa dietaria, no obstante no modificaron el peso corporal ni de otros tejidos en estas ratas.
- Los CLA incrementaron los TAG séricos en animales alimentados con niveles recomendados de grasa, mientras que a niveles elevados no acrecentaron los niveles ya aumentados por el nivel de grasa. Estos efectos estuvieron asociados a una mayor secreción hepática de TAG y a la remoción de los mismos por el tejido adiposo.
- Las dietas con CLA incrementaron los niveles de TAG hepáticos asociado a un desbalance en la relación lipogénesis/ β -oxidación y a menores niveles de ARNm de genes relacionados con la oxidación de AG; mientras que a niveles elevados de grasa no acrecentaron los TAG ya aumentados por la dieta rica en grasa, asociado a una mayor VSTAG y una disminuida expresión de genes relacionados con la lipogénesis.
- Los CLA en animales alimentados a niveles elevados de grasa aumentaron el flujo biliar asociado a un aumento en la síntesis-excreción de AB y mayor excreción de colesterol en bilis, sin modificar el contenido de colesterol hepático.

- Los CLA a niveles recomendados de grasa dietaria disminuyeron la síntesis de LC-PUFA n-6 asociado a un menor índice de la enzima Δ -6 desaturasa; mientras que a elevados niveles de grasa no modificaron esta vía metabólica. La síntesis de LC-PUFA n-3 no fue afectada por los CLA en ninguno de los niveles de grasa evaluados.
- Los CLA redujeron la acumulación de grasa en el TARP a ambos niveles de grasa dietaria evaluados, mientras que no modificaron los depósitos grasos en TAE aunque la actividad LPL en este tejido estuvo aumentada. Esto pudo deberse a un incremento en la actividad lipolítica en estos tejidos.

Los presentes resultados podrán contribuir a ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de acción y las implicancias metabólicas del consumo de isómeros de AG dietarios a niveles de ingesta alcanzables por la población. Además podrán ser de utilidad para comprender el impacto de la interacción entre la composición y la cantidad de grasa ingerida en el desarrollo de ECNT que permitan posteriormente tomar decisiones tendientes a disminuir su incidencia.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

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.

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

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

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

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

Albuquerque, K.T.; Sardinha, F.L.; Telles, M.M.; Watanabe, R.L.; Nascimento, C.M.; Tavares do Carmo, M.G. y col. (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.

Allen, R.R. *Hydrogenation*. (1960). *Journal AOCS*. 37: 521-523.

Allison, D. B.; Denke M. A., Dietschy J. M., Emken E. A., Kris-Etherton P. M., Nicolosi R. J. (1995). *Trans-fatty acids and coronary heart disease risk. Report of the expert panel on trans-fatty acids and coronary heart disease*. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 655S-708S.

American Institute of Nutrition. *Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Committee on Standards for Nutritional Studies*. (1977). *J. Nutr.* 107: 1340-1348.

Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M.R.; Martínez, M.A.; Ares, I.; Ramos, E.; Gómez-Cortés, P. y col. (2010). *Acute oral safety study of dairy fat rich in trans-10 C18:1 versus vaccenic plus conjugated linoleic acid in rats*. *Food Chem. Toxicol.* 48(2):591-598.

Anderson, R.L. y Coots, R.H. (1967). *The catabolism of the geometric isomers of uniformly 14C-labeled delta 9-octadecenoic acid and uniformly 14C-labeled delta 9,12-octadecadienoic acid by the fasting rat*. *Biochim. Biophys Acta.* 144: 525-531.

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.

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.; 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.

AOAC. (2005). *Official methods of analysis of AOAC International*, 18th. Official method 996.06. (AOAC INTERNATIONAL). Gaithersburg, MD.

AOCS. (2005). *Official methods and recommended practices of the AOCS*. 6th. Official method Ce 1h-05. (AOCS). Champaign, IL, USA.

AOCS. (2007). *Official methods and recommended practices of the AOCS. 6th*. Official method Ce 1j-07. (AOCS). Champaign, IL, USA.

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: S8-22.

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

Aro, A.; Jauhiainen, M.; Partanen, R.; Salminen, I. y Mutanen, M. (1997). *Stearic acid, trans fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects*. Am. J. Clin. Nutr. 65: 1419-1426.

Arrol, S.; Mackness, M.I. y Durrington, P.N. (2000). *The effects of fatty acids on apolipoprotein B secretion by human hepatoma cells (HEP G2)*. Atheroscler. Suppl 150: 255-264.

Ascherio, A. y Willett, W.C. (1994). *Are body iron stores related to the risk of coronary heart disease?* N. Engl. J. Med. 330: 1152-1154.

Ascherio, A; Katan, M.B.; Zock, P.L.; Stampfer, M.J. and Willett, W.C. (1999). *Trans Fatty Acids and Coronary Heart Disease*. N. Engl. J. Med. 340: 1994-1998.

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.

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

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.

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. y Martin, J.C. (1998). *Trans Fatty Acids in Human Nutrition. Conjugated linoleic acid and metabolites*. (Sébédio, J.J. and Christie, W.W.). Oily Press. Dundee. Scotland. 261-302.

Banni, S., Angioni, E., Casu, V., Melis, M. P., Carta, G., Corongiu, F. P. y col. (1999). *Decrease in linoleic acid metabolites as a potential mechanism in cancer risk reduction by conjugated linoleic acid*. Carcinogenesis 20: 1019-1024.

Banni, S.; Angioni, E.; Murru, E.; Carta, G.; Melis, M. P.; Bauman, D. y col. (2001b). *Vaccenic acid feeding increases tissue levels of Conjugated Linoleic Acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland*. Nutr. Cancer. 41: 91-97.

Banni, S.; Carta, G.; Angioni, E.; Murru, E.; Scanu, P.; Melis, M.P. y col. (2001a). *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.; Angioni, E.; Murru, E. y col. (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.

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

Barnes, K.; Chen, Q. y Dartigue, V. *Effect of mouse strain on dietary CLA and coconut oil-induced lipolysis*. FASEB J. 29 (1) Suppl. 136.6.

Barson, J. R.; Karatayev, O.; Gaysinskaya, V.; Chang, G-Q. y Leibowitz, S.F. (2012). *Effect of dietary fatty acid composition on food intake, triglycerides, and hypothalamic peptides*. Regul. Pept. 173(1-3): 13-20.

Bauman, D.E.; Barbano, D.M.; Dwyer, D.A.; and Griinari, J.M. (2000). *Technical note: production of butter with enhanced conjugated linoleic acid for use in biomedical studies with animal models*. J. Dairy Sci. 83: 2422-2425.

Bauman, D.E.; Baumgard, L.H.; Corl, B.A.; Griinari, J.M. (1999). *Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants*. Proc ASAS. 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.

Beare-Rogers, J.L.; Gray, B.; Hollywood, R. (1979). *The linoleic acid and trans fatty acids of margarines*. J. Am. Clin. Nutr. 32: 1805-1809.

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.

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

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

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.

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

Bernal, C.A.; Rovira, J.; Colandre, M.E.; Cusso, R. y 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.

Bernas, A.; Kumar, N.; Maki-Arvela, P.; Kulkova, N.V.; Holmbom, B.; Salmi, T. y col. (2003). *Isomerization of linoleic acid over supported metal catalysts*. Appl. Catalysis A: General. 245: 257-275.

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

Björkhem, I; Blomstrand, R.; Svensson, L. (1978). *Effect of different dietary triglycerides on 7alpha-hydroxylation of cholesterol and other mixed-function oxidations*. J. Lipid Res.19 (3):359-69.

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. Phis.37:911-917.

Blomstrand, R.; Diczfalusy, U.; Sisfontes, L. y Svensson, L. (1985). *Influence of dietary partially hydrogenated vegetable and marine oils on membrane composition and function of liver microsomes and platelets in the rat*. Lipids. 20:283-295.

Blundell, J.E y Stubbs, R.J. (1999). *High and low carbohydrate and fat intakes: limits imposed by appetite and palatability and their implications for energy balance*. Eur J Clin Nutr. 53. (Suppl 1): S148-165.

Blundell, J.E. y MacDiarmid, J.I. (1997). *Fat as a risk factor for overconsumption: satiation, satiety, and patterns of eating*. J. Am. Diet. Assoc. 97 (Suppl 7): S63-69.

Blundell, J.E.; Burley, V.J.; Cotton, J.R. y Lawton, C.L. (1993). *Dietary fat and the control of energy intake: evaluating the effects of fat on meal size and postmeal satiety*. Am J Clin Nutr. 57 (Suppl): 772S-777S.

Booyens, J.; Louwrens, C.C.; Katzeff, I.E. (1988). *The role of unnatural dietary trans and cis unsaturated fatty acids in the epidemiology of coronary artery disease*. Med. Hypotheses . 25: 175-182.

Bötcher, C.J.F.; van Gent, C.M.; Pries C. (1961). *A rapid and sensitive sub-microphosphorus determination*. Anal. Chim. Acta. 24: 203-204.

Bravo, E.; Flora, L.; Cantafora, A.; De Luca, V.; Tripodi, M; Avella, M. y col. (1998). *The influence of dietary saturated and unsaturated fat on hepatic cholesterol metabolism and the biliary excretion of chylomicron cholesterol in the rat*. Biochim. Biophys. Acta. 1390:134-148.

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.

Brouwer, I.A.; Wanders, A.J. y Katan, M.B. (2013). *Trans fatty acids and cardiovascular health: research completed?* Eur. J. Clin. Nutr. 67: 541-547.

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.

Browning, J.D. y Horton J. D. (2004). *Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury*. J. Clin. Invest. 114(2):147-152.

Buettner, R.; Parhofer, K.G.; Woenckhaus, M.; Wrede, C.E.; Kunz-Schughart, L.A.; Schölmerich, J. y col. (2006). *Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types*. Journal of Molecular Endocrinology. 36, 485-501.

Burr, G.O. y Burr, M. (1929). *A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet*. J. Biol. Chem. 82: 345.

Byrne, C.; Rockett, H. y Holmes, M.D. (2002). *Dietary fat, fat subtypes, and breast cancer risk: lack of an association among postmenopausal women with no history of benign breast disease*. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 261-265.

Byrne, C.D. (2010). *Fatty liver: Role of inflammation and fatty acid nutrition*. *PLEFA.* 82: 265-271.

Campillo Álvarez, J.E. (2010). *El mono obeso. Introducción*. Crítica S.L. Barcelona. 11-6.

Canolty, N.J. y Kung, I.J. (1976). *Utilization of energy for maintenance and for fat and lean gain 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.

Casas-Agustench, P.; López-Uriarte, P., Bulló, M.; Rosb, E; Gómez-Flores A. y Salas-Salvadó, J. (2009). *Acute effects of three high-fat meals with different fat saturations on energy expenditure, substrate oxidation and satiety*. *Clin. Nutr.* 28: 39-45.

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.

Chajes, V.; Thiebaut, A.C.; Rotival, M.; Gauthier, E.; Maillard, V.; Boutron-Ruault, M.C. y col. (2008). *Association between serum trans-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC Study*. *Am. J. Epidemiol.* 167: 1312-1320.

Chardigny, J.M.; Destailats, F.; Malpuech-Brugère, C.; Moulin, J.; Bauman, D.E.; Lock, A.L. y col. (2008). *Do trans fatty acids from industrially produced sources and from natural sources have the same effect on cardiovascular disease risk factors in healthy subjects? Results of the trans Fatty Acids Collaboration (TRANSFACT) study1–4*. Am. J. Clin. Nutr. 87:558-66.

Chavarro, J.E.; Stampfer, M.J.; Campos, H.; Kurth, T.; Willett, W.C. y Ma, J. (2008). *A prospective study of trans-fatty acid levels in blood and risk of prostate cancer*. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 17: 95-101.

Cheema, S. K. Cheema; Cikaluk, D y Agellon, L. *Dietary fats modulate the regulatory potential of dietary cholesterol on cholesterol 7 α -hydroxylase gene expression*. (1997) J. Lipid Res. 38: 315- 323.

Chin,S.F.; Storkson, J.M.; Liu, W.; Albright, K.J. y Pariza, M.W.(1994). *Conjugated linoleic acid (9,11- and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid*. J Nutr. 124 (5):694-701.

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*. Lipid. Health Dis. 10: 15.

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.