

SECRECIÓN BILIAR Y ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO EN ANIMALES ALIMENTADOS CON CONJUGADOS DEL ÁCIDO LINOLEICO (CLA).

BILIARY SECRETION AND HEPATIC OXIDATIVE STRESS IN ANIMALS FED WITH LINOLEIC ACID CONJUGATES (CLA)

MARCELA GONZÁLEZ¹, VANESA TOMATIS¹, PAOLA ILLESCA¹, FLORENCIA ANDREOLI^{1,2}, CLAUDIO BERNAL^{1,2}

1-Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Biológicas, Cátedra de Bromatología y Nutrición.

2-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Resumen

El objetivo de este trabajo fue investigar los efectos de los CLA en dos niveles de grasa (7 y 20%) sobre la secreción biliar y el estrés oxidativo hepático. Los animales fueron divididos en cuatro grupos y alimentados con dietas suplementadas o no con CLA durante 30 días. Transcurrido este tiempo, se analizó "in vivo" el flujo biliar (FB) por cateterización del colédoco y recolección de muestras de bilis durante 1 hora. En bilis se determinó la concentración de ácidos biliares (AB), proteínas, fosfolípidos (Fl) y colesterol (Col). Finalmente, en homogeneizados hepáticos se determinaron parámetros relacionados con el estado oxidativo. Los resultados demostraron que, en ambos niveles de grasas de la dieta, los CLA aumentaron el FB (40% en dietas de bajo porcentaje de grasa y más de 50% en dietas de alto porcentaje de grasa). Esto estuvo acompañado por un aumento en la velocidad de excreción de AB y proteínas. No se observaron modificaciones significativas en los parámetros de estrés oxidativo evaluados. En conclusión, los CLA en ambos niveles de grasa dietaria aumentan el FB dependiente de AB, lo cual podría estar relacionado con la actividad proliferativa peroxisomal de los mismos que, estimulando la β -oxidación, aumentarían el flujo de Acetil-CoA necesario para la biosíntesis de AB.

Palabras claves: hígado; CLA; estrés oxidativo; flujo biliar.

Abreviaturas: CLA: conjugados del ácido linoleico; FB: flujo biliar; AB: ácidos biliares; Fl: fosfolípidos; Col: colesterol.

Summary:

The purpose of this work was to investigate the effects of CLA at two levels (7 and 20%) of dietary fat on biliary secretion and oxidative stress in liver of rats. Animals were divided in four groups and fed with diets, supplemented or not with CLA during 30 days. After this time, we analyzed "in vivo" bile flow by cannulation of bile duct and collecting bile during 1 hour. In bile, we evaluated biliary acids, proteins, phospholipids and cholesterol concentrations. Furthermore, we determinate in liver homogenates oxidative stress parameters. The results of this experiment demonstrated that at both dietary fat levels, CLA increased bile flow (40% and more than 50% in recommended and high fat levels, respectively). This was accompanied by an increase in biliary acids and protein secretion rates without significant changes in oxidative stress parameters. It can be concluded that at both dietary fat levels CLA increases the fractional bile flow dependent of biliary acids. This can be related with peroxisomal proliferative activity of CLA that, stimulating β -oxidation, could produce a bigger flow of Acetil-Co A which is a precursor of bile acids synthesis.

Key words: Liver; CLA; oxidative stress; bile flow.

Abbreviations: CLA, conjugated linoleic acid.

Introducción

Las grasas dietarias son una importante fuente energética, transportan vitaminas liposolubles, suministran ácidos grasos esenciales, cumplen un rol vital para el crecimiento y participan en diversas funciones biológicas como precursores de prostaglandinas, componentes de membranas, moduladores de funciones celulares e inmunológicas. Se ha demostrado que dichas funciones están principalmente relacionadas con el tipo de ácido graso (AG) dietario que es ingerido.

Durante los últimos años, han sido objeto de gran atención los efectos bioquímicos de los AG isoméricos (geométricos y/o posicionales), abriendo un campo científico especial, principalmente por la potencial repercusión sobre la salud humana. Los Conjugados del Ácido Linoleico (CLA) son AG dienoicos derivados del ácido linoleico, que se caracterizan por modificaciones isoméricas posicionales^(9,11 y 10,12) y geométricas (cis/trans) de sus dobles enlaces. Los mismos son generados por las bacterias del rúmen y colónicas, por ello se encuentran naturalmente en la carne de rumiantes, leche y productos lácteos derivados, y también en menor proporción pueden ser formados industrialmente. El isómero *c9,t11*-CLA constituye aproximadamente el 80% de los CLA presentes en los alimentos de origen animal, mientras que los CLA producidos industrialmente a partir de aceites vegetales comerciales guardan una proporción isomérica equimolecular entre el *c9,t11*-CLA y el *t10,c12*-CLA.

El contenido de CLA en la leche de vaca es de aproximadamente 4 a 20 mg/g de AG, dependiendo de la alimentación del animal, mientras que en los aceites comerciales su contenido es muy variado.

Los CLA presentan propiedades muy diferentes a los AG con isomería sólo trans y actualmente son considerados importantes sustancias bioactivas. En este sentido, mientras numerosas implicancias deletéreas han sido atribuidas a los AG-t, efectos positivos y negativos han sido reportados sobre los CLA.⁽¹⁻⁴⁾ En animales de experimentación se ha demostrado una actividad pre-

ventiva de los CLA sobre el cáncer en distintos tejidos^(5,6), principalmente de mamas, aumento de la masa corporal magra⁽⁷⁾, modulación de los lípidos circulantes⁽⁸⁾ y protección contra los efectos catabólicos de endotoxinas^(9,10). Asimismo, se ha sugerido que los CLA podrían tener efectos antioxidantes indirectamente a través de la producción de sustancias protectoras contra los efectos deletéreos de los peróxidos. Por otro lado, diversos efectos negativos han sido reportados, entre ellos, hepatomegalia y esteatosis hepática. Los efectos benéficos, como deletéreos de los CLA han suscitado controversias, dependiendo sus resultados de numerosos factores entre ellos, el modelo experimental, la grasa dietaria, el tipo y nivel de isómeros utilizados.

Dado que a nuestro nivel de conocimiento, no se dispone de estudios que hayan investigado las acciones que los isómeros CLA podrían tener sobre el metabolismo lipídico hepático, el objetivo de este trabajo fue investigar en animales de experimentación los efectos de los CLA comerciales sobre la secreción biliar y el estado oxidativo en el hígado.

El presente trabajo, en el área de la salud, podría tener un alto impacto debido a que los CLA producidos industrialmente están siendo adicionados a ciertos alimentos y son ofrecidos como ayudas ergogénicas lo que enfatiza, por cuestiones de seguridad, la promoción de más investigaciones en este campo científico.

Metodología

1- Animales y tratamientos dietarios

Ratas macho de la cepa Wistar fueron aclimatadas desde su arribo en un ambiente con luz-oscuridad de 12 hs. y a temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ \text{C}$), teniendo libre acceso al agua y a una dieta estándar de laboratorio. Cuando alcanzaron 100-120 g de peso, fueron divididos en cuatro grupos dietarios que recibieron durante 30 días "ad libitum" una de las dietas detalladas en la Tabla 1, basadas en las recomendaciones del "American Institute of Nutrition".⁽¹¹⁾

TABLA 1
Composición de las dietas (g/kg dieta)

	C	RG	C+CLA	RG+CLA
Aceite de maíz	7	20	6	17
Aceite rico en CLA	-	-	1	3
Proteínas	20	20	20	20
Almidón	52.95	39.95	52.95	39.95
Sacarosa	10	10	10	10
Fibras	5	5	5	5
Vitaminas	1.0	1.0	1.0	1.0
Minerales	3.5	3.5	3.5	3.5
Cisteína/Metionina/Colina	0.55	0.55	0.55	0.55
Energía (Kjoule/g)	14.83	17.55	14.83	17.55

Composición de las dietas utilizadas.

Se conformaron los siguientes grupos experimentales:
-Control (C): 7% de Aceite de Maíz (AM), aceite rico en Ácido Linoleico.

-Rico en Grasa (RG): 20% de AM.

-Control enriquecido con CLA (C+CLA): obtenido por sustitución del 1% de AM de la dieta Control por 1% de la mezcla de CLA (6% AM + 1% CLA).

-Rico en Grasa enriquecido con CLA (RG+CLA): obtenido por sustitución del 3% de AM de la dieta Control por 3% de la mezcla de CLA (17% AM + 3% CLA).

La mezcla de isómeros CLA cuyos principales componentes fueron c9,t11-CLA y t10,c12-CLA (aproximadamente 40-45% de c/u) fue cedida gentilmente Lipid Nutrition B.V. Holanda.

2- Procedimiento quirúrgico

Al cabo de los 30 días de tratamiento, los animales ayunados fueron pesados y luego anestesiados con una dosis única intraperitoneal de acepromazina (1 mg/kg pc) y ketamina (100 mg/kg pc). La temperatura corporal se mantuvo entre 37-38,5 °C con una lámpara infrarroja de calentamiento. Finalizados los experimentos, los animales fueron sacrificados, los hígados removidos y pesados para posteriores determinaciones.

3- Determinaciones bioquímicas

•Enzimas marcadoras de daño hepático

Sueros frescos fueron empleados para analizar, a través de kits comerciales (Wiener Lab., Rosario, Argentina), las actividades de enzimas plasmáticas marcadoras de daño hepático tales como aspartato aminotransferasa (ASAT), alanina aminotransferasa (ALAT) y fosfatasa alcalina (FAL). Los valores se expresaron en U/l.

•Flujo biliar (FB)

Para el estudio "in vivo" de la secreción biliar, a los animales anestesiados, se les cateterizó el colédoco con un catéter P10 y muestras de bilis fueron recolectadas cada 15 min durante 1 hora. El flujo biliar (FB) fue estimado gravimétricamente, asumiendo una densidad de la bilis de 1 g/mL. Los valores fueron expresados en µl/min/100 g rata.⁽¹²⁾

Las velocidades de excreción biliar de los distintos componentes excretados fueron calculadas como el producto del FB y las concentraciones biliares de los mismos.

• Ácidos biliares (AB) totales

Los ácidos biliares en bilis fueron medidos por el método de Talalay.⁽¹³⁾ El mismo se fundamenta en la oxidación del grupo hidroxilo 3 alfa del núcleo de los ácidos biliares por la enzima 3 alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa formando NADH. Se origina 1 mol de NADH por cada mol oxidado de ácidos biliares hidroxilados. Los resultados fueron expresados como µmol/mL.

•Proteínas totales

Para la determinación de las proteínas totales tanto en bilis como en homogeneizados hepáticos se utilizó el método colorimétrico de Lowry y col.⁽¹⁴⁾

•Colesterol (Col) total

Se determinó la concentración de colesterol en bilis por el método enzimático de la colesterolasa, colesterol oxidasa y colesterol peroxidasa (Wiener Lab., Rosario, Arg.).

•Fosfolípidos (Fl)

Para la determinación de fosfolípidos totales se utilizó la técnica de Duck-Chong.⁽¹⁵⁾ El fósforo de los fosfolípidos es convertido primero en fosfato inorgánico cuando el extracto lipídico es calentado en presencia de Nitrato de Magnesio. El residuo es disuelto en HCl. El fósforo inorgánico se determina por el reactivo ácido formado por molibdato-verde de malaquita con la formación de un complejo entre fosfomolibdato y el colorante básico que se estabiliza con un tensoactivo. La absorbancia se mide a 650 nm luego de 5 minutos de finalizada la reacción y a temperatura ambiente.

•Parámetros relacionados al daño peroxidativo en el hígado.

En muestras de hígado lavado en solución fisiológica a 4 °C se determinó el grado de lipoperoxidación (LPO) mediante el dosaje de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBAR) y el estado tanto de sistemas antioxidantes no enzimáticos, a través de la determinación del contenido de Glutation (GSH) reducido, como el de sistemas antioxidantes enzimáticos midiendo las actividades de las enzimas Catalasa (CAT), Glutation peroxidasa (GSH-Px) y Glutation reductasa (GR).

El nivel de LPO se determinó por el método de Ohkawa.⁽¹⁶⁾ El ensayo se realizó en homogeneizados hepáticos preparados en una proporción de 1 gramo de tejido húmedo con 9 ml de KCl 1,15%, usando un homogeneizador Potter-Elvehjén. El método consiste en la reacción del Ácido Tiobarbitúrico (TBA) con un producto secundario de la peroxidación lipídica identificado como malonaldehído (MDA), formado durante la incubación de homogeneizados tisulares bajo condiciones aeróbicas. Esto genera, en medio acético y caliente, un cromógeno rojo con un pico de absorción espectrofotométrica a 532 nm. Los resultados fueron expresados en nmol MDA/g de tejido húmedo.

La determinación de GSH se realizó en homogeneizados hepáticos obtenidos con tricloroacético al 5% en HCl 0,01 M a 4°C, en una proporción de 4 mL por gramo de tejido húmedo. En el sobrenadante, obtenido por centrifugación, se determinó el contenido de GSH según la técnica de Ellman⁽¹⁷⁾, utilizando como reactivo el ácido 5,5'- ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB). Los resultados fueron expresados en µmol/g de tejido húmedo.

La actividad enzimática de CAT fue determinada por el

método de Cohen y col. ⁽¹⁸⁾, la de GSH-Px por el método de Paglia y Valentine ⁽¹⁹⁾ y la actividad de GR por el método de Horn. ⁽²⁰⁾ Las determinaciones enzimáticas fueron realizadas en homogeneizados hepáticos preparados con sacarosa 0,25 M.

La actividad CAT se basa en la cantidad de H₂O₂ degradada por la enzima en *buffer* KH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM con EDTA 0,1 mM pH=7. La medición de la disminución del contenido del sustrato se realizó espectrofotométricamente a 240 nm durante 60 segundos. La actividad CAT fue expresada en U/mg de proteína.

La actividad GSH-Px se cuantificó utilizando peróxido de hidrógeno como sustrato y la reacción fue seguida espectrofotométricamente por el consumo de NADPH en presencia de la enzima Glutacion reductasa. La reacción fue realizada en *buffer* KH₂PO₄/Na₂HPO₄ 50 mM pH=7 con 1mM de GSH, 0,2 mM de NADPH y 1,4 U de GR. Los cambios en la absorbancia se registraron durante 2 minutos a 340 nm. La actividad GSH-Px fue expresada como U/mg de proteína.

La actividad GR se midió utilizando como sustrato glutatión oxidado (GSSG) en *buffer* Tris pH=8 con EDTA 4 mM y NADPH 2mM. La disminución en la absorbancia ocasionada por la transformación del NADP⁺ a partir de NADPH se registró durante 3 minutos a 340 nm. La actividad GR se expresó como U/mg de proteína.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un test de variancia (2x2 ANOVA), seguido del test de Scheffé a través del programa informático STATGRAPHICS[®] (Statistical Graphics System Vers. 4.0). Los resultados fueron expresados como la media ± SEM y p<0,05 fue considerado como límite para la significancia estadística.

Resultados

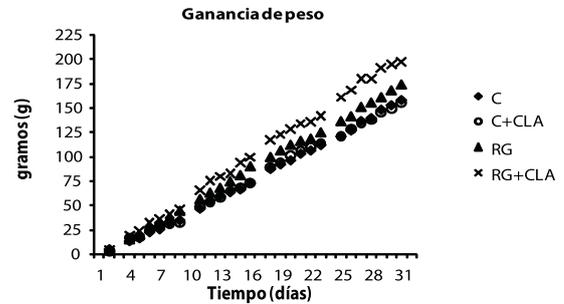
Los animales de todos los grupos dietarios tuvieron un continuo incremento del peso corporal y no se observaron diferencias en la ganancia de peso corporal total al final de la experiencia (Figura 1).

En los animales no se observaron signos de daño

FIGURA 1

Evolución del peso corporal de los animales según su grupo experimental.

Cada punto corresponde al peso promedio diario del lote de animales (n=5) de cada grupo dietario.



hepático evaluados a través de algunos parámetros indicativos, como las actividades de las enzimas ASAT, ALAT Y FAL (Tabla 2).

Las dietas conteniendo CLA aumentaron significativamente el FB (C+CLA: 51 % y RG+CLA: 56 %, vs. C y RG, respectivamente; p=0.0016), sin diferencias entre los niveles de grasa utilizada. Además se pudo observar un aumento significativo en la concentración de AB (C+CLA: 34% y RG+CLA: 42% vs. C y RG, respectivamente; p=0.0001) sin diferencias por el tipo de grasa utilizada. En consecuencia, el aumento tanto del FB como en la concentración de AB en ambos grupos CLA provoca un aumento significativo en la velocidad de excreción de este componente (p=0,0001). Las velocidades de excreción biliar de FI y Col no aumentaron significativamente a pesar del incremento del FB observado; por el contrario, el incremento en la velocidad de excreción de proteínas se relacionó directamente al aumento del FB (Figura 2).

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos de las determinaciones de parámetros relacionados al estrés oxidativo a nivel hepático. Tanto en los valores obtenidos de LPO, como en los parámetros de sistemas antioxidantes no enzimáticos (GSH) y enzimáticos

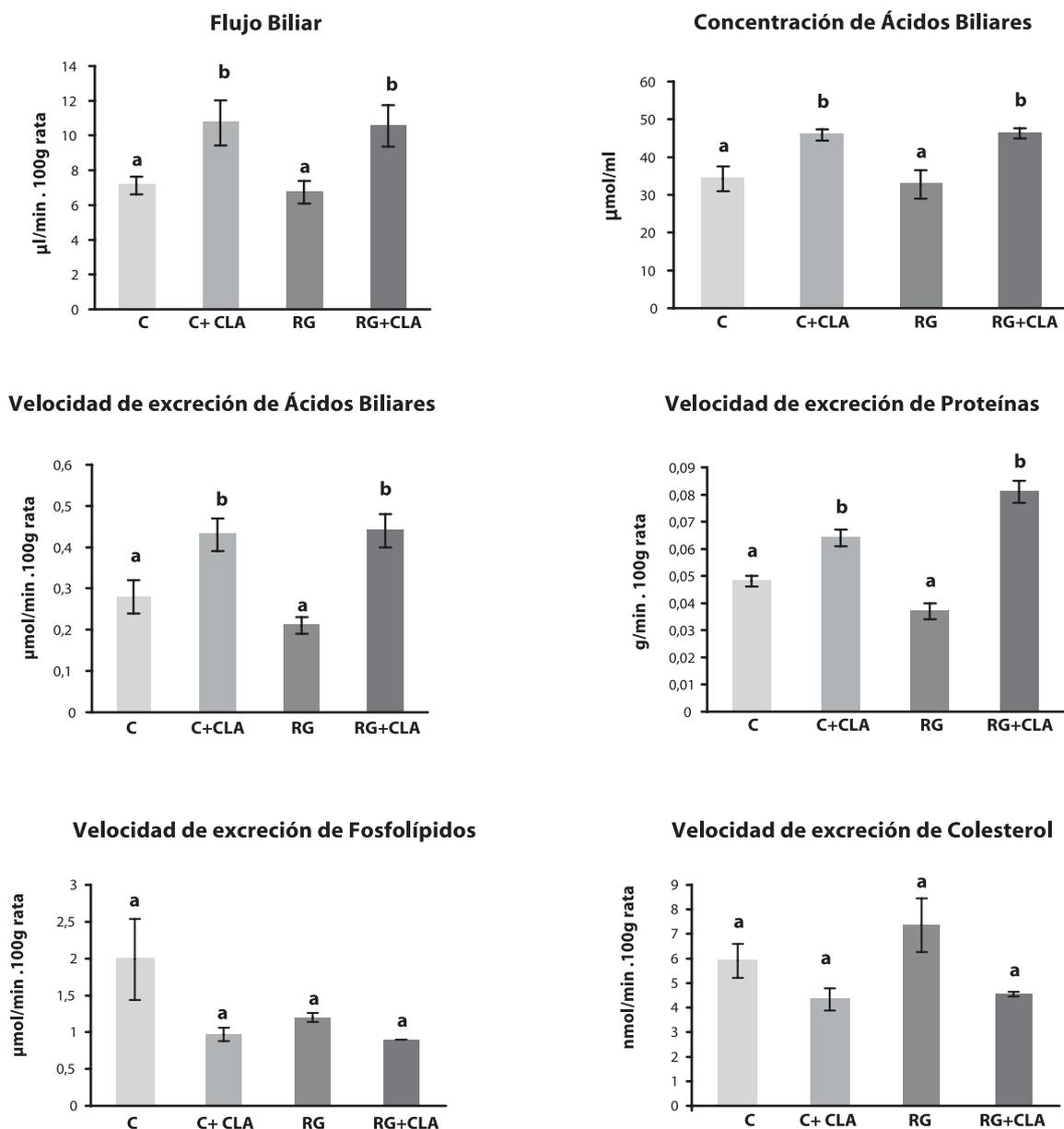
TABLA 2
Actividades de enzimas plasmáticas: ALAT, ASAT Y FAL

	C	C+CLA	RG	RG+CLA
ALAT (U/l)	41,66 ± 4,05 ^a	47,79 ± 5,44 ^a	41,55 ± 2,05 ^a	40,84 ± 1,13 ^a
ASAT (U/l)	16,39 ± 3,84 ^a	17,92 ± 1,34 ^a	17,36 ± 1,01 ^a	16,73 ± 1,15 ^a
FAL (U/l)	653,54 ± 56,52 ^a	563,85 ± 50,73 ^a	732,22 ± 67,46 ^a	527,34 ± 76,55 ^a

Los resultados se expresan como promedio ± SEM (n=6). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (ANOVA seguido de test de Scheffé)

FIGURA 2

Flujo biliar, concentración de AB y velocidades de excreción de AB, FI, Col y Proteínas.

Los resultados se expresan como promedio \pm SEM (n=6).

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (ANOVA seguido de test de Scheffé).

TABLA 3

Marcadores de daño peroxidativo hepático

	C	C+CLA	RG	RG+CLA
LPO (nmol MDA/ g híg.)	368.40 \pm 21.33 ^a	315.45 \pm 16.45 ^a	328.20 \pm 30.66 ^a	319.68 \pm 20.60 ^a
GSH (mmol/g híg.)	2.049 \pm 0.136 ^a	2.276 \pm 0.215 ^a	2.687 \pm 0.106 ^a	2.276 \pm 0.272 ^a
CAT (U/ mg prot.)	103.93 \pm 17.70 ^a	93.24 \pm 7.90 ^a	105.31 \pm 11,98 ^a	123.26 \pm 15.02 ^a
GR (mU/mg prot.)	0.44 \pm 0.06 ^a	0.51 \pm 0.06 ^a	0.42 \pm 0.10 ^a	0.47 \pm 0.42 ^a
GSH-Px (U/mg prot.)	11.00 \pm 0.82 ^a	7.40 \pm 0.81 ^a	12.60 \pm 2.33 ^a	7.20 \pm 1.46 ^b

Medida de Lipoperoxidación y actividad de los sistemas antioxidantes hepáticos enzimáticos y no enzimáticos. Los resultados se expresan como promedio \pm SEM (n=6). Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (ANOVA seguido de test de Scheffé)

(CAT, GSH-Px y GR) no se observaron variaciones significativas por la presencia de CLA, ni por el nivel de grasa utilizada en la dieta.

Discusión

En el modelo utilizado en este trabajo estudiamos el efecto de los CLA a dos niveles de grasa dietaria (7 y 20%). Dado que el aceite empleado es rico en Ácido Linoleico y los CLA compiten con los mismos, los niveles de CLA se incrementaron en forma semejante al incremento de grasa para mantener constante la relación Ácido Linoleico/CLA. De esta manera quedó conformado un modelo experimental sobre el que, según nuestro conocimiento, es el primero en mostrar cómo la ingesta de isómeros CLA afectaría el FB en animales de experimentación.

Park y col. 1997⁽²¹⁾ hallaron que los efectos más consistentes de los CLA fueron sobre el peso corporal con una marcada disminución del mismo. Sin embargo, los escasos cambios inducidos por los CLA en nuestro modelo dietario concuerdan con los resultados hallados por otros autores en animales bien nutridos, alimentados con niveles normales^(22,23) y elevados⁽²⁴⁾ de grasa en la dieta. En trabajos previos ha sido demostrado que los CLA generan hepatomegalia en ratones⁽²⁵⁾, aunque en otros modelos esto no se observó, debido quizá entre otros factores a la diferencia de especie. La ausencia de hepatomegalia en nuestro trabajo coincide con los resultados, en la misma especie de animales bien nutridos, obtenidos por Park y col. 2005.⁽²⁶⁾

El hígado es un órgano blanco para la acción de los CLA, lo que conduce una acumulación muy significativa de TG acompañada de hepatomegalia. Dentro de los mecanismos que podrían estar involucrados en la inducción de la acumulación de lípidos, podría mencionarse las alteraciones en la síntesis y oxidación de AG, regulación de factores de transcripción y el ensamble de pre- β lipoproteínas, entre otros mecanismos. Varios autores han reportado que la ingesta de la mezcla de isómeros CLA en ratones incrementa la actividad y expresión de las enzimas involucradas tanto en la síntesis de AG, como en la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal.⁽²⁷⁾ La expresión génica de casi todas las enzimas involucradas en la oxidación de lípidos hepáticos y en la captación hepática de TG es regulada por los PPAR- β .^(28,29) Moya-Camarena y col.⁽³⁰⁾ demostraron que los CLA son potentes ligandos y activadores de estos receptores nucleares. Así, a través de la unión y activación a los PPAR- β , la ingesta de CLA resulta en un aumento del mRNA de la enzima Acil CoA oxidasa (ACO) responsable de oxidación de los AG en peroxisomas y de la proteína de unión a AG (FABP). Esta inducción de la β -oxidación peroxisomal aumentaría la descomposición de AG favoreciendo una mayor producción de precursores para la síntesis de lípidos funcio-

nales como AB y FI.⁽³¹⁾ Los CLA inducen la expresión de PPAR- β lo cual aumenta la β -oxidación mitocondrial y peroxisomal.^(32,33) Los mismos estudios también sugieren que la conformación espacial que presentan los CLA, de tipo hairpin, es la que permite las interacciones hidrofóbicas específicas con las proteínas, pudiendo explicar de esta manera su interacción con los PPAR- β . Esta característica le otorga a la β -oxidación una gran relevancia anabólica debido a su habilidad para generar Acetil-CoA. Como se puede observar en nuestros resultados, los CLA, con ambos niveles de grasa dietaria, aumentaron el FB a expensas de la fracción dependiente de AB evidenciado por un aumento en la concentración de los mismos en la bilis.

Por otro lado, resultados controversiales han sido reportados en relación a los efectos de los isómeros sobre el estrés oxidativo hepático. Sailaja y col., 2004⁽³⁴⁾ hallaron en dietas con alto contenido de grasa niveles incrementados de LPO asociados a un fuerte descenso en varios sistemas enzimáticos a nivel hepático mientras que, Lin y col., 2008⁽³⁵⁾ y Yang y col., 2006⁽³⁶⁾ reportaron resultados similares, acompañados por un descenso de los niveles de GSH. La capacidad de los CLA de prevenir el incremento en los niveles hepáticos de LPO fue hallada también por Livisay y col., 2000⁽³⁷⁾, quienes reportaron que la habilidad de los CLA de disminuir la formación de los mismos sin afectar otros marcadores de oxidación, sugiere que la menor generación de estrés oxidativo sería el resultado de una disminución en el contenido de ácidos grasos poli-insaturados de las membranas. Aunque los CLA no actúen directamente como antioxidantes, su habilidad de alterar la composición de AG podría disminuir la formación de productos citotóxicos. Este resultado puede relacionarse con el potencial efecto antioxidante de los CLA que Yu y col., 2001⁽³⁸⁾ evaluaron *in vitro*, sugiriendo que podrían ejercer un efecto de *quenching* sobre los radicales libres, protegiendo así contra los efectos deletéreos de los peróxidos. Nuestros estudios, sin embargo, no mostraron modificaciones significativas de los parámetros de estrés hepático en ninguno de los niveles de grasa utilizados.

Conclusión

Estos resultados nos permiten inferir que los CLA, en los niveles de grasas evaluados, producen un incremento del FB dependiente de AB. En nuestro modelo experimental, con ratas Wistar, las modificaciones relacionadas al FB no estuvieron asociadas con variaciones en los parámetros evaluados de estrés oxidativo. Los mecanismos involucrados podrían estar vinculados a la actividad proliferadora peroxisomal de los CLA, que estimulando la β -oxidación proveerían mayor flujo de Acetil Co A, necesaria para la síntesis de AB.

Agradecimientos

- Agradecemos al Sr. Walter Darú y la Srta. Mónica Nasimbera por su asistencia técnica con los animales.
- Agradecemos el soporte financiero recibido de la ANPCyT (Agencia Nacional Científica y Tecnológica PICT 25750)
- Asimismo agradecemos al CYTED (Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - Ministerio Español de Ciencia y Tecnología – BFI2002-00218) por el soporte financiero de la Red Temática 208RT0343 en la cuál este trabajo de investigación está incluido.

Referencias Bibliográficas

- 1- Aro A. Amelvoort W. Becker M. et al. Trans fatty acids in dietary fats and oils from 14 european countries: the transfair study. *J.Food Composition and Analysis* 1998; 11: 137-149.
- 2- Kritchevsky D. Trans fatty acids and cardiovascular risk. *Prostaglandins Leukot. Essent.Fatty Acids* 1997; 57(4-5): 399-402.
- 3- Colandré ME. Diez RS. Bernal CA. Metabolic effect of trans fatty acids on an experimental dietary model. *Br.J.Nutr* 2003; 89: 631-638.
- 4- Bernal C. Rovira J. Colandré ME. Cussó R. Cadefau JA. Effects of dietary cis and trans unsaturated and saturated fatty acids on the glucose metabolites and enzymes of rats. *British J. Nutr* 2006; 95: 947-954.
- 5- Ip C. et. al. Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1997; 18 (4): 755-759.
- 6- Hubbard N. Lim D. Summers L. Erckson KL. Reduction of murine mammary tumor metastasis by conjugated linoleic acid. *Cancer Letters* 2000; 150 (1): 93-100.
- 7- Evans M. Brown J. McIntosh M. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. *J Nut Biochem* 2002; 13: 508-516.
- 8- Cook M. Miller C. Park Y. Pariza M. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult Sci* 1993; 72:1301-1305.
- 9- Miller C. Park Y. Pariza M. Cook M. Feeding conjugated linoleic acids to animals partially overcomes catabolic response due to endotoxin injection. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 198: 1107-1112.
- 10- Kloss R. Linscheid J. Johnson A. Lawson B. Edwards K. Linder T. Effects of conjugated linoleic acid supplementation on blood lipids and adiposity of rats fed diets rich in saturated versus unsaturated fat. *Pharmacol Res* 2005; 51:503-507.
- 11- Reeves P. Nielsen FH. Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr* 1993; 123: 1939-1951.
- 12- Gonzalez M. Roma M. Bernal C. Alvarez M. Carrillo MC. Biliary secretory function in rats chronically intoxicated with aluminium. *Toxicological Science* 2004; 79: 189 – 195.
- 13- Talalay P. Enzymatic analysis of steroid hormones. *Methods Biochem. Anal* 1960; 8: 119-143.
- 14- Lowry O. Passonneau J. A flexible system of enzymatic analysis. *Academic Press: New York - London* 1972.
- 15- Duck-Chong C. A rapid sensitive method for determining phospholipid phosphorous involving digestion with magnesium nitrate. *Lipids* 1979; 14: 492-497.
- 16- Ohkawa H. Ohishi N. Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 1979; 95: 351-358.
- 17- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archs Biochem Biophys* 1959; 82,70-73.
- 18- Cohen G. Dembiec D. Marcuson, J. (Eds). Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal.Biochem* 1970; 34: 30-38.
- 19- Paglia D. and Valentine W. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70: 158-169.

- 20- Rivas Martinez I. Melatonina y Parkinson: Implicación del poro mitocondrial de transición en la fisiopatología del Parkinson y papel de la melatonina como neuroprotector. Granada 2005.
- 21- Park Y. Albright KJ. Lin W. Storkson JM. Cook ME. Pariza MW. Effects of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids* 1997; 8: 853-858.
- 22- Patreud Mirand P. Arnal- Bagnard MA. Mosani L. Faulconnier Y. Chardigny JM. Chilliard Y. Cis-9,trans-11 and Trans-10,cis- 12 conjugated linoleic acid isomers do not modify body composition in adult sedentary or exercised rats. *Journal of Nutrition* 2004; 134: 2263-2269.
- 23- Azain M. Hausman D. Sisk M. Flatt W. Jewell D. Dietary conjugated linoleic acid reduce rat adipose tissue cell size rather than cell number. *Journal of Nutrition* 2000; 130: 1548-1554.
- 24- Kim M. Park Y. Albright K. Pariza M. Differential responses of hamsters and rats fed high- fat or low- fat diets supplemented with conjugated linoleic acid. *Nutrition Research* 2002; 22: 715-722.
- 25- Tsuboyama-Kasaoka N. Takahashi M. Tanemura K. et al. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes* 2000; 49(9): 1534-1542.
- 26- Park Y. Albright K. Pariza M. Effects of conjugated linoleic acid on long term feeding in Fischer 344 rats. *Food and Chem Toxicol* 2005; 43: 1273- 1279.
- 27- Takahasi Y. Kushiro M. Shinohara K. T. Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1631: 265- 273.
- 28- Jump DB. Clarke SD. Thelen A. Liinatta M. Ren B. Bodin MV. Dietary fat, genes and human health. *Adv Exp Med Biol* 1997; 422: 167-176.
- 29- Kota BP. Hsun- Wei Huang T. Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research* 2005; 51: 85-94.
- 30- Moya- Camarena S. Belury M. Species differences in the metabolism and regulation of gene expression by conjugated linoleic acid. *Nutrition Reviews* 1999; 57: 336- 340.
- 31- Hashimoto F. Ishikawa T. Hamada S. Hayashi H. Effect of gemfibrozil on lipid biosynthesis from Acetil-CoA derived from peroxisomal α - oxidation. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49: 1213-1221.
- 32- Moya -Camarena S. Vanden Heuvel J. Blanchard S. Leesnitzer L. Belury M. Conjugated linolenic acid is a potent naturally occurring ligand an activator of PPAR?. *Journal of Lipid Research* 1999; 40: 1426- 1433.
- 33- Jiang H. Dan Z. Wang H. Lin J. Effects of ATRA on contents of liver retinoids, oxidative stress and hepatic injury in rat model of extrahepatic cholestasis. *J. Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2007; 27(5): 491-494.
- 34- Sailaja JB. Balasubramaniyan V. Nalini N. Effects of exogenous leptin administration on high fat diet induced oxidative stress. *Pharmazie* 2004; 59 (6): 475-47.
- 35- Lin C. Yin M. Effects of cysteine-containing compounds on biosynthesis of triacylglycerol and cholesterol and anti-oxidative protection in liver from mice consuming a high-fat diets. *British J of Nutrit* 2008; 99:37-43.
- 36- Yang R. Le G. Li A. Zhen J. Shi Y. Effects of antioxidative on capacity on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of rats fed a high-fat diets. *Elsevier Nutrition* 2006; 22:1185-1191.
- 37- Livisay S. Zhou S. Ip C. Decker E. Impact of dietary Conjugated Linolenic Acid on the oxidative stability of rats liver microsomes an skeletal muscle homogenates. *J Agric Food Chem* 2000; 48:4162-4168.
- 38- Yu L. Free radical scavenging properties of Conjugated Linolenic Acids. *J Agric Food Chem* 2001; 49:3452-3456.