



**OBTENCIÓN DE LECHES FUNCIONALES Y SUS POTENCIALES EFECTOS
SOBRE LA SALUD**

Liliana Elisabet Antonacci

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar por el título de
DOCTOR en CIENCIAS AGRARIAS

Área Nutrición Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNdMDP- Estación
Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA

**Balcarce, Argentina
Septiembre 2021**

**OBTENCIÓN DE LECHEs FUNCIONALES Y SUS POTENCIALES EFECTOS
SOBRE LA SALUD**

Liliana Elisabet Antonacci

Aprobada por:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'G. Gagliostro', with a long horizontal stroke extending to the right.

Gerardo A. Gagliostro, Ingeniero Agrónomo, PhD
Director de Tesis

OBTENCIÓN DE LECHEs FUNCIONALES Y SUS POTENCIALES EFECTOS SOBRE LA SALUD

Liliana Elisabet Antonacci

Aprobada por:


Prof. Liliana TRIARTE, Mag
Secretaria de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAP

Marco Antonio Sundfeld da Gama, PhD.
Evaluador


Prof. Liliana TRIARTE, Mag
Secretaria de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAP

Mario Skliar, Dr.
Evaluador


Prof. Liliana TRIARTE, Mag
Secretaria de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAP

Nora Slobodianik, Dra.
Evaluadora


Prof. Liliana TRIARTE, Mag
Secretaria de Posgrado
Facultad de Ciencias Agrarias
UNMAP

Einard Vargas Bello Perez, Dr.
Evaluador

DEDICATORIA

Para Agustín y Joaquín, mis adorados hijos, por el amor incondicional y por lo que significan en mi vida. Para mis Padres y mis Abuelos, por su amor, ejemplo de vida y por inculcarme la pasión por el trabajo. Para mi compañero de vida, mi amor, por su ayuda, contención, comprensión y presencia permanente.

“Haz todo el bien que puedas, en todas las formas que puedas, en todos los lugares que puedas, a todas las personas que puedas, todo el tiempo que puedas...”

John Wesley

AGRADECIMIENTOS

Es innumerable la cantidad de gente a la que quiero agradecer, soy afortunada, muchas lindas personas me ayudaron y me acompañaron en este reto.....

A Gerardo, mi Director, por estimularme, motivarme, enseñarme, guiarme y no parar de buscar desafíos en esta profesión que tanto amo,

A Adriana Cano, por estar siempre presente y ayudarme ante mis requerimientos,

A Eduardo, Lucrecia, Roberto, Miguel, Francisco y Marina, compañeros imprescindibles y cariñosos para que este trabajo se lleve a cabo,

A Roxana Paéz y todo su grupo, por haberme recibido en la Experimental Rafaela y brindarme todo para que mi trabajo sea exitoso,

A Eduardo Comeron, por permitir que esta tesis forme parte del proyecto Lechero,

A Estelita, Mónica y Silvita que me ayudaron con la parte burocrática de este desafío,

A Karina, Andrea, Alejandra y Yossi que siempre me ofrecieron su calidez y unos ricos mates cuando estaba muy cansada,

A Carolina, Juliana, Victoria, Jimena, Anita, Maria Rosa y Marcela por la inmensa ayuda en el laboratorio de la UNL,

Al INTA por darme la oportunidad de pasar por esta capacitación y aportar todo lo necesario para que la formación finalice con éxito,

A todos aquellos que me acompañaron con su amor, cariño, ayuda, permanencia, MUCHISIMAS GRACIAS !!!!!!!y espero no ser injusta y olvidarme de alguien.

ÍNDICE

PROLOGO.....	1
INTRODUCCION GENERAL.....	2
Marco teórico general.....	2
Caracterización y relevancia del problema.....	4
Ácidos grasos <i>trans</i>	7
OBJETIVOS GENERALES.....	14
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	14
CAPITULO I.MODULACIÓN DEL PERFIL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE A TRAVÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON COMBINACIONES DE ACEITES VEGETALES POLIINSATURADOS (SOJA-LINO) A VACAS LECHERAS EN ALIMENTACIÓN BASE PASTORIL.....	16
RESUMEN.....	16
ABSTRACT.....	16
INTRODUCCION.....	18
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVOS.....	20
MATERIALES Y METODOS.....	20
1.1. - Lugar experimental y fecha.....	20
1.2. - Animales.....	21
1.3.- Diseño experimental, tratamientos y alimentación.....	21
1.4.- Mediciones en los alimentos.....	22
1.5.- Medición de la producción y la composición química de la leche.....	23
1.6.- Medición de peso vivo, obtención de plasma y análisis de metabolitos y hormonas...	23
1.7.- Medición de consumo de alimento.....	24
1.8.- Cuantificación del perfil en ácidos grasos de la leche y de los alimentos.....	24
1.9.- Determinaciones complementarias sobre los aceites.....	25
1.10. - Análisis estadístico.....	25
RESULTADOS Y DISCUSION.....	26
1.1.- Medición de la biomasa del forraje.....	26
1.2.- Composición química y valor nutricional de los alimentos.....	27
1.3.- Producción y composición química de la leche.....	29
1.4.- Metabolitos, hormonas plasmáticas y peso vivo.....	32
1.5.- Consumo de concentrado y pastura.....	35
1.6. Perfil de los AG de la leche.....	36
CONCLUSIONES.....	45
CAPITULO II.EFECTO DEL CONSUMO DE NIVELES CRECIENTES DE UNA MEZCLA DE ACEITES DE SOJA Y LINO SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE DE VACAS EN PASTOREO.....	46
RESUMEN.....	46

ABSTRACT.....	47
INTRODUCCION.....	48
HIPOTESIS.....	49
OBJETIVOS.....	49
MATERIALES Y METODOS.....	50
2.1. - Lugar experimental y fecha.....	50
2.2.- Animales, tratamientos y diseño experimental.....	50
2.3. - Mediciones en los alimentos.....	51
2.4.- Medición de consumo de Alimento.....	52
2.5.- Medición de la producción y composición química de la leche.....	52
2.6.- Medición de peso vivo y concentración de metabolitos plasmáticos.....	53
2.7.- Cuantificación del perfil en ácidos grasos de la leche y de los alimentos.....	53
2.8.- Determinaciones complementarias sobre los aceites.....	54
2.9. - Análisis estadístico.....	55
RESULTADOS Y DISCUSION.....	55
2.1.- Oferta forrajera y calidad de los alimentos.....	55
2.2.- Consumo, producción y composición química de la leche.....	58
2.3.- Metabolitos plasmáticos y variaciones de peso.....	63
2.4.- Perfil de los AG de la leche.....	64
CONCLUSIONES.....	74
CAPITULO III. EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA OVINA CON DISTINTAS COMBINACIONES DE ACEITE DE SOJA Y DE LINO SOBRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE.....	74
RESUMEN.....	74
ABSTRACT.....	75
INTRODUCCION.....	76
HIPOTESIS.....	77
OBJETIVOS.....	78
MATERIALES Y METODOS.....	78
3.1.- Condiciones experimentales.....	78
3.2.- Diseño experimental y tratamientos.....	79
3.3. - Mediciones en los alimentos.....	79
3.4.- Medición de la producción, composición química de la leche y consumo de alimento	80
3.5.- Cuantificación del perfil en ácidos grasos de la leche y de los alimentos.....	80
3.6.- Análisis estadísticos.....	80
RESULTADOS Y DISCUSION.....	81
3.1.- Composición química y valor nutricional de los alimentos.....	81
3.2.- Composición en ácidos grasos de los alimentos y de los aceites.....	81
3.3.- Producción y composición química de la leche.....	82
3.4.- Consumo de concentrado y forraje.....	85

3.5.- Composición en ácidos grasos de la leche.....	86
CONCLUSIONES.....	96
CAPITULO IV. EVALUACIONES BIOQUÍMICO NUTRICIONALES DE UNA POTENCIAL GRASA LÁCTEA FUNCIONAL BOVINA EN ANIMALES EXPERIMENTALES.....	97
RESUMEN.....	97
ABSTRACT.....	97
INTRODUCCION.....	100
HIPOTESIS.....	103
OBJETIVOS.....	103
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	103
MATERIALES Y METODOS.....	104
4.1.- Animales de experimentación.....	104
4.2.- Tipos de dietas experimentales.....	104
4.3.- Grupos experimentales y protocolo de trabajo.....	107
4.4.- Cuantificaciones en suero.....	107
4.4.1.- Concentración de triglicéridos séricos (Experiencias 1, 2 y 3).....	107
4.4.2.- Concentración de colesterol total sérico (Experiencias 1 y 2).....	108
4.4.3.- Concentración de glucosa sérica (Experiencias 1, 2, 3 y 4).....	108
4.4.4.- Perfil de ácidos grasos séricos (Experiencia 1).....	108
4.4.5.- Concentración de ácidos Grasos no Esterificados (NEFA) (Experiencias 3 y 4)....	110
4. 5.- Cuantificación de lípidos tisulares.....	110
4. 5.1.- Concentración de triglicéridos tisulares (Experiencias 1, 2 y 3).....	110
4. 5.2.- Perfil de ácidos grasos tisulares (Experiencia 1).....	111
4. 6.- Parámetros relacionados al metabolismo lipídico.....	111
4.6.1- Secreción hepática “in vivo” de TG-pre- β lipoproteínas (Experiencia 3).....	111
4.6.2.- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa (LPL).....	112
4.6.2.1.- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal (Experiencia 3).....	112
4.6.2.2.- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en musculo gastrocnemio (Experiencia 3).....	113
4.6.3.- Actividad de las enzimas lipogénicas en Hígado.....	113
4.6.3.1.- Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Experiencia 4).....	114
4.6.3.2.- Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos (Experiencia 4).....	114
4.6.3.3.- Actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa-I en hígado (Experiencia 4)	114
4.6.3.4.- Actividad de la enzima Acetil-CoA Carboxilasa (Experiencia 4).....	115
4.7.- Extracción, análisis y cuantificación de ARN por PCR en tiempo real (Experiencia 1)	116
4.8. - Análisis estadísticos.....	117

RESULTADOS.....	118
4.1.- Perfil de ácidos grasos del aceite de soja.....	118
4.2.- Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales.....	118
4.3.- Parámetros nutricionales.....	119
4.3.1.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre el peso y la ganancia de peso ($\Delta 60-0$).....	119
4.3.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre el peso de hígado, tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio.....	127
4.4.- Parámetros bioquímicos.....	132
4.4.1.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración de triglicéridos y colesterol séricos.....	132
4.4.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración de triglicéridos hepáticos.....	133
4.4.3.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la composición de ácidos grasos de hígado, tejido adiposo epididimal y suero.....	134
4.4.3.1.- Perfil AG en hígado.....	134
4.4.3.2.- Perfil AG en tejido adiposo epididimal.....	141
4.4.3.3.- Perfil AG en suero.....	144
4.5.- Parámetros relacionados a la regulación del metabolismo lipídico.....	155
4.5.1.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la actividad de las enzimas lipogénicas del hígado (Experiencia 4).....	155
4.5.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre síntesis de ácidos grasos en hígado (Experiencia 4).....	155
4.5.3.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la actividad de las enzimas oxidativas de ácidos grasos en hígado (Experiencia 4).....	159
4.5.4.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la velocidad de secreción hepática de triglicéridos (Experiencia 3).....	160
4.5.5.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la remoción de triglicéridos: actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio (Experiencia 4).....	161
4.6.- Expresión de factores de transcripción de genes lipogénicos y oxidativos en hígado (Experiencia 4).....	164
4.7.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración plasmática de NEFA y glucosa.....	169
DISCUSION.....	175

Caracterización de modelo experimental.....	175
4.1. - Parámetros nutricionales.....	176
4.1.1.- Efecto del origen y el nivel de grasa dietaria sobre el peso, la ganancia de peso y el peso de tejidos de los animales experimentales.....	176
4.2.- Parámetros bioquímicos.....	178
4.2.1.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración de TG y colesterol sérico.....	178
4.2.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración de TG hepáticos y su regulación.....	181
4.2.3.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre el contenido y retención de AV y CLA en hígado, tejido adiposo epididimal y suero.....	182
4.3.- Parámetros relacionados a la regulación del metabolismo lipídico.....	183
4.3.1.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la actividad de las enzimas lipogénicas del hígado.....	183
4.3.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la síntesis de AGPI de cadena larga en hígado.....	184
4.3.3.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos.....	184
4.3.4.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo y musculo gastrocnemio.....	185
4.3.5.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre los NEFA y glucosa circulantes....	186
CONCLUSIONES.....	186
CONCLUSIONES GENERALES.....	188
BIBLIOGRAFIA.....	190
APENDICE.....	212
TRABAJOS COMPLETOS PUBLICADOS.....	214

ÍNDICE DE TABLAS

CAPITULO I. MODULACIÓN DEL PERFIL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE A TRAVÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON COMBINACIONES DE ACEITES VEGETALES POLIINSATURADOS (SOJA-LINO) A VACAS LECHERAS EN ALIMENTACIÓN BASE PASTORIL

Tabla 1. Composición química y digestibilidad <i>in vitro</i> de la pastura y alimento concentrado.....	27
Tabla 2. Perfil en ácidos grasos de la pastura, el alimento concentrado y de los aceites puros de soja y de lino.....	28
Tabla 3. Producción y composición de leche en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.....	29
Tabla 4. Concentración plasmática de metabolitos en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.....	32
Tabla 5. Concentración plasmática de hormonas en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.....	33
Tabla 6. Variaciones de PV en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.....	34
Tabla 7. Consumo de pastura, aceites, concentrado y consumo total de MS en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.....	35
Tabla 8. Perfil en ácidos grasos de la leche en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.....	36

CAPITULO II. EFECTO DEL CONSUMO DE NIVELES CRECIENTES DE UNA MEZCLA DE ACEITES DE SOJA Y LINO SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE DE VACAS EN PASTOREO

Tabla 1. Composición química y digestibilidad <i>in vitro</i> de la pastura y del concentrado	56
Tabla 2. Perfil en ácidos grasos de la pastura, el alimento concentrado y de los aceites puros de soja y de lino.....	57
Tabla 3. Consumo de pastura y de suplementos en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75-25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.....	58
Tabla 4. Producción y composición de leche en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75-25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.....	59
Tabla 5. Concentración plasmática de metabolitos en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75-25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.....	63
Tabla 6. Variaciones de peso vivo (PV) en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75-25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.....	64
Tabla 7. Perfil en ácidos grasos (AG) de la leche en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75-25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.....	66

CAPITULO III. EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA OVINA CON DISTINTAS COMBINACIONES DE ACEITE DE SOJA Y DE LINO SOBRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE

Tabla 1. Composición química de los alimentos utilizados en el experimento.....	81
Tabla 2. Composición en ácidos grasos de los aceites de soja, de lino, del heno y del concentrado utilizados en el experimento.....	82

Tabla 3. Producción y composición de leche en ovejas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y de lino.....	83
Tabla 4. Perfil en ácidos grasos de la leche en ovejas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y de lino.....	86
CAPITULO IV. EVALUACIONES BIOQUÍMICO NUTRICIONALES DE UNA POTENCIAL GRASA LÁCTEA FUNCIONAL BOVINA EN ANIMALES EXPERIMENTALES	
Tabla 1. Composición de ácidos grasos del aceite de soja utilizado en las dietas experimentales.....	118
Tabla 2. Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales.....	119
Tabla 3. Parámetros nutricionales experiencia 1.....	128
Tabla 4. Parámetros nutricionales experiencia 2.....	129
Tabla 5. Parámetros nutricionales experiencia 3.....	130
Tabla 6. Parámetros nutricionales experiencia 4.....	131
Tabla 7. Parámetros lipídicos experiencia 1.....	135
Tabla 8. Parámetros lipídicos experiencia 2.....	136
Tabla 9. Parámetros lipídicos experiencia 3.....	137
Tabla 10. Composición de ácidos grasos en hígado.....	147
Tabla 11. Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal.....	149
Tabla 12. Composición de ácidos grasos en suero.....	153

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I. MODULACIÓN DEL PERFIL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE A TRAVÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON COMBINACIONES DE ACEITES VEGETALES POLIINSATURADOS (SOJA-LINO) A VACAS LECHERAS EN ALIMENTACIÓN BASE PASTORIL

Figura 1. Relación entre la concentración de grasa de la leche (GB) y la de <i>trans</i> -10 C18:1.....	38
Figura 2. Relación entre la concentración de <i>trans</i> -11 C18:1 y <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 C18:2 en leche.....	43

CAPITULO II. EFECTO DEL CONSUMO DE NIVELES CRECIENTES DE UNA MEZCLA DE ACEITES DE SOJA Y LINO SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE DE VACAS EN PASTOREO

Figura 1. Relación entre la concentración grasa de la leche (GB) y la de <i>trans</i> -10 C18:1 en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75-25) al 0 (T0), 2% (T2), 4% (T4) y 6% (T6) del consumo de materia seca total.....	60
Figura 2. Concentración de ácido vaccénico (AV, <i>trans</i> -11 C18:1) en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75- 25).....	70
Figura 3. Relación entre la concentración del ácido vaccénico (AV, <i>trans</i> -11 C18:1) y el ácido ruménico (AR, <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 C18:2) en la leche.....	71
Figura 4. Relación entre el consumo de una mezcla (75- 25) de aceites de soja y lino y la concentración de ácido ruménico (AR, <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 C18:2) en leche.....	72

CAPITULO III. EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA OVINA CON DISTINTAS COMBINACIONES DE ACEITE DE SOJA Y DE LINO SOBRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE

Figura 1. Recuento de células somáticas (RCS) durante las tres últimas semanas de suplementación en ovejas lecheras consumiendo aceites de soja (AS) y de lino (AL) en diferentes mezclas.....	84
Figura 2. Relación entre la concentración grasa de la leche (GB) y los niveles de <i>trans</i> -10 C18:1 en ovejas lecheras suplementadas con aceites vegetales poliinsaturados.....	88
Figura 3. Relación entre la concentración de ácido vaccénico (AV, <i>trans</i> -11 C18:1) y la de ácido ruménico (AR, <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 C18:2 CLA) en leche de ovejas.....	92
Figura 4. Concentración promedio de ácido ruménico (AR, <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 C18:2 CLA) en muestras de leche obtenidas durante cinco semanas de ensayo.....	94

CAPITULO IV. EVALUACIONES BIOQUÍMICO NUTRICIONALES DE UNA POTENCIAL GRASA LÁCTEA FUNCIONAL BOVINA EN ANIMALES EXPERIMENTALES

Figura 1a. Evolución del peso a lo largo del periodo experimental (Experiencia 1).....	120
Figura 1b. Evolución del peso a lo largo del periodo experimental (Experiencia 2).....	121
Figura 1c. Evolución del peso a lo largo del periodo experimental (Experiencia 3).....	122
Figura 1d. Evolución del peso a lo largo del periodo experimental (Experiencia 4).....	123
Figura 1e. Ganancia de peso (Experiencia 1).....	124
Figura 1f. Ganancia de peso (Experiencia 2).....	125
Figura 1g. Ganancia de peso (Experiencia 3).....	126
Figura 1h. Ganancia de peso (Experiencia 4).....	127
Figura 2. Retención de AV en hígado.....	138
Figura 3. Retención de CLA en hígado.....	139

Figura 4. Retención de C12:0, C14:0 y C16:0 en hígado.....	140
Figura 5. Retención de AV en tejido adiposo epididimal.....	142
Figura 6. Retención de CLA en tejido adiposo epididimal.....	143
Figura 7. Retención de AV en suero.....	145
Figura 8. Retención de CLA en suero.....	151
Figura 9. Actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa.....	156
Figura 10. Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos en hígado.....	157
Figura 11. Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en hígado.....	158
Figura 12. Actividad hepática de la enzima carnitina palmitoil transferasa-I.....	159
Figura 13. Velocidad de secreción hepática de triglicéridos.....	160
Figura 14. Actividad lipoproteína lipasa por gramo de tejido adiposo epididimal.....	162
Figura 15. Actividad lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal afectada por el peso del tejido.....	163
Figura 16. Actividad lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio.....	164
Figura 17. Expresión génica del SREBP-1c relacionado con el metabolismo lipídico..	165
Figura 18. Expresión génica de la $\Delta 9$ -desaturasa (SCD1) relacionado con el metabolismo lipídico.....	166
Figura 19. Expresión génica de la FAS.....	167
Figura 20. Expresión génica de la CPT-I.....	168
Figura 21. Expresión génica del PPAR- α	169
Figura 22. Concentración de NEFA (Experiencia 3).....	170
Figura 23. Concentración de NEFA (Experiencia 4).....	171
Figura 24. Concentración de glucosa sérica (Experiencia1).....	172
Figura 25. Concentración de glucosa sérica (Experiencia 2).....	173
Figura 26. Concentración de glucosa sérica (Experiencia 3).....	174
Figura 27. Concentración de glucosa sérica (Experiencia 4).....	175

ABREVIATURAS

- AA:** ácido araquidónico
- AB:** ácido butírico
- ACC:** acil CoA-carboxilasa
- ACO:** acil CoA oxidasa
- AE:** ácido elaídico
- AG:** ácidos grasos
- AGI:** ácidos grasos insaturados
- AGMI:** ácidos grasos monoinsaturados
- AGPI:** ácidos grasos poliinsaturados
- AGPI-CL:** ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga
- AGPI-CC:** ácidos grasos poliinsaturados de cadena corta
- AGS:** ácidos grasos saturados
- AG-*t*:** ácidos grasos *trans*
- AL:** aceite de lino
- ALi:** ácido linoleico
- ALA:** α -linolénico
- *ANOVA:** análisis de la varianza. Acrónimo del inglés “analysis of variance”
- AO:** ácido oleico
- AOCS:** American Oil Chemists’s society
- AP:** aceite de pescado
- AR:** ácido ruménico
- AS:** aceite de soja
- AV:** ácido vaccénico
- BH:** biohidrogenación
- CG:** cromatografía gaseosa
- CGL:** cromatografía gas- líquido
- *CLA:** conjugados del ácido linoleico. Acrónimo del inglés “conjugated linoleic acid”
- CMS:** consumo de materia seca
- CMST:** consumo de materia seca total
- CPT-I:** carnitina palmitoil transferasa-I
- CSA:** carbohidratos solubles en agua
- DCA:** diseño completamente aleatorizado

DEL: días en lactancia

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

DMS: digestibilidad de la materia seca

ECNT: enfermedades crónicas no transmisibles

ECV: enfermedades cardiovasculares

EDTA: etilendiaminotetraacético

EE: extracto etéreo

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

EM: enzima mállica

EMAG: ésteres metílicos de ácidos grasos

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

F:C: forraje: concentrado

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

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

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

FDA: fibra detergente ácida

FDN: fibra detergente neutra

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

***GH:** Hormona de crecimiento. Acrónimo del inglés “growth hormone”

GL: grasa láctea

GLE: grasa láctea estandarizada

GLF: grasa láctea funcional

GT: grasa total

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

IA: índice de aterogenicidad

***IGF-1:** factor de crecimiento insulínico tipo 1. Acrónimo del inglés “insulin-
like growth factor-1”

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

INTI: Instituto Nacional de Tecnología Industrial

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

LGC4%: leche corregida al 4% de grasa

LPL: lipoproteína lipasa

MO: materia orgánica

MS: materia seca

ND: no detectado

***NEFA:** ácidos grasos no esterificados. Acrónimo del inglés “Non-esterified fatty acid”

NS: no significativo

NUL: nitrógeno ureico en leche

NUP: nitrógeno ureico plasmático

OMS: Organización Mundial de la Salud

PB: proteína bruta

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

PV: peso vivo

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

SNG: sólidos no grasos

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

ST: sólidos totales

TAE: tejido adiposo epididimal

TAG: triacilgliceridos

TG: triglicérido

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

UI: unidades internacionales

UNL: Universidad Nacional del Litoral

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

Vp: volumen plasmático

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

Δ 9-D: delta 9 desaturasa

* En inglés, debido a su reconocida utilización como acrónimo.

PRÓLOGO

Existen evidencias experimentales y epidemiológicas que demuestran que un consumo excesivo de productos derivados de lagrasa láctea (**GL**) incrementa en el hombre el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles (**ECNT**). La presencia de una sobre abundancia de ácidos grasos saturados (**AGS**), principalmente láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), junto con ciertos ácidos grasos (**AG**) *trans* (**AG-t**) y colesterol, han conducido durante las últimas décadas a un gradual descenso en el consumo de dichos productos. No obstante, la leche contiene componentes bioactivos que tienen efectos protectores sobre el riesgo de ECNT. La GL puede ser naturalmente modificada en cuanto a sus AG constitutivos a través de la alimentación de los animales, como se demostró en estudios previos a través de la suplementación de sus dietas con aceites conteniendo ácidos grasos poliinsaturados (**AGPI**), entre ellos el aceite de soja, rico en ácido linoleico (C18:2n-6, **ALi**) y el aceite de lino, rico en ácido linolénico (α -C18:3n-3, **ALA**). La plasticidad de la GL permitiría reducir potenciales factores de riesgos asociados a la dieta (como la concentración elevada de algunos AGS e incrementar los niveles de AG bioactivos benéficos, entre ellos el *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (ácido linoleico conjugado, **CLA**), el *trans*-11 C18:1 (ácido vaccénico, **AV**), el *cis*-9 C18:1 (ácido oleico, **AO**) y el C18:3n-3, entre otros. En el presente trabajo de Tesis se abordaron dos aspectos centrales: En la primera etapa, el objetivo fue determinar una combinación adecuada de aceites de soja (**AS**) y de lino (**AL**) que, al ser suministrada con la alimentación a vacas y ovejas lecheras, resultara capaz de producir una grasa láctea funcional (**GLF**), esto es, una combinación capaz de reducir en la leche los niveles de AG potencialmente deletéreos e incrementar los de los benéficos desde el punto de vista de la salud humana. En la segunda etapa, se apuntó a la obtención de la GL y GLF en cantidades necesarias para determinar la capacidad de prevenir o al menos atenuar las alteraciones metabólicas que se producen en animales de laboratorio con exceso de grasa en su dieta. Se espera que los resultados a obtener permitan proponer una alternativa tecnológica viable para producir lácteos con propiedades saludables y con agregado de valor en su origen (tambo), así como obtener información relevante sobre los mecanismos involucrados en la posible prevención o atenuación de alteraciones en el metabolismo lipídico en los eventuales consumidores humanos de dichos lácteos. Los resultados del proyecto podrían contribuir a generar un nuevo nicho de mercado para los productos y una mejor calidad de vida en la población, así como ahorros por parte del Estado en costos

asociados al mantenimiento de la salud pública a través de la prevención de ECNTs importantes y frecuentes.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Marco teórico general

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud(**OMS**), tres cuartas partes de las muertes prematuras que se produzcan en el mundo para el año 2020 estarán causadas por ECNT, tales como los trastornos cardiovasculares, hipertensión, la diabetes o el cáncer (Torralba *et al.*, 2012), estos desordenes metabólicos están relacionados a un aumento en la morbilidad y mortalidad en distintas etapas de la vida (Nagao *et al.*, 2008). Junto con los avances científicos que vinculan la salud y la dieta, existe un gran interés público en los alimentos funcionales, en particular los lípidos funcionales (Kim *et al.*, 2016). Las evidencias científicas que relacionan a la alimentación con la salud humana han tomado una especial relevancia durante los últimos años y se detecta un interés creciente del consumidor sobre los efectos benéficos que una buena alimentación puede ejercer sobre la disminución del riesgo.

La expresión “alimento funcional” se utiliza para identificar alimentos y/o componentes de los mismos que poseen propiedades sobre la salud de los consumidores que superan al beneficio clásico de un aporte de nutrientes (Milner, 1999) y deben también ser considerados como alimentos con bioactividad (Dr. Einard, VBP, comunicación personal). Otra definición sugiere que un alimento funcional es aquél que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter saludable, (Ashwell, 2012)

Serían funcionales también los alimentos en los que se ha eliminado o reducido la presencia de uno o varios componentes para que produzca menos efectos indeseables sobre la salud humana (Milner, 1999). Hasler y Brown (2009) definen a los alimentos funcionales como cualquier alimento modificado o ingrediente alimentario que, además de sus efectos nutritivos, puede producir un beneficio o mejora del estado de salud, o bien afectar beneficiosamente distintas funciones del organismo y/o reducir el riesgo de padecer alguna enfermedad. También, alimento funcional es todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, pero capaz de producir demostrados efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental, en la

reducción del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas (Serrano Ríos *et al.*, 2005)

Este concepto tiene su origen en Japón en la década de los 80 tendiente a reducir las crecientes inversiones estatales en salud pública como consecuencia de la mayor longevidad promedio de la población y mejorar a su vez la calidad global de vida de la misma.

La GL contiene una sobre abundancia de AGS con propiedades hipercolesterolémicas (C12:0, C14:0 y C16:0) que pueden aportar entre un 25 a un 60% del total de grasa saturada que un ser humano consume diariamente. También contiene ciertos AG con propiedades saludables (CLA y AV) por ser capaces de prevenir la incidencia de ECNT. Entre muchos otros efectos potencialmente benéficos sobre la salud humana (Maijala, 2000; Gagliostro, 2004a), el isómero *cis*-9, *trans*-11 C18:2 (CLA) ha sido señalado como un agente preventivo del desarrollo y proliferación de ciertos tipos de cáncer (Ip *et al.*, 1994; Ip *et al.*, 1999; De La Torre *et al.*, 2006; Kelley *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2016; Faramarzi *et al.*, 2017), así como un efectivo agente reductor del riesgo de enfermedades cardiovasculares (**ECV**) a través de sus propiedades antiaterogénicas (Lee *et al.*, 1994; Lock *et al.*, 2005) entre otros efectos potencialmente benéficos sobre la salud humana (Gagliostro, 2004a, Kim *et al.*, 2016).

La GL también posee una enorme plasticidad en cuanto a su composición en AG, siendo la alimentación de los animales rumiantes una herramienta práctica, natural y eficaz para modificarla en un sentido más saludable para el consumidor (Chilliard *et al.*, 2000; Gagliostro 2004b, Gagliostro, 2011; Gagliostro *et al.*, 2017; Antonacci *et al.*, 2017). Este aspecto puede ser ventajosamente utilizado para obtener productos lácteos bovinos (Gagliostro, 2004b, Antonacci *et al.*, 2017; Gagliostro *et al.*, 2017), caprinos (Gagliostro, 2004c), ovinos (Gómez-Cortés, 2010) y bubalinos (Gagliostro *et al.*, 2015) con propiedades funcionales.

En el marco del presente Proyecto, en la primera etapa se moduló a través de la grasa dietaria la composición de la GL en vacas y ovejas lecheras con el fin de lograr la mejor combinación de aceites vegetales (soja-lino) capaz de reducir en la leche la fracción pro-aterogénica y de aumentar la abundancia de AG con propiedades funcionales. Si bien existen fundamentos técnicos que justifican utilizar combinaciones de aceites vegetales conteniendo ácido linoleico (soja) y linolénico (lino) para obtener lácteos más saludables, presentan potenciales actividades sinérgicas sobre la generación ruminal del ácido vaccénico y el flujo del mismo hacia glándula mamaria. Este hecho está positivamente correlacionado con la presencia de ácido ruménico en

la leche con la ventaja adicional de una potencial mejora en la presencia del linolénico en leche. Puesto que la disponibilidad de aceites de soja y de lino es alta en Argentina, se utilizan ambas fuentes para vehiculizar la llegada de los ácidos linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) al compartimento rumen. Como se explica en el texto, ambos compuestos no existen trabajos que permitan definir la mejor proporción entre ellos para lograr este objetivo, lo que se transformará en un aporte original de la presente investigación.

En la segunda etapa del Proyecto, el ensayo zootécnico se articula con la evaluación de las potenciales propiedades saludables de la GLF comparada con una GL convencional. En animales de laboratorio se evalúan parámetros o marcadores bioquímicos que en el hombre se asocian al riesgo de ECNT, abocándonos en esta tesis específicamente a las asociadas al riesgo cardiovascular.

Caracterización y relevancia del problema

Desde el punto de vista de la salud humana, se considera que la GL debería contener hasta un 8% de AGS (Grummer, 1991). La composición promedio en AG de la GL de los rumiantes por lo tanto no resulta ideal porqu naturalmente posee una elevada concentración de AGS (Grumer, 1999). En Argentina, los AGS de la leche representan en promedio el 54% (Maritano *et al.*, 1987), y los valores de AGS observados en sistemas no pastoriles son del orden del 70% en promedio (Jenkins y McGuire, 2006). Por otra parte, la cantidad de AG monoinsaturados (**AGMI**)yAGPIalgunos de los cuales han sido calificados como “agentes estimuladores” de la salud (Gagliostro, 2005), resulta sub-óptima.

Es sabido que los AGS tienden a aumentar los niveles de colesterol plasmático incrementando la incidencia de ECV (Hu *et al.*, 2001), sin embargo algunas revisiones de estudios epidemiológicos cuestionan estas afirmaciones (Maijala, 2000; Huth y Park, 2012; De Souza *et al.*, 2015). Este aspecto resulta de importancia ya que según los hábitos alimenticios y el poder adquisitivo de la población, los lácteos pueden aportar entre un 25 a un 60% del total de AGS que un ser humano consume diariamente. Un consumo excesivo de GL podría incrementar la incidencia de ECNT, principalmente las asociadas al riesgo cardiovascular. Otros trabajos postulan que al evaluar la asociación de la grasa saturada con los perfiles de lípidos y el riesgo de ECVse debe tener en cuenta la sustitución con otros nutrientes (Mensink, 1994; Maijala, 2000). Los estudios realizados en animales y seres humanos apoyan el

concepto de que la sustitución de grasas saturadas por grasas poliinsaturadas da como resultado perfiles lipídicos más saludables, específicamente disminución de colesterol total y colesterol LDL con disminuciones mínimas en la fracción HDL, así como disminución de riesgo ECV (Siri-Tarino *et al.*, 2010). En la GL, los AG contraindicados son los ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) que resultan ser los más peligrosos (Ulbricht y Southgate, 1991) cuando son consumidos en exceso ya que elevan el colesterol plasmático total y el colesterol asociado a las LDL (Schrezenmeir y Jagla, 2000; Legrand *et al.*, 2001). Es importante destacar que el colesterol total es en realidad un marcador muy deficiente, ya que también incluye la fracción HDL. De modo que el hecho de tener un colesterol total alto no implica mayor riesgo ya que puede suceder que la fracción HDL (protector) sea alta y contribuya a un elevado colesterol total (Maijala, 2000; Mensink *et al.*, 2003). El C14:0 presenta el mayor potencial aterogénico ya que la fracción tiene un efecto cuatro veces más fuerte que el C16:0 sobre los niveles plasmáticos de colesterol (Ulbricht y Southgate, 1991). Por otro lado, niveles de LDL elevados no sugieren mayores riesgos ya que se debe distinguir qué tipo de partícula está asociada a esa LDL. Partículas pequeñas y densas de LDL implican pequeñas lipoproteínas que penetran la pared arterial y pueden fácilmente impulsar la enfermedad cardíaca, no así las partículas de LDL grandes con poca posibilidad de penetrar las paredes arteriales. Cabe destacar que algunos estudios han sugerido que la grasa saturada puede aumentar la LDL colesterol sólo si la ingesta de grasas poliinsaturadas es por debajo de un nivel de umbral; específicamente, la disponibilidad de ácido linoleico pueden determinar efectos colesterolémicos de otros ácidos grasos (Wijendran *et al.*, 2004, en Siri-Tarino *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la sustitución de grasas saturadas por grasas poliinsaturadas disminuye la HDL colesterol, pero más sustancialmente la fracción LDL lo que implica un aumento sobre la relación HDL/LDL y una reducción en la relación Colesterol total/HDL colesterol (Mensink *et al.*, 2003). La asociación positiva entre estos AGS y los niveles elevados de colesterol en sangre han conducido durante las últimas décadas a un gradual descenso en el consumo de GL (Maijala, 2000).

En este contexto, se ha observado que la suplementación de la alimentación de vacas (Gagliostro, 2004b; Antonacci *et al.*, 2017; Gagliostro *et al.*, 2017), cabras (Gagliostro, 2004c), ovejas (Gómez-Cortés, 2010) y búfalas (Gagliostro *et al.*, 2015) con AGPI permite reducir en la leche la concentración de los AG pro-aterogénicos. En el caso de la leche de vaca, el aporte suplementario de AGPI a los animales a través

de una mezcla de aceite vegetal y de pescado (Gagliostro *et al.*, 2006) produce descensos del 63%, 51% y 29% en los niveles de C12:0, C14:0 y C16:0, respectivamente. En Antonacci *et al.*(2017), al suplementar vacas lecheras con mezclas de AS y AL la concentración total de C12:0 a C16:0 disminuyó en todos los tratamientos respecto a Control (-27,4% en promedio) sin diferencias entre las mezclas de aceites. La suplementación con 4,7% de aceite de girasol y 1,4% de aceite de pescado (**AP**) del CTMS produjo una reducción en la concentración de los AG proaterogénicos (C12:0, C14:0 y C16:0) del 63%, 51% y 29% del CMST, respectivamente (Gagliostro *et al.*, 2017).

El suministro de una manteca producida en la Universidad de Auckland (Nueva Zelanda) con una disminución de los ácidos C14:0 y C16:0, y un aumento en los ácidos oleico y linoleico, reduce significativamente el colesterol total (-7,8%) y el asociado a las LDL (-9,5%) en hombres de buena salud sin una disminución asociada en a las HDL (Poppit *et al.*, 2002). Estos autores concluyeron que el riesgo cardiovascular de origen dietario puede ser exitosamente reducido en humanos a través de cambios moderados en el perfil de AG de un alimento natural bien aceptado como es la manteca.

No todos los AGS presentes en la GL son desfavorables para la salud humana. El ácido esteárico (C18:0), que representa un 9-10% del total de AG en leches bovinas, ovinas y caprinas, es considerado como inocuo (Ulbricht y Southgate, 1991), o aún con efecto positivo, sobre la base de resultados obtenidos utilizando hámsteres alimentados con raciones ricas en colesterol. En este modelo experimental, la suplementación con C18:0 reduce la absorción de colesterol dietario y duplica la tasa de excreción de colesterol endógeno (Schneider *et al.*, 2000).

Con respecto a los AGI de la leche, el AO (*cis*-9 C18:1), es el principal AGMI que contiene. Su nivel alcanza un 28-30% del total de AG en los lácteos, y es considerado un protector contra la aterogénesis, debido a sus propiedades benéficas sobre la composición de los lípidos plasmáticos (Legrand *et al.*, 2001).

Los ácidos C18:2n-6 y C18:3n-3 son AG esenciales y deben ser aportados por la alimentación. Juegan un rol importante como precursores de AGPI de cadena más larga de las series n-6y n-3 respectivamente, tales como el araquidónico (C20:4n-6, **AA**) y el decosahexaenoico (C22:6n-3, **DHA**). A través de sus productos, el C18:2n-6 es esencial para el crecimiento y la reproducción y el C18:3n-3 para las funciones del cerebro y la retina (Geay *et al.*, 2002; Elsherbiny *et al.*, 2015). En el hombre, estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado que los ácidos de la serie n-3

presentan propiedades hipocolesterolémicas, antitrombóticas, antiinflamatorias e inmunosupresoras (Williams, 2000, Calder, 2006; Calder, 2008; Calder, 2012; Mozaffarian *et al.*, 2012; Swanson *et al.*, 2012, Calder, 2013; Calder, 2014).

En salud humana resulta más conveniente utilizar el concepto de relación entre las proporciones de AGI de la serie n-3 y n-6 que la concentración individual de los mismos en la dieta. Una relación n-6/n-3 entre 5 y 2 resultaría óptima para la alimentación humana (Okuyama e Ikemoto, 1999, citados por Geay *et al.*, 2002). Es interesante destacar que tanto la presencia de ambos tipos de AG en la grasa láctea como dicha relación son modificables a través de la alimentación de vacas, cabras, búfalas y ovejas lecheras (Gagliostro, 2004abc, Toral *et al.*, 2010; Gagliostro *et al.*, 2015; Gagliostro *et al.*, 2017; Antonacci *et al.*, 2017), uno de los aspectos que se está estudiando en el presente Proyecto, empleando combinaciones de aceites ricos en C18:2n-6 y C18:3n-3 (soja y lino, respectivamente).

Ácidos grasos *trans*

Ciertos AGPI, que se encuentran en niveles bajos en la mayoría de las dietas humanas, contienen una o más dobles ligaduras en la configuración *trans*, como es el caso de varios isómeros del CLA. La principal fuente de CLA en la alimentación son los productos lácteos (Parodi, 1999; Chilliard, Ferlay, Mansbrigg y Doreau, 2000). Se ha estimado que la ingesta total promedio de CLA en los Estados Unidos provenientes de fuentes naturales están cerca de 200 mg/día para los hombres y 93-151 mg/día para las mujeres y en el Reino Unido es de 97,5 mg/día (Herbel *et al.*, 1998; Park *et al.*, 1999b; Ritzenthaler *et al.*, 2001; Mushtaq *et al.*, 2010). Otros autores reportan consumos de CLA en el ser humano oscilan entre 0,3 a 1,5 gramos por persona y por día observándose los mayores consumos en aquellos países donde la leche es producida bajo condiciones de alimentación pastoril del ganado (Gagliostro, 2004a).

Los CLA fueron reconocidos como componentes funcionales de los alimentos en forma accidental, cuando se descubrieron sus propiedades antimutagénicas en la carne bovina cocida, buscando por el contrario en ella agentes mutagénicos (Parizay Hargraves, 1985). La forma biológicamente activa del CLA es el isómero *cis-9trans-11* C18:2, también denominado ácido ruménico (**AR**). Éste es el isómero más abundante en la leche, donde representa entre el 75 al 85 % del total de CLA presente (Bauman, Corl, Baumgard y Griinari, 2001; Stanton, Murphy, McGrath y Devery, 2003; Collomb *et al.*, 2006). En orden de importancia le sigue los isómeros *cis-9 trans-7* que

representa el 10% del total de CLA, el *trans-9 cis-11* y *trans-11 cis-13* (Dilzer y Park, 2012). Luego le sigue el isómero *trans-10 cis-12* C18:2 cuya presencia en leches naturales es muy baja (Bauman *et al.*, 2001).

Existen resultados promisorios sobre efectos potencialmente beneficiosos del consumo de CLA, entre ellos la reducción de la obesidad (*trans-10 cis-12* CLA) (Shen *et al.* 2013; Hamilton *et al.*, 2015) pero con evidencias (Risérus *et al.*, 2002a) de efectos de resistencia a la insulina con este isómero (efecto diabetogénico) y la diabetes tipo II (Ip *et al.*, 2003; Parodi, 2004; Yurawecz *et al.*, 2006), preventivo de la hiperinsulinemia y aumento de HDL colesterol en animales de experimentación (De Almeida *et al.*, 2015) y la disminución del riesgo de cáncer colorectal (Larson *et al.*, 2005), con el isómero *cis-9trans-11* C18:2, por citar sólo algunos.

Los AG-*t*son también producidos industrialmente durante la hidrogenación parcial de los aceites vegetales para la fabricación de margarinas, por lo que han sido denominados *sustancias no naturales* (Mensink, 2002). Dicha hidrogenación trae como consecuencia un enriquecimiento en los isómeros *trans* (mayoritariamente *trans-9* y *trans-10* C18:1) y con ello una grasa más peligrosa para la salud en el ser humano. En efecto, existe una correlación positiva entre el consumo de AG-*t* y las concentraciones plasmáticas del colesterol asociado a las LDL. Se ha demostrado una relación dosis-respuesta dependiente y positiva entre el consumo de los AG-*t* y el aumento de la relación LDL/HDL con el agravante de que la magnitud de dicho efecto es aún mayor para los AG-*t* que para los AGS (Ascherio *et al.*, 1999). Los isómeros *trans* de los ácidos oleico y linoleico son negativos tanto para el crecimiento fetal como para el crecimiento y desarrollo en la niñez, debido al efecto inhibitorio que ejercen sobre la desaturación de los ácidos linoleico y alfa-linolénico, lo que afecta adversamente la formación de AGPI de mayor longitud e insaturación, tales como los ácidos eicosapentaenoico (C20:5n-3, **EPA**) y C22:6n-3(DHA) (Trumbo *et al.*, 2002).

Desde un punto de vista biofísico, los AG-*t* tienen al menos una doble ligadura en la configuración *trans*, lo que les confiere un ángulo mayor de ligadura respecto a la de los isómeros *cis*. La cadena carbonada resulta en consecuencia más extendida y se parece más a la de los AGS que a los insaturados de configuración *cis*. Esta propiedad les confiere una mayor tendencia a la adhesión o alineamiento de las cadenas carbonadas, lo que resulta en una menor movilidad del AG. Para una membrana biológica cuyos lípidos contengan estos AG, esto implica una menor fluidez en comparación con los isómeros que contienen sus dobles ligaduras en configuración *cis*. Este tipo de AG-*t* está presente en una gran variedad de alimentos que contienen

margarinas. Si bien el llamado Nivel de Consumo Máximo Tolerable de estos AG-*t* debería ser de cero, alcanzar el mismo resulta impracticable debido a que también hay AG-*ten* alimentos indispensables para el ser humano como son las carnes y las leches. Dentro de los AG-*t* consumidos por el hombre, los isómeros *trans*-C18:1 son los de mayor porcentaje (85-95%), seguidos de los *trans*-C18:2 (8-22%), mientras que las cantidades de *trans*-C18:3 son menores al 10% (Zbikowska, 2010).

Resulta por lo tanto importante distinguir entre los AG-*t*naturales y los producidos industrialmente. En los rumiantes, estos AG se producen naturalmente por la biohidrogenación (**BH**) de los AG dietarios por parte de las bacterias normalmente presentes en el tracto gastrointestinal, a la temperatura y presión corporal normal de los animales. En cambio, el proceso industrial de hidrogenación de aceites vegetales genera los AG-*t*bajo una hidrogenación catalizada por metales, bajo una enorme presión a muy alta temperatura (<http://www.dairynutrition.ca/nutrients-in-milk-products/fat/natural-trans-fats>). A diferencia del proceso biológico, que genera una cantidad importante de CLA y AG como el AV, el proceso industrial genera una amplia variedad de isómeros, con las dobles ligaduras entre carbonos localizadas en distintas posiciones de las moléculas de los AG. Entre los *trans*-monoinsaturados de C18:1, el ácido elaídico (*trans*-9 C18:1, **AE**) es el que más efectos negativos tiene sobre el colesterol plasmático y la incidencia de ECV en el ser humano (Stender *et al.*, 2008). Mientras que en la grasa de la leche de rumiantes los AG-*t* rara vez superan el 6% de los AG constitutivos, en las margarinas alcanzan valores de hasta un 60% de los AG presentes. El AE y el *trans*-10 C18:1, que son los AG mayoritariamente presentes en las margarinas y son considerados pro-aterogénicos.

Desde el inicio de la década de los 90, fueron puestos en evidencia los efectos adversos del consumo de estos AG-*t*sobre los niveles de lípidos plasmáticos (Mensink y Katan, 1990) y el riesgo de enfermedades coronarias (Ascherio *et al.*, 1999). Además de los efectos desfavorables sobre el perfil lipídico, se les han atribuido efectos pro-inflamatorios (Calder, 2006, Calder, 2008, Calder, 2012) y acciones pro-aritmicas (Stender *et al.*, 2008). El consumo diario de 5 g de AG-*t*proveniente de margarinas ha sido asociado a un 29% de incremento en el riesgo de enfermedades coronarias mientras que dicha asociación no pudo establecerse ni aún con un consumo máximo de 4 g de AG-*t*provenientes de rumiantes (Stender *et al.*, 2008). Bendtsen *et al.* (2011) han reportado en estudios observacionales que el consumo de AG-*t*de origen industrial, pero no los AG-*t*de origen natural, correlacionaban positivamente con los sucesos y casos fatales de ECV.

Como ya fue comentado, la BH (desaturación) bacteriana en el rumen también produce dobles ligaduras de tipo *trans* sobre los diversos AG ingeridos por la vaca pero con una alta predominancia natural del ácido AV, que representa al menos un 50% del total de isómeros *trans*. Dado que éste puede ser convertido en AR en los tejidos humanos tiene cierto grado reconocido de funcionalidad, habiendo sido considerado favorable en los estudios relacionados a salud humana (Mensink, 2002; Banni *et al.*, 2002). Otros isómeros *trans* presentes en los lácteos parecen no ejercer efectos negativos, y algunos hasta positivos, sobre la salud humana.

Los AG-*trans* son transportados en forma esterificada en los ésteres de colesterol, los triglicéridos y los fosfolípidos de las lipoproteínas. Experimentos en roedores realizados en Canadá señalan que el aporte de AV disminuye la concentración de triglicéridos (TG) plasmáticos y en menor medida la de colesterol total y LDL con efectos más importantes en los experimentos de largo plazo <http://www.clanetwork.com/2008>. En síntesis, el AV es el AG-*trans* más importante producido por los rumiantes, está presente fundamentalmente en los lácteos y contribuye con un 80 a un 90% del aporte de grasas *trans* en la dieta (Gagliostro, 2004a).

La vía más efectiva para modificar el perfil de AG en la leche de rumiantes es la suplementación con aceites vegetales ricos en AGPI, práctica que permite aumentar la generación ruminal del AV y del AR (Gagliostro, 2004b, Gagliostro, 2004c, Gagliostro, 2011; Gagliostro *et al.*, 2015; Gagliostro *et al.*, 2017; Antonacci *et al.*, 2017). Inhibidores naturales de la BH del AV, como los ácidos grasos EPA y sobre todo DHA, pueden potenciar el efecto del aporte de AGPI (Gagliostro, 2004b, Palmquist y Griinari, 2006; Gagliostro *et al.*, 2017). El AP se caracteriza por un alto contenido en estos dos AG n-3 de cadena larga (AbuGhazaleh *et al.*, 2003). Ensayos conducidos *in vitro* sugieren que el DHA sería el principal compuesto activo presente en el AP que favorece la acumulación de AV en el rumen (AbuGhazaleh y Jenkins, 2004) para su posterior transferencia a la glándula mamaria.

Los inconvenientes asociados al uso de AP son su extremadamente baja palatabilidad, su elevado costo, la variabilidad estacional en sus AG constitutivos por la diversidad biológica en las especies marinas capturadas para su obtención y la falta de un suministro constante de este insumo por parte de los laboratorios o empresas proveedoras. Un aspecto importante es que la suplementación de la dieta de vacas lecheras con AP induce la depresión de la grasa de la leche (Griinari y Bauman, 2006),

incluso en dietas con un alto contenido de fibra (Gama *et al.*, 2008), lo que reduce la rentabilidad para el productor.

A estos inconvenientes se suma la existencia de una restricción a su uso en algunos países (entre ellos Brasil) para alimentación de rumiantes, más un cierto riesgo de desvíos en la fermentación ruminal hacia la producción de ciertos AG no deseados, como el ya mencionado *trans*-10 C18:1, fundamentalmente en los ovinos (Gómez-Cortés, 2010).

Existe una importante cantidad de trabajos que documentan la importancia que la alimentación de los animales rumiantes tiene sobre el contenido en AGS, n-3 y CLA presentes en la grasa láctea del ganado bovino (Gagliostro, 2004b, Gagliostro, 2011; Antonacci *et al.*, 2013; Gagliostro *et al.*, 2017; Antonacci *et al.*, 2017), caprino (Gagliostro, 2004c), bubalino (Gagliostro *et al.*, 2015) siendo aún muy escasa la información disponible sobre los efectos logrables en leche de oveja (Gómez-Cortez, 2010; Pintus *et al.*, 2013; Nuda *et al.*, 2014).

El ácido C18:3n-3 contenido en el aceite de lino, tal como el AP pero sin sus inconvenientes, presenta potencialidad para incrementar los niveles de AV en el fluido ruminal y los de AR en la grasa láctea, con menor tendencia a incrementar el *trans*-10 C18:1 (Gómez-Cortés *et al.*, 2008). Otra ventaja de la suplementación con aceite de lino, es que puede reducir la relación n-6/n-3 en leche de vacas, (Gagliostro, 2004b), cabras (Gagliostro, 2004c) y ovejas (Gómez-Cortés, 2010).

Estudios *in vitro* (Castillo Vargas, 2012) demostraron que la sustitución parcial de C18:2n-6 por C18:3n-3 incrementó la tasa de conversión del C18:2n-6 a CLA y de CLA a AV. La mayor tasa de isomerización del C18:2n-6 se obtuvo al combinarlo con el C18:3n-3, lo que implicaría que en el fluido ruminal la conversión del C18:2n-6 a estos metabolitos también podría favorecerse por la presencia de C18:3n-3.

El ASes rico en ácido linoleico (*cis*-9 *cis*-12 C18:2), mientras que el AL es una fuente natural de ácido linolénico (*cis*-9 *cis*-12 *cis*-15 C18:3) (Dubois *et al.*, 2007). En la cabra y en búfalas, ambos aceites, suministrados al 5-6% y 2,21-4,42 % del consumo de materia seca total (**CMST**), respectivamente, provocan los efectos buscados para una leche funcional (Gagliostro, 2004c; Gagliostro *et al.*, 2015). Sin embargo, no existen en nuestro conocimiento ensayos que demuestren la ventaja de combinar estos dos aceites tanto en vacas como en ovejas lecheras.

Utilizando alimentos convencionales, la ingestión diaria de CLA y del AV resultaría insuficiente en el hombre para alcanzar sus efectos bioquímicos, moleculares y fisiológicos positivos contra el cáncer, la aterosclerosis y la obesidad (Watkins y Li,

2003). Sin embargo, es posible que una adecuada alimentación de los rumiantes productores de leche permita aumentar los niveles de CLA y de AV en la grasa láctea para obtener lácteos funcionales.

Es importante conocer la cantidad efectiva mínima de CLA y de AV a consumir diariamente por un ser humano para obtener un efecto terapéutico o protector sobre la salud. En animales de laboratorio (ratas), se demostró que con concentraciones muy bajas de CLA en la ración total (0,1%) se lograba disminuir significativamente el número de tumores mamarios (Ip *et al.*, 1994). Para una rata de unos 350 g de peso vivo, el consumo diario *preventivo* de AR sería del orden de 0,015 g. Una ingestión equivalente en el ser humano, utilizando el peso metabólico como ajuste en el cálculo, permite estimar que un efecto antitumoral en una persona de unos 70 kg de peso vivo podría lograrse con un consumo diario de 0,8 g/día de CLA (Watkins y Li, 2003). Cabe comentar que el consumo juzgado *preventivo* de CLA sería unas diez veces menor (comunicación personal del Dr. D Bauchart, cita Gagliostro 2004a). Por otra parte, los efectos saludables del consumo de CLA sobre la aterosclerosis se alcanzarían a partir de niveles de CLA cercanos a los 0,25 g /día (cálculo por extrapolación de los efectos observados en experimentos con animales ajustados al ser humano en función al peso metabólico).

Las estimaciones existentes de consumo diario de CLA en humanos se encuentran en general por debajo de los valores mencionados, salvo en países como Australia donde predominan sistemas pastoriles de producción de leche. El nivel de consumo diario de CLA aconsejable sería más fácil de alcanzar si lográramos enriquecer naturalmente a los lácteos en CLA. En la actualidad, existe un gran interés en modificar el perfil en AG de la GL para responder a las demandas de los consumidores que se orienta hacia la obtención “natural” de este tipo de productos, esto es, sin la adición de moléculas bioactivas exógenas. Cabe destacar que las propiedades benéficas de la GLF rica en CLA se transfieren a los lácteos (manteca, queso, yogurt y helados) elaborados con ella (Gagliostro, 2011).

Por las razones expuestas, y por el impulso que han tomado los alimentos funcionales, la posibilidad de modificar la composición de la grasa láctea de vacas, cabras, búfalas y ovejas constituye una valiosa herramienta de diferenciación y valorización de los productos lácteos (Gagliostro, 2004abc; Gagliostro *et al.*, 2015; Antonacci *et al.*, 2017). El presente Proyecto se orienta a la obtención de lácteos con reducción del nivel de AG deletéreos para la salud (C12:0, C14:0 y C16:0) y con un incremento de compuestos con características saludables y preventivas (*cis*-9 C18:1,

trans-11 C18:1 y *cis*-9, *trans*-11 C18:2 y C18:3n-3, entre otros). Este objetivo está en sintonía con la demanda creciente de alimentos funcionales que, manteniendo sus atributos sensoriales comparados con los tradicionales, aporten beneficios para la salud de los consumidores.

En el marco del presente plan de trabajo, se buscó la mejor combinación AS y AL en la dieta de los animales que resulte efectiva para reducir en la leche la cantidad de AGS pro-aterogénicos e incrementar en forma simultánea la proporción de AG con propiedades potencialmente benéficas para la salud humana. Se espera obtener una GLF cuyo potencial beneficio sobre la salud sea evaluado en animales de laboratorio, tanto normales como experimentalmente afectados por trastornos del metabolismo de los lípidos y de los carbohidratos similares a los que se observan en humanos en condiciones promotoras de aterosclerosis y diabetes.

Como objetivos a largo plazo, se espera que el desarrollo del proyecto tenga un impacto positivo sobre la cadena de valor en la industria alimentaria a través de la producción de alimentos funcionales y sobre la salud de los consumidores, lo que redundará indirectamente sobre la economía mediante el ahorro al Estado en costos asociados a mantenimiento de salud pública.

Un resumen de las etapas en las que se ha dividido este proyecto y las actividades a realizar en cada una son las siguientes:

ETAPA I. ENSAYOS ZOOTÉCNICOS

EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON DISTINTAS COMBINACIONES DE ACEITE DE SOJA Y DE LINO SOBRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE DE VACAS EN PASTOREO

CAPITULO I. Modulación del perfil de los ácidos grasos de la leche a través de la suplementación con combinaciones de aceites vegetales poliinsaturados (soja-lino) a vacas lecheras en alimentación base pastoril.

CAPITULOII. Ensayo de dosis-respuesta a niveles crecientes de la mejor combinación soja-lino en vacas lecheras en alimentación base pastoril.

CAPITULOIII. Efecto de la suplementación de la dieta ovina con distintas combinaciones de aceite de soja y de lino sobre el perfil de ácidos grasos de la leche.

ETAPA II. ENSAYOS BIOMÉDICOS

EFFECTOS DE LA GRASA LÁCTEA FUNCIONAL OBTENIDA SOBRE MODELOS CON EXCESO DE GRASA DIETARIA EN ANIMALES DE LABORATORIO

APENDICE. Obtención de grasa estándar y grasa funcional bovina para los ensayos biomédicos (Suplementación con mezcla aceites vegetales y el perfil en ácidos grasos de leche bovina).

CAPITULO IV. Evaluaciones bioquímico nutricionales de una potencial grasa láctea funcional bovina en animales experimentales.

Como resultado del proyecto, se espera lograr los siguientes objetivos:

OBJETIVOS GENERALES

Obtener leches bovina y ovina con propiedades funcionales para la prevención y/o reversión de ECNT importantes en el hombre, esto es, reducidas en ácidos grasos potencialmente perjudiciales y enriquecidas en AG saludables desde el punto de vista de la salud humana.

Evaluar la potencia funcional de la grasa láctea bovina así modificada en animales de laboratorio con exceso de grasa dietaria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.-Obtener una leche con una GLF que tenga reducida concentración de AG proaterogénicos (C12:0, C14:0 y C16:0) e incrementado nivel de AG potencialmente más saludables (CLA, AV y AGPI de la serie n-3) a partir de modificaciones en los lípidos dietarios de vacas y ovejas lecheras.

2.- Determinar cuál es la mejor combinación entre aceites de soja y de lino en la dieta que permita alcanzar ese objetivo manteniendo en un mínimo la aparición del *trans*-9 y *trans*-10 C18:1.

3.- Determinar cuánto es necesario y suficiente de dicha mejor combinación para lograr los efectos deseados.

4.-Generar grupos de ratas con exceso de grasa en su dieta para evaluar en ellas los potenciales efectos positivos de la GLF producida, en comparación con la grasa estándar.

CAPÍTULO I

MODULACIÓN DEL PERFIL DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE A TRAVÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON COMBINACIONES DE ACEITES VEGETALES POLIINSATURADOS (SOJA-LINO) A VACAS LECHERAS EN ALIMENTACIÓN BASE PASTORIL (VER PUBLICACIÓN 1. PÁGINA 214)

Este primer trabajo experimental forma parte de las actividades previstas en la Etapa I y satisface los objetivos específicos 1 y 2 en lo que respecta a la obtención de una leche bovina funcional. Constituye además la base para seleccionar una combinación de aceites idónea a utilizar en el ensayo de dosis-respuesta (Capítulo II).

RESUMEN

Treinta y seis vacas lecheras de raza Holstein (6 por tratamiento) fueron utilizadas en un diseño completamente aleatorizado(**DCA**) para conocer la efectividad del aporte de aceites de soja (**AS**) y de lino (**AL**) a fines de reducirla concentración de los ácidos grasos (**AG**)hipercolesterolémicos de la leche (C12:0a C16:0) e incrementar la presencia del ácido linoleico conjugado (*cis*-9, *trans*-11 C18:2 **CLA**) y del ácido vaccénico (*trans*-11, C18:1, **AV**). El experimento tuvo una duración de 38 días con los primeros 7 de covariable y los últimos 31 para las mediciones experimentales. Los tratamientos radicaron en una ración basal (Control), 56% pastura (*Bromus unioloides*, *Festuca arundinacea*, *Trifolium pratense* y *Trifolium repens*) y 44% concentrado o la ración basal suplementada al 4% del consumo de materia seca total (**CMST**) con aceites puros (**AS100** o **AL100**) o en mezcla (**AS75- AL25**, **AS50- AL50** y **AS25- AL75**) (% p/p).Los aceites o sus mezclas (0,8 kg/vaca/día) fueron manual y totalmente mezclados con el concentrado (8 kg/vaca/día) y consumidos en su totalidad. El

consumo de pastura (kgMS/vaca/día) fue menor en AS25- AL75 (8,09) y AL100 (8,98) respecto al lote Control (9,27 kg). El CMST (Control=16,47 kg) resultó superior solo en AS100 (17,04 kg) y AS75 (17,20kg). La producción de leche corregida por grasa al 4% (**LGC4%**) (kg/vaca/día) fue superior solo en AS75 (23,73) en comparación al grupo de vacas Control (20,73). La concentración grasa de la leche (g/100g) estuvo negativamente correlacionada a la concentración del *trans*-10 C18:1 en leche y disminuyó en los tratamientos AS50- AL50 (2,79) y AS25- AL75 (3,06) comparados a Control (3,40). La concentración de proteína láctea no fue afectada y la producción de proteína fue incrementada sobre el Control (0,729 kg/vaca/día) en AS100 (11%) y AS75 (21%). Las proporciones de C12:0, C14:0 y C16:0 en la grasa láctea de las vacas suplementadas con aceites fueron reducidas en 42-37%, 28-37% y 30-17%, respectivamente. La concentración total de C12:0 a C16:0 en la grasa láctea de las vacas Control fue reducida en 27,4% por los aceites (38,5 vs. 27,9 g/100g del total de AG). La concentración basal del *trans*-10 C18:1 (0,46 g/100g del total de AG) se incrementó en un 222% (AS100), 107% (AS75- AL25), 291% (AS50- AL50), 146% (AS25- AL75) y 98% (AL100). En comparación a los valores de 3,49 g/100g del total de AG observados en las vacas Control, el incremento promedio en el contenido de AV luego del consumo de aceites fue de 135%. La mayor concentración de AV (g/100g del total de AG) se observó en los tratamientos AL100 (8,17) y AS50- AL50 (9,20). La concentración basal del CLA en leche (Control=1,56 g/100g del total de AG) se incrementó en 94% (AS100), 106% (AS75- AL25), 108% (AS50- AL50), 49% (AS25- AL75) y 90% (AL100). En una alimentación base pastoril, no se observó una respuesta bien definida ante el aporte de mezclas de aceites de soja y lino para incrementar la proporción de los AG saludables de la leche (AV y CLA). Tomados en conjunto, los resultados sugieren una cierta ventaja a favor de la mezcla AS75- AL25 tomando en cuenta los costos relativos de los aceites, el efecto sobre la producción de leche, grasa y proteína y el incremento en el valor saludable de la leche caracterizado por una menor concentración total de C12:0 a C16:0, un incremento en las concentraciones de AV y CLAmanteniendo bajos los niveles de los AG no saludables (*trans*-9 y *trans*-10 C18: 1) y una relación n-6/n-3 cercana a 5.

ABSTRACT

Thirty-six Holstein dairy cows (6 per treatment) were used in a complete randomized design to determine the effectiveness of soybean (**SO**), and linseed (**LO**) oils to reduce

the hypercholesterolemic fatty acid (**FA**) of milk (C12:0 to C16:0) and to enhance C18:2 *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (**CLA**) and *trans*-11 C18:1 (vaccenic acid, **VA**). The experiment lasted 38 d with the first 7 d as covariable and the last 31 d for experimental measurements. Treatments were a basal (Control) diet (pasture 56%, concentrate 44%) or the basal diet supplemented at 4% of total DM intake with pure (**SO100** or **LO100**) or mixed (**SO75- LO25**, **SO50- LO50** and **SO25- LO75**) oils (% w/w). Oils or mixtures (0.8 kg/cow/day) were manually and thoroughly mixed to the concentrate (8kg/cow/day) and completely consumed by cows. Pasture intake (kgDM/cow/day) resulted lower in SO25- LO75 (8.09) and LO100 (8.98) compared to Control (9.27 kg). Total DM intake (Control=16.47 kg) increased only in SO100 (17.04 kg) and SO75 (17.20kg). FCM (kg/cow/d) resulted higher only in SO75 (23.73) when compared to cows in the Control group (20.73). Milk fat content (g/100g) was negatively correlated to *trans*-10 C18:1 concentration and decreased in SO50- LO50 (2.79) and in SO25- LO75 (3.06) compared to Control (3.40). Milk protein content was not affected and milk protein yield increased over control (0.729 kg/cow/d) in SO100 (11%) and SO75 (21%). The proportions of C12:0, C14:0 and C16:0 in milk fat from oil supplemented cows were reduced in 42-37%, 28-37% and 30-17% respectively. Total C12:0 to C16:0 in milk fat from Control cows (38.48 g/100g) were decreased by oils (27.4%). Basal *trans*-10C18:1 (0.46 mg/100g) was increased by 222% (SO100), 107% (SO75- LO25), 291% (SO50- LO50), 146% (SO25- LO75) and 98% (LO100). Compared to values of 3.49 g/100g observed in control cows, the increase in VA content after oil feeding averaged 135%. The highest VA concentrations (g/100g) were registered in AL100 (8.17) and SO50- LO50 (9.20) treatments. Basal milk CLA content (C=1.56 g/100g) was increased in 94% (SO100), 106% (SO75- LO25), 108% (SO50- LO50), 49% (SO25- LO75) and 90% (LO100). In a pasture based diet, a clear response to feeding mixtures of soy and linseed oils in order to increase the proportion of healthy fatty acids (VA and CLA) in milk fat was not observed. Taken together, these results suggest some advantage for the SO75- LO25 mixture considering the relative cost of individual oils, the effect on milk, fat and protein yields and the increase in the healthy value of milk defined by a lower total C12:0 to C16:0 content, enhanced AV and CLA concentrations with low levels of the unhealthy fatty acids (*trans*-9 and *trans*-10 C18: 1) and a n-6/n-3 ratio near 5.

INTRODUCCIÓN

La grasa láctea (**GL**) contiene una alta cantidad de ácidos grasos saturados (**AGS**) que representan alrededor de dos tercios de los AG totales siendo el ácido palmítico (C16:0) el más abundante. El consumo excesivo de ciertos AGS presentes en dicha grasa como el láurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) elevan el colesterol total y el LDL-colesterol aspecto que resulta de importancia ya que según los hábitos alimenticios y el poder adquisitivo de la población los lácteos pueden aportar entre un 25 a un 60% del total de AGS que un ser humano consume diariamente (Chilliard y Ferlay, 2004). Aún en sistemas de producción base pastoril, la composición en AG de la leche dista de ser ideal debido al exceso en AGS y a un déficit en ácidos grasos monoinsaturados (**AGMI**) y poliinsaturados (**AGPI**) juzgados como más adecuados en nutrición humana. Por lo tanto, toda disminución en el consumo de los ácidos láurico, mirístico y palmítico contribuye a una alimentación más saludable disminuyendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares (**ECV**) de origen dietario.

Como contraparte, la leche también contiene AG con potenciales roles benéficos (antiaterogénicos o anticancerígenos) como el ácido butírico (**AB**), ácido oleico (**AO**), ciertos AGPI de la serie n-3 y una familia de compuestos denominados ácidos linoleicos conjugados (CLA) cuyo isómero *cis*-9, *trans*-11 C18:2 o ácido ruménico (**AR**) presenta efectos benéficos sobre la composición de los lípidos plasmáticos, la función cardiovascular (Lee *et al.*, 1994; Lock *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2010) y la reducción de incidencia de cáncer y diabetes (Ip *et al.*, 1994, 1999; Gagliostro, 2004a; De La Torre *et al.*, 2006; Kelley *et al.*, 2007).

La alimentación de la vaca lechera permite modular en forma rápida e importante la composición de los AG de la leche mediante el aporte suplementario de AGPI en la ración (Chilliard *et al.*, 2000; Gagliostro, 2004b; Antonacci *et al.*, 2017; Gagliostro *et al.*, 2017)

Los precursores de los CLA son los AGPI como los ácidos linoleico (*cis*-9, *cis*-12 C18:2, **ALi**) y α -linolenico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3, **ALA**). El primero resulta abundante en los aceites de girasol y AS, mientras que el segundo predomina en las pasturas y en el AL. El proceso de biohidrogenación (**BH**) de estos AG en el rumen genera cambios importantes incrementando la aparición de numerosos isómeros geométricos y posicionales, entre los que se encuentran el AR cuya transferencia a la glándula mamaria resulta mínima y AV que es el principal precursor del AR por acción de la enzima $\Delta 9$ desaturasa (**$\Delta 9$ -D**) en la glándula mamaria y en otros tejidos por

desaturación del AV en la posición 9 (Harfoot *et al.*, 1997; Bauman *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007). Esta resulta la principal vía de acumulación del AR en leche bovina explicando el 64 % de la síntesis del isómero (Griinari, Bauman, Chilliard, Parajoki y Nurmela, 2000).

La utilización de aceites ricos en ALi y ALA es una vía efectiva para incrementar los niveles de AV y AR en el rumen y en la leche (Harvatine y Bauman, 2006; Antonacci *et al.*, 2017; Gagliostro *et al.*, 2017) permitiendo a su vez reducir la concentración de los AGS en la grasa láctea (Chilliard y Ferlay, 2000; Rego *et al.*, 2009; Antonacci *et al.*, 2017; Gagliostro *et al.*, 2017).

Estudios *in vitro* sugieren que la inclusión de aceites ricos en ALi como el AS resultaría más eficaz para incrementar el AV en comparación a los aceites ricos en ALA como el AL debido a una BH más eficiente del ALi (Castillo Vargas, 2012). En altas concentraciones, este AG inhibiría además la BH del AV a C18:0 (Harfoot *et al.*, 1973; Agazzi *et al.*, 2004).

Se ha postulado que el ALA contenido en el AL presenta potencialidad para incrementar los niveles de AV en el fluido ruminal y los de AR en la GL con menor tendencia a incrementar las concentraciones del *trans*-10 C18:1 (Gómez-Cortés *et al.*, 2008). Otra ventaja potencial de la suplementación con AL es que puede reducir (o al menos mantener) la relación n-6/n-3 dentro de valores cercanos a 5 en leche de vacas, (Gagliostro, 2004b; Antonacci *et al.*, 2017), cabras (Gagliostro, 2004c), ovejas (Gómez-Cortés, 2010) y búfalas (Gagliostro *et al.*, 2015).

Estudios *in vitro* (Castillo Vargas, 2012) demostraron que la sustitución parcial de C18:2n-6 por C18:3n-3 incrementó la tasa de conversión del C18:2n-6 a CLA y de CLA a AV. La mayor tasa de isomerización del C18:2n-6 se obtuvo al combinarlo con el C18:3n-3, lo que implicaría que en el fluido ruminal la conversión del C18:2n-6 a estos metabolitos también podría favorecerse por la presencia de C18:3n-3.

El suministro de ambos aceites puros incrementa la concentración de AV y AR y disminuye la de los AG hipercolesterolémicos (C12:0 a C16:0) pero no existen en nuestro conocimiento ensayos que demuestren la ventaja de combinar ambos aceites en diferentes proporciones sobre los parámetros que aumentan el valor funcional de la leche lo que constituye el objetivo central del presente trabajo.

HIPÓTESIS

Existiría una combinación óptima entre los AS y AL que suministrada al 4% del consumo de materia seca de vacas lecheras permitiría disminuir la presencia en la leche de los AGS desfavorables para la salud (C12:0, C14:0 y C16:0) y aumentar en forma simultánea la concentración de los AG potencialmente benéficos como el AR, el AV y los AGPI de la serie n-3 sin desvíos importantes hacia la formación de AG no saludables como *trans*-9 y *trans*-10 C18:1.

El consumo de los aceites puros o sus mezclas a la dosis propuesta no tendrá efectos negativos sobre la producción y composición de la leche.

OBJETIVOS

Conocer una combinación de AS y de AL que suministrada a la ración de la vaca lechera genere el mejor perfil en AG en la grasa láctea con el fin de obtener una leche bovina funcional caracterizada por una reducción de los AG hipercolesterolémicos y enriquecida naturalmente en AR.

Determinar el efecto de la suplementación con esos aceites sobre la producción y composición química de la leche (grasa butirosa, proteína, lactosa y sólidos totales).

Conocer el efecto de la suplementación con aceites sobre el consumo de forraje y de concentrado, la variación en el peso vivo de las vacas y la concentración plasmática de metabolitos y hormonas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1.- Lugar experimental y fecha

El estudio se llevó a cabo en el Tambo Experimental de la Unidad Integrada Balcarce (EEA INTA Balcarce- Facultad Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata), provincia de Buenos Aires (37° 45` LS, 58° 18` LO, 130 msnm) durante los meses de octubre y noviembre de 2013. Tuvo una duración de 6 semanas de las

cuales una correspondió al periodo de covariable y cinco como período experimental. El experimento se desarrolló bajo un sistema base pastoril.

1.2.- Animales

Se utilizaron 36 vacas multíparas de raza Holando Argentino en lactancia temprana 77 (± 43), días en lactancia (**DEL**) con un peso vivo (**PV**) promedio de 548 (± 56) kg y una producción promedio de 23 ($\pm 0,5$) Kg/día.

1.3.- Diseño experimental, tratamientos y alimentación

Los animales fueron asignados al azar a seis tratamientos (6 vacas por tratamiento) definidos por mezclas de AS y AL (porcentajes en peso): AS0-AL0 (**Control** sin aceites), 800 gramos de aceite de soja (**AS100-AL0**), 600 gramos de aceite de soja y 200 gramos de aceite de lino (**AS75-AL25**), 400 gramos de aceite de soja y 400 gramos de aceite de lino (**AS50-AL50**), 200 gramos de aceite de soja y 600 gramos de aceite de lino (**AS25-AL75**) y 800 gramos de aceite de lino (**AS0-AL100**). Los aceites puros o sus mezclas fueron suministradas al 4% del CMST (Chilliard *et al.*, 2000) estimado previo al inicio del consumo de aceites (período de covariable) en un DCA.

Durante los primeros 7 días de ensayo (covariable) todos los animales recibieron la misma alimentación, a base de pasturas consociadas de festuca (*Festuca arundinacea*), trébol rojo (*Trifolium pratense*), trébol blanco (*Trifolium repens*) y cebadilla (*Bromus unioloides*) ofrecidas a razón de 27 kg MS/vaca/día. Las vacas recibieron además un concentrado comercial en sala de ordeño a razón de 8 kg/vaca/día ofrecido por mitades durante cada turno de ordeño. Dicho concentrado (16% PB) estuvo compuesto por grano de maíz (35%), brote de malta (10%), pellet de girasol (20%), sojilla (10%), afrechillo de trigo (21,48%), conchilla (2%), óxido de magnesio (0,4%), sal 1%, rumensin (0,02%), y núcleo vitamínico (0,1%). Se suministraron además 150 gramos/vaca/día de sales minerales (ppm) de Mn, Fe, Cu, Zn, Co, Se y I (40.000; 30.000; 10.000; 50.000; 400; 300 y 600 respectivamente). El núcleo vitamínico estuvo formulado con Vitaminas (unidades internacionales, **UI**) A, D3, E (4.500.000; 900.000; 10.000, respectivamente). Los datos colectados durante este período fueron utilizados como covariable y también para asignar en forma equilibrada a las vacas a los tratamientos. A partir del día 8 de ensayo y durante 31 días adicionales la oferta de concentrado y pastura fueron las mismas con la adición

de los aceites puros o sus combinaciones (800 g/vaca/día) que fueron manualmente mezclados al alimento concentrado.

El acostumbramiento a los aceites fue gradual comenzando con 200 g/vaca/día (100 g en cada ordeño) durante el primer día (día 1), 300 g/vaca/día (150 g en cada ordeño) durante los 2 días siguientes (días 2-3) y 800 g/vaca/día a partir del día 4 de comenzada la suplementación. A partir de ese momento, la cantidad se mantuvo constante hasta la finalización del ensayo (28 días de aporte de aceites a dosis completa).

La pastura fue utilizada bajo un sistema de pastoreo en franjas diarias. La biomasa disponible fue estimada semanalmente para ajustar el tamaño de la franja diaria de pastoreo utilizando el método de doble muestreo (Fernández, 1999) a través de la relación establecida entre la altura del forraje (x) y la biomasa disponible (y). Las ecuaciones fueron ajustadas tanto para la disponibilidad inicial como para el forraje remanente luego del pastoreo.

1.4.- Mediciones en los alimentos

A lo largo de todo el ensayo se tomaron muestras semanales representativas del concentrado y de la pastura (0,5 kg). Las muestras de pastura se obtuvieron en el horizonte de pastoreo por encima del residuo, en forma manual simulando la selectividad de la vaca (*hand-plucking*) según Meijs *et al.* (1982). Todas las muestras fueron secadas en estufa con circulación de aire forzado (60°C, 48 horas) para determinar el contenido de materia seca (**MS**) y molidas en molino tipo Willey (malla 1 mm), materia orgánica (**MO**) (mufla a 550-600°C durante 4 horas), proteína bruta (**PB**) (Horneck; Miller, 1998 con un analizador LECO FP-528), carbohidratos solubles en agua (**CSA**) (Morris, 1948), fibra en detergente neutro (**FDN**) y ácido (**FDA**) por la técnica de bolsas filtrantes (Komarek *et al.*, 1994 y Komarek *et al.*, 1993, respectivamente) con un autoanalizador (ANKOM Corp., Fairport, Nueva York, EE.UU., 1970), extracto etéreo (**EE**) por la técnica de extracción con solventes en alta temperatura (AOCS, 2004) con un autoanalizador (ANKOM Corp., Fairport, Nueva York, EE.UU.), digestibilidad de la materia seca (**DMS**) a 48 horas de incubación *in vitro* (equipo Daisy II, ANKOM) y almidón (Mc Rae; Armstrong, 1968).

1.5.- Medición de la producción y la composición química de la leche

La producción de leche fue registrada en forma individual y diaria durante todo el ensayo. La composición química de la leche se determinó a partir de muestras (50 ml) de dos ordeños diarios, dos veces a la semana en días no consecutivos. Con la leche de dos muestreos consecutivos (ordeño de la tarde de un día y mañana del día siguiente) se obtuvo una muestra única individual (pool) ponderada por la respectiva producción individual para la determinaciones de grasa, proteína y lactosa de la leche con un analizador Milko Scan™ Minor (FOSS, Hillerød, Denmark). La concentración de nitrógeno ureico en leche (**NUL**) fue determinada manualmente utilizando Kits enzimáticos (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina) previa refrigeración y centrifugación de la muestra de leche a 3000 rpm, durante 15 minutos (IEC Modelo Centra MP4) y posterior lectura con un espectrofotómetro (Spectrum modelo SP1102).

1.6.- Medición de peso vivo, obtención de plasma y análisis de metabolitos y hormonas

Las vacas fueron pesadas luego del ordeño de la mañana los días 6 y 7 del período de covariable y los días 37 y 38 del experimento. La variación diaria del peso de cada vaca se calculó como la diferencia entre el peso promedio final menos el inicial, dividido por el número de días transcurridos. Durante las dos últimas semanas de ensayo, se tomaron muestras de sangre por punción de vena yugular luego del ordeño de la mañana. La sangre fue colectada en tubos conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (**EDTA**, 7-8 gotas) (0,342 mol/L, pH 7,2, Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina), centrifugada (2000 × g por 15 min a 4°C) y el plasma obtenido fue conservado (-24°C) hasta los análisis de glucosa, nitrógeno ureico plasmático (**NUP**), triglicéridos, y colesterol utilizando kits enzimáticos (Laboratorio Wiener, Rosario Argentina). Para la determinación de los ácidos grasos no esterificados (**NEFA**) se utilizó el kit para NEFA (Randox Laboratories Ltd., UK). Las determinaciones de insulina, hormona de crecimiento (**GH**) y somatomedina (Factor de crecimiento tipo insulina, **IGF-I**) fueron realizadas según se describe en Mejia *et al.*, 1999 y Lacau-Mengido *et al.*, 2000 en el IByME (Instituto de Biología y Medicina Experimental, Buenos Aires, Argentina).

1.7.- Medición de consumo de alimento

El consumo diario de concentrado y aceite fue individualmente determinado por la diferencia entre lo ofrecido y lo rechazado a lo largo de todo el experimento. El consumo individual de pastura (parcelas individuales) se estimó durante los 3 últimos días del período de covariable para determinar el porcentaje de suplementación lipídica sobre el CMST y durante los 3 últimos días de las semanas 4 y 5 del ensayo mediante la diferencia entre el forraje ofrecido y el remanente (Meijs *et al.*, 1982). El promedio de los tres días consecutivos de estimación del consumo de cada animal fue utilizado para realizar el análisis estadístico generando seis repeticiones por tratamiento.

1.8.- Cuantificación del perfil en ácidos grasos de la leche y de los alimentos

Para la determinación de AG en leche, durante las 2 últimas semanas de suplementación con lípidos y de cada muestra compuesta colectada para la determinación de la composición química, se congelaron (-24°C) en forma inmediata alícuotas de 50 ml de leche de cada vaca para obtener una única muestra (pool) por animal.

La grasa total (**GT**) se determinó gravimétricamente por extracción con éter de petróleo a 65-80 °C (Official Methods 960.39) (Association of Official Analytical Chemists International [AOAC],1999). Es importante considerar que los AGI se isomerizan a altas temperaturas. Por esta razón, para analizar el perfil de AG, todo el procedimiento debe realizarse a una temperatura más baja. Así, los lípidos se extrajeron con una mezcla de hexano: isopropanol (3:2) y sulfato de sodio 6% a temperatura ambiente (Wolff 1995). El residuo lipídico extraído se secó a 40 °C bajo una corriente de nitrógeno. Para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (**EMAG**), se utilizó un método frío con hexano y KOH 2N en metanol (Bannon *et al.*, 1982). Los EMAG se cuantificaron usando un cromatógrafo de gases (Shimadzu **GC-2014**, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) equipado con una columna capilar CP-Sil 88, 100 mx 0,25 mm id (Varian, Lake Forrest, CA, EE.UU.) y detector de ionización de llama. De acuerdo con la técnica desarrollada por Masson *et al.* (2015), se mantuvieron las temperaturas del inyector y del detector a 250 °C, la tasa de flujo fue de 1: 100, 1 µl de muestra estándar o de muestra utilizando un dispositivo de

muestreo automático en cada corrida del GLC. El flujo de hidrógeno fue de 1 ml / min y el flujo de nitrógeno como gas de compresión fue de 25 ml / min. Se identificaron los tiempos de retención máximos y los porcentajes de área del total de AG inyectando patrones conocidos. Estándares internos, Tritridecanoína [13: 0-triacylglycerol (TAG)], estándares externos de referencia GLC-463 que contenían mezclas de 52 EMAG (pureza > 99%) y *trans*-mix GLC 481 (pureza > 99%) fueron adquiridos de Nu-Chek (Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN, USA). Ésteres de metilo del ácido linoleico, mezcla *cis* / *trans* (Catálogo n ° 47791); las mezclas de EMAG de largo de cadena C4-C24 insaturados (Catálogo N ° 18919) y de los EMAG individuales de largo de cadena de C4:0 a C24:1 saturados e insaturados se obtuvieron de Supelco (Bellefonte, PA, USA). Las mezclas de isómeros de AG posicional y geométrico fueron proporcionadas por la Red CYTED Internacional (208RT0343). Los EMAG fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los estándares comerciales. Los valores se expresaron como un porcentaje de los EMAG totales. El límite inferior de cuantificación por los EMAG identificados varió de 0,01% a 0,03%. Para convertir g EMAG / 100 g EMAG a equivalentes de triacilglicéridos (**TAG**) (g AG como TAG / 100 g de TAG) se emplearon los Factores de Conversión respectivos tabulados en el Método AOCS Ce 1j-07 (2007) (Masson *et al.*, 2015). Para estimar los g de AG / 100 g de muestra, los g de AG / 100 g de TAG se multiplicaron por el contenido total de grasa (%). Los resultados se expresaron como g de AG/100g del total de AG.

1.9.- Determinaciones complementarias sobre los aceites

Para evaluar la calidad de los aceites suplementarios de soja y de lino, se evaluó la estabilidad oxidativa mediante las determinaciones de índice de peróxidos y espectrofotometría UV (a 232 y 270 nm) y la estabilidad hidrolítica mediante el índice de acidez por análisis espectrales de absorción (AOAC). Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cromatografía del Dr. Claudio Bernal, cátedra de Bromatología y Nutrición. Universidad nacional del Litoral (**UNL**).

1.10.- Análisis estadístico

Las variables de producción y composición de leche fueron analizadas mediante un DCA con mediciones repetidas en el tiempo ajustado por covariable utilizando el programa PROC MIXED de SAS/STAT® (2002-2010) según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + A(i)j + S_k + Cov + (C \times S)_{ik} + E_{ijk}$$

donde Y_{ijk} es la variable respuesta; μ es la media poblacional; Cov es el efecto de covariable, C_i es el efecto del i -ésima combinación de suplementación con mezcla de aceites, A_{ij} es el efecto del animal dentro de tratamiento, S_k es el efecto de la semana, $(C \times S)_{ik}$ interacción entre el tratamiento y la semana y E_{ijk} es el error experimental asociado a la ijk -ésima unidad experimental.

Los resultados de la composición en AG de la GB, el consumo, el peso vivo, metabolitos y hormonas se analizaron utilizando el programa PROC GLM de SAS/STAT® (2002-2010) según un modelo a un criterio de clasificación:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + E_{ij}$$

donde Y_{ij} es la variable respuesta; μ es la media poblacional; C_i es el efecto del i -ésima combinación de suplementación con mezcla de aceites y E_{ij} es el error residual.

El umbral de significancia estadística fue establecido en $p < 0,05$ y el umbral de tendencia fue $p < 0,10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1.- Medición de la biomasa del forraje

La biomasa promedio de la pastura (2253 ± 590 kg MS/ha) estuvo por encima de la disponibilidad crítica (2000 kg de MS/ha) por debajo de la cual el consumo de materia seca (**CMS**) podría estar restringido (Minson, 1990). Por su parte, la asignación diaria de forraje fue de 27 kg MS/vaca/día. Una asignación diaria de 45 g MO por kg de PV y por día permitiría lograr máximos CMS en vacas lecheras en pastoreo según Minson (1990). En el presente ensayo, el PV promedio de las vacas (563 kg, Tabla 6) y el contenido promedio de MO de las pasturas (90 g/100gMS, Tabla 1) permiten estimar que la asignación de pastura no limitante del consumo sería de 22,8 kg MS/vaca/día valor inferior al utilizado (27 kg MS/vaca/día). Se ha postulado también que el máximo CMS se alcanzaría cuando la oferta de pastura oscila entre 45 a 55 g MS por kg de PV y por día (Leaver, 1985). Para el peso promedio registrado en las vacas del presente ensayo (563 kg) el rango de asignación sería de 25 a 31 kg MS y por lo tanto la asignación de 27 kg MS/vaca/día se encontró dentro del mismo. Puede concluirse que la oferta forrajera no resultó limitante para la expresión del potencial de CMS de los animales experimentales.

1.2.- Composición química y valor nutricional de los alimentos

En la Tabla 1 se presentan los valores de composición química y digestibilidad *in vitro* de la MS de la pastura y del concentrado utilizados durante el experimento. El contenido de MS promedio del forraje (21,85%) estuvo por encima del rango crítico de 15-18% informado por Verité y Journet (1970) como limitante del consumo. A su vez, los contenidos de PB (15,1%) y de FDN (46,23%) de las pasturas se encontraron dentro de los rangos (15-25% para PB y 36-54% para FDN) propuestos por Minson (1990) a fines de obtener una alta DMS del forraje como lo sugieren los altos valores obtenidos con la metodología *in vitro* (68,62%).

Tabla 1. Composición química y digestibilidad *in vitro* de la pastura y alimento concentrado.¹

Variable	Pastura ²	Concentrado
Materia Seca, %	21,85 ± 2,70	89,6 ± 0,65
Materia Orgánica, % de la MS	90,01 ± 1,35	92,80 ± 0,46
Proteína Cruda, % de la MS	15,10 ± 3,68	17,32 ± 1,02
Fibra Detergente Neutro, % de la MS	46,23 ± 8,16	23,97 ± 2,00
Fibra Detergente Ácida, % de la MS	26,84 ± 4,42	11,51 ± 1,41
Digestibilidad in Vitro de la MS, %	68,62 ± 3,10	75,14 ± 1,88
Almidón, % de la MS	2,38 ± 0,66	32,59 ± 4,05
Extracto Etéreo, % de la MS	2,62 ± 0,54	4,47 ± 0,77
E. Metabolizable (Mcal/kg MS)	2,48 ± 0,11	2,71 ± 0,07
CSA, % de la MS	11,90 ± 3,60	20,70 ± 2,30

¹ Valores expresados a través del promedio ± el desvío estándar. Pastura y Concentrado n=10. ² pastura consociada de cebadilla (*Bromus unioloides*), Festuca (*Festuca arundinacea*), Trébol rojo (*Trifolium pratense*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). CSA=carbohidratos solubles en agua

Los valores de carbohidratos no estructurales totales (14,3%) y de extracto etéreo resultaron normales. Estos resultados, sumados a la adecuada oferta de forraje ya discutida, resultan compatibles con un adecuado consumo voluntario de pastura.

La composición en AG de los aceites, la pastura y el concentrado se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Perfil en ácidos grasos de la pastura, el alimento concentrado y de los aceites puros de soja y de lino.

Ácidos grasos	Pastura ¹	AS ²	AL ³	Concentrado
	g/100g del total de AG			
C14:0	0,32	ND ⁴	ND	ND
C16:0	17,55	10,25	7,15	15,40
C16:1 <i>cis</i> -9	1,16	ND	ND	ND
C18:0	1,50	4,90	5,45	3,43
C18:1 <i>cis</i> -9	1,87	21,55	21,05	26,95
C18:1 <i>cis</i> -11	ND	ND	ND	3,20
C18:1 <i>cis</i> -12	ND	ND	ND	0,81
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	12,45	53,55	23,6	45,85
C20:0	0,69	0,40	0,25	0,33
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	54,21	8,50	41,90	3,21
<i>cis</i> -15				
C22:0	0,99	0,40	0,20	0,38

¹Pastura consociada de cebadilla (*Bromus unioloides*), Festuca (*Festuca arundinacea*), Trébol rojo (*Trifolium pratense*) y Trébol blanco (*Trifolium repens*).²aceite de soja.³aceite de lino.⁴No se detecta.

El AS se caracterizó por su alto contenido en ALi y su bajo contenido en AGS características deseables para cumplir con los objetivos del trabajo. El AS utilizado resultó una buena fuente de AO (*cis*-9 C18:1, 21,55%),AGMI y fundamentalmente de ALi (53,55%). Su composición resultó normal y similar a lo informado por otros autores (Glasser *et al.*, 2008; Martínez, 2010).

El ALA representó el 41,9% del total de AG en el AL (Tabla 2) valor que resultó inferior a lo reportado (55%) por otros autores (Flowers *et al.*, 2008; Glasser *et al.*, 2008; Rego *et al.*, 2009) pero comparable a lo informado por Martin *et al.* (2008) y Pires *et al.* (2008). La concentración de ALA en la pastura estuvo dentro de los valores aceptables aunque superiores a los encontrados en otros trabajos (Looor *et al.*, 2005; Flowers *et al.*, 2008).

El índice de acidez (mg KOH/g) para el AS y AL fue de 1,29 ($\pm 0,02$) y 7,11 ($\pm 0,61$), respectivamente. El índice de peróxidos (meq O₂/kg) fue de 3,11 ($\pm 1,29$) y 5,87 ($\pm 1,02$), respectivamente. El índice de Espectrofotometría UV (A_λ 232) para el AS y AL fue de 0,789 ($\pm 0,14$) y 1,324 ($\pm 0,37$), respectivamente y el índice de Espectrofotometría UV (A_λ 270) en ambos aceites fue de 0,106 ($\pm 0,02$) y 0,297($\pm 0,08$), respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de rangos considerados admisibles para el consumo animal.

1.3.- Producción y composición química de la leche

El consumo de aceites incrementó (+9,4%; $p < 0,05$) la producción promedio de leche (25,19 kg/vaca/día) comparado al valor registrado en el lote Control (23,03 kg/vaca/día) resultado fundamentalmente explicado por ambas combinaciones 75-25 (Tabla 3).

Puesto que la producción de leche en AS100 (24,59 kg/vaca/día) y AL100 (23,86 kg/vaca/día) no se diferenció ($p > 0,05$) del Control (23,03 kg) puede inferirse que ambas mezclas (75- 25) ejercieron un efecto sinérgico sobre esta variable.

La comparación de las mezclas de aceites entre sí no sugiere un efecto específico de alguna de ellas sobre la producción de leche. En el trabajo de Bu *et al.* (2007) el aporte de AS, de AL o sus mezclas (50- 50) suministradas al 4% del CMS incrementó la producción de leche respecto al Control en un 16,7% sin diferencias entre los tratamientos con lípidos.

Tabla 3. Producción y composición de leche en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.

Variable	Tratamiento ¹							EEM	T	S	T * S
	Control	AS100-AL0	AS75-AL25	AS50-AL50	AS25-AL75	AS0-AL100					
Leche, kg/vaca/d	23,03 ^c	24,59 ^{bc}	26,12 ^{ab}	24,53 ^c	26,85 ^a	23,86 ^c	0,55	0,0004	0,44	NS ³	
LGC4%, kg/vaca/d	20,73 ^b	22,87 ^{ab}	23,73 ^a	20,45 ^b	22,90 ^{ab}	21,21 ^b	0,92	0,08	0,0008	NS	
Grasa, g/100 g	3,40 ^a	3,47 ^a	3,33 ^{ab}	2,79 ^c	3,06 ^{bc}	3,40 ^a	0,12	0,002	<0,0001	NS	
Proteína, g/100 g	3,34	3,29	3,34	3,25	3,16	3,29	0,09	NS	<0,0001	NS	
Lactosa, g/100 g	4,82	4,90	4,89	4,89	4,88	4,96	0,04	NS	<0,0001	0,001	
Sólidos, g/100g	12,29 ^a	12,37 ^a	12,41 ^a	11,80 ^{bc}	11,74 ^c	12,24 ^{ab}	0,15	0,006	<0,0001	NS	
Grasa, kg/vaca/día	0,748 ^{bc}	0,857 ^{ab}	0,886 ^a	0,709 ^c	0,820 ^{abc}	0,791 ^{abc}	0,04	0,04	<0,0001	NS	
Proteína, kg/vaca/día	0,729 ^d	0,811 ^{abc}	0,882 ^a	0,806 ^{bcd}	0,850 ^{ab}	0,773 ^{cd}	0,03	0,007	0,001	NS	
Urea mg/dl	27,97	29,25	27,83	26,95	26,73	28,24	1,47	0,87	<0,0001	NS	

^{a,b,c,d} Medias dentro de fila con distinta letra difieren significativamente entre sí (Test Tukey-Kramer, $p < 0,05$).

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMeans (EEM). Control (C) sin aceites, 800g aceite de soja (AS100- AL0), 600g aceite de soja y 200g aceite de lino (AS75- AL25), 400g aceite de soja y 400g aceite de lino (AS50- AL50) 200 g aceite de soja y

600g aceite de lino (AS25- AL75), 800g aceite de lino (AS0-AL100). ²Efecto tratamiento. LGC4% = Leche grasa corregida al 4%. ³ No significativo. T=tratamiento. S=semana

Una alta frecuencia de efectos favorables sobre la producción de leche ante la inclusión de aceites vegetales no protegidos fue informada por Morand-Fehr *et al.* (1986). La falta de diferencias entre AS100 y AL100 respecto al lote Control fue también observada en el meta análisis de Glasser *et al.* (2008) lo que sugiere ausencia de una ventaja neta de uno u otro aceite sobre la producción de leche.

El aporte de aceite de lino al 3 o al 4% del CMS aumentó la producción de leche en el trabajo Bu *et al.* (2007) pero no ante el suministro de 0,5 kg de AL en Rego *et al.* (2009), ni en el de Loor *et al.* (2005). Por su parte, el aporte de AS al 2,9 ($\pm 1,2$) % del CMS (533 g/día \pm 228) no afectó la producción de leche en los trabajos revisados por Glasser *et al.* (2008).

La producción de leche corregida por grasa al 4% (**LGC4%**) resultó superior al Control sólo en la combinación AS75- AL25 resultado explicado por el mayor volumen de leche producido puesto que el tenor graso no varió. La suplementación con lípidos insaturados presenta en general efectos neutros sobre la producción de LGC4% tanto en condiciones de estabulación (Gagliostro y Chilliard, 1992a) como en alimentación pastoril (Schroeder *et al.*, 2004).

Comparado al lote Control, sólo los tratamientos con 50 y 75% de AL afectaron negativamente la concentración graso de la leche junto a la concentración de los sólidos totales(**ST**)mientras que el tenor proteico no fue afectado por los tratamientos (Tabla 3). La menor concentración de GL se obtuvo en el tratamiento 50- 50 en concordancia con la mayor concentración del *trans*-10 C18:1 observada en la leche (Tabla 8) ya que ambos parámetros correlacionaron negativamente (Figura 1).

Se ha informado una relación directa entre niveles crecientes de *trans*-10 C18:1 en leche y reducción de la síntesis mamaria *de novo* (Piperova *et al.*, 2000; Lock *et al.*, 2007)lo que contribuye a explicar la caída en el tenor graso.

El efecto de la suplementación con lípidos no protegidos sobre el tenor proteico de la leche resulta sistemáticamente desfavorable (71% de los casos analizados por Morand-Fehr *et al.*, 1986) y está además asociado a una reducción en la síntesis de caseínas (Storry *et al.*, 1974; Dunkley *et al.*, 1977). Numerosos trabajos indican que la suplementación con lípidos presenta un efecto negativo sobre la concentración proteica de la leche bovina (Gagliostro y Chilliard, 1992; Palmquist *et al.*, 1993) efecto que resulta más consistente ante el uso de grasas saturadas (-0,18 g/100g) y sales

cálcicas de AG (-0,12 g/100g) respecto a los aceites vegetales insaturados (Gagliostro y Chilliard, 1992). Del análisis de 8 trabajos de suplementación con lípidos insaturados en vacas en pastoreo (Schroeder *et al.*, 2004) surge una disminución de la concentración proteica en leche del orden del 3,2% (-0,11 g/100g). La inclusión de AL en la ración de vacas lecheras no parece afectar ni el contenido ni la producción de grasa (Bu *et al.*, 2007; Glasser *et al.*, 2008) o de proteína láctea (Loor *et al.*, 2005; Rego *et al.*, 2005; Bu *et al.*, 2007; Rego *et al.*, 2009).

En comparación al tratamiento Control, la combinación AS75- AL25 resultó también la más efectiva para incrementar la producción de grasa y proteína láctea. El resultado puede ser relevante en un contexto del pago de la leche por kg de grasa y de proteína producidos. La ausencia de efectos negativos sobre la concentración proteica en todos los tratamientos es importante ya que este parámetro no sólo incide en el precio de la leche sino que resulta determinante de la velocidad y calidad de coagulación en la fabricación de quesos.

En condiciones de alimentación pastoril, la suplementación con lípidos no suele afectar la concentración proteica de la leche (Bargo *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2004) mientras que en alimentación estabulada este parámetro resulta sistemáticamente afectado (Gagliostro y Chilliard, 1992a; Wu y Huber, 1994).

El AS suministrado en un rango del 3,5 al 5% del CMS no afectó la producción de leche en los trabajos de Dhiman *et al.* (2000), Alzahal *et al.* (2008), y Huang *et al.* (2008) lo que también fue informado por Glasser *et al.* (2008). Por su parte, el consumo de AL (1 al 7% del CMS) tampoco afectó la producción de leche (Dhiman *et al.*, 2000; Loor *et al.*, 2005; Flowers *et al.*, 2008; Glasser *et al.*, 2008). En un amplio rango de aporte (0,2 a 1,0 kg/vaca/día) se ha observado que la suplementación con lípidos insaturados a vacas lecheras en pastoreo suele reducir (8%) el contenido y la producción de GB de la leche (Schroeder *et al.*, 2004) efecto que resultó ser muy variable según la fuente lipídica que se utilice. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en la concentración de lactosa. Muy pocos estudios han observado cambios en el porcentaje de lactosa en la leche. Jenkins y McGuire (2006), indican que éstos solo ocurren en situaciones poco frecuentes de alimentación muy extremas. El nivel de Urea en leche no fue afectado por la inclusión de lípidos en la dieta ($p > 0,05$) y parece ser un buen indicador del equilibrio entre la proteína y los Carbohidratos no estructurales totales aportados por la dieta (Tabla 1).

1.4.- Metabolitos, hormonas plasmáticas y peso vivo

Los niveles circulantes de glucosa, urea, NEFA y triglicéridos (**TG**) no fueron afectados por el aporte de aceites puros o sus mezclas ($p>0,05$; Tabla 4). Los niveles de colesterol resultaron superiores ($p<0,05$) al Control sólo cuando la participación del AL superó el 50% de la mezcla. La comparación de las mezclas entre sí no evidenció efectos netos sobre la colesterolemia.

El mantenimiento de la glucemia entre tratamientos resultó compatible con la ausencia de efectos negativos de los aceites sobre el consumo de concentrado o de MS total (Tabla 7). Cuando el CMS no fue afectado por el aporte de grasa protegida, los niveles plasmáticos de glucosa permanecieron constantes (Vicente *et al.*, 1984).

Tabla 4. Concentración plasmática de metabolitos en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.

Variable	Tratamiento ¹						EEM	P< ²
	Control	AS100-AL0	AS75-AL25	AS50-AL50	AS25-AL75	AS0-AL100		
Glucosa (mg/dl)	64,21	61,54	58,80	57,51	60,42	60,01	2,27	0,28
Urea (mg/dl)	38,81	39,23	37,63	37,38	34,46	39,67	3,01	0,86
Trigliceridos (mmol/L)	0,80	0,84	0,81	0,75	0,81	0,92	0,06	0,58
Colesterol (mg/dl)	199,39 ^c	208,56 ^{abc}	205,94 ^{bc}	229,26 ^{ab}	231,98 ^{ab}	236,44 ^a	9,92	0,04
NEFA (μ Eq/l)	404,59	430,33	385,13	386,04	424,67	431,67	31,52	0,80

^{a,b,c} Medias dentro de fila con distinta letra difieren significativamente entre sí (Test Tukey-Kramer, $P<0,05$). ¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMs (EEM). Control (C) sin aceites, 800g aceite de soja (AS100-AL0), 600g aceite de soja y 200g aceite de lino (AS75-AL25), 400g aceite de soja y 400g aceite de lino (AS50-AL50) 200g aceite de soja y 600g aceite de lino (AS25-AL75), 800g aceite de lino (AS0-AL100). ²Efecto tratamiento. NEFA= ácidos grasos no esterificados.

Aún ante disminuciones en el CMS inducidos por la infusión duodenal de aceite de colza (1kg/vaca/día) la glucemia permaneció inalterada tanto en vacas en inicio como en lactancia media (Gagliostro *et al.*, 1991).

La reducción en la concentración de los AG sintetizados *de novo* (Tabla 8) sugiere una menor lipogénesis mamaria lo que pudo haber contribuido a mantener (o inclusive aumentar) la glucemia debido a una menor oxidación de glucosa para producción de NADPH a nivel mamario (Chilliard *et al.*, 1991). Además, también podría explicar, al

menos en parte, el aumento de la producción de leche observado en algunos tratamientos con aceite, ya que la glucosa ahorrada podría ser dirigida a la síntesis de lactosa.

Los aumentos en los niveles circulantes de todos los lípidos plasmáticos ante el aporte de materia grasa es un resultado bien documentado (Gagliostro *et al.*, 1991; Gagliostro y Chilliard, 1991b) que se explica por un incremento en todas las fracciones de lipoproteínas plasmáticas (Nestel *et al.*, 1978; Christie, 1981; Storry, 1981). La única excepción a esta regla general son los TG debido a su alta tasa de recambio (Christie, 1981) que podría explicar la ausencia de efecto de los aceites suplementarios sobre la trigliceridemia (Tabla 4). Un resultado comparable fue también observado ante la infusión duodenal de aceite de colza (1kg/vaca/día) a vacas lecheras en lactancia temprana (Gagliostro *et al.*, 1991).

Concordando con lo observado en otros trabajos (Mandebvu *et al.*, 2003; Ambrose *et al.*, 2006; Castañeda-Gutiérrez *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2008), la concentración de NEFA no fue afectada por los lípidos incluidos en la ración, lo que sugiere que los AG que componen las dos fuentes de lípidos fueron utilizados de forma similar en el metabolismo animal.

Tabla5. Concentración plasmática de hormonas en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.

Variable	Tratamiento ¹						EEM	P< ²
	Control	AS100-AL0	AS75-AL25	AS50-AL50	AS25-AL75	AS0-AL100		
IGF-1 (ng/ml)	178,05 ^a	105,60 ^{cd}	97,15 ^d	94,01 ^d	133,01 ^{bc}	140,17 ^b	11,47	<0,0001
Insulina (ng/ml)	0,34	0,24	0,38	0,53	0,36	0,77	0,13	0,11
GH (ng/ml)	2,76	2,18	2,88	2,73	2,46	2,39	0,21	0,90

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMean (EEM). Control (C) sin aceites, 800g aceite de soja (AS100-AL0), 600g aceite de soja y 200g aceite de lino (AS75-AL25), 400g aceite de soja y 400g aceite de lino (AS50-AL50) 200g aceite de soja y 600g aceite de lino (AS25-AL75), 800g aceite de lino (AS0-AL100).²Efecto tratamiento.

Los niveles de hormonas en plasma se presentan en la Tabla 5. Los efectos sobre la concentración plasmática de hormonas ante la inclusión de grasa en la dieta no son consistentes (Chilliard, 1993) y la recopilación de datos para vacas lecheras en pastoreo son escasos. La respuesta productiva o las adaptaciones metabólicas después de la inclusión de lípidos en la dieta puede ser en parte consecuencia de

cambio en las hormonas circulantes (Chilliard, 1993; Staples *et al.*, 1998). No se han encontrado efectos claros de la inclusión de lípidos sobre la GH circulante en vacas lecheras (Wu and Huber, 1994). Cuando se incrementan los NEFA plasmáticos en circulación debido a la suplementación con lípidos, se podría ocasionar una disminución en el plasma de la GH (Casper y Schingoethe, 1989; Chilliard, 1993). En el presente trabajo los niveles promedio de NEFA y GH no fueron afectados ($p>0,05$) por la inclusión de aceites en la ración (Tablas 4 y 5) resultados idénticos a los ocurridos en otros trabajos ante la inclusión de aceites parcialmente hidrogenados (Schroeder *et al.*, 2002; Salado *et al.*, 2004).

El IGF-I puede ser usado como un examen de selección de potencial reproductivo especialmente para vacas de alta producción lechera cuya capacidad reproductiva se vea afectada. Sin embargo, el IGF-I no es pronosticador de eventos reproductivos, pero sí un indicador indirecto de la capacidad de un animal para lograr reproducirse y sigue siendo importante en el estudio de la relación entre nutrición y reproducción (Ruiz Arboleda *et al.*, 2011). En nuestro trabajo la concentración de IGF-1 se vio afectada ($p<0,05$) con la inclusión de lípidos con concentraciones menores a medida que la inclusión de aceite de lino disminuía. La concentración plasmática de insulina como indicador de *status* energético no fue afectada ($p>0,05$) por la inclusión de lípidos en la dieta.

Los resultados de variación de PV de los animales experimentales se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Variaciones de PV en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.

Variable (kg)	Tratamiento ¹						EEM	$P<^2$
	Control	AS100- AL0	AS75- AL25	AS50- AL50	AS25- AL75	AS0- AL100		
PV inicial	542,2	547,8	562,3	528,5	554,2	554,8	23,9	0,94
PV final	568,6	584,7	588,3	559,2	592,2	584,2	22,6	0,88
GPV	0,690	0,960	0,680	1,00	0,810	0,780	0,14	0,47
Δ PV	26,5	36,8	26,0	30,8	38,7	29,7	5,55	0,45

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMean (EEM). Control (C) sin aceites, 800g aceite de soja (AS100-AL0), 600g aceite de soja y 200g aceite de lino (AS75-AL25), 400g aceite de soja y 400g aceite de lino (AS50-AL50) 200g aceite de soja y 600g aceite de lino (AS25-AL75), 800g aceite de lino (AS0-AL100). ² Efecto tratamiento. GPV=ganancia de peso vivo. Δ PV= variación de peso vivo

Los cambios en el PV de los animales y sus variables asociadas indicaron ausencia de efectos del aporte de aceites o sus mezclas sobre estos parámetros. Si bien el

resultado debe tomarse con precaución debido a la corta duración del trabajo el mismo resulta compatible con lo informado por otros autores (AbuGhazaleh, Schingoethe, Hippen, Kalscheur y Whitlock, 2002; AbuGhazaleh, Schingoethe, Hippen y Whitlock, 2002; Flowers *et al.*, 2008; Angulo, 2012). La suplementación con lípidos insaturados no parece reducir la pérdida de peso en vacas en inicio de lactancia ni favorecer la reconstitución de reservas corporales en vacas en lactancia media (Gagliostro y Chilliard, 1992b).

1.5.- Consumo de concentrado y pastura

A la concentración utilizada (10% en alimento tal cual) la inclusión de aceite vegetal en el concentrado no produjo rechazos en el consumo del mismo ni diferencias respecto al Control (Tabla 7). El CMS de la pastura se incrementó en un 6 y 8% en los tratamientos AS100 y AS75- AL25 mientras que en AS50- AL50; AS25- AL75 y AS0- AL100 se redujo en un 0,3; 13 y 9% respectivamente (Tabla 7).

En consecuencia, el consumo de los aceites resultó completo y el CMST fue mayor en los tratamientos AS100 y AS75 (Tabla 7).

Tabla 7. Consumo de pastura, aceites, concentrado y consumo total de MS en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.

Ingredientes (kg MS/día)	Tratamiento ¹						EEM	P< ²
	Control	AS100- AL0	AS75- AL25	AS50- AL50	AS25- AL75	AS0- AL100		
Pastura ³	9,27 ^{ab}	9,84 ^{ab}	10,00 ^a	9,24 ^{ab}	8,09 ^c	8,98 ^{bc}	0,35	0,007
Concentrado	7,2	7,20	7,20	7,20	7,20	7,20	-	-
Aceites	-	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	-	-
Total MS	16,47 ^b	17,84 ^a	18 ^a	17,24 ^{ab}	16,09 ^c	16,98 ^{bc}	0,39	<0,0001

^{a,b,c} Medias dentro de fila con distinta letra difieren significativamente (test Tukey-Kramer, $p < 0,05$). ¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMean (EEM). Control (C) sin aceites, 800g aceite de soja (AS100- AL0), 600g aceite de soja y 200g aceite de lino (AS75- AL25), 400g aceite de soja y 400g aceite de lino (AS50- AL50) 200g aceite de soja y 600g aceite de lino (AS25- AL75), 800g aceite de lino (AS0-AL100). ²Efecto tratamiento.

³Pastura consociada de cebadilla (*Bromus unioloides*), Festuca (*Festuca arundinacea*), Trébol rojo (*Trifolium pratense*) y Trébol blanco (*Trifolium repens*).

La inclusión de AL ($3,2 \pm 1,7\%$ CMS) o AS ($2,9 \pm 1,2\%$ CMS) en la ración de vacas lecheras no afectó el CMS en el meta análisis de Glasser *et al* (2008) ni en Loor *et al.* (2005) y Bu *et al.* (2007). Los efectos de la inclusión de aceites vegetales sobre la digestión ruminal son muy variables reportándose efectos negativos (Sutton *et al.*,

1983), neutros (Kim *et al.*, 2008; Atkinson *et al.*, 2009; Dschaak *et al.*, 2011) o aún positivos (Doreau y Chilliard, 1997; Ueda *et al.*, 2003).

La relación forraje: concentrado(**F:C**) puede interactuar con la respuesta sobre la digestión ruminal. En efecto, cuando el AL fue incluido al 3% del CMS en una ración con 65% de forraje y 35% de concentrado se informaron efectos positivos sobre la digestión de la fibra con un resultado opuesto cuando dicha relación fue de 35:65 (Ueda *et al.*, 2003). En el presente ensayo, la relación F:C fue de 54:46 (Tabla 7).

El consumo (g/día) de C18:2n-6 y C18:3n-3 aportado por los aceites suplementarios fue de 407,4- 179,4 (AS100- AL0); 321,67- 212,8 (AS75- AL25); 235,98- 246,24 (AS50- AL50); 150,29- 279,68 (AS25- AL75) y 64,6- 313,12 (AS0- AL100), respectivamente.

1.6. Perfil de los AG de la leche

Un aumento en la captura mamaria de los TG plasmáticos luego del aporte de los aceites vegetales explicaría las importantes modificaciones en el perfil en AG de la GL respecto al grupo Control (Tabla 8). El resultado confirma la existencia de una gran plasticidad de composición de la GL en cuanto a sus AG constitutivos (Chilliard *et al.*, 2000; Glasser *et al.*, 2008).

La ausencia de un efecto depresor sobre la concentración del AB (C4:0) es un resultado frecuentemente informado (Glasser *et al.*, 2008) que resulta de interés por su potencial rol benéfico en la salud humana. El compuesto, presente únicamente en la leche de rumiantes, ha demostrado efectos antineoplásicos inhibiendo el desarrollo de carcinoma mamario en ratas (Parodi, 1999).

El C4:0 puede ser sintetizado por una vía malonil-CoA independiente y por lo tanto no dependiente de la acetil CoA carboxilasa(**ACC**) cuya actividad resulta inhibida por la captura de los AG exógenos aportados por los aceites (Bauman y Davies, 1974; Chilliard *et al.*, 2003; Chilliard y Ferlay, 2004).

Tabla 8. Perfil en ácidos grasos de la leche en vacas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soja y lino.

Ácidos Grasos (g/100g del total de AG)	Tratamiento ¹						P< ²	
	Control	AS10- AL0	AS75- AL25	AS50- AL50	AS25- AL75	AS0- AL100	EEM	T
C4:0	2,38 ^a	2,41 ^a	2,47 ^a	2,18 ^a	2,60 ^a	2,46 ^a	0,15	<0,0001
C6:0	1,50 ^a	1,25 ^{ab}	1,35 ^{ab}	1,11 ^b	1,30 ^{ab}	1,34 ^{ab}	0,10	0,02
C8:0	0,93 ^a	0,66 ^b	0,74 ^b	0,60 ^b	0,72 ^b	0,74 ^b	0,06	0,0002

C10:0	2,20 ^a	1,39 ^b	1,55 ^b	1,27 ^b	1,54 ^b	1,55 ^b	0,13	<0,0001
C12:0	2,58 ^a	1,60 ^b	1,79 ^b	1,52 ^b	1,73 ^b	1,73 ^b	0,12	<0,0001
C14:0	10,21 ^a	6,78 ^b	7,27 ^b	6,42 ^b	6,75 ^b	6,95 ^b	0,32	<0,0001
C14:1 <i>cis</i> -9	0,88 ^a	0,43 ^b	0,48 ^b	0,37 ^b	0,42 ^b	0,34 ^b	0,08	<0,0001
C15:0	0,98 ^a	0,68 ^b	0,72 ^b	0,73 ^b	0,69 ^b	0,68 ^b	0,03	<0,0001
C16:0	25,69 ^a	19,49 ^b	20,07 ^b	19,53 ^b	19,52 ^b	18,96 ^b	0,66	<0,0001
C16:1	0,88 ^a	0,58 ^{bc}	0,62 ^b	0,40 ^{bc}	0,54 ^{bc}	0,38 ^c	0,07	<0,0001
C17:0	0,52 ^a	0,32 ^b	0,31 ^b	0,34 ^b	0,34 ^b	0,33 ^b	0,03	<0,0001
C18:0	12,78 ^c	14,11 ^{bc}	13,86 ^{bc}	14,10 ^{bc}	16,15 ^a	15,33 ^{ab}	0,67	0,004
C18:1Isómeros								
<i>Trans</i> -6-8	0,16 ^c	0,38 ^{ab}	0,32 ^b	0,41 ^a	0,36 ^{ab}	0,36 ^{ab}	0,03	<0,0001
<i>Trans</i> -9	0,23 ^b	0,53 ^a	0,48 ^a	0,52 ^a	0,47 ^a	0,50 ^a	0,02	<0,0001
<i>Trans</i> -10	0,46 ^c	1,48 ^{ab}	0,95 ^{bc}	1,80 ^a	1,13 ^{abc}	0,91 ^{bc}	0,29	0,006
<i>Trans</i> -11 (AV)	3,49 ^c	8,17 ^{ab}	7,82 ^b	9,20 ^a	7,67 ^b	8,15 ^{ab}	0,38	<0,0001
Trans totales	4,34 ^c	10,56 ^{ab}	9,57 ^b	11,93 ^a	9,63 ^b	9,91 ^b	0,52	<0,0001
C18:1 <i>cis</i> -9	26,14 ^b	27,80 ^{ab}	27,50 ^{ab}	27,45 ^{ab}	27,76 ^{ab}	28,10 ^a	0,68	0,02
C18:1 <i>cis</i> -11	2,15 ^a	2,10 ^a	1,92 ^{ab}	1,95 ^{ab}	1,92 ^{ab}	1,78 ^b	0,09	0,01
C18:2 (n-6)	1,96 ^b	3,36 ^a	3,50 ^a	3,44 ^a	2,87 ^a	2,74 ^a	0,29	<0,0001
C18:3 (n-3)	0,35 ^d	0,40 ^d	0,64 ^c	0,73 ^{bc}	0,85 ^{ab}	1,05 ^a	0,07	<0,0001
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 (AR)	1,56 ^c	3,03 ^a	3,21 ^a	3,24 ^a	2,33 ^b	2,96 ^a	0,22	<0,0001
AG cadena corta ³	7,02 ^a	5,70 ^b	6,11 ^{ab}	5,16 ^b	6,17 ^{ab}	6,08 ^{ab}	0,42	0,005
AG cadena media ⁴	41,69 ^a	29,30 ^b	31,21 ^b	29,18 ^b	29,70 ^b	29,15 ^b	0,98	
AG cadena larga ⁵	49,27 ^b	61,32 ^a	60,21 ^a	62,70 ^a	61,52 ^a	61,86 ^a	1,08	<0,0001
Ácidos grasos saturados (AGS)	59,76 ^a	48,24 ^b	50,10 ^b	47,74 ^b	51,28 ^b	49,95 ^b	1,24	<0,0001
Ácidos grasos insaturados (AGI)	38,21 ^b	48,07 ^a	47,43 ^a	49,30 ^a	46,12 ^a	47,14 ^a	1,17	<0,0001
AGS/AGI	1,58 ^a	1,01 ^b	1,06 ^b	0,97 ^b	1,12 ^b	1,06 ^b	0,06	<0,0001
ÍA ⁶	1,85 ^a	1,05 ^b	1,12 ^b	1,00 ^b	1,09 ^b	1,07 ^b	0,07	<0,0001
ProductosΔD	35,77 ^b	43,93 ^a	42,97 ^a	44,72 ^a	42,04 ^a	43,00 ^a	0,99	<0,0001
Sustratos ⁸	54,51 ^a	51,50 ^b	51,76 ^b	52,99 ^{ab}	53,01 ^{ab}	52,01 ^b	0,85	<0,0001
Índex ⁷	0,40 ^b	0,46 ^a	0,45 ^a	0,46 ^a	0,44 ^a	0,45 ^a	0,08	<0,0001
AG de <i>novo</i> (C4:0-C15:1)	21,07 ^a	15,60 ^b	16,35 ^b	14,17 ^b	15,59 ^b	15,70 ^b	0,81	<0,0001
AG preformados (>17:0)	50,70 ^b	61,26 ^a	60,16 ^a	62,57 ^a	61,42 ^a	61,72 ^a	1,06	<0,0001
n-6/n-3	5,94 ^b	8,53 ^a	5,66 ^b	4,86 ^c	3,47 ^d	2,76 ^d	0,26	0,0008
AR/AV	0,44 ^a	0,37 ^{abc}	0,42 ^{ab}	0,33 ^{bc}	0,31 ^c	0,37 ^{bc}	0,03	<0,0001
Σ(C12:0, C14:0, C16:0)	38,48 ^a	27,43 ^b	29,13 ^b	27,47 ^b	28,00 ^b	27,64 ^b	0,96	<0,0001

^{a,b,c,d}Medias dentro de fila con distinta letra difieren significativamente (test Tukey-Kramer, P< 0,05). ¹Valor expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMea (EEM). Control (C) sin aceites, 800g aceite de soja (AS100- AL0), 600g aceite de soja y 200g aceite de lino (AS7 AL25), 400g aceite de soja y 400g aceite de lino (AS50- AL50) 200g aceite de soja y 600g aceite de lino (AS2 AL75), 800g aceite de lino (AS0-AL100). ²Efecto tratamiento. ³Ácidos grasos de cadena corta: (C6:0 C10:0). ⁴Ácidos grasos de cadena media: (C12:0 a C17:1). ⁵Ácidos grasos de cadena larga: (C18:0 a C22:0). ⁶Índice de aterogenicidad: (C12+4*C14+C16)/(ΣAGI) los AGI de la fórmula son: *cis*-9C14:1, C16:1, *cis*-9C18:1, *cis*-11C18:1, *trans*-11C18:1, C18:3, C18:2, *cis*-9 *trans*-11 C18:2 CLA. Se excluyeron los AG no saludables (*trans*-6-8,9, 10). ⁷Índex: ([ΣproductosΔ9D]/[ΣproductosΔ9D+Sustratos]). ⁸Sustratos: C14:0+C15:0+C16:0+C17:0+C18:0+ *Trans*-1 C18:1. T= tratamiento.

La disminución en la concentración total de los AG sintetizados *de novo* (C4:0-C15:1) resultó de similar magnitud entre los aceites puros y sus mezclas. El resultado concuerda con lo informado por Bu *et al.* (2007) y se explica a nivel de célula secretora mamaria por la inhibición de la actividad de enzimas lipogénicas como la ACC (Christie, 1981; Storry, 1981). Antonacci *et al.* (2013) también observaron una reducción (-17,8%) del total de AG sintetizados *de novo* de 22,49 a 18,48 g/100g del total de AG ($p < 0,001$) ante el suministro de 700 g de una mezcla AS70- AL30 a vacas lecheras en pastoreo.

Dicha reducción es frecuentemente observada cuando se suplementa a vacas lecheras con AGPI (Casper *et al.* 1988; Kelly *et al.*, 1998). El efecto inhibitor aumenta con la longitud de la cadena, el grado de insaturación y la presencia de dobles enlaces de configuración *trans* (Chilliard *et al.*, 2001).

En los tratamientos AS50- AL50 y AS25- AL75 la disminución de los AG sintetizados *de novo* no resultó aparentemente compensada por un aumento correlativo en la captación mamaria de los AG preformados ya que el tenor graso de la leche experimentó una caída respecto al lote Control (Tabla 3). La depresión resultó máxima en el tratamiento AS50- AL50 donde también se observó la máxima concentración del *trans*-10 C18:1. La disminución en el tenor graso de la leche estuvo negativamente asociada a la concentración de *trans*-10 C18:1 (Figura 1) en concordancia con lo informado por Piperova *et al.* (2000).

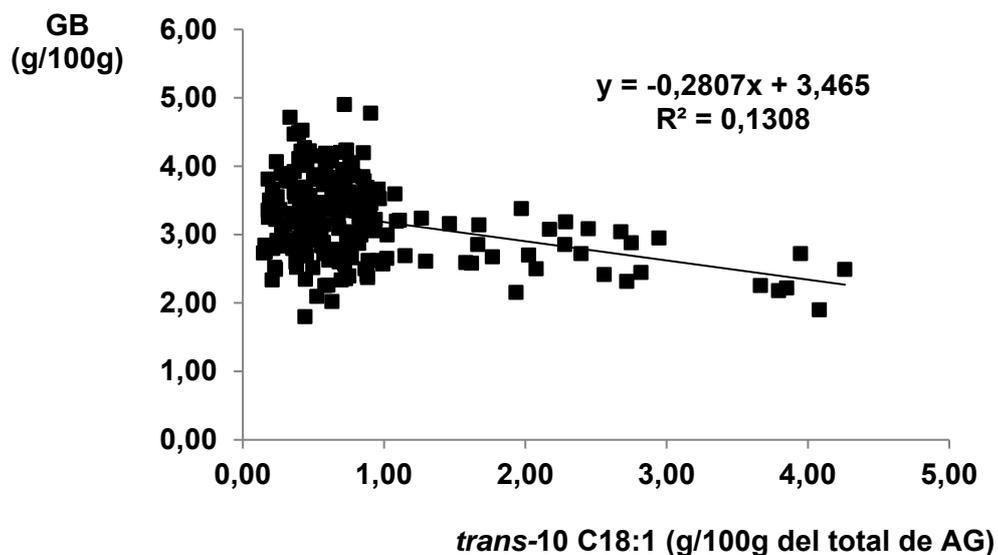


Figura 1. Relación entre la concentración graso de la leche (GB) y la de *trans*-10 C18:1.

Una alta concentración de *trans*-10 C18:1 (o de metabolitos relacionados como el *trans*-10, *cis*-12 C18:2CLA), ha sido asociada a disfunciones en la actividad de las enzimas lipoproteína lipasa (**LPL**) y Estearil CoA desaturasa (**SCD**) que intervienen en la síntesis de grasa causando así una disminución en el tenor graso de la leche (Griinari y Bauman, 2001).

Es importante destacar que dicha reducción se produjo en parte a expensas de la cantidad de AGS hipercolesterolémicos (Tabla 8) lo que mejora el valor saludable de la leche. En efecto, la concentración total de C12:0 a C16:0 disminuyó en todos los tratamientos respecto a Control (-27,4% en promedio) sin diferencias entre las mezclas de aceites (Tabla 8). El resultado es relevante ya que contribuye a disminuir el potencial aterogénico de la GL. En efecto, el índice de aterogenicidad (**IA**) de la leche Control (1,85) resultó mayor (+74%, $p < 0,05$) al promedio registrado en los tratamientos con aceites (1,10) sin diferencias entre las combinaciones AS-AL. En condiciones de alimentación pastoril, el aporte de 700 g/vaca/día de una mezcla AS70- AL30 redujo el IA desde un valor de 1,6 a otro de 1,25 (-25%, Antonacci *et al.*, 2013).

La concentración basal (10,21 g/100g del total de AG) del ácido mirístico (C14:0) fue reducida en un 33% en promedio sin diferencias entre mezclas (Tabla 8) resultado importante ya que el rol pro-aterogénico del C14:0 es considerado como muy potente (Ulbricht y Southgate, 1991). Expresadas en forma porcentual respecto a la concentración observada en la leche Control, las reducciones fueron del orden del 35% para el C12:0 y del 24% para el C16:0 también sin diferencias entre mezclas. El aporte de 700 g/vaca/día de una mezcla AS70- AL30 en vacas lecheras en pastoreo produjo reducciones significativas del C12:0 (2,78 a 2,04 g/100g del total de AG, -27%), C14:0 (9,01 vs 7,64 g/100g del total de AG, -15%) y C16:0 (25,15 vs 21,37 g/100g del total de AG, -15%) en el trabajo de Antonacci *et al.* (2013). Estos resultados contribuyen a evitar un exceso en el consumo de grasa saturada no saludable. En Bu *et al.* (2007) las reducciones respecto al Control de estos tres AG ante el aporte (4% del CMS) de una mezcla AS- AL al 50% o ante el suministro de los aceites puros no resultaron diferentes entre tratamientos.

En el presente ensayo, las reducciones se encontraron dentro del rango estimado a partir del meta-análisis realizado por Glasser *et al.* (2008) para suplementaciones con AS y AL con valores del 42-37% para el C12:0, del 23-24% para el C14:0 y del 30-17% para el C16:0. La suplementación con aceites ricos en AG de cadena larga (>16 átomos de carbono) da lugar a una reducción en el porcentaje de los ácidos grasos de

cadena corta y media induce un aumento en los de cadena larga resultado también observado en el presente trabajo. Los AG de más de 16 átomos de carbono inhiben la síntesis *de novo*, y el consumo de aceites ricos en AGPI da lugar a un mayor flujo de estos AG hacia la glándula mamaria como consecuencia del incremento en su absorción intestinal (Palmquist *et al.*, 1993).

Respecto al Control, la concentración de ácido esteárico (C18:0) aumentó sólo cuando el AL representó el 75% y el 100% de la mezcla sin diferencias en los tratamientos con mayor proporción de AS. El resultado reflejó consistencia con lo informado por Bu *et al.* (2007) y con la posible inhibición de la BH del AV a C18:0 ante altas concentraciones de C18:2n-6 observada en experimentos *in vitro* (Hartoof *et al.*, 1973; Agazzi *et al.*, 2004). Puesto que la actividad estimada del complejo $\Delta 9$ -D no difirió entre mezclas (Tabla 8) y que la enzima convierte de un 37 a un 50% del ácido esteárico en AO en la leche (Bickerstaffe *et al.*, 1974) los mayores niveles de C18:0 podrían explicarse por una mayor BH ruminal.

La comparación del C18:0 entre mezclas resultó inconsistente lo que concuerda con otros autores (Ward *et al.*, 2002; Antonacci *et al.*, 2013) sobre ausencia de diferencias en el contenido de este AG en la leche al suplementar con aceites ricos en C18:2n-6 o C18:3n-3. En su meta-análisis, Glasser *et al.* (2008) concluyen que todos los suplementos con AGPI generan aumentos similares en el contenido de los ácidos esteárico y oleico en la leche.

La concentración del AO (*cis*-9 C18:1) aumentó en todos los tratamientos con aceites pero se diferenció del Control sólo en el tratamiento AL100 (+7%, $p < 0,05$). El aumento del AO luego del aporte de aceites de girasol o soja es un hecho bien documentado (Rego *et al.*, 2005; Cruz Hernández *et al.*, 2007; Glasser *et al.*, 2008) también observado al suplementar con AL (Bu *et al.*, 2007; Glasser *et al.*, 2008; Chilliard *et al.*, 2009; Hurtaud *et al.*, 2010). En Antonacci *et al.* (2013) no se detectaron diferencias en los niveles de AO (25,56- 23,03 g/100g del total de AG ante el suministro de 700g de una mezcla AS70- AL30 a vacas lecheras en pastoreo.

El suministro de aceites ricos en C18:2n-6 y C18:3n-3 a vacas lecheras aumenta ligeramente su concentración en la leche, ya que la alta BH limita su transferencia completa a la glándula mamaria. En nuestro trabajo, el aumento promedio del C18:2n-6 en los tratamientos con aceites resultó importante (62%, $p < 0,05$) comparado al valor registrado en leche Control sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre combinaciones de aceites. El aporte de 700 g/vaca/día de la mezcla AS70-AL30 también incrementó (20,6%) la concentración de C18:2n-6 (3,25 a 3,92, $p < 0,05$) en Antonacci *et al.* (2013).

A diferencia de lo sucedido en el presente trabajo, el meta análisis de Glasser *et al.* (2008) sugiere ausencia de incremento en el *cis*-9, *cis*-12 C18:2n-6 ante el aporte de aceite de lino al 3,2% del CMS (613 ± 299 g/día). En nuestro trabajo, la proporción de ALi en los AG de la leche de post suplementación estuvo comprendida entre el 2,74 y el 3,50% (Tabla 8) valores cercanos al rango (2-3%) informado por Chilliard *et al.* (2007).

El aumento promedio del C18:3n-3 respecto al Control fue del orden de 87% con un aumento gradual ante la participación creciente de AL en la mezcla. El aporte de AL a 4% del CMS incrementó (170%) la concentración de C18:3n-3 en leche respecto al Control sin efectos del AS o la mezcla (AS50- AL50) de ambos (Bu *et al.*, 2007). El aporte de 700 g/vaca/día de la mezcla AS70-AL30 no alteró la concentración de C18:3n-3 en Antonacci *et al.* (2013). La alta velocidad de pasaje asociada a raciones que incluyen pasturas de alta calidad como las utilizadas en el presente trabajo genera cierta capacidad de escape de los AGPI suplementarios lo que aumenta y explica su transferencia a la leche.

La relación n-6/n-3 en la leche Control (5,94) fue incrementada ($p < 0,05$) ante el aporte de AS puro (8,53). La inclusión de AL a 25% en la mezcla mantuvo dicha relación en valores similares (5,66) al tratamiento Control mientras que aportes superiores de AL (50, 75 y 100%) provocaron una reducción significativa de este parámetro de interés saludable (4,86; 3,47; 2,76, respectivamente). El aporte de 700 g/vaca/día de una mezcla AS70- AL30 en vacas lecheras en pastoreo incrementó ($p < 0,05$) la relación n-6/n-3 desde un valor de 3,18 en pre suplementación a 3,87 (Antonacci *et al.*, 2013). En Bu *et al.* (2007) la menor relación n-6/n-3 fue observada ante el suministro de AL a 4% del CMS (2,13) con un resultado intermedio ante la mezcla AS50- AL50 (3,44) y sin diferencias respecto al Control (4,25) cuando se suministró AS puro (4,35).

El aporte de aceites vegetales no protegidos trae aparejado un aumento en la producción de los diversos AG-*t* C18:1 en el rumen los que resultan posteriormente transferidos a la leche. La concentración (g/100g del total de AG) del ácido eláidico (**AE**) *trans*-9 C18:1 (0,23) y del *trans*-10 C18:1 (0,46) en Control fue incrementada por los aceites (Tabla 8) alcanzando un valor máximo de 0,53 (*trans*-9) y de 1,80 (*trans*-10) en los tratamientos AS100 y AS50- AL50 (Tabla 8) sin diferencias ($p > 0,05$) entre mezclas de aceites para el caso del AE o sin un patrón definido de respuesta en el caso del *trans*-10 C18:1. En Antonacci *et al.* (2013) las concentraciones (g/100g del total de AG) basales en leche del *trans*-10 C18:1 (0,56) y del *trans*-9 C18:1 (0,32) se

mantuvieron bajas (0,99 y 0,58, respectivamente) luego del consumo (700 g/vaca/día) de una mezcla AS70- AL30 en vacas lecheras en pastoreo.

Estas concentraciones pueden considerarse bajas y sin efectos negativos para la salud humana. En efecto, una concentración de *trans*-10 C18:1 del orden de 2,28 g/100g del total de AG en una manteca suministrada al 12% de la dieta de conejos experimentales sometidos a un desafío colesterolémico no presentó efectos deletéreos sobre el perfil lipídico plasmático o el metabolismo de las lipoproteínas cuando dicho nivel de *trans*-10 C18:1 estuvo acompañado por al menos 7% de AV y 3% del *cis*-9, *trans*-11 C18:2 CLA (Roy *et al.*, 2007). En los tratamientos con aceites, los valores del AV y del CLA en la leche promediaron 8,20 y 2,94 g/100g del total de AG, respectivamente mientras que los valores del *trans*-10 C18:1 oscilaron entre 0,91 y 1,80 g/100 g del total de AG (Tabla 8). Se ha postulado que el C18:3n-3 contenido en el AL presentaría una menor tendencia a incrementar el *trans*-10 C18:1 en la leche (Gómez-Cortes *et al.*, 2008) efecto no confirmado en el presente experimento (Tabla 8).

En la leche Control, el AV representó el 80,41% del total de los AG-*t* C18:1 valor que permaneció alto (77 a 82%) en los tratamientos con aceites (Tabla8). Por su parte, las proporciones de AEy *trans*-10 C18:1 fueron de 5,30 y de 10,60% del total de AG-*t* C18:1 en la leche Control, valores que permanecieron bajos en los tratamientos con aceites (11,5 y 28,9%, respectivamente). Estos resultados sugieren ausencia de desvíos significativos hacia la formación de los AG-*t* no deseables en detrimento de la producción de AV a nivel ruminal.

El AV presente en los lácteos puede ejercer propiedades benéficas a través de un efecto anticarcinogénico directo (Awad *et al.*, 1995) o mediado por su conversión endógena a *cis*-9 *trans*-11 CLA a una tasa estimada en un 20% (Turpeinen *et al.*, 2002) por acción de la Δ 9-D en el ser humano (Parodi, 2003). La metabolización del AV a CLA ha demostrado ser una efectiva prevención del cáncer químicamente inducido en ratas (Banni *et al.*, 2001) e incrementa la biodisponibilidad del compuesto en los tejidos (Siurana y Calsamiglia, 2016).

En las vacas del presente ensayo, la conversión promedio del AV en AR pareció situarse en un 32,84% (Figura 2) valor cercano al 33% informado por Griinari y Bauman (1999). Tomando como estimador la relación producto/precursor (AR/AV), la conversión promedio resultó ser algo mayor (37,3%; Tabla8) pero comparable a los valores de 39-35% obtenidos en Antonacci *et al.* (2013) ante el suministro de 700 g/vaca/día) de la mezcla AS70-AL30 a vacas lecheras en pastoreo.

Teniendo en cuenta las distintas fuentes de variación que influyen sobre la actividad microbiana de la BH ruminal (consumo de C18:2n-6 y C18:3n-3, interacciones con la ración de base, relaciones F:C), se ha propuesto una relación AR/AV promedio del orden de 0,41 (Chilliard *et al.*, 2007) valor cercano al de 0,44 observado en el tratamiento Control (Tabla 8). Dicha relación disminuyó ($p < 0,05$) luego del aporte suplementario de aceites (Tabla 8) lo que sugiere que el aumento del precursor (AV) para la síntesis del CLA (*cis*-9, *trans*-11 C18:2) no se tradujo en incrementos proporcionales de la actividad Δ^9 -D mamaria.

De acuerdo a lo esperado, la concentración del AR en la leche correlacionó positivamente (r^2 : 0,80, $p < 0,05$) con su precursor el AV (Figura 2) resultado frecuentemente informado (Chilliard *et al.*, 2000; Chilliard y Ferlay, 2004; Bu *et al.*, 2007). El aporte de aceites incrementó significativamente la concentración del AV en comparación al valor registrado en el tratamiento Control (3,49 g/100g del total de AG) observándose los valores más altos con la mezcla AS50- AL50 (9,20 g/100g del total de AG, +163%) y en el tratamiento AS100 (8,17 g/100g del total de AG, +134%). El aporte de 700 g/vaca/día de una mezcla AS70- AL30 a vacas lecheras en pastoreo produjo un incremento significativo en la concentración de AV en leche del orden del 186% (de 3,15 a 8,99 g/100g del total de AG) lo que explicó el aumento significativo (+152%) en la concentración del AR de 1,24 a 3,13 g/100g del total de AG (Antonacci *et al.*, 2013).

Las concentraciones del AR y del AV en leche mostraron una elevada variabilidad de respuesta ante el consumo de AS y AL puros o en mezclas sin un patrón de respuesta bien definido (Tabla 8 y Figura 2). El tratamiento 50- 50 presentó el valor numérico más alto de AR (3,24 g/100g del total de AG) pero también de *trans*-10 C18:1 sin diferencias significativas al compararlo con las concentraciones obtenidas cuando los aceites se suministraron de forma separada (Tabla 8).

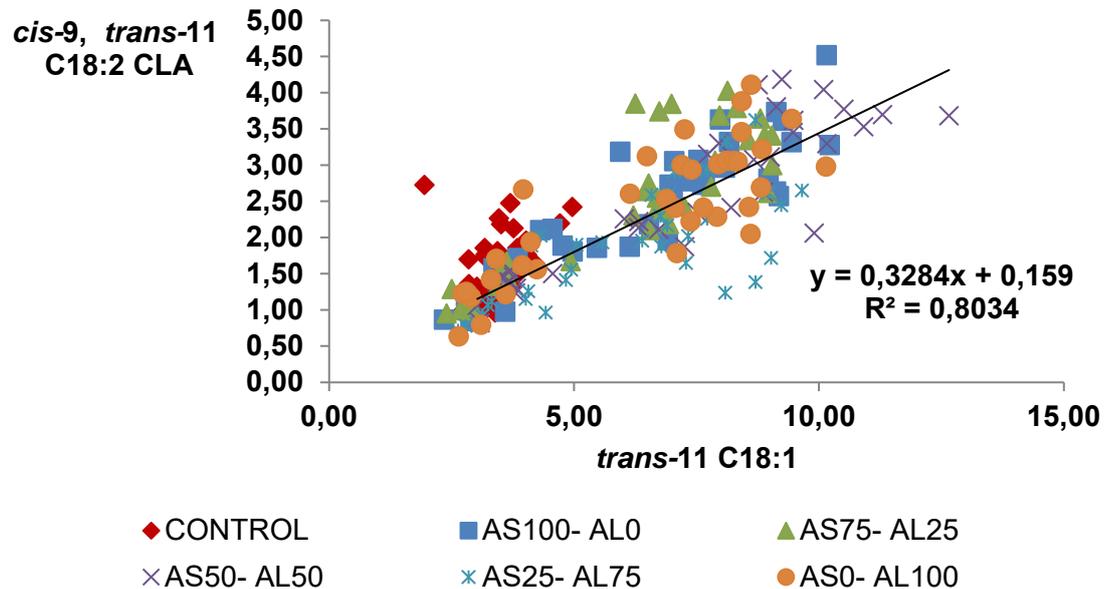


Figura 2. Relación entre la concentración de *trans*-11 C18:1 y *cis*-9 *trans*-11 C18:2 CLA en leche.

Tanto los resultados obtenidos *in vivo* (Chilliard *et al.*, 2000; Lock y Garnsworthy, 2002; Bu *et al.*, 2007) como *in vitro* (Hartoof *et al.*, 1973; Agazzi *et al.*, 2004) sugieren que los aceites ricos en C18:2n-6 (girasol-soja) resultarían más efectivos para incrementar el AV respecto a los aceites ricos en C18:3n-3 por una más eficiente BH del C18:2n-6.

La concentración basal (1,56 g/100g del total de AG) del AR fue incrementada ($p < 0,05$) en todos los tratamientos con aceites sin diferencias entre mezclas (Tabla8) salvo para la combinación AS25- AL75 dónde se registró el valor más bajo (2,33 g/100g del total de AG). Los niveles de AR alcanzados con los aceites puros (2,96 a 3,03 g/100g del total de AG) resultaron superiores a los obtenidos por Bu *et al.* (2007) (1,60-2,39 g/100g del total de AG) a similar dosis utilizada (4% del CMS) en raciones con alto contenido de forraje (59%). Dichos autores obtienen mayores incrementos tanto para el AV como para el AR utilizando aceite de soja respecto al aceite de lino con respuestas aditivas ante la mezcla (AS50- AL50) de ambos pero siempre inferiores a los aportes en su forma pura lo que sugiere ausencia de efectos sinérgicos. Una mayor y más completa BH ruminal de los AGPI en los animales que consumieron el AL explicaría la respuesta obtenida (Bu *et al.*, 2007).

En el presente ensayo, los niveles de AR observados en post suplementación (2,33 a 3,24 g/100g del total de AG) resultaron superiores a los valores promedio informados

en el meta análisis de Glasser *et al.* (2008) ante el suministro de AS (1,02 \pm 0,36 g/100g del total de AG) o AL (1,75 \pm 0,84 g/100g del total de AG) a vacas lecheras y también a los obtenidos por Rego *et al.* (2005) ante el suministro de 500 g/día de aceite de girasol o AS (2,02 g AR/ 100 g del total de AG) a vacas lecheras en pastoreo. También fueron superiores a los observados por Schroeder y Gagliostro (2007) ante el aporte de 900 g/vaca/día de sales cálcicas de ácidos grasos insaturados **(AGI)** conteniendo un 30% de C18:2n-6 pero cercanos a los reportados por Antonacci *et al.* (2013) ante el suministro de 700 g/vaca/día de una mezcla AS70- AL30 a vacas lecheras en alimentación pastoril (3,13 g/100g del total de AG para el AR).

El total de AGI en los tratamientos con aceites se incrementó (+25%) significativamente ($p < 0,05$) comparado con el Control sin diferencias ($p > 0,05$) entre los tratamientos con mezclas. La relación basal entre los AGS y AGI (1,58) fue significativamente ($p < 0,05$) reducida ante el suministro de aceites (-52% en promedio) sin diferencias entre mezclas.

CONCLUSIONES

En un sistema base pastoril y bajo similares condiciones de alimentación no se observó un patrón definido de respuesta ante el suministro de aceites ricos en ácido linoleico (AS) o linolénico (AL) suministrados al 4% del CMS en su forma pura o en mezclas sobre el conjunto de parámetros que mejoran el valor saludable de la grasa láctea. Tomados en conjunto, los resultados sugieren cierta ventaja de la mezcla AS75- AL25 en función a los costos relativos de ambos aceites, sus efectos positivos sobre las variables productivas (producción de leche, grasa y proteína láctea, consumo de MS) y sobre la mejora en el valor saludable de la grasa láctea definida por la disminución de los AG hipercolesterolémicos, los incrementos en AV y AR y el mantenimiento de bajas concentraciones de los AG no saludables (*trans*-9 y *trans*-10 C18:1) con una adecuada relación n-6/n-3 en la leche cercana a 5. Los resultados confirman la existencia de una amplia plasticidad de composición en AG de la grasa butirosa de la vaca lechera ante el aporte de AGPI lo que constituye una herramienta muy efectiva a fines de mejorar el valor saludable de la leche con un beneficio potencial para la salud de los consumidores. Como se ha postulado en (Dalmeijer *et al.*, 2013) el relativamente alto contenido de grasa saturada en la leche y los productos lácteos podría incrementar el riesgo de enfermedades cardiovasculares y la mortalidad, la implicancia práctica de los resultados obtenidos reside en la capacidad

de reducir el tenor de los compuestos no saludables (grasa saturada) a través de una biointervención como la alimentación de los animales productores.

CAPITULO II

EFFECTO DEL CONSUMO DE NIVELES CRECIENTES DE UNA MEZCLA DE ACEITES DE SOJA Y LINO SOBRE LA RESPUESTA PRODUCTIVA Y EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE DE VACAS EN PASTOREO (VER PUBLICACIÓN 2. PÁGINA 215)

Este trabajo forma parte de las actividades previstas en la Etapa I y satisface al objetivo específico 3.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue conocer el efecto del consumo creciente de una mezcla (75-25) de aceites de soja(**AS**) y de lino(**AL**) sobre la respuesta productiva y el perfil de ácidos grasos(**AG**) de la leche. Veinticuatro vacas multíparas de raza Holando Argentino fueron asignadas a 4 tratamientos en un diseño completamente aleatorizado (**DCA**) con tres semanas de acostumbramiento y una de mediciones experimentales. Base materia seca (**MS**), la ración estuvo compuesta pastura (63%) y concentrado energético (37%). La mezcla AS- AL fue suministrada en cuatro tratamientos al cero, (**Control**), 2% (**T2%**, 0,36 kg/vaca/día), 4% (**T4%**, 0,72 kg/vaca/día) y 6% (**T6%**, 1,08 kg/vaca/día) del consumo de materia seca total (**CMST**). La mezcla de aceites fue manualmente homogeneizada con el concentrado y suministrada por mitades durante cada turno de ordeño sin registrarse rechazos. Los consumos de MS(**CMS**) de pastura y total promediaron 11,27 y 18,85 kg/vaca/día respectivamente sin diferencias entre tratamientos. La producción de leche (22,71 kg/vaca/día) resultó similar ($p>0,05$) entre tratamientos. La concentración grasa de la leche disminuyó en forma lineal ($p<0,01$) ante la inclusión creciente de mezcla de aceites mientras que la concentración y producción de proteína láctea no fueron afectadas ($p>0,05$). La concentración (g/100g del total de AG) de los AG hipercolesterolémicos (C12:0, C14:0 y C16:0) en la leche Control fue de 38,93 disminuyendo linealmente ante el consumo de aceite (T2%: 37,81; T4%: 31,59 y T6%: 29,18). La concentración del ácido vaccénico (*trans*-11 C18:1,**AV**) fue de 3,63 g/100g del total de AG en T0, aumentando linealmente en todos

los tratamientos (T2: 4,97; T4: 7,05 y T6: 8,38 g/100g del total de AG). La concentración del ácido ruménico (*cis*-9, *trans*-11 C18:2, **AR**) en leche Control (2,28 g/100g del total de AG) aumentó linealmente resultando máxima en T4% (3,88) sin un incremento adicional en T6% (3,89). El índice de aterogenicidad (**IA**) de la leche Control (1,87) disminuyó ($p < 0,01$) linealmente (T2%=1,64; T4%=1,18 y T6%=0,95). La relación n-6/n-3 en leche Control (3,57) no difirió ($p > 0,05$) de T2% (3,37) aumentando ($p < 0,05$) en T4% (4,41) y T6% (4,63) pero permaneciendo por debajo de los valores recomendados (5:1). Los valores máximos de los AG *trans*-10 y *trans*-9 C18:1 fueron de 2,23 y 0,73 g/100g del total de AG, respectivamente. En vacas lecheras en pastoreo, el nivel óptimo de inclusión de la mezcla de AS y AL pareció situarse en el 4% del CMST a fines de maximizar la presencia del CLA, reducir la concentración de los AG hipercolesterolémicos y mantener bajos los niveles de los AG no saludables (*trans*-9 y *trans*-10 C18:1) con una relación n-6/n-3 cercana a 5.

ABSTRACT

The objective was to determine the effect of increasing intake of a mixture (75- 25) of soybean (**SO**) and flax (**LO**) oils on the productive response and milk fatty acid (**FA**) profile in grazing dairy cows. Twenty-four Holando Argentino cows were assigned to 4 treatments in a completely randomized design with three weeks of adaptation and one of experimental measurements. On a dry matter (**DM**) basis cows consumed pasture (63%) and energy concentrate (37%). The SO-LO mixture was consumed at zero (**Control**), 2% (**T2%**, 0,36 kg/cow/day), 4% (**T4%**, 0,72 kg/cow/day) and 6% (**T6%**, 1.08 kg/cow/day) of total estimated DM intake. Oil mixture was manually homogenized with the concentrate and supplied by halves during each milking time without refusals. Pasture and total DM intake averaged 11.27 and 18.85 kg/cow respectively without differences between treatments. Milk production averaged 22.71 kg/cow/day) resulting similar ($p > 0.05$) between treatments. Milk fat content decreased linearly ($p < 0.01$) as oil mixture intake increased while milk protein concentration or yield were not affected ($p > 0.05$). The concentration (g/100g FA) of the hypercholesterolemic FAs (C12:0, C14:0 and C16:0) in Control milk averaged 38.93 decreasing linearly with oil consumption (T2%=37.81; T4%=31.59 and T6%=29.18). Concentration of vaccenic acid (*trans*-11 C18:1, **VA**) in milk was 3.63 g/100g FA in Control, increasing linearly after mix-oil intake in T2% (4.97), T4% (7.05) and T6% (8.38 g/100g FA). Concentration of rumenic acid (*cis*-9, *trans*-11 C18: 2, **RA**) in Control milk (2.28 g/100g

FA) increased linearly resulting maximal in T4% (3.88) without any additional increase in T6% (3.89). The atherogenic index (**AI**) of Control milk (1.87) decreased ($p<0.01$) linearly (T2%=1.64, T4%=1.18 and T6%=0.95). The n-6/n-3 ratio in Control milk (3.57) did not differ ($p>0.05$) from T2% (3.37) but resulted higher ($p<0.05$) in T4% (4.41) and T6% (4.63). It remained below the recommended value of 5:1. The maximum values of the *trans*-10 and *trans*-9 C18:1 was 2.23 and 0.73 g/100g FA respectively. In grazing dairy cows, the optimum inclusion level of soybean and flaxseed oils appeared to be near to 4% of total DM intake in order to maximize the presence of CLA, reduce the concentration of hypercholesterolemic FA and maintain low levels of unhealthy FA (*trans*-9 and *trans*-10 C18: 1) maintaining a n-6/n-3 ratio close to 5.

INTRODUCCIÓN

La composición en AG de la leche es un factor determinante de sus propiedades saludables debido a los potenciales efectos que ciertos AG específicos tienen sobre la salud humana. La grasa láctea (**GL**) puede representar hasta un 75% del consumo total de grasa proveniente de rumiantes y los productos lácteos aportan alrededor del 25 a 35% del total de grasa saturada consumida diariamente. Algunos ácidos grasos saturados (**AGS**) presentes en la leche como el laurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0) resultan potencialmente aterogénicos cuando son consumidos en exceso (Ulbricht y Southgate, 1991; Tholstrup *et al.*, 2004) y se los asocia al incremento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares (**ECV**) (Chilliard *et al.*, 2000; Parodi, 1999). Los trabajos disponibles (Gagliostro, 2004b) y los resultados obtenidos en Antonacci *et al.* (2017) demuestran que el aporte suplementario de aceites poliinsaturados constituye una herramienta efectiva y natural para inhibir la síntesis mamaria de *novode* los AGS reduciendo también la presencia de los AG pro-aterogénicos en la leche. Un interés especial ha sido puesto en la presencia del AR (*cis*-9, *trans*-11 C18:2 CLA) por su potencial rol saludable sobre los niveles y la composición de los lípidos circulantes, la salud cardiovascular (Kritchevsky *et al.*, 2000; Valeille *et al.*, 2005), la reducción en la incidencia de algunos tipos de cáncer (Parodi, 1999; Gagliostro, 2004a; Stachowska, 2008; Shiraishi *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2016) y respuesta inmune (Kelly, 2001; Bhattacharya *et al.*, 2006). Por su parte, el AV (*trans*-11 C18:1) es el principal ácido graso trans (**AG-t**) presente en la leche, resulta el precursor del AR más importante y presenta además propiedades antiproliferativas. El

AV es convertido en AR en los tejidos humanos a una tasa promedio del 20% (Stanton *et al.*, 2003).

La GL es la más importante fuente natural del AR y su concentración en leche es altamente dependiente de la alimentación y de la suplementación lipídica de los animales (Chilliard *et al.*, 2000; Gagliostro, 2004b; Antonacci *et al.*, 2017; Gagliostro *et al.*, 2017). La alimentación base pastoril permite obtener leches con altos niveles basales de AR los que pueden amplificarse a través del aporte suplementario de aceites vegetales poliinsaturados (Chilliard *et al.*, 2000; Schroeder *et al.*, 2004, Gagliostro, 2004b; Antonacci *et al.*, 2017) o una mezcla de aceites de AS y AL como la utilizada en Antonacci *et al.* (2017).

Determinar la dosis óptima de aceite a suplementar para obtener un perfil más saludable en los AG de la leche es un aspecto importante que merece ser explorado experimentalmente. Las razones que justifican ajustar dicha dosis reconocen aspectos económicos asociados al alto costo de los aceites, metabólicos a fines de evitar desvíos importantes y no deseables hacia los AG-*t* no saludables de la leche por sobredosis de aceites y finalmente razones digestivas por los posibles efectos deletéreos de los aceites libres sobre la función ruminal y la digestión. Pese a la enorme importancia práctica de conocer cuál es la cantidad más adecuada de aceites a suministrar, los resultados experimentales son por el momento y en nuestro conocimiento muy escasos o directamente inexistentes. Se ha postulado un efecto lineal del consumo de aceite sobre la concentración de AR en leche hasta un máximo de inclusión al 4% del CMST no lipídica (Chilliard *et al.*, 2000) aspecto que merece ser explorado experimentalmente.

HIPÓTESIS

La concentración en la leche de los AG potencialmente aterogénicos (C12:0, C14:0 y C16:0) disminuye mientras que la de los AG benéficos (AV y CLA) se incrementa en forma lineal manteniendo bajas concentraciones de AG-*t* no saludables (*trans*-9 y *trans*-10 C18:1) y una adecuada relación n-6/n-3 ante dosis crecientes de una mezcla de AS- AL (75- 25) hasta alcanzar un nivel de consumo de mezcla en el que ulteriores aumentos no producirán incrementos o reducciones proporcionales.

OBJETIVOS

Determinar si existe una respuesta lineal, y en qué punto deja de serlo, al suministro creciente de la mezcla AS-AL (75- 25) sobre parámetros que mejoran el valor saludable de la leche de vacas en alimentación base pastoril.

Determinar la dosis adecuada de mezcla de aceites que permita obtener una leche con un nivel alto de CLA y reducida en AG no saludables al menor costo asociado al aporte suplementario de la mezcla de AS y AL.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.-Lugar experimental y fecha

El trabajo se llevó a cabo en el Tambo Experimental de la Unidad Integrada Balcarce ubicado en la Provincia de Buenos Aires (37° 45' LS, 58° 18' LO) a 130 metros sobre el nivel del mar durante los meses de septiembre y octubre de 2014. El período experimental fue de 4 semanas con las tres primeras consideradas de acostumbramiento a los aceites y la cuarta para toma de datos experimentales.

2.2.- Animales, tratamientos y diseño experimental

Se utilizaron 24 vacas multíparas de raza Holando Argentino en lactancia avanzada 244 (\pm 69) días posparto, con una producción inicial promedio de 20,5 (\pm 1,8) kg de leche por día y un peso vivo (**PV**) promedio de 552 (\pm 50) kg. El manejo, cuidado y utilización de los animales experimentales fue aprobado por dictamen 002/2014 del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE, INTA, Centro Regional Buenos Aires Sur). Los animales fueron asignados al azar en un DCA a cuatro tratamientos con 6 vacas por tratamiento definidos por el aporte de una mezcla de AS- AL al 75- 25 (porcentajes en peso) suministrada al 0% (Control sin aceites), 2% (T2%), 4% (T4%) y 6% (T6%) del CMST (18 KgMS/vaca/día) medido durante la semana previa al inicio del ensayo. Durante la semana precedente al comienzo de la adaptación, todos los animales consumieron una pastura consociada y un concentrado energético para registrar la producción y composición individual de leche, el PV y el CMST quedando definidas las cantidades diarias (kg/vaca/día) de

mezcla de aceites a suministrar en cada tratamiento. La pastura estuvo compuesta por cebadilla criolla (*Bromus unioloides*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*) y se utilizó una oferta forrajera de 27 kgMS/vaca/día bajo un sistema de pastoreo rotativo en franjas diarias. La biomasa disponible fue estimada semanalmente para ajustar el tamaño de la franja diaria de pastoreo (y asegurar la oferta) utilizando el método de doble muestreo (Fernández, 1999) a través de la relación establecida entre la altura del forraje (x) y la biomasa disponible (y). Las ecuaciones fueron ajustadas semanalmente tanto para la disponibilidad inicial como para el forraje remanente luego del pastoreo.

El concentrado energético fue ofrecido a razón de 8 kg/vaca/día por mitades durante cada turno de ordeño. La mezcla de aceites (mitades en cada ordeño) fue manualmente incorporada con el concentrado no registrándose rechazo en ninguna de las dosis utilizadas. El concentrado estuvo compuesto por grano de maíz (35%), brote de malta (10%), pellet de girasol (20%), sojilla (10%), afrechillo de trigo (21,28%), conchilla (2%), óxido de magnesio (0,4%), sal (1,2%), rumensin (0,02%), y núcleo vitamínico (0,1%). El núcleo vitamínico incluyó vitaminas A, D3, E (4.500.000, 900.000 y 10.000 Unidades internacionales (**UI**), respectivamente) y minerales de Mn, Fe, Cu, Zn, Co, Se y I (40.000, 30.000, 10.000, 50.000, 400, 300 y 600 ppm, respectivamente). Las cantidades efectivas de mezcla de aceites consumidas (kg/vaca/día) fueron de 0,36 (T2%), 0,72 (T4%) y 1,08 (T6%). El acostumbramiento a los aceites fue gradual procediendo por mitades de la dosis diaria durante cada turno de ordeño comenzando con 0,1 (T2%), 0,2 (T4%) y 0,3 (T6%) kg/vaca/día durante el primer día (día 1), 0,2; 0,3 y 0,4 kg durante los 2 días siguientes (días 2-3), 0,2; 0,3 y 0,5 kg/día al día 4 y dosis completa según tratamiento a partir del día 5 hasta la finalización del ensayo. Los animales fueron ordeñados dos veces por día a las horas 6:00 y 16:00. Luego de cada ordeño fueron conducidos a la pastura con disponibilidad de agua limpia a voluntad.

2.3.- Mediciones en los alimentos

Durante todo el ensayo se tomaron muestras semanales representativas del concentrado y de la pastura (0,5 kg). Las muestras de pastura se obtuvieron en el horizonte de pastoreo por encima del residuo en forma manual simulando la selectividad de la vaca (*hand-plucking*) según Meijis *et al.* (1982). Todas las muestras fueron secadas en estufa con circulación forzada de aire a 60°C durante 48 horas para determinar el contenido de MS y molidas en molino tipo Willey (malla 1 mm). Se cuantificaron los tenores de materia orgánica(**MO**) (mufla a 550-600°C durante 4

horas), proteína bruta (**PB**) (Horneck y Miller, 1998 con un analizador LECO FP-528), carbohidratos solubles en agua (**CSA**) (Morris, 1948), fibra detergente neutro (**FDN**) y ácido (**FDA**) (mediante la técnica de bolsas filtrantes, Komarek *et al.*, 1994 y Komarek *et al.*, 1993, respectivamente) con un autoanalizador (ANKOM Corp., Fairport, Nueva York, EE.UU., 1970), extracto etéreo(**EE**) por la técnica de extracción con solventes en alta temperatura (AOCS, 2006) con un autoanalizador (ANKOM Corp., Fairport, Nueva York, EE.UU.), digestibilidad de la MS (**DMS**) a 48 horas de incubación *in vitro* (equipo Daisy II, ANKOM) y almidón (Mc Rae; Armstrong, 1968).

2.4.-Medición de consumo de alimento

El consumo diario de concentrado y aceites fue determinado en forma individual mediante la diferencia entre la cantidad ofrecida y la rechazada a lo largo de todo el experimento sin registrarse rechazos. El consumo individual de pastura se estimó por el método de la diferencia entre el forraje ofrecido y el remanente (Meijs *et al.*, 1982) utilizando parcelas individuales durante 3 días consecutivos en la semana previa al comienzo del experimento y durante los 3 últimos días de la semana 4 de ensayo. El promedio de los tres días consecutivos de estimación en cada animal fue utilizado para realizar el análisis estadístico (seis repeticiones de consumo de pastura por tratamiento).

2.5.-Medición de la producción y composición química de la leche

La producción de leche fue registrada en forma individual y diaria durante todo el ensayo. La composición química fue determinada a partir de muestras (50 ml) de dos ordeños diarios, dos veces a la semana en días no consecutivos. Con la leche de dos muestreos consecutivos (ordeño de la tarde de un día y mañana del día siguiente) se obtuvo una muestra individual compuesta ponderada por el volumen producido en cada ordeño para la determinación de grasa butirosa(**GB**), proteína, lactosa, sólidos totales(**ST**) y sólidos no grasos(**SNG**) por espectrofotometría infraroja (longitud de onda media) utilizando un autoanalizador Milko Scan-Minor (Foss Electric, Hillerod, Denmark). La concentración de nitrógeno ureico en leche (**NUL**) fue determinada manualmente utilizando Kits enzimáticos (Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina) previa refrigeración y centrifugación de la muestra a 3000 rpm, durante 15 minutos

(centrífuga IEC Modelo Centra MP4) y posterior lectura con un espectrofotómetro (Spectrum modelo SP1102).

2.6.- Medición de peso vivo y concentración de metabolitos plasmáticos

Las vacas fueron pesadas dos días consecutivos luego del ordeño de la mañana a los días 6, 7, 27 y 28 de ensayo. La variación diaria del peso de cada vaca se calculó como la diferencia entre el peso promedio final (dos días) menos el inicial (dos días) dividido por el número de días transcurridos. Durante las dos últimas semanas de ensayo, se tomaron muestras de sangre por punción de vena yugular luego del ordeño de la mañana. La sangre fue colectada en tubos conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (**EDTA**, 7-8 gotas) (0.342 mol/L, pH 7.2, Laboratorio Wiener, Rosario, Argentina) y centrifugada (2000 × g por 15 min a 4°C). El plasma obtenido fue conservado (-24°C) hasta los análisis de glucosa, NUP, triglicéridos, y colesterol utilizando kits enzimáticos (Laboratorio Wiener, Rosario Argentina). Para la determinación de los AG no esterificados (**NEFA**) se utilizó un kit enzimático (Randox Laboratories Ltd., UK).

2.7.-Cuantificación del perfil en ácidos grasos de la leche y de los alimentos

A los 21 días de suplementación con aceites se congelaron (-24°C) alícuotas de 50 ml de leche de cada vaca provenientes de cada muestra compuesta colectada para la determinación de la composición química. Se analizó una única muestra compuesta (pool) por animal. La grasa total se determinó gravimétricamente por extracción con éter de petróleo a 65-80 °C (Official Methods 960.39) (AOAC, 1999). Puesto que los ácidos grasos insaturados (**AGI**) se isomerizan al utilizar altas temperaturas todo el procedimiento analítico fue realizado a baja temperatura. Los lípidos fueron extraídos con una mezcla de hexano:isopropanol (3:2) y sulfato de sodio 6% a temperatura ambiente (Wolff, 1995). El residuo lipídico se secó a 40 °C bajo una corriente de nitrógeno. Para la preparación de ésteres metílicos de ácidos grasos (**EMAG**), se utilizó un método frío con hexano y KOH 2N en metanol (Bannon *et al.*, 1982). Los EMAG se cuantificaron usando un cromatógrafo de gases (GLC- Shimatzu GC-2014, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) equipado con una columna capilar CP-Sil 88, 100 mx 0,25 mm id (Varian, Lake Forrest, CA, EE.UU.) y detector de ionización de llama. Se utilizó

la técnica desarrollada por Masson *et al.* (2015) manteniendo las temperaturas del inyector y del detector a 250 °C, la tasa de flujo a 1:100 y 1 µl de muestra estándar o de muestra utilizando un dispositivo de muestreo automático en cada corrida del GLC. El flujo de hidrógeno fue de 1 ml/min y el flujo de nitrógeno como gas de compresión fue de 25 ml/min. Se identificaron los tiempos de retención máximos y los porcentajes de área del total de AG inyectando patrones conocidos. Los estándares internos [(Tritridecanoína [13: 0-triacilgliceridos (**TAG**)], estándares externos de referencia GLC-463 (mezclas de 52 EMAG (pureza > 99%) y *trans*-mix GLC 481 (pureza > 99%) fueron adquiridos de Nu-Chek (Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN, USA). Ésteres de metilo del ácido linoleico, mezcla *cis/trans* (Catálogo n ° 47791); las mezclas de EMAG de largo de cadena C4-C24 insaturados (Catálogo N ° 18919) y de los EMAG individuales de largo de cadena de C4:0 a C24:1 saturados e insaturados se obtuvieron de Supelco (Bellefonte, PA, USA). Las mezclas de isómeros de AG posicional y geométrico fueron proporcionadas por la Red CYTED Internacional (208RT0343). Los EMAG fueron identificados comparando sus tiempos de retención con los estándares comerciales. Los valores se expresaron como un porcentaje de los EMAG totales. El límite inferior de cuantificación para los EMAG identificados varió de 0,01% a 0,03%. Para convertir g EMAG/100g EMAG a equivalentes de TAG (g de AG como TAG/100g de TAG totales) se emplearon los Factores de Conversión respectivos tabulados en el Método AOCS Ce 1j-07 (2007) (Masson *et al.*, 2015). Para estimar los g de AG/100 g de muestra, los g de AG/100 g de TAG se multiplicaron por el contenido total de grasa (%). Los resultados se expresan en g/100g del total de AG.

2.8.- Determinaciones complementarias sobre los aceites

Para caracterizar la calidad de los aceites de soja y de lino, se evaluó la estabilidad oxidativa mediante las determinaciones de índice de peróxidos y espectrofotometría UV (a 232 y 270 nm) y la estabilidad hidrolítica mediante el índice de acidez por análisis espectrales de absorción (AOAC). Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Laboratorio de Cromatografía del Dr. Claudio Bernal, cátedra de Bromatología y Nutrición. Universidad Nacional del Litoral (**UNL**).

2.9.- Análisis estadístico

El efecto del consumo de niveles crecientes de la mezcla de aceites sobre la producción y composición química de la leche, perfil en AG de la leche y PV se evaluó mediante contrastes ortogonales para ajustar los efectos lineales, cuadráticos y cúbicos con el paquete estadístico PROC MIXED de SAS/STAT® (2002-2010).

Los resultados de consumo y metabolitos plasmáticos se analizaron utilizando el programa PROC GLM de SAS/STAT® (2002-2010) según un modelo a un criterio de clasificación:

$$Y_{ij} = \mu + C_i + E_{ij}$$

donde Y_{ij} es la variable respuesta; μ es la media poblacional; C_i es el efecto de tratamiento y E_{ij} es el error residual.

El umbral de significancia estadística fue establecido en $p < 0,05$ y el umbral de tendencia fue $p < 0,10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.1.- Oferta forrajera y calidad de los alimentos

La disponibilidad forrajera de las franjas previo al pastoreo (2100 ± 308 KgMS/ha) estuvo por encima del valor crítico de 2000 kg de MS/ha por debajo del cual el CMS podría estar restringido (Minson, 1990). El sistema de pastoreo en franjas diarias permitió mantener una oferta diaria de $27(\pm 2)$ kgMS/vaca/día considerada como adecuada para obtener un alto nivel de consumo de forraje (Minson, 1990). El consumo de pastura sería máximo cuando el forraje es ofrecido a razón de 45 g MO de pastura/kg de PV (Minson, 1990). El PV promedio de las vacas (554 kg, Tabla 6) y el contenido promedio de MO de las pasturas (92 g/100gMS, Tabla 1) permiten estimar que la asignación de pastura no limitante sería de 23 Kg MS/vaca/día valor inferior al utilizado (27 kgMS/vaca/día). Se ha postulado también que el máximo CMS se alcanzaría cuando la oferta de pastura oscila entre 45 a 55gMS/kg de PV por día (Leaver, 1985). Para un peso promedio de 554 kg (Tabla 6) el rango de asignación sería de 25 a 30 kgMS y por lo tanto la asignación utilizada (27 kgMS/vaca/día) se encontró dentro del mismo. Puede concluirse que en el presente trabajo, la oferta forrajera no resultó limitante para la expresión del potencial de CMS de los animales.

Además de la asignación, el consumo de pastura puede resultar también afectado si el contenido de MS resulta inferior al 18% existiendo una relación lineal entre el contenido de MS de la pastura y el consumo en un rango de 13 a 22% de MS. La depresión promedio estimada del consumo sería de 0,34 kgMS por cada unidad porcentual de disminución en el tenor de MS del pasto (Verité y Journet, 1970). En el presente trabajo, el contenido de MS de la pastura (20,5%; Tabla 1) estuvo por encima del rango crítico informado por (Verité y Journet, 1970). Asimismo, los contenidos de PB (24,1%) y de FDN (36,4%) de las pasturas (Tabla 1) se encontraron dentro de los rangos (15-25% para PB y 36-54% para FDN) propuestos por Minson (1990) a fines de obtener una alta DMS del forraje en concordancia con los altos valores *in vitro* obtenidos (70,93%) para dicho parámetro (Tabla 1).

Tabla 1. Composición química y digestibilidad *in vitro* de la pastura y del concentrado⁽¹⁾

Variable	Pastura ²	Concentrado
Materia Seca, %	20,50 ± 0,70	89,6 ± 0,65
Materia Orgánica, % de la MS	91,66 ± 0,55	92,80 ± 0,46
Proteína Cruda, % de la MS	24,10 ± 1,56	17,32 ± 1,02
Fibra Detergente Neutro, % de la MS	36,40 ± 1,00	23,97 ± 2,00
Fibra Detergente Ácida, % de la MS	18,23 ± 1,11	11,51 ± 1,41
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la MS, %	70,93 ± 0,40	75,14 ± 1,88
Almidón, % de la MS	1,57 ± 0,40	32,59 ± 4,05
Extracto Etéreo, % de la MS	3,23 ± 0,31	4,47 ± 0,77
EM, Mcal/kg MS)	2,89 ± 0,01	2,71 ± 0,07
CSA, % de la MS	12,00 ± 3,40	20,80 ± 1,51

⁽¹⁾Valores expresados a través del promedio ± el desvío estándar (n=4 muestras analizadas).²Pastura consociada de Cebadilla (*Bromus unioloides*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*). CSA=Carbohidratos solubles en agua. EM= energía metabolizable. MS=materia seca

Los valores de CSA y de EE resultaron normales para pasturas de calidad. Puede concluirse que tanto la calidad como la cantidad de pastura ofrecida resultaron suficientes para alcanzar un adecuado CMS y de energía. La composición química del concentrado resultó compatible con la de los alimentos utilizados para su formulación y normales para un concentrado energético de calidad. La composición en AG de los alimentos utilizados se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Perfil en ácidos grasos de la pastura, el alimento concentrado y de los aceites puros de soja y de lino.

Ácidos grasos	Pastura ¹	AS ²	AL ³	Concentrado
	g/100g del total de AG			
C16:0	14,08	10,67	6,71	13,91
C18:0	1,31	4,31	5,38	1,92
C18:1 <i>cis</i> -9	1,53	17,43	18,28	26,89
C18:1 <i>cis</i> -11	0,18	2,83	3,16	4,13
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	14,58	52,87	16,35	49,75
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	62,76	11,36	49,87	2,29

¹Pastura consociada de Cebadilla (*Bromus unioloides*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*).

²Aceite de soja. ³Aceite de lino.

De acuerdo a lo esperado, el contenido de ácido linolénico (*cis*-9 *cis*-12 *cis*-15C18:3) resultó alto en el aceite de lino (49,87%) y en la pastura (62,76%) donde se observaron valores mayores a los informados por Loor *et al.* (2005) y Flowers *et al.* (2008) resultado compatible con la alta calidad del forraje utilizado. Por su parte, el aceite de soja se caracterizó por su alto contenido (52,87%) en ácido linoleico (*cis*-9 *cis*-12C18:2) y su bajo contenido en AGS características deseables para el alcance de los objetivos del trabajo. Los aceites (y el concentrado) resultaron una buena fuente de ácido oleico (*cis*-9C18:1, **AO**). Su composición resultó normal y similar a lo informado por otros autores (Bu *et al.*, 2007; Glasser *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2010; Martínez del Olmo, 2012).

Es importante destacar el rol de la presencia de pastura en la dieta sobre el metabolismo de los lípidos en el rumen y su importancia para lograr cambios saludables en la composición de los AG de la leche particularmente en relación a los ácido grasos poliinsaturados (**AGPI**) n-3 y el CLA, como así también la reducción de los AGS y el aumento del AO (Dewhurst *et al.*, 2006). La presencia de forraje fresco evita aumentos en la concentración de isómeros *trans*-C18:1 no deseables excluyendo el AV. El índice de acidez (mg KOH/g) para los aceites de soja y lino fue de 2,37 ($\pm 0,03$) y de 6,18 ($\pm 0,52$) respectivamente. El índice de peróxidos (meq O₂/kg) fue de 4,96 ($\pm 1,10$) y 2,25 ($\pm 1,52$), respectivamente. El índice de espectrofotometría ultravioleta (**UV**) (A_λ 232) para el AS y AL fue de 0,860 ($\pm 0,12$) y 1,044 ($\pm 0,27$), respectivamente y el índice de espectrofotometría UV (A_λ 270) para ambos aceites fue de 0,151 ($\pm 0,01$) y 0,294 ($\pm 0,05$), respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de rangos considerados admisibles para el consumo animal.

2.2.- Consumo, producción y composición química de la leche

La inclusión creciente de la mezcla de AS y AL en el concentrado no produjo rechazos en el consumo del mismo ni afectó el consumo de pastura o de MS total respecto al tratamiento Control ($p>0,05$; Tabla 3).

Tabla 3. Consumo de pastura y de suplementos en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75- 25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.

Ingredientes (kg MS/día)	Tratamientos ¹				EEM	P-valor ²
	Control	T2%	T4%	T6%		
Pastura ³	12,00	10,83	10,67	11,57	0,59	0,49
Concentrado	7,04	7,04	7,04	7,04	-	-
Aceites	0,00	0,36	0,72	1,08	-	-
Total MS	19,04	18,23	18,43	19,69	0,68	0,31

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMean (EEM). ²Efecto tratamiento. ³Pastura consociada de cebadilla criolla (*Bromus unioloides*) y trébol rojo (*Trifolium pratense*). MS= materia seca.

El consumo de aceite vegetal podría afectar negativamente la digestión ruminal de la fibra (FDN) (Jenkins, 1994) con reducción del consumo (Sutton *et al.*, 1984) y por lo tanto de la producción de leche (Chilliard *et al.*, 2001a; Rego *et al.*, 2005; Chilliard *et al.*, 2009). Los efectos negativos sobre la digestión ruminal de los aceites libres son variables habiéndose informado efectos negativos (Sutton *et al.*, 1983), neutros (Pantoja *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2008; Atkinson *et al.*, 2009; Dschaak *et al.*, 2011; Gagliostro *et al.*, 2017), o aún positivos (Doreau y Chilliard, 1997; Ueda *et al.*, 2003).

La inclusión de aceite de lino al 3,2%(±1,7)ode aceite de soja al 2,9%(±1,2)de la raciónno afectó el CMSen el meta-análisis de Glasser *et al.* (2008) o en los trabajos de Loor *et al.* (2005) y Bu *et al.* (2007). La relación forraje:concentrado (**F:C**) parece interactuar con los efectos de la suplementación con aceite libre sobre la digestión ruminal (Palmquist, 1988). Cuando el aceite de lino fue incluido al 3% de la MS en una ración de vacas lecheras cuya relación F:C fue de 65:35 se observaron efectos positivos sobre la digestión de la fibra (FDN) con un resultado opuesto cuando dicha relación fue de 35:65 (Ueda *et al.*, 2003). En el presente trabajo, la relación F:C fue de 61:39 (Tabla 3) y no se observó depresión del CMS.

El consumo (g/vaca/día) de C18:2n-6 y C18:3n-3 provenientes de la mezcla de aceites fue de 149,7 y 71,9 en el T2%, 299,4 y 143,8 en el T4% y de 449,1 y 215,7 en el T6%, respectivamente. En Antonacci *et al.* (2017), el consumo de C18:2n-6 y C18:3n-3 fue de 321,7 y de 212,8, respectivamente, ante el aporte de la mezcla soja-lino (75- 25) al 4% del CMST. El consumo total de energía sería mayor en los tratamientos con aceites como consecuencia de ausencia de efecto negativo sobre el consumo de pastura y de concentrado (Tabla 3) y la alta densidad energética de los aceites. Sin embargo, y pese al mayor consumo teórico de energía en las vacas suplementadas, no se detectaron diferencias significativas ($p>0,05$) en la producción de leche tal cual o expresada como leche corregida al 4% de grasa (**LGC4%**) (Tabla 4).

Tabla 4. Producción y composición de leche en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75- 25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.

Variable	Tratamientos ¹				EEM	P< ²		
	Control	T2%	T4%	T6%		Trat	Lin ³	Cuad ³
Leche, kg/día	21,96	20,58	23,99	24,30	1,90	0,46	NS	NS ⁴
LGC4%, kg/día	19,32	17,93	20,61	19,45	1,62	0,73	NS	NS
Grasa, kg/día	0,706	0,641	0,724	0,652	0,06	0,73	NS	NS
Grasa, g/100g	3,20 ^a	3,14 ^a	3,06 ^{ab}	2,67 ^b	0,14	0,06	0,05	NS
Proteína, kg/día	0,831	0,774	0,919	0,963	0,06	0,11	NS	NS
Proteína,g/100g	3,81	3,80	3,87	3,99	0,11	0,56	NS	NS
Lactosa, g/100g	4,80	4,85	4,93	5,06	0,07	0,08	NS	NS
ST,g/100g	12,74	12,85	12,82	12,61	0,23	0,85	NS	NS
SNG,g/100g	9,37	9,51	9,59	9,77	0,14	0,27	NS	NS
Urea, mg/dl	37,83	37,11	33,30	33,12	1,76	0,14	NS	NS

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMMeans (EEM). ²Efecto tratamiento. ³Contrastes: lineal y cuadrático.

^{a,b}LSMeans dentro de fila con distinta letra difieren significativamente.

(Tukey- Kramer, $p < 0,05$). ⁴No significativo. ST=sólidos totales. SNG=sólidos no grasos

La suplementación con AS o AL solos o en combinación (50- 50)al 4% de la ración produjo un aumento en la producción de leche del 16,7% respecto al tratamiento Control en el trabajo de Bu *et al.* (2007) sin diferencias entre ambos aceites. En Antonacci *et al.*(2017), el aumento promedio en la producción de leche de las vacas suplementadas con aceites fue moderado (9,4% sobre el Control) y principalmente explicadopor ambas mezclas en una relación75- 25. En condiciones no pastoriles de alimentación, una alta frecuencia de efectos favorables sobre la producción de leche fue informada por Morand-Fehr *et al.* (1986) ante la inclusión de aceites vegetales no protegidos en la ración.El aporte de AL al 3% o 4% de la ración incrementó la

producción de leche en el trabajo de Bu *et al.* (2007) resultado no observado en otros experimentos (Loor *et al.*, 2005; Rego *et al.*, 2009). El AS suministrado al 2,9 ($\pm 1,3$) % de la ración (533 ± 228 g/día) no afectó la producción de leche en los trabajos revisados por Glasser *et al.* (2008) y tampoco cuando el AS fue suministrado en el rango del 3,5 al 5% de la MS total consumida (Dhiman *et al.*, 2000; Alzahal *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2008). La suplementación con aceite de lino (1 al 7% de la MS total) no afectó la producción de leche en diversos trabajos (Dhiman *et al.*, 2000; Loor *et al.*, 2005; Flowers *et al.*, 2008; Glasser *et al.*, 2008).

El tenor graso de la leche disminuyó linealmente ($p < 0,05$) ante el suministro creciente de la mezcla de AS y AL. El efecto estuvo fundamentalmente explicado por la importante disminución registrada en el T6% donde se registró una caída del 13% respecto al Control (Tabla 4). La importante reducción en la concentración de los AG sintetizados *de novo* (-100 g/kg) en el T6% en comparación al Control (Tabla 7), no fue aparentemente compensada por un incremento en la captura mamaria de los AG preformados (+137 g/kg) ya que el contenido graso de la leche resultó menor (Tabla 4). El resultado fue su vez consistente con la mayor concentración observada del *trans*-10 C18:1 en la leche (Tabla 7) ya que ambos parámetros correlacionaron negativamente (Figura 1). Una relación directa entre niveles crecientes de *trans*-10 C18:1 en leche y la reducción de la síntesis mamaria *de novo* ha sido reportada por Piperova *et al.* (2000) lo que contribuye a explicar la caída lineal en el tenor graso de la leche en el presente experimento. Cabe destacar que dicha caída (Tabla 4) se explicó en parte por la menor presencia de los AG juzgados como hipercolesterolémicos (Tabla 7) lo que mejora el valor saludable de la leche.

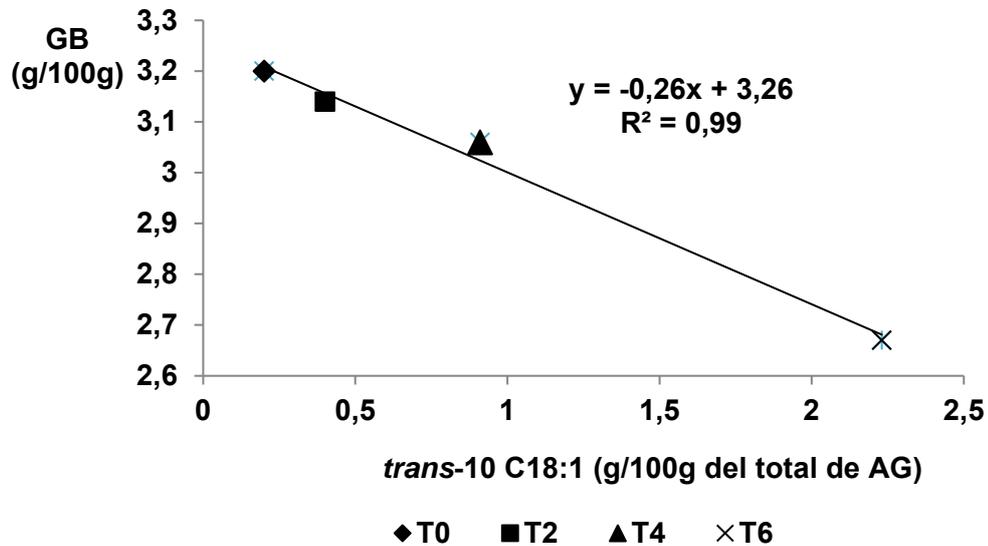


Figura 1. Relación entre la concentración grasa de la leche (GB) y la de *trans*-10 C18:1 en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75- 25) al 0 (T0), 2% (T2), 4% (T4) y 6% (T6) del consumo de materia seca total.

La disminución del tenor graso de la leche ante el consumo de aceites vegetales poliinsaturados es un resultado bien documentado (Dhiman *et al.*, 2000; Whitlock *et al.*, 2006; Shingfield *et al.*, 2006; Bu *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008). En un rango extendido (0,2 a 1,0 kg/vaca/día) de suplementación con lípidos insaturados en vacas lecheras en pastoreo se ha informado una disminución promedio del orden de 8% en el tenor graso y en la secreción de grasa láctea (Schroeder *et al.*, 2004). El ingreso a la glándula mamaria de ciertos AG preformados (*trans*-10 C18:1, *trans*-10, *cis*-12 CLA y *trans*-8, *cis*-10 CLA) reduce la actividad y/o expresión de genes que codifican importantes enzimas involucradas en la captura, síntesis y desaturación de los AG (Chilliard *et al.*, 2002) contribuyendo a explicar la reducción en el tenor graso de la leche.

La producción expresada como LGC4% no resultó diferente entre tratamientos (Tabla 4) lo que sugiere que el aumento (numérico) en la producción de leche en T4% y T6% compensó la reducción en el tenor graso de la leche. Estos resultados fueron consistentes con los efectos de la suplementación con lípidos insaturados que demuestran en general efectos neutros sobre la producción de LGC4% no solo en condiciones de alimentación estabulada (Gagliostro y Chilliard, 1992a) sino también en sistemas de alimentación base pastoril (Schroeder *et al.*, 2004).

La ausencia de efectos negativos del consumo de mezcla de aceites sobre la concentración proteica de la leche (Tabla 4) fue un resultado importante ya que este parámetro no sólo incide en el valor comercial (precio) de la leche sino que resulta determinante de la velocidad y calidad de coagulación en la fabricación de quesos. En condiciones de alimentación pastoril, la suplementación con lípidos no suele afectar la concentración proteica de la leche (Bargo *et al.*, 2003; Schroeder *et al.*, 2004) mientras que en alimentación estabulada este parámetro resulta sistemáticamente afectado (Gagliostro y Chilliard, 1992a; Wu y Huber, 1994). La inclusión de aceite de lino en la ración de vacas lecheras no parece afectar ni el contenido ni la producción de proteína láctea (Loor *et al.*, 2005; Rego *et al.*, 2005; Bu *et al.*, 2007; Rego *et al.*, 2009). En condiciones no pastoriles, la suplementación con lípidos no protegidos afectó negativamente el tenor proteico de la leche en el 71% de los casos analizados por Morand-Fehr *et al.* (1986) estando además asociado a una reducción en la síntesis de caseínas (Storry *et al.*, 1974; Dunkley *et al.*, 1977). Una gran cantidad de trabajos demostraron un efecto negativo de los lípidos suplementarios sobre la concentración proteica de la leche bovina (Gagliostro y Chilliard, 1992; Palmquist *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 2002; Shingfield *et al.*, 2006; Alzahal *et al.*, 2008) efecto que resulta más consistente ante el uso de grasas saturadas (-0,18 g de proteína/100 g de leche) y sales cálcicas de AG (-0,12 g de proteína/100g de leche) respecto a los aceites vegetales insaturados (Gagliostro y Chilliard, 1992). Del análisis de 8 trabajos de suplementación con lípidos insaturados en vacas en pastoreo (Schroeder *et al.*, 2004) surge una disminución de la concentración proteica en leche del orden del 3,2% (-0,11 g/100g). Los mecanismos fisiológicos que explican la reducción en el contenido en proteína láctea ante la suplementación lipídica no están plenamente dilucidados. Algunos autores lo explican por una alteración en la fermentación ruminal que reduce la síntesis de proteína microbiana y por lo tanto la cantidad de aminoácidos que llega a la glándula mamaria para la síntesis proteica (Onetti y Grumer, 2004). Otros autores indican un efecto de dilución por aumento diferencial de la producción de leche y la síntesis proteica (Gagliostro y Chilliard, 1992a; Wu y Huber, 1994; Garnsworthy, 1997; Schroeder *et al.*, 2004). En el presente trabajo, no se detectaron efectos estadísticamente significativos ($p > 0,05$) de los niveles crecientes de la mezcla de aceites sobre la producción de leche, el contenido o la cantidad de proteína secretada (Tabla 4).

La concentración de lactosa tampoco fue afectada ($p > 0,05$) por el consumo creciente de mezcla de aceites (Tabla 4). La disminución aparente de la lipogénesis *de*

novo mamaria (Tabla 7) supone una reducción de la oxidación de glucosa para la síntesis de NADPH lo que podría haber aumentado la biodisponibilidad de glucosa para síntesis de lactosa efecto que no parece haber ocurrido en el presente trabajo ya que los niveles circulantes de glucosa tampoco fueron afectados ($p>0,05$; Tabla 5). Muy pocos estudios han observado cambios en la concentración de lactosa en la leche resultado que estaría explicado por la capacidad osmoreguladora del compuesto. Jenkins y McGuire (2006) sugieren que dichos cambios solo ocurrirían en situaciones muy extremas y poco frecuentes de alimentación. El nivel de urea en leche no fue afectado por la inclusión de niveles crecientes de lípidos en la dieta ($p>0,05$) resultado consistente con la ausencia de un efecto depresor de los lípidos suplementarios sobre el consumo de pastura.

2.3.- Metabolitos plasmáticos y variaciones de peso

Los niveles circulantes de urea, triglicéridos (**TG**), colesterol, glucosa y NEFA no fueron afectados ($p>0,05$) por el aporte creciente de la mezcla de aceites (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración plasmática de metabolitos en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75- 25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.

Variable	Tratamientos ¹				EEM	$P<^2$
	Control	T2%	T4%	T6%		
Urea, mg/dl	45,87	39,50	44,24	48,05	3,88	0,45
TG, mmol/L	0,25	0,30	0,30	0,31	0,02	0,41
Colesterol, mg/dl	220,97	235,44	257,1	252,31	14,54	0,29
Glucosa, mg/dl	71,92	70,60	69,13	69,38	3,12	0,91
NEFA, μ eq/L	276,71	274,93	280,89	335,38	30,94	0,48

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMean (EEM). ²Efecto tratamiento. TG= triglicéridos. NEFA=ácidos grasos no esterificados.

La ausencia de efectos negativos sobre la glucemia sugiere que la disponibilidad de precursores gluconeogénicos no fue afectada por el aporte de lípidos lo que resulta compatible con la ausencia de un reemplazo isoenergético de carbohidratos (grano de maíz) por lípidos (aceites) en el concentrado y con la ausencia de efectos negativos del aceite sobre el consumo de concentrado o de MS total (Tabla 3). Cuando el consumo total no resultó afectado por el aporte de grasa protegida los niveles plasmáticos de glucosa permanecieron constantes (Vicente *et al.*, 1984). Aún ante disminuciones en el CMS inducidos por la infusión duodenal de aceite de colza (1

kg/vaca/día) la glucemia permaneció inalterada tanto en vacas en inicio de lactancia como en lactancia media (Gagliostro *et al.*, 1991). La reducción lineal en la concentración de los AG sintetizados de *novo* (Tabla 7) ante el suministro creciente de mezcla de aceites sugiere una menor lipogénesis mamaria lo que pudo haber contribuido a mantener la glucemia debido a una menor oxidación de glucosa para producción de NADPH a nivel mamario (Chilliard *et al.*, 1991).

Los aumentos en los niveles circulantes de todos los lípidos plasmáticos ante el aporte de materia grasa en la ración es un resultado bien documentado (Gagliostro *et al.*, 1991; Gagliostro y Chilliard, 1991b) que se explica por un incremento en todas las fracciones de lipoproteínas plasmáticas (Nestel *et al.*, 1978; Christie, 1981; Storry, 1981). La única excepción a esta regla general son los TG debido a su alta tasa de recambio (Christie, 1981) lo que podría explicar la ausencia de efecto del suministro creciente de mezcla de aceites sobre la trigliceridemia (Tabla 5).

Concordando con lo observado en otros trabajos (Mandebvu *et al.*, 2003; Ambrose *et al.*, 2006; Castañeda-Gutiérrez *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2008), la concentración plasmática de NEFA no fue afectada por los lípidos suplementarios resultado consistente con los cambios de PV que resultaron positivos en todos los tratamientos (Tabla 6).

Tabla 6. Variaciones de peso vivo (PV) en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75- 25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.

Variable	Tratamientos ¹				EEM	<i>P</i> < ²			
	Control	T2%	T4%	T6%		Trat	Lin ³	Cuad ³	Cub ³
PV inicial, kg	599,00 ^a	521,50 ^b	556,40 ^{ab}	538,71 ^b	18,29	0,04	0,50	0,12	0,07
PV final, kg	647,83 ^a	554,83 ^b	598,80 ^{ab}	584,00 ^{bc}	18,78	0,02	0,60	0,05	0,04
GPV, kg/día	1,62 ^a	1,12 ^b	1,42 ^b	1,51 ^{ab}	0,11	0,02	0,40	0,03	0,07
ΔPV, kg	48,83 ^a	33,33 ^b	42,30 ^{ab}	45,29 ^a	3,41	0,03	0,43	0,01	0,07

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMMeans (EEM). ²Efecto tratamiento. ³Contrastes: lineal, cuadrático y cúbico. ^{a,b,c}LSMeans dentro de fila con distinta letra difieren significativamente (Tukey- Kramer, *p*< 0,05). GPV=ganancia de peso vivo. ΔPV=PV final – PV inicial.

2.4.- Perfil de los AG de la leche

Respecto al tratamiento Control, la concentración del ácido butírico (C4:0, **AB**) resultó menor (*p*<0,05) solo ante el máximo aporte de la mezcla de aceites en el T6%(Tabla 7). En general, la presencia de este AG saludable no suele ser afectada por el consumo de lípidos ya que es sintetizado por una vía malonil-CoA independiente

y por lo tanto no asociada a la actividad acetil-CoA carboxilasa (**ACC**) que resulta inhibida por la captura de los AG exógenos aportados por los aceites (Chilliard *et al.*, 2000; Chilliard y Ferlay, 2004). Toda reducción en los niveles del AB en leche resulta no deseable debido a que el mismo presenta efectos benéficos sobre la salud humana (Chilliard *et al.*, 2000). En este contexto, el consumo de mezcla de aceites hasta un 4% de la MS total sería la máxima dosis aconsejada (T4%).

La disminución en la concentración de los AG sintetizados *de novo* (C4:0 a C15:1) respecto al Control resultó significativa solo a partir del aporte del 4% de mezcla de aceites en la ración total (Tabla 7). Los resultados informados en Antonacci *et al.* (2017) también muestran una reducción (-22,4%) en el total de los AG sintetizados *de novo* de 21,07 a 16,35 g/100g del total de AG ($p < 0,05$) ante el suministro de 0,8 kg/vaca/día de la mezcla (75- 25) soja-lino. Antonacci *et al.* (2013) informaron una reducción del total de AG sintetizados *de novo* del orden del 17,8% (desde 22,49 a 18,48 g/100g del total de AG) en vacas lecheras en pastoreo que consumieron 0,7 kg/vaca/día de una mezcla (70- 30) de aceites de soja-lino. Estos efectos se explican por la inhibición de la actividad de las enzimas lipogénicas mamarias como la ACC (Christie, 1981; Storry, 1981) y son normalmente informados cuando se suplementa a las vacas lecheras con AGPI (Casper *et al.*, 1988; Kelly *et al.*, 1998). El efecto inhibitor resulta más potente medida que aumenta la longitud de la cadena de los AGPI, el grado de insaturación y la presencia de dobles enlaces de configuración *trans* (Chilliard *et al.*, 2001). Puesto que la dosis más alta de consumo mezcla de aceites (T6%) afectó negativamente la concentración grasa de la leche (Tabla 4), un 4% de inclusión sería un máximo recomendable para mantener el valor comercial en un contexto de pago por cantidad de sólidos útiles. A dosis mayores, la disminución de la síntesis *de novo* mamaria no pareció verse compensada por un aumento proporcional en la captura de los AG exógenos preformados y el tenor graso disminuyó respecto al tratamiento Control (Tabla 4). La depresión resultó máxima ante el consumo de mezcla de aceites al 6% lo que además coincidió con la más alta concentración del *trans*-10 C18:1 en leche (Tabla 7). Este AG presenta efectos deletéreos sobre la salud humana (Roy *et al.*, 2007) y está negativamente correlacionado con la concentración grasa de la leche (Figura 1). Una elevada concentración de *trans*-10 C18:1 o del isómero *trans*-10, *cis*-12 C18:2 CLA, ha sido relacionada con disfunciones en la actividad de las enzimas lipoproteína lipasa (**LPL**) y estearil CoA desaturasa (**SCD**) que intervienen en la síntesis de la grasa causando así una disminución en el tenor graso de la leche (Bauman y Griinari, 2001).

La concentración total de los AG hipercolesterolémicos (C12:0 a C16:0) disminuyó significativamente ante el 4% de inclusión de mezcla de aceites en la ración total sin una reducción adicional ante la dosis superior (T6%) utilizada (Tabla 7). Asociado a este resultado, el IA de la leche disminuyó significativamente en T4% sin detrimentos adicionales ($p>0,05$) entre T4% (1,18) y el T6% (0,95). En Antonacci *et al.* (2017), el aporte de 0,8 kg/vaca/día de la mezcla soja-lino (75- 25) mostró una disminución del 41% en el IA respecto al valor registrado en el tratamiento Control (IA=1,83). En el presente trabajo, el IA en la leche Control fue de 1,87 (Tabla 7) resultando comparable al observado en Antonacci *et al.* (2017). El consumo de 0,8 kg/vaca/día de la mezcla soja-lino (75- 25) también generó reducciones ($p<0,05$) en las concentraciones de C12:0 (-30,6%), C14:0 (-28,8%) y C16:0 (-21,9%) respecto al Control (Antonacci *et al.*, 2017).

La concentración de C12:0 y C16:0, dos AG potencialmente aterogénicos cuando son consumidos en exceso, demostró el mismo patrón de respuesta (Tabla 7). La concentración del ácido mirístico en T4% se redujo en un 21,6% respecto a la observada en el Control (Tabla 7) resultado importante debido al potente rol aterogénico que se le atribuye a este AG (Ulbricht y Southgate, 1991). Las reducciones registradas en el T4% vs el Control en la concentración de los AG C12:0 (35,9%), C14:0 (21,7%) y C16:0 (15,5%) resultaron ligeramente inferiores al rango estimado a partir del meta-análisis de Glasser *et al.* (2008) para suplementaciones con aceites de soja y lino quienes informaron valores de 42-37% para el C12:0, 23-24% para el C14:0 y del 30-17% para el C16:0.

Tabla 7. Perfil en ácidos grasos (AG) de la leche en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75- 25) al 0 (Control), 2%, 4% y 6% del consumo total de materia seca.

Ácidos Grasos (g/100g del total de AG)	Tratamiento ¹				EEM	$P<^2$			
	Control	T2%	T4%	T6%		Trat	Lin ³	Cuad ³	Cub ³
C4:0	2,81 ^a	2,36 ^{ab}	2,33 ^{ab}	1,84 ^b	0,21	0,02	0,02	0,92	0,35
C6:0	1,73 ^a	1,40 ^a	1,21 ^{ab}	0,91 ^b	0,13	0,001	0,001	0,91	0,65
C8:0	1,03 ^a	0,85 ^a	0,64 ^b	0,45 ^b	0,08	<0,0001	<0,0001	0,96	0,85
C10:0	2,49 ^a	2,12 ^a	1,46 ^b	1,08 ^b	0,18	<0,0001	<0,0001	0,97	0,51
C12:0	3,04 ^a	2,77 ^a	1,95 ^b	1,58 ^b	0,19	<0,0001	<0,0001	0,81	0,28
C14:0	10,90 ^a	10,50 ^a	8,54 ^b	7,09 ^c	0,40	<0,0001	<0,0001	0,20	0,26
C14:1 <i>cis</i> -9	1,21 ^a	1,35 ^a	0,92 ^{ab}	0,95 ^{ab}	0,12	0,03	0,01	0,96	0,05
C16:0	24,99 ^a	24,55 ^a	21,11 ^b	20,51 ^b	0,72	0,0002	<0,0001	0,91	0,08
C16:1	0,89	1,23	0,95	1,17	0,13	0,22	0,97	0,67	0,07
C17:0	0,45 ^a	0,59 ^a	0,53 ^{ab}	0,29 ^{ac}	0,06	0,01	0,09	0,005	0,94
C18:0	11,50	9,67	11,58	11,06	0,69	0,20	0,29	0,34	0,06

C18:1

Isómeros

<i>trans</i> -9	0,21 ^a	0,40 ^b	0,64 ^c	0,73 ^d	0,05	<0,0001	<0,0001	0,32	0,43
<i>trans</i> -10	0,20 ^a	0,40 ^b	0,91 ^c	2,23 ^d	0,17	<0,0001	<0,0001	0,003	0,52
<i>trans</i> -11 (AV)	3,63 ^a	4,97 ^b	7,05 ^c	8,38 ^d	0,24	<0,0001	<0,0001	0,98	0,18
trans totales	4,04 ^a	5,77 ^b	8,60 ^c	11,35 ^d	0,34	<0,0001	<0,0001	0,15	0,45
C18:1 <i>cis</i> -9	25,74 ^a	26,04 ^a	27,90 ^a	30,06 ^b	0,20	0,005	0,002	0,28	0,74
C18:1 <i>cis</i> -11	1,57 ^a	1,36 ^a	1,94 ^{ab}	1,91 ^{ab}	0,170	0,06	0,01	0,60	0,07
C18:2 (n-6)	1,98 ^a	2,60 ^b	2,81 ^b	2,78 ^b	0,20	0,03	0,02	0,12	0,88
C18:3 (n-3)	0,58	0,78	0,66	0,64	0,06	0,40	0,73	0,18	0,28
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 (AR)	2,28 ^a	3,16 ^b	3,88 ^c	3,89 ^c	0,22	<0,0001	<0,0001	0,05	0,57
AG cadena corta ⁴	8,06 ^a	6,72 ^a	5,63 ^{ab}	4,27 ^{bc}	0,55	0,0005	0,0002	0,98	0,83
AG cadena media ⁵	43,33 ^a	42,67 ^a	34,99 ^b	32,48 ^b	1,09	<0,0001	<0,0001	0,40	0,02
AG cadena larga ⁶	48,14 ^a	50,03 ^a	58,40 ^b	62,33 ^c	1,32	<0,0001	<0,0001	0,44	0,08
Ácidos grasos saturados (AGS)	60,69 ^a	52,38 ^b	47,59 ^c	43,38 ^d	1,15	<0,0001	<0,0001	0,08	0,57
Ácidos grasos insaturados (AGI)	38,52 ^a	42,93 ^b	48,69 ^c	53,39 ^d	1,04	<0,0001	<0,0001	0,90	0,64
AGS/AGI	1,59 ^a	1,23 ^b	0,98 ^c	0,82 ^{cd}	0,06	<0,0001	<0,0001	0,12	0,96
ÍA ⁷	1,87 ^a	1,64 ^a	1,18 ^b	0,95 ^{bc}	0,09	<0,0001	<0,0001	0,99	0,26
Productos Δ 9D	34,96 ^a	38,22 ^b	44,30 ^c	49,02 ^d	1,06	<0,0001	<0,0001	0,49	0,40
Sustratos ⁸	55,65 ^a	54,41 ^a	52,51 ^b	52,29 ^{bc}	0,65	0,003	0,0005	0,44	0,43
Índex ⁹	0,38 ^a	0,41 ^b	0,46 ^c	0,48 ^d	0,009	<0,0001	<0,0001	0,95	0,40
AG de <i>novo</i> (C4:0-C15:1)	24,76 ^a	22,82 ^a	17,90 ^b	14,70 ^c	1,01	<0,0001	<0,0001	0,53	0,31
AG preformados (>17:0)	48,89 ^a	50,61 ^a	58,93 ^b	62,62 ^c	1,33	<0,0001	<0,0001	0,46	0,07
n-6/n-3	3,57 ^a	3,37 ^a	4,41 ^b	4,63 ^c	0,32	0,02	0,003	0,52	0,16
AR/AV	0,56 ^a	0,59 ^a	0,49 ^b	0,37 ^c	0,03	<0,0001	<0,0001	0,01	0,32
Σ (C12:0, C14:0, C16:0)	38,93 ^a	37,81 ^a	31,59 ^b	29,18 ^b	1,15	<0,0001	<0,0001	0,57	0,10

¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMMeans (EEM), ²Efecto tratamiento, ³Contrastes: lineal y cuadrático, ^{a-d}LSMeans dentro de fila con distinta letra difieren significativamente (Tukey- Kramer, $p < 0,05$), ⁴Ácidos grasos de cadena corta: (C6:0 a C10:0), ⁵Ácidos grasos de cadena media: (C12:0 a C17:1), ⁶Ácidos grasos de cadena larga: (C18:0 a C22:6), ⁷Índice de aterogenicidad: $(C12+4 \cdot C14+C16)/(\Sigma AGI)$ los AGI de la fórmula son: C14:1 *cis*9, C16:1, C18:1 *cis*9, C18:1 *cis*11, C18:1 *trans*11, C18:3, C18:2, C18:2 *cis*9 *trans*11CLA, Se excluyeron los AG no saludables (*trans*6-8,9,10), ⁸Sustratos: C14:0+C15:0+C16:0+C17:0+C18:0+*trans*11C18:1, ⁹Índex: $([\Sigma \text{productos} \Delta 9D]/[\Sigma \text{productos} \Delta 9D + \text{Sustratos}])$

El nivel de ácido esteárico (C18:0) no difirió estadísticamente ($p > 0,05$) del Control en ninguna de las dosis utilizadas pero se registró un aumento significativo y lineal (Tabla 7) del ácido linoleico (C18:2n-6). Estos resultados podrían explicarse por

una posible inhibición en el proceso de biohidrogenación (**BH**) hacia el C18:0 cuando altos niveles de C18:2n-6 están presentes en rumen (Hartoof *et al.*, 1973; Agazzi *et al.*, 2004). La ausencia de incrementos en el contenido de C18:0 en la leche cuando las vacas son suplementadas con aceites ricos en C18:2n-6 o C18:3n-3 puede considerarse un resultado positivo por su potencial rol trombogénico (Ulbricht y Sothgate, 1991) y resultó consistente con lo informado en otros trabajos (Ward *et al.*, 2002; Antonacci *et al.*, 2013).

El nivel de AO (*cis*-9C18:1) resultó superior al Control sólo en el T6% ante la máxima dosis de mezcla de aceites (Tabla 7). En Antonacci *et al.* (2017), no se registraron diferencias ($p > 0,05$) entre el Control (26,14 g/100g del total de AG) y el tratamiento con 0,8 kg/vaca/día de la mezcla soja-lino (27,50 g/100g del total de AG) resultado consistente con lo observado en el T4% del presente trabajo (Tabla 7). En Antonacci *et al.* (2013) tampoco se detectaron diferencias en los niveles de AO ante el suministro de 0,7 kg/vaca/día de una mezcla de aceites de soja (70%) y lino (30%) a vacas lecheras en pastoreo. Sin embargo, un aumento en los niveles de *cis*-9C18:1 en leche luego de la suplementación con aceites de girasol o soja es un resultado frecuentemente informado (Rego *et al.*, 2005; Cruz Hernández *et al.*, 2007; Glasser *et al.*, 2008) inclusive ante el consumo de aceite de lino (Bu *et al.*, 2007; Glasser *et al.*, 2008; Chilliard *et al.*, 2009; Hurtaud *et al.*, 2010). El aumento lineal en el índice (**INDEX**) utilizado para estimar la actividad de desaturación mamaria (Tabla 7) resultó compatible con el aumento del AO contribuyendo en parte a mantener niveles similares del C18:0 en leche (Tabla 7). Chilliard *et al.* (2009), informaron un valor más alto del índice desaturasa en la leche de los animales suplementados con aceite de lino a pesar de que los AGPI inhiben la actividad del complejo enzimático delta 9 desaturasa (**Δ9-D**). Bu *et al.* (2007) no observaron diferencias en este índice al comparar la ración control con la que incluyó aceites de soja y lino en sus mezclas al 50-50.

El contenido de C18:2n-6 se incrementó en forma lineal desde 1,98 (Control) a 2,78 g/100g del total de AG en el T6% (Tabla 7) permaneciendo por lo tanto dentro del rango normal (2-3 g/100g del total de AG) informado por Chilliard *et al.* (2000) pero inferior al observado por Antonacci *et al.* (2013) en un experimento previo (3,25 a 3,92 g/100g del total de AG) luego de la suplementación con 0,7 kg/vaca/día de una mezcla (70-30) de aceites de soja y lino en vacas en alimentación pastoril. En Antonacci *et al.* (2017) también se reportó un incremento del C18:2n-6 de 1,96 (Control) a 3,50 g/100g del total de AG ante el consumo de 0,8 kg/vaca/día de la mezcla soja-lino.

Por su parte, los niveles de ácido linolénico (C18:3n-3) en lechero difirieron ($p>0,05$) entre tratamientos (Tabla 7) resultado consistente con lo observado en Antonacci *et al.* (2013). El aporte de aceite de lino suministrado al 4% del CMS en forma pura incrementó (170%) los niveles de C18:3n-3 en leche resultado no observado al suplementar con una mezcla al 50% con aceite de soja (Bu *et al.*, 2007).

La relación n-6/n-3 en el Control (3,57) se incrementó ($p<0,05$) ante el suministro creciente de la mezcla de aceites permaneciendo siempre debajo del valor recomendado de 5 hasta el 4% de consumo de aceites (T4%) donde alcanzó un valor de 4,41. En el T6%, dicho parámetro superó la relación de 5:1 considerada como más saludable alcanzando un valor de 6,63. Al 4% de inclusión de mezcla en vacas lecheras en pastoreo, la relación n-6/n-3 se mantuvo entre 3,18 (Basal) y 3,87 (Suplementadas) en Antonacci *et al.* (2013). En Antonacci *et al.* (2017) se demostró que para alcanzar una baja relación n-6/n-3 el suministro de aceite de lino puro al 4% del CMS resultó una medida efectiva (2,13 vs 4,25 del Control) efecto que resultó atenuado al utilizar mezclas con aceite de soja. En dicho trabajo, la relación n-6/n-3 en leche luego del consumo de 0,8 kg/vaca/día de mezcla de AS- AL al 75- 25 fue mayor (5,66) que en el presente experimento.

El aporte de aceites vegetales no protegidos trae aparejado un aumento en la producción de los diversos AG *trans*-C18:1 en el rumen los que resultan transferidos a la leche. Algunos de ellos (*trans*-9 y *trans*-10 C18:1) son juzgados como deletéreos o no saludables (Mozaffarian, *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2007; Dorfman, 2009) y por lo tanto resulta prudente evitar o prevenir todo aumento de sus niveles en la leche. La concentración (g/100g del total de AG) basal en leche Control del *trans*-9 C18:1 (AE) (0,21) y del *trans*-10 C18:1 (0,20) fue linealmente ($p<0,01$) incrementada por el consumo creciente de mezcla de aceites (Tabla 7) alcanzando los valores máximos de 0,73 para el AE y de 2,23 para el *trans*-10 C18:1 en el T6% los que pueden considerarse bajos o inocuos. En efecto, una concentración de 2,28 g de *trans*-10C18:1 g/100g del total de AG en una manteca suministrada al 12% de la dieta de conejos experimentales sometidos a un desafío colesterolémico no presentó efectos deletéreos sobre el perfil lipídico plasmático o el metabolismo de las lipoproteínas cuando dicho nivel de *trans*-10 C18:1 estuvo acompañado por al menos 7 g/100g del total de AG de AV y 3 g/100g del total de AG del AR (Roy *et al.*, 2007). En el T4%, tanto para el AE (0,64 g/100g del total de AG) como para el *trans*-10 C18:1 (0,91 g/100g del total de AG) los valores resultaron menores ($p<0,05$) que en T6% lo que posiciona favorablemente a este tratamiento. Puesto que en el T4%, los valores del

trans-10 C18:1 fueron de tan solo 0,91 g/100g del total de AG con registros de AV y de AR en leche de 7,05 y 3,88 g/100g del total de AG, respectivamente (Tabla 7) resultaría posible hipotetizar un rol atero-protector de la leche similar (o aún superior) al obtenido en Roy *et al.* (2007). El consumo de 0,7 kg/vaca/día de una mezcla (70-30) de aceites de soja y lino también generó valores bajos de AE (0,58 g/100g del total de AG) y de *trans*-10 C18:1 (0,99 g/100g del total de AG) en vacas lecheras en pastoreo (Antonacci *et al.*, 2013).

En la leche Control, el AV representó el 90% del total de los AG *trans*-C18:1 valor que permaneció alto (74 a 86%) ante niveles crecientes de consumo de aceites (Tabla 7). Por su parte, las proporciones en el total de *trans*-C18:1 de los AG *trans*-9 y *trans*-10 C18:1 fueron de 5,19 y de 4,95% en la leche Control aumentando en el caso del *trans*-10 C18:1 ante los consumos crecientes de la mezcla de aceites. El aumento resultó mayor entre los tratamientos T4% (10,5% del total de *trans*-C18:1) y el T6% (19,7%). Aunque las concentraciones de este AG-*t* resultaron moderadas resulta conveniente evitar desvíos hacia la formación del mismo por su potencial efecto aterogénico (Roy *et al.*, 2007). En este contexto, los resultados sugieren no superar el 4% del CMST no lipídica bajo la forma de mezcla de aceites.

La concentración de AV en leche demostró un incremento lineal ($p < 0,05$) ante consumos crecientes de la mezcla de aceites pero su conversión aparente en AR estimada por la relación AR/AV presentó una relación opuesta alcanzando un valor mínimo de 0,37 en el T6% (Tabla 7). El resultado sugiere que el aumento en la disponibilidad de precursor (AV) para la síntesis del AR no se tradujo en incrementos proporcionales de la actividad $\Delta 9$ -D mamaria lo que resultó consistente con la ausencia ($p > 0,05$) de incremento en el nivel de AR en leche entre los tratamientos T4% (3,88 g/100g del total de AG) y T6% (3,89 g/100g del total de AG). Una relación promedio (AR/AV) del orden de 0,41 fue propuesta por Chilliard *et al.* (2007) valor cercano al 0,49 observado en el T4% (Tabla 7). El AV presente en los lácteos puede ejercer propiedades benéficas a través de un efecto anticarcinogénico directo (Awad *et al.*, 1995) o mediado por su conversión endógena a AR a una tasa estimada del 20% en tejidos humanos (Turpeinen *et al.*, 2002) por acción de la $\Delta 9$ -D (Parodi, 2003). Puesto que sólo un 20% del AV sería convertido en AR en los tejidos humano y hasta que se disponga de mayores evidencias experimentales de los efectos saludables del AV, resulta prudente evitar excesos de concentración en leche y consumo elevado de este compuesto (Dr. Yves Chilliard, comunicación personal). En este contexto, la suplementación con mezcla de aceites al 4% de la MS consumida (T4%) sería la dosis

más aconsejable a utilizar al no haberse detectado incrementos marginales del AR aunque si del AV (Tabla 7 y Figura 2) al aumentar el consumo de aceites en el T6%.

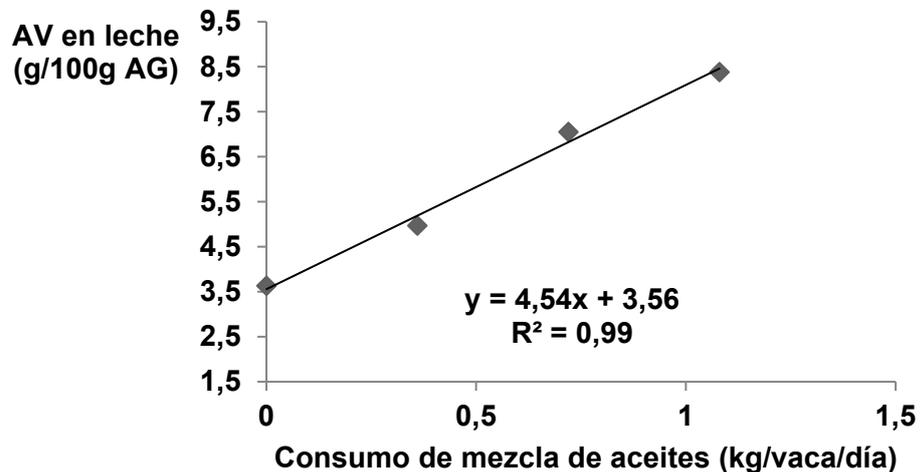


Figura 2. Concentración de ácido vaccénico (AV, *trans*-11 C18:1) en vacas lecheras en pastoreo recibiendo cantidades crecientes de una mezcla de aceites de soja y de lino (75- 25).

De acuerdo a lo esperado, la concentración del AR en la leche correlacionó positivamente ($R^2:0,89; p<0,01$) con su precursor el AV (Figura 3) resultado frecuentemente informado (Chilliard *et al.*, 2000; Chilliard y Ferlay, 2004; Bu *et al.*, 2007). La conversión promedio del AV en AR pareció situarse en un 34,2% (Figura 3) valor muy cercano al 33% informado por Griinari y Bauman (1999) y al 35-39% estimado en Antonacci *et al.* (2013) ante el suministro de 700 g/vaca/día de una mezcla (70- 30) soja-lino a vacas lecheras en pastoreo. Tomando como estimador la relación AR/AV, la conversión promedio estimada resultó mayor (50,25%; Tabla 7).

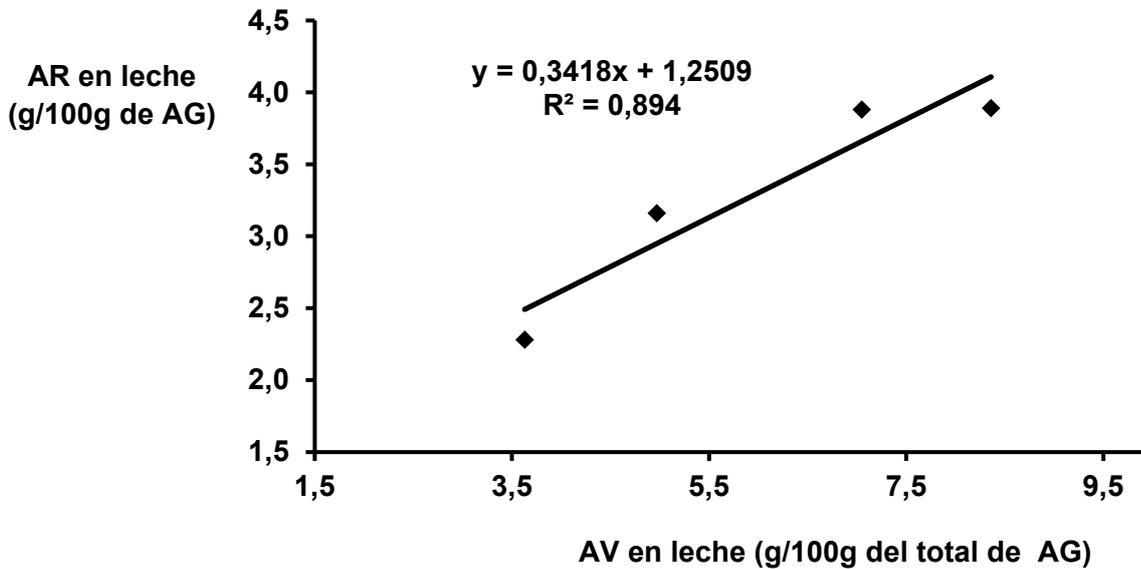


Figura 3. Relación entre la concentración del ácido vaccénico (AV, *trans*-11 C18:1) y el ácido ruménico (AR, *cis*-9*trans*-11 C18:2) en la leche.

En el presente trabajo, la concentración basal (Control) del AR resultó elevada (2,28 g/100g del total de AG) y fue incrementada ($p < 0,05$) en todos los niveles de consumo de aceite suplementario sin diferencias ($p > 0,05$) entre T4% y T6% (Tabla 7). El resultado sugiere que la respuesta en los niveles de AR en leche sería lineal hasta un máximo de 4% de consumo de aceites en la ración total (Figura 4) y confirma experimentalmente lo previamente sugerido por Chilliard *et al.* (2000).

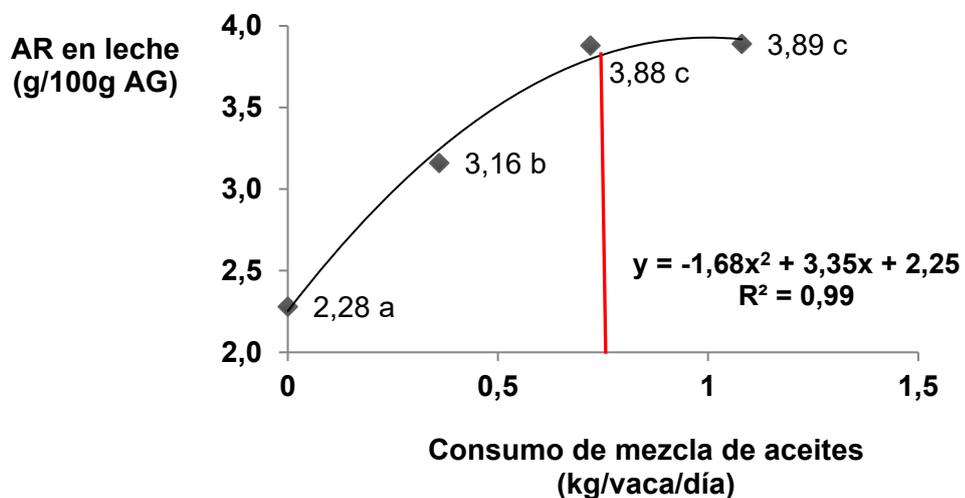


Figura 4. Relación entre el consumo de una mezcla (75- 25) de aceites de soja y lino y la concentración de ácido ruménico (AR, *cis*-9 *trans*-11 C18:2) en leche.

Los niveles de AR en leche obtenidos en el T4% (3,88 g/100g del total de AG) resultaron superiores a los informados por Bu *et al.* (2007) (1,60-2,39 g/100g del total de AG) a similar dosis de aceite utilizada (4% del consumo de MS) en raciones con alto contenido de forraje (59%). También fueron mayores a los obtenidos Antonacci *et al.* (2017) para el tratamiento 75- 25 soja-lino (3,21 g/100g del total de AG) y en el trabajo de Antonacci *et al.* (2013) ante el suministro de 0,7 kg/vaca/día de la mezcla soja- lino (70- 30) a vacas lecheras en alimentación pastoril (3,13 g/100g del total de AG). Los valores promedio de AR en leche en el meta análisis de Glasser *et al.* (2008) ante el suministro de aceite de soja (1,02 (\pm 0,36) g/100g del total de AG) o de lino (1,75 (\pm 0,84) g/100g del total de AG), los obtenidos por Rego *et al.* (2005) ante el suministro de 500 g/día de aceite de girasol o de soja (2,02 g/100g del total de AG) a vacas lecheras en pastoreo y a los informados por Schroeder y Gagliostro (2007) ante el aporte de 0,9 kg/vaca/día de sales cálcicas de AG insaturados conteniendo un 30% de C18:2n-6 resultaron inferiores a los registrados en el presente experimento. Los elevados valores basales de AR observados en la leche Control (2,28 g/100g del total de AG, Tabla 7 y Figura 3) podrían explicar en parte las diferencias entre experimentos.

Las concentraciones del AR en leche presentaron también una alta variabilidad de respuesta ante los niveles crecientes de consumo de mezcla soja- lino sobre todo ante el mayor consumo de mezcla (T6%) como puede observarse en la Figura 4.

La presencia de los AGI se incrementó linealmente con el consumo de aceite alcanzando un valor máximo en el T6% con 38,6% de aumento respecto al Control (Tabla 7). Por su parte, el nivel de AGS disminuyó alcanzando su reducción máxima en el T6% con un 37,7% respecto a Control. La relación AGS/AGI disminuyó con el consumo de aceites sin diferencias entre T4% y T6% (Tabla 7).

Los resultados confirman la existencia de una gran plasticidad de respuesta en la composición de la grasa láctea en cuanto a sus AG constitutivos (Chilliard *et al.*, 2000; Glasser *et al.*, 2008) la que puede ser modulada vía alimentación para incrementar el valor saludable de los lácteos.

CONCLUSIONES

La suplementación de vacas lecheras en pastoreo con dosis crecientes de una mezcla de aceites de soja y lino incrementó de manera lineal el contenido de los ácidos ruménico y vaccénico en la leche sin desvíos importantes hacia ciertos ácidos grasos no saludables (*trans*-9 y *trans*-10 C18:1) y sin afectar ni la producción de leche ni su contenido proteico. La estrategia resultó también una herramienta efectiva a fines de reducir el contenido de ácidos grasos saturados y la fracción hipercolesterolémica de la grasa láctea lo que mejora su valor saludable. Tomados en conjunto, los resultados indican que el nivel óptimo de inclusión de la mezcla de aceites estuvo situado alrededor del 3,91% del consumo total de MS sin ventajas adicionales al incrementar la dosis de aceites en la ración total.

CAPITULO III

EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA OVINA CON DISTINTAS COMBINACIONES DE ACEITE DE SOJA Y DE LINO SOBRE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE (VER PUBLICACIÓN 3. PÁGINA 216)

RESUMEN

Treinta y seis ovejas de raza Pampinta (6 por tratamiento) fueron utilizadas en un diseño completamente aleatorizado (**DCA**) para conocer la efectividad del aporte de aceites de soja (**AS**) y de lino (**AL**) para reducir la concentración de los ácidos grasos (**AG**) hipercolesterolémicos de la leche (C12:0 a C16:0) e incrementar la presencia del ácido linoleico conjugado (*cis*-9, *trans*-11 C18:2, **CLA**) o ácido ruménico (**AR**) y del ácido vaccénico (*trans*-11 C18:1, **AV**). Los tratamientos fueron una ración Control (71% heno de alfalfa y 29% de concentrado) o la ración Control suplementada con aceites puros (**AS100** o **AL100**) o sus mezclas (% p/p) (**AS75- AL25**, **AS50- AL50** y **AS25- AL75**) al 7% (240 g de aceite/animal/día) del consumo de materia seca total (**CMST**). El promedio de las tres últimas semanas de suplementación fue utilizado para el análisis estadístico. El aporte suplementario de aceites no afectó la producción de leche, el tenor graso o la secreción de la grasa láctea. La concentración proteica de la leche resultó mayor en AS75- AL25, AS50-AL50 y AS25- AL75 sin efecto sobre la

secreción de proteína láctea. El contenido de sólidos totales(**ST**) de la leche tendió ($p<0,10$) a aumentar con el consumo de aceites. La concentración total de los AG potencialmente aterogénicos disminuyó y la concentración de los ácidos esteárico, oleico y linolénico aumentó. El nivel de AV y AR fue mayor en los tratamientos con aceites sin diferencias entre mezclas. El índice de aterogenicidad (**IA**)de la leche Control (2,23) fue reducido ($p<0,05$) en los tratamientos con aceites (1,15 a 1,37) así como también la relación n-6/n-3 pasando de 7,27 en la leche Control a un valor mínimo de 1,89 en AL100. La suplementación con aceites poliinsaturados en la ración de ovejas lecheras al 7% del consumo de materia seca (**CMS**)no afectó la respuesta productiva y resultó una estrategia efectiva para mejorar el valor saludable de la leche siendo la combinación AS50- AL50 la que generó el mayor número de cambios favorables desde el punto de vista de la salud humana.

ABSTRACT

Thirty-six Pampinta ewes (6 per treatment) were used in a completely randomized design to assess the effectiveness of soybean (**SO**) and linseed(**LO**) oils to reduce the concentration of the hypercholesterolemic (C12:0 to C16:0)fatty acids(**FA**) and increase the presence of conjugated linoleic acid (*cis*-9, *trans*-11 C18:2, also called rumenic acid, **RA**) and vaccenic acid (*trans*-11 C18:1, **VA**). The treatments consisted in a Control ration (71% alfalfa hay and 29% concentrate) or the Control ration supplemented with pure oils (**SO100 or LO100**) or their mixtures at (%w/w)**SO75-LO25, SO50- LO50 and SO25- LO75** fed at 7% (240 g/ewe/day) of total DM intake. Mean parameter records of the last three weeks of supplementation were computed for statistical analysis. Milk yield, milk fat content or milk fat secretion were not affected by oil intake. Milk protein content resulted higher in SO75- LO25, SO50-LO50 and SO25- LO75 with no effect on milk protein secretion. The milk total solid content tended ($p<0.10$) to increase after oil intake. Total milk fat concentration of atherogenic FA decreased and milk content of stearic, oleic and linolenic acids increased. Milk fat content of VA and RA resulted higher in treatments with oils without differences between oil-blends. The atherogenicity index (**AI**)in Control milk (2.23) was reduced ($p<0.001$) by oil intake (1.15 to 1.37) as well as the n-6/n-3 ratio that averaged 7.27 in Control milk reaching a minimum value of 1.89 in LO100. Polyunsaturated oils supplementation at 7% of DM intake to dairy ewes did not affect the productive

response resulting an effective strategy to improve the healthy value of milk. The SO50- LO50 blend showed the highest number of milk favorable changes concerning human health.

INTRODUCCIÓN

La producción de leche de oveja representa aproximadamente el 1,4% de la producción mundial (9.584 millones de toneladas por año como promedio para 2007-2011 (FAO [FAOSTAT], 2013) y se destaca por una baja actividad alergénica, una alta concentración de sólidos y compuestos nutracéuticos presentando el queso ovino un alto valor lo que genera un importante mercado mundial y un creciente interés en países como EE.UU., Brasil y China (Nudda *et al.*, 2014).

Puesto que gran parte de la leche de oveja se transforma en yogur y queso, la calidad de la misma se evalúa principalmente en términos de sus propiedades tecnológicas y de coagulación las que a su vez dependen de los contenidos de grasa y proteína y del recuento de células somáticas (Nudda *et al.*, 2014)

Tanto los consumidores como los responsables de la cadena láctea están cada vez más interesados en el valor saludable de los lácteos que se generan el que depende en parte de la composición en AG de la grasa láctea, tanto por los potenciales efectos aterogénicos atribuidos al exceso del consumo de los ácidos grasos saturados (**AGS**) como por las potenciales propiedades antiaterogénicas (Lee *et al.*, 1994) y las anticancerígenas (Ip *et al.*, 1994; Ip *et al.*, 1999; De La Torre *et al.*, 2006; Kelley *et al.*, 2007) presentes en los CLA naturales como el AR (Gagliostro, 2004a).

La leche ovina es un producto muy valorado tanto por su calidad nutricional como por su alto rendimiento industrial, atribuido al alto contenido de sólidos útiles que posee. En nuestro país, el destino principal de la leche ovina es la producción de quesos, siendo minoritarios otros destinos industriales (Suárez, 2004; Buseti, 2006). La raza Pampinta es una raza ovina doble propósito (lechera y carnífera) desarrollada por la Estación Experimental Agropecuaria "Guillermo Covas" del INTA durante la década del 80 en la Provincia de La Pampa (Anguil) a partir del cruzamiento de ovejas Corriedale con carneros Frisones del Este (Suárez y Buseti, 1992). Su leche presenta un alto contenido de ST que puede ser superior al 19% con valores promedio del 6,7% en proteína y 7,4% en grasa butirosa lo cual la convierte en una leche de excelente rendimiento quesero (Busetti, 2005).

Al igual que en vacas (Gagliostro, 2004b), cabras (Gagliostro, 2004c), y búfalas (Gagliostro *et al.*, 2015), la suplementación de ovejas lecheras con fuentes de AG poliinsaturados (**AGPI**) permite disminuir la concentración de AGS no saludables de la leche (C12:0, C14:0 y C16:0) y en consecuencia su IA (Gómez-Cortés, 2010). Por las características de su grasa, la leche de ovejas Pampinta podría presentar valores de IA comparables o aún más elevados que los de la leche bovina lo que justifica el intento de reducir la presencia de sus AGS y obtener beneficios adicionales en salud humana (Buseti, 2005).

Estudios *in vitro* utilizando fluido ruminal demostraron que la sustitución parcial de ácido linoleico (*cis*-9,*cis*-12 C18:2) por linolénico (*cis*-9,*cis*-12,*cis*-15 C18:3) incrementaría las tasas de conversión del ácido linoleico al CLA y del CLA al AV con una mayor tasa de isomerización del ácido linoleico cuando se lo combina con el linolénico que podría extrapolarse a situaciones *in vivo* (Castillo-Vargas, 2010).

En ovejas lecheras, la adición de un 6% de AS a una ración con una baja relación forraje/concentrado (**F:C**) del orden de 20:80 generó aumentos en la concentración de CLA y AV en la leche los que disminuyeron a la primera semana post suplementación con aumento a niveles de 6 g/100g de un AG deletéreo como el *trans*-10 C18:1 (Gómez-Cortés *et al.*, 2008). Adicionalmente, la suplementación con AL permite reducir la relación n-6/n-3 en leche de cabras (Gagliostro, 2004c) y ovejas (Gómez-Cortés, 2010) con un incremento en los niveles de CLA en la grasa láctea ovina y en el fluido ruminal (Gómez-Cortés *et al.*, 2008). Esta estrategia conduce a la formación de AV con un menor riesgo de desvíos hacia la generación de *trans*-10 C18:1 que resulta desfavorable para la salud humana. Estudios previos en cabras mostraron que los AS y AL suministrados al 5-6% del CMST, provocan los efectos buscados para una leche funcional (Gagliostro, 2004c). La información disponible acerca del efecto de los lípidos suplementarios sobre el perfil en AG de la leche de oveja es bastante limitado en comparación con los estudios conducidos en vacas y cabras (Chilliard *et al.*, 2003, Hervás *et al.*, 2008; Gómez-Cortés, 2010) y no existen en nuestro conocimiento ensayos que demuestren la ventaja potencial de combinar AS y AL en la ración de ovejas lecheras lo que justifica la realización del presente trabajo experimental.

HIPÓTESIS

En raciones de alta relación F:C existiría una combinación entre los AS y AL que suministrada al 6% del consumo de materia seca de ovejas lecheras

permitiría disminuir la presencia en la leche de los AGS desfavorables para la salud (C12:0, C14:0 y C16:0) y aumentar en forma simultánea la concentración de los AG potencialmente benéficos como el AR, el AV y los AGPI de la serie omega tres (n-3) sin desvíos importantes hacia la formación de AG no saludables como el *trans*-10 C18:1.

El consumo de los aceites puros o sus mezclas a la dosis propuesta no tendrá efectos negativos sobre la producción y composición de la leche en cuanto a los parámetros determinantes de su rendimiento para elaboración de queso.

OBJETIVOS

Conocer una combinación de AS y de AL que consumida por la oveja lechera genere un perfil en AG potencialmente más saludable en la grasa láctea a fin de obtener una leche ovina funcional caracterizada por una reducción de los AG hipercolesterolémicos y enriquecida naturalmente en AR.

Determinar el efecto de la suplementación con esos aceites sobre la producción y composición química de la leche (grasa butirosa, proteína, lactosa y sólidos totales).

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Condiciones experimentales

El trabajo se llevó a cabo en el tambo ovino de la Estación Experimental "Ing. Agrónomo Guillermo Covas" de INTA (Anguil, Provincia de La Pampa) con una duración de 36 días de los cuales los 7 primeros fueron de covariable sin aceites, con 7 de adaptación al 50% de la dosis de aceites y 22 días con suplementación a dosis completa de aceites. Se utilizaron 36 ovejas multíparas de raza Pampinta en lactancia temprana ($50 \pm 2,5$ días en lactancia), homogéneas, con 3 lactancias, una producción láctea promedio de $1,058 (\pm 0,28)$ kg/día y un peso vivo (**PV**) promedio de $72,3 (\pm 2,3)$ kg. Previo al inicio del ensayo se registró la producción lechera y el PV a fines de asignar a los animales en forma homogénea a los tratamientos. Los animales fueron ordeñados una vez por día a primera hora de la mañana y se mantuvieron separadas

por tratamiento en corrales de 10 m² a cielo abierto con sombra natural y agua limpia a voluntad. Se controló de presencia de mastitis y se monitoreó el recuento de células somáticas (**RCS**) a lo largo del ensayo.

3.2.- Diseño experimental y tratamientos

Las ovejas fueron alimentadas una vez al día en corrales con rollo de alfalfa de calidad (2300 g MS/oveja) y alimento balanceado comercial (1200 g, Lechera al 18% PB) en el momento del ordeño (alimento tal cual). Los alimentos que integraron el concentrado (% tal cual) fueron grano de maíz partido (38,7%), pellet de girasol (25,3%), pellet de soja (5,0%), afrechillo de trigo (29%), sal común (0,8%) y una mezcla comercial (AF Mix ACA Lechera; 1,2%).

En un DCA, 6 ovejas por tratamiento fueron asignadas a las siguientes combinaciones de AS y AL (% en peso): 0-0 (Control, sin aceites), 100- 0, 75-25, 50-50, 25-75 y 0- 100. Los aceites puros o sus mezclas fueron ofrecidos al 6% del CMSTestimado en 4 kg. Durante los 7 días previos al inicio de la suplementación con aceites todos los animales recibieron la alimentación Control. Desde el día 8 al 15 los animales suplementados recibieron 1200 g de balanceado y 100 gramos de aceites para continuar a dosis completa (240 g/oveja/día) desde el día 16 al 36 de ensayo. Los aceites (puros o combinaciones) fueron manualmente mezclados con el concentrado y ofrecidos individualmente en el momento del ordeño.

3.3.- Mediciones en los alimentos

Se colectaron dos muestras de heno de alfalfa y de concentrado a lo largo de todo el período experimental. Las muestras fueron secadas en estufa con circulación de aire forzado (60°C, 48 horas) para determinar el contenido de materia seca (**MS**), proteína bruta (**PB**) (Horneck; Miller, 1998 con un analizador LECO FP-528), fibra detergente neutra (**FDN**) y ácida (**FDA**) por la técnica de bolsas filtrantes (Komarek *et al.*, 1994 y Komarek *et al.*, 1993, respectivamente) con un autoanalizador (ANKOM Corp., Fairport, Nueva York, EE.UU., 1970), extracto etéreo (**EE**) por la técnica de extracción con solventes en alta temperatura (AOCS, 2006) con un autoanalizador (ANKOM Corp., Fairport, Nueva York, EE.UU.) y digestibilidad de la materia seca (**DMS**) a 48 horas de incubación *in vitro* (equipo Daisy II, ANKOM).

3.4.- Medición de la producción, composición química de la leche y consumo de alimento

La producción de leche se registró en forma individual y diaria durante 5 días consecutivos a la semana durante todo el ensayo. Las muestras (100 ml) para composición de leche (grasa butirosa(**GB**), proteína, lactosa y ST) se obtuvieron durante dos días no consecutivos en cada semana de ensayo, fueron conservadas con el agregado de Bronopol y Natamicina y enviadas refrigeradas al Laboratorio de Físico Química del Instituto Nacional de Tecnología Industrial- **INTI** Lácteos (PTM Miguelete, Buenos Aires) para su análisis por metodología infrarroja (Milko Scan).

El consumo de heno de alfalfa fue medido en forma grupal dentro de cada tratamiento durante 5 días consecutivos en cada semana de ensayo. El consumo del concentrado y del aceite fue determinado en forma individual y diaria al finalizar el ordeño por oferta-rechazo durante todo el periodo experimental.

3.5.-Cuantificación del perfil en ácidos grasos de la leche y de los alimentos

El análisis de composición en AG de la leche y de los alimentos fue realizado sobre muestras individuales colectadas a los días 7, 15, 22, 29 y 36 de ensayo y conservadas a -20°C por cromatografía gas- líquido (**CGL**) como se describe en Gagliostro *et al.* (2017).

3.6.- Análisis estadísticos

El promedio de las tres últimas semanas de toma de datos fue utilizado para el análisis de producción, composición y perfil en AG de la leche ajustado por covariable utilizando el Programa PROC GLM de SAS/STAT® (2002-2010) según el siguiente modelo:

$$Y_i = \mu + C_i + Cov + E_i$$

donde Y_i es la variable respuesta; μ es la media poblacional; Cov es el efecto de covariable, C_i es el efecto del i -ésima combinación de suplementación con mezcla de aceites y E_i es el error experimental asociado a la i -ésima unidad experimental.

El umbral de significancia estadística fue establecido en $p < 0,05$ y el umbral de tendencia fue $p < 0,10$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.-Composición química y valor nutricional de los alimentos

La calidad de los alimentos utilizados en el ensayo se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química de los alimentos utilizados en el experimento.

Variable	Heno de alfalfa	Concentrado
Materia seca, %	87,09±3,43	87,50±2,53
Proteína bruta, % de la MS	19,39±1,65	19,00±1,74
FDN, % de la MS	43,65±5,53	35,10±4,60
FDA, % de la MS	32,40±3,16	11,40±3,12
Digestibilidad de la MS, %	64,83±1,30	80,00±2,48
Extracto etéreo, % de la MS	1,59±0,09	5,50±0,05
EM, Mcal/kg MS	2,34 ± 0,05	2,89 ± 0,06

EM= energía metabolizable.FDN= fibra detergente neutra. FDA= fibra detergente ácida. MS= materia seca.Valores promedio ± el desvío estándar. Heno de alfalfa y concentrado, n=2

La calidad del heno de alfalfa resultó adecuada destacándose su digestibilidad y su alto contenido en PB con moderados contenidos de FDN, EE y EM comparables a los informados en Prieto *et al.* (2014). El alimento concentrado se caracterizó por un elevado contenido proteico y una alta digestibilidad. Estos resultados son comparables con la calidad de los alimentos utilizados en el meta-análisis de 21 trabajos (Martínez Marín *et al.*, 2015) en ovejas suplementadas con semillas y aceites poliinsaturados.

3.2.-Composición en ácidos grasos de los alimentos y de los aceites

El perfil en AG de los alimentos utilizados en el presente ensayo se presenta en la Tabla 2. De acuerdo a lo esperado, el AS se caracterizó por su riqueza en ácido linoleico (50%) aunque inferior a lo informado por otros autores (Glasser *et al.*, 2008; Antonacci *et al.*, 2013; Martínez Marín *et al.*, 2015, Antonacci *et al.*, 2017) pero comparable al utilizado en el trabajo de Ortega Pérez (2012). El contenido en AGS fue bajo mientras que el nivel (19,81%) de ácido oleico (*cis*-9 C18:1, **AO**) resultó

importante. El ácido linolénico representó el 46,80% del total de AG en el AL (Tabla 2) valor inferior a lo reportado por otros autores (Flowers *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2008; Cieslak *et al.*, 2010; Antonacci *et al.*, 2013; Martínez Marín *et al.*, 2015) pero mayor al reportado por Antonacci *et al.* (2017).

Tabla 2. Composición en ácidos grasos de los aceites de soja, de lino, del heno y del concentrado utilizados en el experimento.

Ácidos Grasos (g/100g del total de AG)	Heno ¹	AS ²	AL ³	Concentrado
C16:0	13,25	10,13	6,85	9,48
C18:0	2,55	4,86	5,47	3,79
C18:1 <i>cis</i> -9	28,18	19,81	20,08	22,96
C18:1 <i>cis</i> -11	1,13	1,79	1,47	1,95
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	11,78	49,99	18,66	48,19
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	12,82	12,15	46,80	2,50

¹Heno de alfalfa. ²aceite de soja. ³aceite de lino

En el heno de alfalfa, el nivel observado de ácido linoleico resultó bajo (12,82%) e inferior a lo informado por Solís Limón (2010) aunque comparable al valor (13,59%) reportado por Nahum *et al.* (2016). Una disminución promedio del orden del 20% en el contenido de ácido linolénico en los forrajes conservados ha sido informado por Dewhurst y King (1998).

3.3.-Producción y composición química de la leche

La producción promedio de leche en los tratamientos con aceites (877 g/oveja/día) resultó numéricamente mayor (+12,2%) a la observada en el tratamiento Control (782 g/día) aunque dicha diferencia no resultó significativa ($p < 0,05$). El resultado indicó ausencia de efectos negativos del consumo de aceite vegetal libre sobre la producción de leche en ovejas alimentadas con una relación F:C cercana a 80:20. No se detectaron cambios en la concentración ($p > 0,05$) o producción ($p > 0,05$) de grasa láctea lo que sugiere que la importante caída (27%) en la concentración de los AG sintetizados *de novo* (Tabla 4) fue compensada por un incremento en la captura de los AG preformados puesto que su concentración en leche aumentó (39%, Tabla 4) ante

el consumo de aceites. Estos resultados son compatibles con lo informado por Martínez Marín *et al.* (2015). Una menor producción de leche sin diferencias en el contenido de grasa y proteína láctea fue observada en ovinos por Gómez-Cortés *et al.* (2011) ante el consumo de 167 g/oveja/día de aceite de girasol en una ración con una relación F:C inversa (20:80) a la utilizada en el presente trabajo.

Tabla 3. Producción y composición de leche en ovejas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soya de lino.

Variable	Tratamiento ¹						<i>P</i> < ²	
	Control	AS100- AL0	AS75- AL25	AS50- AL50	AS25- AL75	AS0- AL100	EEM	T
Leche (g/día)	782	963	854	805	902	862	21,3	0,54
Grasa, %	6,42	5,96	6,56	6,75	7,09	6,59	0,37	0,18
Proteína, %	5,69 ^c	5,67 ^c	5,79 ^{bc}	6,10 ^{ab}	6,10 ^a	5,18 ^{abc}	0,11	0,05
Lactosa, %	5,68	5,37	5,22	4,98	5,26	5,14	0,10	0,07
ST, %	16,79	17,07	17,50	17,77	18,53	17,58	0,19	0,10
Grasa, g/día	50	60	60	60	60	60	0,006	0,87
Proteína, g/día	50	50	50	50	50	50	0,003	0,71

^{a,b,c}Medias dentro de fila con distinta letra difieren significativamente (test Tukey-Kramer, $P < 0,05$). ¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMeans (EEM). Control (C) sin aceites, 240g aceite de soja (AS100- AL0), 180g aceite de soja y 60g aceite de lino (AS75- AL25), 120g aceite de soja y 120g aceite de lino (AS50- AL50) 60g aceite de soja y 180g aceite de lino (AS25- AL75), 240g aceite de lino (AS0- AL100). ²Efecto tratamiento. T=tratamiento. ST=sólidos totales.

Respecto al tratamiento Control (5,69), la concentración (g/100g) proteica de la leche resultó mayor ($p < 0,05$) en los tratamientos AS50- AL50 (6,10) y AS25- AL75 (6,10) sin efecto ($p > 0,05$) sobre la secreción de proteína láctea (Tabla 3). El aumento en la concentración proteica de la leche ante consumos crecientes de aceite de lino resultó comparable a lo informado por Martínez Marín *et al.* (2015).

La tendencia observada en el aumento del contenido de sólidos totales ante el consumo de aceites (Tabla 3) es un resultado importante para el productor de quesos ovinos y compatible con lo informado por Gómez-Cortés *et al.* (2011) ante la inclusión de niveles crecientes (60, 117 y 167 g/oveja/día) de aceite de girasol en la ración. En otro trabajo con aceite de girasol consumido al 2,5% de la ración total no se detectaron diferencias en la producción de leche, grasa, proteína, lactosa y sólidos totales (Castro-Carrera *et al.*, 2015).

La leche de oveja presenta una elevada aptitud industrial por su alto rendimiento (20% ó 5:1) para la elaboración de quesos en comparación al 14% (7:1) de la leche de cabra y al 10% (10:1) de la leche de vaca (Buseti, 2006). En el presente trabajo, el extracto quesero (contenidos de grasa y proteína) resultó mayor en los tratamientos

con mezclas de aceites (12,80 g/100g) respecto al Control (12,11 g/100g) mientras que los menores valores fueron observados con los aceites puros de soja (11,63 g/100g) y de lino (11,77 g/100g). Por lo tanto, la inclusión de mezcla de aceites ricos en AGPI en la ración de ovejas lecheras no afectaría el valor comercial de la leche en un sistema de pago referenciado al extracto quesero (Pirisi *et al.*, 2007). Por otro lado, la relación grasa:proteína resultó óptima ($1 \pm 0,1$) en acuerdo con lo informado por Gómez-Cortés *et al.* (2011) lo que garantiza un adecuado nivel de grasa para procesamiento industrial y maduración del queso (Caja y Bocquier, 2000).

El RCS es unatécnica utilizada para diagnosticar mastitis sub-clínicas ya que en respuesta a procesos infecciosos, la ubre reacciona con un proceso inflamatorio localizado permitiendo el pasaje de glóbulos blancos a la leche y aumentando el número de células presentes. En el caso de la leche de oveja, en EEUU se fija un valor de referencia para sano de 10 a 200 x 10³ células/ml (Buseti, 2006). En el presente trabajo, los valores promedio de RCS en las ovejas suplementadas con lípidos (99 x 10³ cel/ml, Figura 1) estuvieron dentro de los valores de referencia resultando menores a los observados en el tratamiento Control (128 x 10³ cel/ml) y al valor de 191 x 10³ informado por Buseti (2006).

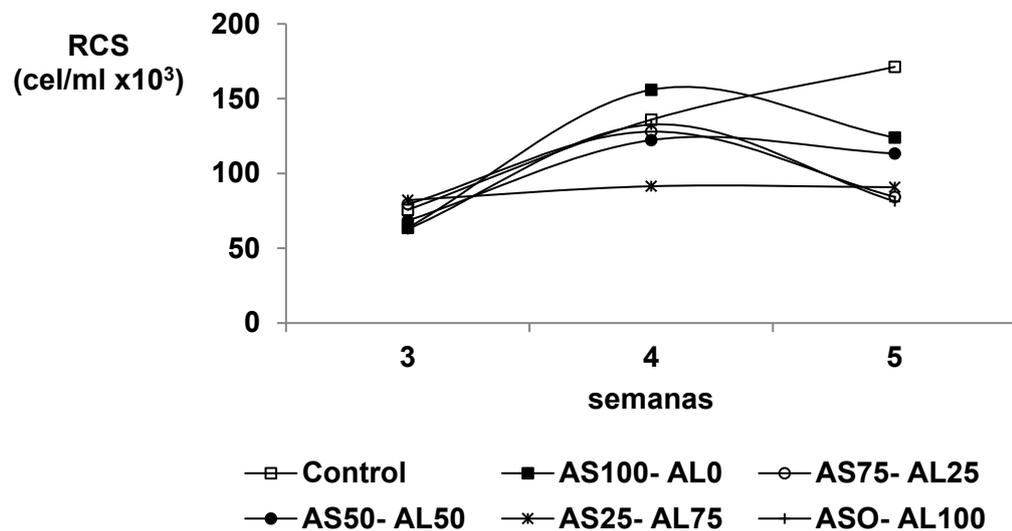


Figura 1. Recuento de células somáticas (RCS) durante las tres últimas semanas de suplementación en ovejas lecheras consumiendo aceites de soja (AS) y de lino (AL) en diferentes mezclas.

3.4.-Consumo de concentrado y forraje

No hubo diferencias ($p>0,05$) entre los aceites puros y sus mezclas para el consumo de alimento concentrado. Respecto al observado en el tratamiento Control (933 g MS/día), el consumo aumentó ($p<0,05$) en los tratamientos con aceites puros de soja (950 g; +1,8%) y de lino (965 g; +3,4%) y también en el tratamiento 50- 50 (964 g; +3,3%) resultando numéricamente menor ($p>0,05$) en los tratamientos AS75 y AS25 (925 y 932 g MS/oveja/día, respectivamente). A partir de la medición grupal del consumo de heno, el consumo total promedio calculado fue de 3245 g MS/oveja/día. La oferta de alimento concentrado fue de 1050 g MS/oveja/día y el consumo (g MS/oveja/día) promedio de heno de alfalfa y alimento concentrado fue de 2300 y 945, respectivamente. El consumo voluntario de MS no fue afectado ante la ingestión de 83,6 (\pm 33,6) g/oveja/día de lípidos (Martínez Marín *et al.* (2015) o por la inclusión de aceite de soja al 6 % en la ración (Hervás *et al.*, 2008) resultados consistentes con los obtenidos en el presente trabajo. Una reducción en el CMS ante la suplementación con aceites vegetales ricos en ácidos grasos insaturados (**AGI**) es un resultado frecuentemente observado (Shingfield *et al.*, 2006) y asociado a potenciales efectos perjudiciales sobre la fermentación ruminal (Jenkins, 1993). Martínez Marín *et al.* (2011b) informaron que la inclusión de lípidos en la dieta de los rumiantes habitualmente reduce la digestión de la fibra cuando el nivel de inclusión es superior al 4% de la MS. En el presente trabajo, el similar CMS ante el suministro de aceites al 7% de la ración sugiere ausencia de efectos negativos sobre la digestión ruminal como fue observado en vacas lecheras suplementadas con aceites poli-insaturados (Gagliostro *et al.*, 2017). Los resultados disponibles sobre tipo y/o procesado del forraje son escasos ya que la mayoría de los trabajos con ovejas han sido realizados utilizando forraje henificado y el número de especies vegetales involucradas es relativamente bajo (Chilliard *et al.*, 2007).

El consumo estimado (g/oveja/día) de los ácidos linoleico y linolénico provenientes del concentrado, del heno y de los aceites fue de 106 y 18 g/día en AS100- AL0, de 96 y 27 en AS75- AL25, de 79 y 46 en AS50- AL50, de 71-y 51 en AS25- AL75 y finalmente de 58 y 63 en AS0- AL100, respectivamente.

3.5.- Composición en ácidos grasos de la leche

El contenido de ácido butírico (C4:0, **AB**) no disminuyó o inclusive aumentó (AS100 y AS25) luego del consumo de aceites (Tabla 4) de acuerdo con lo informado por Chilliard *et al.* (2000). La consistente proporción de este AG (C4:0) o su aumento es un resultado positivo debido a sus potenciales efectos favorables sobre la salud humana (Chilliard *et al.*, 2000). El AB es en parte sintetizado por una vía malonil-CoA independiente y por lo tanto no asociada a la actividad de la acetil CoA carboxilasa (**ACC**) enzima que resulta inhibida por los AG exógenos (Chilliard *et al.*, 2000; Chilliard y Ferlay, 2004).

Tabla 4. Perfil en ácidos grasos de la leche en ovejas lecheras suplementadas con diferentes mezclas de aceites de soya de lino.

Ácidos Grasos (g/100g del total de AG)	Tratamiento ¹						EEM	P ² T
	Control	AS100- AL0	AS75- AL25	AS50- AL50	AS25- AL75	AS0- AL100		
C4:0	2,62 ^{bc}	2,84 ^a	2,53 ^c	2,51 ^c	2,75 ^{ab}	2,72 ^{abc}	0,074	0,03
C6:0	2,74 ^a	1,78 ^d	2,17 ^b	2,12 ^{bc}	2,18 ^b	1,90 ^{cd}	0,08	<0,0001
C8:0	2,94 ^a	1,50 ^d	2,21 ^b	2,14 ^b	2,13 ^{bc}	1,78 ^{cd}	0,12	<0,0001
C10:0	9,21 ^a	4,18 ^d	6,43 ^{bc}	6,45 ^b	6,11 ^{bc}	5,30 ^{cd}	0,39	<0,0001
C10:1	0,39 ^a	0,11 ^c	0,19 ^b	0,20 ^b	0,18 ^b	0,14 ^{bc}	0,02	<0,0001
C12:0	5,38 ^a	2,91 ^b	3,58 ^b	3,73 ^b	3,59 ^b	3,36 ^b	0,19	<0,0001
C12:1	0,10 ^a	0,06 ^c	0,07 ^b	0,08 ^b	0,08 ^b	0,07 ^{bc}	0,005	<0,0001
C14:0	10,68 ^a	8,39 ^c	7,27 ^b	9,07 ^{bc}	9,28 ^b	8,85 ^{bc}	0,28	0,001
C14:1	0,29 ^a	0,14 ^c	0,17 ^{bc}	0,17 ^{bc}	0,18 ^b	0,16 ^{bc}	0,01	<0,0001
IsoC15:0	0,13 ^a	0,09 ^b	0,08 ^b	0,09 ^b	0,10 ^b	0,09 ^b	0,01	0,02
C15:0	1,03 ^a	0,65 ^c	0,75 ^b	0,75 ^b	0,78 ^b	0,75 ^b	0,03	<0,0001
C15:1	0,22 ^a	0,12 ^c	0,13 ^{bc}	0,13 ^{bc}	0,14 ^b	0,13 ^{bc}	0,005	<0,0001
C16:0	25,34 ^a	20,01 ^b	20,07 ^b	20,11 ^b	20,40 ^b	20,38 ^b	0,63	<0,0001
C16:1	1,04 ^a	0,47 ^b	0,59 ^b	0,59 ^b	0,57 ^b	0,52 ^b	0,04	<0,0001
C17:0	0,55 ^a	0,44 ^b	0,42 ^b	0,41 ^b	0,44 ^b	0,43 ^b	0,02	<0,0001
C17:1	0,24 ^a	0,11 ^b	0,11 ^b	0,11 ^b	0,12 ^b	0,12 ^b	0,009	<0,0001
C18:0	6,11 ^c	7,89 ^a	6,95 ^{abc}	6,01 ^c	7,27 ^{ab}	6,79 ^{bc}	0,36	0,01
C18:1								
<i>Trans</i> -8	0,54 ^c	0,87 ^a	0,79 ^{ab}	0,74 ^b	0,76 ^{ab}	0,78 ^{ab}	0,04	0,0002
<i>Trans</i> -9	0,45 ^c	0,56 ^b	0,58 ^b	0,67 ^a	0,58 ^b	0,54 ^b	0,03	0,0007
<i>Trans</i> -10	2,07 ^c	6,20 ^a	4,84 ^b	3,94 ^{bc}	3,51 ^{bc}	3,11 ^{bc}	0,69	0,004
<i>Trans</i> -11 (AV)	2,26 ^b	4,98 ^a	5,50 ^a	5,63 ^a	5,76 ^a	5,20 ^a	0,53	0,006
<i>Trans</i> totales	5,32 ^c	12,61 ^a	11,71 ^{ab}	10,98 ^b	10,61 ^b	9,63 ^b	0,52	<0,0001
C18:1 <i>cis</i> -9	16,57 ^b	18,40 ^a	16,94 ^b	16,89 ^b	17,32 ^{ab}	18,48 ^a	0,46	0,03
C18:1 <i>cis</i> -11	0,71 ^b	1,09 ^b	1,06 ^a	1,03 ^a	1,06 ^a	1,14 ^a	0,04	<0,0001
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 (n-6)	6,51 ^c	11,25 ^a	9,34 ^b	9,31 ^b	8,08 ^b	9,18 ^b	0,45	<0,0001
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -5(n-3)	0,63 ^d	1,97 ^c	2,40 ^c	3,24 ^b	3,49 ^b	5,18 ^a	0,22	<0,0001
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 (AR)	1,50 ^b	2,42 ^a	2,79 ^a	3,04 ^a	2,72 ^a	2,50 ^a	0,30	0,02
C20:4 AA	0,26 ^a	0,18 ^{bc}	0,19 ^b	0,18 ^{bc}	0,15 ^c	0,15 ^{bc}	0,012	<0,0001
C20:5 EPA	0,07 ^b	0,06 ^c	0,07 ^b	0,09 ^a	0,07 ^b	0,10 ^a	0,005	<0,0001
C22:6 DHA	0,06 ^a	0,04 ^b	0,06 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a	0,05 ^{ab}	0,004	0,03

AG cadena corta ⁴	17,88 ^a	10,42 ^d	13,57 ^b	13,43 ^b	13,36 ^{bc}	11,79 ^{cd}	0,54	<0,0001
AG cadena media ⁵	44,76 ^a	33,34 ^b	35,51 ^b	35,37 ^b	35,74 ^b	34,46 ^b	0,94	<0,0001
AG cadena larga ⁶	37,38 ^a	56,13 ^c	49,76 ^b	51,71 ^b	50,55 ^b	52,58 ^b	1,01	<0,0001
Ácidos grasos saturados (AGS)	66,5 ^a	50,68 ^c	54,19 ^b	53,82 ^b	54,94 ^b	52,29 ^{bc}	0,97	<0,0001
Ácidos grasos insaturados (AGI)	33,48 ^c	49,30 ^a	45,83 ^b	46,15 ^b	45,05 ^b	47,70 ^{ab}	0,96	<0,0001
AGS/AGI	2,03 ^a	1,03 ^c	1,19 ^{bc}	1,18 ^{bc}	1,23 ^b	1,12 ^{bc}	0,05	<0,0001
ÍA ⁷	2,23 ^a	1,15 ^c	1,30 ^{bc}	1,32 ^{bc}	1,37 ^b	1,26 ^{bc}	0,07	<0,0001
Productos Δ 9-D	25,42 ^c	35,48 ^a	33,28 ^{ab}	32,67 ^b	32,70 ^b	32,96 ^b	0,80	<,0001
Índex ⁸	0,34 ^b	0,41 ^a	0,41 ^a	0,41 ^a	0,40 ^a	0,41 ^a	0,006	<,0001
AG de <i>novo</i> (C4:0-C15:1)	35,41 ^a	22,59 ^c	26,87 ^b	27,30 ^b	27,33 ^b	25,19 ^{bc}	0,90	<0,0001
AG preformados (>17:0)	38,11 ^c	56,67 ^a	51,85 ^b	51,52 ^b	51,55 ^b	54,06 ^a	0,70	<0,0001
n-6/n-3	7,27 ^a	5,66 ^b	3,79 ^c	2,87 ^d	2,32 ^{de}	1,89 ^e	0,20	<0,0001
AR/AV	0,69 ^a	0,46 ^c	0,47 ^{bc}	0,54 ^b	0,48 ^{bc}	0,47 ^{bc}	0,03	<0,0001
Σ (12:0,14:0,16:0)	41,26 ^a	31,32 ^b	33,04 ^b	33,15 ^b	33,29 ^b	32,31 ^b	0,89	<0,0001

^{a,b,c,d,e} Medias dentro de fila con distinta letra difieren significativamente (test Tukey-Kramer, $P < 0,05$). ¹Valores expresados a través de las medias mínimas cuadráticas (LSMeans) y el error estándar de las LSMeans (EEM). Control (C) sin aceites, 240g aceite de soja (AS100- AL0), 180g aceite de soja y 60g aceite de lino (AS75- AL25), 120 g aceite de soja y 120 g aceite de lino (AS50 – AL50) 60g aceite de soja y 180g aceite de lino (AS25- AL75), 240g aceite de lino (AS0- AL100). ²Efecto tratamiento. ⁴Ácidos grasos de cadena corta: (C6:0 a C10:0), ⁵Ácidos grasos de cadena media: (C12:0 a C17:1), ⁶Ácidos grasos de cadena larga: (C18:0 a C22:6), ⁷Índice de aterogenicidad: $(C12+4*C14+C16)/(\Sigma AGI)$ los AGI de la fórmula son: C14:1 *cis*-9, C16:1, *cis*-9 C18:1, *cis*-11 C18:1, *trans*-11 C18:1, C18:3, C18:2, *cis*-9 *trans*-11 C18:2 CLA, Se excluyeron los AG no saludables (*trans*-8,9,10), ⁸Índex: $([\Sigma \text{productos } \Delta 9\text{-D}]/[\Sigma \text{productos } \Delta 9\text{-D} + \text{Sustratos}])$. T=tratamiento.

Respecto a la leche Control, la concentración total de los AG de 6 a 12 átomos de carbono fue significativamente disminuida ante el consumo de aceites puros o sus mezclas (Tabla 4) aspecto relevante en la leche ovina por los aromas y sabores característicos que estos AG le confieren a los productos siendo a su vez parcialmente responsables del valor económico de los lácteos ovinos (Busetti, 2006) Los ácidos caprílico (C8:0) y cáprico (C10:0) representan entre un 3 a 18 % de los AG totales mientras que en la leche vaca dicha contribución es de tan solo 3 a 5% (Busetti, 2006). El contenido de estos dos AG en la leche Control totalizó un 12,15% disminuyendo en promedio a 7,65 % ($p < 0,01$) en los tratamientos con aceites resultado frecuentemente observado ante el consumo de aceites no protegidos (Chilliard *et al.*, 2000). La concentración de AGS de cadena media (44,76 g/100 g del total de AG) disminuyó a un valor promedio de 34,88 g/100g del total de AG (-22%, $p < 0,05$) ante el consumo de aceites sin diferencias entre mezclas ($p > 0,05$).

La disminución observada en todos los tratamientos de la concentración de los AG sintetizados *de novo* (C4:0 a C15:1) resultó importante registrándose los menores valores en AS100 y AL100. El efecto puede explicarse por la inhibición en la actividad de las enzimas lipogénicas mamarias como la ACC (Christie, 1981; Storry, 1981). Dicha caída fue aparentemente compensada por un incremento en la captura mamaria de los AG preformados ya que ni la concentración ni la secreción de grasa láctea disminuyó (Tabla 3) a pesar del importante incremento en la concentración del *trans*-10 C18:1 en leche observado en AS100 y AS75 (Tabla 4) y de la correlación negativa ($R^2=0,46$, $p<0,05$) entre este isómero *trans*-10 y la concentración grasa de la leche (Figura 2) en concordancia con lo informado por Piperova *et al.* (2000) y Antonacci *et al.* (2017).

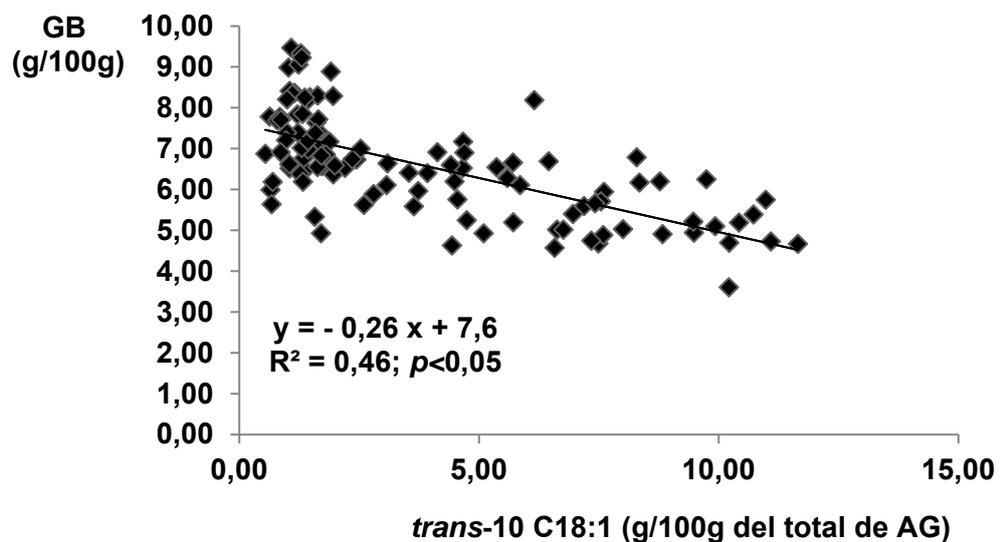


Figura 2. Relación entre la concentración grasa de la leche (GB) y los niveles de *trans*-10 C18:1 en ovejas lecheras suplementadas con aceites vegetales poliinsaturados.

En los bovinos, la disminución en el tenor graso de la leche ante el consumo de AGPI también está frecuentemente asociada a un aumento en los niveles de *trans*-10 C18:1 (Piperova *et al.*, 2000; Antonacci *et al.*, 2017). La presencia de *trans*-10 C18:1 y/o de sus compuestos relacionados (*trans*-10, *cis*-12 C18:2) han sido asociados a disfunciones en la actividad de enzimas como la lipoproteína lipasa (**LPL**) y la estearil CoA desaturasa (**SCD**) involucradas en la captura (LPL) y síntesis de AG lo que explica la caída en el tenor graso de la leche.

El IA basal en la leche Control (2,23) fue reducido por el consumo de aceites como consecuencia de una importante disminución en la concentración de los AGS de C12:0 a C16:0 átomos de carbono y al incremento en los AGI sin diferencias importantes entre las mezclas de aceites. En efecto, y en relación al tratamiento Control, el nivel total de los AG pro-aterogénicos (C12:0 a C16:0) disminuyó (-21%) desde 41,26 g/100g del total de AG a un promedio de 32,62 g/100g del total de AG resultado que como ya fue comentado podría explicarse por el efecto inhibitorio de ciertos AG (*trans*-10 C18:1, *trans*-10, *cis*-12 C18:2) sobre la lipogénesis mamaria *de novo*. El resultado es relevante ya que contribuye a prevenir un consumo excesivo de AGS no saludables, mejora el valor nutricional de la leche y reduce el potencial aterogénico de la grasa láctea ovina. La reducción promedio (19,7%) en el contenido de ácido mirístico respecto a Control (Tabla 4) es importante ya que el rol pro-aterogénico del mismo (C14:0) es considerado como muy potente (Ulbricht y Southgate, 1991).

El menor nivel de AGS (Tabla 4) mejora el valor nutricional de la leche por su asociación con la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Mensink *et al.*, 2003). Una tendencia similar y más acentuada a disminuir el nivel de AGS de cadena media fue también observada por Hervás *et al.* (2008) ante la inclusión de AG insaturados al 6% de la ración y por Gómez-Cortés *et al.* (2011) con la inclusión de niveles crecientes de los mismos a una dieta basal de alta relación C:F (80:20).

Los niveles basales de *trans*-9 C18:1 (0,45 g/100g del total de AG) se incrementaron ($p < 0,05$) en todos los tratamientos mientras que los de *trans*-10 C18:1 (2,07 g/100g del total de AG) lo hicieron sólo en los tratamientos con predominio de aceite de soja (AS100=6,20 y AS75=4,84 g/100g del total de AG, Tabla 4). Resulta aconsejable evitar todo consumo excesivo de *trans*-10 C18:1 ya que en conejos sometidos a un desafío hipercolesterolémico (0,2 % de inclusión de colesterol en la ración), el consumo de una manteca rica en *trans*-10 C18:1 (13% de la ración) incrementó el colesterol VLDL, el total y el LDL reduciendo la concentración de colesterol HDL con un incremento en la deposición lipídica en arteria aorta. En cambio, los animales que consumieron una manteca rica en AV y AR presentaron efectos neutros o una tendencia a reducir la deposición lipídica en dicha arteria (Roy *et al.*, 2007).

Puesto que los menores valores numéricos del *trans*-10 C18:1 (3,94 g/100g del total de AG) y los mayores valores numéricos de AR (3,04 g/100g del total de AG) fueron encontrados en el tratamiento 50- 50 manteniendo una alta relación numérica entre el AR y el AV se destaca esta combinación de aceites como la más promisoría.

Los desvíos hacia la formación de este isómero no deseado (*trans*-10 C18:1) están asociados a la utilización de raciones muy ricas en almidón y mecanismos capaces de alterar la actividad microbiana ruminal asociada con la biohidrogenación(**BH**) de los AGPI y a la presencia de una fuente de ácido linoleico (Chilliard y Ferlay, 2004; Palmquist *et al.*, 2005). En una ración pobre en forraje y rica en concentrado (20:80), el consumo de cantidades crecientes de aceite de girasol (60, 117 y 167 g/oveja/día) generó aumentos significativos en el nivel de *trans*-10 C18:1 en leche el que se mantuvo constante y por debajo del 1% en la ración control (Gómez-Cortés *et al.*, 2011). Mele *et al.* (2006) observaron que niveles crecientes de concentrado generan aumentos significativos en la presencia de *trans*-10 C18:1 en la leche de oveja.

El contenido de AO aumentó ($p<0,05$) sólo en los tratamientos con aceites puros (AS100 y AL100) resultado consistente con lo observado en bovinos (Glasser *et al.*, 2008). Dicho aumento no pareció estar explicado por una mayor actividad de desaturación del ácido esteárico (Chilliard *et al.*, 2000; Lock y Garnsworthy, 2003) ya que la concentración del mismo no disminuyó o inclusive aumentó en AS100 y AS25. Podría en cambio explicarse por el aporte suplementario y captura a nivel mamario del AO contenido en los aceites (Tabla 2). Los aumentos en la concentración de C18:0 en AS100 y AS25 resultaron comparables a los informados por Gómez-Cortés *et al.* (2011) ante una dosis de 167 g/oveja/día de aceite de girasol en una ración alta en concentrado y por Castro-Carrera *et al.* (2015) con 2,5 % de inclusión de aceite de girasol en una ración 60:40 F:C.

El contenido de ácido linoleico en leche Control (6,51 g/100g del total de AG, Tabla 4) resultó muy superior al rango normal (2-3 g/100g del total de AG) informado para la leche bovina (Chilliard *et al.*, 2000). En todos los tratamientos con consumo de aceites, el nivel basal de este AG resultó fuertemente incrementado (44,9% en promedio, $p<0,05$) alcanzando un máximo de 11,25 g/100g AG en AS100. Estos valores resultan superiores a los máximos reportados por Chilliard y Ferlay (2004) para vacas lecheras suplementadas con aceites de soja y lino (4 g/100g del total de AG) o al rango (2,74-3,92 g/100g del total de AG) observado en alimentación pastoril por Antonacci *et al.* (2013; 2017). Estos resultados discrepan con lo informado por Gómez-Cortés *et al.* (2011) quienes reportan un menor impacto sobre los niveles de ácido linoleico en leche (2,63; 2,87 y 2,95 g/100g del total de AG) ante el consumo creciente (60, 117 y 167 g/oveja/día) de aceite de girasol en la ración. En vacas o cabras suplementadas con fuentes de ácido linoleico, la presencia de este AG en leche no supera en general en más de 1,5 unidades porcentuales al valor basal (Chilliard y Ferlay, 2004) con

aumentos en la leche de oveja o de cabra comprendidos entre +0,5 y +1,8 g/100g del total de AG a una tasa de incremento de 0,07% ($\pm 0,02$) por gramo de ácido linoleico/kg de la MS ingerida (Chilliard *et al.*, 2007) resultados no consistentes con lo observado en el presente experimento. Otros estudios realizados con ovejas (Hervás *et al.*, 2008; Castro *et al.*, 2009) resultaron consistentes con Chilliard *et al.* (2007).

Los derivados no conjugados del ácido linoleico que escapan a la BH ruminal forman parte de los fosfolípidos y ésteres de colesterol los que resultan pobremente utilizados (3%) por la glándula mamaria (Tyburczy *et al.*, 2008).

El nivel de AV (hipocolesterolémico, antiaterogénico y precursor del AR) en la leche de las ovejas del tratamiento Control fue de 2,26 g/100g del total de AG experimentando un fuerte incremento (140%, $p < 0,05$) ante el consumo de aceite en todos los tratamientos sin diferencias entre combinaciones de aceites. Los valores numéricos aumentaron con la inclusión creciente de AL en la mezcla hasta un máximo de 75% para luego decaer en el tratamiento 100% AL (Tabla 4).

En la leche control, el AV representó el 42,5 % del total de los AG-*t* C18:1 valor que se mantuvo en un rango de 39-54% en los tratamientos con consumo de aceites. Estas proporciones (AR/AV) resultan bajas en comparación a los valores observados en la leche de vacas en pastoreo (77-82%) suplementadas con las mismas mezclas de aceites (Antonacci *et al.*, 2017). La diferencia se explicaría en parte por la mayor presencia de *trans*-9 y sobre todo del *trans*-10 C18:1 en las leches ovinas de post suplementación.

Los cambios observados en los niveles de *trans*-10 C18:1 y de AV son consistentes con lo informado en Toral *et al.* (2010) luego de la suplementación al 2% con aceites de girasol y de pescado (*trans*-10 C18:1=6,48 g/100g del total de AG y AV=8,05 g/100g del total de AG) en una ración con 80% de concentrado y similar a lo observado por Gómez-Cortés *et al.* (2011) luego de la suplementación con aceite de girasol (167g) a ovejas lecheras (*trans*-10 C18:1=3,74 y AV=8,50 g/100g del total de AG). El aporte de AS al 6% de una ración F:C=20:80 provocó un transitorio aumento en los niveles de AV durante la primera semana con un importante aumento posterior en los niveles de *trans*-10 C18:1 (10 g/100g del total de AG). Por su parte, Castro-Carrera *et al.* (2015) informaron un incremento del 79% en el AV (2,36 g/100g del total de AG) respecto al valor basal (1,32 g/100g del total de AG) al suplementar la dieta ovina con aceite de girasol al 2,5% del CMST.

Los mayores valores de ácidos grasos *trans*(AG-*t*)C18:1 totales en la leche ovina se obtendrían en alimentación base pastoril ($5,7 \pm 1,1$ g/100g del total de AG) en

relación a sistemas estabulados ($3,4 \pm 2,5$ g/100g del total de AG) siendo el isómero mayoritario el *trans*-11 C18:1 (2 a 3,5%) al igual que en la vaca y la cabra (Chilliard *et al.*, 2007). Dichos valores promedio resultan menores a los obtenidos en el presente trabajo sin la presencia de forraje fresco (Tabla 4).

En el ser humano, el AV puede ejercer efectos anticarcinogénicos directos (Awad *et al.*, 1995) o mediados vía conversión endógena al AR (*cis*-9, *trans*-11 C18:2) a una tasa estimada del 20% (Turpeinen *et al.*, 2002) por acción de la desaturasa (Parodi, 2003). Esta vía ha demostrado ser una efectiva prevención del cáncer químicamente inducido en ratas (Banni *et al.*, 2001) e incrementa la biodisponibilidad del AR en los tejidos (Siurana y Calsamiglia, 2016).

En el presente trabajo en ovinos, la tasa de conversión promedio del AV en AR pareció situarse en un 43% (Figura 3) valor superior al 33% informado por Griinari y Bauman (1999) en vacas lecheras. Tomando como estimador la relación AR/AV, la conversión promedio en los tratamientos con aceites resultó del orden del 48 ($\pm 3,2$) % (Tabla 4) semejante al valor de 50% informado por Castro-Carrera *et al.* (2015) y mayores a los informados (35 y 30%) por otros autores (Toral *et al.*, 2010; Gómez-Cortés *et al.*, 2011). En vacas lecheras, se ha propuesto una tasa de conversión promedio del orden del 41% (Chilliard *et al.*, 2007) valor cercano al obtenido en el presente trabajo (Figura 3).

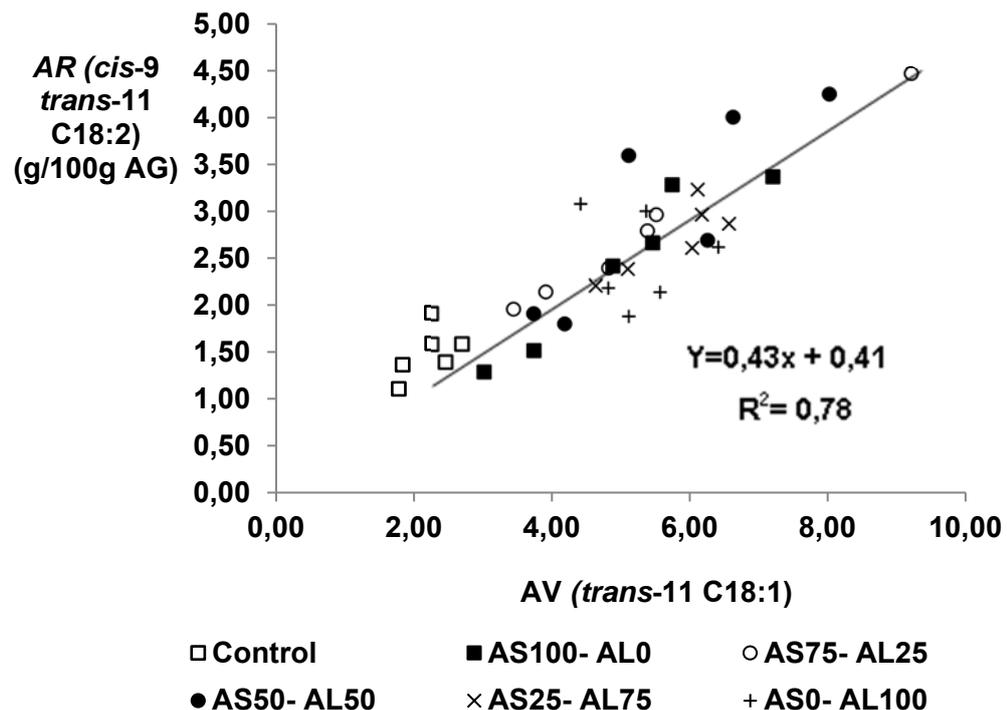


Figura 3. Relación entre la concentración de ácido vaccénico (AV, *trans*-11 C18:1) y la de ácido ruménico (AR, *cis*-9 *trans*-11 C18:2 CLA) en leche de ovejas.

El nivel basal de AR (1,50 g/100g del total de AG, Tabla 4) resultó mayor a los valores informados para ovejas lecheras alimentadas con raciones sin forraje fresco ($0,6 \pm 0,30$ g/100g del total de AG) y cercano a lo observado en ovejas en pastoreo ($1,6 \pm 0,53$ g/100g del total de AG) o a los valores de $1,3 (\pm 0,6)$ g/100g del total de AG observados en alimentación pastoril y concentrados no enriquecidos en lípidos (Chilliard *et al.*, 2007). Dicho nivel basal aumentó 1,79 veces ($p < 0,05$) luego del consumo de aceite (Tabla 4) sin diferencias ($p > 0,05$) entre mezclas. El valor numérico más alto de AR fue observado en el tratamiento AS50-AL50 (3,04 g/100g del total de AG) y los menores se registraron cuando los aceites fueron suministrados en forma pura (AS y AL 100%, Tabla 4). Castro-Carrera *et al.* (2015) informaron valores basales de AR de 0,69 g/100g del total de AG en raciones F:C=60:40 alcanzando valores de 1,18 g/100g del total de AG luego de la inclusión de aceite de girasol al 2,5 % del CMST. Los incrementos registrados en el AV y en el AR (Tabla 4) son relevantes por sus efectos protectores sobre el riesgo cardiovascular (Lock *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2010) y sus promisorias propiedades anti-carcinogénicas (Gagliostro, 2004a; Kelley *et al.*, 2007). El aporte de aceite de girasol al 5,1% de la ración permitió alcanzar niveles de AR del orden de 2,19g/100g del total de AG en leche ovina (Gómez-Cortés *et al.*, 2011) resultado comparable al 2,31 g/100g del total de AG obtenido en una ración similar y una inclusión menor (2%) de aceite (Toral *et al.*, 2010). En una ración rica en concentrado (80%), el aporte suplementario de AS al 6% generó un aumento transitorio del AR ya que el nivel comenzó a decaer luego de la primera semana de consumo de aceite (Gómez-Cortés *et al.*, 2008). En el presente trabajo, los valores más altos de AR en leche fueron observados en la semana 3 de ensayo (Figura 4) sin un patrón bien definido o diferente entre las combinaciones de aceites ensayadas.

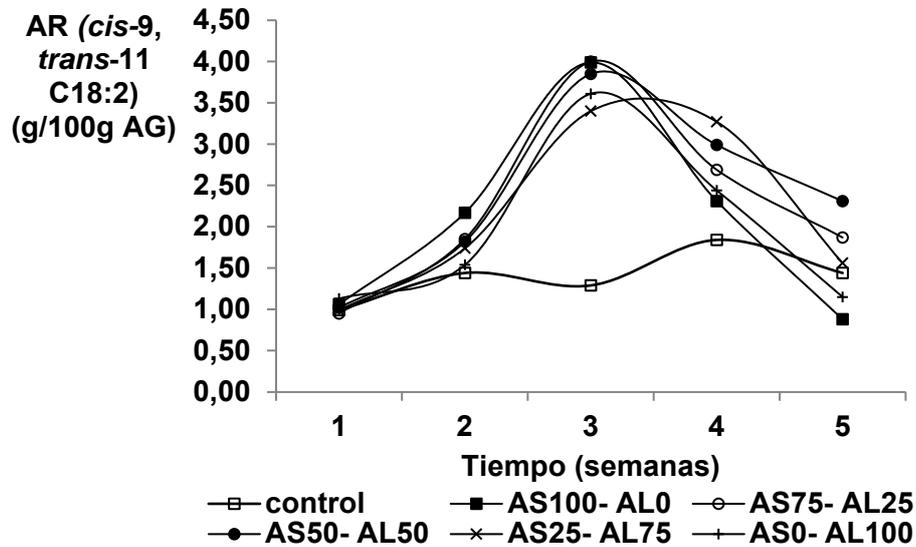


Figura 4. Concentración promedio de ácido ruménico (AR, *cis*-9, *trans*-11 C18:2 CLA) en muestras de leche obtenidas durante cinco semanas de ensayo.

Un nivel de AR del orden de 2,59 g/100g del total de AG podría mantenerse con la inclusión de 117 y 167 g/oveja/día de aceite de girasol lo que a su vez generaría elevados incrementos del *trans*-10 C18:1 por lo que resultará necesario explorar alternativas (Gómez-Cortés *et al.*, 2011) como la utilización de la mezcla AS50- AL50 que pareció presentar la mayor persistencia (Figura 4).

En el presente trabajo, el nivel basal de AV y de AR así como también los incrementos registrados luego de la ingestión de aceites resultaron inferiores a los obtenidos en vacas lecheras en pastoreo consumiendo similares combinaciones de AS y de AL (Antonacci *et al.*, 2017). El enriquecimiento de la leche y del queso de oveja con compuestos bioactivos como el AV, AR y ácido linolénico ha adquirido relevancia debido a los promisorios resultados obtenidos en salud humana (Pulina *et al.*, 2014).

En efecto, en sujetos clínicamente sanos, el consumo de 200 g por semana durante 10 semanas de un queso de alto contenido de AV (3,26 g/100g del total de AG) y de AR (1,56 g/100g del total de AG) en comparación al consumo de un queso estándar (AV=0,4 y AR=0,19 g/100g del total de AG) produjo favorables cambios bioquímicos en los marcadores ateroscleróticos (Sofi *et al.*, 2010). En individuos hipercolesterolémicos, la ingesta de queso ovino rico en AR (2,5 g/100g del total de AG) disminuyó (7%) las concentraciones plasmáticas de LDL colesterol en comparación con un queso control conteniendo 1,5 g de AR/100g del total de AG (Pintus *et al.*, 2013).

En el presente trabajo, la reducción en el total de AGS respecto al Control inducida por el consumo de aceites fue en promedio de 0,8 veces mientras que el aumento de los AGI fue de 1,4 veces ($p < 0,05$) sin diferencias importantes entre mezclas (Tabla 4). La grasa láctea de ovejas de raza Pampinta presenta un menor contenido en AG de cadena larga (**AGCL**) y un nivel más alto de los AG de cadena corta (**AGCC**) que la leche de vaca. Los ácidos cáprico, laúrico, mirístico, palmítico y oleico representan el 65% del total de AG (Buseti, 2006) valores consistentes con los encontrados en la leche de ovejas Control del presente trabajo (67%). La mayoría de los AG de la leche presentó importantes modificaciones ante el consumo de aceites o sus mezclas generando un aumento del contenido de los AG de 18 átomos de carbono a expensas del contenido de los AGS. Este patrón de respuesta ha sido reportado en vacas y cabras (Chilliard y Ferlay, 2004; Gagliostro, 2004c) así como en ovejas alimentadas con altos niveles de AS (Mele *et al.*, 2006; Gómez-Cortés *et al.*, 2008).

El nivel de ácido linolénico (C18:3n-3) en leche aumentó ante el consumo creciente de AL con un aumento promedio del orden de 400% en relación a la leche Control. No se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos 100AS y AS75-AL25 ni entre AS50-AL50 y AS25-AL75 pero si entre AL100 y el resto de las mezclas (Tabla 4). El aporte de aceite de lino al 4% del CMS incrementó la concentración de ácido linolénico en leche (+170%) respecto al Control sin efectos del AS o la mezcla (50-50) de ambos en vacas lecheras (Bu *et al.*, 2007).

La relación n-6/n-3 en la leche Control resultó relativamente alta (7,27) y fue disminuida ($p < 0,05$) ante la inclusión de AL en las mezclas alcanzando los valores más bajos (2,32 y 1,89) en AL75 y AL100 (Tabla 4). En ovejas lecheras suplementadas con aceite de girasol (2%) la relación n-6/n-3 fue de 8,14 (Toral *et al.*, 2010) y por lo tanto muy superior a lo registrado en AS100 (5,66) incluido al 7% de la ración. En vacas lecheras (Bu *et al.*, 2007) la menor relación n-6/n-3 fue observada ante el suministro de aceite de lino al 4% del CMS (2,13) con un resultado intermedio ante la mezcla AS50-AL50 (3,44) y sin diferencias respecto al control (4,25) cuando se suministró AS puro (4,35). Valores menores a 4 de este parámetro (n-6/n-3) se asocian a una disminución de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares y riesgo de cáncer de mama con efectos positivos sobre enfermedades crónicas como el cáncer de colon y la artritis reumatoide (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2012). Trabajos recientes también informan efectos positivos sobre la depresión (Husted *et al.*, 2016). En el presente trabajo, los valores registrados estuvieron por debajo de 4 a partir del tratamiento AS75 (Tabla 4).

El total de AGI en los tratamientos con mezclas de aceites se incrementó (+40%) significativamente ($p < 0,05$) en relación al Control sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los aceites puros pero sí ($p < 0,05$) entre AS100 y los tratamientos con inclusión de AL, sus mezclas con AS y AL100 (Tabla 4).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos confirman la existencia de una importante plasticidad en la composición de AG de la leche ovina ante el aporte de lípidos poliinsaturados aspecto que puede ser ventajosamente utilizado para mejorar el valor nutricional del alimento y sus derivados. El consumo de aceites poliinsaturados al 7% de una ración compuesta por forraje (71%) y concentrado (29%) no afectó la respuesta productiva ni el rendimiento y contenido de la grasa láctea, lactosa y sólidos totales, con aumentos positivos sobre el contenido de proteína. El extracto quesero y el recuento de células somáticas tampoco se vieron afectados por el consumo de aceite suplementario lo que constituye una estrategia de alimentación válida para producir leche ovina destinada a industrialización quesera. Respecto al valor nutricional de la leche y su relación con salud humana se destaca la disminución obtenida de los ácidos grasos potencialmente hipercolesterolémicos (C12:0, C14:0 y C16:0) y los incrementos en los AG bioactivos como el vaccénico, el ruménico, el oleico y el linolénico con ausencia de desvíos importantes hacia el isómeros deletéreos como los *trans*-9 y *trans*-10 C18:1. Estas propiedades representan una potencial ventaja para la salud del consumidor y para el agregado de valor en origen obtenido por vías naturales como la alimentación. Tomados en conjunto, los resultados sugieren que la combinación de aceites de soja y de lino al 50% generó el mayor número de cambios nutricionales favorables en la leche ovina teniendo en cuenta como criterios la disminución de la fracción hipercolesterolémica, el aumento simultáneo en los niveles de los ácidos vaccénico, ruménico y linolénico con una relación n-6/n-3 menor a 4 y un IA menor a 2. La cantidad óptima de la mezcla de aceites a suministrar (ensayos de dosis-respuesta) y la persistencia de los favorables cambios inducidos en la leche a través de la alimentación son aspectos que merecen ser abordados experimentalmente.

CAPITULO IV

EVALUACIONES BIOQUÍMICO NUTRICIONALES DE UNA POTENCIAL GRASA LÁCTEA FUNCIONAL BOVINA EN ANIMALES EXPERIMENTALES

Este capítulo de trabajo de tesis doctoral satisface el objetivo específico 4. La GL y GLF se colectaron a través de un ensayo zootécnico llevado a cabo en la EEA. INTA Rafaela. Provincia de Santa Fe (VER APÉNDICE).

RESUMEN

Ratas macho jóvenes (n=192) de la cepa Wistar con un peso vivo de aproximadamente 100g y luego de un periodo de aclimatación fueron aleatoriamente divididas en 8 grupos dietarios según el origen y nivel de grasa: Soja (S), grasa láctea (GL), grasa láctea funcional (GLF) y grasa láctea estandarizada (GLE) al 7% y 30% (p/p), respectivamente. Los animales recibieron agua de bebida y las respectivas dietas *ad libitum*. Durante 60 días de tratamiento dietario, se siguió la ingesta de alimentos y se registraron los pesos corporales de los animales. Al final de dicho período, las ratas fueron anestesiadas con el objetivo de tomar muestras de sangre y sacrificadas para la obtención de tejidos y así, valorar parámetros nutricionales y del metabolismo lipídico y glucídico. Los resultados, expresados como promedios \pm EEM, se compararon mediante ANOVA donde las variables independientes fueron el nivel de grasa dietaria (7 o 30%) y el origen de la grasa en la dieta, seguido del test de tukey, fijando una significancia estadística a un $p < 0,05$. La ganancia de peso de los animales mostró diferencias por el origen de la grasa dietaria, y un mayor incremento de peso por efecto del nivel de grasa (30%). Los niveles de colesterol y TG sérico disminuyeron en el grupo GLF a niveles recomendados de grasa. Los TG hepáticos disminuyeron a niveles recomendados de grasa en el grupo experimental GLF. Los isómeros: ácido ruménico (AR) y ácido vaccénico (AV) fueron incorporados y retenidos en hígado, tejido adiposo y suero asociados a cambios en los perfiles de los otros AG. Específicamente, los mayores niveles de AV y AR en hígado fueron encontrados en aquellos animales alimentados con GLF30. Los AGS en hígado de animales alimentados con 30% de grasa dietaria, como era de esperar, incrementaron por el tratamiento con GL, GLF y GLE; no obstante en hígados de animales del grupo GLF30, mostró niveles significativamente menores que aquellos correspondientes a

GL y GLE. Estos cambios fueron a expensas de mayores niveles de AG monoinsaturados (AGMI) con configuración *cis* y a la incorporación de isómeros, principalmente AV y AR. Además, a nivel hepático es de manifestar el mejoramiento de la relación entre los AG poliinsaturados (AGPI) de las familias n-6/ n-3 [(expresado por las relaciones de los niveles totales de AGPI, Ácido Linoleico (ALi)/ Ácido α -Linolénico(ALn) y Ácido Araquidónico (AA)/ Ácido Eicosapentaenoico (EPA))] producto de la ingesta de GLF30. Así como fuera observado en hígado, en tejido adiposo epididimal de animales alimentados con GLF al 30% se observaron los máximos niveles de AV y AR. Además, la GLF al 30% en el tejido adiposo mejoró el perfil de AGS, junto con la relación de AGPI n-6/ n-3. En suero de animales ayunados, los niveles de AV y AR, fueron relacionados a sus ingestas, así en el grupo GLF30 se observaron las concentraciones más elevadas de dichos AG funcionales. El perfil de AG circulantes de los animales alimentados con GLF30 mostró notables mejoras respecto al de la GL y GLE, mostrando entre ellas una menor relación AGS/AGMI, ALi/ALn y AA/EPA. A niveles elevados de grasa la actividad de las enzimas ACC y CPT-I disminuyó con aumentos en los niveles de ARNm PPAR- α . La expresión del factor de transcripción SREBP-1 disminuyó con incrementos en la de las enzimas FAS y SCD1. En referencia al metabolismo de la glucosa los resultados de los niveles de glucemia muestran que la GLF30 presentó niveles de glucemias inferiores a aquellos observados con S30, como también con GL30 y GLE30 pero sin diferencias significativas. De acuerdo a los resultados, se puede concluir que la GLF caracterizada por bajos niveles de AGS y elevado contenido de AR y AV, condujo a una reducción de acumulación de lípidos hepáticos y a mejoras en el metabolismo lipídico y glucídico. Dichos efectos benéficos han sido asociados a una significativa retención de AG potencialmente funcionales y a unas sustanciales mejoras del perfil de los AG circulantes y tisulares. Así el conocimiento de los efectos benéficos que presentan la GLF desarrollada y los mecanismos de acción involucrados podrán contribuir a una mejor intervención o prevención de ECNT elevada incidencia en nuestra población.

ABSTRACT

Male Wistar rats after a period of acclimatization were randomly divided into 8 dietary groups according to origin and fat level: Soybean (S), milk fat (MF), functional milk fat

(FMF); standardized milk fat (SMF) at 7% and 30% (w / w), respectively. During 8 weeks of dietary treatment, the intake was followed and the body weights of the animals were recorded. At the end of this period, the rats were anesthetized for blood and tissue sampling. Samples were obtained for the evaluation of nutritional parameters, and lipid and glucose metabolism. The results, expressed as means \pm SEM, were compared by ANOVA where the independent variables were the dietary fat level (7 or 30%) and the type of fat in the diet, followed by the tukey test. The weight gain of the animals showed differences by the type of dietary fat, and a greater increase of weight by effect of fat level (30%). Cholesterol and serum TG levels decreased in the FMF group at recommended levels of fat. Hepatic TG decreased to the recommended levels of fat in the FMF experimental group. The isomers: rumeric acid (RA) and vaccenic acid (VA) were incorporated and retained in liver, adipose tissue and serum associated with changes in the profiles of the other MFs. Specifically, higher levels of VA and RA in liver were found in those animals fed FMF30. The SFA in liver of animals fed with 30% dietary fat, as expected, increased by treatment with MF, FMF and SF; However in livers in the FMF30 group, showed levels significantly lower than those corresponding to MF and SMF. These changes were at the expense of higher levels of monounsaturated FA (MUFA) with *cis* configuration and the incorporation of isomers, mainly VA and RA. In addition, at the hepatic level, the improvement in the ratio of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) of the n-6 / n-3 families [expressed by the ratio of total levels of PUFA, Linoleic Acid (ALi)/Linolenic acid (ALn) and Arachidonic acid (AA)/Eicosapentaenoic acid (EPA)] product of FMF30 intake. As observed in liver, in epididymal adipose tissue of animals fed with FMF30, the highest levels of VA and RA were observed. In addition, FMF30 in the AT improved the SFA profile, along with the PUFA n-6/n-3 ratio. In serum of fasted animals, VA and RA levels were related to their intakes, so in the FMF30 group the highest concentrations of these functional FAs were observed. The circulating FA profile of the animals fed with FMF30 showed remarkable improvements over MF and SMF, indicating a lower SFA/MUFA, ALi/ALn and AA/EPA ratio. At high fat levels the activity of the ACC and CPT-I enzymes decreased with increases in mRNA levels of PPAR- α . Gene expression of the SREBP-1 transcription factor decreased with increases in the FAS and SCD1 enzymes. In reference to glucose metabolism the results of the glycemia levels show that FMF30 presented lower levels of glycemia than those observed with S30, as well as MF30 and SMF30, but without significant differences. According to the results, it can be concluded that the FMF characterized by low levels of SFA and high

content of RA and VA, led to a reduction of hepatic lipid accumulation and to improvements in lipid and glucose metabolism. Such beneficial effects have been associated with a significant retention of potentially functional FAs and substantial improvements in the profile of circulating and tissue FA. Thus, knowledge of the beneficial effects of developed FMF and the mechanisms of action involved may contribute to a better intervention or prevention of chronic non-communicable diseases with a high incidence in our population.

INTRODUCCIÓN

Es ampliamente conocida la relación existente entre una elevada ingesta de lípidos y el incremento del riesgo de numerosas alteraciones metabólicas en el hombre. Las enfermedades crónicas no transmisibles (**ECNT**) están asociadas especialmente a factores nutricionales, ambientales y genéticos. Entre las ECNT más importantes se encuentran el cáncer, las enfermedades cardiovasculares (**ECV**) y la diabetes tipo 2.

Por otro lado, existen una serie de trastornos metabólicos considerados factores de riesgo para las ECNT como son la hipertensión seguido de sobrepeso-obesidad, la hiperlipemia y la hiperglucemia (OMS, 2015). Existen un conjunto de factores de riesgo individuales que se relacionan entre sí y unidos a otros como la resistencia a la insulina, obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa y estado pro-inflamatorio son determinantes del síndrome metabólico.

La hiperlipidemia o hiperlipemia es aquella condición en la que se elevan las concentraciones plasmáticas de los lípidos (colesterol, triglicéridos(**TG**) o ambos) y que tiene como consecuencia una mayor predisposición a padecer en humanos la ECV (Ross, 1999). Numerosos estudios han ido reafirmando la relación directa que existe entre estas enfermedades y sus complicaciones con las concentraciones elevadas de colesterol y triglicéridos (Roldan *et al.*, 2005).

Las ECV constituyen la primera causa de muerte en el mundo y se debe a la confluencia de múltiples factores como la falta de actividad física, el tabaquismo, la hipertensión arterial, la hiperlipemia, entre otros. La situación es muy alarmante si consideramos que las muertes por ECV exceden el 80% en países con ingresos medianos y bajos (OMS, 2012).

A pesar de que la hiperlipemia es relativamente asintomática, tiene consecuencias clínicas significativas a nivel individual y constituye además un importante problema de salud de gran impacto demográfico, sanitario y social (Rosas *et al.*, 2012).

Un estudio realizado en el 2006 en el que se incluyeron 995 casos de pacientes con diagnóstico de infarto de miocardio agudo (**IMA**), reportó que la muerte intrahospitalaria fue de 7,4% mientras que uno de los principales factores de riesgo fue la hiperlipemia (41,1%) (Reyes *et al.*, 2012)

Una de las complicaciones que genera la hiperlipemia es la aterosclerosis, que se define como la alteración patológica de las arterias. Se caracteriza por el depósito anormal de lípidos y tejido fibroso en la pared arterial, que desorganiza la estructura, la función de los vasos sanguíneos y reduce en forma variable el flujo de sangre (Digirolamo *et al.*, 1991).

Estudios conducidos en el laboratorio del Dr. Bernal y colaboradores (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe) han demostrado en animales de experimentación que dietas ricas en AGS producen hipertrigliceridemia, con acúmulo de TGen hígado y otros tejidos, asociados a profundas alteraciones en la utilización periférica de la glucosa. Esta asociación ha sido también observada en humanos, aunque las alteraciones presentan ciertas características diferenciales (Bernal *et al.*, 2006).

La relación existente entre elevadas ingestas de lípidos y las alteraciones observadas dependen de numerosos factores, como la especie, el sexo, la edad, pero el nivel y el origen de la grasa dietaria son dos factores determinantes de las modificaciones inducidas por los lípidos dietarios. Así, en diferentes modelos experimentales, el equipo del Dr. Bernal ha demostrado que un incremento del 7 % al 20 % (p/p) en la grasa dietaria induce una serie de modificaciones en el metabolismo lipídico y glucídico. Ciertos efectos pueden ser exacerbados y/o atenuados dependiendo del tipo de AG contenido en los lípidos dietarios (Bernal *et al.*, 2006; Veaute *et al.*, 2007; Saín *et al.*, 2012).

No todas las grasas saturadas tienen el mismo impacto sobre el metabolismo. El largo de cadena de los AGS es muy importante en el efecto que los mismos ejercen, razón que da justificación al hecho de que las grasas lácteas, caracterizadas por un elevado porcentaje de AGS de cadena corta, tengan diferentes efectos sobre la salud que las grasas saturadas animales presentes en las carnes rojas, o que distintas grasas saturadas de origen vegetal (Colandré *et al.*, 2003). Modificaciones en la relación Grasa Saturada/Grasa Insaturada dietaria también pueden inducir cambios en el metabolismo lipídico y glucídico en animales de experimentación del tipo de los que, en el hombre, incrementan la incidencia de ECNT, siendo el tipo de AGS e insaturado,

así como el equilibrio entre los AG insaturados factores determinantes de los efectos específicos de los lípidos dietarios.

El consumo de AG isoméricos pueden también tener un alto impacto sobre la salud, con efectos que varían dependiendo de la isomería que presenten (Saín *et al.*, 2009; Illesca *et al.*, 2009; Scalerandi *et al.*, 2009; Andreoli *et al.*, 2009; González *et al.*, 2010; Fariña, 2014). Así, mientras ingestas elevadas de AG con isomería geométrica *trans*(**AG-t**) incrementan el riesgo de ECNT, los CLA han mostrado ejercer efectos bioactivos benéficos (Andreoli *et al.*, 2007; 2010; 2012;). Así, a nivel experimental los CLA inhiben la carcinogénesis, son antiobesogénicos, y mejoran la respuesta inmune, así como el metabolismo glucídico y lipídico (Andreoli *et al.*, 2007; 2012). No obstante ello, también han sido demostrados efectos deletéreos en modelos animales, y las evidencias en humanos son aún muy escasas, como así también contradictorias.

Entre las causales de los resultados conflictivos observados, la especie animal y el tipo de CLA empleado en los estudios juegan un rol clave. Dentro de las acciones benéficas y deletéreas de los CLA han sido mostradas grandes diferencias en el efecto de los CLA de origen natural generados por rumiantes, rico en *cis*-9, *trans*-11 C18:2 y el de origen comercial, rico en cantidades equimoleculares de *cis*-9, *trans*-11 C18:2 y *trans*-10, *cis*-12 C18:2 (Scalerandi *et al.*, 2009E; Saín *et al.*, 2009; 2011F; 2011G).

El grupo de trabajo del Dr. Bernal ha trabajado en modelos experimentales enriquecidos con grasas saturadas, insaturadas e isoméricas, y durante los últimos años viene desarrollando distintos proyectos en el tema de isómeros CLA de origen comercial. En este último eje temático, dicho grupo ha trabajado con ratas y ratones en diferentes estadios de su vida y con distintos tratamientos nutricionales (Andreoli *et al.*, 2007, 2010; Scalerandi, 2013; Fariña, 2014, Illesca, 2015), dietas normales, hiperlipidémicas (ricas en grasas), dietas de recuperación nutricional post-depleción calórico-proteica y dietas con déficit parcial de ácidos grasos esenciales.

El presente trabajo espera contribuir al conocimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en el desarrollo y posible prevención de enfermedades de elevada morbi-mortalidad en nuestra población. Asimismo permitirá profundizar el conocimiento de las propiedades bioactivas de los CLA naturales, con miras a una posterior intervención o prevención de alteraciones metabólicas producidas nutricionalmente.

HIPÓTESIS

La GLF bovina obtenida, con sus niveles de CLA naturales aumentados y su mejorado perfil de AGS, al ser administrada a animales de experimentación cuyo metabolismo lipídico y glicémico fue alterado experimentalmente para imitar o reflejar patologías humanas de alta incidencia en nuestra población, producirá efectos biológicos protectores o preventivos sobre dichos trastornos.

Los mecanismos por los cuales la GLF bovina produciría sus efectos benéficos podrían estar asociados a una mejora en el tráfico de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (mayor eficacia en la salida desde el hígado o en la incorporación de las mismas por parte de los tejidos adiposo y/o muscular), o a una mayor eficiencia con que los tejidos oxidan a los AG a nivel mitocondrial o peroxisomal.

OBJETIVOS GENERALES

Investigar en ratas a las que experimentalmente se les suministra una sobreabundancia de grasa (que por estudios previos se sabe que se acompaña de importantes alteraciones del metabolismo lipídico e hidrocarbonado), si aspectos clave de esos perjuicios pueden revertirse, o al menos atenuarse, bajo la influencia de la GLF bovina obtenida (caracterizada por un mejoramiento sustantivo en la composición de AGS y un enriquecimiento natural en *cis*-9 *trans*-11 C18:2 CLA o ácido ruménico-AR)

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En ratas adultas macho alimentadas con dietas que difieren en el origen y en el nivel de grasa dietaria, los objetivos específicos son investigar la capacidad de la grasa láctea naturalmente enriquecida en CLA y reducida en su fracción hipercolesterolémica sobre:

1. Peso y ganancia de peso de los animales experimentales.
2. La composición de los AG de los lípidos circulantes y hepáticos incluyendo la incorporación de CLA en los mismos y determinar su impacto sobre la proporción de AGPI de cadena larga.
3. Parámetros lipídicos y glucídicos del plasma y tejidos.

4. La biosíntesis de AG en hígado.
5. La capacidad oxidativa mitocondrial y peroxisomal de AG en hígado
6. La capacidad de estimular la secreción hepática de TG-pre- β -lipoproteína in vivo.
7. La actividad y la expresión de algunas de las enzimas claves del metabolismo lipídico.

MATERIALES Y METODOS

4.1.- Animales de experimentación

Con el objetivo de investigar los efectos metabólico-nutricionales potencialmente benéficos de una GLF con niveles de CLA naturales aumentado y su perfil en AGS mejorado, se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar (n=48/experiencia), de dos semanas post-destete, provistas por el Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (Esperanza, Santa Fe). Durante el periodo experimental los animales fueron aclimatados en un ambiente con luz-oscuridad (12 hs) a temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) y tuvieron libre acceso al agua y a una dieta estándar de laboratorio (Control -S7-) hasta el inicio del período dietario experimental. Las experiencias fueron programadas según normas internacionales para el uso de animales de laboratorio (Guide to the Care and Use of Experimental Animals of Laboratory) y fueron aprobadas por el comité de ética de la FBCB-UNL.

4. 2.- Tipos de 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 *et al.*, 1993) y difirieron en el origen de la grasa y en el nivel de grasa recomendado -7%- o elevado -30%- (Tabla 1).

Control (S7): basada en las recomendaciones emanadas del Comité ad hoc del “American Institute of Nutrition” para roedores en crecimiento. Contenido de 7% (p/p) de aceite de soja.

Grasa Láctea (GL7): caracterizada por la sustitución de 4 % del aceite de soja de la dieta C por 4 % de Grasa Láctea (Obtenida de la leche de los animales sin suplementación lipídica).

Grasa Láctea Funcional (GLF7): caracterizada por la sustitución de 4 % del aceite de soja de la dieta C por 4 % de Grasa Láctea Funcional previamente obtenida de bovinos enriquecida con CLA natural y mejorada en la composición de sus AG.

Grasa Láctea Estandarizada (GLE7): caracterizada por la sustitución de 4 % del aceite de soja de la dieta C por 4 % de Grasa Láctea Estandarizada a equivalentes niveles de grasa saturada e insaturada que la GLF (sin niveles elevados de CLA).

Hiperlipídica (S30): Dieta con alto contenido de aceite de soja. Se sustituye almidón por aceite de soja para arribar al 30 % (p/p) de grasas.

Hiperlipídica con Grasa Láctea Funcional (GLF30): se sustituye 27 % del aceite de soja de la Dieta Hiperlipídica (S30) por 27 % de Grasa Láctea Funcional mejorada en la composición de AGS y rica en CLA. Contiene 30 % (p/p) de grasas.

Hiperlipídica con Grasa Láctea (GL30): se sustituye 27 % del aceite de soja de la Dieta Hiperlipídica por 27 % de Grasa Láctea. Contiene 30 % (p/p) de grasas.

Hiperlipídica con Grasa Láctea Estandarizada (GLE30): se sustituye 27 % del aceite de soja de la Dieta Hiperlipídica por 27 % de Grasa Láctea Estandarizada a equivalentes niveles de grasa saturada e insaturada que la GLF. Contiene 30 % (p/p) de grasas.

Las grasas lácteas a investigar, GL y GLF, se obtuvieron de la leche de origen bovino (apéndice). La GLE se obtuvo por mezclado de GL con aceite de soja en cantidad y proporciones necesarias para obtener niveles equivalentes de AGS y AGI totales, y la misma relación AG n-6/ n-3 que la GLF.

Composición de las dietas experimentales (g/100g)

Ingredientes (g/100g de dieta)	S7¹	GLF	GLF7	GLE7	S30	GL30	GLF30	GLE30
Aceite de soja	7	3	3	3	30	3	3	3
Grasa Láctea Funcional	-	4	-	-	-	27	-	-
Grasa Láctea	-	-	4	-	-	-	27	-
Grasa Láctea Estandarizada	-	-	-	4	-	-	-	27
Proteínas	20	20	20	20	20	20	20	20
Almidón	52,95	52,95	52,95	52,95	39,95	39,95	39,95	39,95
Sacarosa	10	10	10	10	10	10	10	10
Fibras	5	5	5	5	5	5	5	5
Vitaminas	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Minerales	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Cistina/Metionina/Colina	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Energía (Kjoule/g)	16,52	16,52	16,52	16,52	21,33	21,33	21,33	21,33

¹ Dieta control según las recomendaciones por el “*American Institute of Nutrition*” (Reeves *et al.*, 1993) para roedores en crecimiento. Dietas experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *AS: aceite de soja.

El nivel de grasa dietaria (30 % p/p) elegido para las dietas hiperlipídicas supera las recomendaciones específicas de diferentes sociedades científicas, pero está basado en consumos altos observados frecuentemente en nuestra población. Además en este modelo nutricional el equipo del Dr. Bernal ha demostrado numerosos efectos perjudiciales sobre el metabolismo lipídico de animales de experimentación.

Todas las dietas contuvieron al menos un 3% de Aceite de Soja para garantizar la cobertura de requerimientos de AG esenciales recomendada por el Comité ad hoc del “*American Institute of Nutrition*” para roedores en crecimiento (Reeves *et al.*, 1993).

La composición de AG de los lípidos constituyentes de las grasas y aceites fue evaluada por GC acorde a procedimientos oficiales. Se cuidó la calidad de esas grasas y aceites para minimizar procesos de oxidación a través de la eliminación del oxígeno por desplazamiento con gas nitrógeno y se controló antes de su uso el grado de deterioro mediante la evaluación del Índice de peróxidos, AG libres y formación de dienos, trienos y tetraenos conjugados por análisis espectrales de absorción (AOAC). A lo largo de todo el período experimental se prepararon las dietas semanalmente, conservadas a -20°C y ofrecidas a los animales diariamente durante todo el periodo experimental.

4. 3.- Grupos experimentales y protocolo de trabajo

Ratas de la cepa Wistar, macho, con un peso de 100 g (al menos 6/grupo) aclimatadas durante dos semanas luego del destete en un ambiente con luz-oscuridad de 12 hs, a temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$), con libre acceso al agua y a una dieta estándar de laboratorio, fueron distribuidos aleatoriamente en 8 grupos experimentales y alimentados durante 60 días con alguna de las dietas experimentales definidas en el apartado anterior (S7, GL7, GLF7, GLE7, S30, GL30, GLF30 y GLE30) y ofrecidas *ad libitum* junto a agua de bebida.

Durante 60 días de tratamiento dietario, se registró el peso corporal de los animales (Experiencia 1- 4). Al finalizar el período experimental, los mismos fueron sacrificados bajo anestesia (1 mg acepromicina + 100 mg ketamina/Kg peso). Se extrajeron muestras de sangre por punción cardíaca sin anticoagulante y se centrifugaron a 4°C . El suero obtenido fue alicuotado y congelado a -20°C hasta el momento de su valoración. Hígado, tejido adiposo epididimal (**TAE**)y músculo gastrocnemio fueron extraídos en forma completa, y muestras de cada uno de ellos fueron congeladas con una pinza enfriada en nieve carbónica, pesadas, morterizadas y conservadas en ultrafreezer (-80°C) hasta su procesamiento.

4. 4.- Cuantificaciones en suero

4.4.1.- Concentración de triglicéridos séricos (Experiencias 1, 2 y 3)

La concentración de TG en suero se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Sociedad de Bioquímicos, Santa Fe, Argentina). El método se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los TG en glicerol y AG libres, por medio de una combinación especial de lipasas. El glicerol es fosforilado a glicerol-fosfato en presencia de glicerol quinasa y ATP luego, este derivado fosforilado, es oxidado con producción de peróxido de hidrógeno por acción de la enzima glicerol fosfato oxidasa. El indicador final de color es una quinoneimina roja formada a partir del peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y 4-clorofenol, con la acción catalítica de una peroxidasa. La quinoneimina posee un pico de absorción a 510 nm, cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de TG presentes en la muestra. Los resultados se expresaron en g/l.

4.4.2.- Concentración de colesterol total sérico (Experiencias 1 y 2)

La concentración de Colesterol en suero se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Sociedad de Bioquímico, Santa Fe, Argentina). El método se fundamenta en la hidrólisis enzimática de los ésteres de colesterol por la enzima colesterol esterasa liberando colesterol y AG. El colesterol producido en esta reacción, más el colesterol libre, es oxidado por acción de una colesterol oxidasa, con formación de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de peroxidasa, oxida el cromógeno 4-aminofenazona a un compuesto de color rojo. La quinoneimina roja formada posee un pico de absorción a 505 nm. La intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra. Los resultados se expresaron en g/l.

4.4.3.- Concentración de glucosa sérica (Experiencias 1, 2, 3 y 4)

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

4.4.4.- Perfil de ácidos grasos séricos (Experiencia 1)

La composición de AG de los lípidos circulantes se cuantificó mediante cromatografía gaseosa (CG), empleando un cromatógrafo gas-líquido marca Shimadzu (GC-2014), con detector FID y columna capilar CP-Sil 88 (100 m x 0,25 mm id x 20 mm de espesor). Los metil ésteres de los AG plasmáticos fueron identificados por comparación con los tiempos de retención relativos a estándares comerciales. La identificación y cuantificación de ésteres metílicos correspondientes a AG por CG, requiere de tres etapas: obtención del extracto lipídico, derivatización de los AG, y corrida cromatográfica.

La extracción de la materia grasa del suero se realizó mediante el método de Bligh y Dyer (1959). Este método permite una rápida extracción de lípidos de tejidos o muestras que contienen una cantidad significativa de agua. El método se basa en la homogenización de la muestra con cloroformo, metanol y agua en proporciones 1:2:0,8 para que se forme una sola fase miscible con el agua de la muestra que extrae, tanto la grasa libre, como estructural. Luego se añaden alícuotas de cloroformo y agua para lograr la separación de fases. El material lipídico se encuentra en la fase orgánica, mientras que el material no lipídico se ubica en la fase acuosa. El volumen de suero a utilizar para la extracción lipídica debe ser de 0,8 ml (ajustándose con el agregado de agua destilada, de ser necesario), ya que el contenido de agua de la muestra es crítico para conservar la proporción de cloroformo, metanol y agua, que permite la formación del sistema homogéneo. La fase orgánica conteniendo el material lipídico de la muestra se colocó bajo corriente de N₂ gas, con el fin de evaporar los restos de solvente.

Para la derivatización de los AG es importante considerar que, incluso al estado de vapor, los mismos se encuentran en forma de un dímero unidos por puente de hidrógeno. Esta estructura corresponde al doble de su peso molecular y se refleja en sus propiedades físicas como el punto de ebullición. Así, los AG tienen sus puntos de ebullición anormalmente altos, lo cual impide su análisis directo por CG. Por esta razón los AG de los TG presentes en la muestra son convertidos en metil ésteres con KOH 2N, previa disolución del extracto lipídico en hexano calidad HPLC (ISO 5509:2000 (E)). Los ésteres metílicos formados tienen un peso molecular algo mayor que el respectivo ácido graso, pero al romperse el puente de hidrógeno, bajan su punto de ebullición a la mitad, pudiendo ser analizados por CG, ya que son volátiles a las temperaturas en que se manejan las fases líquidas (Los resultados se expresaron como g/100 g del total de AG)

Con los resultados se realizó un análisis exhaustivo de la incorporación de AG isoméricos en los lípidos totales de plasma de las alteraciones de la biosíntesis de AGPI de cadena larga de las familias n-3 y n-6, y del tipo de sustitución de AG que los isómeros AV y CLA podrían producir.

4.4.5.- Concentración de ácidos Grasos no Esterificados (NEFA) (Experiencias 3 y 4)

La concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en plasma se determinó mediante un método enzimático empleando un kit comercial (Randox Laboratories Ltd., UK). Los NEFA de la muestra, por la acción de la sintetasa de acil-CoA (ACS), se transforman en acil-CoA, AMP y ácido fosfórico (PPi) bajo la modulación de la coenzima A (CoA) y la adenosina-5-trifosfato-sal disódica (ATP). Por la acción de la acil-CoA-oxidasa (ACOD), la acil-CoA se transforma en 2,3-trans-enoil-CoA y peróxido de hidrógeno y posteriormente, en presencia de la peroxidasa (POD) y por la acción conjunta de la 3-metil-N-etil-N-(β-hidroxietilo)-anilina (MEHA) y la 4-aminoantipirina (4-AA), se obtiene un complejo cromático azul-violeta por acoplamiento oxidativo. Leyendo (550 nm) la absorción azul-violeta se puede determinar la concentración de NEFA. Los resultados se expresaron como μEq/L.

4. 5.- Cuantificación de lípidos tisulares

4. 5.1.- Concentración de triglicéridos tisulares (Experiencias 1, 2 y 3)

Para cuantificar los niveles de TG tisulares (hígado), una cantidad determinada del tejido conservado a -80°C se homogenizó con un volumen apropiado de solución fisiológica fría (4°C) para obtener una dilución 1/10. El contenido de TG se determinó mediante la técnica propuesta por Laurell (1966), se extrajeron utilizando una mezcla éter isopropílico:etanol (95:5; v/v) y luego fueron saponificados con una solución de KOH 6N:etanol (0,5:9,5; v/v). El glicerol liberado fue cuantificado mediante su oxidación con peryodato generando un mol de ácido fórmico y dos moles de formaldehído para cada mol de sustrato. El formaldehído reacciona a 100°C con ácido cromotrópico para dar un compuesto violeta, cuya intensidad de color se mide a 570 nm y es proporcional a la cantidad de TG presentes en la muestra. Los resultados se expresaron como μmol/g tejido húmedo (TH).

4. 5.2.- Perfil de ácidos grasos tisulares (Experiencia 1)

La composición de AG de los lípidos tisulares (hígado y TAE) se determinaron mediante CG, como fuera descrito en el ítem 4.4, previa extracción de la materia grasa tisular mediante el método de Bligh y Dyer (1959). En este caso, el método requiere determinar el contenido de humedad de la muestra. 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. (Los resultados se expresaron como g/100g del total de AG).

4. 6.- Parámetros relacionados al metabolismo lipídico

4.6.1- Secreción hepática “in vivo” de TG-pre- β lipoproteínas (Experiencia 3).

La velocidad de secreción de TG-pre- β lipoproteínas (**VSTG**) “in vivo” se determinó utilizando la metodología propuesta por Otway *et al.* (1967) modificada por Bernal *et al.* (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 Tritón WR 1339, de modo que los TG se acumulan en el tiempo en el sistema vascular en forma proporcional a la velocidad con la que son secretados por el hígado.

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

La VSTG fue calculada mediante la siguiente ecuación:

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

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

En un trabajo previo (Bernal *et al.*, 1989) ha sido demostrado que, en ratas, la dosis empleada es la que provee la máxima inhibición de la clarificación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)-TG y que bajo estas condiciones el acúmulo de TG en el plasma es lineal hasta los 150 minutos, razón por la que sólo se cuantificaron los niveles de TG a los tiempos 0 y 120 minutos. Los resultados se expresaron en $\text{nmol}/100\text{g}/\text{min}$.

4.6.2.- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa (LPL)

4.6.2.1.- Actividad total de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal (Experiencia 3)

A pesar de que el tejido adiposo de la rata representa sólo un 7-10% de su peso corporal y que recibe menos del 5% del flujo sanguíneo, se ha demostrado que es el principal tejido responsable de la capacidad de captación o remoción de las lipoproteínas ricas en TG presentes en circulación. La actividad total de la enzima LPL en el TAE se determinó empleando el método fluorimétrico descrito por Del Prado *et al.* (1994). Para tal fin, una cantidad de TAE se homogeneizó en frío con buffer Tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl) 0,2 M pH 8,2 a 4°C , en una proporción 0,2 g de tejido/ml de buffer. Una alícuota del homogeneizado fue utilizada para la preparación de extracto enzimático "polvo de acetona" (Lutz *et al.*, 1989). Esta preparación consiste en una doble extracción con acetona fría (dilución 1/4, -20°C) seguida de una doble extracción con éter dietílico frío (dilución 1/4, -20°C). El polvo de acetona obtenido se llevó a sequedad bajo corriente de N_2 (1 hora a 4°C) y se re-suspendió en 1 ml de buffer NH_4Cl 25 mM pH 8,1 con 1 UI/ml de heparina. La concentración de proteínas en el re-suspendido se determinó mediante la técnica de Lowry *et al.* (1951).

El método fluorimétrico para la determinación de la actividad de la enzima LPL descrito por Del Prado *et al.* (1994), utiliza di-butiril fluoresceína (DBF) como sustrato enzimático, el cual fue sintetizado a partir de la mezcla de fluoresceína con piridina y anhídrido butírico. La mezcla fue almacenada a temperatura ambiente por 24 hs antes de la adición de etanol absoluto. Finalmente, la mezcla se guardó en freezer a -20°C por 18 hs. El DBF fue recristalizado en 95% de etanol sucesivas veces hasta remover

las trazas de fluoresceína libre. La pureza del producto final se evaluó realizando un espectro de emisión, comprobando que no exista pico de excitación de fluoresceína a 490 nm. La reacción enzimática se llevó a cabo a 37°C en buffer fosfato 0,1 M, pH 8,0, conteniendo 5% de 2-etoxietanol, 10 mM de DBF y extracto enzimático re-suspendido (teniendo en cuenta de no superar los 15 mg de proteínas en la mezcla de reacción).

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

4.6.2.2.- Actividad de la enzima lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio (Experiencia 3)

El músculo gastrocnemio conservado a -80°C fue homogeneizado (dil 1/10) en una solución buffer $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_4\text{OH}$ -Heparina (50 mM, pH 8,6, conteniendo 4 UI/ml de heparina). Luego de reposar 15 minutos a 4°C los homogenizados fueron centrifugados a 2.600g a 4°C durante 15 minutos obteniéndose los extractos crudos frescos tisulares. La cuantificación de la actividad LPL se realizó midiendo durante 5 minutos el aumento de fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}= 490 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emisión}}= 530 \text{ nm}$) producto de la liberación de fluoresceína como resultado de la hidrólisis enzimática del DBF. La reacción se llevó a cabo a 37°C en un buffer fosfato 0,1 M, pH 8,0, conteniendo 5% de 2-etoxietanol, 10 mM de DBF y extracto enzimático (teniendo en cuenta de no superar los 15 mg de proteínas en la mezcla de reacción). La actividad medida fue expresada como nmol de fluoresceína liberada por minuto por gramo de músculo (nmol F/min/g).

4.6.3.- Actividad de las enzimas lipogénicas en Hígado

Las enzimas relacionadas con la actividad lipogénica en hígado se encuentran en la fracción citosólica celular. Para la determinación de la actividad de estas enzimas se

homogenizaron fracciones de hígado (0,5 g) fresco en buffer pH 7,6 (KCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, N-acetil-cisteína 10 mM y ditioneitol 0,5 mM) en proporción 0,5:5. Luego, se centrifugó el homogenado a 60.000g a 4°C durante 90 minutos y se separó el sobrenadante, el cual se almacenó a -80°C hasta la posterior determinación de la actividad de las enzimas. Por otro lado, una alícuota del sobrenadante se utilizó para la determinación de la concentración de proteínas a través de la técnica de Lowry *et al.* (1951).

4.6.3.1.- Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Experiencia 4)

La actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (**G6PDH**) se determinó espectrofotométricamente a través de la formación de NADPH durante 5 minutos a 37°C, medida por absorbancia a 340 nm, en buffer glicil-glicina 0,1 M, pH 8,0 en presencia de glucosa 1,2 mM, NADP 0,4 mM y MgSO₄ 12 mM. La actividad de G6PDH fue expresada como nmol de NADPH producidos por minuto por miligramo de proteína (nmol NADPH/min/mg prot.) (Kuby y Noltmann, 1966).

4.6.3.2.- Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos (Experiencia 4)

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

4.6.3.3.- Actividad de la enzima carnitina palmitoil transferasa-I en hígado (Experiencia 4)

El proceso de β-oxidación de los AG se realiza en la matriz mitocondrial de las células, siendo una de las enzimas clave la carnitina palmitoil transferasa-I (**CPT-**

I). Esta enzima es la encargada de transportar los AG, que se encuentran en el citosol, hacia el interior de las mitocondrias.

Para la determinación de la actividad de la enzima CPT-I se realizó un homogenado (relación 1:5) a partir de tejido congelado (-80°C) de hígado, en solución de sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, fenil-metil-sulfonil fluoruro 0,2 mM, antipain 1 mg/l, aprotinin 1 mg/l, leupeptin 2 mg/l y pepstatin 0,7 mg/l. El homogenado se centrifugó a 300g a 4°C durante 10 minutos y luego el sobrenadante se volvió a centrifugar a 12.000g a 4°C durante 5 minutos. Este nuevo sobrenadante, conteniendo un aislado de mitocondrias, se utilizó como fuente de enzima. La determinación de la actividad de la enzima mide la cantidad de coenzima A, liberada a partir de palmitoil-CoA en presencia de 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico)(DTNB). Para esto, se incubaron las mitocondrias a 30°C durante 5 minutos en un medio conteniendo 800 µl de buffer Tris-HCl, pH 8, (Tris-HCl 116 mM, EDTA 2,5 mM, DTNB 0,11 mM, Triton X-100 0,2%), 75 µl de solución de homogenado, palmitoil-CoA 0,05 mM y L(-) carnitina 0,11 mM. La reacción fue iniciada con 25 µl de muestra y la actividad se determinó siguiendo la liberación del CoA (a través de la formación de CoASH) a 412 nm durante 3 minutos. Este resultado valora la actividad de un conjunto de enzimas que, al igual que la CPT-I, liberan CoA, por lo que se determinó paralelamente la actividad en ausencia de L(-) carnitina para cuantificar la actividad de todas las enzimas excepto de la CPT-I. Para la expresión del resultado se realizó la diferencia entre la actividad en presencia y en ausencia de L(-) carnitina. La concentración de proteínas se estimó en el sobrenadante utilizando la técnica de Lowry *et al.* (1951). La actividad de la CPT- I fue expresada como nmol de CoA liberados por minuto por miligramo de proteína (nmol/min/mg prot.) (Bieber *et al.*, 1972).

4.6.3.4.- Actividad de la enzima Acetil-CoA Carboxilasa (Experiencia 4)

Para la determinación de la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa (**ACC**) se realizó un homogenado a partir del tejido hepático conservado a -80°C en buffer fosfato pH:7 (KH₂PO₄ 9 mM, K₂HPO₄ 85 nM, ditiotreitól 1mM 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 fue incubado 10 minutos a 37°C con el medio de reacción (Tris-HCl 50 mM, citrato de potasio 10mM, 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 0,125mM, piruvato kinasa 5,6 U/ml y lactato

deshidrogenasa 5,6 U/ml), ATP 150 mM y KHCO_3 . La actividad de la enzima se determinó siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 340 nm por oxidación del NADH durante 3 minutos y se expresó como mU/mg de proteína (Zimmermann *et al.*, 2003). La concentración de proteínas se estimó en el sobrenadante utilizando la técnica de Lowry *et al.*, (1951).

4.7.- Extracción, análisis y cuantificación de ARN por PCR en tiempo real (Experiencia 1)

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 de 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 kit de síntesis M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Argentina).

Se analizaron los niveles de ARNm de las enzimas vinculadas a la lipogénesis, sintasa de ácidos grasos (**FAS**), Stearoyl-CoA desaturase- $\Delta 9$ -desaturasa (**SCD1**) y la principal enzima vinculada a la β -oxidación: carnitina palmitoil transferasa-I(**CPT-I**). También se evaluó el nivel de expresión de los factores de transcripción: Sterol regulatory element-binding transcription factor 1c(**SREBP-1c**)y Peroxisome proliferator-activated receptors- alpha (**PPAR- α**).

Los niveles de ARN fueron cuantificados usando PCR en tiempo real con un equipo de detección StepOne TM Real-Time (Applied Biosystems). Los niveles de β -actina fueron medidos de la misma manera y utilizados como gen de referencia. Se tomaron 0,1 μl 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- I, 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'-AGCCCCTCAAGTGACAGTG-3' (sentido);

5'-TGCCAATGTGTTTTCCCTGA-3' (antisentido).

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

CPT-I: 5'-ACGTGAGTGA CTGGTGGGAAGAAT-3' (sentido);
5'-TCTCCATGGCGTAGTAGTTGCTGT-3' (antisentido).

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

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

Las condiciones de amplificación de la PCR fueron: 2 minutos iniciales a 50°C, desnaturalización a 95°C durante 15 segundos combinados con anillado y extensión a 60°C por minuto. En todas las muestras, los niveles de RNA mensajero fueron normalizados según los valores obtenidos para β -actina y los resultados expresados usando el método recomendado de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001).

4.8.- Análisis estadísticos

Las variables fueron analizadas a través de un arreglo factorial 4 x 2 (origen y nivel de grasa dietaria) utilizando el programa PROC MIXED de SAS (2002-2010) donde las variables independientes fueron el nivel de grasa dietaria (7 o 30%) y el origen de la grasa en la dieta, seguido del test de Tukey (prueba de comparaciones múltiples). El nivel de significancia estadística se fijó a un $p < 0.05$.

$$Y_{ijk} = \mu + D_j + N_i + (N \times T)_{ij} + E_{ij}$$

donde Y_{ijk} es la variable respuesta; μ es la media poblacional; D_j es el efecto del j -ésimo origen de la grasa, N_i es el efecto del i -ésimo nivel de grasa, $(D \times N)_{ij}$ interacción entre el origen de la grasa y el nivel de grasa y E_{ij} es el error experimental asociado a la ij -ésima unidad experimental.

RESULTADOS

En función a los objetivos planteados para evaluar los posibles efectos de la ingesta de una GLF (con sus niveles de *cis*-9 *trans*-11 C18:2 CLA naturales aumentados y su mejorado perfil de AGS) en el presente modelo experimental, se describen a continuación las experiencias llevadas a cabo teniendo en cuenta:

- a) Origen de la grasa utilizada (S, GL, GLF y GLE)
- b) Nivel de grasa dietaria recomendado y elevado (7 y 30%, respectivamente).

4.1.- Perfil de ácidos grasos del aceite de soja

La composición del aceite de soja utilizado se presenta en la Tabla 1. El AS se caracteriza por una concentración (g/100g del total de AG) elevada de C18:2 n-6 (54,24) y baja en AGS (15,06).

Tabla 1. Composición de ácidos grasos del aceite de soja utilizado en las dietas experimentales

AG (g/100g del total de AG)	AS¹
C14:0	0,07
C16:0	10,12
C18:0	4,25
<i>cis</i> -9 C18:1	23,21
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 C18:2n-6	54,24
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15 C18:3n-3	5,01
C22:0	0,46
C24:0	0,16

¹AS: aceite de soja

4.2.- Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales

La concentración (g/100g del total de AG) de las dietas se presenta en la Tabla 2. Todas las dietas cumplieron las recomendaciones de ácidos grasos esenciales (**AGE**), con el objetivo de evitar cualquier posible alteración como consecuencia de un déficit dietario de los mismos.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de las dietas experimentales

AG (g/100g AG)	S7	GL7	GLF7	GLE7	S30	GL30	GLF30	GLE30
C 4:0	0,0	1,8	1,6	1,4	0,0	2,8	2,5	2,2
C 6:0	0,0	1,0	0,9	0,8	0,0	1,6	1,4	1,3
C 8:0	0,0	0,6	0,5	0,5	0,0	0,9	0,8	0,7
C 10:0	0,0	1,3	1,1	1,1	0,0	2,1	1,8	1,7
C 12:0	0,0	1,6	1,4	1,2	0,0	2,5	2,3	2,0
C14:0	0,1	5,5	5,4	4,3	0,1	8,6	8,5	6,8
C16:0	10,1	21,2	17,8	19,7	10,1	27,6	22,2	25,2
C18:0	4,3	8,7	7,8	7,4	4,3	11,3	9,8	9,3
<i>trans</i> -8 C18:1	0,0	0,2	0,2	0,1	0,0	0,3	0,4	0,2
<i>trans</i> -9 C18:1	0,0	0,2	0,2	0,1	0,0	0,3	0,4	0,2
<i>trans</i> -10 C18:1	0,0	0,4	0,5	0,3	0,0	0,7	0,8	0,5
<i>trans</i> -11 C18:1- AV	0,0	1,2	3,4	0,9	0,0	1,9	5,3	1,5
<i>cis</i> -9 C18:1n-9	23,2	22,8	23,9	26,8	23,2	22,6	24,3	28,8
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 C18:2n-6	54,2	24,6	24,6	26,4	54,2	7,6	7,6	10,4
<i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15								
C18:3n-3	5,0	2,1	2,1	2,2	5,0	0,5	0,5	0,6
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 C18:2								
CLA- AR	0,0	0,5	1,7	0,4	0,0	0,8	2,6	0,6
C22:0	0,5	0,2	0,2	0,2	0,5	0,1	0,1	0,1
AGMI	23,64	27,92	31,49	31,68	23,64	30,38	36,00	36,30
AGPI	60,01	28,08	26,67	29,82	60,01	9,73	12,22	12,45

S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27% grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *AS: aceite de soja

Los AG isoméricos (*cis*-9 *trans*-11 C18:2 CLA y *trans*-11 C18:1) fueron aportados principalmente por la GL y GLF obtenida a través de un ensayo zootécnico llevado a cabo en vacas lecheras. En la GLE, estos AG se encontraron en menores concentraciones (Tabla 2).

4.3.- Parámetros nutricionales

4.3.1.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre el peso y la ganancia de peso ($\Delta 60-0$)

Las dietas fueron bien aceptadas por los ocho grupos experimentales (Experiencias 1 a 4). Al comienzo del trabajo, los pesos promedio de los animales de los 8 grupos experimentales fueron similares y tuvieron un continuo incremento de peso durante todo el periodo experimental Figuras 1a, 1b, 1c, y 1d.

En la experiencia 1 (Figura 1a) se observa el aumento de peso fue en el orden GL30>S30>GLF30>GLE30>S7>GL7>GLF7>GLE7.

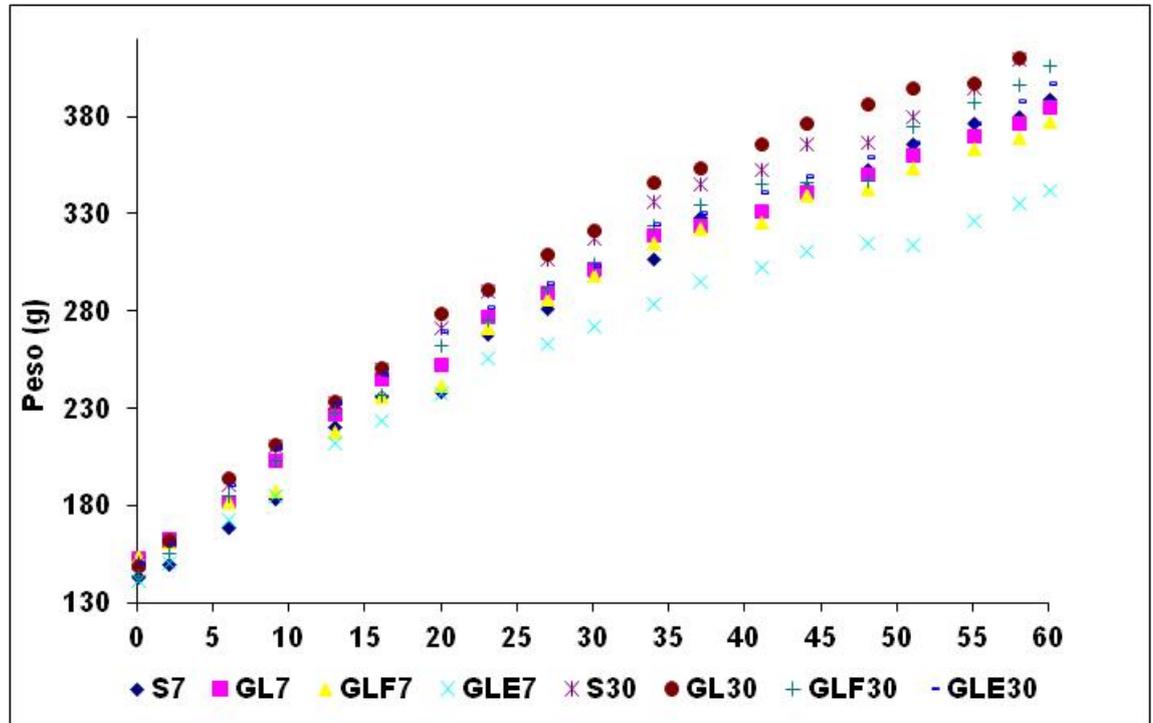


Figura 1a. Evolución del peso a lo largo del periodo experimental (Experiencia 1). Resultados expresados como promedio (n=6).

En la experiencia 2 (Figura 1b) se observa el aumento de peso fue en el orden GLE30>S30>GLF30>GL30>GLF7>GLE7>S7>GL7

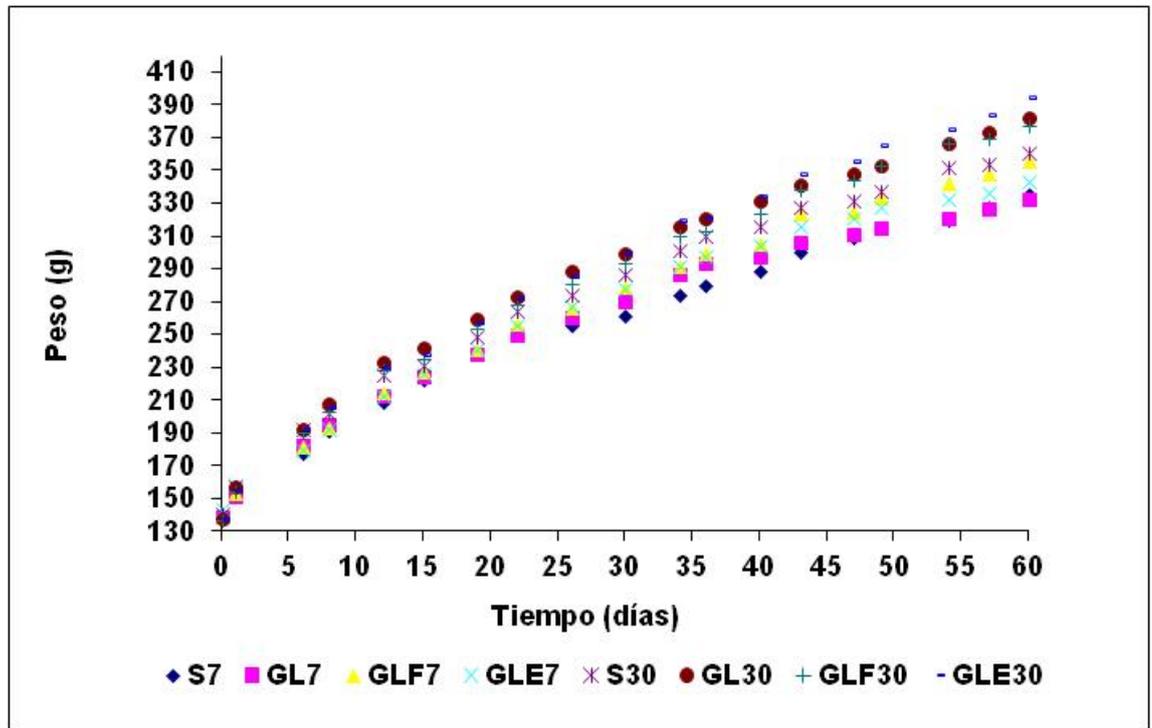


Figura 1b. Evolución del peso a lo largo del periodo experimental (Experiencia 2). Resultados expresados como promedio(n=6).

En la experiencia 3 (Figura 1c) se observa el aumento de peso fue en el orden GLF30>GLE30>GL30>S30>GL7>GLE7>S7>GLF7

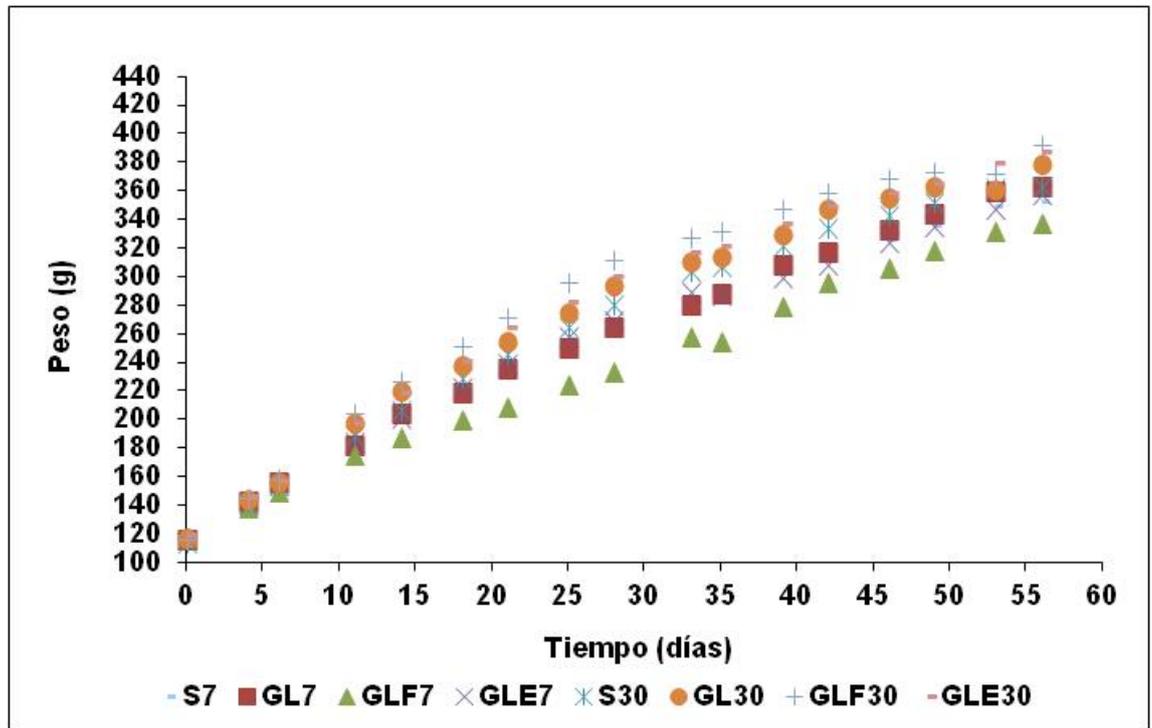


Figura 1c. Evolución del peso a lo largo del periodo experimental (Experiencia 3). Resultados expresados como promedio (n=6).

En la experiencia 4 (Figura 1d) se observa el aumento de peso fue en el orden GLF30>GLE30>GL30>S30>S7>GLE7>GL7>GLF7

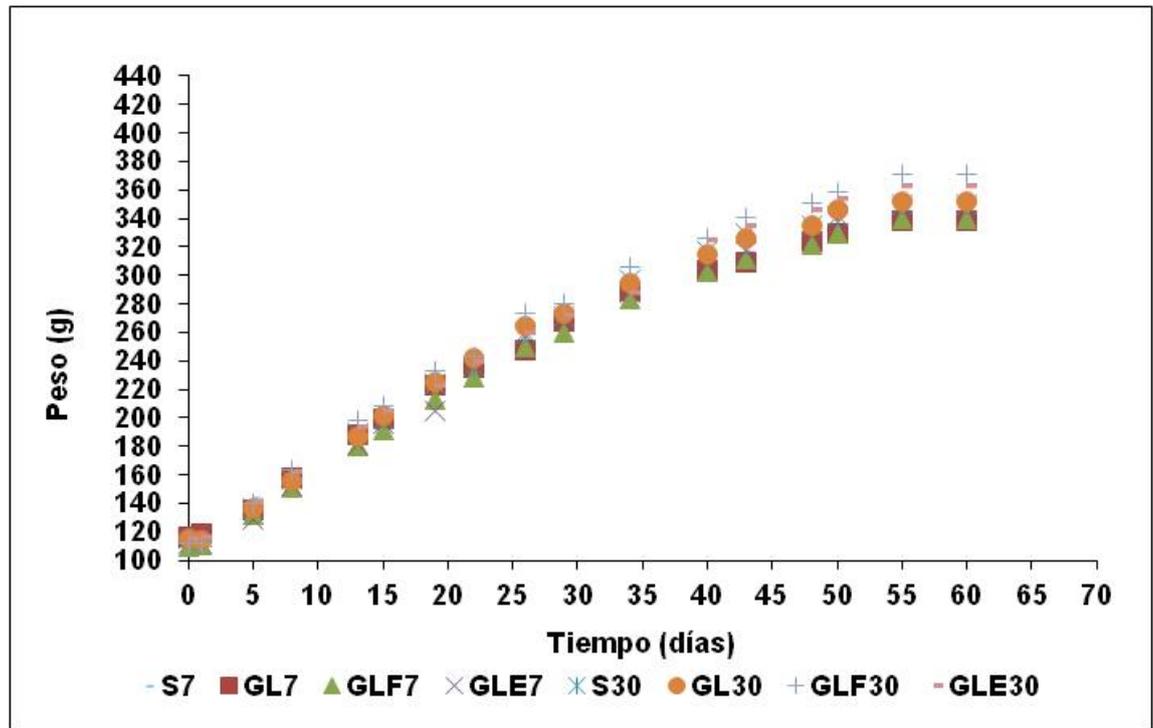


Figura 1d. Evolución del peso a lo largo del periodo experimental (Experiencia 4). Resultados expresados como promedio (n=6).

Al final de cada experiencia, se observó un incremento significativo de la ganancia de peso (ΔP_{60-0} ; Figuras 1e, 1f, 1g, 1h).

En la experiencia 1, la ganancia de peso se vio afectada ($p < 0,05$) por el origen y nivel de grasa dietaria. Las mayores ganancias de peso se observaron en los grupos experimentales S30, GL30 y GLF30, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos (Figura 1e).

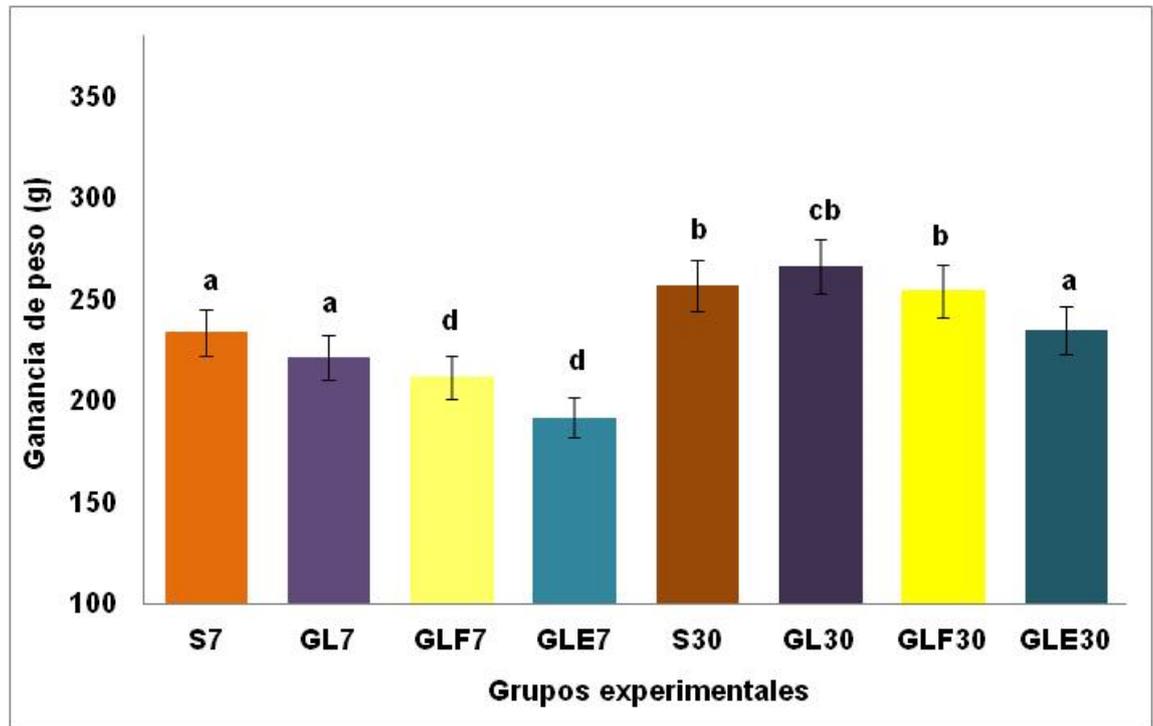


Figura 1e. Ganancia de peso (Experiencia 1). Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4×2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

En la experiencia 2, la ganancia de peso se vio afectada ($p < 0,05$) por el nivel de grasa dietaria (Figura 1f). Las mayores ganancias de peso se observaron en los grupos experimentales GL30, GLF30 y GLE30.

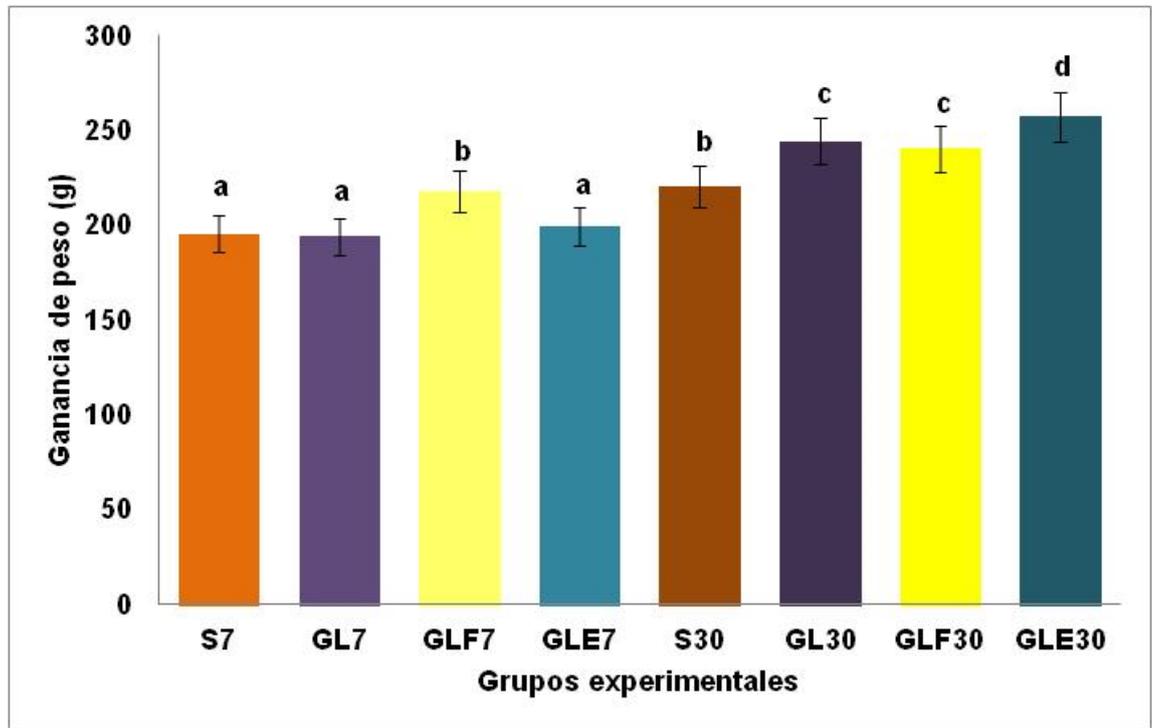


Figura 1f. Ganancia de peso (Experiencia 2). Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

En la experiencia 3, la ganancia de peso no fue afectada ($p > 0,05$) ni por el origen ni por el nivel de grasa dietaria (Figura 1g).

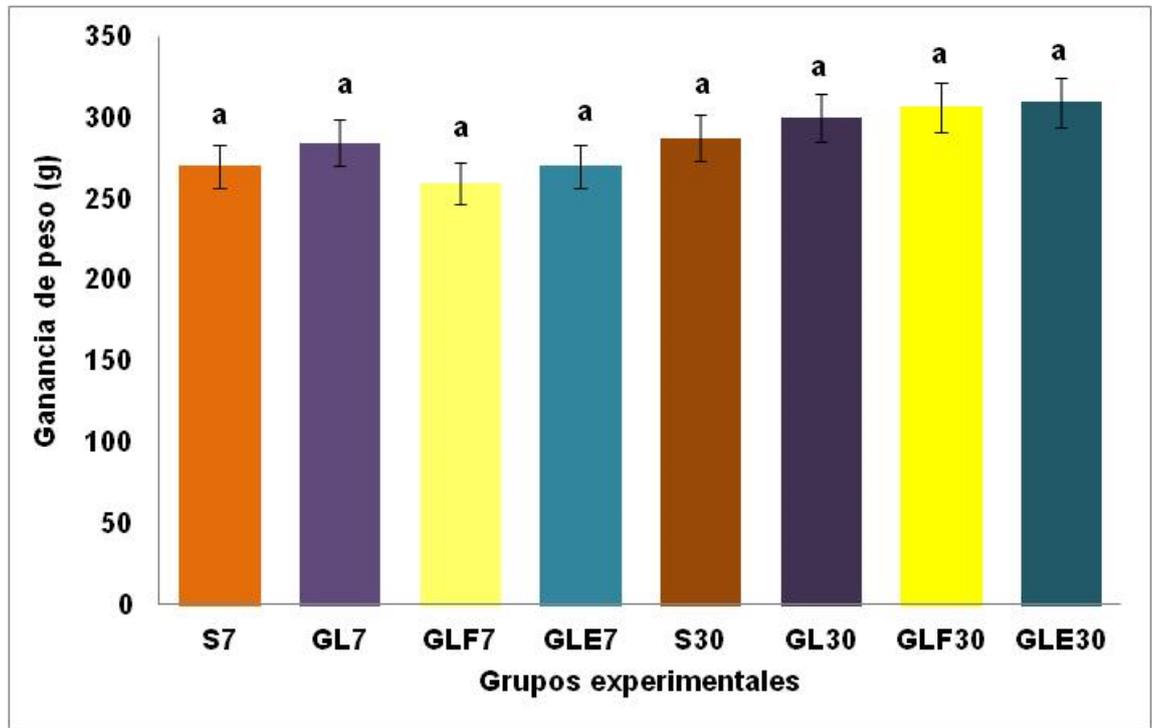


Figura 1g. Ganancia de peso (Experiencia 3). Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

En la experiencia 4, la ganancia de peso fue afectada ($p < 0,05$) por el origen de la grasa, esos cambios se atribuyen a los grupos dietarios GLF30 y GLE30 (Figura 1h).

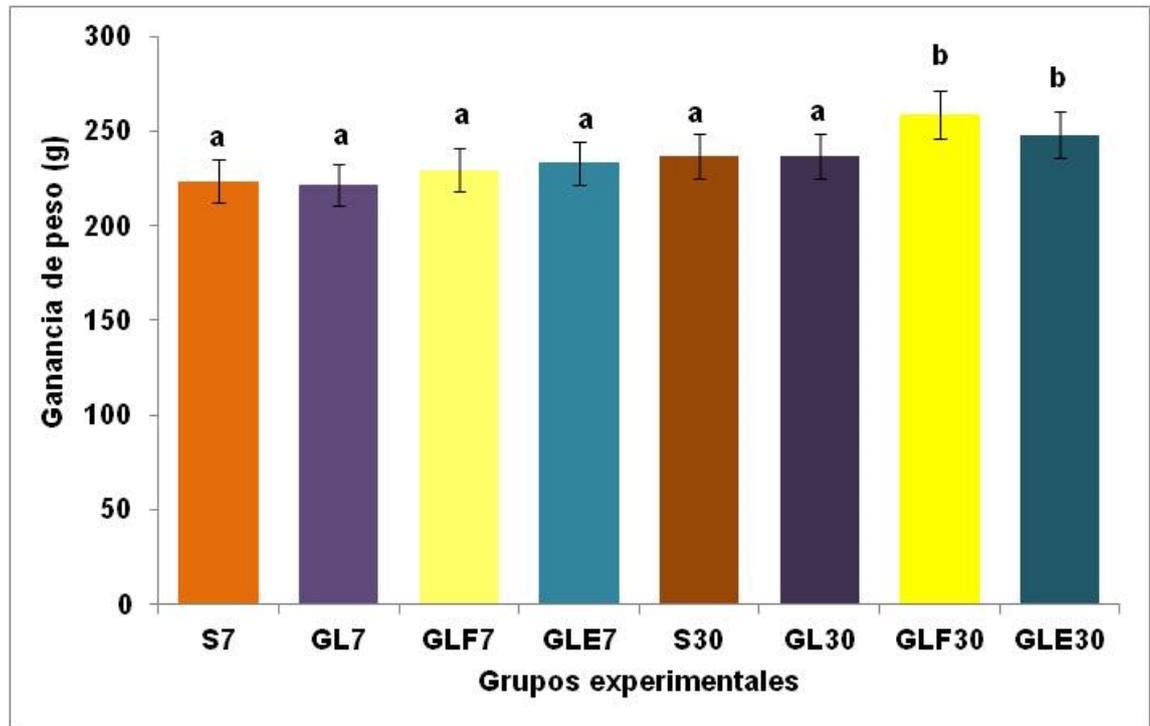


Figura 1h. Ganancia de peso (Experiencia 4). Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

4.3.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre el peso de hígado, tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio

El peso absoluto del hígado (Experiencia 1) se incrementó significativamente ($p < 0,05$) cuando el nivel de grasa se aumentó de 7 % a 30 %, observándose los mayores pesos en los tratamientos GL30 y GLF30. Cuando los resultados fueron expresados en forma relativa al peso corporal (g hígado/100g de peso corporal) no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguno de los grupos experimentales (Tabla 3).

Tabla 3 .Parámetros nutricionales experiencia 1

Parámetro	Grupos experimentales ¹								Efecto ²			
	S7	GL7	GLF7	GLE7	S30	GL30	GLF30	GLE30	EEM	DIETA	NIVEL GRASA	D X N
Peso animales (g)	377,72 ^{ba}	375,33 ^{bac}	366,15 ^{bc}	334,00 ^c	408,00 ^a	415,65 ^a	398,80 ^{ba}	386,03 ^{ba}	14,55	0,08	0,0005	0,88
Peso hígado (g)	8,93 ^{bc}	9,09 ^{bc}	8,56 ^c	8,32 ^c	9,82 ^{ba}	10,18 ^a	10,16 ^a	9,69 ^{ba}	0,37	0,39	<,0001	0,79
Peso relativo hígado	2,38	2,42	2,34	2,49	2,44	2,47	2,45	2,51	0,02	0,21	0,13	0,82
Peso TAE (g)	10,09	10,66	10,82	7,57	10,64	10,88	10,83	9,46	0,99	0,08	0,33	0,79
Peso relativo TAE	2,64	2,84	2,95	2,26	2,56	2,58	2,53	2,43	0,17	0,07	0,28	0,42
Peso músculo (g)	2,80 ^b	2,84 ^{ba}	2,89 ^{ba}	2,84 ^{ba}	3,12 ^a	3,03 ^{ba}	3,02 ^{ba}	3,11 ^a	0,10	0,99	0,003	0,84

¹ Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. ² Efecto Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio ± EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 2 x 4 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$.

*AS: aceite de soja

Tabla 4. Parámetros nutricionales experiencia 2

Parámetro	Grupos experimentales ¹								SEM	Efecto ²		
	S7	GL7	GLF7	GLE7	S30	GL30	GLF30	GLE30		DIETA	NIVEL GRASA	D X N
Peso animales (g)	377,72 ^{ba}	375,33 ^{bac}	366,15 ^{bc}	334,00 ^c	408,00 ^a	415,65 ^a	398,80 ^{ba}	386,03 ^{ba}	14,55	0,08	0,0005	0,88
Peso hígado (g)	8,41 ^{bc}	8,36 ^c	9,34 ^{ba}	8,92 ^{bac}	8,87 ^{bac}	9,81 ^a	9,16 ^{bac}	9,79 ^a	0,33	0,19	0,01	0,13
Peso relativo hígado	2,52	2,53	2,67	2,60	2,57	2,54	2,63	2,59	0,05	0,75	0,68	0,83
Peso TAE (g)	7,09 ^b	6,26 ^b	7,71 ^{ba}	7,83 ^{ba}	6,75 ^b	9,28 ^a	7,79 ^{ba}	9,38 ^a	0,67	0,15	0,04	0,08
Peso relativo TAE	2,19	1,91	2,22	2,28	1,92	2,45	2,02	2,41	0,14	0,30	0,37	0,06
Peso músculo (g)	2,49	2,63	2,90	2,78	2,70	2,99	2,81	3,14	0,25	0,60	0,27	0,82
Peso relativo músculo	0,77	0,80	0,83	0,81	0,77	0,79	0,80	0,81	0,02	0,88	0,82	0,99

¹ Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. ² Efecto Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio ± EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 4 x 2 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$. *AS: aceite de soja

Tabla 5. Parámetros nutricionales experiencia 3

Parámetros	Grupos experimentales ¹								EEM	Efecto ²		
	S7	GL7	GLF7	GLE7	S30	GL30	GLF30	GLE30		DIETA	NIVEL GRASA	D X N
Peso animales (g)	358,75 ^{dc}	366,55 ^{bdc}	342,40 ^d	357,95 ^{dc}	374,66 ^{bc}	389,28 ^{ba}	387,66 ^{bac}	414,00 ^a	10,44	0,17	<,0001	0,20
Peso hígado (g)	10,38	10,43	10,28	10,80	11,08	11,40	10,93	11,52	0,47	0,67	0,40	0,98
Peso relativo hígado	2,89	2,84	3,00	3,00	2,94	2,94	2,88	2,78	0,06	0,99	0,32	0,21
Peso TAE (g)	9,8 ^{dc}	11,54 ^{bc}	8,35 ^d	10,67 ^{dc}	10,78 ^{dc}	11,80 ^{bc}	14,05 ^{ab}	15,28 ^a	0,71	0,08	0,0003	0,40
Peso relativo TAE	2,71 ^{bc}	3,13 ^{ba}	2,42 ^c	2,96 ^{bc}	2,86 ^{bc}	3,00 ^b	3,60 ^a	3,67 ^a	0,09	0,07	0,001	0,30
Peso músculo (g)	2,81	2,84	2,97	2,87	3,12	3,03	3,03	3,11	0,05	0,98	0,08	0,91
Peso relativo músculo	0,75 ^b	0,76 ^b	0,79 ^{ba}	0,86 ^a	0,77 ^{ba}	0,73 ^b	0,76 ^b	0,81 ^{ba}	0,02	0,05	0,37	0,75

¹ Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. ² Efecto Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio ± EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 4 x 2 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$. *AS: aceite de soja

Tabla6. Parámetros nutricionales experiencia 4

Parámetro	Grupos experimentales ¹								Efecto ²			
	S7	GL7	GLF7	GLE7	S30	GL30	GLF30	GLE30	EEM	DIETA	NIVEL GRASA	D X N
Peso animales (g)	339,50 ^c	335,75 ^c	336,00 ^c	344,00 ^c	346,71 ^c	346,83 ^{bc}	369,67 ^a	362,67 ^{ba}	6,49	0,14	0,0003	0,18
Peso hígado (g)	9,14 ^{bc}	8,99 ^{bc}	8,82 ^c	9,05 ^{bc}	9,62 ^{bac}	9,79 ^{ba}	10,26 ^a	9,63 ^{bac}	0,29	0,91	0,0003	0,38
Peso relativo hígado	2,69 ^{ba}	2,68 ^{ba}	2,62 ^b	2,63 ^b	2,77 ^{ba}	2,83 ^a	2,77 ^{ba}	2,66 ^{ba}	0,06	0,33	0,03	0,73
Peso TAE (g)	9,65	9,39	9,56	10,04	9,80	9,89	10,93	10,91	0,59	0,43	0,09	0,75
Peso relativo TAE	2,84	2,79	2,91	2,84	2,82	2,84	2,96	2,99	0,03	0,72	0,55	0,95
Peso músculo (g)	2,47	2,63	2,85	2,70	2,75	2,99	2,80	3,11	0,23	0,60	0,14	0,76

¹ Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. ² Efecto Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio ± EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 4 x 2 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$. *AS: aceite de soja

El peso del TAE no se incrementó ($p>0,05$) ni de forma absoluta ni relativa en ninguno de los grupos experimentales ni a nivel recomendado o elevado de grasa dietaria. El peso absoluto del músculo gastrocnemio fue afectado por el nivel de grasa dietaria ($p<0,05$) en los grupos S7 vs S30 (Tabla 3) con un aumento en S30 del 11%.

El peso absoluto del hígado (Experiencia 2) se incrementó significativamente ($p<0,05$) cuando el nivel de grasa se elevó de 7 % a 30 %, dándose los pesos mayores en los tratamientos GLF7, GL30 y GLE30. Cuando los resultados fueron expresados en forma relativa al peso corporal (g hígado/100g de peso corporal) no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en ninguno de los grupos experimentales (Tabla 4).

El peso del TAE incrementó ($p<0,05$) de forma absoluta por efecto del nivel de grasa dietaria, observándose los mayores pesos en los grupos experimentales GL30, GLF30 y GLE30 sin diferencias significativas entre ellos ($p>0,05$). El peso absoluto y relativo del músculo gastrocnemio no se vio afectado ($p>0,05$) ni por el origen ni por el nivel de grasa dietaria (Tabla 4).

El peso absoluto y relativo del hígado (Experiencia 3) no fue afectado ($p>0,05$) ni por el origen ni por el nivel de grasa dietaria en ninguno de los grupos experimentales. El peso del TAE incrementó ($p<0,05$) de forma absoluta por efecto del nivel de grasa dietaria. El peso absoluto del músculo gastrocnemio no se vio afectado ($p>0,05$) ni por el origen ni por el nivel de grasa dietaria, mientras que cuando el resultado fue expresado en forma relativa se observaron diferencias significativas ($p<0,05$) por efecto del origen de la dieta (Tabla 5), las diferencias se dieron entre los grupos S7, GL7 y GLE7 mientras que este último grupo se diferenció de GL30 y GLF30.

Los pesos absoluto y relativo del hígado (Experiencia 4) fueron afectados ($p<0,05$) por el nivel de grasa dietaria con diferencias entre el grupo GL30 y los grupos GLF7 y GLE7. Ni el origen ni el nivel de grasa dietaria, afectaron ($p>0,05$) los pesos absoluto y relativo del TAE, ni el peso absoluto del músculo gastrocnemio (Tabla 6).

4.4.- Parámetros bioquímicos

4.4.1.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración de triglicéridos y colesterol séricos

En la experiencia 1, la ingesta de dietas S7 y GL7 produjo un aumento ($p<0,05$) en la concentración (g/l) sérica del colesterol pero con reducciones significativas ($p<0,05$) ante el aumento en el nivel de grasa en los grupos S30, GL30, GLF30 y GLE30 (Tabla

7). La concentración promedio de colesterol en los grupos experimentales con nivel elevado de grasa disminuyó (-32%) al compararla con la concentración de los grupos experimentales con nivel recomendado de grasa (Tabla 7).

Comparado con S30 (0,60), la concentración sérica de los TG (g/l) aumentó ($p < 0,05$) en los grupos S7 (0,99), GL7 (1,26), GLF7 (0,97), GL30 (1,13) y GLF30 (1,24; Tabla 7).

En la experiencia 2, los niveles de colesterol sérico no fueron afectados ($p > 0,05$) por ninguna de las dietas suministradas a los animales. Los niveles (g/l) de TG circulantes fueron afectados por el origen de la dieta y el nivel de grasa ($p < 0,05$). La concentración de TG séricos en ambos controles (S7 y S30) difirieron significativamente ($p < 0,05$) con el resto de los grupos experimentales dentro de cada nivel de grasa (7% y 30%, respectivamente) con disminuciones (Tabla 8) en los grupos con nivel elevado de grasa al compararlo con las concentraciones de los grupos con nivel de grasa recomendado (7%) de grasa dietaria.

Dentro del nivel 7% de grasa dietaria, los niveles promedio de TG séricos (g/l) en GL7, GLF7 y GLE7 (0,92) se redujeron (26,1%) al compararlo con el control (S7; 0,68). Dentro del nivel elevado de grasa dietaria, los niveles promedio de TG séricos (g/l) en GL30, GLF30 y GLE30 (0,75) se redujeron (54,9%) al compararlo con el control (S30; 0,34).

En la experiencia 3, la ingesta de la dieta S30 dio como resultado una disminución ($p < 0,05$) en la concentración (g/l) sérica de los TG de 53% al compararlo con la concentración promedio del resto de los grupos experimentales (Tabla 9).

4.4.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración de triglicéridos hepáticos

En la experiencia 1, comparado con S7, el contenido ($\mu\text{mol/g}$) hepático de TG aumentó (+63%) significativamente ($p < 0,05$) en los animales que consumieron la dieta S30. El grupo GLF30 mostró un mayor contenido ($p < 0,05$) de TG en hígado al compararlo con el contenido en hígado de los animales que consumieron las dietas GL30 y GLE30, pero menores que S30 (Tabla 7). Los animales alimentados con S7, S30, GL30, GLF30 y GLE30 mostraron los mayores niveles de TG en hígado con un efecto más acentuado a niveles de grasa elevados (30%).

En la experiencia 2, el contenido ($\mu\text{mol/g}$) hepático de TG se vio afectado por el origen y el nivel de grasa dietaria ($p < 0,05$). Dichos cambios fueron atribuidos principalmente a la disminución promedio (-31%) de los niveles hepáticos en los grupos

GL7, GLF7 y GLE7 (19,55) al compararlo con el control (S7; 28,32). Dentro del nivel de grasa 30%, el mayor descenso (-32%, $p < 0,05$) de los niveles de TG hepáticos se dio en el grupo GLF (23,83) al compararlo con el control (S30; 34,90). Las dietas con concentraciones superiores de *cis-9 trans-11* C18:2 CLA disminuyeron las concentraciones de TG hepáticos en los animales que consumieron dichas dietas, tanto a niveles de grasa recomendado (7%) como a niveles elevados (30%) pero sin diferencia entre ellas (Tabla 8).

En la experiencia 3, el contenido hepático de TG ($\mu\text{mol/g}$) se incrementó (+47) en los grupos S30 y GLE30 (31,90) al compararlo con el grupo GL7 (21,58; $p < 0,05$), Tabla 9.

4.4.3.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la composición de ácidos grasos de hígado, tejido adiposo epididimal y suero

4.4.3.1.- Perfil AG en hígado

En la Tabla 10 se presenta el perfil de AG en hígado de los diferentes grupos experimentales, el perfil de AG fue modificado en distintos grados por el origen y nivel de grasa dietaria. Se describen con más profundidad los AG de mayor relevancia a nivel metabólico y/o cuantitativo para enfocar en los objetivos planteados en el presente trabajo. El AV (*trans-11* C18:1) y el CLA (*cis-9 trans-11* C18:2) fueron incorporados (Tabla 10) y retenidos (Figura 2 y 3, respectivamente) en hígado. La retención de cada AG fue estimada usando la relación entre el porcentaje de AG en la muestra y el porcentaje de cada uno de los AG en las dietas suministradas.

El AR, producto de la bio-conversión del AV por la actividad de la enzima Δ^9 -desaturasa se muestra en la Tabla 11. La conversión, expresada por la relación AR/AV, fue mayor para los grupos GL30 (3,06) y GLF30 (2,96) sin diferencias ($p > 0,05$) entre grupos con nivel recomendado y elevado de grasa (7% y 30 %, respectivamente). La retención de AV y CLA en el grupo experimental GLF fue 2,8 y 3 veces mayor, respectivamente, a nivel elevado de grasa (30%) que a el nivel de grasa recomendado (7%) (Figura 2 y 3, respectivamente)

Tabla 7. Parámetros lipídicos experiencia 1

Parámetro	Grupos experimentales ¹								EEM	Efecto ²		
	S7	GL7	GLF7	GLE7	S30	GL30	GLF30	GLE30		DIETA	NIVEL GRASA	D X N
Colesterol sérico (g/l)	1,15 ^a	1,19 ^a	0,83 ^b	0,85 ^b	0,75 ^b	0,68 ^b	0,70 ^b	0,62 ^b	0,09	0,03	<,0001	0,13
Triglicéridos séricos (g/l)	0,99 ^{ba}	1,26 ^a	0,97 ^{ba}	0,88 ^{bac}	0,60 ^c	1,13 ^{ba}	1,24 ^a	0,79 ^{bc}	0,14	0,007	0,28	0,07
Triglicéridos en hígado (μmol/g)	38,96 ^{cb}	24,48 ^c	29,84 ^{cb}	26,44 ^c	63,04 ^a	39,96 ^{cb}	43,98 ^b	37,37 ^{cb}	5,42	0,003	0,001	0,66

¹ Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. ² Efecto Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio ± EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 4 x 2 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$. *AS: aceite de soja

Tabla 8. Parámetros lipídicos experiencia 2

Parámetro	Grupos experimentales ¹									Efecto ²		
	S7	GL7	GLF7	GLE7	S30	GL30	GLF30	GLE30	EEM	DIETA	NIVEL GRASA	D X N
Colesterol sérico (g/l)	0,65	0,66	0,71	0,73	0,55	0,68	0,71	0,68	0,04	0,09	0,33	0,52
Triglicéridos séricos (g/l)	0,68 ^{bc}	0,90 ^a	0,99 ^a	0,87 ^{ba}	0,34 ^d	0,81 ^{ba}	0,63 ^{bc}	0,82 ^{ba}	0,08	0,02	0,02	0,43
Triglicéridos en hígado (umol/g)	28,32 ^{bac}	21,40 ^{dc}	20,70 ^{dc}	16,55 ^d	34,90 ^a	31,40 ^{ba}	23,83 ^{bdc}	33,38 ^a	3,00	0,06	0,0004	0,21

¹ Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. ² Efecto Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio \pm EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 4 x 2 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$. *AS: aceite de soja

Tabla 9. Parámetros lipídicos experiencia 3

Parámetro	Grupos experimentales ¹								EEM	Efecto ²		
	S7	GL7	GLF7	GLE7	S30	GL30	GLF30	GLE30		DIETA	NIVEL GRASA	D X N
Trigliceridos séricos (g/l)	0,87 ^a	1,02 ^a	1,20 ^a	0,81 ^a	0,46 ^b	1,00 ^a	1,01 ^a	0,96 ^a	0,09	0,02	0,23	0,22
Trigliceridos en hígado (μmol/g)	27,34 ^{ba}	21,58 ^b	24,20 ^{ba}	28,26 ^{ba}	31,61 ^a	24,26 ^{ba}	26,21 ^{ba}	32,18 ^a	1,20	0,05	0,15	0,98

¹ Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. ² Efecto Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio ± EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 4 x 2 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$. *AS: aceite de soja

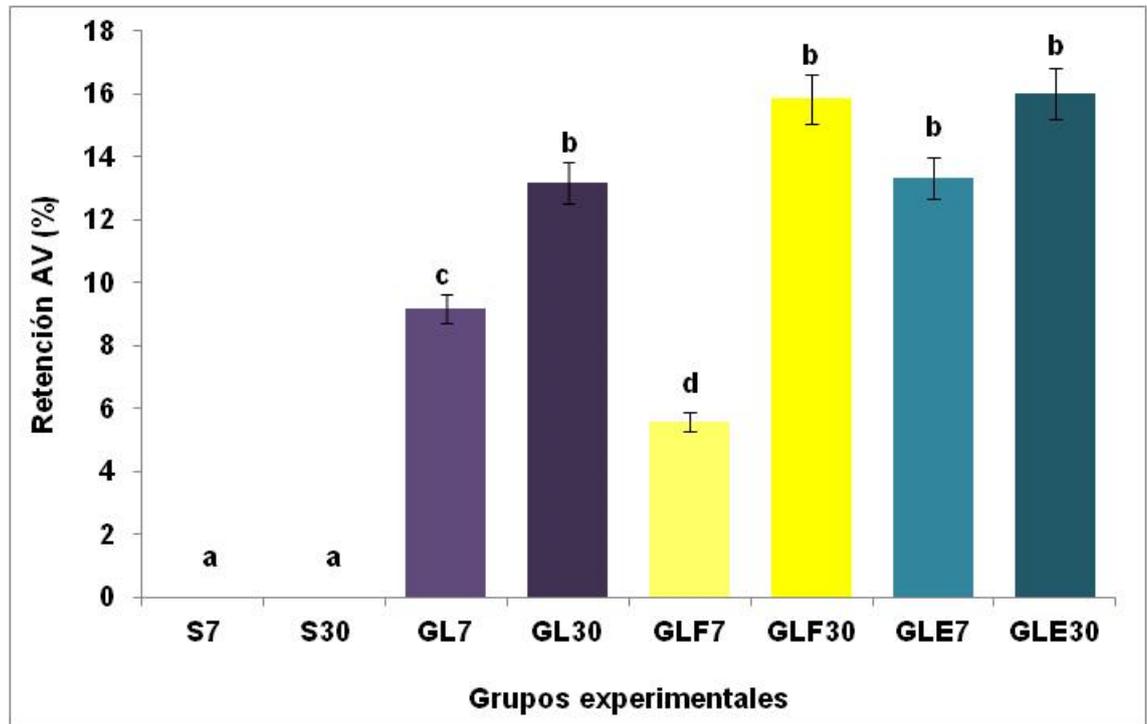


Figura 2. Retención de AV en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS + 4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS + 4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS + 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

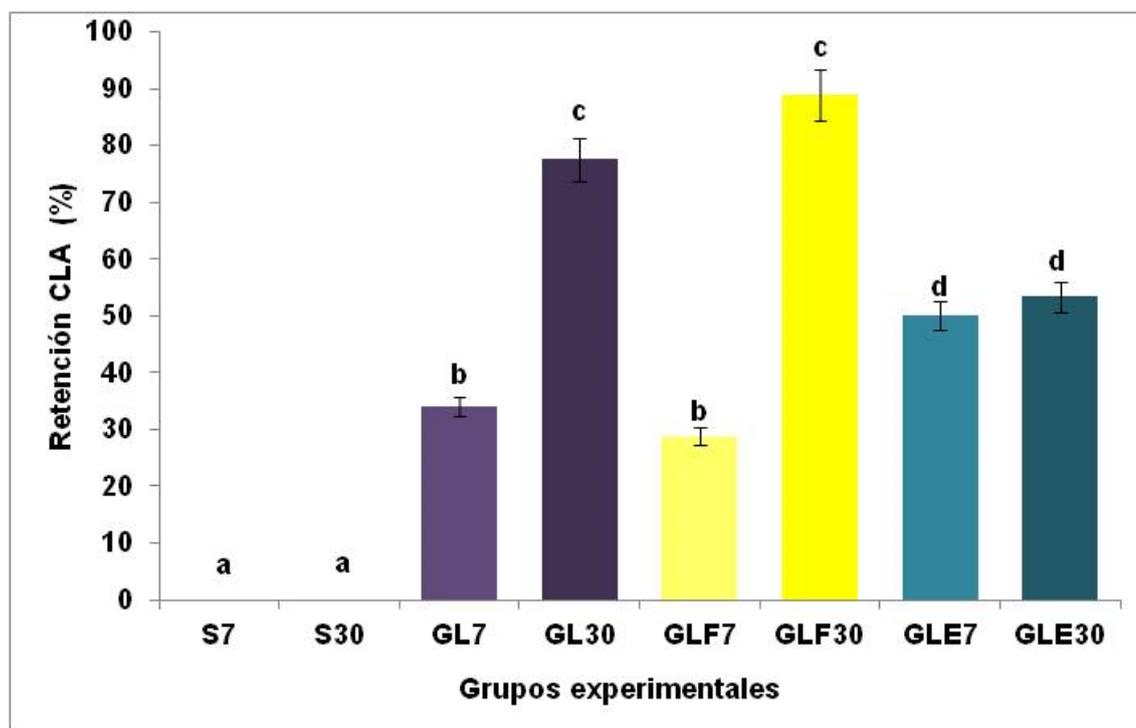


Figura 3. Retención de CLA en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS + 4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS + 4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS + 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

La concentración (g/100g del total de AG) de AV en hígado fue afectada por el origen y nivel de grasa dietaria ($p < 0,05$). La concentración mayor se dio en el grupo experimental GLF30 (0,84; $p < 0,05$) con un aumento (+546%) con respecto al promedio del resto de grupos experimentales (0,13). La concentración de AR en el hígado del grupo experimental GLF30 (2,31) se incrementó (+881%) significativamente ($p < 0,05$) cuando se la comparó con el promedio (0,24) del resto de los grupos experimentales. Las menores concentraciones se observaron en los grupos GL7 (0,17), GLE7 (0,20) y GLE30 (0,32) sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). Las concentraciones intermedias se observaron en los grupos GL30 y GLF7 (0,62 y 0,49 g/100 g del total de AG, respectivamente) sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$; Tabla 10).

La concentración de C16:0 en el hígado del grupo experimental S30 (13,57) se vio reducida (-36,1%) significativamente ($p < 0,05$) al compararla con la concentración promedio del resto de los grupos experimentales (21,23). La concentración (g/100 g del total de AG) de los AG C12:0 y C14:0 en hígado siguió el mismo patrón de comportamiento, mayores concentraciones en los grupos experimentales GL30 (0,18 y 1,60, respectivamente) y GLF30 (0,14 y 1,57, respectivamente) con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el origen y nivel de grasa dietaria (Tabla 10). La retención de los AG, C12:0, C14:0 y C16:0 se presenta en la figura 4 y los mayores porcentajes de retención se observaron en los AG C12:0 y C16:0. Con respecto al C12:0 las mayores retenciones se dieron en los grupos experimentales S7 y S30 con diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$). En referencia al C16:0 la retención fue superior en los grupos experimentales S7, S30 y GLF7 con diferencias entre ellos ($p < 0,05$; Figura 4).

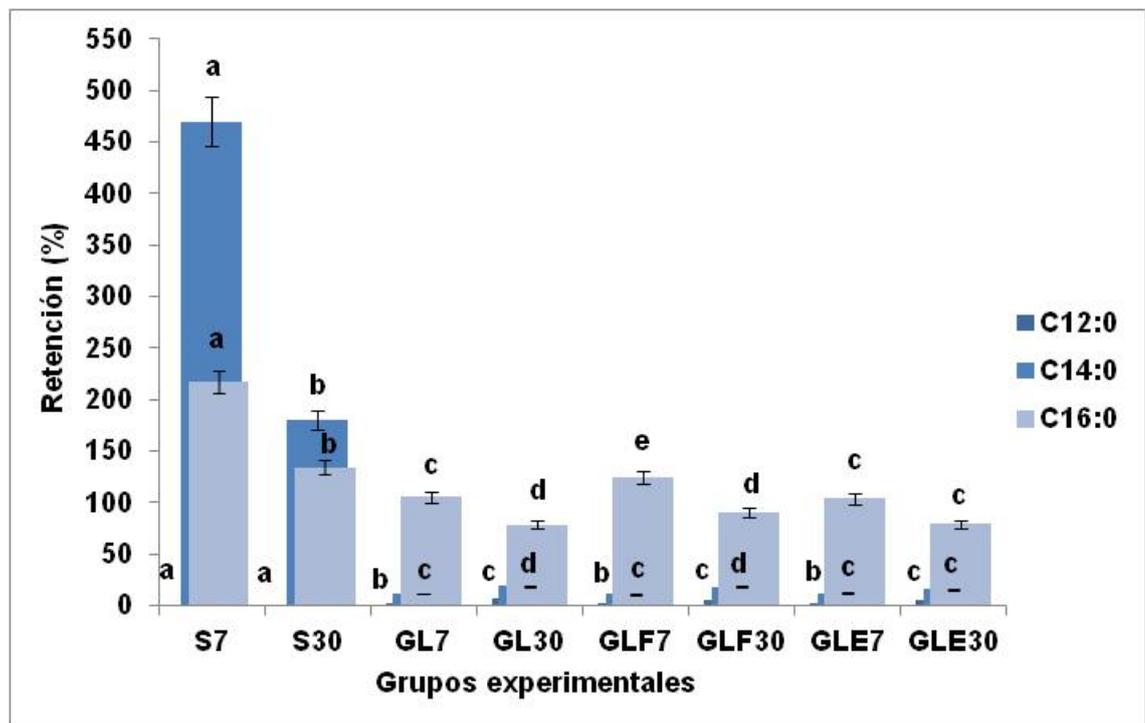


Figura 4. Retención de C12:0, C14:0 y C16:0 en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30:

3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

Los AGS totales fueron afectados ($p < 0,05$) por el origen y nivel de grasa dietaria. La menor concentración (g/100g del total de AG) se observó en el grupo experimental S30 (27,13) con diferencias significativas ($p < 0,05$) cuando se la comparó con el promedio (35,2) del resto de los grupos experimentales y con un aumento del 30%. No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales S7, GLF7, GLF30, GLE7 y GLE30 (Tabla 10).

La relación AGPIc n-6/AGPIc n-3 fue afectada por el origen de la dieta ($p < 0,05$) y esos cambios fueron atribuidos a la diferencia entre la relación del grupo experimental GLF30 (5,91) cuando fue comparado con el promedio de los grupos GL7, GL30 Y GLF7 (6,3) con una reducción del 5,8%. Mientras que la relación se redujo en un 26% en el grupo GLF30 cuando se la comparó con el promedio de la relación de los grupos S7, S30 y GLF30 (8,02), Tabla 10.

4.4.3.2.- Perfil AG en tejido adiposo epididimal

El perfil de AG en TAE se presenta en la Tabla 11. Los isómeros *trans*-11 C18:1, AV y *cis*-9 *trans*-11 C18:2, CLA fueron incorporados al TAE. La concentración (g/100g del total de AG) de ambos isómeros fue afectada por el origen y nivel de grasa dietaria ($p < 0,05$). La concentración de AV en el grupo GLF30 (2,58) aumentó (+656%) cuando se la comparó con la concentración promedio del resto de los grupos experimentales (0,34; Tabla 11). No hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales S7, S30, GL7 y GLE7; entre GL30 y GLE30 y entre GL7 y GLF7. La concentración (g/100g del total de AG) de CLA en el grupo GLF30 (3,26) aumentó (+459%) cuando se la comparó con la concentración del promedio del resto de los grupos experimentales (0,58; $p < 0,05$). No hubo diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales GL7 y GLE7 y entre S7 y S30. Al comparar los grupos experimentales GL30, GLF7, GLF30 Y GLE30 se observó diferencia significativa ($p < 0,05$; Tabla 11).

La conversión, expresada por la relación AR/AV, fue mayor para los grupos GLE7 (4,83) y GLF7 (2,92) con diferencias ($p < 0,05$) entre grupos con nivel recomendado y elevado de grasa (7% y 30 %, respectivamente). La diferencia ($p < 0,05$) entre dietas fue atribuido a la diferencia entre el grupo GLE7 y S7 y S30 (Tabla 11).

La retención de ambos isómeros (AV y CLA) se presenta en las figuras 5 y 6 respectivamente. Al comparar la retención de AV entre niveles de grasa se puede observar que entre los grupos experimentales GLF7 y GLF30, el aumento fue de 449% ($p < 0,05$; Figura 5).

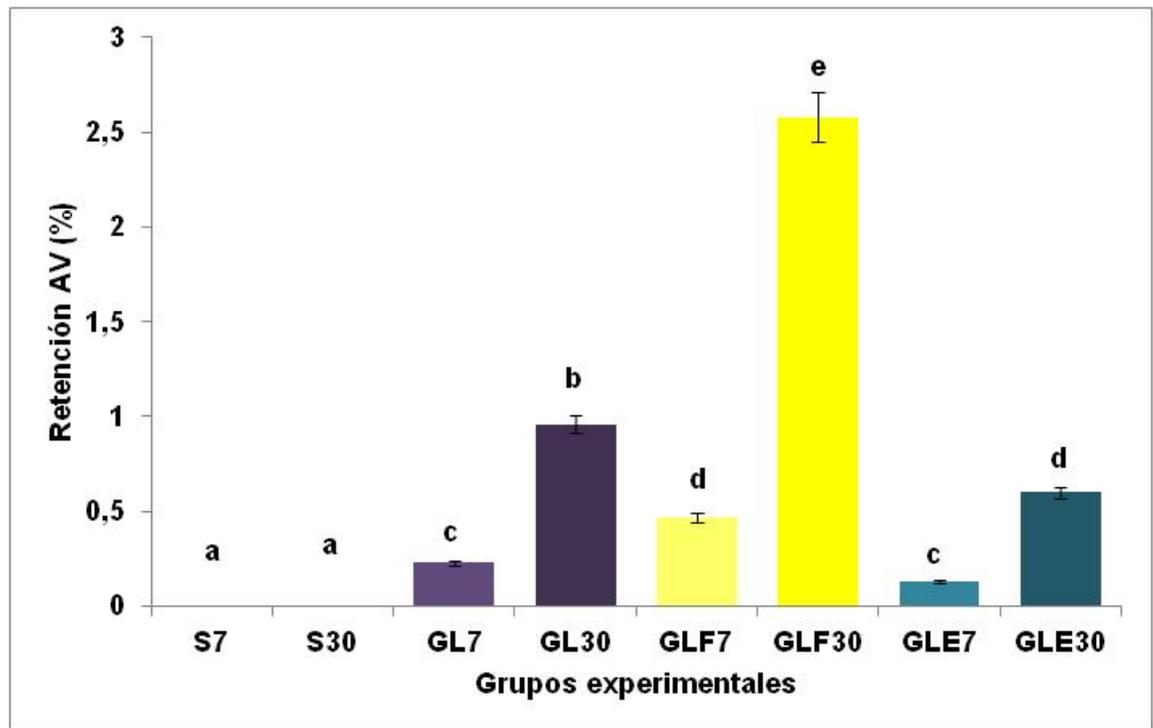


Figura 5. Retención de AV en tejido adiposo epididimal. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

Al comparar la retención de CLA entre niveles de grasa se puede observar que entre los grupos experimentales GLF7 y GLF30 el aumento fue de 159% ($p < 0,05$; Figura 6).

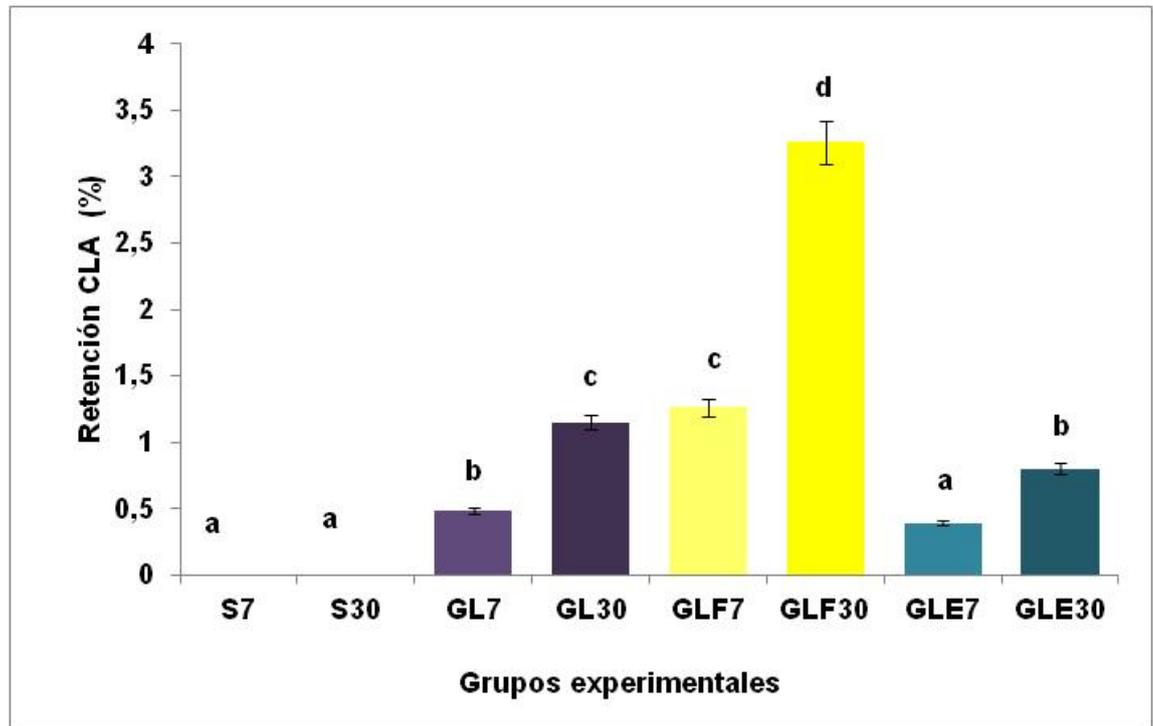


Figura 6. Retención de CLA en tejido adiposo epididimal. Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

El contenido (g/100g del total de AG) del ácido laúrico (C12:0) presentó modificaciones ($p < 0,05$) a causa del origen y nivel de grasa dietaria. La diferencia entre el origen de las dietas estuvo atribuida a los grupos experimentales GLF7, GLE30, GL30, S7 y S30. Las concentraciones más elevadas (Tabla 11) se observaron en GL30 (1,44), GLF30 (1,21), GLE30 (1,01). El contenido del ácido mirístico (C14:0) también fue afectado por el origen y nivel de grasa ($p < 0,05$). Las concentraciones más elevadas se observaron en los grupos experimentales GL, GLF y GLE a niveles recomendados (7%) y elevado (30%) de grasa. Se observaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los grupos experimentales S7, S30, GL7, GL30, GLF30,

GLE7 y GLE30. No se observaron diferencias ($p>0,05$) entre los grupos GLF7 y GLE7 (Tabla 11).

Los niveles (g/100g del total de AG) de ácido palmítico (C16:0) en TAE disminuyeron significativamente ($p<0,05$) en el hígado de los grupos GLF30 (21,92) y S30 (12,45) con diferencias ($p<0,05$) entre ambos grupos (Tabla 11), con una reducción del 43 %.

La concentración (g/100g del total de AG) de AGS en TAE estuvo afectada por el origen y nivel de grasa dietaria ($p<0,05$). El contenido más elevado se observó en el grupo experimental GL30 (41) mientras que el menor se observó en el grupo S30 (16,56) con diferencia significativa ($p<0,05$) entre ellos y una reducción del 60% (Tabla 11). La relación AGPlc n-6/AGPlc n-3 fue menor en el grupo GLF30 (11,63) sin diferencias ($p>0,05$) con la relación del grupo S7 (13,24). La relación C18:2/C18:3 siguió el mismo patrón de comportamiento. Los grupos experimentales con presencia del isómero CLA redujeron la concentración de los AG C18:2 y C18:3 al compararlos con los controles con niveles recomendados y elevados de grasa (S7 y S30, respectivamente). No se observó diferencia significativa ($p>0,05$) entre los grupos experimentales GLF7, GLF30 y GLE7; entre GL30 y GLE30; entre GLF30 y GLE30. Las diferencias ($p<0,05$) son atribuidas a los grupos S7 y S30; GL7 y GL30; GLE7 y GLE30 (Tabla 11).

4.4.3.3.- Perfil AG en suero

La composición de AG presentes en el suero de los animales expresa el conjunto de AG correspondiente a los lípidos de la dieta más aquellos procedentes de la metabolización de lipoproteínas a nivel de diferentes tejidos.

Los distintos tipos de dieta y los niveles recomendados y elevados de grasa indujeron cambios importantes en el perfil de AG en suero y se presentan en la Tabla 12.

La concentración (g/100g del total de AG) más elevada del isómero *trans*-11 C18:1 (1,26) se observó en los lípidos séricos de los animales alimentados con la dieta GLF30. Así, el contenido de AV de este grupo experimental fue 332% mayor que el promedio del resto de los grupos experimentales (0,29; $p<0,05$). El contenido de este isómero en suero fue afectado por el origen y nivel de grasa dietaria. En particular los animales que consumieron las dietas con grasas lácteas, con menor o mayor contenido de AV fueron los que mostraron mayores concentraciones de este isómero

con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre dietas y entre nivel de grasa de los cuatro grupos experimentales (GL7, GL30, GLF7 y GLF30). No se observaron diferencias ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales S7 y S30; GL7 y GLE30; GL7 y GLE7; GL30 y GLF7.

El contenido (g/100g del total de AG) de CLA (*cis-9 trans-11 C18:2*) fue afectado por el tipo de grasa ($p < 0,05$). Las concentraciones más elevadas se observaron en los grupos experimentales GLF7 (0,47) y GLF30 (0,61) sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). El aumento (+134,6%) fue atribuido al grupo GLF30 (0,61) cuando fue comparado con el promedio del resto de los grupos experimentales (0,26). Se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los grupos GL7 y GLF30; S7 y S30 del resto de los grupos experimentales, GLF30, GLE7 y GLE30 (Tabla 12).

La retención de ambos isómeros mostró dependencia del nivel y también del origen de la grasa dietaria, además las retenciones fueron significativamente más elevadas en los grupos experimentales GL30 y GLE30 (Figuras 7 y 8).

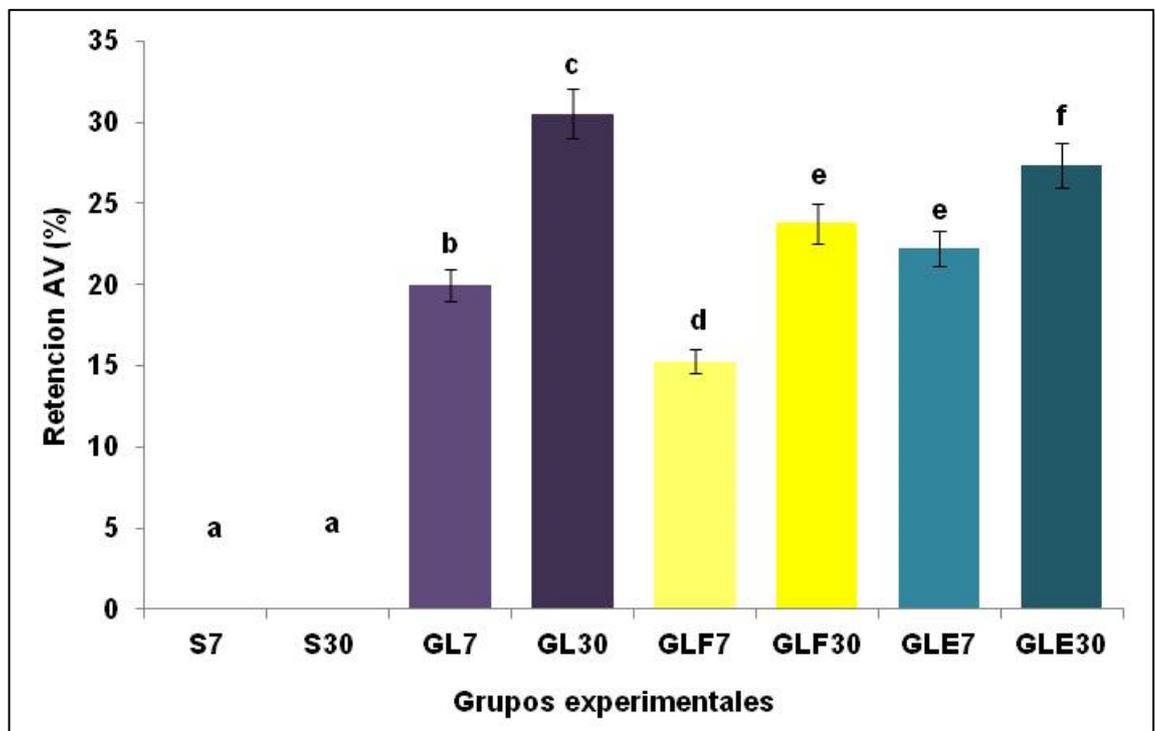


Figura 7. Retención de AV en suero. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada;

S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

Tabla 10. Composición de ácidos grasos en hígado

AG (g/100gAG)	Grupos experimentales ¹								Efecto ²		
	S7	S30	GL7	GL30	GLF7	GLF30	GLE7	GLE30	D	NG	DxN
C10:0	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^{ab}	0,00±0,00 ^a	0,04±0,01 ^{bc}	0,01±0,00 ^{ab}	0,03±0,01 ^{abc}	0,00±0,00 ^a	0,04±0,01 ^c	0,21	0,000	0,03
C12:0	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,03±0,01 ^a	0,18±0,04 ^b	0,03±0,00 ^a	0,14±0,04 ^{ab}	0,036±0,00 ^a	0,10±0,04 ^{ab}	0,03	0,000	0,05
C14:0	0,47±0,09 ^a	0,18±0,02 ^a	0,64±0,04 ^{ab}	1,60±0,21 ^c	0,60±0,03 ^{ab}	1,57±0,16 ^c	0,53±0,02 ^{ab}	1,07±0,19 ^{bc}	0,000	0,000	0,000
c-9 C14:1	0,03±0,01 ^{ab}	0,00±0,00 ^a	0,06±0,01 ^b	0,14±0,01 ^c	0,07±0,00 ^b	0,15±0,01 ^c	0,03±0,01 ^{ab}	0,06±0,01 ^b	0,000	0,000	0,000
C15:0	0,10±0,00 ^{ab}	0,09±0,00 ^a	0,18±0,00 ^c	0,36±0,02 ^e	0,16±0,00 ^{bc}	0,39±0,01 ^e	0,16±0,01 ^{bc}	0,26±0,02 ^d	0,000	0,000	0,000
C16:0 iso	0,04±0,00 ^{ab}	0,02±0,00 ^a	0,04±0,01 ^b	0,05±0,01 ^b	0,04±0,00 ^{ab}	0,05±0,00 ^b	0,04±0,01 ^{ab}	0,03±0,00 ^{ab}	0,01	0,76	0,07
C16:0	21,93±1,60 ^a	13,57±0,20 ^b	22,38±0,26 ^a	21,58±0,44 ^a	22,22±0,61 ^a	20,17±0,07 ^a	20,46±0,21 ^a	19,87±0,47 ^a	0,000	0,000	0,000
C17:0 anteiso	0,15±0,05 ^a	0,00±0,00 ^b	0,16±0,03 ^a	0,14±0,04 ^{ab}	0,16±0,02 ^a	0,21±0,01 ^a	0,20±0,04 ^a	0,12±0,01 ^{ab}	0,007	0,03	0,03
C17:0	0,16±0,02 ^a	0,20±0,01 ^{ab}	0,23±0,01 ^{bc}	0,30±0,01 ^{de}	0,19±0,01 ^{ab}	0,31±0,00 ^e	0,24±0,02 ^{bcd}	0,28±0,01 ^{cde}	0,000	0,000	0,02
C18:0	10,14±1,01	12,80±1,01	12,58±0,68	12,66±0,80	11,72±0,46	10,67±0,32	13,58±0,48	13,78±1,23	0,02	0,41	0,16
ℓ-9 C18:1	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,05±0,00 ^a	0,10±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,36±0,10 ^b	0,08±0,02 ^a	0,18±0,08 ^{ab}	0,007	0,001	0,005
ℓ-11 C18:1	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,11±0,01 ^a	0,25±0,60 ^a	0,19±0,01 ^a	0,84±0,12 ^b	0,12±0,03 ^a	0,24±0,06 ^a	0,000	0,000	0,000
c-9 C18:1	13,33±2,17 ^{ab}	9,75±0,55 ^a	13,93±0,88 ^{ab}	19,22±0,67 ^{cd}	15,03±0,58 ^{bc}	20,78±0,26 ^d	12,59±0,55 ^{ab}	18,92±1,29 ^{cd}	0,000	0,000	0,000
c-11 C18:1	3,95±0,52 ^{ab}	2,13±0,12 ^c	4,88±0,20 ^b	3,54±0,37 ^{abc}	4,61±0,29 ^{ab}	4,05±0,17 ^{ab}	4,50±0,27 ^{ab}	3,44±0,25 ^{ac}	0,001	0,000	0,23
c-9 c-12 C18:2	22,54±1,67 ^a	33,77±1,99 ^b	13,64±0,23 ^c	12,69±0,29 ^c	14,43±0,48 ^c	13,82±0,73 ^c	15,61±0,78 ^c	14,79±0,53 ^c	0,000	0,006	0,000
c-9 c-12 c-15 C18:3	1,09±0,10 ^a	1,76±0,20 ^b	0,47±0,03 ^c	0,41±0,01 ^c	0,58±0,01 ^c	0,63±0,05 ^c	0,52±0,08 ^c	0,39±0,04 ^c	0,000	0,05	0,001
c-9 ℓ-11 C18:2 (CLA)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,17±0,03 ^{ab}	0,62±0,09 ^d	0,49±0,05 ^{cd}	2,31±0,09 ^e	0,20±0,04 ^{ab}	0,32±0,05 ^{bc}	0,000	0,000	0,000
C20:4 (AA)	15,32±1,95 ^{ab}	16,28±1,18 ^{ab}	18,62±0,98 ^b	15,22±0,8960 ^{ab}	17,41±0,89 ^{ab}	12,60±0,49 ^a	19,81±0,47 ^b	16,73,44 ^{ab}	0,04	0,004	0,10
ΣAGS	33,19±0,84 ^a	27,13±1,10 ^d	36,34±0,40 ^{bc}	36,98±0,44 ^c	35,20±0,41 ^{abc}	33,62±0,41 ^{ab}	35,34±0,43 ^{abc}	35,68±0,71 ^{abc}	0,000	0,001	0,000
ΣAGMlc	21,49±3,68 ^a	12,80±0,65 ^b	23,01±1,39 ^a	25,79±1,38 ^a	24,16±1,29 ^a	28,26±0,65 ^a	20,41±0,39 ^{ab}	24,69±1,71 ^a	0,000	0,61	0,002
ΣAGPlc	44,71±4,29 ^a	59,36±0,61 ^b	39,39±1,19 ^{acd}	34,37±1,41 ^{cd}	38,94±1,50 ^{acd}	32,00±0,29 ^c	42,85±0,42 ^{ad}	37,64±1,49 ^{acd}	0,000	0,77	0,000
ΣAGPlc n-6	39,67±3,68 ^a	52,65±0,85 ^b	33,99±0,98 ^{ac}	29,70±1,22 ^c	33,46±1,29 ^{ac}	28,19±0,43 ^c	37,27±0,37 ^a	33,49±1,18 ^{ac}	0,000	0,94	0,000
ΣAGPlc n-3	***5,04±0,62 ^a	6,71±0,34 ^b	5,40±0,21 ^{ab}	4,67±0,19 ^a	5,48±0,21 ^{ab}	4,81±0,22 ^a	5,57±0,08 ^{ab}	4,15±0,30 ^a	0,02	0,20	0,000

AGS/AGMIc	1,66±0,23 ^{ab}	2,15±0,20 ^b	1,60±0,10 ^{ab}	1,45±0,07 ^a	1,47±0,06 ^a	1,19±0,04 ^a	1,73±0,04 ^{ab}	1,47±0,11 ^a	0,002	0,60	0,02
AGS/AGMI \dagger	0,00±0,00 ^{ab}	0,00±0,00 ^b	201,10±16,7802 ^d	90,38±15,52 ^{bc}	144,93±7,21 ^{cd}	23,21±2,67 ^{ab}	179,65±33,20 ^d	95,15±24,04 ^{bc}	0,000	0,000	0,006
AGS/AGPIc	0,79±0,11 ^a	0,47±0,02 ^d	0,94±0,03 ^{abc}	1,09±0,04 ^c	0,92±0,04 ^{abc}	1,04±0,01 ^{bc}	0,84±0,01 ^{ab}	0,96±0,04 ^{abc}	0,000	0,59	0,000
C18:2/C18:3	20,64±0,58 ^a	19,58±1,13 ^a	29,22±1,56 ^{bc}	30,88±0,37 ^{cd}	24,76±0,63 ^{abc}	22,06±0,89 ^{ab}	31,61±3,70 ^{cd}	39,01±2,36 ^d	0,000	0,30	0,042
AR/AV	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,56±0,28 ^{ab}	3,06±0,81 ^b	2,61±0,37 ^b	2,96±0,46 ^b	1,69±0,32 ^{ab}	1,83±0,77 ^{ab}	0,000	0,15	0,40
c-9 C 16:1/C16:0	0,14±0,03 ^a	0,01±0,00 ^b	0,14±0,01 ^a	0,06±0,01 ^{bc}	0,16±0,01 ^a	0,05±0,00 ^{bc}	0,11±0,01 ^{ac}	0,04±0,00 ^b	0,11	0,000	0,27
c-9 C 18:1/C18:0	1,43±0,41 ^{ab}	0,78±0,09 ^a	1,12±0,12 ^{ab}	1,56±0,16 ^{ab}	1,29±0,10 ^{ab}	1,95±0,08 ^b	0,93±0,07 ^a	1,43±0,21 ^{ab}	0,06	0,10	0,008
AA/C18:2	0,67±0,05 ^{ab}	0,49±0,07 ^a	1,37±0,08 ^d	1,201±0,04 ^{cd}	1,21±0,03 ^{cd}	0,92±0,08 ^{bc}	1,28±0,09 ^{cd}	1,14±0,12 ^{cd}	0,000	0,002	0,83
γ -C18:3/C18:2	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^{ab}	0,01±0,00 ^{ab}	0,01±0,00 ^{ab}	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^{ab}	0,02±0,00 ^{ab}	0,01±0,00 ^b	0,04	0,005	0,32
AA/ γ -C18:3	35,86±6,73 ^a	28,56±4,07 ^a	100,25±16,91 ^{ab}	101,29±27,01 ^{ab}	58,86±3,89 ^{ab}	73,93±19,15 ^{ab}	85,71±21,93 ^{ab}	120,36±24,39 ^b	0,001	0,40	0,67
EPA/ α C18:3	0,33±0,02 ^{ab}	0,29±0,02 ^a	0,53±0,06 ^c	0,60±0,02 ^c	0,49±0,04 ^{bc}	0,65±0,04 ^c	0,48±0,04 ^{abc}	0,52±0,05 ^{bc}	0,000	0,06	0,15
DHA/ α C18:3	3,23±0,32 ^{ab}	2,75±0,67 ^a	10,05±0,90 ^c	9,70±0,21 ^c	7,89±0,34 ^{bc}	6,17±1,01 ^{abc}	10,08±1,97 ^c	9,60±1,5675 ^c	0,000	0,32	0,90
EPA/AA	0,02±0,00 ^{abc}	0,03±0,00 ^{bc}	0,01±0,00 ^a	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^{ab}	0,03±0,01 ^c	0,01±0,00 ^a	0,01±0,0030 ^a	0,000	0,004	0,06
AA/EPA	42,51±3,28 ^{ab}	34,08±5,27 ^a	77,78±8,37 ^{bc}	61,09±0,42 ^{abc}	62,98±7,72 ^{abc}	32,87±5,90 ^a	85,04±9,20 ^c	90,48±14,94 ^c	0,000	0,04	0,19
t -9 C 18:1/ t -11 C18:1	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,42±0,03 ^{ab}	0,56±0,21 ^b	0,00±0,00 ^a	0,40±0,0690 ^{ab}	0,67±0,11 ^b	0,63±0,14 ^b	0,000	0,10	0,16
DHA/AA	0,23±0,00 ^{ab}	0,27±0,01 ^{bc}	0,25±0,00 ^{ab}	0,26±0,00 ^{bc}	0,26±0,00 ^{bc}	0,29±0,01 ^c	0,24±0,00 ^{ab}	0,21±0,00 ^a	0,000	0,04	0,002
AGPIc n-6/AGPIc n-3	7,98±0,31 ^{ab}	7,92±0,51 ^{ab}	6,30±0,07 ^c	6,36±0,02 ^c	6,10±0,07 ^c	5,91±0,35 ^c	6,69±0,07 ^{ac}	8,15±0,33 ^b	0,000	0,12	0,02

¹Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada.

²Efecto: Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio \pm EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 4 x 2 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$. *AS: aceite de soja.

Tabla 11. Composición de ácidos grasos en tejido adiposo epididimal

AG (g/100g AG)	Grupos experimentales ¹								Efecto ²		
	S7	S30	GL7	GL30	GLF7	GLF30	GLE7	GLE30	D	NG	DxN
C10:0	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,13±0,00 ^b	0,44±0,01 ^d	0,11±0,00 ^b	0,36±0,01 ^c	0,01±0,00 ^b	0,33±0,02 ^c	0.000	0.000	0.000
C12:0	0,07±0,0040 ^a	0,03±0,00 ^a	0,41±0,01 ^b	1,44±0,03 ^e	0,35±0,01 ^b	1,21±0,02 ^d	0,33±0,01 ^b	1,01±0,04 ^c	0.000	0.000	0.000
C14:0	1,32±0,0167 ^a	0,36±0,03 ^g	3,05±0,02 ^c	6,45±0,09 ^f	2,91±0,0367 ^{bc}	6,04±0,07 ^e	2,69±0,01 ^b	4,57±0,15 ^d	0.000	0.000	0.000
c-9-C14:1	0,09±0,01 ^a	0,00±0,00 ^f	0,35±0,01 ^c	0,61±0,02 ^d	0,36±0,0118 ^c	0,68±0,01 ^e	0,27±0,02 ^b	0,40±0,01 ^c	0.000	0.000	0.000
C15:0	0,11±0,01 ^a	0,07±0,00 ^a	0,30±0,02 ^b	0,64±0,02 ^d	0,26±0,01 ^b	0,61±0,01 ^d	0,24±0,01 ^b	0,50±0,01 ^c	0.000	0.000	0.000
C16:0 iso	0,08±0,01 ^a	0,03±0,00 ^d	0,12±0,01 ^{bc}	0,14±0,01 ^c	0,11±0,01 ^b	0,14±0,00 ^c	0,10±0,00 ^{ab}	0,10±0,00 ^{ab}	0.000	0.85	0.000
C16:0	25,25±0,55 ^{ab}	12,45±0,36 ^d	28,65±0,37 ^c	26,50±0,19 ^b	28,55±0,54 ^c	21,92±0,19 ^e	28,88±0,45 ^c	23,47±0,33 ^{ae}	0.000	0.000	0.000
C17:0 iso	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,27±0,01 ^{cd}	0,19±0,07 ^b	0,24±0,01 ^c	0,28±0,01 ^d	0,25±0,00 ^{cd}	0,19±0,01 ^b	0.000	0.000	0.000
C17:0 anteiso	0,19±0,01 ^a	0,04±0,00 ^b	0,39±0,04 ^e	0,23±0,01 ^{ac}	0,35±0,02 ^{de}	0,31±0,02 ^{cde}	0,28±0,01 ^{acd}	0,20±0,03 ^{ac}	0.000	0.000	0.06
C17:0	0,08±0,01 ^a	0,12±0,00 ^b	0,14±0,00 ^b	0,24±0,00 ^{cd}	0,12±0,01 ^b	0,28±0,01 ^d	0,12±0,00 ^b	0,23±0,01 ^c	0.000	0.000	0.000
C18:0	3,10±0,09 ^a	3,46±0,06 ^a	3,28±0,05 ^a	5,37±0,04 ^b	3,33±0,12 ^a	5,16±0,17 ^b	3,33±0,04 ^a	5,02±0,10 ^b	0.000	0.000	0.000
t-9 C18:1	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,14±0,01 ^{ab}	0,43±0,01 ^c	0,17±0,01 ^{ab}	0,84±0,09 ^d	0,06±0,02 ^a	0,25±0,04 ^b	0.000	0.000	0.000
t-11 C18:1	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,23±0,02 ^{abc}	0,96±0,13 ^d	0,47±0,06 ^{bc}	2,58±0,18 ^e	0,13±0,03 ^{ab}	0,60±0,12 ^{cd}	0.000	0.000	0.000
c-9 C18:1	24,00±0,64 ^a	21,71±0,22 ^a	26,61±0,39 ^b	32,01±0,59 ^c	27,49±0,34 ^b	30,98±0,58 ^c	27,94±0,14 ^b	34,69±0,74 ^d	0.000	0.000	0.000
c-9 c-12 C18:2	28,23±1,42 ^a	50,84±0,65 ^b	16,52±0,69 ^d	10,99±0,21 ^c	15,08±0,79 ^d	11,30±0,15 ^c	16,84±0,51 ^d	14,64±0,33 ^d	0.000	0.000	0.000
c-9 c-12 c-15 C18:3	2,05±0,08 ^a	3,64±0,05 ^b	1,18±0,05 ^f	0,69±0,01 ^c	1,09±0,04 ^{ef}	0,96±0,01 ^{de}	1,10±0,03 ^{ef}	0,78±0,02 ^{cd}	0.000	0.000	0.000
c-9 t-11 C18:2 (CLA)	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,48±0,01 ^b	1,15±0,02 ^d	1,26±0,02 ^e	3,26±0,03 ^f	0,39±0,01 ^b	0,80±0,01 ^c	0.000	0.000	0.000
C22:5 (EPA)	0,08±0,00 ^{ab}	0,09±0,01 ^b	0,05±0,00 ^{ac}	0,04±0,00 ^c	0,04±0,00 ^{ac}	0,05±0,00 ^{ac}	0,06±0,01 ^{abc}	0,03±0,00 ^c	0.000	0.45	0.05
C22:6 (DHA)	0,14±0,00 ^{ab}	0,15±0,02 ^b	0,09±0,01 ^a	0,04±0,00 ^{cd}	0,06±0,01 ^{cd}	0,05±0,00 ^{cd}	0,07±0,00 ^{cd}	0,03±0,00 ^c	0.000	0.02	0.04
ΣAGS	30,15±0,62 ^a	16,56±0,32 ^b	36,46±0,34 ^c	41,00±0,18 ^d	36,10±0,60 ^c	35,74±0,28 ^c	36,07±0,53 ^c	35,17±0,59 ^c	0.000	0.000	0.000
ΣAGMIc	37,80±0,98 ^a	26,53±0,26 ^b	43,45±0,46 ^c	42,53±0,09 ^c	44,41±0,28 ^{cd}	42,34±0,12 ^c	44,09±0,33 ^c	46,29±0,31 ^d	0.000	0.000	0.000
ΣAGPIc	31,57±1,54 ^a	56,28±0,54 ^b	18,43±0,77 ^e	12,03±0,21 ^c	16,73±0,86 ^e	12,70±0,17 ^{cd}	18,63±0,51 ^e	15,86±0,33 ^{de}	0.000	0.000	0.000
ΣAGPIc n-6	29,35±1,45 ^a	52,42±0,56 ^b	17,17±0,71 ^d	11,29±0,21 ^c	15,58±0,81 ^d	11,69±0,17 ^c	17,45±0,50 ^d	15,05±0,32 ^d	0.000	0.000	0.000
ΣAGPIc n-3	2,21±0,09 ^a	3,86±0,07 ^b	1,26±0,05 ^f	0,73±0,01 ^c	1,15±0,04 ^{ef}	1,01±0,01 ^{de}	1,18±0,02 ^{ef}	0,81±0,02 ^{cd}	0.000	0.000	0.000
AGS/AGMIc	0,78±0,00 ^{ab}	0,62±0,01 ^d	0,84±0,00 ^b	0,96±0,00 ^c	0,81±0,01 ^b	0,84±0,00 ^b	0,82±0,01 ^b	0,76±0,01 ^a	0.000	0.02	0.000
AGS/AGMI t	137,79±2,50 ^{ab}	97,09±3,58 ^{ad}	88,62±8,23 ^{ad}	25,13±1,95 ^c	49,96±4,69 ^{cd}	8,39±0,26 ^c	178,20±32,00 ^b	40,29±8,52 ^{cd}	0.000	0.000	0.002
AGS/AGPIc	0,96±0,07 ^a	0,29±0,01 ^e	1,99±0,09 ^b	3,41±0,07 ^d	2,18±0,14 ^b	2,82±0,05 ^c	1,94±0,07 ^b	2,22±0,08 ^b	0.000	0.000	0.000

C18:2/C18:3	13,69±0,18a	13,99±0,28a	14,04±0,09a	15,95±0,49b	13,74±0,2227 ^a	11,78±0,25 ^d	15,26±0,38 ^{ab}	18,70±0,59 ^c	0.000	0.001	0.000
AR/AV	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	2,16±0,22 ^{ab}	1,29±0,18 ^{ab}	2,92±0,57 ^{ab}	1,28±0,08 ^{ab}	4,83±2,53 ^b	1,57±0,35 ^{ab}	0.02	0.04	0.37
c-9 C16:1/C16:0	0,27±0,00 ^a	0,06±0,01 ^c	0,29±0,00 ^{ab}	0,13±0,00 ^d	0,30±0,01 ^b	0,14±0,00 ^d	0,29±0,01 ^{ab}	0,13±0,00 ^d	0.000	0.000	0.000
c-9 C 18:1/C18:0	7,73±0,17 ^{ab}	6,28±0,14 ^{cd}	8,12±0,10 ^b	5,97±0,14 ^c	8,27±0,22 ^b	6,02±0,20 ^c	8,40±0,12 ^b	6,92±0,23 ^{ad}	0.004	0.000	0.06
AA/C18:2	0,02±0,00 ^{ab}	0,01±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b	0,02±0,00 ^{ab}	0,02±0,00 ^{ab}	0,02±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a	0.004	0.000	0.20
γ-C18:3/C18:2	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^e	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^d	0,00±0,00 ^c	0.000	0.000	0.000
AA/γ-C18:3	3,55±0,09 ^{ab}	2,56±0,24 ^a	5,71±0,27 ^{bcd}	0,00±0,00 ^e	4,23±0,15 ^{ab}	5,56±1,16 ^{bc}	7,37±0,66 ^{cd}	8,14±0,60 ^d	0.000	0.006	0.000
EPA/α C18:3	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0,00±0,00 ^b	0.000	0.37	0.49
DHA/α C18:3	0,066±0,00 ^{ab}	0,04±0,01 ^{ab}	0,07±0,01 ^b	0,06±0,01 ^{ab}	0,05±0,00 ^{ab}	0,05±0,01 ^{ab}	0,07±0,01 ^{ab}	0,04±0,01 ^a	0.11	0.002	0.34
EPA/AA	0,04±0,00 ^a	0,06±0,00 ^b	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0.000	0.01	0.001
AA/EPA	31,36±5,89 ^a	17,82±0,92 ^b	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0.000	0.03	0.007
t-9 C18:1/t-11 C18:1	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,61±0,06 ^c	0,48±0,08 ^{bc}	0,38±0,06 ^{bc}	0,34±0,05 ^b	0,44±0,02 ^{bc}	0,47±0,07 ^{bc}	0.000	0.37	0.57
DHA/AA	0,25±0,02 ^a	0,20±0,02 ^{ab}	0,23±0,02 ^a	0,19±0,02 ^{ab}	0,21±0,03 ^{ab}	0,24±0,01 ^a	0,19±0,02 ^{ab}	0,12±0,02 ^b	0.01	0.06	0.19
AGPIc n-6/AGPIc n-3	13,24±0,22 ^{ab}	13,60±0,32 ^b	13,59±0,07 ^b	15,47±0,51 ^c	13,48±0,22 ^b	11,63±0,24 ^a	14,85±0,40 ^{bc}	18,55±0,58 ^d	0.000	0.001	0.000

¹Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. ²Efecto: Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio ± EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 4 x 2 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$. *AS: aceite de soja.

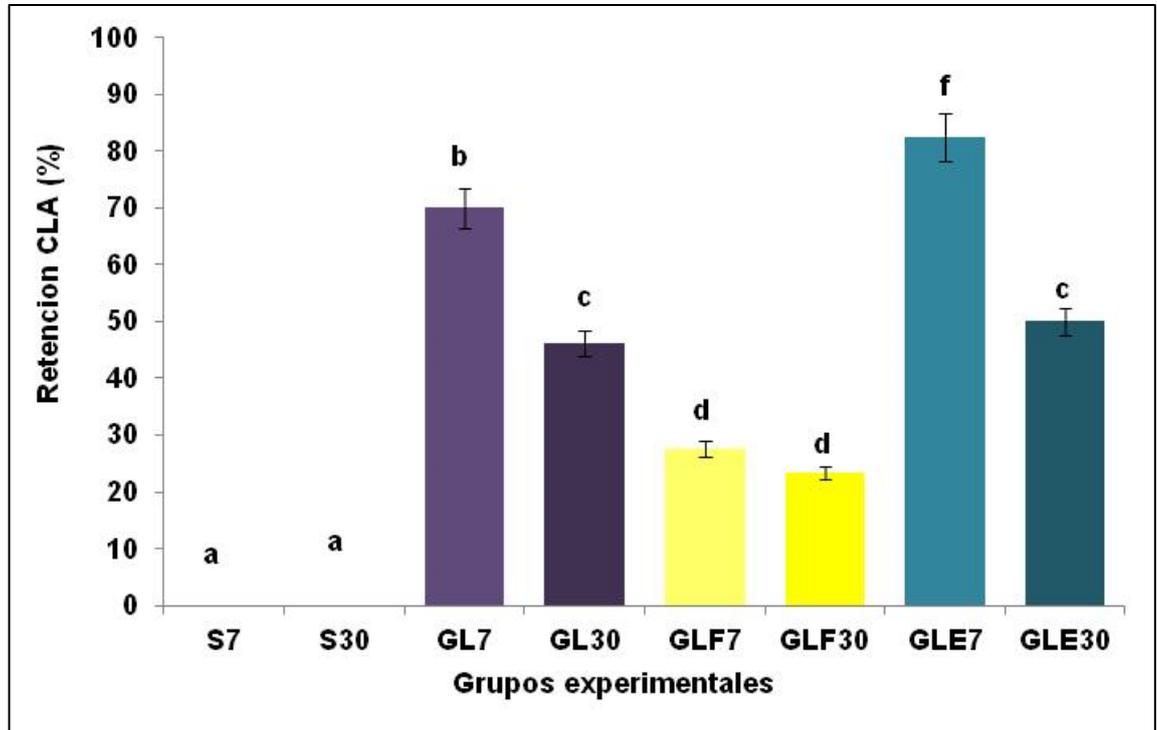


Figura 8. Retención de CLA en suero. Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

Los AGS totales no fueron afectados ni por el origen ni por el nivel de grasa dietaria ($p>0,05$; Tabla 12). La relación AR/AV fue afectada por el origen y nivel de grasa dietaria ($p<0,05$) esos cambios son atribuidos a las diferencias entre los grupos experimentales control (S7 y S30) con el resto de los grupos, GL7 y GL30, GLF7, GLF30 y GLE30 (Tabla 12). La relación AGPIc n-6/AGPIc n-3 se vio reducida (-22%) en el grupo GLF30 (7,01) al ser comparado con su control, S30 (8,94; $p<0,05$). El contenido de C18:2 no aumentó con el nivel de grasa dietaria consumida ($p>0,05$) mientras que el C18:3 aumentó (+161%) significativamente ($p<0,05$) al comparar el grupo S30 con el contenido promedio del resto de los grupos experimentales (Tabla 12).

Tabla 12. Composición de ácidos grasos en suero

AG (g/100g/AG)	Grupos experimentales ¹								Efecto ²		
	S7	S30	GL7	GL30	GLF7	GLF30	GLE7	GLE30	D	NG	DxN
C12:0	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,04±0,00 ^{ab}	0,01±0,00 ^a	0,07±0,03 ^b	0,004	0,01	0,05
C14:0	0,20±0,02 ^a	0,21±0,04 ^a	0,44±0,05 ^{abc}	0,84±0,12 ^c	0,58±0,09 ^{abc}	0,79±0,04 ^{bc}	0,41±0,04 ^{ab}	0,68±0,17 ^{bc}	0,000	0,001	0,18
c-9-C14:1	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,08±0,01 ^b	0,00±0,00 ^a	0,07±0,01 ^b	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,000	0,000	0,000
C15:0	0,11±0,02 ^a	0,14±0,01 ^a	0,19±0,04 ^{ab}	0,34±0,03 ^c	0,20±0,02 ^{ab}	0,32±0,02 ^c	0,18±0,01 ^{ab}	0,27±0,03 ^{bc}	0,000	0,000	0,086
C16:0 iso	0,06±0,01	0,04±0,00	0,07±0,00	0,07±0,01	0,08±0,01	0,07±0,01	0,06±0,00	0,05±0,01	0,03	0,18	0,83
C16:0	21,53±0,76 ^a	17,18±0,13 ^b	21,64±2,05 ^a	20,68±0,88 ^{ab}	22,69±0,55 ^a	18,84±0,23 ^{ab}	21,41±0,39 ^a	19,34±0,35 ^{ab}	0,23	0,000	0,22
c-9 C16:1	1,07±0,19 ^{ab}	0,28±0,11 ^d	1,77±0,11 ^c	0,78±0,07 ^{ad}	2,01±0,13 ^c	0,81±0,08 ^{ad}	1,60±0,21 ^{bc}	0,65±0,16 ^{ad}	0,000	0,000	0,55
C17:0 anteiso	0,06±0,01 ^a	0,00±0,00 ^d	0,11±0,01 ^{bc}	0,10±0,01 ^{abc}	0,14±0,02 ^c	0,10±0,00 ^{abc}	0,10±0,01 ^{abc}	0,07±0,00 ^{ab}	0,000	0,000	0,20
C17:0	0,26±0,02 ^{ab}	0,31±0,02 ^{ab}	0,29±0,02 ^{ab}	0,30±0,01 ^{ab}	0,24±0,02 ^a	0,32±0,01 ^b	0,29±0,02 ^{ab}	0,32±0,01 ^{ab}	0,40	0,002	0,209
C18:0	18,04±1,27 ^{ab}	21,34±1,00 ^b	16,90±1,12 ^a	18,69±0,68 ^{ab}	15,83±0,50 ^a	17,37±0,57 ^{ab}	16,15±0,75 ^a	19,36±0,90 ^{ab}	0,016	0,001	0,66
t-9 C18:1	0,02±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	0,12±0,01 ^b	0,16±0,02 ^{bc}	0,16±0,01 ^{bc}	0,21±0,02 ^c	0,12±0,01 ^b	0,15±0,01 ^b	0,000	0,005	0,044
t-11 C18:1	0,04±0,01 ^a	0,05±0,02 ^a	0,24±0,01 ^{bc}	0,58±0,04 ^d	0,52±0,01 ^d	1,26±0,09 ^e	0,20±0,01 ^{ab}	0,41±0,05 ^{cd}	0,000	0,000	0,000
c-9 C18:1	5,49±0,48 ^a	5,14±0,50 ^a	8,86±0,39 ^b	11,86±0,28 ^{de}	9,79±0,30 ^{bcd}	13,76±0,47 ^e	9,10±0,60 ^{bc}	11,45±0,85 ^{cde}	0,000	0,000	0,002
c-9 c-12-C18:2	16,34±1,46 ^a	22,33±1,55 ^b	13,87±0,23 ^a	13,29±0,81 ^a	13,72±0,189 ^a	14,06±0,89 ^a	15,25±0,32 ^a	14,62±1,22 ^a	0,000	0,08	0,006
C20:0	0,07±0,02 ^a	0,12±0,02 ^b	0,07±0,00 ^a	0,07±0,01 ^{ab}	0,00±0,00 ^c	0,04±0,01 ^{ac}	0,05±0,01 ^a	0,05±0,01 ^{ab}	0,000	0,01	0,02
c-9 c-12 c-15 C18:3 c-9 t-11 C18:2 (CLA)	0,40±0,07 ^a	0,84±0,09 ^b	0,25±0,04 ^a	0,27±0,01 ^a	0,32±0,03 ^a	0,44±0,04 ^a	0,28±0,01 ^a	0,29±0,07 ^a	0,000	0,001	0,001
C20:5 (EPA)	0,34±0,04 ^{ab}	0,32±0,03 ^{ab}	0,29±0,01 ^{ab}	0,36±0,02 ^{ab}	0,28±0,04 ^a	0,44±0,05 ^b	0,27±0,03 ^a	0,23±0,03 ^a	0,02	0,09	0,02
C24:0	0,04±0,01	0,05±0,00	0,04±0,00	0,03±0,00	0,02±0,00	0,03±0,01	0,02±0,00	0,04±0,01	0,04	0,21	0,47
C22:4	0,06±0,01 ^a	0,45±0,03 ^c	0,29±0,02 ^b	0,37±0,03 ^{bc}	0,27±0,04 ^b	0,27±0,02 ^b	0,35±0,02 ^{bc}	0,46±0,02 ^c	0,000	0,000	0,000
C22:5	0,66±0,05 ^{ab}	0,70±0,06 ^{abc}	0,53±0,04 ^a	0,81±0,05 ^{bc}	0,55±0,02 ^a	0,86±0,03 ^c	0,62±0,02 ^{ab}	0,76±0,02 ^{bc}	0,83	0,000	0,007
C22:6 (DHA)	3,94±0,20	4,24±0,54	3,45±0,25	3,77±0,38	3,53±0,20	4,13±0,35	3,38±0,23	3,46±0,22	0,20	0,16	0,88

ΣAGS	40,40±1,16	39,36±1,03	39,79±1,04	41,20±0,38	39,89±0,85	38,07±0,55	38,75±0,60	40,30±0,70	0,34	0,97	0,13
ΣAGMIc	10,70±0,76 ^a	7,46±0,67 ^a	15,16±0,62 ^b	16,16±0,13 ^b	16,25±0,40 ^b	17,99±0,41 ^b	15,40±1,00 ^b	15,48±1,11 ^b	0,000	0,83	0,01
ΣAGPIc	47,53±0,67 ^a	52,46±0,50 ^b	43,52±1,42 ^{de}	40,15±0,21 ^{cd}	41,83±0,52 ^{cde}	39,72±0,41 ^c	44,41±0,75 ^{ae}	42,31±0,75 ^{cde}	0,000	0,216	0,000
ΣAGPIc n-6	42,86±0,72 ^a	47,05±0,95 ^b	39,53±1,42 ^{ade}	35,76±0,41 ^{cd}	37,69±0,61 ^{cde}	34,72±0,48 ^c	40,47±0,78 ^e	38,34±0,68 ^{cde}	0,000	0,053	0,000
ΣAGPIc n-3	4,67±0,13 ^{ab}	5,41±0,46 ^b	3,99±0,23 ^a	4,39±0,36 ^{ab}	4,13±0,23 ^{ab}	5,00±0,26 ^{ab}	3,94±0,22 ^a	3,97±0,15 ^a	0,004	0,015	0,444
AGS/AGMIc	3,85±0,373 ^a	5,42±0,5416 ^b	2,63±0,09 ^{ac}	2,55±0,01 ^c	2,46±0,11 ^c	2,12±0,07 ^c	2,56±0,21 ^c	2,66±0,24 ^{ac}	0,000	0,107	0,006
AGS/AGMI _t	369,15±19,33 ^a	274,96±21,61 ^d	93,35±2,56 ^c	50,31±4,26 ^{bc}	52,76±1,02 ^{bc}	22,333±1,42 ^b	97,11±2,41 ^c	64,61±5,36 ^{bc}	0,000	0,000	0,020
AGS/AGPIc	0,85±0,04 ^{ab}	0,75±0,03 ^a	0,92±0,05 ^{bc}	1,03±0,01 ^c	0,96±0,03 ^{bc}	0,96±0,02 ^{bc}	0,87±0,02 ^{ab}	0,95±0,02 ^{bc}	0,000	0,294	0,010
C18:2/C18:3	42,69±4,27 ^{abc}	26,87±1,03 ^a	60,47±9,28 ^c	50,45±4,99 ^{abc}	44,33±4,72 ^{abc}	32,09±0,87 ^{ab}	53,75±3,30 ^{abc}	57,12±10,20 ^{bc}	0,001	0,045	0,39
AR/AV	0,00±0,00 ^a	0,00±0,00 ^a	1,51±0,22 ^c	0,63±0,11 ^b	0,89±0,14 ^b	0,49±0,07 ^{ab}	1,61±0,08 ^c	0,77±0,14 ^b	0,000	0,000	0,004
c-9 C16:1/C16:0	0,05±0,01 ^{ab}	0,02±0,0067 ^d	0,08±0,00 ^c	0,038±0,00 ^{ad}	0,09±0,01 ^c	0,04±0,00 ^{ad}	0,07±0,01 ^{bc}	0,03±0,014 ^{ad}	0,000	0,000	0,77
c-9 C18:1/C18:0	0,31±0,04 ^{ab}	0,25±0,03 ^a	0,53±0,04 ^{bc}	0,64±0,03 ^{cd}	0,62±0,04 ^{cd}	0,80±0,047 ^d	0,57±0,06 ^c	0,60±0,07 ^{cd}	0,000	0,09	0,10
AA/C18:2	1,59±0,18 ^{ab}	1,04±0,11 ^a	1,73±0,09 ^b	1,55±0,14 ^{ab}	1,63±0,01 ^{ab}	1,34±0,13 ^{ab}	1,54±0,11 ^{ab}	1,54±0,20 ^{ab}	0,12	0,01	0,249
γ-C18:3/C18:2	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00	0,95	0,004	0,38
AA/γ- C18:3	132,57±16,44	122,93±13,24	175,12±28,69	169,02±17,00	162,02±28,53	164,82±39,09	127,08±16,77	238,84±30,56	0,18	0,18	0,07
EPA/α C18:3	0,87±0,07 ^{ab}	0,39±0,04 ^a	1,30±0,22 ^b	1,37±0,13 ^b	0,94±0,18 ^{ab}	0,99±0,06 ^{ab}	0,94±0,09 ^{ab}	0,96±0,28 ^{ab}	0,002	0,48	0,27
DHA/α C18:3	10,99±2,42	5,41±1,17	15,08±2,49	14,16±1,37	11,42±1,32	9,72±1,38	12,04±1,40	14,86±4,44	0,04	0,41	0,34
EPA/AA	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,01±0,00 ^a	0,02±0,00 ^{ab}	0,01±0,00 ^a	0,02±0,00 ^b	0,01±0,0007 ^a	0,01±0,00 ^a	0,01	0,01	0,01
AA/EPA	78,42±11,16 ^{ab}	72,38±6,15 ^{ab}	81,16±3,02 ^{ab}	57,10±5,16 ^{ab}	86,92±18,76 ^{ab}	44,41±6,84 ^a	88,57±5,16 ^{ab}	99,39±10,42 ^b	0,03	0,03	0,06
t-9 C18:1/ t-11 C18:1	0,51±0,12 ^{ab}	0,00±0,00 ^c	0,49±0,06 ^{ab}	0,27±0,02 ^{ad}	0,30±0,02 ^{ad}	0,17±0,01 ^{cd}	0,59±0,0191 ^b	0,37±0,03 ^{abd}	0,000	0,000	0,009
DHA/AA	0,16±0,01 ^a	0,19±0,02 ^{ab}	0,14±0,01 ^a	0,18±0,01 ^{ab}	0,16±0,01 ^a	0,22±0,01 ^b	0,15±0,01 ^a	0,16±0,00 ^a	0,06	0,001	0,30
AGPIc n-6/ AGPIc n-3	9,20±0,03449 ^{ab}	8,94±0,95 ^{ab}	10,02±0,73 ^b	8,33±0,74 ^{ab}	9,22±0,62 ^{ab}	7,01±0,48 ^a	10,38±0,68 ^b	9,69±0,36 ^{ab}	0,051	0,013	0,42

¹Grupos experimentales: S7: 7% *AS; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada.

²Efecto: Dieta, Nivel de grasa e interacción dieta x nivel de grasa. Los resultados son presentados como el promedio ± EEM de al menos 6 animales por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante 4 x 2 ANOVA, seguido de test de tukey. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre grupos. Significancia estadística: $p < 0,05$. *AS: aceite de soja

4.5.- Parámetros relacionados a la regulación del metabolismo lipídico

4.5.1.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la actividad de las enzimas lipogénicas del hígado (Experiencia 4)

En la síntesis *de novo* de los AG en hígado y tejido adiposo están implicadas varias enzimas: ACC, FAS, enzima málica(EM) yG6PGH. Estas enzimas son determinantes de los niveles y disponibilidad de AG para su posterior esterificación, depósito, utilización o secreción dependiendo del tejido y requerimiento. Estas enzimas son moduladas por las diferentes dietas y quedó en evidencia que fue el nivel de grasa dietaria lo que afectó principalmente la actividad de dichas enzimas. En el presente trabajo se midió la actividad de ACC, FAS y G6PGH en hígado.

4.5.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre síntesis de ácidos grasos en hígado (Experiencia 4)

La actividad de la enzima relacionada a la síntesis de ácidos grasos ACC fue determinada en hígado. La misma fue afectada ($p < 0,05$) por el origen y nivel de grasa dietaria (Figura 9). La actividad se vio disminuida en los grupos dietarios GLE7 y GLE30 e incrementada al nivel recomendado de grasa (7%).

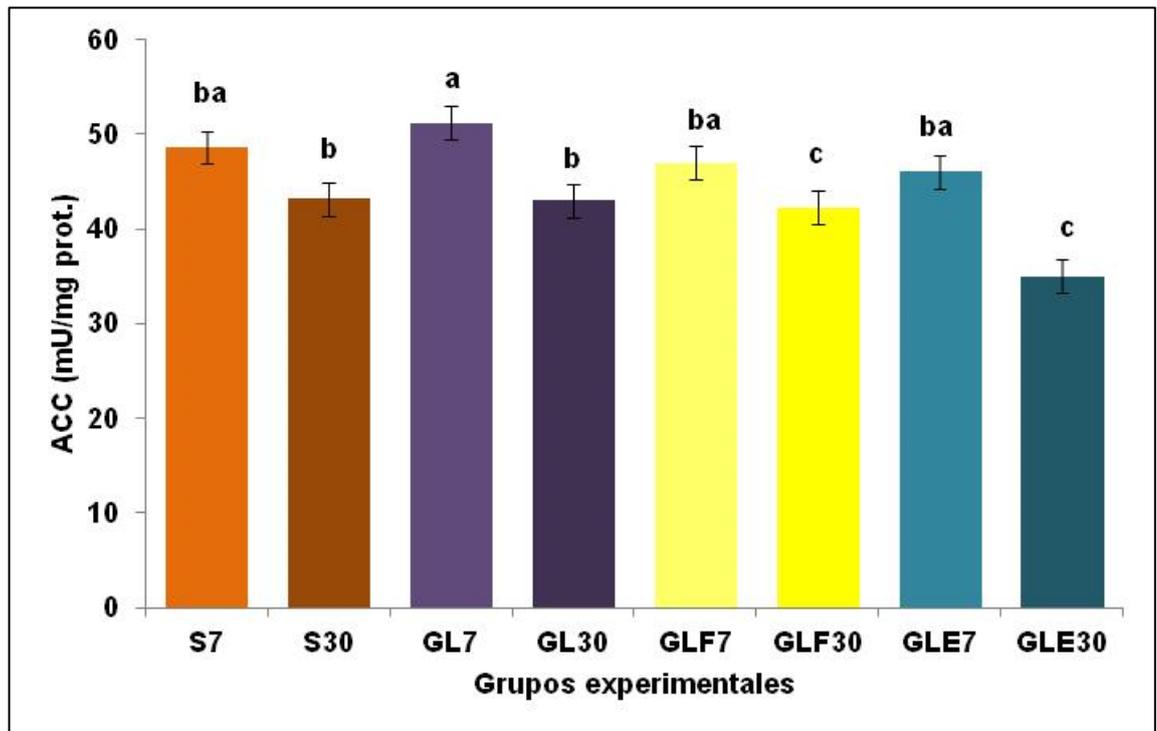


Figura 9. Actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

La actividad hepática de la enzima FAS fue influenciada ($p < 0,05$) por el origen de la grasa dietaria y también por la interacción origen y nivel de grasa ($p < 0,05$). Los cambios se atribuyen al aumento (+366 %) en la actividad (nmol NADPH/min mg prot.) de FAS en el grupo dietario GLF7 (17,09) vs S7 (3,67) y GLF30 (16,39) vs S30 (10,06) con un aumento del 63%. La menor actividad de la enzima se observó en los grupos experimentales S7 y GL30 (Figura 10).

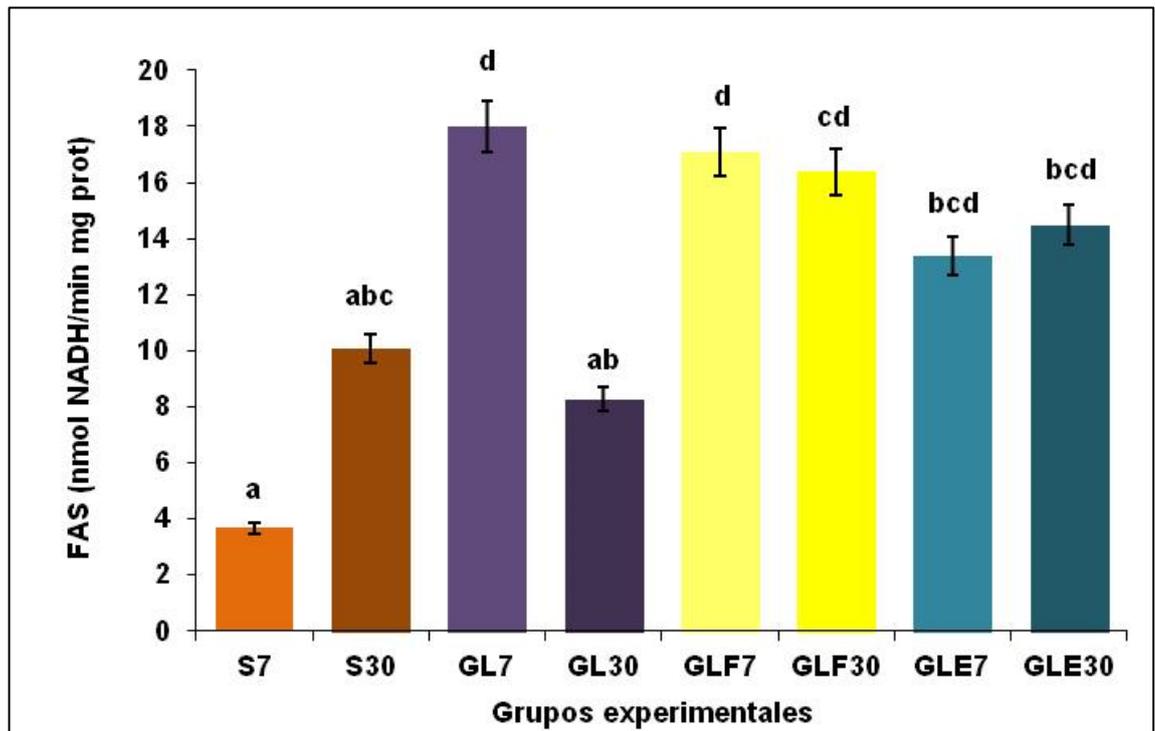


Figura 10. Actividad de la enzima sintasa de ácidos grasos en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

La actividad de la enzima G6PDH (Figura 11) se vio afectada por el nivel de grasa dietaria ($p < 0,05$). Las menor actividad se observó en los grupos experimentales a nivel elevado de grasa sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos. Dentro del nivel recomendado de grasa (7%), la mayor actividad se presentó en el grupo GLF7 (26,87) con diferencias significativas ($p < 0,05$) al ser comparada con la actividad del grupo GL7 (20,47).

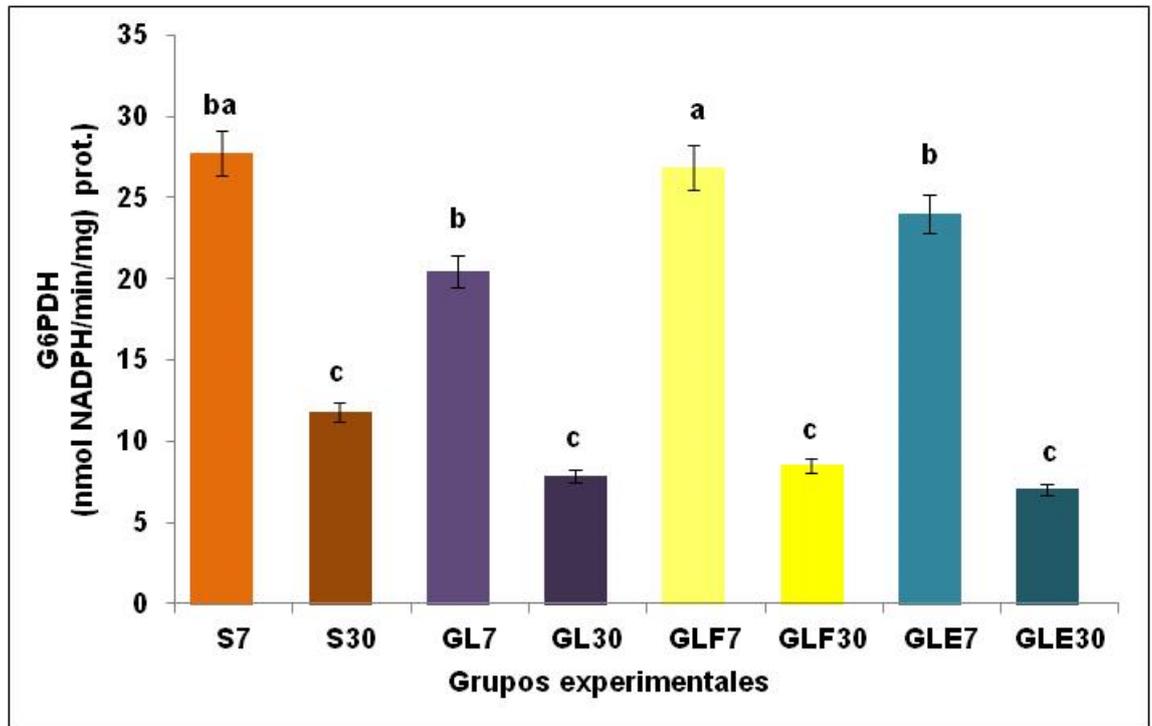


Figura 11. Actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) en hígado. Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

4.5.3.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la actividad de las enzimas oxidativas de ácidos grasos en hígado (Experiencia 4).

La enzima clave en la β -oxidación hepática de ácidos grasos es la carnitina palmitoil transferasa-I(**CPT-I**), y fue influenciada ($p < 0,05$) por el origen de la grasa dietaria. La actividad de la enzima en el grupo experimental GLE7 se vio reducida (-64%) al ser comparada con la actividad de los grupos S30 y GLF30. El nivel de grasa (7% o 30%) dietaria en los grupos GLF no afectó ($p > 0,05$) la actividad de la enzima (Figura 12).

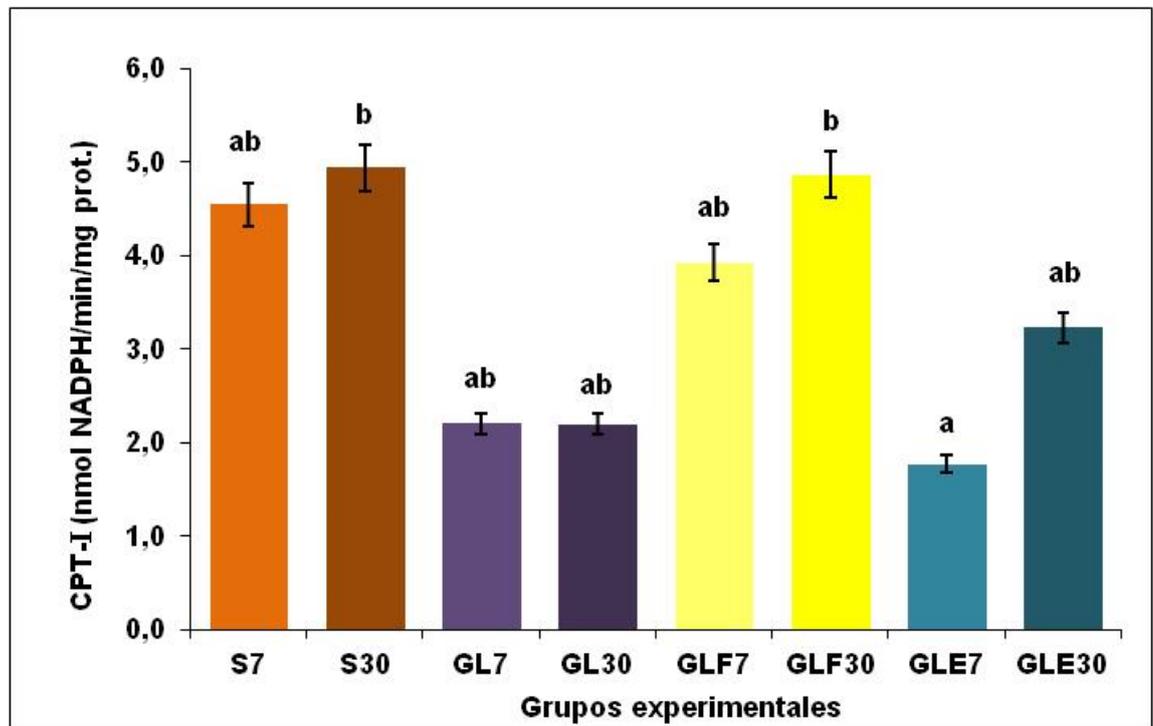


Figura 12. Actividad hepática de la enzima carnitina palmitoil transferasa-I. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

4.5.4.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la velocidad de secreción hepática de triglicéridos (Experiencia 3)

La velocidad de secreción de TG (**VSTG**) no se modificó ($p>0,05$) por la ingesta de las diferentes dietas, ni a nivel recomendado o elevado de grasa dietaria (Figura 13).

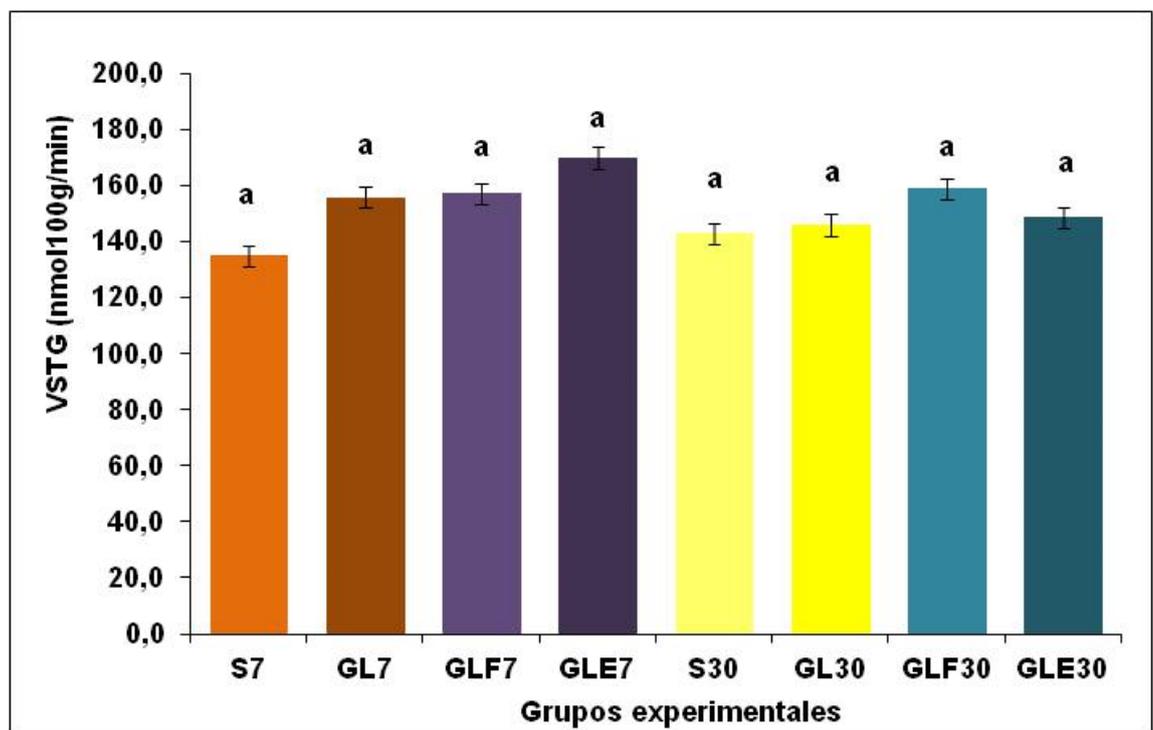


Figura 13. Velocidad de secreción hepática de triglicéridos. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p<0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

4.5.5.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la remoción de triglicéridos: actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal y músculo gastrocnemio (Experiencia 4)

El tejido adiposo es un órgano clave y muy activo en la captación de TG, fundamentalmente en condiciones post-prandiales. El músculo esquelético, por contribuir con un porcentaje alto de la masa corporal (aprox. 45%) y en virtud de la importancia de la captación en condiciones pre-prandiales, participa activamente en la clarificación de los TG circulantes. Es importante considerar también, que el tejido adiposo, es un órgano que se expande en forma muy heterogénea dependiendo de variables nutricionales, es por ello que su expresión a la contribución en la captación de TG debe ser realizada por órgano total.

La actividad de la LPL cuando fue expresada por gramo de TAE, fue afectada por el origen de la dieta, nivel de grasa dietaria y la interacción de ambos efectos ($p < 0,05$; Figura 14) y cuando fue expresada por el efecto peso del TAE la diferencia significativa ($p < 0,05$) se le atribuyó al efecto de nivel de grasa dietaria (Figura 15). En el grupo experimental GLF30 se observa un efecto aditivo por el nivel de grasa y la presencia de CLA.

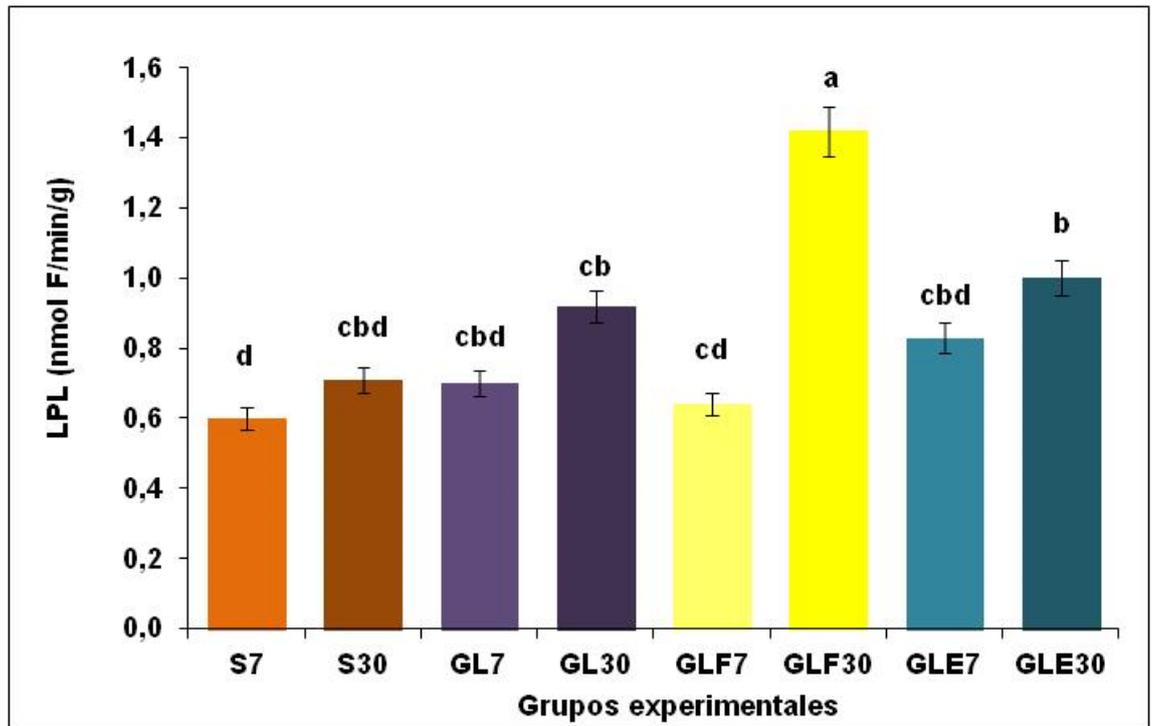


Figura 14. Actividad lipoproteína lipasa por gramo de tejido adiposo epididimal. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

Al comparar los grupos experimentales, se observó diferencia significativa ($p < 0,05$) en la actividad de los grupos S7 y GLF30; S7 y GLE30; S7 y GL30. La actividad de la enzima LPL expresada por gramo de tejido (Figura 14) en los grupos experimentales dentro del nivel de grasa recomendado (7%) no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$). A niveles elevados de grasa (30%) la diferencia ($p < 0,05$) se atribuyó a la GLF30 con un incremento (+116%) con respecto a la actividad promedio del resto de los grupos experimentales (Figura 14).

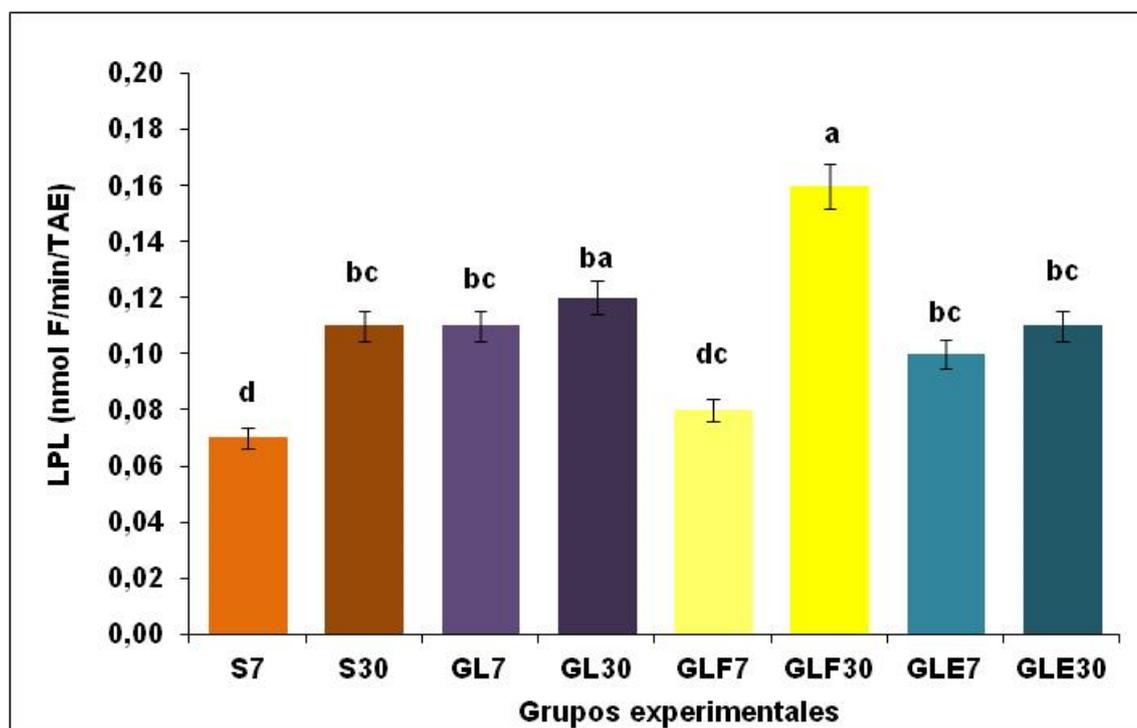


Figura 15. Actividad lipoproteína lipasa en tejido adiposo epididimal afectada por el peso del tejido. Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

La actividad de la LPL cuando fue afectada por el peso del TAE, evidenció una modificación por el nivel de grasa dietaria y la interacción entre el origen y nivel de grasa ($p < 0,05$). Al comparar los grupos experimentales entre niveles de grasa recomendado y elevado (7% y 30%, respectivamente) las diferencias se atribuyeron a la S7 vs S30 y a la GLF7 vs GLF30. La presencia del isómero CLA (*cis-9 trans-11* C18:2 CLA) incrementó la actividad enzimática ($p < 0,05$) independientemente de la forma de expresión (Figura 15).

La actividad de la enzima LPL en músculo gastrocnemio, no fue afectada ni por el origen ni por el nivel de grasa dietaria ($p > 0,05$; Figura 16)

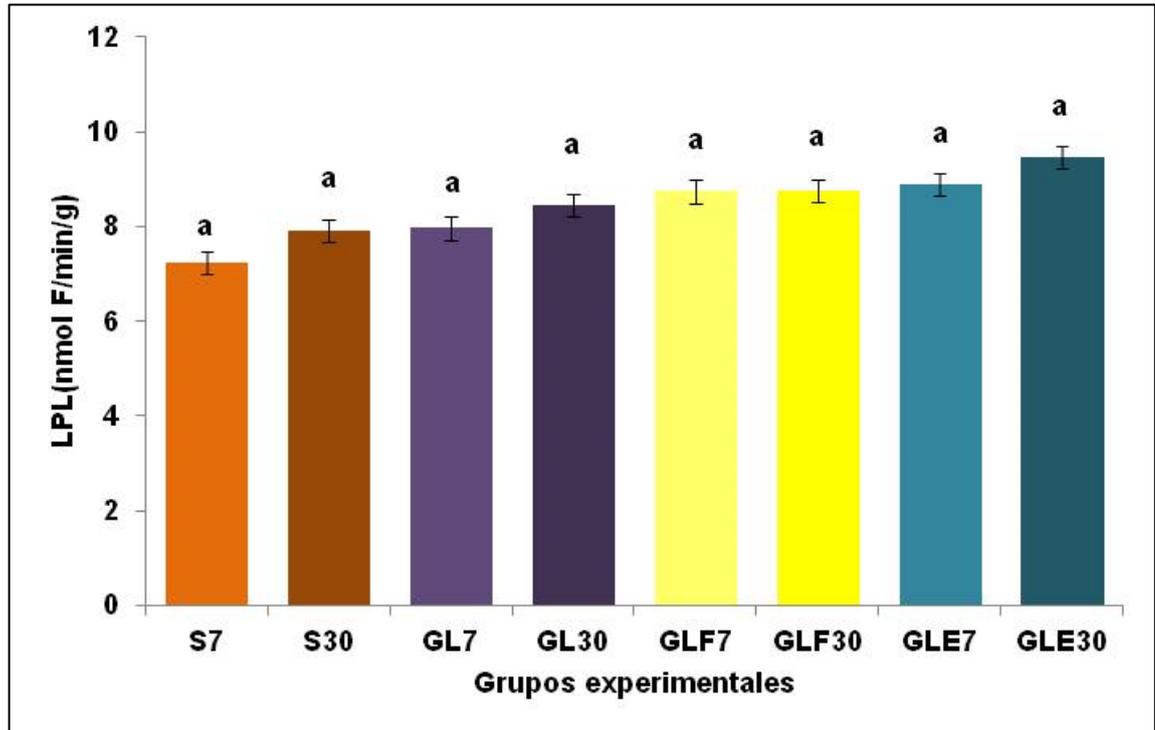


Figura 16. Actividad lipoproteína lipasa en músculo gastrocnemio. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p<0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

4.6.- Expresión de factores de transcripción de genes lipogénicos y oxidativos en hígado (Experiencia 4)

Para esclarecer los mecanismos implicados en la regulación de la lipogénesis y oxidación a nivel de tejido hepático, se calcularon las expresiones de algunas enzimas y factores de transcripción claves relacionados con la lipogénesis a través de la evaluación de los niveles de ARNm de: SREBP-1c, SCD1 y FAS. Además, los asociados a la oxidación de ácidos grasos: CPT-I y PPAR- α .

La expresión génica del SREBP-1c en hígado estuvo afectada por el origen de la grasa dietaria ($p<0,05$). Se observó un incremento (+100%) entre S30 vs S7. No se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) entre los grupos experimentales a nivel

recomendado de grasa (7%). La menor actividad se observó en el grupo experimental GLF30 (Figura 17).

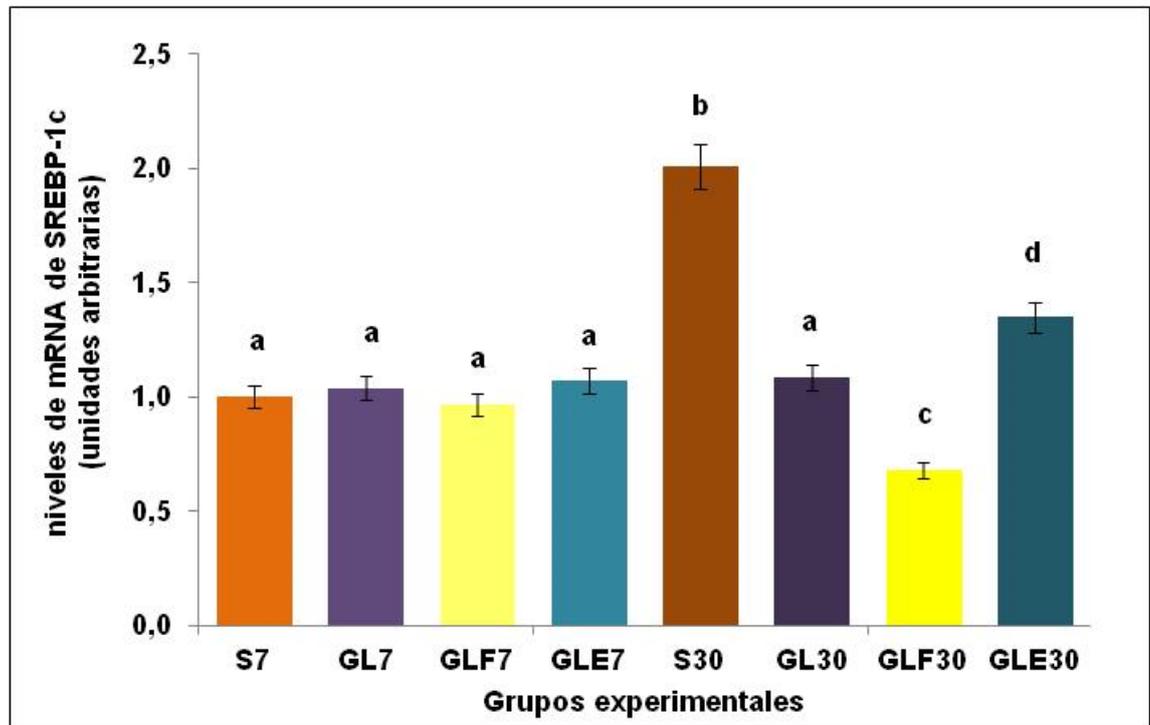


Figura 17. Expresión génica del SREBP-1c relacionado con el metabolismo lipídico. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p<0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

Los niveles de RNAm de SCD1 se vieron incrementados (+600%) en la GL30 ($p<0,05$) al ser comparada con su control S30. Los niveles de RNAm de SCD1 se incrementaron (+145%) en el grupo experimental GLF7 ($p<0,05$) al ser comparado con su control S7 (Figura 18).

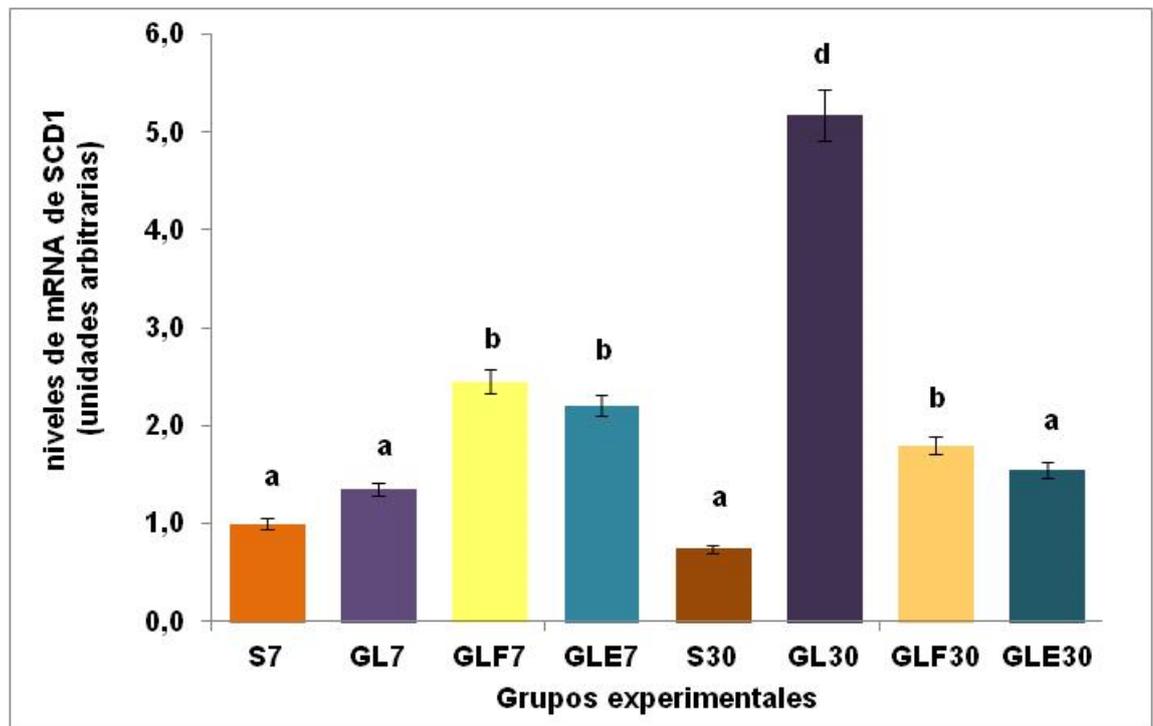


Figura 18. Expresión génica de la $\Delta 9$ -desaturasa (SCD1) relacionado con el metabolismo lipídico. Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

En la Figura 19, se observa que los niveles de ARNm de la FAS, aumentaron (76%) en la GLF7 al ser comparados con los niveles del grupo experimental control (S7). Lo mismo sucedió con los niveles de los grupos experimentales GLE7 (+121%) y S30 (+70%). El nivel de ARNm en el grupo experimental GLF30 se redujo (-25%) al ser comparado con el nivel del grupo S30 con diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos grupos. El nivel de ARNm en el grupo GL30 aumentó (+12%) al ser comparado con el nivel de su grupo control (S30) con diferencias significativas entre ambos grupos ($p < 0,05$).

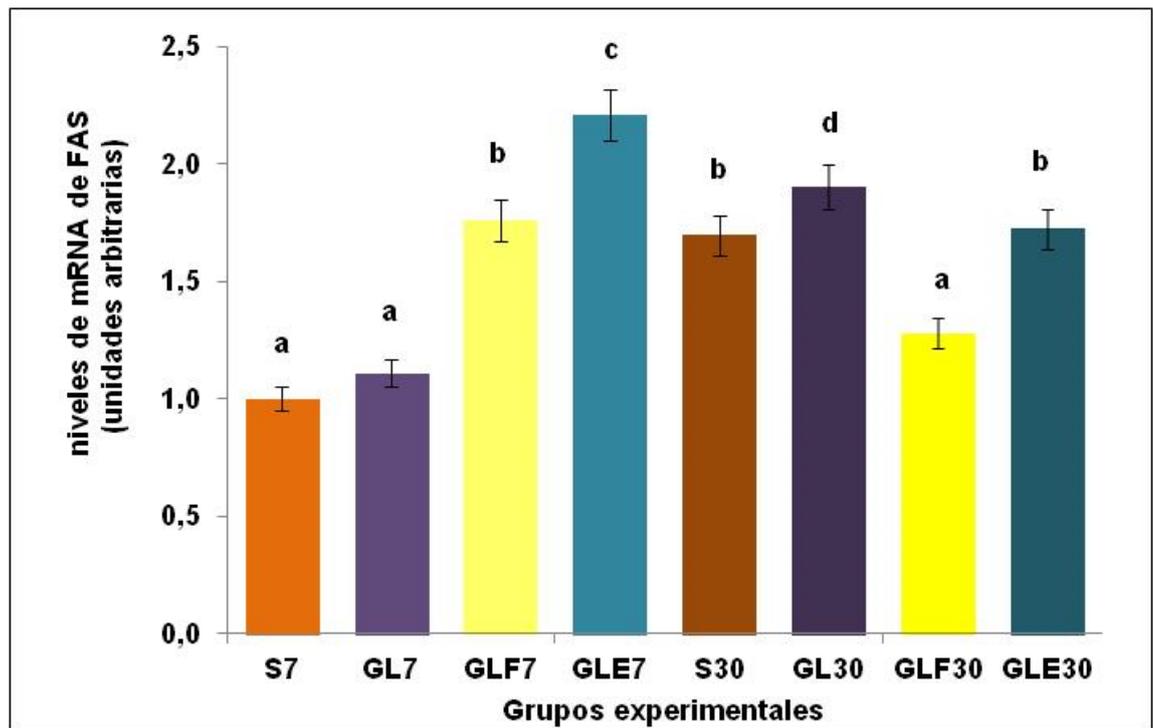


Figura 19. Expresión génica de la FAS. Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

Los cambios en la expresión de la enzima CPT-I se manifestaron a causa del origen de la grasa dietaria ($p < 0,05$). La mayor expresión se observó en los grupos experimentales control S7 y S30, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos grupos. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales GL, GLF y GLE en ninguno de los dos niveles de grasa (7% y 30%, respectivamente). A niveles elevados de grasa, los menores niveles de ARNm de CPT-I se observaron en el grupo experimental GLF30 (Figura 20).

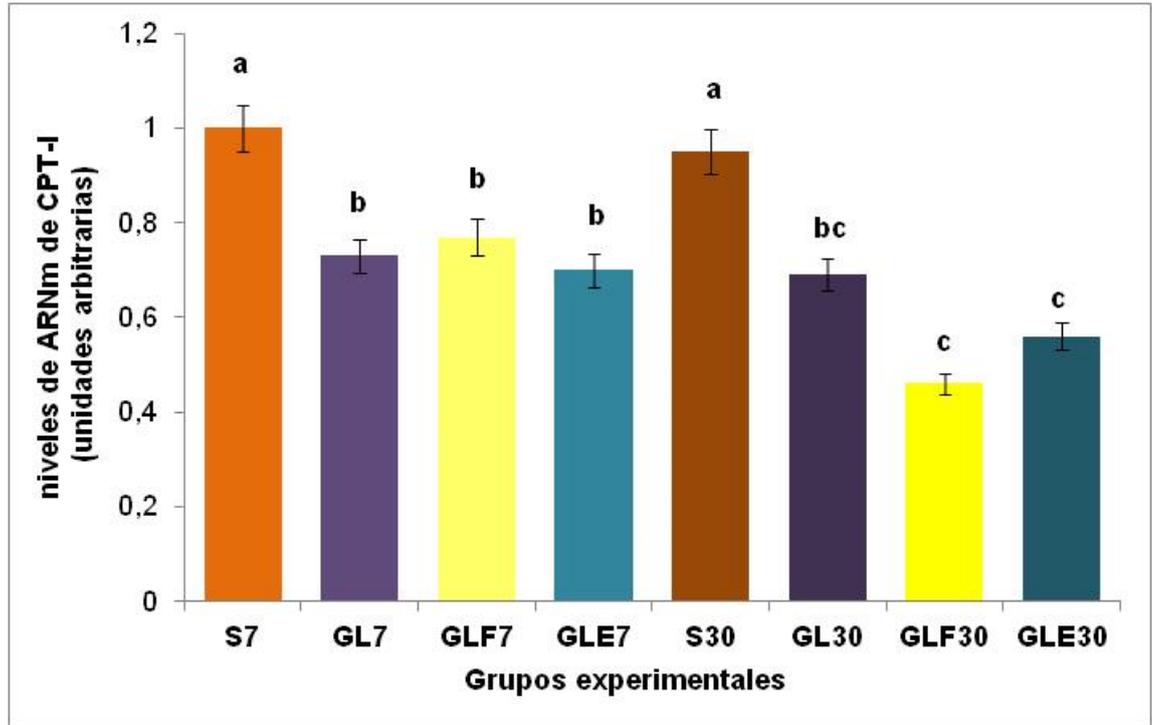


Figura 20. Expresión génica de la CPT-I. Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30.

Relacionando a la oxidación de AG, la expresión génica en hígado de PPAR- α fue mayor en los grupos experimentales GLF7, GLE7 y GL30. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos experimentales S7, GL7, S30, GL30, GLF30 y GLE30 (Figura 21).

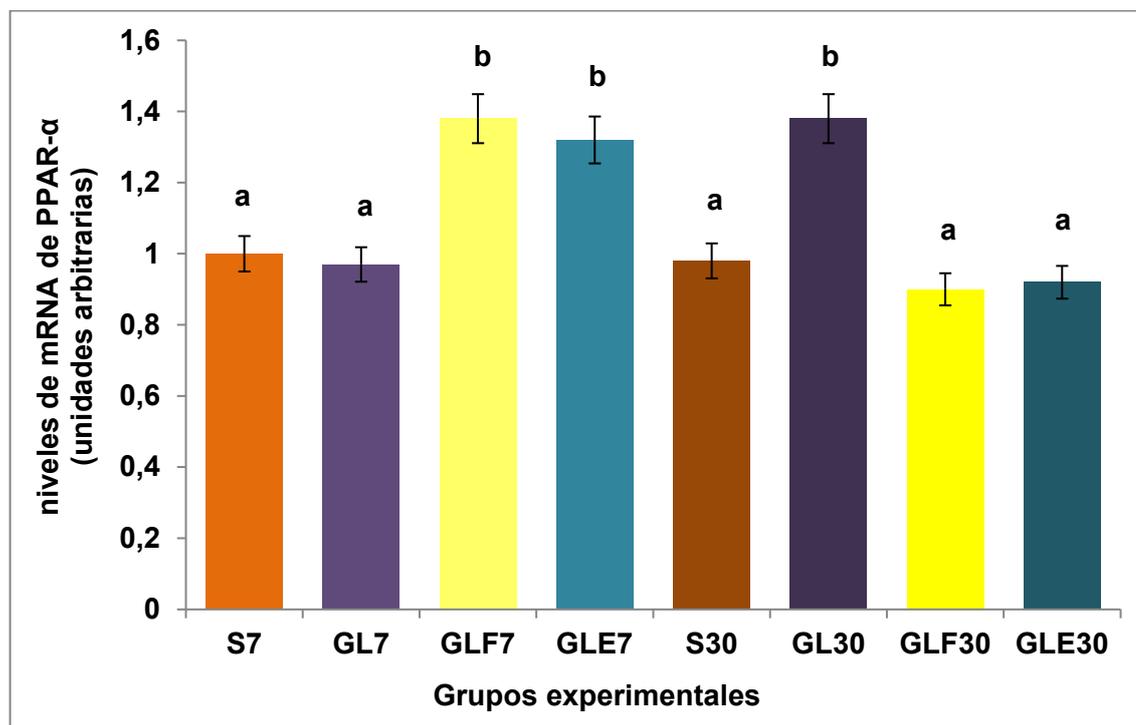


Figura 21. Expresión génica del PPAR- α . Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

4.7.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración plasmática de NEFA y glucosa

En la experiencia 3, la concentración ($\mu\text{Eq/l}$) de NEFA fue afectada por el nivel de grasa dietaria ($p < 0,05$), la concentración de este metabolito disminuyó (-32,5%) al comparar el promedio de las dietas S30 y GL30 con la dieta GL7 (Figura 22).

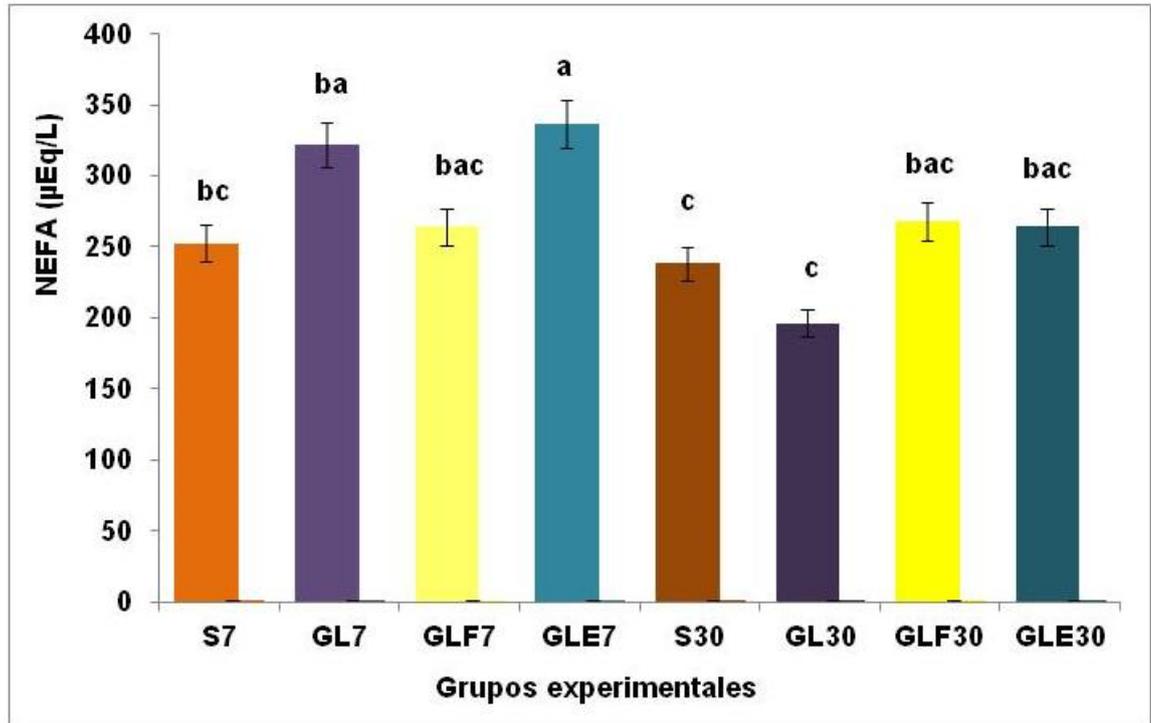


Figura 22. Concentración de NEFA (Experiencia 3). Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

En la experiencia 4, la concentración ($\mu\text{Eq/l}$) de NEFA fue afectada por el nivel de grasa dietaria ($p < 0,05$), dichos cambios fueron atribuidos principalmente al descenso (-39%) de la concentración ($\mu\text{Eq/l}$) de NEFA en plasma de los animales del grupo GL30 (389,14) al compararlo con la concentración del grupo GLE7 (641,32; Figura 23).

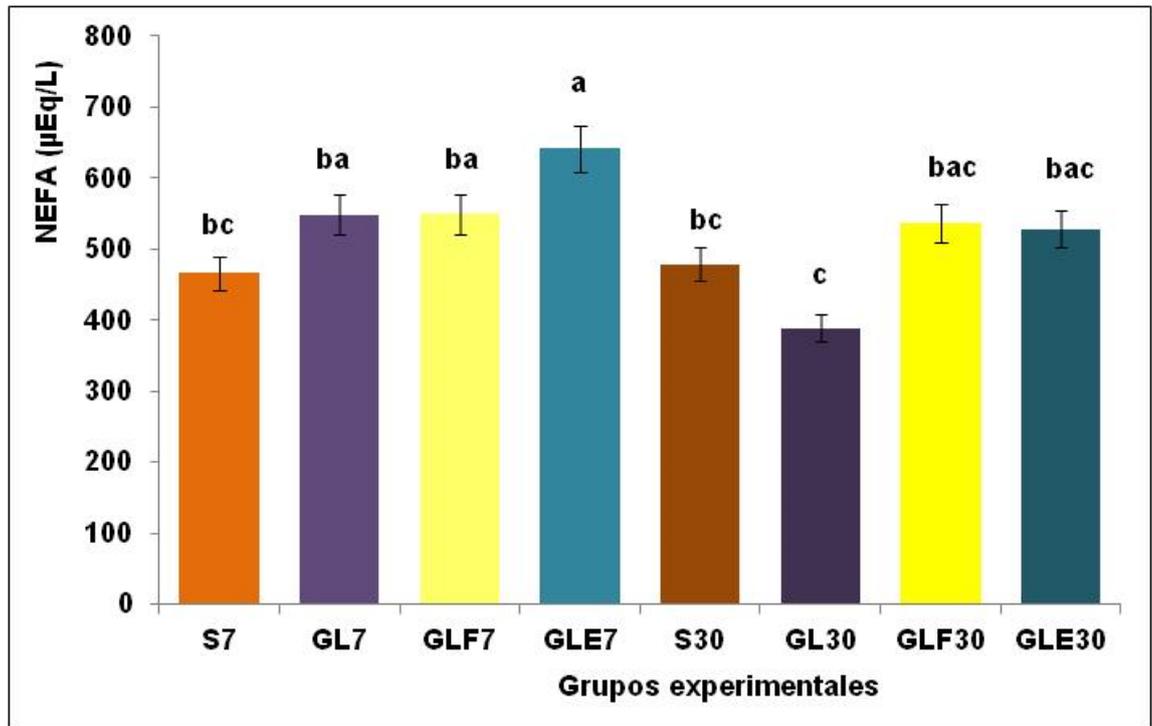


Figura 23. Concentración de NEFA (Experiencia 4). Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

En la experiencia 1, la concentración (g/l) de glucosa en plasma fue modificada ($p < 0,05$) por la interacción entre el tipo de grasa y nivel de grasa dietaria (Figura 24).

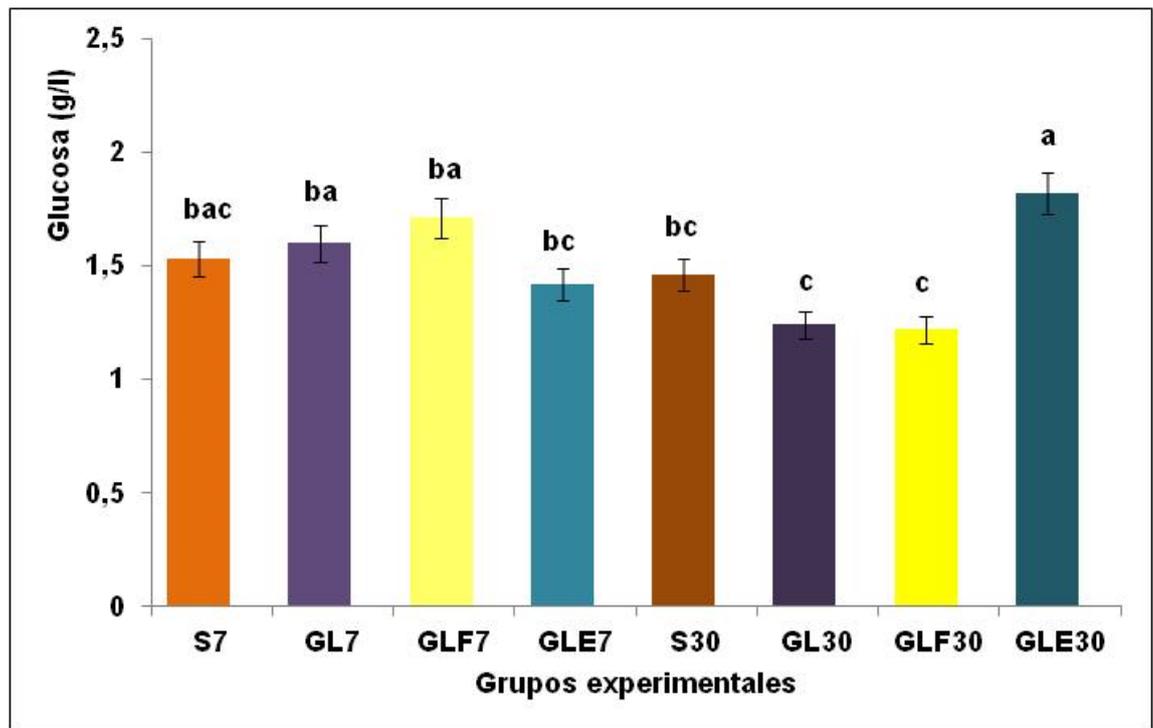


Figura 24. Concentración de glucosa sérica (Experiencia1). Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

En la experiencia 2, la concentración de glucosa sérica no estuvo afectada ni por el origen ni por el nivel de grasa dietaria ($p > 0,05$; Figura 25).

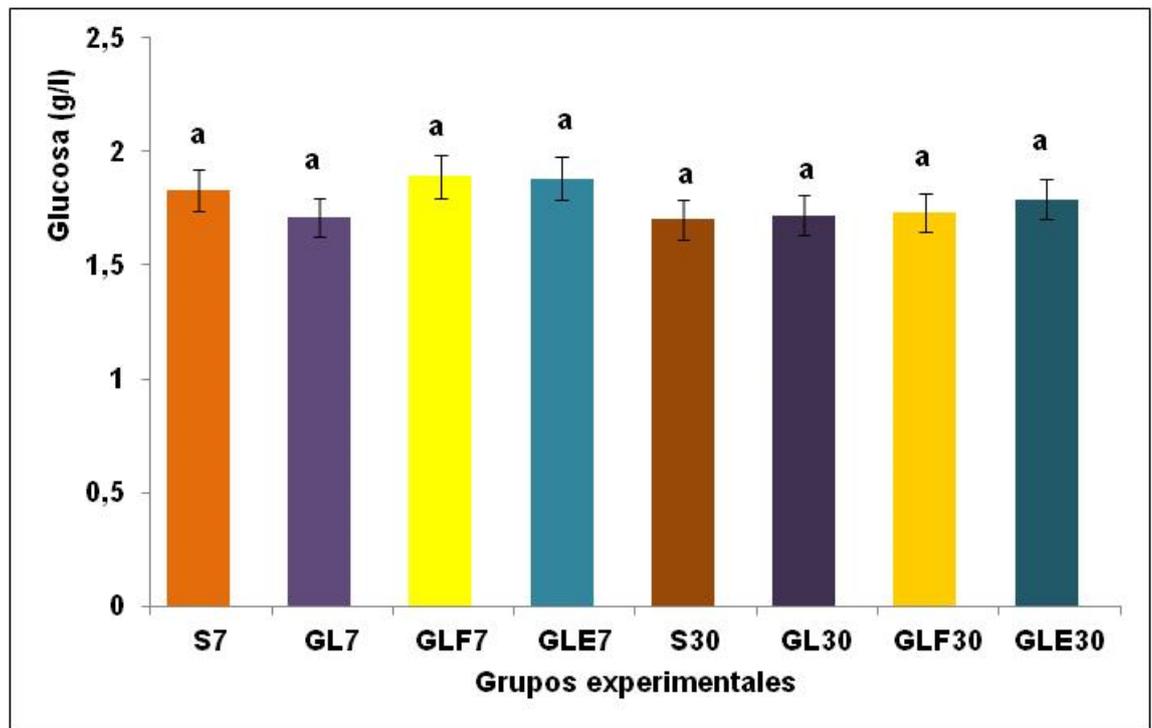


Figura 25. Concentración de glucosa sérica (Experiencia 2). Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

En la experiencia 3, la concentración de glucosa en plasma fue modificada por el nivel de grasa dietaria ($p < 0,05$). Los cambios más notorios en este parámetro fueron observados cuando se alimentó con GL7, GL30 y GLE30 (Figura 26).

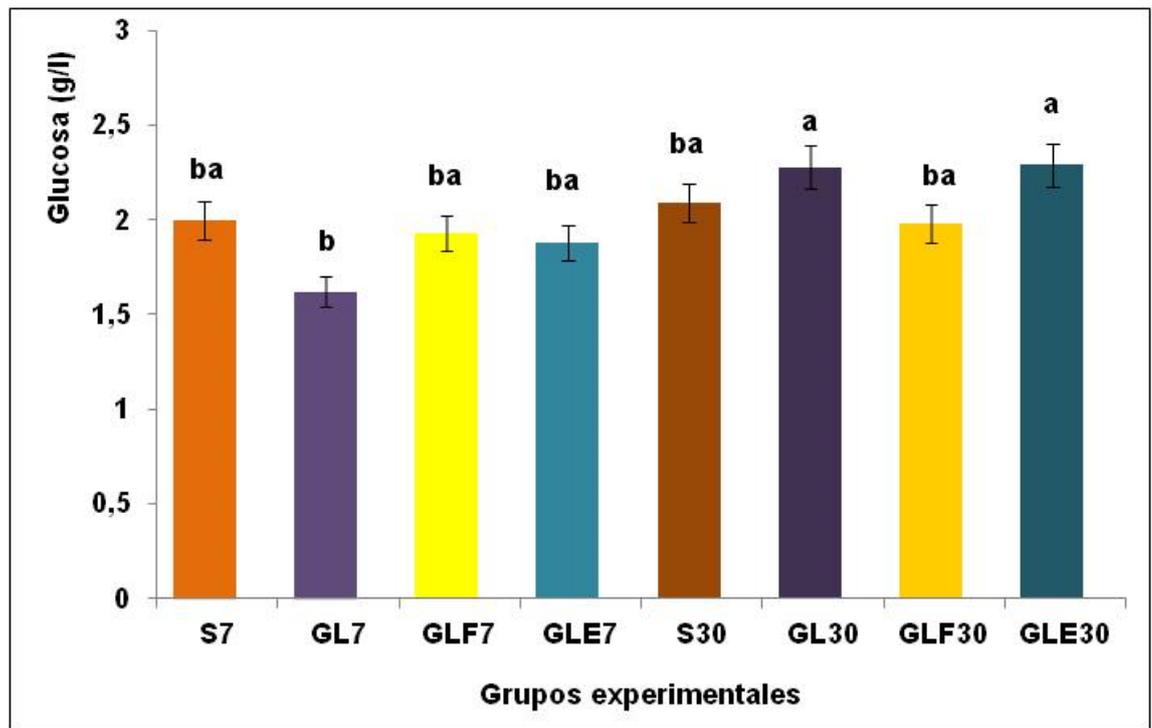


Figura 26. Concentración de glucosa sérica (Experiencia 3). Resultados expresados como el promedio \pm EEM ($n=6$). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS+ 4% grasa láctea funcional, GLE7: 3% AS+ 4% grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27% grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

En la experiencia 4, la concentración de glucosa en plasma fue modificada por el nivel de grasa dietaria ($p < 0,05$). Los cambios más notorios en este parámetro fueron observados cuando se alimentó con GL7, GL30 y GLE30 (Figura 27).

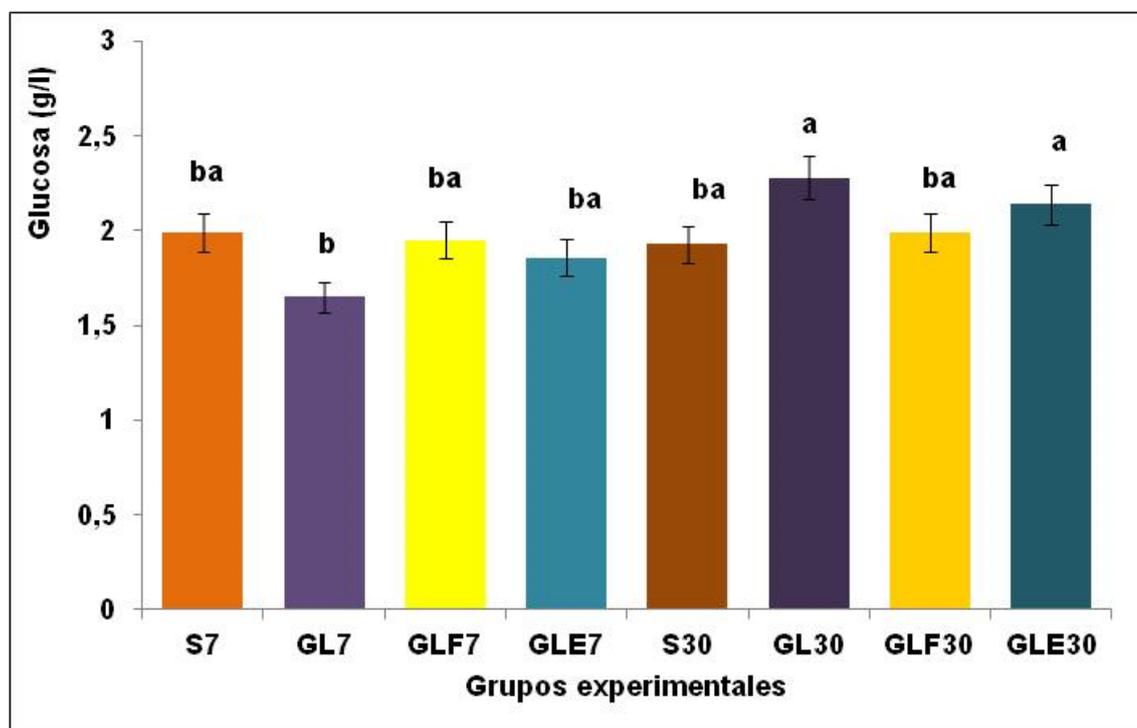


Figura 27. Concentración de glucosa sérica (Experiencia 4). Resultados expresados como el promedio \pm EEM (n=6). Análisis estadístico ANOVA (4x2) seguido de test de tukey. Nivel de significancia: $p < 0,05$. Letras distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales. S7: 7% AS*; GL7: 3% AS+ 4% grasa láctea, GLF7: 3% AS +4% grasa láctea funcional, GLE7: 3 % AS +4 % grasa láctea estandarizada; S30: 30% AS, GL30: 3% AS+ 27% grasa láctea; GLF30: 3% AS+ 27 % grasa láctea funcional, GLE30: 3% AS+ 27% grasa láctea estandarizada. *aceite de soja.

DISCUSIÓN

Caracterización de modelo experimental

En los últimos años, el consumo de elevados niveles de grasa láctea (rica en AGS) ha sido asociado con alteraciones lipídicas y riesgo de ECV, sin embargo, la suplementación con AGI en la alimentación de las vacas puede disminuir los niveles de AGS e incrementar el contenido de conjugados del ácido linoleico (*cis-9 trans-11* C18:2) y del ácido vaccénico (*trans-11* C18:1) en la grasa láctea conduciendo a una

grasa láctea funcional con un potencial efecto benéfico sobre la regulación de los lípidos.

En este capítulo de trabajo de tesis se evaluó la incorporación y efectos de la sustitución parcial del aceite de soja con grasas lácteas con contenidos normales y elevados de *cis-9 trans-11 C18:2* y *trans-11 C18:1* y con niveles convencionales y reducidos en AGS en ratas alimentadas con dietas conteniendo niveles recomendados y elevados de grasa. Se evaluaron parámetros nutricionales, incorporación y retención de los isómeros (CLA y AV), las potenciales modificaciones en el perfil de AG y los posibles cambios metabólicos producidos por la regulación de los TG y los mecanismos involucrados. En los aspectos nutricionales, el desarrollo del presente trabajo se focalizó en estudios de ganancia de peso, peso de tejidos. En cuanto al metabolismo lipídico, se puntualizó en las incorporaciones tisulares de los AG potencialmente funcionales (AV y AR), en los perfiles de lípidos plasmáticos y tisulares, en los mecanismos de regulación de TG tisulares y en el potencial beneficio de la grasa láctea funcional.

4.1.- Parámetros nutricionales

4.1.1.- Efecto del origen y el nivel de grasa dietaria sobre el peso, la ganancia de peso y el peso de tejidos de los animales experimentales

Todos los animales independientemente de los tratamientos, mostraron una buena aceptación sin observarse rechazo en el consumo del alimento (datos sin presentar) a los dos niveles de grasa suministrados. Durante todo el período experimental, los animales mostraron un buen estado de salud, sin ningún tipo de manifestaciones toxicológicas debido a los tratamientos recibidos.

El elevado contenido de grasa dietaria aumentó el peso corporal en todos los grupos experimentales y posiblemente estuvo asociado a una mayor retención energética en la carcasa. La alimentación de ratas con dietas con contenido alto de grasa induce a una deposición elevada de grasa corporal debido al incremento en el número de adipocitos, el tamaño o ambos (Lemonnier y Alexiu, 1973). El grado de engrasamiento depende de varios factores, el genotipo, el tipo de dieta y el porcentaje de grasa en la dieta son los más importantes (Harris y Jones, 1991). Dietas elevadas en grasa (35% vs 7%) con alimentación ad libitum durante 4 semanas no mostró efectos sobre el consumo de energía metabolizable, peso vivo o ganancia de lípidos

corporales en ratas Wistar (Mazier y LeBlanc, 1991). Este reporte no condice con nuestros resultados ya que el peso vivo y ganancia de peso aumentaron en los grupos experimentales alimentados con niveles elevados de grasa (30%) en las cuatro experiencias. En el presente trabajo, el efecto de las grasas lácteas con contenidos de CLA en su formulación sobre el peso de los animales fue superior al del control y la grasa láctea estandarizada, particularmente a niveles elevados de grasa. Estudios en ratas que fueron alimentadas con CLA durante la etapa de gestación y lactancia, se observaron mayores valores de ganancia de peso corporal postnatal en sus crías en comparación con los animales testigo; e incluso, también en las crías en donde se continuó la alimentación con CLA después del destete (Chin *et al.*, 1994).

Sin embargo, los efectos de los CLA sobre la composición corporal son controversiales, esto puede deberse en parte a los modelos experimentales y los isómeros utilizados, como así también a la dosis, duración del experimento, edad de los animales al inicio de la experiencia (Choi *et al.*, 2004; 2007). Domeneghini *et al.* (2006) reportaron que los CLA dietarios pueden modificar la composición corporal disminuyendo la acumulación de tejido adiposo en varias especies de mamíferos.

Los efectos más pronunciados de los CLA sobre la composición corporal han sido reportados esencialmente en modelos experimentales de ratones (West *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002; Terpstra *et al.*, 2002, 2003). Muy pocos efectos o ausencia de ellos, han sido reportados en ratas normales o con diferentes estados nutricionales (Andreoli *et al.*, 2007) y con otros modelos de animales (Lasa *et al.*, 2008; Miranda *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2010).

Los animales tratados con CLA muestran una reducción en la acumulación de la grasa en el cuerpo en varias especies, tanto con dietas elevadas como en bajas en grasa; el isómero responsable de este efecto es el *trans*-10, *cis*-12 aún con dosis de 0,15% fue efectiva (Martín *et al.*, 2000; DeLaney, 2002; Pariza, 2002; Vessby *et al.*, 2002). El *trans*-10, *cis*-12 C18:2 no fue detectado en nuestra experiencia ya que es un isómero con niveles muy bajos o nulos de detección en la grasa láctea (Chilliard *et al.*, 2000). En mujeres adultas, con dietas suplementadas con 3 g de CLA/día durante 64 días, no se encontraron evidencias significativas sobre una disminución de la grasa corporal o en el gasto energético, en contraste con algunos estudios en animales (Zambell *et al.*, 2000). Estos efectos pueden ser ocasionados por la acción del CLA sobre el metabolismo de la glucosa y lípidos. Mencionan al *trans*-10, *cis*-12 C18:2, con efectos antiobesidad y sensibilizador a la insulina. Investigaciones en humanos con

CLA, mostraron una reducción moderada en la grasa corporal o no tuvieron efecto comparadas con el grupo con placebo (Vessby *et al.*, 2002).

Mersmann (2002) señala que los mecanismos por los cuales se reduce la grasa corporal y su deposición, son el aumento de la actividad de la enzima CPT-I, limitante de la β -oxidación de los ácidos grasos y también incrementa el contenido de lipasas que hidrolizan a los lípidos en los adipocitos para su liberación al torrente sanguíneo (Hauner *et al.*, 1995; Doyle, 1998). Posiblemente acoplado a un aumento en la oxidación de ácidos grasos tanto en las células musculares como en los adipocitos (Evans *et al.*, 2000). Por reducción en la síntesis de la Lipasa de la lipoproteína liberadora de heparina en los adipocitos 3T3-L1, esta enzima está involucrada en la entrada de los AG a las células grasas (Hauner *et al.*, 1995), estos mecanismos traerían como consecuencia la reducción de la grasa corporal. Por otro lado, también menciona al principal factor mediador de la respuesta inflamatoria (Factor α de necrosis de tumor- TNF α) con múltiples efectos biológicos, entre ellos el decremento en la diferenciación del adipocito (Petruschke y Houner, 1993). En ratones suplementados con CLA, las concentraciones del RNAm del TNF α decreció en el tejido adiposo y quizá sea la causa del incremento de la apoptosis del adipocito (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000).

Pariza (2002), expone que los mecanismos por los cuales el *trans*-10, *cis*-12C18:2 actúa en los adipocitos no están bien esclarecidos y que los estudios clínicos o efectos metabólicos del CLA en humanos no están bien caracterizados. Atkinson (1999) concluye que son necesarios otros estudios en humanos con diseños experimentales apropiados.

En el presente trabajo, los grupos dietarios con grasas lácteas fueron los que más impacto tuvieron en los parámetros nutricionales en las cuatro experiencias, particularmente en el peso del hígado y de tejido adiposo a niveles elevados de grasa. Akahoshi *et al.* (2003) reportaron que la suplementación con *cis*-9 *trans*-11 C18:2 y *trans*-10 *cis*-12 C18:2o con un MixCLA redujeron el TAE y tejido adiposo perirenal en rata. Otros autores expusieron 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 la cantidad de CLA presente en la grasa (Yamasaki *et al.*, 2003).

4.2.- Parámetros bioquímicos

4.2.1.-Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración de TG y colesterol sérico

Los efectos de los CLA sobre los niveles de lípidos plasmáticos son controversiales, en el presente trabajo, los cambios observados en el nivel de colesterol circulante se observaron en la experiencia 1 los aumentos se produjeron a niveles recomendados de grasa, sin embargo las menores concentraciones se observaron en el grupo GLF7. A niveles elevados de grasa los grupos S30, GL30 y GLE30 presentaron las menores concentraciones séricas de colesterol. Mientras que en la experiencia 2 no se observaron cambios entre los grupos experimentales.

Numerosos estudios realizados en humanos han expuesto que los CLA no generan cambios sobre los niveles de colesterol séricos (Smedman y Vessby, 2001; Noone *et al.*, 2002; Petridou *et al.*, 2003; Naumann *et al.*, 2005). Sin embargo, algunos investigadores han informado efectos hipocolesterolémicos (Gauillier *et al.*, 2005). De la misma forma, los efectos hallados sobre los distintos tipos de lipoproteínas séricas han sido muy discordantes (Battacharya *et al.*, 2006). Estudios llevados a cabo en humanos, como también en animales hipertrilicidémicos, mostraron que existe una relación entre la concentración de TG y colesterol en suero con la capacidad lipogénica hepática expresada por la actividad de la enzima SCD-1 (Attie *et al.*, 2002).

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica constituye la primera causa de mortalidad en el hemisferio occidental (MSCH, 2001). Dentro de los múltiples factores de riesgo, las dislipidemias (caracterizadas por aumento de TG y colesterol plasmático) constituyen una importante condición etiopatogénica que favorece el desarrollo de la enfermedad. Los niveles plasmáticos elevados de colesterol transportado en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) son un factor de riesgo proaterogénico ampliamente demostrado (Rizzo y Berneis, 2006).

Existen diversos estudios en animales que demuestran que la suplementación con CLA tendría efectos positivos sobre algunos factores de riesgo cardiovascular y que, además, disminuiría el desarrollo temprano de lesiones ateroscleróticas (Lee *et al.*, 1994; Kritchevsky *et al.*, 2000; Arbonés-Mainar *et al.*, 2006). Sin embargo, la evidencia es heterogénea, ya que la mayoría de los estudios han utilizado diferentes mezclas de isómeros y distintos modelos experimentales.

La suplementación con 0,5 g/día de una mezcla de los isómeros CLA redujo la aterosclerosis aórtica en conejos alimentados con una dieta elevada en grasa (Lee *et al.*, 1994). Inclusive, se ha establecido que cantidades menores de 0,1% de mezcla de CLA del total de la dieta, pueden llevar a la reversión de lesiones en conejos (Kritchevsky *et al.*, 2000; Nicolosi *et al.*, 1997; Toomey *et al.*, 2006). En este sentido,

Arbonés *et al.* (2006), llevaron a cabo un estudio similar suplementando ratones apo E-/- con 1% de *cis-9 trans-11* o *trans-10 cis-12* C18:2 en forma separada, contra ácido linoleico como control, observando un menor desarrollo de ateromas y una mayor estabilidad de la placa ateromatosa luego de la dieta enriquecida con *cis-9trans-11* C18:2 en comparación con *trans-10cis-12* C18:2. Estos resultados coinciden con los de Mitchell *et al.* (1999), quienes utilizando hámsters como modelo experimental, también observaron un menor número de lesiones luego de aportar dietas suplementadas con 1 % de *cis-9trans-11*C18:2 y *trans-10cis-12* C18:2, al compararlas con el C18:2. En forma contradictoria a estas investigaciones, Munday *et al.* (1999) en ratones C57BL/6 silvestres alimentados con 2,5 g de CLA/kg de dieta aterogénica, observó que este ácido graso favorecía la formación de la aterosclerosis. A pesar de los resultados obtenidos en este estudio la mayor parte de la bibliografía apoya el efecto anti-ateroesclerótico del CLA, aunque no se han definido los mecanismos específicos involucrados en el efecto protector de los isómeros en roedores. Ante estas discrepancias surge la necesidad de nuevas investigaciones para esclarecer con mayor profundidad la repercusión que podrían tener los CLA sobre este parámetro.

En nuestro trabajo, los niveles de TG circulantes fueron modificados por la presencia de grasas lácteas, mostrando un comportamiento diferencial sin depender del nivel de grasa dietaria. Las grasas lácteas presentaron mayor concentración que las controles a niveles recomendados o elevados de grasa. La ausencia de cambios en la actividad de la LPL del músculo gastrocnemio en los grupos experimentales contribuyó a mantener TG séricos elevados sobre todo en los grupos con presencia de CLA. Aunque muchos investigadores reportan un efecto hipotriacilgliciridémico por la ingesta de CLA sintético (Macarulla *et al.*, 2005; Andreoli *etal.*, 2009) en otros trabajos los efectos fueron opuestos, como ocurrió en el presente trabajo. Un trabajo reciente (Scalerandi *et al.*, 2014) reportó un efecto hipertrigliceridémico en un modelo de ratones alimentados con grasas insaturadas de diferente origen suplementadas con AR o con una mezcla de CLA sintético (cantidades equimoleculares de *cis-9 trans-11* y *trans-10 cis-12* C18:2). Del mismo modo, evaluaciones llevadas a cabo en humano han dado resultados controversiales y con pocos efectos de los CLA sobre las concentraciones de TG séricos. Algunos trabajos informaron que las concentraciones de TG en individuos sanos (Roche *et al.*, 2002) o con sobrepeso (Naumann *et al.*, 2005) no se modificaron ante el consumo de CLA. Tricon *et al.* (2004), en hombres saludables, demostraron que los niveles de TG plasmáticos eran aumentados por el isómero *trans-10 cis-12* C18:2 CLA y disminuidos por el *cis-9 trans-11* C18:2 CLA.

Otros investigadores informaron reducción de los TG séricos (Mougios *et al.*, 2001; Noone *et al.*, 2002). Con los resultados informados sobre diferentes modelos experimentales, pareciera que la respuesta de los CLA sobre los TG séricos en animales y humanos es contradictoria y dependerían de la especie, el estado metabólico, el tipo de isómero, el diseño experimental y la composición de las dietas (Bhattacharya *et al.*, 2006).

4.2.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la concentración de TG hepáticos y su regulación

Los resultados controversiales sobre los niveles de TG hepáticos que han sido observados por diversos investigadores se exhibieron de mismo modo en los resultados obtenidos en las experiencias 1, 2 y 3 del presente trabajo.

Los TG hepáticos aumentaron en los grupos experimentales S30 y GLF30 y GLE30 en las experiencias 1 y 3, mientras que en la experiencia 2, disminuyeron en las grasas lácteas sin depender del nivel de grasa dietaria. En modelos experimentales con ratones se observó un incremento de TG hepáticos relacionado a una elevada lipogénesis hepática (Takahashi *et al.*, 2003; Ferramosca *et al.*, 2006), por otro lado, otros autores atribuyen este efecto al isómero *trans-10 cis-12 C18:2 CLA*. De forma contraria otros trabajos informan disminuciones en el contenido de TG hepáticos por diferentes mecanismos, en ratas normales (Purushotham *et al.*, 2007) y en ratas genéticamente obesas (Nagao *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006).

Sin embargo, el incremento de los TG hepáticos en nuestro trabajo en las grasas lácteas con niveles de AR no tuvo la dimensión de los cambios informados en ratones, donde el *trans-10 cis-12 C18:2 CLA* ha promovido una marcada esteatosis (Tsuboyama-Kasaoka *et al.*, 2000; Poirier, Niot, *et al.*, 2005). Igualmente, por los resultados observados no podemos descartar que ciertos mecanismos descritos en la inducción de la esteatosis, estén involucrados en nuestras experiencias a niveles elevados de grasa.

En nuestras experiencias, a niveles recomendados de grasa no se observaron incrementos en el contenido de TG en hígado en concordancia con la menor síntesis hepática de AG a este nivel de grasa dietaria y a un aumento en la β -oxidación. Sin embargo, en la experiencia que se midió la actividad de las enzimas lipogénicas, estas no disminuyeron su actividad como debería haber ocurrido para evitar la acumulación de TG hepáticos. Estos efectos podrían explicarse en parte por un

desequilibrio en la relación lipogenesis: β -oxidación, manifestada por un incremento en la actividad de la enzima ACC hepática y la mayor expresión génica del factor de transcripción PPAR- α y menor de CPT-I (claves en la regulación de la oxidación de los AG en el hígado) en las grasas lácteas a nivel recomendado de grasa. El grupo experimental S30vs GLF30 incrementó los niveles de ARNm de SREBP-1c y disminuyó, FAS y SCD-1 como también las actividades de la FAS y ACC. En las grasas lácteas mermó la expresión génica de la CPT-I, incrementó la actividad de la FAS y ACC, lo que manifiesta una prevención en la acumulación de TG en hígado a pesar del no aumento en la VSTG.

Varios investigadores en modelos experimentales con ratones reportaron un incremento en los TG hepáticos asociados a una elevada actividad de enzimas y una mayor expresión de genes involucrados con la lipogénesis (Takahashi *et al.*, 2003; Ferramosca *et al.*, 2006). A nuestro conocimiento, no existen estudios donde se evalúe el efecto de grasas lácteas ricas en AR natural sobre la relación lipogenesis: β -oxidación en ratas, asociada a la acumulación de TG en hígado.

Algunos investigadores han reportado que los CLA dietarios mejoraron la esteatosis hepática en ratas obesas aumentando la actividad de la CPT-I sin modificar su expresión (Nagao *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Andreoli *et al.* (2009) informaron un menor contenido de TG en hígado de ratas alimentadas con una dieta rica en grasa (20%) suplementada con CLA post-depresión proteica.

4.2.3.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre el contenido y retención de AV y CLA en hígado, tejido adiposo epididimal y suero

En el presente modelo experimental, los mayores contenidos de AV y CLA fueron observados en tejido adiposo, seguido del hígado y suero. Tomados en conjunto, estos resultados confirman la incorporación preferencial de CLA en los tejidos ricos en lípidos neutros (Banni *et al.*, 2001). Resultados semejantes fueron reportados por Yamasaki *et al.*, (2000), estos investigadores encontraron una retención 5 veces mayor de CLA en tejido adiposo que en hígado en animales alimentados con dietas conteniendo 2 % de CLA. La retención de ambos isómeros (AV y CLA) mostró dependencia con el nivel de grasa dietaria y con el origen de la grasa. A niveles elevados de grasa dietaria y dietas con grasa láctea se encontraron los mayores contenidos y retenciones de ambos isómeros. Los menores niveles se dieron en la GL, seguido de la GLE sin contenidos o retenciones en ambos controles S7 y S30. La

retención de los AG isoméricos en los tejidos puede variar de acuerdo a la cantidad ingerida, tiempo de tratamiento dietario, afinidad para su incorporación en tejidos y la capacidad de oxidación. Se sabe que el flujo de los AG a través de las vías de β -oxidación mitocondrial y peroxisomal esta determinado fundamentalmente por la actividad de las enzimas CPT-I y Acetil CoA oxidasa (no medida en nuestro trabajo) peroxisomal, respectivamente.

La cantidad de isómeros CLA en tejido adiposo depende tanto de la captación de éstos desde circulación, como de sus velocidades relativas de metabolización. En nuestro trabajo se observó que, el contenido de CLA (reflejado en el perfil de AG y en la retención) mostró niveles elevados de ambos isómero *cis*-9 *trans*-11 C18:2 CLA y *trans*-11 C18:1 tanto en TAE como así también, en hígado y suero. Estos resultados son semejantes a los informados por otros investigadores (Martins *et al.*, 2010), quienes encontraron mayores niveles de AR en TAE de ratas.

La suplementación con grasas lácteas no modificó los niveles de C18:2 en el hígado ni con niveles recomendados o elevados de grasa, aunque las mayores concentraciones se observaron en la GLF30. Se ha informado, que la incorporación y metabolización de los CLA es sensible a diferentes factores de la dieta, como lo son los cambios en los niveles de AGPI dietarios que podrían perturbar el metabolismo de estos isómeros y de los demás AGPI de cadena larga (Banni *et al.*, 2004a). En cuanto a los AG de la familia n-3, el contenido de C18:3 en TAE se vio disminuido en los grupos experimentales con grasa láctea a niveles recomendados y elevados de grasa.

4.3.- Parámetros relacionados a la regulación del metabolismo lipídico

4.3.1.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la actividad de las enzimas lipogénicas del hígado

La actividad de las enzimas lipogénicas: ACC, FAS y G6PDH aumentaron la actividad a nivel recomendado de grasa (7%). El origen de la grasa dietaria presentó influencia sobre la actividad de las enzimas. Las grasas lácteas presentaron una menor actividad de la enzima CPT-I, lo cual podría asociarse con una menor β -oxidación mitocondrial y una mayor estimulación de la enzima FAS. Numerosos autores (Tsuboyama- Kasaoka *et al.*, 2000; Clément *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2003, Ferramosca *et al.*, 2006; Degrace *et al.*, 2004) han observado en hígado de ratones alteraciones en la tasa de lipogénesis y/o β -oxidación inducidas tanto por el

mixCLA, como por el isómero individual *trans*-10 *cis*-12 C18:2 CLA. No obstante, a diferencia de lo encontrado en nuestro trabajo por la suplementación con AR, la mayoría de los estudios realizados en modelos animales, no mostraron incremento en la actividad y/o expresión de las enzimas lipogénicas hepáticas por la suplementación con dicho isómero (Clément *et al.*, 2002; Faulconnier *et al.*, 2004).

4.3.2.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la síntesis de AGPI de cadena larga en hígado

El contenido hepático de ALi, ALn y de los AGPI-CL derivados de los mismos, guardó una relación directa con los niveles dietarios de las respectivas familias de AGI.

Los cambios en la biosíntesis hepática de AGPI-CL de las familias n-6 y n-3 se estima con las relaciones AA/C18:2 y DHA/C18:3, respectivamente. El índice de la enzima Δ 6-desaturasa es representado por la relación γ -C18:3/C18:2, mientras que el índice de la enzima Δ 5-desaturasa está representado por la relación AA/ γ -C18:3.

Los cambios observados en la relación AA/C18:2 estuvo afectada por los grupos experimentales con presencia de grasas lácteas con respecto a sus controles (S7 y S30, respectivamente). Ambas relaciones, aumentaron en los grupos experimentales con grasas lácteas, lo indica que no hubo inhibición en la biosíntesis de AGPI n-6 y específicamente de la enzima Δ 6-desaturasa hepática ya que la relación que representa a esta enzima también aumentó en los grupos experimentales con grasas lácteas. Diferentes investigadores hallaron que el AR o el CLA sintético (mezcla de *cis*-9 *trans*-11 C18:2 y *trans*-10 *cis*-12 C18:2), reducen la biosíntesis de los AGPI-CL inhibiendo las enzimas Δ 5- y Δ 6-desaturasas (Ederf *et al.*, 2002; Javadi *et al.*, 2004). Nuestros resultados muestran un efecto inhibitorio en los grupos experimentales control posiblemente a causa de la excesiva oferta de C18:2 en ambos grupos experimentales (S7 y S30).

Con respecto a la familia n-3, los animales alimentados con grasas lácteas aumentaron la relación DHA/C18:3 aumentando la biosíntesis de de los AGPI n-3.

4.3.3.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la velocidad de secreción de triglicéridos hepáticos

La VSTG no fue afectada por el origen o nivel de grasa dietaria, sin embargo, en valores absolutos fueron mayores las velocidades en las grasas lácteas (La de mayor velocidad de AG se observó en GLF30) a ambos niveles de grasa al ser comparadas

con sus controles (S7 y S30). Este efecto pudo haber sido un mecanismo compensatorio para regular el contenido de TG hepáticos aumentados. Algunos investigadores informan que estudios realizados en cultivos con células HepG2, el AR actuó como activador más potente de la secreción de VLDL-TG que el isómero *trans*-10 *cis*-12 C18:2 CLA (Lin *et al.*, 2001). Este efecto de los CLA sobre la VLDL-TG, puede estar relacionado con la activación de PPAR- α , de los cuales se sabe los CLA son agonistas. En hígado, la activación de PPAR- α acrecienta 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). Esta 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 (Linden *et al.*, 2002). Asimismo, existen evidencias que la activación de PPAR- α reduce la biosíntesis de TG por el hígado (Linden *et al.*, 2002), este sería otro mecanismo mediante el cual los CLA podrían modular el contenido de TG en el hígado. Varios investigadores han respaldado estas aseveraciones, demostrando que los CLA son potentes activadores de los PPAR, esencialmente, PPAR- α , y que el AR sería el más eficiente (Moya- Camarena *et al.*, 1999; Clement *et al.*, 2002). Nuestros resultados muestran una mayor activación de este factor de transcripción en hígado en la GL7, GLF7 y GL30.

4.3.4.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre la actividad de la enzima lipoproteína lipasa en tejido adiposo y musculo gastrocnemio

Los estudios sobre de los efectos benéficos de los CLA sobre el tejido adiposo han sido controversiales acerca de la modulación de la homeostasis de los lípidos por estos isómeros. En el tejido adiposo, la LPL es considerada una enzima clave para la diferenciación de los adipocitos, también tiene un rol importante en la captación y almacenamiento de los lípidos. El tejido adiposo es un órgano muy variable en su tamaño por lo tanto la actividad de la enzima LPL puede tener diferente interpretación en función a su modo de expresión. En el presente trabajo, cuando la enzima se expresó por órgano total, tanto el origen como el nivel de grasa dietaria modificaron la actividad de la LPL en TAE, específicamente un aumento en el grupo experimental GLF30. Algunos trabajos llevados a cabo con Mix CLA, informaron una disminución en la actividad de la LPL, tanto en estudios en adipocitos aislados (Park y Pariza, 2001), como en estudios *in vivo* (Androli *et al.*, 2009) y en estudio *in vitro*, ha sido relacionado al isómero *trans*-10 *cis*-12 C18:2 (Park *et al.*, 2004). El mismo efecto se reportó en

hamsters alimentados con dietas aterogénicas suplementadas con *trans*-10 *cis*-12 C18:2 (Zabala *et al.*, 2006a). Es escasa la información con el isómero *cis*-9 *trans*-11 C18:2 sobre la actividad de la LPL y en general la poca que existe es contradictoria. Lin *et al.* (2009b) reportaron en adipocitos 3T3-L1, expuestos a *cis*-9 *trans*-11 C18:2, una disminución en la actividad de la LPL, resultado que no condice con los del presente trabajo, donde la actividad aumento en el grupo experimental GLF30.

La actividad de la LPL en musculo no presentó cambios ni por el origen ni por el nivel de grasa dietaria.

4.3.5.- Efecto del origen y nivel de grasa dietaria sobre los NEFA y glucosa circulantes.

Los niveles de NEFA circulantes disminuyeron en los grupos experimentales S30 y GL30 en las dos experiencias en las que se determinaron.

Los niveles de glucosa circulante no se modificaron por las grasas dietarias de diferentes orígenes, sin embargo en una de las experiencias la concentración en los grupos experimentales GL30 y GLF30 disminuyó. En el presente trabajo, no fue objeto de estudio investigar mecanismos reguladores de la glucemia. Algunos trabajos en ratones suplementados con mixCLA o con el isómero *trans*-10 *cis*-12 C18:2 CLA, han observado normoglucesmia en presencia de una marcada hiperinsulinemia (Poirier,Rouault *et al.*, 2005; Clément *etal.*, 2002). Los mismos autores, reportaron que dietas ricas en *cis*-9 *trans*-11 C18:2 CLA, no modificaron los niveles de glucosa circulante como sucedió en el presente trabajo. Otros investigadores, en pacientes con sobrepeso (Gaulhier *et al.*, 2004) o en pacientes sanos (Eyjolfson *et al.*, 2004), reportaron que el mixCLA como suplemento dietario, afectó los niveles de glucosa y los resultados sobre la insulinemia fueron discrepantes.

CONCLUSIONES

Los resultados muestran que independientemente del origen de la grasa dietaria, los grupos experimentales alimentados con 30% de grasa tuvieron un incremento mayor en su ganancia corporal que los que consumieron niveles recomendados de grasa. Por otro lado, la GLF caracterizada por bajos niveles de AGS y elevado contenido de AR y AV, condujo una reducción de acumulación de lípidos hepáticos

inducida por altos niveles de grasa y mejoras en el metabolismo lipídico. Dichos efectos benéficos han sido asociados a una significativa retención de los AG potencialmente funcionales y a unas sustanciales mejoras del perfil de los AG circulantes y tisulares. Los presentes resultados podrán contribuir a una mejor intervención o prevención de alteraciones producidas nutricionalmente, las cuales son comunes a enfermedades de elevada incidencia en nuestra población.

CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos confirmaron la existencia de una importante plasticidad en la composición de los ácidos grasos de la leche ante el aporte suplementario de aceites poliinsaturados. Los resultados sugieren ciertas ventajas al utilizar la mezcla de aceites de soja y de lino en la proporción 75- 25 teniendo en cuenta costos relativos de los aceites, los efectos positivos sobre las variables productivas y la mejora inducida en el valor saludable de la grasa láctea. De acuerdo a lo esperado, resultó posible disminuir la participación de los ácidos grasos hipercolesterolémicos de la leche con un incremento simultáneo de los ácidos vaccénico y ruménico. La práctica utilizada resultó de rápido efecto y de relativamente fácil implementación para obtener una leche natural como fuente pura y sostenible de ácidos grasos de excelente calidad para alimentación humana. El trabajo realizado aportó conocimientos para el desarrollo de nuevas estrategias alimenticias para vacas y ovejas lactantes a fines de mejorar la calidad nutritiva de la leche, innovación científica que puede contribuir a revertir la tendencia negativa en el consumo de lácteos asociada al consumo excesivo de grasa saturada y crear conciencia entre los consumidores respecto a los beneficios de tomar leche entera para la salud. Las concentraciones de los ácidos grasos no saludables como los *trans*-9 y *trans*-10 C18:1 permanecieron bajas. En la proporción mencionada, la mezcla de aceites de soja y lino permitió además mantener una adecuada relación n-6/n-3 en la leche cercana a 5. La obtención de estas leches y sus derivados representa un potencial beneficio para la salud de los consumidores con un posible ahorro de costos del estado asociados al mantenimiento de una adecuada salud pública. La estrategia utilizada en el presente trabajo de Tesis va “del tambo a la mesa” y brinda a los productores o empresas lácteas la oportunidad de desarrollar productos con mayor valor agregado para el consumidor mediante prácticas naturales que pueden resultar importantes para el posicionamiento de una marca con una inversión adicional relativamente pequeña. Los resultados en el cambio del perfil lipídico de la leche constituyen una gran oportunidad para productores y empresas lácteas que pretendan ubicar a sus productos dentro de la categoría de “halo saludable” y diferenciarlos por valor agregado en origen siendo a su vez una herramienta muy efectiva para mejorar en forma natural la calidad nutricional de la leche. Si bien este tipo de leches ya están presentes en mercados nicho, se obtienen en general agregando compuestos exógenos (CLA) después de su producción lo que puede afectar el sabor, el olor y la rancidez del producto final. Dado el elevado costo de los aceites, también resultó importante explorar la cantidad o dosis más

conveniente de aceites para alcanzar los objetivos buscados. Los resultados del Capítulo II ponen por primera vez en evidencia que el aporte creciente de la mezcla de aceites de soja y lino (75- 25) aumenta de manera lineal el contenido de los ácidos vaccénico y en consecuencia del ruménico sin efectos negativos sobre la producción de leche ni su contenido proteico. Los cambios en el perfil graso estuvieron acompañados de la reducción esperada en el contenido de grasa saturada y de su fracción hipercolesterolémica lo que constituye una mejora en su calidad nutricional. El nivel óptimo de inclusión de la mezcla de aceites estuvo situado alrededor del 3,91% del consumo total de MS de la vaca sin ventajas adicionales al incrementar la dosis de aceites en la ración total. Al igual que en los bovinos, los resultados obtenidos con los con ovinos confirmaron la posibilidad de modificar la composición en ácidos grasos de la leche ante el aporte suplementario de aceites poliinsaturados. El consumo de aceites al 7% de una ración basada en forraje (71%) y concentrado (29%) no afectó la respuesta productiva ni el rendimiento y contenido de la grasa láctea con aumentos en el contenido de proteína. Ni el extracto quesero ni el recuento de células somáticas se vieron afectados lo permitió obtener una leche ovina de mayor valor nutricional y de excelente aptitud para su industrialización quesera. La combinación de aceites de soja y de lino al 50% generó el mayor número de cambios nutricionales favorables en la leche ovina tomando como criterios de mejora la disminución de la fracción hipercolesterolémica, el aumento simultáneo en los niveles de los ácidos vaccénico, ruménico y linolénico con una relación n-6/n-3 menor a 4 y un índice aterogénico menor a 2. La cantidad óptima de la mezcla de aceites a suministrar (ensayos de dosis-respuesta) y la persistencia en el tiempo de los cambios inducidos son aspectos que merecen ser abordados experimentalmente en trabajos futuros. Finalmente, la grasa láctea funcional caracterizada por bajos niveles de ácidos grasos saturados y elevado contenido de los compuestos bioactivos como el rúménico y el vaccénico utilizada en la dieta de animales de experimentación condujo a una reducción de acumulación de lípidos hepáticos inducida por altos niveles de grasa y a mejoras en el metabolismo lipídico y glucídico. Dichos efectos benéficos fueron asociados a una significativa retención de los AG potencialmente funcionales y a unas sustanciales mejoras del perfil de los AG circulantes y tisulares. Así, el conocimiento de los efectos benéficos que presentó la GLF desarrollada obtenida y los mecanismos de acción involucrados podrán contribuir a una mejor intervención o prevención de alteraciones metabólicas producidas nutricionalmente, las cuales son comunes a enfermedades de elevada incidencia en nuestra población.

BIBLIOGRAFIA

- ABUGHAZALEH, A. A. 2008. Effect of fish oil and sunflower oil supplementation on milk conjugated linoleic acid content for grazing dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 141: 220-232.
- ABUGHAZALEH, A.A.; HOLMES, L. D. 2007. Diet supplementation with fish oil and sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* Jun; 90 (6):2897-904.
- ABUGHAZALEH, A. A.; JENKINS, T. C. 2004. Short communication: Decosahexaenoic acid promotes caccenic acid accumulation in mixed rumen cultures when incubated with linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 87: 1047-1050.
- ABUGHAZALEH, A. A.; SCHINGOETHE, D. J.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F. 2003. Milk Conjugated linoleic acid response to fish oil supplementetation of diets differig in fatty acids profile. *J. Dairy Sci.* 86: 9444-953.
- ABUGHAZALEH, A. A. ; SCHINGOETHE, D. J.; HIPPEN, A. R.; KALSCHEUR, K. F.; WHITLOCK, A. 2002. Fatty acid profiles of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. *J Dairy Sci.* 85(9):2266-76.
- ABUGHAZALEH, A.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; WHITLOCK, L.A. 2002. Feeding fish meal and extruded soybeans enhances the conjugated linoleic acid (CLA) content of milk. *J Dairy Sci.* 85(3):624-31.
- AGAZZI, A.; BAYOURTHE, C.; NICOT, M.C.; TROEGELER-MEYNADIER, A.; MONCOULON. R.; ENJANBERT. 2004. In situ ruminal biohydrogenation of fatty acids from extruded soybeans: effects of dietary adaptation and of mixing with lecithin or wheat Straw. *Anim Feed Sci Technol.* 117: 165-175.
- AKAHOSHI, A.; KOKA, K.; OHKURA-KAKU, S.; KANEDA, N.; GOTO, C.; SANO, H.; IWATA, T.; YAMAUCHI, Y.; TSUTSUMI, K. Y SUGANO, M. 2003. Metabolic effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rats. *Nutr Res.* 23: 1691-1701.
- ALZAHAL, O.; ODONGO, N.E.; MUTSVANQWA, T.; OR-RASHID, M.M.; DUFFIELD, T.F.; BAQQ, R.; DICK, P.; VESSIE, G.; MCBRIDE, B.W. 2008. Effects of Monensin and Dietary Soybean Oil on Milk Fat Percentage and Milk Fatty Acid Profile in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy. Sci.* 91 (3): 1166-1174.
- AMAMCHARLA J.K.; METZGER L.E. 2014. Modification of the ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay to determine the susceptibility of raw milk to oxidation. *Int. Dairy J* 34:177-179. DOI: 10.1016/j.idairyj.2013.09.004.
- AMBROSE, D. J.; KASTELIC, J. P.; CORBETT, R.; PITNEY, P. A.; PETIT, H. V.; SMALL, J. A.; ZLKOVIC, P. 2006. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed a diet enriched in linoleic acid. *J. Dairy Sci.* 89:3066–3074.
- ANDREOLI, M. F.; MARTINELLI, M. I.; SCALERANDI, M. V.; FARIÑA, A. C.; WILLINER, M. R.; BERNAL, C. A. 2012. CLA prevents alterations in glycolytic metabolites induced by a high fat diet. *Eur J Lipid Sci Technol.* 114: 718-725.

- ANDREOLI, M.; ILLESCA, P.; GONZÁLEZ, M.; BERNAL, C. 2010. Conjugated Linoleic Acid reduces hepatic steatosis and restores liver triacylglycerol secretion and the fatty acid profile during protein repletion in rats. *Lipids* 45(11): 1035–1045. ISSN 0024-4201
- ANDREOLI, M.; GONZALEZ, M.; MARTINELLI, M.; MOCCHIUTTI, N.; BERNAL, C. 2009. Effects of dietary Conjugated Linoleic Acid at high fat levels on lipid regulation in mice. *Nutrition* 25 .445-452.
- ANDREOLI, M.; SCALERANDI, M.; MALAN BOREL, I.; BERNAL C. 2007. Effects of CLA at different dietary fat levels on nutritional recovery during protein repletion in the rat. *Nutrition* 23 827–835.
- ANGULO J, 2012. Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. Tesis. Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Colombia. 174 p.
- ANTONACCI, L.E.; GAGLIOSTRO, G.A.; CANO, A.V.; BERNAL, C.A. 2017. Effects of Feeding Combinations of Soybean and Linseed Oils on Productive Performance and Milk Fatty Acid Profile in Grazing Dairy Cows. *Agric. Sci.*, 8, 984-1002. <https://doi.org/10.4236/as.2017.89072>
- ANTONACCI, L.; RODRÍGUEZ, A., CASTELLI, L., ZAMPATTI, M., CASTAÑEDA, R., CEAGLIO, J.; GAGLIOSTRO, G. 2013. Suplementación con mezcla de aceites vegetales y el perfil en ácidos grasos de leche bovina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 33. (Supl. 1). 149-207.
- ARBONÉS-MAINAR, J.M.; NAVARRO, M.A.; GUZMÁN, M. A. ; ARNAL, C.; SURRA, J. C.; ACÍN, S.; CARNICER, R.; OSADA, J.; ROCHE, M. H. 2006. Selective effect of conjugated linoleic acid isomers on atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E knockout mice. *Atherosclerosis.*; 189(2):318-327.
- ASCHERIO, A.; Katan, M.B.; Zock, P.L.; Stampfer, M.J.; Willet, W.C. 1999. Trans fatty acids and coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 1994-1998.
- ASHWELL, M. 2012. Conceptos sobre los alimentos funcionales. ILSI Europe Consideration Series, 40p.
- Association of Official Analytical Chemists International. 1999. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 18th ed. (1st rev). Horwitz, W.; Latimer, G.W. (eds.); AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. 2400p.
- ATKINSON, R. L. 1999. Conjugated linoleic acid for altering body composition and treating obesity. In: Yurawecz, M.P. et al (eds.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. AOCS Press. Champaign, IL, pp348-353.
- ATKINSON, R.L.; TOONE, C.D.; ROBINSON, T.J.; HARMON, D.L.; LUDDEN, P.A. 2009. Effects of ruminal protein degradability and frequency of supplementation on nitrogen retention, apparent digestibility, and nutrient flux across visceral tissues in lambs fed low-quality forage. *J. Anim Sci.* 10:2246-2257.

- ATTIE, A.D.; KRAUSS, R.M.; GRAY-KELLER, M.P.; BROWNLIE, A.; MIYAZAKI, M.; KASTELEIN, J.J.; LUSIS, A.J.; STALENHOF, A.F.; STOEHR, J.P.; HAYDEN, M.R.; NTAMBI, J.M. 2002. Relationship between stearoyl-CoA desaturase activity and plasma triglycerides in human and mouse hypertriglyceridemia. *J Lipid Res.* 43: 1899-1907.
- AWAD, A.B.; HERMANN, T.; FINK, C.S.; HORVATH, P.J. 1995. 18:1 n7 Fatty acids inhibit growth and decreased inositol phosphate release in HT-29 cells compared to n-9 fatty acids. *Cancer Lett.* 91: 55-61.
- BALDI, A.; PINOTTI, L. 2008. Lipophilic Microconstituents of Milk. In: Zsuzsanna Bösze (ed.) *Bioactive components of milk.* Springer: New York, 109-125.
- BANNI, S.; PETRONI, A.; BLASEVICH, M.; CARTA, G.; CORDEDDU, L.; MURRU, E.; MELIS, M.P.; MAHON, A.; BELURY, M.A. 2004. Conjugated linoleic acids (CLA) as precursors of a distinct family of PUFA. *Lipids.* 39: 1143-1146.
- BANNI, S., MURRU, E., ANGIONI, E., CARTA, G., MELIS, M. P. 2002. Conjugated linoleic acid isomers (CLA): good for everything?. *Sci. Aliments.* 22: 371-380.
- BANNON, C. D.; BREEN, G. J.; CRASKE, J. D.; HAI, N. T.; HARPER, N. L.; O'ROURKE, K. L. 1982. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. III. literature review of and investigations into the development of rapid procedures for the methoxide catalysed methanol of fats and oils. *J. Chromatogr. A,* 247: 71- 89.
- BARGO, F.; MULLER, L.D.; KOLVER, E.S.; DELAHOY, J.E. 2003. Invited review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86: 1-42.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J.M. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livest. Prod.Sci.* 70:15–29.
- BAUMAN, D. E.; CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; GRIINARI. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. In: Garnsworthy, P.C.; Wiseman, J. (eds.) *Recent Advances in Animal Nutrition,* Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp: 221–250.
- BAUMAN, D.E.; BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; GRIINARI, J.M. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proc Am Soc Aim Sci;* 1-15. Recuperado de: <https://www.agrireseau.net/bovinsboucherie/documents/CLA.pdf>.
- BAUMAN, D.E.; Davis, C.L. 1974. Biosynthesis of milk fat. In: Larson, B.L.; Smith, V.R. (eds.) *Lactation. A comprehensive treatise, Biosynthesis and secretion of milk/Diseases.* Academic Press, New York, pp.31-75.
- BENDSEN, N. T.; HAUGAARD, S. B.; LARSEN, T. M.; CHABANOVA, E.; STENDER, S.; 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.; ROVIRA, J.; COLANDRE, M.E.; CUSSO, R.; CADEFAU, J.A. 2006. Effects of dietary cis and trans unsaturated and saturated fatty acids on the glucose metabolites and enzymes of rats. *Br. J. Nutr.* 95: 947-954.
- BERNAL; C.; MARTINELLI. M.; MOCCHIUTTI, N. 2002. Effect of the dietary exposure of rat to di (2-ethylhexyl) phthalate on their metabolic efficiency. *Food Addit Contam*; 19: 1091–1096.
- BERNAL, C.; BASÍLICO, M.Z.; GUTMAN, R.LOMBARDO, Y.B.. 1989. Secretion and removal rates of very low density lipoprotein triglycerides at the three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet *Nutr.Rep.Internat.*40: 71-83.
- BHATTACHARYA, A.; RAHMAN, M.M.; MCCARTER, R.; O'SHEA, M. ;FERNANDES, G. 2006. Conjugated linoleic acid and chromium lower body weight and visceral fat mass in high-fat-diet-fed mice. *Lipids* 41: 437-444.
- BICKERSTAFFE R.; ANNISON E.F.; LINZELL, J. 1974. The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino acids in lactating dairy cows. *J. Agric. Sci. Camb.* 82: 71–85.
- BIEBER, L.L.; ABRAHAM, T.; HELMRATH, T. 1972. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. *Anal Biochem.*50: 509-518.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.*37: 911-917.
- BOKEN, S. L.; STAPLES, C.R.; SOLLENGBERGER, L.E.; JENKINS, T.C.; THATCHER, W.W.. 2005. Effect of grazing and fat supplementation on production and reproduction of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 88:4258-4272.
- BU, D.P.; WANG, J.G.; DHIMAN, T.R.; LIU, S.J. 2007. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:998-1007.
- BUSETTI, M. 2005. Composición de la leche de ovejas pampinta a lo largo de un período de lactación. Sitio Argentino de Producción Animal. <http://www.produccion-animal.com.ar/>
- BUSETTI, M. 2006. La calidad de la leche de oveja. INTA. EEA Anguil. Boletín De Divulgación Técnica; 90 pp. 206-214.
- CAJA, G.; BOCQUIER, F. 2000. Effects of nutrition on the composition of sheep's milk. *Options Mediter*52, 59-74.
- CALDER, P.C. 2014. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta.* 1851(4):469-84.
- CALDER, P.C. 2013. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br J. Clin Pharmacol.* 75(3):645-62.
- CALDER, P.C. 2012. Fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?. *Br J Clin Pharmacol* / **75**:3 / 645–662.

- CALDER, P.C. 2008. Fatty acids and inflammation – from the membrane to the nucleus and from the laboratory bench to the clinic. *Clin Nutr* 2010; 29: 5–12.
- CALDER, P.C. 2006. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory Diseases. *Am J Clin Nutr*; 83(suppl):1505S–19S.
- CASPER, D.P.; SHINGOETHE, D.J.; MIDDAUGH R.P.; BAER, R.J. 1988. Lactational responses of dairy cows to diets containing regular and high oleic sunflower seeds. *J. Dairy Sci.* 71: 1267– 1274.
- CASTAÑEDA-GUTIERREZ, E.; BENEFIELD, B.C.; DE VETH, M.J.; SANTOS, N.R.; GILBERT, R.O.; BUTLER, W.R.; BAUMAN, D.E. 2007. Evaluation of the mechanism of action of conjugated linoleic acid isomers on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4253- 4264.
- CASTILLO VARGAS, J. A. 2012. Cinética de biohidrogenación in vitro de ácidos grasos poliinsaturados en fluido ruminal. Tesis de Magister en Producción Animal, Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento de Producción Animal. Bogotá, Colombia. 91p.
- CASTRO, T.; MANSO, T.; JIMENO, V.; DEL ALAMO, M.; MANTECÓN, A. R.2009. Effects of dietary sources of vegetable fats on performance of dairy ewes and conjugated linoleic acid (CLA) in milk. *Small Ruminant Res* 84:47-53.
- CASTRO-CARRERA, T.; FRUTOS, P.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y.; HERVÁS, G.; BELENGUER, A.; BERNARD, L.; TORAL, P.G. .2015. Dietary sunflower oil modulates milk fatty acid composition without major changes in adipose and mammary tissue fatty acid profile or related gene mRNA abundance in sheep. *Animal*. 9:4, pp 582–591.
- CHILLIARD, Y.; MARTIN, C.; ROUEL, J.; DOREAU, M. 2009. Milk fatty acids in dairy cows fed whole crude linseed, extruded linseed, or linseed oil, and their relationship with methane output. *J. Dairy Sci.* 92:5199–5211.
- CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; ENJALBERT, F.; FERLAY, A.; BOCQUIER, F.; SCHMIDELY, P.H. 2007. Recent data on effects of feeding factors on milk fatty acid composition in cow, goat and ewe. *Rev Arg Prod An* 27(3): 197-213.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties, *Reprod. Nutr. Dev.* 44: 467–492.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G.A. 2003. Review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86: 1751–1770.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A., LOOR, J., ROUEL, J., MARTIN, B. 2002. Trans and conjugated fatty acids in milk from cows and goats consuming pasture or receiving vegetable oils or seeds. *Ital. J. Anim. Sci.* (1), 243-254.

- CHILLIARD, Y., FERLAY, A.; DOREAU, M. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70:31–48.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R.M.; DOREAU, M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.* 49, 181-205.
- CHILLIARD, Y. 1993. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: A review. *J. Dairy Sci.* 76:3897–3931.
- CHILLIARD, Y.; GAGLIOSTRO, G.A.; FLÉCHET, J.; LEFAIVRE, J.; SEBASTIAN, I. 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and mid lactation cows. 5. Milk fatty acids and adipose tissue lipogenic activities. *J. Dairy Sci.* 74: 1844-1854.
- CHIN, S. F.; STORKSON, J.M.; LIU, W.; ALBRIGHT, K.J.; 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.* 124:694-701.
- CHOI, J.S.; KOH, I.U.; JUNG, M.H.; SONG, J. 2007. Effects of three different conjugated linoleic acid preparations on insulin signalling, fat oxidation and mitochondrial function in rats fed a high-fat diet. *Br. J. Nutr.* 98: 264-275.
- CHOI, J. S.; JUNG, M. H.; PARK, H. S.; 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.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- CHRISTIE, W.W. 1981. The effects of diet and other factors on the lipid composition of ruminant tissues and milk. In: Christie W.W. (ed.), *Lipid metabolism of ruminant animals*. Pergamon Press, Oxford, pp.193-226.
- CIESLAK, A.; KOWALCZYK, J.; CZAUDERNA, M.; POTKANSKI, A.; SZUMACHER-STRABEL, M. 2010. Enhancing unsaturated fatty acids in ewe's milk by feeding rapeseed or linseed oil. *Czech J. Anim. Sci.* 55, 496-504.
- CLÉMENT, L.; POIRIER, H.; NIOT, I.; BOCHER, V.; GUERRE-MILLO, M.; KRIEF, S.; STAELS, B.; BESNARD, P. 2002. Dietary trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. *J Lipid Res.* 43: 1400-1409.
- COLANDRE, M.E.; DIEZ, R.S.; BERNAL, C.A. 2003. Metabolic effects of trans fatty acids on an experimental dietary model. *Br. J. Nutr.* 89: 631-639.
- COLLOMB, M, SCHMID A, SIEBER R., WECHSLER D.; RYHÄNEN, E. L. 2006. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. Review. *Int Dairy J.* 16: 1347-1361.

- CORL, B. A.; BAUMGARD L. H.; DWYER D. A.; GRIINARI, J. M.; PHILLIPS, B. S.; BAUMAN, D.E. 2001. The role of Δ^9 -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11CLA. *J. Nutr. Biochem.* 12: 622-630.
- COUVREUR, S.; HURTAUD, C.; LOPEZ, C.; DELABY, L.; PEYRAUD, J.L. 2006. The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *J. Dairy Sci.*, 89, 1956-1969.
- CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAMER, J.K.G.; KENNELLY, J.J.; GLIMM, D.R.; SORENSEN, B. M.; OKINE, E. K.; GOONEWARDENE, L. A.; WESELAKE, R.J. 2007. Evaluating the Conjugated Linoleic Acid and *Trans* 18:1 Isomers in Milk Fat of Dairy Cows Fed Increasing Amounts of Sunflower Oil and a Constant Level of Fish Oil. *J. Dairy Sci.* 90:3786–3801.
- DALMEIJER, G.W.; STRUIJK, E.A.; VAN DER SCHOUW, T.; SOEDAMAH-MUTHU, S:S.; VERSCHUREN, W.M.; BOER, J.M. 2013. Dairy intake and coronary heart disease or stroke—a population-based cohort study. *Int. J. Cardiol.* 167(3):925E9.
- DE ALMEIDA, M.; POTENTE DUTRA LUQUETTI, S. C.; SABARENSE, C. M.; DO AMARAL CORREA, J.O.; GOMEZ DOS REIS, L.; SANTOS DA CONCEICAO, E. P.; LISBOA, P. C.; DE MOURA, E.G.; GAMEIRO, J.; SUNFELD DA GAMA, M. A.; FERRAZ LOPES, F. C.; GONZALEZ GARCIA, R. M. 2015. Butter naturally enriched in *cis*-9,*trans*-11 CLA prevents hyperinsulinemia and increases both serum HDLcholesterol and triacylglycerol levels in rats. *Lipids Health Dis.* 13:200.
- DE LA TORRE, A.; DEBITON, E.; JUANÉDA, P.; DURAND, D.; CHARDIGNY, J.M.; BARTHOMEUF, C.; BAUCHART, D.; GRUFFAT, D. 2006. Beef conjugated linoleic acid isomers reduce human cancer cell growth even when associated with other beef fatty acids *Br. J. Nutr.* 95: 346-352.
- DE SOUZA , R.J.; MENTE, A.; MAROLEANU, A.; HA, V.; KISHIBE , T.; ULERYK ,E.; BUDYLOWSKI ,P.; SCHÜNEMANN , H.; BEYENE , J.; ANAND, S.S.2015. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMJ*; 351:h3978. doi: 10.1136/bmj.h3978
- DEGIROLAMO, C.; RUDEL, L.L. 2010. Dietary monounsaturated fatty acids appear not to provide cardioprotection. *Curr Atheroscler Rep.*12: 391-396.
- DEGRACE, P.; DEMIZIEUX, L.; GRESTITI, J.; CHARDIGNY, J.M.; SÉBÉDIO, J.L.; CLOUET, P. 2003. Association of liver steatosis with lipid oversecretion and hypotriglyceridaemia in C57BL/6j mice fed *trans*-10,*cis*-12-linoleic acid. *FEBS Lett.*546: 335-339.
- DEL PRADO, M., HERNADEZ-MONTES, H.; VILLAPANDO, S. 1994. Charaterization of a Fluorometric Method for Lipoprotein Lipase. *Arch. Med. Res.*25(3):331-335
- DELANY, J. P.; LOHM, F.B-; TRUETT, A.A.; SCIMECA,J.A.; WEST, D.B. 1999. Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Comp. Physiol.* 45:1172- 1179.

- DEWHURST, R.J.; SHINGFIELD, K.J.; LEE M.R.F.; SCOLLAN, N.D. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:168-206. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2006.04.016.
- DEWHURST, R.J.; KING, P.J. 1998. Effects of extended wilting, shading and chemical additives on the fatty acids in laboratory grass silages. *Grass forage Sci.* 53: 219-224.
- DHIMAN, T.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W.; GALLI, M.P.; ALBRIGHT, K.; TOLOSA, M.X. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 83: 1016–1027.
- DIGIROLAMO, M.; SCHLANT R. 1991. Etiology of coronary atherosclerosis. 2^a ed. Toray: Barcelona.
- DILZER, A.; PARK, Y. 2012. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. *Food Sci. Nutri.* 52(6): 488-513.
- DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. 1997. Effects of ruminal or postruminal. fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reprod. Nutr. Dev.* 37: 113–124. (Abstract).
- DORFMAN, S. E.; LAURENT, D.; GOUNARIDES, J. S.; LI, X.; MULLARKEY, T. L.; ROCHEFORD, E. C.; SARI-SARRAF, F. 2009. Metabolic implications of dietary trans-fatty acids. *Obesity.* 17: 1200-1207.
- DOYLE, E. 1998. Scientific forum explores CLA knowledge. *Inform* 9(1):69-73.
- DSCHAAK, C. M.; NOVIANDI, C.T.; EUN, J.S.; FELLNER, V.; YOUNG, A. J.; ZOBELL, D. R.; ISRAELSEN, C.E. 2011. Ruminal fermentation, milk fatty acid profiles, and productive performance of Holstein dairy cows fed 2 different safflower seeds. *J. Dairy Sci.* 94:5138–5150.
- DUBOIS V.; BRETON, S.; LINDER M.; FANNI J.; PARMENTIER, M. 2007. Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 109:710-732.
- DUNKLEY, W.L.; SMITH, N.E.; FRANKE, A.A. 1977. Effect of feeding protected tallow on composition of milk and milk fat. *J. Dairy Sci.* 60: 1863-1869.
- EDERF, K.; SLOMMA, N.; BECKER, K. 2002. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid suppresses the desaturation of linoleic and alpha-linolenic acids in HepG2 cells. *J. Nutr.* 132: 1115-1121.
- ELSHARBINY, M. E.; GORUK, S.; MONCK, E. A.; RICHARD, C.; BRUN, M.; EMARA, M.; FIELD, J.C.; GODBOUT, R. 2015. Long-Term Effect of Docosahexaenoic Acid Feeding on Lipid Composition and Brain Fatty Acid-Binding Protein Expression in Rats. *Nutrients.* 7(10): 8801-8817.
- EVANS, M.; GEIGERMAN, C.; COOK, J.; CURTIS, L.; KUEBLER, B.; MCINTOSH, M. 2000. Conjugated linoleic acid suppresses triglyceride content and induces apoptosis in 3T3–L1 preadipocytes. *Lipids;* 35: 899-910.

- EYJOLFSON, V.; SPRIET, L.L.; DYCK, D.J. 2004. Conjugated linoleic acid improves insulin sensitivity in young, sedentary humans. *Med Sci Sports Exerc.* 36: 814-820.
- FAO[FAOSTAT].2013. Production livestock primary.[Base de datos]. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>
- FARAMARZI, E.; MAHDAVI, R.; MOHAMMAD; M, Z.; NASIRIMOTLAGH, B.; SANAIE, S. 2017. Effect of conjugated linoleic acid supplementation on quality of life in rectal cancer patients undergoing preoperative Chemoradiotherapy. *Pak. J. Med.Sci.* 33 (2): 383-388.
- FARIÑA, A. C. 2014. Impacto de los ácidos grasos isoméricos *trans* y CLA sobre la modulación lipídica en ratas alimentadas con dietas enriquecidas o deprivadas en ácido linoleico. Tesis Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Del Litoral. 246p.
- FAULCONNIER, Y.; ARNAL, M.A.; PATUREAU MIRAND, P.; CHARDIGNY, J.M.; CHILLIARD, Y. 2004. Isomers of conjugated linoleic acid decrease plasma lipids and stimulate adipose tissue lipogenesis without changing adipose weight in post-prandial adult sedentary or trained Wistar rat. *J. Nutr. Biochem.*15: 741-748.
- FERNANDEZ, H.H. 2004. Estimación de la disponibilidad de pasto. INTA. EEA Balcarce, Area de Producción Animal.
- FERRAMOSCA, A.; SAVY, V.; CONTE, L.; COLOMBO, S.; EINERHAND, A.W.; ZARA, V. 2006. Conjugated linoleic acid and hepatic lipogenesis in mouse: role of the mitochondrial citrate carrier. *J. Lipid. Res.*47: 1994-2003.
- FLOWERS, G., IBRAHIM, S.A.; ABUGHAZALEH, A.A. 2008. Milk fatty acid composition of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *J. Dairy Sci.* 91:722-730.
- FOLCH, J.; LEES, M.;SLOANE STANLEY, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.*226: 497-509.
- FUENTES, M.C.; CALSAMIGLIA, S.S.; SÁNCHEZ, C.; GONZÁLEZ, A.; NEWBOLD, J.; SANTOS, J E.P.; RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L.M.; FONTECHA, J. 2008. Effect of extruded linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 113: 144-154.
- GAGLIOSTRO, G.A.; GARCIARENA, D.A.; RODRIGUEZ, M.A.; ANTONACCI, L.E. 2017. Feeding polyunsaturated supplements to grazing dairy cows improve the healthy value of milk fatty acids. *Agric. Sci.* 8,759-782. <https://doi.org/10.4236/as.2017.88057>.
- GAGLIOSTRO, G.A.;PATIÑO, E.M.; SANCHEZ NEGRETTE, M.; SAGER,G. CASTELLI, L.; ANTONACCI, L.E.; RACO, F.; GALLELLO , L.; RODRÍGUEZ, M.A.; CAÑAMERAS, C.; ZAMPATTI , M.L.;BERNAL. C. 2015. Milk fatty acid profile from grazing buffaloes fed a blend of soybean and linseed oils. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*.67(3):927-934.

- GAGLIOSTRO, G.A. 2011. Obtención de lácteos funcionales naturales. En: Camgiano, C.A.; Brizuela, M.A. (eds.). Producción Animal en Pastoreo. 2ª.ed.INTA: Buenos Aires, pp. 425-445
- GAGLIOSTRO, G. 2004a. Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y su presencia en alimentos naturales funcionales. 1. efectos en salud humana. Rev. Arg.Prod. Anim. 24(3-4): 113-136.
- GAGLIOSTRO, G. 2004b. Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y su presencia en alimentos naturales funcionales. 2. producción de leche alto CLA de vaca. Rev. Arg. Prod. Anim. 24(3-4): 137-163.
- GAGLIOSTRO, G. 2004c. Control nutricional del contenido de ácido linoleico conjugado (CLA) en leche y su presencia en alimentos naturales funcionales. 3. producción de leche alto CLA a través de la suplementación estratégica de la cabra. Rev. Arg. Prod. Anim. 24(3-4): 165-185.
- GAGLIOSTRO, G.A.; CHILLIARD, Y. 1992a.Utilización de lípidos protegidos en la nutrición de vacas lecheras. I. Efectos sobre la producción y composición de leche, y sobre la ingestión de materia seca y energía. Rev. Arg. Prod. Anim. 12(1): 1-15.
- GAGLIOSTRO, G.A.; CHILLIARD, Y. 1992b. Revisión bibliográfica. Utilización de lípidos protegidos en nutrición de vacas lecheras. II. Efectos sobre la concentración plasmática de metabolitos y hormonas, movilización de lípidos corporales y actividad metabólica del tejido adiposo. Rev. Arg. Prod. Anim. 12 (1):17-32.
- GAGLIOSTRO, G.A.; CHILLIARD, Y.; DAVICCO, M.J. 1991. Duodenal rapeseed oil infusion in early and mid lactation cows. 3. Plasma hormones and mammary apparent uptake of metabolites. J. Dairy Sci.74: 1893-1903.
- GAMA, M.A.S.; GARNSWORTHY, P.C.; GRIINARI, J.M.; LEME, P.H.M.; RODRIGUES, H.M.; SOUZA, L.W.O.; LANNA, D.P.D. 2008. Diet- induced milk fat depression: Association with changes in milk fatty acid composition and fluidity of milk fat. Livest Sci. 115(2-3); 319-331.
- GARNSWORTHY P.C. 1997. Fats in dairy cow diets. In: Cole, D.J.A. (ed.). Recent Advances in Animal Nutrition, Nottingham University Press: Nottingham, UK, pp 87–13,
- GAULLIER, J.M.; HALSE, J.; HOYE, K.; KRISTIANSEN, K.; FAGERTUN, H.; VIK, H.; GUDMUNDSEN, O. 2005. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. J. Nutr.135: 778-784.
- GAULLIER, J.M.; HALSE, J.; HOYE, K.; KRISTIANSEN, K.; FAGERTUN, H.; VIK, H. Y GUDMUNDSEN, O. 2004. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. Am J Clin Nutr. 79: 1118-1125.

- GEAY, Y.; BAUCHART, D.; HOCQUETTE, J.F.; CULIOLI, J. 2002. Valeur diététique et qualités sensorielles des viands de ruminants. Incidence de L'alimentación des animaux= Nutritive value and sensorial qualities of ruminat meat. INRA productions Animales 15: 37-52.
- GLASSER, F.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. 2008. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a Meta-Analysis. J. Dairy Sci. 91:4687-4703.
- GÓMEZ-CORTÉS, P.; TORAL, P.G.; FRUTOS, P.; JUÁREZ, M.; DE LA FUENTE, M.A.; HERVÁS, G. 2011. Effect of the supplementation of dairy sheep diet with incremental amounts of sunflower oil on animal performance and milk fatty acid profile. Food Chem. 125: 644-651. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.09.053.
- GÓMEZ-CORTÉS, P. 2010. Efecto de la suplementación de la dieta ovina con distintas fuentes lipídicas sobre el perfil de ácidos grasos de la leche. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Química Física I. 233p.
- GÓMEZ-CORTÉS, P.; FRUTOS, P., MANTECÓN, A.R., JUÁREZ, M. DE LA FUENTE, M.A.; HERVÁS, G. 2008. Milk Production, Conjugated Linoleic Acid Content, and In Vitro Ruminal Fermentation in Response to High Levels of Soybean Oil in Dairy Ewe Diet. J. Dairy Sci. 91:1560-1569.
- GONZÁLEZ, M.; SAIN, J.; SCALERANDI, M.V.; PORTILLO BAQUEDANO, M.P. Y BERNAL, C. 2010. Efectos de la interacción de los ácidos grasos trans (AGt) con dietas ricas en diferentes ácidos grasos insaturados (AGI) sobre la lipogénesis y β -oxidación hepática en animales de experimentación. Nutrición Hospitalaria, 25 (Supl.1):135
- GRIINARI J.M.; BAUMAN D.E. 2006. Milk fat depression: concepts, mechanisms and management applications. In: Sjerssen, K. et al (eds.). Ruminant physiology: digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Wageningen Academic Publishers, Holanda. pp. 389-417
- GRIINARI, J.M.; BAUMAN, D.E.; CHILLIARD, Y.; PARAJOKI, P.; NURMELA, K.W. 2000. Dietary influences on conjugated linoleic acid in bovine milk fat. Abstracts. 3^o. Meeting of the European Section of AOCS. June 18-21. Helsinki. p. 87.
- GRIINARI, J.M.; BAUMAN, D.E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecz, M.P. et al. (eds.) Advances in conjugated linoleic acid research. AOCS Press, pp 180-200.
- GRUMMER, R. R. 1991. Effect of feed on the composition on milk fat. J. Dairy Sci. 74: 3244-3257.
- HAMILTON, M.; HOPKINS, L.E. ALZAHAL, O.; MACDONALD, T. L.; CERVONE, D. T.; WRIGHT, D. C.; MCBRIDE, B. W.; DYCK, D. J. 2015. Feeding butter with elevated content of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid to obese-prone rats impairs glucose and insulin tolerance Lipids in Health and Disease. 14:119.
- HARTOOF, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. 1997. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N.; Stewart, C.S. (eds.). The rumen microbial ecosystem Chapman and Hall, London, UK. pp.382-426.

- HARTOOF, C.G.; NOBLE, R. C.; MOORE, J. H. 1973. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms in vitro. *J. Sci. Food Agric.* 24:961–970.
- HARVATINE, K.; BAUMAN, D.E. 2006. SREBP1 and Thyroid Hormone Responsive Spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced fat depression and treatment with CLA. *J Nutr.*; 136: 2468-2474.
- HASLER, C. M.; BROWN, A. C. 2009. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *J. Am. Diet. Assoc.*, 109(4): 735-45.
- HAUNER, H.; PETRUSCHKE, T.; RUSS, M.; ROHRIG, K.; ECKEL, J. 1995 Effects of tumour necrosis factor alpha (TNF alpha) on glucose transport and lipid metabolism of newly-differentiated human fat cells in cell culture. *Diabetologia* 38 764–771.
- HERBEL, B.K.; MCGUIRE, M.K.; MCGUIRE, M.A.; SHULTZ, T. D. 1998. Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:332-337.
- HERVÁS, G.; LUNA, P.; MANTECÓN, A.R.; CASTAÑARES, N.; DE LA FUENTE, M.A.; JUÁREZ, M.; FRUTOS, P. 2008. Effect of diet supplementation with sunflower oil on milk production, fatty acid profile and ruminal fermentation in lactating dairy ewes. *J. Dairy Res.* 75:399-405.
- HORNECK, A. D.; MILLER, R. O. 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. In: Karla, Y. P. (ed.). *Handbook of reference Methods of Plants Analysis* CRC. Press. pp. 75-83.
- HU, F. B.; MANSON, J. E.; WILLET, W. C. 2001. Types of dietary fat and risk coronary heart disease: a Critical review. *J. Am. Coll. Nutr.* 20 (1): 5-19.
- HUANG, Y.; SCHOONMAKER, J.P.; BRADFORD, B.J.; BEITZ, D.C. 2008. Response of milk fatty acid composition to dietary supplementation of soy oil, conjugated linoleic acid, or both. *J. Dairy Sci.* 91: 260–270.
- HURTAUD, C.; FAUCON, F.; COUVREUR, S.; PEYRAUD, J.L. 2010. Linear relationship between increasing amounts of extruded linseed in dairy cow diet and milk fatty acid composition and butter properties. *J. Dairy Sci.* 93: 1429–1443.
- HUSTED, K. S.; BOUZINOVA, S. V. 2016. The importance of n-6/n-3 fatty acids ratio in the major depressive disorder. *Review. Medicina* 52 .139 – 147
- HUTH, J.P.; PARK.M.K. 2012. Influence of Dairy Product and Milk Fat Consumption on Cardiovascular Disease Risk: A Review of the evidence. *American Society for Nutrition. Adv. Nutri.* 3:266-285.
- ILLESCA, P. 2015. Incorporación de ácidos grasos *trans* y CLA dietarios en lípidos tisulares y su potencial implicancia metabólica en animales de experimentación. Tesis Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Del Litoral. 224p.

- ILLESCA, P.; GONZÁLEZ, M.; MARTINELLI, M.; WILLINER, M.; BERNAL, C. 2009. Influence of dietary isomeric fatty acids (FA) on bile flow and FA incorporation into liver and bile. *Ann. Nutr. Metab.* 55 (Suppl 1): 280
- IP, M.M., MASSON-WELCH, P.A.; IP, C. 2003. Prevention of mammary cancer with conjugated linoleic acid: Role of the stroma and the epithelium. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 8:103–118.
- IP, C.;BANNI, S.; ANGIONI, E.; CARTA, G.; MCGINLEY, J.; THOMPSON, H.J.; BARBANO, D.; BAUMAN D. 1999. Conjugated linoleic acid-enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* 129:2135-2142.
- IP, C.;SINGH, M.; THMPSON, H.J.; SCIMECA, J.A. 1994. Conjugated linoleic acid suppreses mammary carcinogenesis and proliferative activity on the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* 54, 1212-1215.
- JAVADI, M.; BEYNEN, A.C.; HOVENIER, R.; LANKHORST, A.; LEMMENS, A.G.; TERPSTRA, A.H.; GEELLEN, M.J. 2004. Prolonged feeding of mice with conjugated linoleic acid increases hepatic fatty acid synthesis relative to oxidation. *J. Nutr. Biochem.* 15: 680-687.
- JENKINS T.C.; MCGUIRE M.A. 2006. Major advances in nutrition: impact on milk composition. *J. Dairy Sci.* 89, 1302–1310.
- JENKINS, T.C. 1994. Feeding fat to dairy cattle, In: *Proceedings of the Dairy Herd Management Conference, University of Georgia, Athens, CA*.pp. 100-109
- JENKINS, T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76, 3851-3863.
- JENSEN, R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January1995 to December. *J. Dairy Sci.* 85, 295–350.
- KELLEY, N.S.; HUBBARD, N.E.; ERICKSON, K. 2007. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *J. Nutr.* 137 (12), 2599–2607.
- KELLY, G.S. 2001. Conjugated linoleic acid: a review. *Altern. Med. Rev.* 6: 367-382.
- KELLY, M.L.; BERRY, J.R.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; VAN AMBURGH, M.E.; BAUMAN, D.E. 1998. Dietary fatty acid sources effect conjugated linoleic acid (CLA) concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.* 128: 881–885.
- KIM, E.J.; HUWS, S.A.; LEE, M.R.F.; WOOD, J.D.; MUETZEL, S.M.; WALLACE, R.J.; YSCOLLAN, N.D. 2008. Fish Oil Increases the Duodenal Flow of Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids and *trans*-11 18:1 and Decreases 18:0 in Steers via Changes in the Rumen Bacterial Community. *J. Nutr.* 138: 889-896.
- KIM, J. H.; KIM, Y.; KIM, Y. J.; PARK, Y.2016.Conjugated Linoleic Acid: Potential Health Benefits as a Functional Food Ingredient. *Annu.Rev. Food. Sci. Technol.* 7:221-244.

- KOMARECK, A.R.; ROBERTSON, J.B.; VAN SOEST, P.J. 1994. Comparison of the filter bag technique to conventional filtration in the van Soest NDF analysis of 21 feeds. In: Fahey, G.C. (ed.) Proceedings of National Conference on Forage Quality, Evaluation and Utilization, Nebraska University, Lincoln. 13-15 April 1994
- KOMAREK, A.R. 1993. An improved filtering technique for the analysis of neutraldetergent fiber and acid detergent fiber utilizing the filter bag technique. *J. Anim.Sci.* 71:824-829.
- KRITCHEVSKY, D.; TEPPER, S.; WRIGHT, S.; TSO, P.; CZAENECKI, S. 2000. Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progresión of atherosclerosis in rabbits. *J Am Coll Nutr*;(4):472-477.
- KUBY, S.A.; NOLTMANN, E.A. 1966. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from brewers yeast. *Methods Enzymol.*9: 116-117.
- LACAU-MENGIDO, I.M.;MEJÍA, M.E., DÍAZ-TORGA, G.S. Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty. *J. Anim. Sci.* 78:817–824.
- LARSON, S. C.; BERGKVIST, L.; WOLK, A. 2005. Hight- fat dairy food and conjugated linoleic acid intakes in relation to colorectal cancer incidence in the Swedish Mammography cohort. *Am. J. Clin. Nutr.* 82, 894-900.
- LASA, A.; CHURRUCA, I.; SIMON, E.; FERNANDEZ-QUINTELA, A.; RODRIGUEZ, V.M.; PORTILLO, M.P. 2008. *Trans*-10, *cis*-12-conjugated linoleic acid does not increase body fat loss induced by energy restriction. *Br. J. Nutr.*100: 1245-1250.
- LAURELL S. 1966. A method for rutine determination of plasma triglycerides. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18: 668-672.
- LEAVER, J.D. 1985. *Herbage intake handbook*. British Grassland Society, Hurley 143 p.
- LEE, K.N.; PARIZA, M.W.; NTAMBI, J.M. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem Biophys Res Commun.*248: 817-821.
- LEE K.N.; KRITCHEVSKY, D.; PARIZA, M. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis*;108:19-25.
- LEFFLER, H. 1959. Estimation of cholesterol in serum. *Am. J. Clin. Pathol.*31: 310-313.
- LEGRAND, P.; BOURRE, J.M.; DESCOMPS, B.; DURAND, G.; RENAUD, S. 2001. *Apports nutritionnels conseillés pour la population française*. 3éme éd, Martin, A. Technique et documentation. Reproduction Nutrition Development, EDP Sciences, 41 (2), pp.119-128.
- LIEN, E. L.; BOYLE, F. G.; WRENN, J. M.; PERRY, R. W.; THOMPSON, C. A.; BORZELLECA, J. F. 2001. Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: a 13-week study in rats. *Food Chem Toxicol.* 39: 385-92.

- LIN, Y.; SCHUURBIERS, E.; VAN DER VEEN, S.; DE DECKERE, E.A. 2001. Conjugated linoleic acid isomers have differential effects on triglyceride secretion in Hep G2 cells. *Biochim Biophys Acta*.1533: 38-46.
- LIN, Y.; KREEFT, A.; SCHUURBIERS, J.A. Y DRAIJER, R. 2001. Different effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem*.12: 183-189.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*25:402-408.
- LOCK, A.L.; TYBURCZY, C.; DWYER, D.A.; HARVATINE, K. J.; DESTAILLATS, F.; MOULOINGUI, Z.; CANDY, L.; BAUMAN, D. E. 2007 .Trans-10 Octadecenoic Acid Does Not Reduce Milk Fat Synthesis in Dairy Cows. *J. Nutr*.137, 71- 76.
- LOCK, A.L; HORNE, C.A.M.; BAUMAN, D.E.; SALTER, A.M. 2005. Butter naturally enriched in CLA and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *J Nutr*. 135: 1934-1939.
- LOCK, A.L.; GARNSWORTHY, P.C.2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and $\Delta 9$ -desaturase activity in dairy cows. *Livest. Prod. Sci*. 79, 47–59
- LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P.C. 2002. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. *Anim. Sci*. 74:163–176.
- LOOR, J.J.; FERLAY, A.; OLLIER, A.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. 2005. Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and lindseed oil. *J. Dairy Sci*. 88: 726-740.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*.193: 265-275.
- LUTZ, O.; LAVE, T.; FREY, A.; MERAIHI, Z.; BACH, A.C. 1989. Activities of lipoprotein lipase and hepatic lipase on long- and medium-chain triglyceride emulsions used in parenteral nutrition. *Metabolism*.38: 507-513.
- LYNEN, F. 1969. Yeast fatty acid synthase. *Methods Enzymol*.14: 14-17.
- MACARULLA, M.T.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; ZABALA, A.; NAVARRO, V.; ECHEVARRÍA, E.; CHURRUCA, I.; RODRÍGUEZ, V.M.; PORTILLO, M.P. 2005. Effects of conjugated linoleic acid on liver composition and fatty acid oxidation are isomer-dependent in hamster. *Nutrition*.21: 512-519.
- MAIJALA, K. 2000. Cow milk and human development and well-being. *Livest. Prod. Sci*. 65(1-2): 1-18.
- MANDEBVU, P.; BALLARD, C.S.; SNIFFEN, C.J.; CARTER, M.P.; WOLFORD, H.M.; SATO, T.; YABUUCHI, Y.; BOLCK, E.; PALMQUIST, D.L. 2003. Effect of feeding calcium salts of long-chain fatty acids, from palm fatty acid distillate or soybean oil, to high producing dairy cows on milk yield and composition, and on selected blood and reproductive parameters. *Anim. Feed Sci. and Tech*. 108:25-41.

- MARITANO, M.; OXLEY, R.; FERNANDEZ, A.M. 1987. Composición y variaciones estacionales de leches crudas provenientes de los tambos de la cuenca de Lincoln, Industria lechera 65 (688):4-14
- MARTIN B.; VERDIER-METZ I.; BUCHIN, S.; HURTAUD, C.; COULON J.B. 2005. How do the nature of forages and pasture diversity influence the sensory quality of dairy livestock products. *Anim. Sci* 81:205 - 212. DOI: 10.1079/
- MARTIN, C.; ROUEL, J.; JOUANY, J.P.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. 2008. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil.. *J. Anim. Sci.* 86:2642.
- MARTIN, J.C.; GREGOIRE, S.; SIESS, M.H.; GENTY, M.; CHARDIGNY, J.M.; BERDEAUX, O.; JUANEDA, P.; SEBEDIO, J.L. 2000. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid-metabolizing enzymes in male rats. *Lipids*.35: 91-98.
- MARTÍNEZ DEL OLMO, D. 2012. Suplementación de las raciones para vacas lecheras de alta producción con aceites de origen vegetal: rendimientos productivos y reproductivos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Departamento de Producción Animal.122p.
- MARTÍNEZ MARÍN; A. L.; NÚÑEZ SÁNCHEZ, N.; GARZÓN SIGLER, A.I.; PEÑA BLANCO, F.; DOMENECH GARCÍA, V.; HERNÁNDEZ RUIPÉREZ, F. 2015. Metaanálisis del uso de semillas y aceites en la dietade ovejas y cabras. *Pesq. Agropec. Bras.*.50(9):821-828.
- MARTÍNEZ MARÍN, A.L.; PÉREZ HERNÁNDEZ, M.; PÉREZ ALBA, L.M.; GOMEZ-CASTRO, G.; CARRIONPARDO, D.2011. Efecto de las fuentes de grasa sobre la digestión de la fibra en los rumiantes. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*,12:1. 22,
- MARTÍNEZ, M.G. 2010. Modulación de la composición en ácidos grasos de la leche bovina y caprina a través de la suplementación con soja y aceite de pescado. Tesis Magister Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar de Plata, Argentina. 130 p.
- MARTINS, S.V.; LOPES, P.A.; ALFAIA, C.M.; RODRIGUES, P.O.; ALVES, S.P.; PINTO, R.M.; CASTRO, M.F.; BESSA, R.J.; PRATES, J.A. 2010. Serum adipokine profile and fatty acid composition of adipose tissues are affected by conjugated linoleic acid and saturated fat diets in obese Zucker rats. *Br. J. Nutr.*103: 869-878.
- MASSON, L.; ALFARO, T.; CAMILO, C.; CARVALHO, A.; ILLESCA, P.; TORRES, R.; TAVARES DO CARMO, M.; MANCINI-FILHO, J.; BERNAL, C. 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 y Aceites* 66. e064. <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0692141>
- MCRAE, J.E.; ARMSTRONG, D.G. 1968. Enzyme method for determination of alpha-linked glucose polymers in biological materials. *J. Sci. Food Agric.* 19: 578-581
- MEIJS, J.A.C.; WALTERS R.J.K.; KEEN, .A. 1982. Sward methods. In: Leaver, J.D. *Herbage intake handbook*. British Grassland Society:Maidenhead, pp 11-36.

- MEJÍA, M.E.; GONZÁLEZ-IGLESIAS, A.; DÍAZ-TORGA G.S. 1999. Effects of continuous ivermectin treatment from birth to puberty on growth and reproduction in dairy heifers. *J Anim Sci*; 77: 1329–1334.
- MELE, M.; CONTARINI, G.; CERCACI, L.; SERRA, A.; BUCCIONI, A.; POVOLO, M.; CONTE, G.; FUNARO, A.; BANNI, S.; LERCKER, G.; SECCHIARI, P. 2011. Enrichment of Pecorino cheese with conjugated linoleic acid by feeding dairy ewes with extruded linseed: effect on fatty acid and triglycerides composition and on oxidative stability. *Int. Dairy J.* 21, 365-372. DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.12.015.
- MENSINK, R. P.; ZOCK, P. L., KESTER, A.D.M.; KATAN, M.B. 2003. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 1146–1155.
- MENSINK, R.P. 2002. Trans fatty acids: state of the art. *Sci. Aliments*, 22. 365-369.
- MENSINK, R.P., 1994. Effects of monounsaturated fatty acids on serum lipoproteins. In: Serrano Rios, M. (ed.). *Proceedings 1st World Congress. Dairy Products in Human Health & Nutr*, pp. 337–342.
- MENSINK, R.P.; KATAN M.B. 1990. Effect of dietary trans fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. *N Engl J Med* 323:439-445.
- MERSMANN, H.J. 2002. Mechanisms for conjugated linoleic acid-mediated reduction in fat deposition. *J. Anim. Sci.* 80: 126-134.
- MILNER, J. 1999. Functional foods and health promotion. *J. Nutr.* 129(7): 1395S-1397s.
- MINSON, D.J. 1990. Forage in ruminant nutrition. Academic Press Inc., San Diego, California, pp. 153-221
- MIRANDA, J.; CHURRUCA, I.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; RODRÍGUEZ, V.M.; MACARULLA, M.T.; SIMÓN, E.; PORTILLO, M.P. 2009. Weak effect of trans-10, cis-12-conjugated linoleic acid on body fat accumulation in adult hamsters. *Br. J. Nutr.* 102: 1583-1589.
- MITCHELL, P.; LANGILLE, M. A.; CURRIE, D. L.; MC LEOD, R. S. 2005. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipoproteins and atherosclerosis in the Syrian Golden Hamster. *Biochim Biophys Acta*; 1734:269-276.
- MOCCHIUTTI, N. O.; BERNAL, C.A. 1997. Effects of chronic di(2-ethylhexyl) phthalate intake on the secretion and removal rate of triglyceride-rich lipoproteins in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 35: 1017-1021.
- MORAND-FEHR, P.; CHILLIARD, Y.; BAS, P. 1986. Répercussions de l'apport de matières grasses dans la ration sur la production et la composition du lait de ruminant. *Bull. Tech. C.R.Z.V. INRA* 64: 59-72.

- MORRIS, L.D.1948. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 107:254-255.
- MOUGIOS, V.; MATSAKAS, A.; PETRIDOU, A.; RING, S.; SAGREDOS, A.; MELISSOPOULOU, A.; TSIGILIS, N.; NIKOLAIDIS, M. 2001. Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *J. Nutr. Biochem.*12: 585-594.
- MOYA-CAMARENA, S.Y.; BELURY, M.A. 1999: Species differences in the metabolism and regulation of gene expression by conjugated linoleic acid. *Nutr Rev* 57, 336-340.
- MOYA-CAMARENA, S.Y.; VANDEN HEUVEL, J.P.; BLANCHARD, S.G.; LEESNITZER, L. A.; BELURY, M. A. 1999: Conjugated linoleic acid is a potent naturally occurring ligand and activator of PPAR-alpha. *J Lipid Res* 40, 1426-1433.
- MOZAFFARIAN, D.; WU, J.H. 2012. (n-3) fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J. Nutr.* 142(3):614S-25S.
- MOZAFFARIAN, D.; KATAN, M. B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C.; FOOD, T. 2006. Trans Fatty Acids and Cardiovascular Disease. *New Engl J Med.* 1601-1613.
- MUNDAY J.S.; THOMPSON K.G.; JAMES, K.A.C. 1999. Dietary conjugated linoleic acid promote fatty streak formation in C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br. J Nutr;* 81:251-255.
- MUSHTAQ, S.; HEATHER MANGIAPANE, E.; HUNTER, K. A. 2010. Estimation of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid content in UK foods and assessment of dietary intake in a cohort of healthy adults. *Br. J. Nutr.* 103:1366-1374.
- NAGAO, K.; HIGA, K.; SHIROUCHI, B.; NOMURA, S.; INOUE, N.; INAFUKU, M.; YANAGITA, T. 2008. Effect of *Vaccinium ashei* reade leaves on lipid metabolism in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 1619-1622.
- NAGAO, K.; INOUE, N.; WANG, Y.M.; SHIROUCHI, B. Y YANAGITA, T. 2005. Dietary conjugated linoleic acid alleviates nonalcoholic fatty liver disease in Zucker (fa/fa) rats. *J. Nutr.* 135: 9-13.
- NAHUM, M.; MARÍN, M.; RÍOS, C.; MELÉNDEZ, P. 2016. Perfil de ácidos grasos lácteos en vacas lecheras postparto alimentadas con soiling o ensilaje de alfalfa bajo sistema de confinamiento. *Arch Med Vet.* 48, 29-36.
- NESTEL, P.J.; POYSER, A.; HOOD, R.L.; MILLS, S.C.; WILLIS, M.R.; COOK, L.J. AND SCOTT, T.W. 1978. The effect of dietary fat supplements on cholesterol metabolis in ruminants. *J. Lipid Res.* 19: 899-909.
- NICOLOSI, R. J.; ROGERS, E.J.; KRITCHEVSKY, D.; SCIMECA, J. A. 1997. Huth PJ. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery*22:266–277.

- NOONE, E.J.; ROCHE, H.M.; NUGENT, A.P.; GIBNEY, M.J. 2002. The effect of dietary supplementation using isomeric blends of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in healthy Br J Nutr88(3):243-51
- NUDDA, A.; BATTACONE, G.; BOAVENTURA NETO, O.; CANNAS, A.; FRANCESCONI, A.H.D.; ATZORI, A.S.; PULINA, G. 2014. Feeding strategies to design the fatty acid profile of sheep milk and cheese. Rev. Bras. Zootec., 43:445-456. DOI: 10.1590/S1516-35982014000800008.
- ONETTI, S.G.; GRUMMER, R.R. 2004. Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: A metaanalysis of literature. Anim. Feed Sci. Technol. 115:65–82.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2012. Grasas y ácidos grasos en nutrición humana: consulta de expertos 10 - 14 de Noviembre de 2008. FAO, FINUT: Granada, España. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N°91, pp. 59-65.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 2012. Enfermedades Cardiovasculares. Informe de un grupo científico de la OMS. Ginebra: OMS. Hoja de hechos: 317
- ORTEGA PEREZ, R. 2012. Perfil de ácidos grasos en forrajes alternativos para la alimentación de bovinos en ecosistemas áridos y perfil de ácidos grasos en la leche de vacas de distintos grupos raciales en diferentes sistemas de alimentación. Tesis de doctorado. Centro de investigaciones biológicas del Noroeste. México. 99 p.
- OTWAY, S.; ROBINSON, D.S. 1967. The use of a non-ionic detergent (Triton WR 1339) to determine rates of triglyceride entry into the circulation of the rat under different physiological conditions. J Physiol.190: 321-332.
- PALMQUIST, D. L.;GRIINARI, J. M. 2006. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oil in the diet. Anim. Feed Sci. Technol. .131: 358-369.
- PALMQUIST, D.L.; LOCK, A.L.; SHINGFIELD, K.J.; BAUMAN, D.E. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. Adv. Food Nutr. Res. 50:179–217.
- PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. J. Dairy Sci. 76:1753–1771.
- PAMLMQUIST, D. L. 1984. Use of fats in diets for lactating dairy cow. Fat in animal nutrition. Butterworths, London. pp. 357-381.
- PANTOJA, J.; FIRKINS, J.L.; EASTRIDGE, M.L. 1996. Fatty acid digestibility and lactation performance by dairy cows fed fats varying in degree of saturation. J. Dairy Sci. 79: 429-437.
- PARIZA, M. W. 2002. Conjugated linoleic acid may be useful in treating diabetes by controlling body fat and weight gain. Diabetes Technol. Ther. 4:335–338.

- PARIZA, M.W. 1999. The biological activities of conjugated linoleic acid. In: Yurawecz, M.P. et al (eds.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. AOCS Press, Champaign, IL, pp 12-20.
- PARIZA, M.W.; HARGRAVES, W.A. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis*. 6:591-593.
- PARK, Y.; STORKSON, J.M.; LIU, W.; ALBRIGHT, K.J.; COOK, M.E.; PARIZA, M.W. 2004. Structure-activity relationship of conjugated linoleic acid and its cognates in inhibiting heparin-releasable lipoprotein lipase and glycerol release from fully differentiated 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* 15: 561-568.
- PARK, Y.; PARIZA, M.W. 2001. The effects of dietary conjugated nonadecadienoic acid on body composition in mice. *Biochim Biophys Acta*. 1533: 171-174.
- PARK, Y.; MCGUIRE, M.K.; BEHR, R.; MCGUIRE, M. A.; EVANS, M. A.; SHULTZ, T. D. 1999. High-fat dairy product consumption increases δ 9c,11t-18:2 (rumenic acid) and total lipid concentrations of human milk. *Lipids* 34:543-549.
- PARODI, P. W. 2004. Milk Fat in Human Nutrition. *Aust. J. Dairy Technol.* 59:3-59
- PARODI, P.W. 2003. Conjugated linoleic acid in food. In: Sebedio, J.L. et al (eds.). *Advances in Conjugated Linoleic Acid in Food*. AOCS Press, Champaign, Illinois. pp 101-122.
- PARODI, P.W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 82, 1339-1349.
- PETRIDOU, A.; MOUGIOS, V.; SAGREDOS, A. 2003. Supplementation with CLA: isomer incorporation into serum lipids and effect on body fat of women. *Lipids*. 38: 805-811.
- PETRUSCHKE, T.; HAUNER, H. 1993. Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *J. Clin. Endocrinol met.* 76. 742-747.
- PINTUS, S.; MURRU, E.; CARTA, G. CORDEDDU, L.; BATETTA, B.; ACCOSSU, S.; PISTIS, D.; UDA, S.; GHIANI, M. E.; MELE, M.; SECCHIARI, P.; ALMERIGHI, G.; PINTUS, P.; BANNI, S. .2013 Sheep cheese naturally enriched in α -linolenic, conjugated linoleic and vaccenic acids improves the lipid profile and reduces anandamide in the plasma of hypercholesterolaemic subjects. *Br. J. Nutr.* 109, 1453-1462.
- PIPEROVA, L.L.; TETER, B.B.; BRUCKENTAL, I.; SAMPUGNA, J.; MILLS S.E.; YURAWECZ, M.P.; FRITSCH, J.; JU, K.; ERDMAN, R.A. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated fatty acids are altered in lactating dairy cows fed a milk-fat depressing diet. *J. Ntr.* 130: 2568-2574.
- PIRES, J.A.A.; PESCARA, J. B.; BRICKNER, A. E.; SILVA DEL RIO, N.; CUNHA, A. P.; GRUMMER, R.R. 2008. Effects of Abomasal Infusion of Linseed Oil on Responses to Glucose and Insulin in Holstein Cows. *Dairy Sci.* 91:1378-1390 doi:10.3168/jds.2007-0714.

- PIRISI, A.; LAURET, A.; DUBEUF, J.P. 2007. Basic and incentive payments for goat and sheep milk in relation to quality. *Small Ruminant Res.* 68:167-178. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.009.
- POIRIER, H.; NIOT, I.; CLÉMENT, L.; GUERRE-MILLO, M.; BESNARD, P. 2005. Development of conjugated linoleic acid (CLA)-mediated lipotrophic syndrome in the mouse. *Biochimie*.87: 73-79.
- POIRIER, H.; ROUAULT, C.; CLEMENT, L.; NIOT, I.; MONNOT, M.C.; GUERRE-MILLO, M.; BESNARD, P. 2005. Hyperinsulinaemia triggered by dietary conjugated linoleic acid is associated with a decrease in leptin and adiponectin plasma levels and pancreatic beta cell hyperplasia in the mouse. *Diabetologia*.48: 1059-1065.
- POPPIT, S.D.; KEOGH, G.F.; MULVEY, T.B.; MCARDLE, B.H.; MACGIBBON, A.K.H.; COOPER G.J.S. 2002. Lipid-lowering effects of a modified butter fat: a controlled intervention trial in healthy men. *Europ. J. Clin. Nutr.* 56, 64-71.
- PRIETO, N.; BODAS, R.; LÓPEZ-CAMPOS, O.; ANDRÉS, S.; LÓPEZ, S.; GIRÁLDEZ, F.J.. 2014. Effect of sunflower oil supplementation and milking frequency reduction on sheep milk production and composition. *J. Anim. Sci.* 2013.91:446–454. doi:10.2527/jas2012-5187.
- PURUSHOTHAM, A.; SHRODE, G.E.; WENDEL, A.A.; LIU, L.F.; BELURY, M.A. 2007. Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats. *J. Nutr. Biochem.*18: 676-684.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C., Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.*123: 1939-1951.
- REGO, O. A.; ALVES, S. P.; ANTUNES, L. M. S.; ROSA, H.J.D.; ALFAIA, C.F.M., PRATES, J.A.M.; CABRITA, A.R.J.; FONSECA, A.J.M.; BESSA, R.J.B. 2009. Rumen biohydrogenation-derived fatty acids in milk fat from grazing dairy cows supplemented with rapeseed, sunflower, or linseed oils. *J. Dairy Sci.* 92:4530–4540.
- REGO, O.A.; ROSA, H.J.D.; PORTUGAL, P.; CORDEIRO, R.; BORBA, A.E.S.; VOUZELA, C.M., BESSA, R.J.B. 2005. The effects of supplementation with sunflower and soybeans oils on the fatty acid profile of milk fat from grazing dairy cows. *Anim. Res.* 54, 17-24.
- REYES, M.; HEREDIA, J.; CAMPODÓNICO, S.; DRAGO, J.; ALVARADO, O. 2008. Registro nacional de infarto de miocardio agudo (RENIMA). *Rev. Peru. Cardiol;* 34(2):85-99.
- RIBEIRO, C.V. M.; EASTRIDGE, L.; FIRKINS, J. L.; ST-PIERRE, N. R.; PALMQUIST, D. L. 2007. Kinetics of fatty acid biohydrogenation in vitro. *J Dairy Sci;* 90:1405–1416.
- RISERUS, U.; ARNER, P.; BRISMAR, K.; VESSBY, B. 2002. Treatment with dietary *trans*10*cis*12 conjugated linoleic acid causes isomer-specific insulin resistance in obese men with the metabolic syndrome. *Diabetes Care.* 25:1516–21

- RITZENTHALER, K.L.; MCGUIRE, M. K.; FALEN, R.; SHULTZ, T.D.; DASGUPTA, N.; MCGUIRE, M.A. 2001. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate methodology. *J. Nutr.* 131:1548–54.
- RIZZO, M.; BERNEIS, K. 2006. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *Q J Med*; 99:1-14.
- ROCHE, H.M.; NOONE, E.; SEWTER, C.; MC BENNETT, S.; SAVAGE, D.; GIBNEY, M.J.; O'RAHILLY, S.; VIDAL-PUIG, A.J. 2002. Isomer-dependent metabolic effects of conjugated linoleic acid: insights from molecular markers sterol regulatory element-binding protein-1c and LXRA α . *Diabetes*.51: 2037-2044.
- ROLDÁN, C.; CAMPO, C.; SEGURA, J.; RUILOPE, L. 2005. Evaluación del riesgo cardiovascular y nuevos factores de riesgo de aterosclerosis. *Hipertensión y Riesgo Vascular*; 22(5):195-203.
- ROSAS, M.; ATTIE, F. 2007. Enfermedad cardiovascular. Primera causa de muerte en adultos de México y el mundo. *Arch Cardiol Mex*; 77(2):91-93.
- ROSS, R. 1999. Atherosclerosis – An Inflammatory Disease. *N Eng J Med*; 340(2):115-126.
- ROY, A.; CHARDIGNY, J.M.; BAUCHART, D.; FERLAY, A.; LORENZ, S.; DURAND, D.; DUFFART, D.; FAULCONNIER, Y.; SÉBÉDIO, J.L.; CHILLIARD, Y. 2007. Butters rich either in trans-10-C18:1 or in trans-11-C18:1 plus cis-9-trans11 CLA differentially affect plasma lipids and aortic fatty streak in experimental atherosclerosis in rabbits. *Animal*, 1(3): 467-476.
- RUIZ ARBOLEDA, J.L.; URIBE-VELÁSQUEZ, L.F.; OSORIO, J.H. 2011. Factor de crecimiento semejante a insulina tipo 1 (IGF-1) en la reproducción de la hembra bovina. *Vet. Zootec.* 5(2): 68-81.
- TRUMBO, P.; SCHLICKER, S.; YATES, A.A.; POOS, M. 2002. Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc.*102(11):1621-30
- SAÍN, J.; GONZÁLEZ, M.; LASA, A.; BERNAL, C.; PORTILLO, M. 2012. Effects of *trans* fatty acids on liver lipid metabolism in mice fed on diets showing different fatty acid composition. *Ann Nutr Metab*;62(3):242-9. doi: 10.1159/000339453.
- SAÍN, J.; GONZÁLEZ, M.; SCALERANDI, M.V.; BERNAL, C. 2011. Incorporación e interconversión de Ácidos Grasos trans vaccénico y eláidico en ratones alimentados con diferente perfil de Ácidos Grasos. *INVENIO. Revista de Investigación Académica. Universidad del Centro Educativo Latinoamericano.* 26 (Supl. esp.): 34,
- SAIN, J.; SCALERANDI, M.V.; GONZÁLEZ, M.; FARIÑA, A.; BERNAL, C. 2009. Effect of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity in mice fed with different source of dietary fat. *Ann. Nutr. Metab.* 55 (Suppl 1): 166, P1-02.

- SALADO, E. E.; GAGLIOSTRO, G. A.; BECU-VILLALOBOS, D.; LACAUMENGIDO, I. . 2004. Partial replacement of corn grain by hydrogenated oil in grazing dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 87: 1265-1278.
- SAMPELAYO, M.R.S.; CHILLIARD, Y.; SCHMIDELY, P.; BOZA, J. 2007. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res.* 68, 42-63. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2006.09.017.
- SCALERANDI, M.V.; GONZALEZ, M.A.; SAIN, J.; FARINA, A.C.; BERNAL, C.A. 2014. Effect of conjugated linoleic acid mixtures and different edible oils in body composition and lipid regulation in mice. *Nutr. Hosp.* 29: 591-601.
- SCALERANDI, M.V. 2013. Interacciones bioquímico-nutricionales del c9,t11-CLA y de la mezcla de c9,t11-CLA + t10,c12-CLA con aceites ricos en ácidos grasos insaturados de las series n-3, n-6, y n-9 en animales de experimentación. Tesis Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Del Litoral. 184p.
- SCALERANDI, V.; SAÍN, J.; GONZÁLEZ, M.; FARIÑA, A.; BERNAL, C. 2009. Efecto diferencial de c9,t11-CLA y mezcla de c9,t11-CLA + t10,c12-CLA sobre lípidos corporales y tisulares en animales de experimentación. *Revista Chilena de Nutrición*, 36 (Supl. 1): 526
- SCHNEIDER, C.L.; COWLES, R.L.; STUEFER-POWELL, C.L.; CARR, T.P. 2000. Dietary stearic acid reduces cholesterol absorption and increases endogenous cholesterol excretion in hamsters fed cereal-based diets. *Am. Soc. for Nutr. Sci.*, 1232-1238.
- SCHREZENMEIR, J.; JAGLA, A. 2000. Milk and diabetes. *J Am Coll Nutr.* 19(2): 176:190.
- SCHROEDER, G.F.; GAGLIOSTRO, G.A. 2007. Partial replacement of corn grain with calcium salts of fatty acid in the concentrate fed to grazing primiparous and multiparous dairy cows. *New Zealand J. Agric. Res.* 50 : 437-449.
- SCHROEDER, G.F.; GAGLIOSTRO, G.A.; BARGO, F.; DELAHOY, J.E.; MULLER, L.D. 2004. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livest. Prod. Sci.* 86:1-18.
- SCHROEDER, G. F.; GAGLIOSTRO, G.A.; BECU-VILLALOBOS, D.; LACAUMENGIDO, I. .2002. Supplementation with partially hydrogenated oil in grazing dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 85:580-594.
- SERRANO RIOS, M.; SASTRE GALLEGO, A.; COBO SANZ, J.M. 2005. Tendencias en alimentación funcional. Instituto Danone. Madrid: You and Us; pp. 1-14.
- SHEN, W.; BALDWIN, J.; COLLINS, B.; HIXSON, L.; LEE, K.T. 2015. Low level of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid decreases adiposity and increases browning independent of inflammatory signaling in overweight Sv129 mice. *J. Nutr. Biochem.* 26:616-25.

- SHEN, W.; CHUANG, C.C.; MARTINEZ, K.; REID, T.; BROWN, J.M. 2013. Conjugated linoleic acid reduces adiposity and increases markers of browning and inflammation in white adipose tissue of mice. *J. Lipid Res.* 54:909- 22.
- SHINGFIELD, K.J.; CHILLIARD, Y.; TOIVONEN, V.; KAIRENIUS, P.; GIVENS, D.I. 2008. Transfatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Adv Exp Med Biol* 606:3-65. doi: 10.1007/978-0-387-74087-4_1.
- SHINGFIELD, K. J.; REYNOLDS, C. K.; HERVAS, G.; GRIINARI, J. M.; GRANDISON, A.S.; YBEEVER, D. E. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89: 714–732.
- SHIRAISHI, R.; IWAKIRI, R.; FUJISE, T.; KUROKI, T.; KAKIMOTO, T.; TAKASHIMA, T.; SAKATA, Y.; TSUNADA, S.; NAKASHIMA, Y.; YANAGITA, T. Y FUJIMOTO, K. 2010. Conjugated linoleic acid suppresses colon carcinogenesis in azoxymethane-pretreated rats with long-term feeding of diet containing beef tallow. *J. Gastroenterol.* 45: 625-635.
- SIRI-TARINO, P.W.; SUN, Q.; HU, F.B. 2010. Saturated fat, carbohydrate, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 535-546
- SIURANA, A.; CALSAMIGLIA, S. 2016. A metaanalysis of feeding strategies to increase the content of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy cattle milk and their impact on daily human consumption. *Anim. Feed Sci. Technol.* 217 13–26.
- SMEDMAN, A.; VESSBY, B. 2001. Conjugated linoleic acid supplementation in humans--metabolic effects. *Lipids*.36: 773-781.
- SMIT, L.A.; BAYLIN, A.; CAMPOS, H. 2010. Conjugated linoleic acid in adipose tissue and risk of myocardial infarction. *Am J Clin Nutr* 2010; 92:34-40.
- SOFI, F.; BUCCIONI, A.; CESARI, F.; GORI, A. M.; MINIERI, S.; MANNINI, L.; CASINI, A.; GENSINI, G. F.; ABBATE, R.; ANTONGIOVANNI, M. 2010. Effects of a dairy product (pecorino cheese) naturally rich in *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid on lipid, inflammatory and haemorheological variables: a dietary intervention study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20:117-124.
- SOLÍS LIMÓN, F. P 2010. Composición química y perfil de ácidos grasos en forrajes resistentes a la sequía. Tesis de grado. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Área de Conocimiento de Ciencias Agropecuarias Departamento Académico de Zootecnia. 56 p.
- STACHOWSKA, E. 2008. Conjugated dienes of linoleic acid and tumorigenesis. *Ann Acad Med Stetin*.54: 122-125.
- STANTON, C.; MURPHY, J.; MCGRATH, E.; DEVERY, R. 2003. Animal feeding strategies for conjugated linoleic acid enrichment of milk. In: Sebedio, J.L. et al. (eds.) *Advances in conjugated linoleic acid in food*. Volume 2. AOCS Press, Champaign, Illinois. pp 123-145.
- STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. 1998. Influence of supplemental fats on reproductive tissue and performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81:856–871.

- STENDER, S.;ASTRUP, A.; DYERBERG, J. 2008. Ruminant an industrially produced trans fatty acids: health aspects. *Food Nutr Res.* DOI.:103402/fnrv5210.1651.
- STORRY, J.E. 1981. The effect of dietary fat on milk composition. In: Heresing, W. (ed.) *Recent advances in animal nutrition*. Butterworths, London, pp,3-33.
- STORRY, J.E.; BRUMBY, P.E.; HALL, A.J.; JOHNSON V.W. 1974. Response of the lactating cow to different methods of incorporating casein and coconut oil in the diet. *J. Dairy Sci.* 57: 61-67.
- SUÁREZ, V. 2004. Lechería ovina y raza pampinta. *IDIA XXI.* 21(7): 194-200.
- SUÁREZ, V.H.; BUSETTI, M.R.1992. Pampinta: Una raza para obtener carne magra y leche. *INTA. EEA Anguil.Circular de extensión.* N° 33
- SUTTON, J.D.; KNIGHT, R.; MCALLAN, A.B.; SMITH, R.H. 1983. Digestion and synthesis in the rumen of sheep given diets supplemented with free and protected oils. *Brit. J. Nutr.* 49: 419-432.
- SWANSON, D.; BLOCK, R.; MOUSA, S.A. 2012. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: HealthBenefits Throughout Life. *American Society for Nutrition. Adv. Nutr.* 3: 1–7.
- TAKAHASHI, Y.; KUSHIRO, M.; SHINOHARA, K.; IDE, T. 2003. Activity and mRNA levels of enzymes involved in hepatic fatty acid synthesis and oxidation in mice fed conjugated linoleic acid. *Biochim Biophys Acta.*1631: 265-273.
- TAKAHASHI, Y.; KUSHIRO, M.; SHINOHARA, K.; IDE, T. 2002. Dietary conjugated linoleic acid reduces body fat mass and affects gene expression of proteins regulating energy metabolism in mice. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*133: 395-404.
- TERPSTRA, A.H.; JAVADI, M.; BEYNEN, A.C.; KOCSIS, S.; LANKHORST, A.E.; LEMMENS, A.G. Y MOHEDE, I.C. 2003. Dietary conjugated linoleic acids as free fatty acids and triacylglycerols similarly affect body composition and energy balance in mice. *J. Nutr.*133: 3181-3186.
- TERPSTRA, A.H.; BEYNEN, A.C.; EVERTS, H.; KOCSIS, S.; KATAN, M.B.; ZOCK, P.L. 2002. The decrease in body fat in mice fed conjugated linoleic acid is due to increases in energy expenditure and energy loss in the excreta. *J. Nutr.*132: 940-945.
- THOLSTRUP, T.; EHNHOLM, C.; JAUHAINEN, M.; PETERSEN, M.; HOY, C.E.; LUND, P.; SANDSTROM, B. 2004. Effects of medium-chain fatty acids and oleic acid on blood lipids, lipoproteins, glucose, insulin, and lipid transfer protein activities. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 564-569.
- TILLEY, J.M.K. AND R.A. TERRY. 1963. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grass Soc.* 18: 104.
- TOOMEY, S.; HARHEN, B.; ROCHE, H. M.; FITZGERALD, D. 2006. Belton O. Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis*187:40-49

- TORAL, P.G.; FRUTOS, P.; HERVÁS, G.; GÓMEZ-CORTÉS, P.; JUÁREZ, M.; DE LA FUENTE, M.A. 2010. Changes in milk fatty acid profile and animal performance in response to fish oil supplementation, alone or in combination with sunflower oil, in dairy ewes. *J. Dairy Sci*, 93:1604-1615. DOI: 10.3168/jds.2009-2530.
- TRICON, S.; BURDGE, G.C.; KEW, S.; BANERJEE, T.; RUSSELL, J.J.; JONES, E.L.; GRIMBLE, R.F.; WILLIAMS, C.M.; YAQOOB, P.; CALDER, P.C. 2004. Opposing effects of cis-9, trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr*.80: 614-620.
- TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; TANEMURA, K.; KIM, H.J.; TANGE, T.; OKUYAMA, H.; KASAI, M.; IKEMOTO, S.; EZAKI, O. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*.49: 1534-1542.
- TURPEINEN, A.M.; MUTANEN, M.; ARO, A.; SALMINEN, I.; BASU, S.; PALMQUIST, D.L.; GRIINARI, J.M. 2002. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am. J. Clin. Nutr*.76: 504–510.
- TYBURCZY, C.; LOCK, A. L.; DWYER, D. A.; DESTAILLATS, F.; MOULOINGUI, Z.; CANDY, L. 2008. Uptake and utilization of trans octadecenoic acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci*, 91, 3850–3861.
- UEDA, K.; FERLAY, A.; CHABROT, J.; LOOR, J. J.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *J. Dairy Sci*. 86:3999–4007.
- ULBRIGHT, T.L.V.; SOUTHGATE, D.A.T. 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet* 338: 985-992.
- VALEILLE, K.; FERZOU, J.; AMSLER, G.; QUIGNARD-BOULANGE, A.; PARQUET, M.; GRIPOIS, D.; DOROVSKA-TARAN, V.; MARTIN, J.C. 2005. A cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid-rich oil reduces the outcome of atherogenic process in hyperlipidemic hamster. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.289: H652-659.
- VEAUTE, C.;ANDREOLI, M.; RACCA, A.; BAILAT, A.; SCALERANDI, M.; BERNAL, C.; MALAN BOREL, I. 2007.Effects of isomeric fatty acids on reproductive parameters in mice. *Am J ReprodImmuno*l 58 487–496.
- VERITÉ, R.; JOURNET, M. 1970. Influence de la teneur en eau et de la deshydratation de l'herbe sur sa valeur alimentaire pour les vaches laitières. *Ann. Zootech*. 10: 269-277.
- VESSBY, B.; SMEDMAN, A.1999. Conjugated linoleic acid (CLA) reduces the body fat content in humans. *Chem Phys Lipids*; 101: AT2/01.
- VICENTE, G.R.; SHELFORD, J.A.; PETERSON, R.G.; KHRISHNAMURTI, C.R. 1984. Effects of feeding canola-*meal-protected tallow or soy-beal-meal-protected tallow in the low-roughage diet of dairy cows in early lactation. *Can. J. Anim. Sci*. 64:81.
- WANG, C.F.; HEGSTED, D.M. 1949. Determination of blood and plasma volumes, thiocyanate space, and bromsulfalein clearance in rats. *Am J Physiol*.156: 227-232.

- WANG, Y. M.; NAGAO, K.; INOUE, N.; UJINO, Y.; SHIMADA, Y.; NAGAO, T.; IWATA, T.; KAMEGAI, T.; YAMAUCHI-SATO, Y.; YANAGITA, T. 2006. Isomer-specific anti-obese and hypolipidemic properties of conjugated linoleic acid in obese OLETF rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 355-362.
- WARD, A. T.; WITTENBERG, K.M.; PRZYBYLSKI, R. 2002. Bovine milk fatty acid profiles produced by feeding diets containing solin, flax and canola. *J. Dairy Sci.* 85:1191–1196.
- WATKINS, B.A.; Li, Y. 2003. CLA in functional food: enrichment of animal products. In: Sébédio, J.L. et al (eds.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid in Food*. Volume 2. AOCS Press, Champaign, Illinois. pp 174-188.
- WEST, D.B.; BLOHM, F.Y.; TRUETT, A.A.; DELANY, J.P. 2000. Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *J. Nutr.* 130: 2471-2477.
- WHITLOCK, L.A.; SCHINGOETHE, D.J.; ABUGHAZALEH, A.A.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.R. 2006. Milk production and composition from cows fed small amountsof fish oil and extruded soybean. *J. Dairy Sci.* 89:3972-3980.
- WHITLOCK, L.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.R.; BAER, R. J.; RAMASWAMY, N.; KASPERSON, K. M.2002. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase CLA in milk of dairy cows more than when fed separately. *J. Dairy Sci.* 85: 234-243.
- WIJENDRAN, V.; HAYES, K. C. 2004. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Rev. Nutr.* 24:597-615.
- WILLIAMS, C. M. 2000. Dietary fatty acids and human health. *Ann. Zootech*, 49:165-180.
- WOLFF, R. L. 1995. Content and distribution of trans 18:1 acids in ruminant milk and meat fats. Their importance in European diets and their effect on human milk. *J. Am. Oil Chem Soc* 72; 259-272.
- WU, Z.; HUBER J.T. 1994. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. *Liv. Prod. Sci.* 39: 141-155.
- YAMASAKI, M.; IKEDA, A.; OJI, M.; TANAKA, Y.; HIRAO, A.; KASAI, M.; IWATA, T.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. 2003. Modulation of body fat and serumleptin levels by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats fed variousfat-level diets. *Nutrition* 19, 30-5.
- YURAWECZ, M. P.; KRAMER, J.K.G.; GUDMUNDSEN, O.; PARIZA, M.W.; BANNI, S. 2006. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Volume 3. AOCS Press: Champaing 256p.
- ZAMBELL, K.L.; KEIM, N.L.; VAN LOAN, M., GALE, B.; BENITO, P.; KELLEY, D.S. 2000. Conjugated linoleic acid supplementation in humans: effect on body composition and energy expenditure. *Lipids*; 35: 777- 782.

ŻBIKOWSKA, A. 2010. Formation and properties of trans fatty acids- A review. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 60: 107-114.

APENDICE

OBTENCION DE GRASA LACTEA FUNCIONAL (GLF) PARA EVALUAR EN ANIMALES DE EXPERIMENTACION

El trabajo se llevó a cabo en el tambo experimental de la E.E.A. del INTA de Rafaela, Provincia de Santa Fe con una duración total de 23 días. Se utilizaron 15 vacas multíparas de raza Holando Argentino en lactancia avanzada (299 ± 69 días postparto) cuyo peso vivo promedio al inicio del ensayo fue de 600 Kg. Los animales fueron alimentados con una pastura base alfalfa (33,6 % de la MS consumida), un concentrado comercial (18,6% de la MS consumida) a base de grano de maíz (70%), expeller de soja (20%), afrechillo de trigo (8%), carbonato calcio (1,2%), sal entrefina (0,7%), núcleo vit-min (0,08%) y monensina (0,02%) y una ración completamente mezclada (RCM). Base MS, la RCM incluyó ensilaje de maíz picado fino (24,6 % de la MS), heno de alfalfa (9,1 %), grano de maíz seco molido (11 %) y pellet de soja (3,1 %). El concentrado (5 kg/vaca/día) y la mezcla de aceites (0,7 kg/vaca/día) fueron suministrados por mitades durante cada turno de ordeño. Previo al suministro de aceites se tomó una muestra individual de leche del ordeño de la mañana (100 ml) y de la tarde (100 ml) durante tres días consecutivos para calcular el perfil de AG inicial promedio. Luego de 14 días de consumo total de aceites se repitió el procedimiento. Las diferencias de concentración para cada AG de la grasa láctea fueron analizadas a través de la prueba T de Student para diferencias apareadas (Inicial- Final para cada vaca). La composición en AG de la leche en el período de pre- y post-suplementación con aceites se presenta en el Cuadro 1. El total de AG hipercolesterolémicos de la leche resultó reducida (-25%) mientras que la concentración del AV fue incrementada (+203 %) lo que explicaría el aumento significativo (+194) en la concentración final del CLA ya que ambos AG correlacionaron positivamente ($r = 0,81$, $p < 0,05$). Los niveles basales del *trans*-10 C18:1 resultaron muy bajos alcanzando niveles superiores aunque inocuos en post suplementación. El índice de aterogenicidad (IA) inicial de la leche fue reducido (-58%) luego de la suplementación practicada. La relación n-6/n-3 basal (2,46) resultó baja y por lo tanto saludable siendo aún menor (2,12- $p < 0,05$) luego del contribución de los aceites. El aporte de 0,7 kg/vaca/día de una mezcla de aceites de soja y de lino (70- 30) resultó una estrategia adecuada a fines de reducir en la leche la presencia de los AG potencialmente aterogénicos asociados a un incremento del riesgo de enfermedades cardiovasculares. La suplementación practicada permitió además aumentar la concentración de CLA, reducir el IA y la

relación n-6/n-3. Tomados en conjunto, los resultados pueden asociarse a la obtención de una GLF reducida en grasa saturada e incrementada en *cis-9 trans-11 C18:2 CLA*.

Cuadro 1. Composición promedio inicial y final en ácidos grasos en leche.

Ácido graso (g/100g del total de AG)	Inicial (1)	Final (1)
C12:0	3,66	2,50*
C14:0	11,16	9,36*
C16:0	29,41	23,52*
<i>trans-10 C18:1</i>	0,37	0,86*
<i>trans-11 C18:1 (AV)</i>	1,55	4,69*
<i>cis-9,trans-11 C18:2 CLA</i>	0,81	2,38*
Índice de aterogenicidad ²	2,56	1,62*
n-6/n-3 ³	2,46	2,12*
AG hipercolesterolémicos ⁴	44,23	35,38*

²Índice de aterogenicidad: $(C12 + 4 \cdot C14 + C16) / (\text{suma de AG insaturados})$, ³ Relación omega6/omega3. ⁴ácidos grasos hipercolesterolémicos (suma de C12:0, C14:0, C16:0)¹. Inicial: concentración basal de cada AG previo suministro de los aceites. Final: concentración de cada AG luego de 14 días de suplementación lipídica. *: Probabilidad de la diferencia Inicial-Final sea distinta de cero ($p < 0,05$, T de Student, diferencias apareadas)

TRABAJOS COMPLETOS PUBLICADOS



Agricultural Sciences, 2017, 8, 984-1002
<https://www.scirp.org/journal/as>
 ISSN Online: 2156-8561
 ISSN Print: 2156-8553

Effects of Feeding Combinations of Soybean and Linseed Oils on Productive Performance and Milk Fatty Acid Profile in Grazing Dairy Cows

Liliana Elisabet Antonacci¹, Gerardo Antonio Gagliostro^{2*}, Adriana Virginia Cano¹,
 Claudio Adrián Bernal²

¹Área de Producción Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcaros, Argentina
²Faculty of Biochemistry and Biological Sciences, Litoral National University, Santa Fe, Argentina
 Email: *gagliostro.gerasio@ista.gov.ar

How to cite this paper: Antonacci, L.E., Gagliostro, G.A., Cano, A.V. and Bernal, C.A. (2017) Effects of Feeding Combinations of Soybean and Linseed Oils on Productive Performance and Milk Fatty Acid Profile in Grazing Dairy Cows. *Agricultural Sciences*, 8, 984-1002.
<https://doi.org/10.4236/as.2017.89072>

Received: August 16, 2017
Accepted: September 11, 2017
Published: September 14, 2017

Copyright © 2017 by authors and Scientific Research Publishing Inc.
 This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Abstract

Thirty-six grazing dairy cows were used to determine the effect of combinations of soybean (SO), and linseed (LO) oils on milk production, composition and milk fatty acid (FA) profile. Treatments were a basal control diet (56% pasture, 44% concentrate) or the control diet supplemented with oils at 4% of estimated total dry matter (DM) intake. Oils were manually mixed to the concentrate in pure forms (SO100 or LO100) or in blends (%w/w) at SO75 - LO25, SO50 - LO50 and SO25 - LO75. Concentrate and oils were thoroughly consumed. Pasture intake (kg DM/cow-day) was 9.27 in control and decreased ($p < 0.05$) in SO25 - LO75 (8.09) and LO100 (8.98). Total DM intake (kg/cow-day) in control (16.47) increased ($p < 0.05$) to 17.04 in SO100 and 17.20 in SO75. Yield of fat corrected milk (4% FCM) averaged 20.73 kg in control resulting higher in SO75 (23.73 kg). Milk fat content (g/100g) in control averaged 3.40 and decreased to 2.79 in SO50-LO50 and to 3.06 in SO25 - LO75 treatments. Milk protein content was not affected and milk protein yield increased in SO100 (11%) and SO75 - LO25 (21%) over Control (0.729 kg/cow-day). Milk basal (Control) content (g/100g FA) of C12:0 (2.58), C14:0 (10.21) and C16:0 (25.89) was reduced ($p < 0.05$) to 1.64, 6.82 and 19.70 respectively in oil supplemented cows. Basal content of C12:0 to C16:0 averaged 38.48 g/100g FA and decreased (27.4%) after oil intake. Basal *trans*-10 C18:1 (0.46 g/100g FA) increased ($p < 0.01$) in SO100 (1.48) and SO50-LO50 (1.80). Basal level (g/100g FA) of vaccenic acid (*trans*-11 C18:1, **VA**) averaged 3.49 and increased (135%) after oil intake with maximum values observed in LO100 (8.17) and SO50 - LO50 (9.20). Rumenic acid (*cis*-9, *trans*-11 C18:2, **RA**) level (g/100g FA) in milk from Control cows (1.56) increased ($p < 0.05$) to 3.03 (SO100), 3.21 (SO75 - LO25), 3.24 (SO50 - LO50), 2.33 (SO25 - LO75)

DOI: 10.4236/as.2017.89072 Sep. 14, 2017

984

Agricultural Sciences

L. E. Antonacci et al.

and 7.96 (LO100). Results obtained confirmed a great milk fat elasticity in re-



ARTICLE

Milk Fatty-Acid Profile after Feeding Increasing Doses of a Mixture of Soybean and Linseed Oils to Pasture Dairy Cows

Liliana Elisabet Antonacci Gerardo Antonio Gagliostro*

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Balcarce, Área de Producción Animal, Balcarce, Argentina

ARTICLE INFO

Article history

Received: 12 June 2020

Accepted: 27 June 2020

Published Online: 30 June 2020

Keywords:

Polysaturated oils

Vegetable oils

Ruminant acid

ABSTRACT

The goal was to determine the effect of growing intake of a mixture (75:25) of soybean (SoO) and linseed (LCO) oils on milk production and composition and milk fatty-acid (MF-A) profile in grazing dairy cows. Twenty-four Holstein cows were assigned to 4 treatments in a completely randomized design with three weeks of adaptation to oil doses and one week of experimental measurements. On a dry matter (DM) basis, cows were fed pasture (52%), energy concentrate (37%) and the SoO/LCO oil mixture at zero (T0%), 2% (T2%), 4% (T4%) and 6% (T6%) of total DM intake equivalent to 0, 0.36, 0.72 and 1.08 kg/ewe/day of the oil mixture. The oil mixture was manually mixed-up to the concentrate (7.04 kg DM/ewe/day) and supplied by balers during each milking time without refusal. Pasture ($P = 0.49$) and total DM intake ($P = 0.31$) were similar between treatments averaging 11.27 and 18.85 kg DM/ewe/day respectively. Milk output (22.71 kg/ewe/day) was not affected ($P = 0.46$). Milk fat content reduced linearly ($P < 0.05$) from 3.20 (T0%) to 2.67 g/100g (T6%) without effects ($P = 0.73$) on fat or fat corrected milk (FCM) yield. Milk protein concentration ($P = 0.56$) or yield ($P = 0.11$) were not affected. Lactose content tended ($P = 0.08$) to be higher in oil supplemented cows and milk urea nitrogen was not affected ($P = 0.16$). The total (T0%) concentration (g/100g MF-A) of study lipochlorogenic MF-A ($C_{18:1}$, $C_{20:1}$ and $C_{22:1}$) averaged 38.81 and decreased linearly ($P < 0.0001$) with oil intake to 37.81 (T2%), 31.59 (T4%) and 29.18 (T6%). Levels of stearic (trans-9 $C_{18:1}$) and trans-11 $C_{18:1}$ MF-A tended low along in the total (T0%) milk (0.21 and 0.20 g/100g MF-A, respectively) but increased linearly ($P < 0.0001$) after oil intake reaching the maximum values at T6% (0.73 and 2.23 g/100g MF-A, respectively). Milk concentration (g/100g MF-A) of vaccenic acid (trans-11 $C_{18:1}$, VA) averaged 3.63 in T0% and increased linearly ($P < 0.0001$) with oil intake reaching 4.97, 7.05 and 8.38 in T2%, T4% and T6%, respectively. Total concentration of ruminant acid (cis-9, trans-11 $C_{18:1}$, RA) was 2.28 g/100g MF-A and increased linearly ($P < 0.0001$) with increased oil dose resulting in maximal plateau in T4% (3.88) and T6% (3.89). The total atherogenic index (AI) of milk was 1.87 and linearly decreased ($P < 0.01$) to 1.64 (T2%), 1.38 (T4%) and 0.93 (T6%) after oil intake. The total OROSI ratio (3.37) was not different ($P > 0.05$) from T2% (3.37) but was upper ($P < 0.05$) in T4% (4.41) and T6% (4.63) remaining under the recommended value of 5.1. Taken together the results suggest that feeding a blend (75:25) SoO/LCO as LCO oils at 4% of total DM intake to grazing dairy cows maximizes the milk RA content with a concomitant decrease in the lipochlorogenic MF-A of milk maintaining a beneficial for health OROSI ratio with low levels of the detrimental trans-9 $C_{18:1}$ and trans-11 $C_{18:1}$.

*Corresponding Author:

Gerardo Antonio Gagliostro,

Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Balcarce, Área de Producción Animal, Balcarce, Argentina;

Email: gagliostro.gerardo@inta.gub.ar

g

Distributed under creative commons license 4.0 DOI: <https://doi.org/10.30554/jzr.v1i1.1986>

Effect of Diet Supplementation with Combinations of Soybean and Linseed Oils on Milk Production and Fatty Acid Profile in Lactating Dairy Ewes

Liliana Elisabet Antonacci¹, Margarita Bussetti², María Alejandra Rodríguez³, Adriana Virginia Cano¹, Gerardo Antonio Gagliostro^{1*}

¹Área de Producción Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Balcarce, Argentina

²Área de Producción Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Anguil, Argentina

³Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea, Instituto Nacional de Tecnología Industrial, Parque Tecnológico Migualeto, Buenos Aires, Argentina

Email: *gagliostro-gerardo@inta.gov.ar

How to cite this paper: Antonacci, L.E., Bussetti, M., Rodríguez, M.A., Cano, A.V. and Gagliostro, G.A. (2018) Effect of Diet Supplementation with Combinations of Soybean and Linseed Oils on Milk Production and Fatty Acid Profile in Lactating Dairy Ewes. *Agricultural Sciences*, 9, 200-220. <https://doi.org/10.4236/as.2018.92002>

Received: December 27, 2017

Accepted: February 11, 2018

Published: February 14, 2018

Copyright © 2018 by authors and Scientific Research Publishing Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

 Open Access

Abstract

Thirty-six Pampas ewes were used in a completely randomized design to examine the effectiveness of soybean (SO) and linseed (LO) oils to reduce the concentration of the atherogenic fatty acids (FA) of milk (C12:0 to C16:0) and increase the content of conjugated linoleic (*cis*-9, *trans*-11 C18:2) also called ruminant acid (RA) and vaccenic acids (*trans*-11C18:1, VA). Six ewes per treatment received a Control diet alone (71% alfalfa hay and 29% concentrate) or supplemented (0.24 kg/ewe-day) with pure oils (SO100 or LO100) or their blend at (%) SO75-LO25, SO50-LO50 and SO25-LO75. Milk yield, milk fat content and milk fat secretion were not affected. Milk protein content resulted higher in SO75-LO25, SO50-LO50 and SO25-LO75 without changes in milk protein yield. Total solid content of milk tended ($p < 0.10$) to increase after oil intake. Concentration of total atherogenic FA decreased and stearic, oleic and linolenic acids increased after oil intake. Milk content of VA and RA resulted higher in treatments with oils without differences between oil blends. The atherogenicity index (AI) in Control milk (2.23) was reduced ($p < 0.001$) by oil intake (1.15 to 1.37). The n-6/n-3 ratio averaged 7.27 in Control milk and was reduced ($p < 0.001$) by oils reaching a minimum value of 1.89 in LO100. Feeding polyunsaturated oils at 7% of total dry matter (DM) intake did not affect the productive response of dairy ewes resulting in an effective tool to improve the healthy value of milk fat. The SO50-LO50 blend showed the highest number of healthy changes in milk FA composition.