



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LECHE  
FERMENTADAS CON BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS  
POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS Y PRODUCTORAS DE  
ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EN RATAS ESTIMULADAS  
CON UNA ENDOTOXINA**

---

Por:

M. en C. Jesús Sosa Castañeda

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

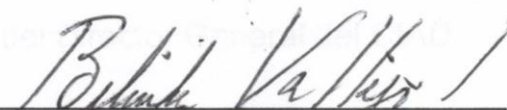
**DOCTORADO EN CIENCIAS**

Hermosillo, Sonora

Septiembre de 2014

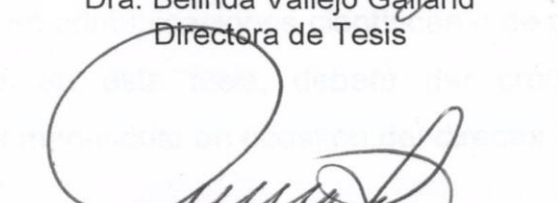
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del Maestro en Ciencias Jesús Sosa Castañeda, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias.




---

Dra. Belinda Vallejo Galland  
Directora de Tesis



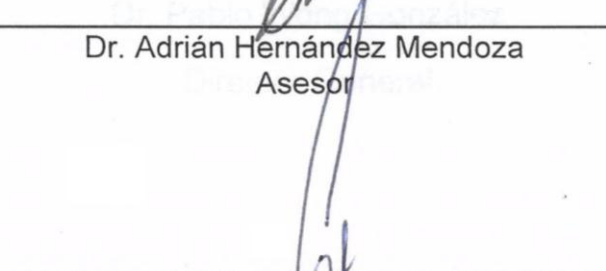
---

Dr. Aarón Fernando González Córdova  
Asesor



---

Dr. Adrián Hernández Mendoza  
Asesor



---

Dr. Humberto Francisco Astiazarán García  
Asesor



---

Dr. Hugo Sergio García Galindo  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos a CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar siempre conmigo y darme la fuerza e inteligencia necesaria para concluir con éxito mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD, A.C) por darme la oportunidad de desarrollarme académicamente haciendo uso de sus instalaciones.

A la Dra. Belinda Vallejo Galland por darme la oportunidad de trabajar a su lado, por darme su apoyo incondicional y compartir sus experiencias profesionales, pero sobre todo por su gran paciencia.

A mi comité de tesis: Dr. Aarón Fernando González Córdova, Dr. Adrián Hernández Mendoza, Dr. Humberto Francisco Astiazarán García y Dr. Hugo Sergio García Galindo, por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo de investigación.

A la M. en C. Carmen Estrada por su apoyo técnico en el uso de cromatografía de gases, a la Dra. María de Jesús Torres Llárez y a la M. en C. Priscilia Yazmín Heredia por su apoyo en microbiología, al M. en C. Ricardo Reyes Diaz por su apoyo en el uso de métodos estadísticos, a la Dra. Verónica Mata Haro y la Dra. Erika Silva Campa por su apoyo en el área de inmunología, al jefe de la biblioteca C. Gerardo Reyna Cañez por su valioso apoyo técnico en la búsqueda de material bibliográfico y soporte documental, al Q. B. Luis Francisco Conde Ortiz y al Q. B. Fernando Alejo Livshin Leyva por su apoyo en la búsqueda de información bibliográfica, a la Lic. Laura Elizabeth García Cruz y a la Lic. Verónica Araiza Sánchez por su apoyo en gestiones y trámites, a la C. Argelia Marín Pacheco por su apoyo en trámites administrativos, a la Q. B. Norma Angélica García Sánchez por su apoyo técnico y soporte en las bases de datos, a la M. E. Ana Aurora

Vidal Martínez por su apoyo técnico en el sistema de Videoconferencias, al C. Héctor Manuel Cota por su apoyo en el departamento de copiado y al C. Héctor Galindo Murrieta por su apoyo durante mis estudios de posgrado.

## DEDICATORIA

*A mis padres: Ramón Sosa Valenzuela y Blanca Estela Castañeda Ceja, por brindarme su apoyo incondicional y sabios consejos, pero sobre todo, por ser los pilares de mi vida. Gracias por inculcar en mi sus principios y valores que me han permitido ser una mejor persona.*

*A mis hermanos: Ramón, Raúl Iván y Carlos por tener siempre su apoyo y hacerme pasar un mejor momento en los tiempos más difíciles. Gracias por su amistad.*

*A mis sobrinitas: Paola Carolina, Marla Janette y Elenita Aylin por llenar mi corazón de felicidad y ternura.*

*A mi sobrinito: Ramoncito por ser ese niño alegre, inocente y platicador, que llena de felicidad mi corazón.*

*A mi novia: Priscilia Yazmín Heredia Castro por ser una persona muy importante en mi vida. Gracias por tu apoyo incondicional y por estar siempre conmigo en los momentos más difíciles.*

*A mis amigos: David Vargas, Ricardo Reyes, Alejandro Santos, Eleazar Aguilar, Lulú Santiago, Rubi, Montserrat, Elena Corso, María Aguilera, Cristobal, Ángel Martín, Ángeles de la Rosa, Martín Moreno, Rogelio, Elvia, Francisco Castro, Samanta Loaiza, Lilia Beltrán, Marisol Luna, Yair Antonio, Isidro Méndez, Vanessa Saracho y Jesús Monzón.*

*“Es de humanos tropezar con una piedra, pero es de sabios no volver a tropezar con la misma piedra”*

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
APROBACIÓN.....	ii
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DEDICATORIA.....	vi
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REFERENCIAS.....	3
INTEGRACIÓN DEL MANUSCRITO.....	5
HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS.....	9
Objetivo general.....	9
Objetivo particular.....	9
CONCLUSIONES.....	120

**Capítulo 1:** Actividad biológica del ácido linoleico conjugado (CLA) y estrategias para incrementar la ingesta de CLA en la dieta de humanos.

**Capítulo 2:** Producción de ácido linoleico conjugado (CLA) por bacterias ácido lácticas (BAL) y su efecto benéfico para la salud.

**Capítulo 3:** Selección de cepas de *Lactobacillus* por su habilidad para producir CLA en leche y adherirse al tracto gastrointestinal.

**Capítulo 4:** Efecto antiinflamatorio de BAL productoras de CLA en ratas estimuladas con una endotoxina.



## RESUMEN

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un término colectivo referido a la mezcla de isómeros del ácido linoleico (LA). El CLA ha sido estudiado por su capacidad de conferir efectos benéficos sobre la salud. Sin embargo, el CLA no se encuentra en concentraciones suficientes en los alimentos para ejercer dichos efectos. Por lo que se han planteado estrategias para incrementar su concentración en los alimentos. Una de estas estrategias ha sido aprovechar la capacidad de algunas bacterias ácido lácticas (BAL) para sintetizar CLA en leche. Además, se ha visto que algunas BAL tienen la capacidad de sintetizar CLA a nivel intestinal. Por lo anterior resulta de interés estudiar y seleccionar BAL con ambas capacidades para incrementar la concentración de CLA disponible en la dieta. Por lo anterior, el objetivo general fue estudiar el efecto antiinflamatorio de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas y productoras de ácido linoléico conjugado en ratas estimuladas con una endotoxina. Los resultados mostraron que 4 de las 13 cepas estudiadas mostraron capacidad de sintetizar CLA en leche y estas conservaron dicha capacidad al ser expuestas a condiciones gastrointestinales simuladas (*Lactobacillus fermentum* J20, *Lactobacillus fermentum* J23, *L. plantarum* J25 y *Lactobacillus pentosus* J26). Por otro lado, se encontró que la administración de leches fermentadas con *L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23 o *L. plantarum* J25 a ratas Wistar estimuladas con LPS como endotoxina, disminuyeron significativamente ( $P < 0.05$ ) los niveles de las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en sangre y la temperatura fisiológica rectal en relación con el grupo control. La administración de leches fermentadas con estos *Lactobacillus* presentaron un efecto antipirético y antiinflamatorio en un modelo murino. Además se demostró que estas cepas fueron capaces de adherirse a la mucosa intestinal. Las leches fermentadas con las cepas *L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23 y *L. plantarum* J25 podrían ser utilizadas como coadyuvantes en el tratamiento de la inflamación causada por las endotoxinas.

**Palabras clave:** Ácido linoleico conjugado, bacterias ácido lácticas, leche fermentada, citocinas, efecto antiinflamatorio.

## ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is a mixture of isomers derived from linoleic acid (LA). CLA has been studied since it confers beneficial health effects. However, CLA is not present in enough concentrations in food to be able to give the desired effect. Consequently, different strategies have been proposed for increasing CLA concentration in foods. One of these strategies has been the use of lactic acid bacteria (LAB) which are able to synthesize CLA in milk. Furthermore, it has been also shown that some LAB are able to produce CLA in the intestine. Therefore it is of interest to study and select LAB which are not only able to produce CLA in milk but are also able to produce CLA in the intestine in order to increase CLA concentration in the diet. Thus, the objective of this research was to study the antiinflammatory effect of fermented milk by potentially probiotic CLA producing LAB in rats challenged with an endotoxin. CLA production by potentially probiotic LAB and its anti-inflammatory effect in rats stimulated with an endotoxin. Results showed that 4 out of 13 strains tested showed ability to synthesize CLA in milk, and retained this ability when exposed to simulated gastrointestinal conditions (*Lactobacillus fermentum* J20, *Lactobacillus fermentum* J23, *Lactobacillus plantarum* J25 and *Lactobacillus pentosus* J26). Furthermore, when milk fermented with *L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23 or *L. plantarum* J25 was administered to Wistar rats challenged with LPS as endotoxin, levels of IL-6 and TNF - $\alpha$  in blood and physiological temperature significantly ( $P < 0.05$ ) decreased in relation to levels in the control group. The administration of fermented milk with these *Lactobacillus* showed an antipyretic and anti-inflammatory effect in a murine model. Additionally, it was also shown that these strains were able to adhere to the intestinal mucosa. Therefore, fermented milk with strains *L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23 and *L. plantarum* J25 could be used as coadjuvants in the treatment of inflammation caused by endotoxins.

**Keywords:** Conjugated linoleic acid, lactic acid bacteria, fermented milk, cytokines, antiinflammatory effect.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El término ácido linoleico conjugado (CLA) hace referencia a un grupo de isómeros del ácido linoleico (LA), de los cuales, los isómeros 9-*cis*, 11-*trans* y 10-*trans*, 12-*cis* son los que han mostrado actividad biológica comprobada (Belury, 2002). El CLA se encuentra de manera natural en alimentos derivados de animales rumiantes, tales como leche y carne. La síntesis de CLA es llevada a cabo por los microorganismos existentes en el rumen de estos animales, en particular, se debe a una bacteria identificada como *butyrivibrio fibrisolvens*, responsable de sintetizar la enzima linoleato isomerasa, la cual toma como sustrato al LA durante el proceso bioquímico de la biohidrogenación para sintetizar CLA (Ogawa et al., 2005).

A lo largo de dos décadas se han reportado una gran variedad de efectos benéficos para la salud cuando los isómeros 9-*cis*, 11-*trans* y 10-*trans*, 12-*cis* han sido administrados en la dieta de animales de laboratorio y en humanos (Park, 2009). Dentro de dichos efectos benéficos se encuentran la actividad anticarcinogénica, antiobesogénica, antiaterogénica, antiinflamatoria y antidiabetogénica (Belury, 2002; O'Shea et al., 2004; Bhattarcharya et al., 2006; Churruca et al., 2009; Park, 2009). Para que se presenten estos efectos benéficos se ha estimado que se necesitan consumir 3.5 g de CLA por día (Ip et al., 1994); sin embargo, el contenido de CLA en los alimentos no es suficiente (Chin et al., 1992), por lo que la ingesta de CLA es limitada (Fremman et al., 2002; Nunez y Torres, 2010). Por lo anterior, surgió la alternativa de sintetizar CLA por reacciones químicas para usarlo como suplemento en la dieta (Rocha-Uribe y Hernández, 2004).

El CLA generado por síntesis química es la fuente de CLA que ha sido más utilizada como fuente de CLA en la dieta de animales de laboratorio y en humanos (Churruca et al., 2009). Sin embargo, se ha demostrado que el CLA producido por este método, genera una mezcla de isómeros de los

cuales, algunos de ellos no presentan actividad biológica comprobada, por lo tanto, se les consideran no deseables (Kapoor et al., 2005; Hernandez-Mendoza et al., 2009). Además, se ha mencionado que el CLA generado por síntesis química podría contener residuos tóxicos de los solventes utilizados para su elaboración (Kapoor et al., 2005). Por ello, han surgido diferentes estrategias para aumentar el contenido de CLA en la dieta. En particular, algunos estudios han demostrado que ciertas bacterias ácido lácticas (BAL), incluidas algunas probióticas, han mostrado capacidad para sintetizar CLA a partir de aceites vegetales o de LA en medio de cultivo (Puniya et al., 2009; Pandit et al., 2012). Por lo anterior, se ha considerado que la utilización de BAL específicas con capacidad de sintetizar CLA podría ser una alternativa para aumentar la concentración de CLA en la dieta, utilizando a la leche fermentada como vehículo. Sin embargo, a la fecha no hay reportes en los cuales se haya evaluado el efecto de las leches fermentadas con BAL productoras de CLA sobre la salud en modelos animales o en humanos. Por otro lado, existe evidencia que indica que la implantación de BAL productoras de CLA a nivel intestinal, pueden promover la salud en modelos animales y humanos, aunque la evidencia que existe al respecto es muy escasa (Wall et al., 2009; Lee et al., 2007; Lee y Lee, 2009). Considerando que las bacterias probióticas biogeneradoras de CLA poseen la capacidad para implantarse a nivel intestinal, es razonable suponer la posibilidad de incrementar la cantidad de CLA en organismos monogástricos a través de la administración e implantación de cepas específicas en el intestino, y a través de la administración de una leche fermentada con cepas productoras de CLA.

Por otro lado, las infecciones pueden ocasionar sepsis y posteriormente shock séptico provocando fallos en los órganos y posteriormente la muerte, presentándose principalmente en niños (Doldán-Pérez, 2008), personas de edad avanzada o en personas recién operadas (Carrasco-Loza et al., 2005). Por lo que, este trabajo de investigación describe el uso de leches fermentadas con BAL productoras de CLA en un modelo murino con inflamación inducida (endotoxina), como una estrategia para reducir la inflamación.

## REFERENCIAS

- Belury, M.A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 505-31.
- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J. y Fernandes, G. (2006). Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J. Nutr. Biochem.* 17, 789-810.
- Carrasco-Loza, R., Castillo-Penalosa, R., Huerta-Bustamante, P. y Salinas, R. R. (2005). Shock Séptico y Estrés Oxidativo. *CIMEL* 10, 53-63.
- Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. y Pariza, M.W. (1992). Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5, 185-197.
- Churrua, I., Fernandez-Quintela, A. y Portillo, M.P. (2009). Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects. *Biofactors.* 35, 105-11.
- Doldán-Pérez, O. (2008). Shock Séptico en Pediatría: enfoque terapéutico. *Pediatr. (Asunción)* 35, 106-111.
- Fremann, D., Linseisen, J. y Wolfram, G. (2002). Dietary conjugated linoleic acid (CLA) intake assessment and possible biomarkers of CLA intake in young women. *Public Health Nutr.* 5, 73-80.
- Hernandez-Mendoza, A., Lopez-Hernandez, A., Hill, C.G. y Garcia, H.S. (2009). Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus reuteri* under different growth conditions. *J. Chem. Technol. Biot.* 84, 180-185.
- Ip, C., Lisk, D.J. y Scimeca, J.A. (1994). Potential of food modification in cancer prevention. *Cancer Res.* 54, 1957-1959.
- Kapoor, R., Reaney, M. y Westcott, N.D. (2005). Conjugated Linoleic Acid Oils. *En: Bailey's Industrial Oil and Fat Products.* John Wiley & Sons, Inc.

- Lee, K., Paek, K., Lee, H.Y., Park, J.H. y Lee, Y. (2007). Antiobesity effect of trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1140-1146.
- Lee, K. y Lee, Y. (2009). Production of c9,t11- and t10,c12-conjugated linoleic acids in humans by *Lactobacillus rhamnosus* PL60. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1617-1619.
- Nunes, J.C. y Torres, A.G. (2010). Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and contribution to daily intake of CLA. *J. Food Compos. Anal.* 23, 782-789.
- Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K. y Shimizu, S. (2005). Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 100, 355-364.
- O'Shea, M., Bassaganya-Riera, J. y Mohede, I.C. (2004). Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 1199-1206.
- Pandit, A., Anand, S., Kalscheur, K. y Hassan, A. (2012). Production of conjugated linoleic acid by lactic acid bacteria in milk without any additional substrate. *Int. J. Dairy Technol.* 65, 603-608.
- Park, Y. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat? *J. Food Compos. Anal.* 22, 4-12.
- Puniya, A., Reddy, C., Kumar, S. y Singh, K. (2009). Influence of sunflower oil on conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. *Ann. Microbiol.* 59, 505-507.
- Rocha-Uribe, A. y Hernández, E. (2004). Synthesis of linoleic conjugated acid by alkali isomerization using propylene glycol as solvent. *Rev. Mex. Ing. Q.* 3, 193-200.
- Wall, R., Ross, R.P., Shanahan, F., O'Mahony, L., O'Mahony, C., Coakley, M., Hart, O., Lawlor, P., Quigley, E.M., Kiely, B., Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. (2009). Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1393-1401.

## INTEGRACIÓN DEL MANUSCRITO

La información de esta tesis está dividida en 4 capítulos, los cuales se muestran resumidos a continuación:

### **Capítulo 1.**

#### **Actividad biológica del ácido linoleico conjugado (CLA) y estrategias para incrementar la ingesta de CLA en la dieta de humanos.**

*J. Sosa-Castañeda, A. Hernández-Mendoza, A.F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba.*

En este capítulo se presenta una revisión sobre la evidencia científica disponible del CLA. Se abordaron las temáticas sobre las principales fuentes de CLA en los alimentos, su síntesis en los animales rumiantes y monogástricos y su incorporación y metabolismo. También se actualizó la información sobre la ingesta poblacional de CLA y la seguridad sobre su consumo. Por otro lado, se abordaron los efectos biológicos del CLA sobre la salud, así como sus mecanismos de acción. Además, se describió y se resumieron las estrategias que han sido consideradas para aumentar el CLA en la dieta de humanos: 1) producción por síntesis química y su uso como suplemento; 2) producción por bacterias ácido lácticas y por lípidos estructurados y 3) producción por manipulación de la dieta de los animales rumiantes. Este capítulo se encuentra en revisión por la Revista Mexicana de Ingeniería Química.

### **Capítulo 2.**

#### **Producción de ácido linoleico conjugado (CLA) por bacterias ácido lácticas (BAL) y su efecto benéfico para la salud.**

*Sosa-Castañeda, Jesús; Hernández-Mendoza, Adrián; González-Córdova, Aarón Fernando; Vallejo-Cordoba, Belinda.*

En este capítulo se revisó la información disponible sobre el uso de bacterias ácido lácticas para aumentar la disponibilidad de CLA en la dieta de humanos. Se abordaron dos temáticas, la primera relacionada con la síntesis exógena de CLA, que es la que ocurre en la leche, quesos, medios de cultivo, etc. La segunda relacionada con la síntesis endógena de CLA, la cual ocurre a nivel fisiológico (intestinal). Además se discutieron los efectos benéficos asociados a la producción exógena y endógena de CLA. Este capítulo se encuentra aceptado para su publicación en la Revista *INTERCIENCIA*.

### **Capítulo 3.**

#### **Selección de cepas de *Lactobacillus* por su capacidad para producir CLA en leche y adherirse al tracto gastrointestinal.**

*J. Sosa-Castañeda, P. Y. Heredia-Castro, A. Hernández-Mendoza, H. Astiazarán-García, H. S. Garcia, A. F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba.*

En este capítulo se presenta la selección de bacterias ácido lácticas en base a su capacidad para producir CLA en leche y por conservar dicha capacidad bajo condiciones gastrointestinales simuladas. Además se demostró que dichas cepas fueron capaces de adherirse al epitelio intestinal de ratas por lo que se supone que son capaces de producir CLA a nivel intestinal. Este capítulo se encuentra en revisión por la Revista *Journal of Dairy Science*.

### **Capítulo 4.**

#### **Efecto antiinflamatorio asociado al consumo de leches fermentadas con *Lactobacillus* productores de ácido linoléico conjugado (CLA) en un modelo murino**

*J. Sosa-Castañeda, A. Hernández-Mendoza, P. Y. Heredia-Castro, A. F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba.*

En este capítulo se evaluó el efecto antiinflamatorio por la administración de leches fermentadas con las cuatro cepas de *Lactobacillus*



seleccionadas por su capacidad de producir CLA en leche y en condiciones gastrointestinales simuladas, en un modelo murino estimulado con lipopolisacárido como endotoxina. Tres de las cuatro leches fermentadas evaluadas fueron capaces de disminuir los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  en el modelo murino. Además, la administración de leche fermentada con estas tres cepas fueron capaces de disminuir la temperatura fisiológica. Este capítulo se encuentra en revisión por la *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*.

## **HIPÓTESIS**

Leches fermentadas con bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas y productoras de ácido linoléico conjugado promueven un efecto antiinflamatorio en ratas estimuladas con una endotoxina.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto antiinflamatorio de leches fermentadas con bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas y productoras de ácido linoléico conjugado en ratas estimuladas con una endotoxina.

### Objetivos específicos

- 1.- Evaluar y seleccionar cepas de *Lactobacillus* potencialmente probióticas con capacidad de producir CLA en leche.
- 2.- Evaluar la capacidad de las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas para producir CLA en un modelo gastrointestinal *in vitro*.
- 3.- Determinar la capacidad de las cepas de *Lactobacillus* de adherirse a la mucosa intestinal en un modelo murino.
- 4.- Evaluar los niveles de marcadores de inflamación séricos, interleucinas IL-6 y TNF- $\alpha$ , ante la exposición a una endotoxina de ratas administradas con leche fermentada con cepas de *Lactobacillus* productoras de CLA.

**CAPITULO 1.** Actividad biológica del ácido linoleico conjugado (CLA) y estrategias para incrementar la ingesta de CLA en la dieta de humanos.

*J. Sosa-Castañeda, A. Hernández-Mendoza, A.F. González-Córdova, B. Vallejo-Cordoba.* Artículo en revisión por la Revista Mexicana de Ingeniería Química.

## **Resumen**

El ácido linoleico conjugado (CLA) ha llamado la atención de la comunidad científica durante las últimas dos décadas debido a la diversidad de efectos benéficos para la salud que confiere cuando es consumido en la dieta. En humanos, la síntesis de CLA es limitada, por el contrario los animales rumiantes son los principales sintetizadores, es por ello que el CLA se encuentra principalmente en la leche, carne y sus derivados. No obstante, los alimentos no cubren los requerimientos necesarios para que se presenten los efectos benéficos. Por lo anterior, se han sugerido diferentes estrategias para incrementar su contenido en la dieta. Dichas estrategias comprenden la isomerización del ácido linoleico, bien por procesos enzimáticos, síntesis química o mediante el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) que presentan capacidad de conjugar los dobles enlaces de este ácido graso. Así mismo, se ha contemplado la producción de lípidos estructurados enriquecidos con CLA, o por medio de la modificación de la alimentación de los animales rumiantes. Este trabajo presenta una revisión de los efectos biológicos del CLA y el potencial que ofrecen las diferentes estrategias para incrementar la disponibilidad de CLA en la dieta.

1 **ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA)**  
2 **Y ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR EL CONTENIDO DE CLA EN**  
3 **LA DIETA**

4  
5 **BIOLOGICAL ACTIVITY OF CONJUGATED LINOLEIC ACID (CLA) AND**  
6 **STRATEGIES TO INCREASE CLA CONTENT IN THE HUMAN DIET**

7 J. Sosa-Castañeda<sup>1</sup>, A. Hernández-Mendoza<sup>1</sup>, A.F. González-Córdova<sup>1</sup>, B. Vallejo-  
8 Cordoba<sup>1\*</sup>

9  
10 <sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD); Coordinación  
11 de Tecnología de Alimentos de Origen Animal; Laboratorio de Química y  
12 Biotecnología de Productos Lácteos. Carretera a La Victoria Km 0.6, Apartado 1735.  
13 Hermosillo, Sonora, 83304. México.

14 Fecha de envío: 21, enero, 2014.

15 **Categoría: Biotecnología.**

16  
17 \*Autor para la correspondencia: Tel: 52 (662) 289-2400 Ext. 303;

18 Fax: 52 (662) 280-0421. E-mail: [vallejo@ciad.mx](mailto:vallejo@ciad.mx)

19  
20 

---

21 **Resumen:**

22 El ácido linoleico conjugado (CLA) ha llamado la atención de la comunidad  
23 científica durante las últimas dos décadas debido a la diversidad de efectos  
24 benéficos para la salud que confiere cuando es consumido en la dieta. En humanos,  
25 la síntesis de CLA es limitada, por el contrario los animales rumiantes son los  
26 principales sintetizadores, es por ello que el CLA se encuentra principalmente en la  
27 leche, carne y sus derivados. No obstante, los alimentos no cubren los  
28 requerimientos necesarios para que se presenten los efectos benéficos. Por lo  
29 anterior, se han sugerido diferentes estrategias para incrementar su contenido en la  
30 dieta. Dichas estrategias comprenden la síntesis química en condiciones alcalinas, la  
31 síntesis por bacterias ácido lácticas (BAL), la síntesis de lípidos estructurados y por  
32 medio de la alimentación de los animales rumiantes. Este trabajo presenta una  
33 revisión de los efectos biológicos del CLA y el potencial que ofrecen las diferentes  
34 estrategias para incrementar el contenido de CLA en la dieta.

35

36 *Palabras clave:* Ácido linoleico conjugado; síntesis química; síntesis por BAL;  
37 síntesis de lípidos estructurados; alimentación de animales rumiantes.

38

---

39

40 **Abstract:**

41 Conjugated linoleic acid has called the attention of the scientific community  
42 during the last two decades due to the diversity of beneficial health effects conferred  
43 when ingested in the diet. In humans, synthesis of CLA is limited, by contrast,  
44 ruminant animals are the main producers and this is the reason why CLA is found  
45 mainly in milk, meat and their products. Regardless, food does not cover the  
46 requirements necessary for the beneficial effects to occur. Therefore, different  
47 strategies have emerged to increment its content in the human diet. The strategies  
48 considered are chemical synthesis in alkaline conditions, synthesis by lactic acid  
49 bacteria, synthesis of structured lipids and strategic feeding of ruminant animals.  
50 This paper presents a review of the biological effects of CLA and the potential that  
51 different strategies offer for increasing CLA content in the human diet.

52

53 *Keywords:* Conjugated linoleic acid, chemical synthesis, synthesis by BAL;  
54 synthesis of structured lipids; feeding ruminant animals.

## 55 **1. Introducción**

56

57 El CLA es una mezcla de isómeros geométricos y posicionales del ácido  
58 linoleico (LA) los cuales se encuentran principalmente en alimentos derivados de  
59 animales rumiantes, tales como leche y carne. Su presencia se debe a un proceso  
60 llamado biohidrogenación, el cual es producto de la flora microbiana existente en el  
61 rumen de estos animales (Chin y *col.*, 1992, Belury, 2002, Sieber y *col.*, 2004,  
62 ParkyPariza, 2007, Baddini Feitoza y *col.*, 2009, Andrade y *col.*, 2012). Por el contrario,  
63 en animales monogástricos y en humanos, la síntesis de CLA es muy limitada (Dugan y  
64 *col.*, 2004, Villeneuve y *col.*, 2007). Diversos estudios han demostrado que el aumento  
65 del consumo de CLA en la dieta de animales monogástricos puede reducir el riesgo de  
66 padecer ciertos tipos de cáncer, reduce el tejido graso y aumenta el tejido magro;  
67 disminuye el riesgo de padecer diabetes; previene la arterosclerosis, fortalece el sistema  
68 inmune y disminuye la inflamación (Belury, 2002, O'Shea y *col.*, 2004, Bhattacharya y  
69 *col.*, 2006, Churruca y *col.*, 2009, Park, 2009). A la fecha, no se ha establecido la dosis  
70 de CLA necesaria para obtener los efectos benéficos en humanos, sin embargo,  
71 basándose en datos obtenidos de modelos murinos se ha estimado que el consumo de 3.5  
72 g de CLA por día para personas de 70 kg podría ser suficiente para ofrecer un efecto  
73 protector contra el cáncer (Ip y *col.*, 1994). No obstante, aunque los productos lácteos  
74 son la principal fuente de CLA en dieta de humanos y la concentración de CLA en los  
75 alimentos se presenta en un rango de 0.2 a 8.8 mg/g de grasa (Chin y *col.*, 1992, Prandini  
76 y *col.*, 2007), algunos estudios han puesto en evidencia que el consumo diario de CLA  
77 en las personas está por debajo de lo recomendado, presentándose en un rango de 36 a  
78 440 mg de CLA/día (FritscheySteinhart, 1998, NunesyTorres, 2010). Por lo anterior, se  
79 han planteado diferentes estrategias para ayudar a incrementar el contenido de CLA en  
80 la dieta de humanos. La isomerización del LA en condiciones alcalinas es un método  
81 comúnmente usado para preparar CLA para consumo humano (Rocha-  
82 UribeyHernández, 2004, Kapoor y *col.*, 2005). Estudios recientes han sugerido que el  
83 uso de BAL específicas podría ayudar a incrementar la cantidad de CLA en productos  
84 lácteos fermentados (Sieber y *col.*, 2004, Andrade y *col.*, 2012), mientras que otras  
85 investigaciones han sugerido el uso de lípidos estructurados con alto contenido de CLA

86 (Adamczak y *col.*, 2008). Otro método utilizado es la suplementación de alimentos ricos  
87 en ácidos grasos poliinsaturados en la dieta de animales rumiantes para obtener leche y  
88 carne con mayor contenido de CLA (Gagliostro, 2005, Pordomingo y *col.*, 2012). El  
89 objetivo de esta revisión es presentar la información disponible sobre los efectos  
90 biológicos del CLA y presentar el potencial de las diferentes estrategias para  
91 incrementar el contenido de CLA en la dieta de humanos.

92

## 93 **2. Antecedentes (fuente de CLA, síntesis, incorporación y metabolismo)**

94

95 El CLA fue descubierto accidentalmente por el grupo del Dr. Pariza, quienes  
96 fueron los primeros en reportar el efecto anticancerígeno de extractos derivados de la  
97 carne (ParizayHargraves, 1985, Ha y *col.*, 1987). El CLA es una mezcla de isómeros  
98 geométricos (*cis/trans*) y posicionales (localización de los dobles enlaces) del LA (*cis-9*,  
99 *cis-12* C18:2, omega-6) y está compuesto por una cadena hidrocarbonada formada por  
100 18 átomos de carbono, mismos que poseen enlaces dobles conjugados principalmente en  
101 los carbonos 6,8; 7,9; 8,10; 9,11; 10,12; 11,13 y 12,14. El término conjugado se refiere a  
102 la separación de un enlace doble precedido de un enlace sencillo, seguido de otro doble,  
103 alternancia a la cual se le denomina “conjugación” (-CH=CH-CH=CH-) (MacDonald,  
104 2000, Belury, 2002, Adamczak y *col.*, 2008, Andrade y *col.*, 2012). Teóricamente, se  
105 pueden formar 54 isómeros de CLA, pero a través de la utilización de métodos analíticos  
106 modernos, solo 17 de ellos han sido identificados en los alimentos, de los cuales, los  
107 isómeros *cis-9*, *trans-11* y *trans-10*, *cis-12* (*c9*, *t11* y *t10*, *c12*) son los que poseen  
108 actividad biológica comprobada (Figura 1) (Bhattacharya y *col.*, 2006, Adamczak y *col.*,  
109 2008, Churruca y *col.*, 2009, Andrade y *col.*, 2012). El isómero *c9*, *t11*, también llamado  
110 “ácido ruménico”, es el de mayor abundancia en los alimentos, representando  
111 aproximadamente el 90% del CLA total en leche y el 75% en carne (Adamczak y *col.*,  
112 2008, Andrade y *col.*, 2012). La concentración de CLA en los alimentos fluctúa en el  
113 rango de 0.2 a 8.11 mg/g de grasa y depende del contenido inicial de CLA de la leche,  
114 del procesamiento del alimento, de la raza, de la especie y del tipo de dieta con el que  
115 fueron alimentados los animales (Chin y *col.*, 1992, Gagliostro, 2005, Prandini y *col.*,  
116 2007, Nascimento y *col.*, 2009). En la Tabla 1 se muestra un resumen de las



117 investigaciones donde se evalúa el contenido de CLA en algunos alimentos derivados de  
118 animales rumiantes.

119

120 La presencia de CLA en leche y carne de rumiantes se debe principalmente a dos  
121 fuentes: a la bioconversión del LA por los microorganismos ruminales y a través de la  
122 desaturación del ácido trans- vaccénico en la glándula mamaria, siendo esta última, la  
123 principal fuente de CLA en leche (Sieber y *col.*, 2004). La síntesis de CLA a nivel  
124 ruminal se genera a través de un proceso enzimático llamado biohidrogenación, siendo  
125 el *Butyrivibrio fibrisolvens* una de las bacterias ruminales responsables de este proceso  
126 (Ogawa y *col.*, 2005, BaumanyLock, 2006), en el cual, se pueden utilizar LA o ácido  
127 linolénico (LNA) como sustrato. La síntesis de CLA inicia con la isomerización del  
128 doble enlace *c12* a una configuración *t11*, resultando en un ácido graso dienoico  
129 conjugado, es decir CLA (*c9, t11* C18:2), o trienoico conjugado *c9, t11, c15* C18:3  
130 según sea el caso (BaumanyLock, 2006). Después, el ácido graso trienoico es reducido  
131 en el doble enlace *c9*, lo cual genera un ácido graso *t11, c15* C18:2. Posteriormente, el  
132 *c15* del ácido graso trienoico y el *c9* del ácido graso dienoico (CLA) se reducen  
133 generando ácido trans-vaccénico (*t11*, C18:1), el cual, al ser absorbido por las papilas  
134 del rumen no continua con el proceso final de biohidrogenación (reducción del doble  
135 enlace *t11* para generar ácido esteárico, C18:0); y es sintetizado a CLA (*c9, t11*, C18:2)  
136 en glándula mamaria a través del sistema multienzimático desaturasa. Este sistema  
137 incluye NADH, citocromo  $b_5$  reductasa, citocromo  $b_5$  acil CoA sintasa y  $\Delta^9$ -desaturasa,  
138 siendo esta última la enzima responsable de la síntesis de CLA en tejido (Figura 2)  
139 (Ntambi, 1999, KhanalyDhiman, 2004, Sieber y *col.*, 2004, BaumanyLock, 2006). Otros  
140 isómeros de CLA también son formados en el rumen y tejido, por ejemplo el *t11, c13* es  
141 sintetizado en el rumen a partir del LNA (su ruta es desconocida) y el *t7, c9* es  
142 sintetizado en tejido por el complejo enzimático de la  $\Delta^9$ -desaturasa utilizando como  
143 precursor al *t7* C18:1 formado en el rumen por el proceso de biohidrogenación a partir  
144 de ácido oleico (Collomb y *col.*, 2006). A diferencia de los rumiantes, en animales  
145 monogástricos y en humanos, la flora microbiana (responsable del proceso de  
146 biohidrogenación) no se encuentra en cantidades apreciables o tan altas (Dugan y *col.*,  
147 2004, Villeneuve y *col.*, 2007), es por ello, que la síntesis de ácido trans-vaccénico a

148 CLA en tejido es la principal fuente de CLA en estas especies (Banni, 2002, Loor y col.,  
149 2002, KhanalyDhiman, 2004).

150

151 La absorción de CLA a nivel intestinal en animales monogástricos alimentados  
152 con aceites ricos en CLA depende de la posición del CLA en el triacilglicérido (TAG),  
153 es decir, si el CLA se encuentra en las posiciones exteriores es mejor absorbido y es  
154 utilizado principalmente como fuente de energía, mientras que, si se encuentra en la  
155 posición central (*sn-2*) será depositado en tejido (Chardigny y col., 2003). Por otro lado,  
156 el grado de absorción de los isómeros de CLA en su forma libre es muy similar y la  
157 configuración geométrica y posicional no tiene influencia sobre su absorción (Straarup y  
158 col., 2005, Tsuzuki y Ikeda, 2007). Una vez que el CLA dietario es absorbido en el  
159 intestino delgado pasa a los tejidos, encontrándose en todas las clases de fosfolípidos  
160 analizados incluyendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol,  
161 fosfatidilserina y cardiolipina (Sugano y col., 1997, Kramer y col., 1998, Banni, 2002).  
162 Además, se ha reportado que el CLA se incorpora principalmente en la posición *sn-2* del  
163 fosfolípido, siendo tal incorporación no específica (Park y Pariza, 2007).

164

165 En otros estudios se ha reportado que el CLA incorporado en tejido es  
166 metabolizado como otros ácidos grasos. Metabolitos elongados y/o desaturados de CLA  
167 han sido detectados en tejidos de animales monogástricos suplementados con CLA  
168 (Sebedio y col., 1999, Banni, 2002). Además, se han detectado ácidos grasos conjugados  
169 de 12, 14 y 16 carbonos, posiblemente productos de la  $\beta$ -oxidación del CLA (Park y col.,  
170 2005, Ringseis y col., 2006).

171

### 172 **3. Efectos biológicos del CLA**

173

174 Se ha demostrado que el CLA suprime el desarrollo de tumores en un amplio  
175 rango de modelos animales, incluyendo cáncer de mama, próstata, colon, estómago, piel  
176 y pulmón (Bhattacharya y col., 2006, Churruca y col., 2009, Park, 2009). Además,  
177 ambos isómeros *c9, t11* y *t10, c12*, así como sus mezclas han mostrado actividad  
178 anticancerígena (Ip y col., 2002, Hubbard y col., 2003, Churruca y col., 2009). Se ha

179 sugerido que el CLA no solo reduce la iniciación, promoción y progresión de tumores,  
180 sino que también reduce la metástasis, relacionando al CLA con la reducción de la  
181 producción de eicosanoides; interferencia con las vías de señalización celular; inhibición  
182 de la síntesis de DNA; promotor de apoptosis e inhibidor de angiogénesis, reduciendo la  
183 matriz de metaloproteinasas y factores de crecimiento endoteliales vasculares (Lee y  
184 *col.*, 2005, Bhattacharya y *col.*, 2006, Kelley y *col.*, 2007, Park, 2009).

185

186 La capacidad del CLA para reducir el tejido graso también ha sido demostrada en  
187 animales de laboratorio. El primer reporte fue realizado por Park y *col.* (1995).  
188 Posteriormente fue confirmado que el isómero responsable de esa actividad era el *t10*,  
189 *c12* (Bhattacharya y *col.*, 2006, ParkyPariza, 2007, Park, 2009) y que los efectos se  
190 veían con mayor claridad en roedores (Wang y Jones, 2004). Se sugirió que tal efecto es el  
191 resultado de múltiples mecanismos, dentro de los cuales se incluyen: incremento en el  
192 gasto energético; reducción en la acumulación de lípidos en el tejido adiposo y/o  
193 diferenciación de adipocitos; incremento de apoptosis en el tejido adiposo; modulación de  
194 adipocinas y citocinas tales como leptina, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ),  
195 adiponectina o interleucinas (IL); e incremento de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en el  
196 musculo esquelético (Bhattacharya y *col.*, 2006, ParkyPariza, 2007, Park, 2009).  
197 También se ha demostrado que el CLA puede prevenir enfermedades cardiovasculares  
198 reduciendo lesiones arterioescleróticas en conejos y hámsteres (Lee y *col.*, 1998,  
199 Kritchevsky y *col.*, 2004, Park, 2009). Además se ha reportado que el CLA reduce el  
200 colesterol total, triacilglicéridos (TAGs) y colesterol LDL; y aumenta el colesterol HDL  
201 en modelos animales (Kritchevsky y *col.*, 2000, McLeod y *col.*, 2004, Bhattacharya y  
202 *col.*, 2006, Park, 2009). Los cambios en el perfil de lípidos han sido observados con una  
203 mezcla de isómeros y con los isómeros *c9*, *t11* y *t10*, *c12* por separado (Churrua y *col.*,  
204 2009). A la fecha, no está del todo claro el rol de los isómeros de CLA en la  
205 arterioesclerosis y los efectos en la disminución de lípidos, pero se presume la  
206 participación del receptor activador de la proliferación de peroxisomas (PPAR, clave  
207 para la lipogénesis); proteína de unión al elemento de respuesta de los esteroides  
208 (SREBPs, clave para la síntesis y elongación de ácidos grasos); y/o esteroil CoA  
209 desaturasa (SCD, clave para la formación de colesterol y TAGs) (Choi y *col.*, 2001,

210 Nagao y col., 2003, Bhattacharya y col., 2006, Park, 2009). También se ha demostrado  
211 que una mezcla de isómeros *c9*, *t11* y *t10*, *c12* (50:50) ó el isómero *t10*, *c12* disminuyen  
212 la presión arterial en modelos animales (Nagao y col., 2003, Inoue y col., 2004,  
213 Bhattacharya y col., 2006), sugiriendo que este efecto está ligado al isómero *t10*, *c12*.

214

215 En otras investigaciones se ha demostrado que el CLA puede favorecer y  
216 modular algunas funciones específicas del sistema inmune y mediadores de la  
217 inflamación. Por ejemplo, citocinas proinflamatorias, citocinas antiinflamatorias,  
218 eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos), óxido nítrico, inmunoglobulinas y  
219 linfocitos (O'Shea y col., 2004, Bhattacharya y col., 2006, Churruca y col., 2009).  
220 Algunos estudios sugieren que el CLA fortalece el sistema inmune aumentando los  
221 niveles de inmunoglobulinas de clase IgA, IgG e IgM; además, incrementa la  
222 proliferación de linfocitos B (Sugano y col., 1997, Yamasaki y col., 2000, Yamasaki y  
223 col., 2003, O'Shea y col., 2004) y linfocitos T de tipo CD8+ (Bassaganya-Riera y col.,  
224 2003). También se ha visto que los isómeros *c9*, *t11* y *t10*, *c12* disminuyen algunos  
225 mediadores de la inflamación, como la expresión y síntesis de citocinas proinflamatorias  
226 (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) y prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), además de aumentar la activación del  
227 PPAR- $\gamma$  y la proliferación de linfocitos T de tipo CD8+ en cerdos (Changhua y col.,  
228 2005, Lai y col., 2005). El isómero que ha sido reportado por tener mayor actividad ha  
229 sido el *t10*, *c12* (Changhua y col., 2005). Los mecanismos que podrían estar implicados  
230 en este efecto son la activación y modulación de los factores de transcripción nuclear de  
231 la familia de los PPARs y la inactivación del factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B  
232 (O'Shea y col., 2004, Bhattacharya y col., 2006).

233

234 Por otro lado, se ha reportado que el CLA favorece la absorción de calcio (Kelly  
235 y col., 2003, Kelly y Cashman, 2004) e incrementa la masa ósea (Bhattacharya y col.,  
236 2006). Este efecto se ha relacionado al consumo de CLA de la dieta y la densidad  
237 mineral de los huesos en mujeres posmenopáusicas suplementadas con calcio,  
238 sugiriendo que el isómero *c9*, *t11* y no el *t10*, *c12* es el que probablemente estuvo  
239 involucrado en el efecto benéfico por ser el isómero más consumido en la dieta  
240 (Brownbill y col., 2005). El papel que juega el CLA en la salud de los huesos hasta el

241 momento es desconocido, pero basado en evidencias indirectas, se ha propuesto que su  
242 efecto se puede deber a la disminución de la osteoclastogénesis, la regulación negativa  
243 de las PGE<sub>2</sub>, la regulación de la leptina y por la reducción de citocinas proinflamatorias  
244 como el TNF- $\alpha$ , IL-1 y la IL-6 (Bhattacharya y col., 2006).

245

246 Otros estudios han demostrado que el CLA puede mejorar la sensibilidad a la  
247 insulina sugiriendo con ello un efecto antidiabetogénico (Bhattacharya y col., 2006). Se  
248 ha reportado por Houseknecht y col. (1998) que una mezcla de isómeros *c9, t11* y *t10, c12*  
249 (50:50) normalizó la tolerancia a la glucosa y disminuyó la hiperinsulemia. Además,  
250 en otras investigaciones se ha reportado que la mezcla de los isómeros *c9, t11* y *t10, c12*  
251 (50:50) y el isómero *t10, c12* mejoran la tolerancia a la glucosa, mientras que con el  
252 isómero *c9, t11* no se observó este efecto (Henriksen y col., 2003, Churruca y col.,  
253 2009).

254

#### 255 **4. Seguridad en el consumo de CLA**

256

257 Existen reportes en los cuales se ha puesto en evidencia que el isómero *t10, c12*  
258 puede disminuir la sensibilidad a la insulina mostrando un efecto negativo para la salud  
259 al favorecer el posible desarrollo de diabetes (Park, 2009). Sin embargo, el efecto  
260 negativo del CLA no se manifiesta al utilizar una mezcla en proporción 1:1 de los  
261 isómeros *c9, t11* y *t10, c12*, además también existen reportes donde se evidencia que el  
262 isómero *t10, c12* puede prevenir el desarrollo de diabetes (Houseknecht y col., 1998,  
263 Henriksen y col., 2003) mostrando actividad benéfica para la salud. A la fecha, sigue  
264 existiendo polémica sobre el posible efecto negativo del CLA en lo referente a la  
265 resistencia a la insulina. Por otro lado, hasta el momento existe la inquietud por otros  
266 efectos negativos como la lipodistrofia y el hígado graso, que pueden ser el resultado de  
267 la movilización prolongada de la grasa corporal, así como una mayor síntesis de ácidos  
268 grasos en el hígado, sin embargo, estos efectos pueden ser reversibles al dejar de  
269 consumir CLA (Churruca y col., 2009, Park, 2009). Debido a la controversia generada  
270 en base a la evidencia, no se ha logrado elucidar de manera concluyente que el consumo  
271 de CLA sea dañino para humanos.

## 272 **5. Consumo de CLA dietario**

273

274 Diferentes estudios han estimado la ingesta diaria de CLA en la dieta de  
275 humanos. El consumo de CLA ha sido estimado en base a la dieta habitual de las  
276 personas o en base a la ingesta de productos lácteos y carne de rumiantes (Tabla 2). En  
277 Alemania el consumo de CLA se estimó en 440 y 360 mg/día para hombres y mujeres  
278 respectivamente (FritscheySteinhart, 1998), mientras que en Estados Unidos se estimado  
279 en 210 y 150 mg/día para hombres y mujeres respectivamente (Ritzenthaler y *col.*,  
280 2001). En otro estudio realizado en Alemania el consumo de CLA para mujeres fue  
281 estimado en 320 mg/día (Fremann y *col.*, 2002), y en el sureste de Brasil fue de 36  
282 mg/día (NunesyTorres, 2010). Aunque la dosis de CLA requerida para que se presenten  
283 los efectos benéficos en humanos, a la fecha no ha sido establecida, se sugiere que el  
284 consumo de 3.5 g de CLA para una persona de 70 kg sería suficiente para ejercer un  
285 efecto protector contra el cáncer (Ip y *col.*, 1994). Con base en lo anterior, resulta  
286 evidente que la cantidad diaria de CLA que consumen las personas no cubre los  
287 requerimientos necesarios para que se presenten los efectos benéficos.

288

## 289 **6. Estrategias para incrementar el contenido de CLA en la dieta**

290

291 Diversas estrategias han sido consideradas para incrementar el consumo de CLA  
292 en la dieta de humanos. La isomerización de CLA por síntesis química en condiciones  
293 alcalinas (por ejemplo, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio) fue desarrollada en  
294 las etapas iniciales de las investigaciones en las que se requerían grandes cantidades de  
295 CLA para realizar estudios con animales de laboratorio (Chin y *col.*, 1992, Rocha-  
296 UribeyHernández, 2004). La concentración final de CLA obtenida por este método  
297 depende del contenido de LA de la materia prima utilizada. Generalmente, las  
298 preparaciones son elaboradas a base de aceite de girasol, aunque también se ha utilizado  
299 el aceite de cártamo, aceite de ricino y aceite de canola (Gauillier y *col.*, 2002, Kapoor y  
300 *col.*, 2005, Villeneuve y *col.*, 2007, Goli y *col.*, 2008, Blasi y *col.*, 2012). La ventaja de  
301 este método es su eficiencia para generar CLA y se han reportado rendimientos en  
302 productos comerciales para consumo humano que van en un rango de 54.2 a 95%,

303 además, su producción es económicamente rentable (Gauillier y *col.*, 2002, Rocha-  
304 UribeyHernández, 2004, Kapoor y *col.*, 2005). Sin embargo, una desventaja de este  
305 método es que genera una mezcla de isómeros, de los cuales, algunos de ellos no  
306 presentan actividad biológica comprobada, además, la cantidad y proporción de los  
307 isómeros de CLA también es variada. Se ha reportado que en algunos productos  
308 comerciales para consumo humano contienen mezclas de 4 isómeros (*t8*, *c10*, *c9*, *t11*,  
309 *t10*, *c12* y *c11*, *t13*), además de otros isómeros *cis*, *cis* y *trans*, *trans* (Gauillier y *col.*,  
310 2002). Debido a la identificación de los dos isómeros biológicamente más activos (*c9*,  
311 *t11* y *t10*, *c12*) se han introducido al mercado nuevos productos, sin embargo, a pesar de  
312 los avances los productos comerciales todavía contienen isómeros indeseables (Rocha-  
313 UribeyHernández, 2004, Kapoor y *col.*, 2005). Además, se menciona que la síntesis  
314 química en condiciones alcalinas pudiera contener residuos tóxicos de los solventes  
315 utilizados, como por ejemplo, etilenglicol, alcohol *t*-butirico, dimetil formamida o  
316 dimemetil sulfóxido (Kapoor y *col.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de los estudios que  
317 demuestran los efectos benéficos para la salud que proporciona el CLA han sido  
318 realizados utilizando CLA generado por síntesis química (Belury, 2002, Bhattacharya y  
319 *col.*, 2006, Churruca y *col.*, 2009, Park, 2009). Por lo anterior, se especula que una  
320 posible causa en la variación de los resultados de esas investigaciones, se podría deber a  
321 la composición y proporción de los isómeros del CLA empleados en las dietas (Blasi y  
322 *col.*, 2012). Sin embargo, la mayoría de los efectos benéficos atribuidos al CLA se han  
323 realizado con CLA generado por este método y a la fecha no se ha demostrado que su  
324 consumo cause problemas a la salud.

325

326 Una alternativa que se ha planteado para incrementar el contenido de CLA en la  
327 dieta, es por medio de la utilización de BAL productoras de CLA. Algunos estudios han  
328 demostrado que diferentes BAL son capaces de sintetizar CLA a partir de LA libre  
329 (Kishino y *col.*, 2002, Lee y *col.*, 2003) o esterificado (Puniya y *col.*, 2008, Puniya y *col.*,  
330 2009), así como de la grasa de leche (Pandit y *col.*, 2012). Además, se ha reportado que  
331 la capacidad de las BAL para sintetizar CLA es cepa dependiente (Liu y *col.*, 2011,  
332 Pandit y *col.*, 2012) y que tal capacidad se puede ver afectada por la temperatura, tiempo  
333 de incubación, pH y concentración del sustrato (Hernandez-Mendoza y *col.*, 2009) lo

334 cual ha intensificado la búsqueda de nuevas cepas de BAL para este fin. El empleo de  
335 BAL productoras de CLA ha logrado incrementar los niveles de CLA en productos  
336 lácteos fermentados (Meraz-TorresyHernandez-Sanchez, 2012) incluyendo leche  
337 fermentada (Tabla 3) (Alonso y col., 2003), yogurt (Akalin y col., 2007), queso (Van  
338 Nieuwenhove y col., 2007b, Abd El-Salam y col., 2011) y crema (Domagała y col.,  
339 2009) (Tabla 4). Por lo anterior, la síntesis de CLA por BAL representa una fuente extra  
340 de CLA en la dieta de humanos utilizando a la leche como matriz alimentaria. Sin  
341 embargo, este método también presenta algunas desventajas, ya que se ha mencionado  
342 que a través del proceso de fermentación se produce CLA libre lo sugiere que podría  
343 ocasionar cambios en la acidez y conferir un sabor desagradable en el producto  
344 (Adamczak y col., 2008). Además, se ha mencionado que los productos lácteos  
345 fermentados con BAL productoras de CLA proporcionan baja cantidad de CLA  
346 (Andrade y col., 2012), sin embargo no deja de ser una fuente extra de CLA en los  
347 alimentos. La ventaja de este método es que se pueden generar isómeros específicos de  
348 CLA, así como altas proporciones de los isómeros biológicamente más activos (Ogawa y  
349 col., 2005). Hasta el momento, los estudios que evalúan los efectos benéficos de las  
350 BAL productoras de CLA son muy escasos, y ninguno evalúa el efecto benéfico de las  
351 leches fermentadas fortificadas con CLA microbiano, sin embargo, se ha estudiado la  
352 utilización de las BAL productoras de CLA implantadas a nivel intestinal y se ha  
353 demostrado que *Bifidobacterium breve* NCIMB 702278 en combinación con aceite de  
354 girasol presentó actividad antiinflamatoria en cerdos, además se detectó la incorporación  
355 del isómero *c9, t11* en los fosfolípidos de las células de hígado en esos mismos cerdos  
356 (Wall y col., 2009), lo que sugiere la participación del CLA como posible mecanismo de  
357 acción. Por otro lado, *Lactobacillus rhamnosus* PL60 en combinación con una dieta alta  
358 en grasa mostró actividad antiobesogénica en ratones, además fue detectada la presencia  
359 del isómero *t10, c12* en suero de sangre (Lee y col., 2006). En otro estudio,  
360 *Lactobacillus rhamnosus* PL60 en combinación con una dieta habitual también mostró  
361 efecto antiobesogénico en humanos y fue detectada la presencia de los isómeros *c9, t11*  
362 y *t10, c12* en suero de sangre (LeeyLee, 2009). Por otro lado, *Lactobacillus plantarum*  
363 PL62 en combinación con una dieta alta en grasa, también mostró actividad  
364 antiobesogénica en ratones (Lee y col., 2007). Por lo anterior, la implantación directa de



365 las BAL productoras de CLA en el intestinito tiene la ventaja de favorecer el aporte  
366 constante de CLA a través de la fermentación en el intestino (Lee y *col.*, 2007, O'Shea y  
367 *col.*, 2012) y los efectos benéficos de este método ya han sido demostrados en modelos  
368 animales y humanos, aunque los estudios al respecto son muy escasos, lo que sugiere  
369 más estudios de este tipo al respecto.

370

371 Otra estrategia considerada es la síntesis de lípidos estructurados (TAGs o  
372 fosfolípidos ricos en CLA), en la cual, se utilizan lipasas específicas que bajo ciertas  
373 condiciones (medio anhidro) operan como una “sintetasa”, es decir, permite la unión de  
374 un ácido graso en una molécula de glicerol (Valenzuela B y *col.*, 2002). Las reacciones  
375 utilizadas para la síntesis de lípidos estructurados con alto contenido de CLA son la  
376 acidólisis (García y *col.*, 2001, Alim y *col.*, 2008, Blasi y *col.*, 2009), la  
377 transesterificación (Kim y *col.*, 2001, Kim y *col.*, 2001, Torres y *col.*, 2003, Villeneuve y  
378 *col.*, 2007) y la esterificación (Blasi y *col.*, 2008, Hong y *col.*, 2011). En investigaciones  
379 recientes la síntesis de lípidos estructurados han reportado rendimientos hasta del 90%  
380 (Tabla 5), además se han utilizado para preparar alimentos como la margarina (Goli y  
381 *col.*, 2009) aunque se ha sugerido que su uso en alimentos debe ser acompañado de un  
382 buen antioxidante debido a su baja estabilidad oxidativa (Timm-Heinrich y *col.*, 2004,  
383 Lee y *col.*, 2006). La síntesis de lípidos estructurados tiene la ventaja de aprovechar las  
384 propiedades tecnológicas de los propios lípidos (capacidad emulsificante, textura, sabor,  
385 etc.), así como utilizarlos como fuente rica de CLA. Además, ofrece la incorporación  
386 selectiva de CLA en ciertas posiciones del glicerol, lo cual hace al producto más  
387 atractivo para la nutrición (Adamczak y *col.*, 2008). Por ejemplo, si el CLA se encuentra  
388 esterificado en la posición central del triglicérido (*sn-2*) y en las posiciones exteriores  
389 (*sn-1* y *sn-3*) se encuentra ácido láurico, se podría garantizar una óptima absorción de  
390 CLA (Villeneuve y *col.*, 2007). Otra ventaja de este método es que se ha reportado que  
391 los lípidos estructurados no mostraron toxicidad en ratones (Hong y *col.*, 2009). Sin  
392 embargo, una desventaja es su alto costo, por lo que se requiere de más investigaciones  
393 para lograr una producción rentable (Torres y *col.*, 2003). Por otro lado, en ratones se ha  
394 visto que los lípidos estructurados ricos en CLA pueden ser absorbidos en el intestino  
395 delgado (Straarup y *col.*, 2005, Tsuzuki y *col.*, 2006) y solo un estudio ha evaluado el

396 efecto benéfico de los lípidos estructurados. Lee y col. (2005) reportaron que ratones  
397 alimentados con lípidos estructurados (0.6% de CLA) disminuyeron los niveles totales  
398 de colesterol y triglicéridos, y aumentaron los niveles de colesterol HDL.

399

400 Otro método que ha sido considerado es la modificación del contenido de CLA  
401 en la leche y carne de animales rumiantes. El tipo de dieta puede influir positivamente  
402 en la concentración final de CLA (principalmente *c9, t11*) en leche y carne de las  
403 diferentes especies de rumiantes utilizados para la alimentación humana (Raes y col.,  
404 2004, Gagliostro, 2005, Collomb y col., 2006, Elgersma y col., 2006). La  
405 suplementación con aceites vegetales (girasol, cártamo, lino, oliva, canola, etc.) ricos en  
406 ácidos grasos poliinsaturados, principalmente en LA (C18:2) o LNA (C18:3) ha  
407 mostrado ser un método efectivo para incrementar los niveles basales de CLA en leche  
408 de bovino (Flowers y col., 2008, Benchaar y col., 2012), de cabra (Mir y col., 1999,  
409 Bouattour y col., 2008) y de oveja (Reynolds y col., 2006, Gomez-Cortes y col., 2008).  
410 Además, el aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados, también incrementa  
411 el contenido de CLA en leche de bovino (Donovan y col., 2000, Baer y col., 2001,  
412 Shingfield y col., 2006), de oveja (Mozzon y col., 2002, TsiplakouZervas, 2013) y de  
413 búfalo (Patiño y col., 2012). La mezcla de ambos tipos de aceites (vegetal y de pescado)  
414 ha mostrado ser efectiva para incrementar el contenido de CLA en leche de bovino  
415 (AbuGhazalehyHolmes, 2007, AbuGhazaleh, 2008, Brown y col., 2008). Por otro lado,  
416 el grano de maíz puede incrementar los niveles de CLA en leche de oveja y cabra  
417 (Tsiplakou y col., 2010). Además, el tratamiento con calor de las semillas de oleaginosas  
418 ricas en LA podría ser favorable para liberar el aceite y lograr un buen contacto con las  
419 bacterias ruminales e incrementar significativamente los valores de CLA en leche  
420 (Chouinard y col., 2001, Gagliostro, 2005). La alimentación con pasturas también  
421 incrementa el contenido de CLA en leche de bovino (Rego y col., 2004, Morales-  
422 Almaraz y col., 2010, Lahlou y col., 2014), búfala (Tyagi y col., 2007) y oveja (Dervishi  
423 y col., 2012, Joy y col., 2012) y ha mostrado ser más efectiva que la alimentación con  
424 raciones sin pastura cuando fue suplementado aceite de girasol en la dieta de bovinos  
425 (Vahmani y col., 2013). Además, al adicionar sales cálcicas de ácidos grasos a la dieta  
426 con pasturas incrementó la cantidad de CLA leche de bovino en un 366% (Gagliostro,

427 2005). Por otro lado, la utilización de orujo de uva y hojas de olivo en la dieta de ovejas  
428 aumentó la concentración de CLA en leche, sin embargo, en leche de cabra no se  
429 observó este efecto (TsiplakouyZervas, 2008).

430

431 Por otro lado, la utilización de pasturas también ha sido eficiente para  
432 incrementar la cantidad de CLA en carne de bovino (Lorenzen y *col.*, 2007, Garcia y  
433 *col.*, 2008, Pordomingo y *col.*, 2012), así como la utilización de aceite de girasol y aceite  
434 de linaza (Mapiye y *col.*, 2013). También la mezcla de pasturas y concentrados a base de  
435 granos mostraron ser más eficientes que la alimentación a base de solo concentrado  
436 (Alfaia y *col.*, 2009) y la inclusión de semillas de lino en la dieta de bovinos también  
437 incrementó el contenido de CLA en carne (De La Torre y *col.*, 2006) así como las  
438 semillas de linaza y girasol (Mapiye y *col.*, 2013). Por otro lado la alimentación de  
439 ovejas a base de pasturas resultaron ser más eficientes para incrementar la cantidad de  
440 CLA en la carne en comparación con una dieta a base de granos (Scerra y *col.*, 2011).  
441 Por otro lado, la suplementación con aceites vegetales ha incrementado la cantidad de  
442 CLA en carne de bovino (Lorenzen y *col.*, 2007), cordero (Santos-Silva y *col.*, 2003) y  
443 oveja (Ivan y *col.*, 2001) y el uso de semillas de lino también incrementa el contenido de  
444 CLA en carne de oveja (Noci y *col.*, 2011). Una ventaja de este método es que la  
445 suplementación con aceites vegetales incrementa el contenido de CLA y grasa butírica  
446 en leche (Flowers y *col.*, 2008). Por el contrario, una desventaja es que el aceite de  
447 pescado o sales cálcicas de ácidos grasos insaturados pueden disminuir el contenido de  
448 grasa butírica en la leche (Gagliostro, 2005, Brown y *col.*, 2008, Patiño y *col.*, 2012).  
449 Además, el empleo de este tipo de estrategias puede incrementar el costo de producción,  
450 tanto para el ganado de leche como para el de carne. Por otro lado, resulta interesante  
451 resaltar que la elaboración de quesos utilizando leche con alto contenido de CLA  
452 obtenida de bovinos alimentados con aceite de girasol y la utilización de cultivos  
453 iniciadores productores de CLA en la elaboración de queso, potencializó el contenido de  
454 CLA en 2.6 veces (Mohan y *col.*, 2013), lo que sugiere que la combinación de  
455 estrategias puede ser muy favorable para incrementar el contenido de CLA en los  
456 alimentos.

457

458 Las investigaciones donde se evalúa el efecto de productos lácteos, leche o carne  
459 de bovinos enriquecidos con CLA sobre la salud, utilizando este método, son muy  
460 escasos. Roy y *col.* (2007) reportaron que conejos blancos de Nueva Zelanda  
461 alimentados con mantequilla rica en CLA obtenida de la leche de bovino alimentados  
462 con aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados, tendió a reducir los  
463 depósitos de grasa en la aorta, mientras que (Chinnadurai y *col.*, 2008) reportaron que las  
464 mantequillas clarificadas ricas en CLA obtenidas de leche de búfalas suplementadas con  
465 aceite de cacahuete y las suplementadas con aceite de mostaza disminuyeron la  
466 incidencia de tumores mamarios inducidos artificialmente en ratas. Por otro lado,  
467 Chinnadurai y *col.* (2013) reportaron que la mantequilla clarificada rica en CLA  
468 obtenida de leche de búfalas alimentadas con aceite de cacahuete disminuyó el  
469 contenido de triglicéridos y colesterol total, además aumentó el colesterol HDL en ratas.  
470 Mientras que, Reynolds y *col.* (2013) reportaron actividad antidiabetogénica en ratones  
471 *Ob/ob* alimentados con carne de bovino rica en CLA, la cual fue obtenida de animales  
472 alimentados a base de pasturas frescas, aceite de pescado y aceite de girasol.

473

## 474 **7. Conclusión.**

475

476 Los efectos benéficos que confiere el CLA cuando es incluido en la dieta de  
477 animales de laboratorio se ha confirmado durante las últimas dos décadas. Sin embargo,  
478 el CLA no se encuentra en las cantidades adecuadas en los alimentos. Debido a esto, se  
479 han desarrollado diferentes estrategias para incrementar la ingesta de CLA en la dieta.  
480 La síntesis química en condiciones alcalinas es la estrategia tecnológica que hasta la  
481 fecha se ha utilizado para la producción de CLA por ser económica y eficiente. Sin  
482 embargo, el mercado actual es exigente y prefiere el uso de estrategias que no utilicen  
483 compuestos tóxicos como el etilenglicol, t-butyl alcohol, dimetil sulfoxido o dimetil  
484 formamida. Por el contrario, las BAL productoras de CLA y el manejo de la  
485 alimentación de los animales rumiantes son métodos naturales que han demostrado ser  
486 efectivos para incrementar su producción y promover la salud en modelos animales y  
487 humanos, aunque los estudios que se tienen al respecto son muy escasos. Hasta donde es  
488 de nuestro conocimiento, no se encontró evidencia que indique que los lípidos

489 estructurados ricos en CLA contengan trazas de residuos tóxicos. Por lo tanto, se  
490 requieren de más estudios que evalúen esta última estrategia. En conclusión, existen las  
491 estrategias necesarias para aportar una fuente extra de CLA en la dieta de humanos, y las  
492 cuatro estrategias que hasta la fecha han sido consideradas han mostrado ser efectivas  
493 para promover la salud en modelos animales y humanos.

494

## 495 **8. Agradecimientos**

496

497 El primer autor agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología  
498 (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el doctorado en ciencias dentro del  
499 programa de doctorado del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.  
500 (CIAD, A.C.), incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), con  
501 el número 001568.

502

## 503 **9. Referencias**

504

505 Abd El-Salam, M.H., Hippen, A.R., Assem, F.M., El-Shafei, K., Tawfik, N.F. y El-  
506 Aassar, M. (2011). Preparation and properties of probiotic cheese high in  
507 conjugated linoleic acid content. *Int. J. Dairy Technol.* 64, 64-74.

508 Abd El-Salam, M.H., El-Shafei, K., Sharaf, O.M., Effat, B.A., Asem, F.M. y El-Aasar,  
509 M. (2010). Screening of some potentially probiotic lactic acid bacteria for their  
510 ability to synthesis conjugated linoleic acid. *Int. J. Dairy Technol.* 63, 62-69.

511 Abd El-Salam, M.H. y El-Shibiny, S. (2014). Conjugated linoleic acid and vaccenic acid  
512 contents in cheeses: An overview from the literature. *J. Food Compos. Anal.* 33,  
513 117-126.

514 AbuGhazaleh, A.A. y Holmes, L.D. (2007). Diet supplementation with fish oil and  
515 sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially  
516 grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 2897-904.

517 AbuGhazaleh, A.A. (2008). Effect of fish oil and sunflower oil supplementation on milk  
518 conjugated linoleic acid content for grazing dairy cows. *Anim. Feed Sci. Tech.* 141,  
519 220-232.

- 520 Adamczak, M., Bornscheuer, U.T. y Bednarski, W. (2008). Properties and  
521 biotechnological methods to produce lipids containing conjugated linoleic acid. *Eur.*  
522 *J. Lipid Sci. Tech.* 110, 491-504.
- 523 Aharoni, Y., Orlov, A. y Brosh, A. (2004). Effects of high-forage content and oilseed  
524 supplementation of fattening diets on conjugated linoleic acid (CLA) and trans fatty  
525 acids profiles of beef lipid fractions. *Anim. Feed Sci. Tech.* 117, 43-60.
- 526 Akalin, A.S., Tokuşoğlu, Ö., Gönç, S. y Aycan, Ş. (2007). Occurrence of conjugated  
527 linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *Int.*  
528 *Dairy J.* 17, 1089-1095.
- 529 Alfaia, C.P.M., Alves, S.P., Martins, S.I.V., Costa, A.S.H., Fontes, C.M.G.A., Lemos,  
530 J.P.C., Bessa, R.J.B. y Prates, J.A.M. (2009). Effect of the feeding system on  
531 intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle, with  
532 emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. *Food Chem.* 114,  
533 939-946.
- 534 Alim, M.A., Lee, J.H., Shin, J.A., Lee, Y.J., Choi, M.S., Akoh, C.C. y Lee, K.T. (2008).  
535 Lipase-catalyzed production of solid fat stock from fractionated rice bran oil, palm  
536 stearin, and conjugated linoleic acid by response surface methodology. *Food Chem.*  
537 *106*, 712-719.
- 538 Alonso, L., Cuesta, E.P. y Gilliland, S.E. (2003). Production of free conjugated linoleic  
539 acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin.  
540 *J. Dairy Sci.* 86, 1941-6.
- 541 Andrade, J.C., AscenÇÃO, K., GullÓN, P., Henriques, S.M.S., Pinto, J.M.S., Rocha-  
542 Santos, T.A.P., Freitas, A.C. y Gomes, A.M. (2012). Production of conjugated  
543 linoleic acid by food-grade bacteria: A review. *Int. J. Dairy Tech.* 65, 467-481.
- 544 Atti, N., Rouissi, H. y Othmane, M.H. (2006). Milk production, milk fatty acid  
545 composition and conjugated linoleic acid (CLA) content in dairy ewes raised on  
546 feedlot or grazing pasture. *Livest. Sci.* 104, 121-127.
- 547 Avilez, J.P.R., Vilches, C.I.S. y Alonzo, M.W.V. (2009). Amonut of conjugate linolec  
548 acid (ALC) in lacteal foods in Chile. *Rev. Chil. Nutr.* 36, 143-150.

549 Baddini Feitoza, A., Fernandes Pereira, A., Ferreira da Costa, N. y Gonçalves Ribeiro,  
550 B. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA): effect modulation of body composition  
551 and lipid profile. *Nutr. Hosp.* 24, 422-428.

552 Baer, R.J., Ryali, J., Schingoethe, D.J., Kasperson, K.M., Donovan, D.C., Hippen, A.R.  
553 y Franklin, S.T. (2001). Composition and properties of milk and butter from cows  
554 fed fish oil. *J. Dairy Sci.* 84, 345-53.

555 Baeza-Jiménez, R., Noriega-Rodríguez, J.A., García, H.S. y Otero, C. (2012). Structured  
556 phosphatidylcholine with elevated content of conjugated linoleic acid: Optimization  
557 by response surface methodology. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 114, 1261-1267.

558 Banni, S. (2002). Conjugated linoleic acid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 261-6.

559 Bargo, F., Delahoy, J.E., Schroeder, G.F., Baumgard, L.H. y Muller, L.D. (2006).  
560 Supplementing total mixed rations with pasture increase the content of conjugated  
561 linoleic acid in milk. *Anim. Feed Sci. Tech.* 131, 226-240.

562 Bassaganya-Riera, J., Pogranichniy, R.M., Jobgen, S.C., Halbur, P.G., Yoon, K.J.,  
563 O'Shea, M., Mohede, I. y Hontecillas, R. (2003). Conjugated linoleic acid  
564 ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced immunosuppression.  
565 *J. Nutr.* 133, 3204-14.

566 Bauman, D.E. y Lock, A.L. (2006). Conjugated Linoleic Acid: Biosynthesis and  
567 Nutritional Significance. *Advanced Dairy Chemistry Volume 2 Lipids*. Springer US.

568 Belury, M.A. (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects  
569 and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* 22, 505-31.

570 Benchaar, C., Romero-Perez, G.A., Chouinard, P.Y., Hassanat, F., Eugene, M., Petit,  
571 H.V. y Cortes, C. (2012). Supplementation of increasing amounts of linseed oil to  
572 dairy cows fed total mixed rations: effects on digestion, ruminal fermentation  
573 characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.*  
574 95, 4578-90.

575 Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, J. y Fernandes, G. (2006). Biological  
576 effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J. Nutr. Biochem.* 17, 789-  
577 810.

578 Blasi, F., Cossignani, L., Bosi, A., Maurelli, S., D'Arco, G., Fiorini, D., Simonetti, M. y  
579 Damiani, P. (2008). Synthesis and Structural Analysis of Structured

580 Triacylglycerols with CLA Isomers in the sn-2- Position. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85,  
581 613-619.

582 Blasi, F., Maurelli, S., Cossignani, L., D'Arco, G., Simonetti, M. y Damiani, P. (2009).  
583 Study of Some Experimental Parameters in the Synthesis of Triacylglycerols with  
584 CLA Isomers and Structural Analysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 531-537.

585 Blasi, F., Dominici, L., Moretti, M., Villarini, M., Maurelli, S., Simonetti, M.S.,  
586 Damiani, P. y Cossignani, L. (2012). In vitro genotoxicity/antigenotoxicity testing  
587 of some conjugated linoleic acid isomers using comet assay. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*  
588 114, 1016-1024.

589 Bouattour, M.A., Casals, R., Albanell, E., Such, X. y Caja, G. (2008). Feeding soybean  
590 oil to dairy goats increases conjugated linoleic acid in milk. *J. Dairy Sci.* 91, 2399-  
591 407.

592 Brown, W., AbuGhazaleh, A.A. y Ibrahim, S.A. (2008). Milk Conjugated Linoleic Acid  
593 Response to Fish Oil and Linseed Oil Supplementation of Grazing Dairy Cows.  
594 *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21,

595 Brownbill, R.A., Petrosian, M. y Ilich, J.Z. (2005). Association between dietary  
596 conjugated linoleic acid and bone mineral density in postmenopausal women. *J. Am.*  
597 *Coll. Nutr.* 24, 177-81.

598 Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D. y Ryhänen, E.-L. (2006). Conjugated  
599 linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *Int. Dairy J.* 16, 1347-  
600 1361.

601 Changhua, L., Jindong, Y., Defa, L., Lidan, Z., Shiyan, Q. y Jianjun, X. (2005).  
602 Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression of  
603 proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with lipopolysaccharide. *J.*  
604 *Nutr.* 135, 239-44.

605 Chardigny, J.M., Masson, E., Sergiel, J.P., Darbois, M., Loreau, O., Noel, J.P. y  
606 Sebedio, J.L. (2003). The position of rumenic acid on triacylglycerols alters its  
607 bioavailability in rats. *J. Nutr.* 133, 4212-4.

608 Chin, S.F., Liu, W., Storkson, J.M., Ha, Y.L. y Pariza, M.W. (1992). Dietary sources of  
609 conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of  
610 anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5, 185-197.



611 Chinnadurai, K., Tyagi, A.K. y Krishnamoorthy, P. (2008). Influence of conjugated  
612 linoleic acid enriched ghee feeding on cancer incidence and histopathological  
613 changes in 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene induced mammary gland  
614 carcinogenesis in rats. *Veterinarsky Archiv.* 78, 511-520.

615 Chinnadurai, K., Kanwal, H., Tyagi, A., Stanton, C. y Ross, P. (2013). High conjugated  
616 linoleic acid enriched ghee (clarified butter) increases the antioxidant and  
617 antiatherogenic potency in female Wistar rats. *Lipids Health Dis.* 12, 1-9.

618 Choi, Y., Park, Y., Pariza, M.W. y Ntambi, J.M. (2001). Regulation of stearyl-CoA  
619 desaturase activity by the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid in  
620 HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284, 689-93.

621 Chouinard, P.Y., Corneau, L., Butler, W.R., Chilliard, Y., Drackley, J.K. y Bauman,  
622 D.E. (2001). Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid  
623 concentrations in milk fat. *J. Dairy Sci.* 84, 680-90.

624 Churrucá, I., Fernández-Quintela, A. y Portillo, M.P. (2009). Conjugated linoleic acid  
625 isomers: differences in metabolism and biological effects. *Biofactors.* 35, 105-11.

626 Dannenberger, D., Nuernberg, K., Nuernberg, G., Scollan, N., Steinhart, H. y Ender, K.  
627 (2005). Effect of pasture vs. concentrate diet on CLA isomer distribution in  
628 different tissue lipids of beef cattle. *Lipids* 40, 589-98.

629 De La Torre, A., Gruffat, D., Durand, D., Micol, D., Peyron, A., Scislowski, V. y  
630 Bauchart, D. (2006). Factors influencing proportion and composition of CLA in  
631 beef. *Meat Sci.* 73, 258-268.

632 de Renobales, M., Amores, G., Arranz, J., Virto, M., Barrón, L.J.R., Bustamante, M.A.,  
633 Ruiz de Gordo, J.C., Nájera, A.I., Valdivielso, I., Abilleira, E., Beltrán de Heredia,  
634 I., Pérez-Elortondo, F.J., Ruiz, R., Albisu, M. y Mandaluniz, N. (2012). Part-time  
635 grazing improves sheep milk production and its nutritional characteristics. *Food*  
636 *Chem.* 130, 90-96.

637 Dervishi, E., Joy, M., Sanz, A., Alvarez-Rodriguez, J., Molino, F. y Calvo, J.H. (2012).  
638 Forage preservation (grazing vs. hay) fed to ewes affects the fatty acid profile of  
639 milk and CPT1B gene expression in the sheep mammary gland. *BMC Vet. Res.* 8,  
640 106.

641 do Espírito Santo, A.P., Cartolano, N.S., Silva, T.F., Soares, F.A.S.M., Gioielli, L.A.,  
642 Perego, P., Converti, A. y Oliveira, M.N. (2012). Fibers from fruit by-products  
643 enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in  
644 yoghurts. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 135-144.

645 Domagała, M., Sady, D., Najgebauer-Lejko, M. y Czernicka, W. (2009). The content of  
646 conjugated linoleic acid (cla) in cream fermented using different starter cultures.  
647 *Bioch. Anim. Husbandry.* 25, 745-751.

648 do Nascimento, P.M.L., Farjalla, Y.B. y do Nascimento, J.L. (2009). Fatty acids and  
649 conjugated linoleic acids content in beef cattle. *REDVET* 10, 1-84.

650 Donovan, D.C., Schingoethe, D.J., Baer, R.J., Ryali, J., Hippen, A.R. y Franklin, S.T.  
651 (2000). Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids  
652 in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 2620-8.

653 Dugan, M.E., Aalhus, J.L. y Kramer, J.K. (2004). Conjugated linoleic acid pork  
654 research. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 1212S-1216S.

655 Elgersma, A., Tamminga, S. y Ellen, G. (2006). Modifying milk composition through  
656 forage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 207-225.

657 Ens, J.G., Ma, D.W.L., Cole, K.S., Field, C.J. y Clandinin, M.T. (2001). An assessment  
658 of c9,t11 linoleic acid intake in a small group of young Canadians. *Nutr. Res.* 21,  
659 955-960.

660 Florence, A., da Silva, R., Santo, A., Gioielli, L., Tamime, A. y de Oliveira, M. (2009).  
661 Increased CLA content in organic milk fermented by bifidobacteria or yoghurt  
662 cultures. *Dairy Sci. Technol.* 89, 541-553.

663 Flowers, G., Ibrahim, S.A. y AbuGhazaleh, A.A. (2008). Milk fatty acid composition of  
664 grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *J. Dairy Sci.* 91, 722-30.

665 Fremann, D., Linseisen, J. y Wolfram, G. (2002). Dietary conjugated linoleic acid  
666 (CLA) intake assessment and possible biomarkers of CLA intake in young women.  
667 *Public Health Nutr.* 5, 73-80.

668 Fritsche, J. y Steinhart, H. (1998). Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in  
669 German foods and evaluation of daily intake. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 206, 77-  
670 82.

671 Gagliostro, G.A. (2005). Nutritional control of conjugated linoleic acid (CLA) content in  
672 milk and in natural food. *Rev. Arg. Prod. Anim* 24, 137-163.

673 Garcia, H.S., Arcos, J.A., Keough, K.J. y Hill Jr, C.G. (2001). Immobilized lipase-  
674 mediated acidolysis of butteroil with conjugated linoleic acid: batch reactor and  
675 packed bed reactor studies. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*. 11, 623-632.

676 Garcia, P.T., Pensel, N.A., Sancho, A.M., Latimori, N.J., Kloster, A.M., Amigone, M.A.  
677 y Casal, J.J. (2008). Beef lipids in relation to animal breed and nutrition in  
678 Argentina. *Meat Sci*. 79, 500-508.

679 Gaullier, J.-M., Berven, G., Blankson, H. y Gudmundsen, O. (2002). Clinical trial results  
680 support a preference for using CLA preparations enriched with two isomers rather  
681 than four isomers in human studies. *Lipids*. 37, 1019-1025.

682 Goli, S., Sahri, M., Kadivar, M. y Keramat, J. (2009). The Production of an  
683 Experimental Table Margarine Enriched with Conjugated Linoleic Acid (CLA):  
684 Physical Properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 453-458.

685 Goli, S.A.H., Kadivar, M., Keramat, J. y Fazilati, M. (2008). Conjugated linoleic acid  
686 (CLA) production and lipase-catalyzed interesterification of purified CLA with  
687 canola oil. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 110, 400-404.

688 Gomez-Cortes, P., Frutos, P., Mantecon, A.R., Juarez, M., de la Fuente, M.A. y Hervás,  
689 G. (2008). Milk production, conjugated linoleic acid content, and in vitro ruminal  
690 fermentation in response to high levels of soybean oil in dairy ewe diet. *J. Dairy*  
691 *Sci.* 91, 1560-9.

692 Ha, Y.L., Grimm, N.K. y Pariza, M.W. (1987). Anticarcinogens from fried ground beef:  
693 heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis* 8, 1881-1887.

694 Henriksen, E.J., Teachey, M.K., Taylor, Z.C., Jacob, S., Ptock, A., Kramer, K. y  
695 Hasselwander, O. (2003). Isomer-specific actions of conjugated linoleic acid on  
696 muscle glucose transport in the obese Zucker rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol.*  
697 *Metab.* 285, E98-E105.

698 Hernandez-Martin, E. y Otero, C. (2009). Enzymatic re-esterification of lower  
699 glycerides from soybean oil with conjugated linoleic acid (CLA). *J. Agric. Food*  
700 *Chem.* 57, 701-8.

701 Hernandez-Mendoza, A., Lopez-Hernandez, A., Hill, C.G. y Garcia, H.S. (2009).  
702 Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus reuteri*  
703 under different growth conditions. *J. Chem. Technol. Biot.* 84, 180-185.

704 Hong, S., Park, C.-K., Cho, B.-G., Wee, J.-J., Hyun, S. y Chung, S.-K. (2009). A  
705 subchronic toxicity study and in vitro genotoxicity studies of conjugated linoleic  
706 acid-diglyceride type structured lipid. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52, 545-  
707 554.

708 Hong, S.I., Kim, Y., Kim, C.-T. y Kim, I.-H. (2011). Enzymatic synthesis of  
709 lysophosphatidylcholine containing CLA from sn-glycero-3-phosphatidylcholine  
710 (GPC) under vacuum. *Food Chem.* 129, 1-6.

711 Hong, S.I., Kim, Y., Yoon, S.W., Cho, S.Y. y Kim, I.-H. (2012). Synthesis of CLA-  
712 enriched TAG by *Candida antarctica* lipase under vacuum. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*  
713 114, 1044-1051.

714 Houseknecht, K.L., Vanden Heuvel, J.P., Moya-Camarena, S.Y., Portocarrero, C.P.,  
715 Peck, L.W., Nickel, K.P. y Belury, M.A. (1998). Dietary conjugated linoleic acid  
716 normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat.  
717 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 678-82.

718 Hossen, M. y Hernandez, E. (2005). Enzyme-catalyzed synthesis of structured  
719 phospholipids with conjugated linoleic acid. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 107, 730-736.

720 Hubbard, N.E., Lim, D. y Erickson, K.L. (2003). Effect of separate conjugated linoleic  
721 acid isomers on murine mammary tumorigenesis. *Cancer lett.* 190, 13-9.

722 Huesca-Toral, A., López-Hernández, A., Angulo-Guerrero, J.O., Hill Jr, C.G. y García,  
723 H.S. (2005). Síntesis de triacilglicérols ricos en ácido linoleico conjugado (CLA)  
724 mediante esterificación enzimática en un medio libre de solvente. *Rev. Mex. Ing. Q.*  
725 4, 75-87.

726 Inoue, N., Nagao, K., Hirata, J., Wang, Y.M. y Yanagita, T. (2004). Conjugated linoleic  
727 acid prevents the development of essential hypertension in spontaneously  
728 hypertensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 679-84.

729 Ip, C., Lisk, D.J. y Scimeca, J.A. (1994). Potential of food modification in cancer  
730 prevention. *Cancer Res.* 54, 1957s-1959s.

731 Ip, C., Dong, Y., Ip, M.M., Banni, S., Carta, G., Angioni, E., Murru, E., Spada, S.,  
732 Melis, M.P. y Saebo, A. (2002). Conjugated linoleic acid isomers and mammary  
733 cancer prevention. *Nutr. Cancer* 43, 52-8.

734 Ivan, M., Mir, P.S., Koenig, K.M., Rode, L.M., Neill, L., Entz, T. y Mir, Z. (2001).  
735 Effects of dietary sunflower seed oil on rumen protozoa population and tissue  
736 concentration of conjugated linoleic acid in sheep. *Small Ruminant Res.* 41, 215-  
737 227.

738 Jahreis, G. (1997). Krebshemmende Fettsäuren in Milch und Rindfleisch. *Ernährungs-*  
739 *Umschau* 44, 168–172.

740 Jiang, J., Wolk, A. y Vessby, B. (1999). Relation between the intake of milk fat and the  
741 occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *Am. J. Clin. Nutr.*  
742 70, 21–27.

743 Joy, M., Ripoll, G., Molino, F., Dervishi, E. y Alvarez-Rodriguez, J. (2012). Influence of  
744 the type of forage supplied to ewes in pre- and post-partum periods on the meat fatty  
745 acids of suckling lambs. *Meat Sci.* 90, 775-82.

746 Kapoor, R., Reaney, M. y Westcott, N.D. (2005). Conjugated Linoleic Acid Oils. *En:*  
747 *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons, Inc.

748 Kelley, N.S., Hubbard, N.E. y Erickson, K.L. (2007). Conjugated linoleic acid isomers  
749 and cancer. *J. Nutr.* 137, 2599-607.

750 Kelly, O., Cusack, S., Jewell, C. y Cashman, K.D. (2003). The effect of polyunsaturated  
751 fatty acids, including conjugated linoleic acid, on calcium absorption and bone  
752 metabolism and composition in young growing rats. *Br. J. Nutr.* 90, 743-50.

753 Kelly, O. y Cashman, K.D. (2004). The effect of conjugated linoleic acid on calcium  
754 absorption and bone metabolism and composition in adult ovariectomised rats.  
755 *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 71, 295-301.

756 Khanal, R.C. y Dhiman, T.R. (2004). Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A  
757 review. *Pak. J. Nutr.* 3, 72-81.

758 Kim, I.-H., Yoon, C.-S., Cho, S.-H., Lee, K.-W., Chung, S.-H. y Tae, B.-S. (2001).  
759 Lipase-catalyzed incorporation of conjugated linoleic acid into tricaprylin. *J. Amer.*  
760 *Oil Chem. Soc.* 78, 547-551.

761 Kim, I.H., Yoon, C.S. y Lee, K.W. (2001). Transesterification of conjugated linoleic  
762 acid and tricaprylin by lipases in organic solvents. *Food Res. Int.* 34, 301-306.

763 Kishino, S., Ogawa, J., Omura, Y., Matsumura, K. y Shimizu, S. (2002). Conjugated  
764 linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *J. Am. Oil Chem.*  
765 *Soc.* 79, 159-163.

766 Kramer, J.G., Sehat, N., Dugan, M.R., Mossoba, M., Yurawecz, M., Roach, J.G., Eulitz,  
767 K., Aalhus, J., Schaefer, A. y Ku, Y. (1998). Distributions of conjugated linoleic  
768 acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture  
769 determined by gas chromatography and silver ion-high-performance liquid  
770 chromatography. *Lipids* 33, 549-558.

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

774 Kritchevsky, D., Tepper, S.A., Wright, S., Czarnecki, S.K., Wilson, T.A. y Nicolosi, R.J.  
775 (2004). Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: growth and  
776 regression of lesions. *Lipids* 39, 611-6.

777 Lahlou, M.N., Kanneganti, R., Massingill, L.J., Broderick, G.A., Park, Y., Pariza, M.W.,  
778 Ferguson, J.D. y Wu, Z. (2014). Grazing increases the concentration of CLA in  
779 dairy cow milka. *Animal.* 1-10.

780 Lai, C., Yin, J., Li, D., Zhao, L. y Chen, X. (2005). Effects of dietary conjugated linoleic  
781 acid supplementation on performance and immune function of weaned pigs. *Arch.*  
782 *Anim. Nutr.* 59, 41-51.

783 Laloux, L., du Chaffaut, L., Razanamahefa, L. y Lafay, L. (2007). Trans fatty acid  
784 content of foods and intake levels in France. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* 109, 918-929.

785 Lee, H.Y., Park, J.H., Seok, S.H., Baek, M.W., Kim, D.J., Lee, K.E., Paek, K.S. y Lee,  
786 Y. (2006). Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce  
787 conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice.  
788 *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 736-44.

789 Lee, J.H., Cho, K.H., Lee, K.T. y Kim, M.R. (2005). Antiatherogenic effects of  
790 structured lipid containing conjugated linoleic acid in C57BL/6J mice. *J. Agric.*  
791 *Food Chem.* 53, 7295-301.

792 Lee, J.H., Lee, K.T., Akoh, C.C., Chung, S.K. y Kim, M.R. (2006). Antioxidant  
793 evaluation and oxidative stability of structured lipids from extravirgin olive oil and  
794 conjugated linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.* 54, 5416-21.

795 Lee, K., Paek, K., Lee, H.Y., Park, J.H. y Lee, Y. (2007). Antiobesity effect of trans-  
796 10,cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-  
797 induced obese mice. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1140-6.

798 Lee, K. y Lee, Y. (2009). Production of c9,t11- and t10,c12-conjugated linoleic acids in  
799 humans by *Lactobacillus rhamnosus* PL60. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19, 1617-9.

800 Lee, K.N., Pariza, M.W. y Ntambi, J.M. (1998). Conjugated linoleic acid decreases  
801 hepatic stearyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res.*  
802 *Commun.* 248, 817-21.

803 Lee, K.W., Lee, H.J., Cho, H.Y. y Kim, Y.J. (2005). Role of the conjugated linoleic acid  
804 in the prevention of cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 135-44.

805 Lee, S.O., Kim, C.S., Cho, S.K., Choi, H.J., Ji, G.E. y Oh, D.K. (2003). Bioconversion  
806 of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed  
807 cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol. Lett.* 25, 935-8.

808 Liu, P., Shen, S.R., Ruan, H., Zhou, Q., Ma, L.L. y He, G.Q. (2011). Production of  
809 conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally  
810 fermented Chinese pickles. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 12, 923-30.

811 Loor, J.J., Lin, X. y Herbein, J.H. (2002). Dietary trans-vaccenic acid (trans11-18:1)  
812 increases concentration of cis9,trans11-conjugated linoleic acid (rumenic acid) in  
813 tissues of lactating mice and suckling pups. *Reprod. Nutr. Dev.* 42, 85-99.

814 Lorenzen, C.L., Golden, J.W., Martz, F.A., Grun, I.U., Eilersieck, M.R., Gerrish, J.R. y  
815 Moore, K.C. (2007). Conjugated linoleic acid content of beef differs by feeding  
816 regime and muscle. *Meat Sci.* 75, 159-67.

817 Luna, P., Bach, A., Juárez, M. y de la Fuente, M.A. (2008). Influence of diets rich in flax  
818 seed and sunflower oil on the fatty acid composition of ewes' milk fat especially on  
819 the level of conjugated linoleic acid, n-3 and n-6 fatty acids. *Int. Dairy J.* 18, 99-  
820 107.

821 MacDonald, H.B. (2000). Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of  
822 current knowledge. *J. Am. Coll. Nutr.* 19, 111S-118S.

823 Mapiye, C., Aalhus, J.L., Turner, T.D., Rolland, D.C., Basarab, J.A., Baron, V.S.,  
824 McAllister, T.A., Block, H.C., Uttaro, B., Lopez-Campos, O., Proctor, S.D. y  
825 Dugan, M.E. (2013). Effects of feeding flaxseed or sunflower-seed in high-forage  
826 diets on beef production, quality and fatty acid composition. *Meat Sci.* 95, 98-109.

827 Maurelli, S., Blasi, F., Cossignani, L., Bosi, A., Simonetti, M. y Damiani, P. (2009a).  
828 Enzymatic Synthesis of Structured Triacylglycerols Containing CLA Isomers  
829 Starting from sn-1,3-Diacylglycerols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86, 127-133.

830 Maurelli, S., Blasi, F., Cossignani, L., Bosi, A., Simonetti, M.S. y Damiani, P. (2009b).  
831 Production and structural analysis of triacylglycerols containing capric acid and  
832 conjugated linoleic acid isomers obtained by enzymatic acidolysis. *J. Sci. Food Agr.*  
833 89, 2595-2600.

834 McLeod, R.S., LeBlanc, A.M., Langille, M.A., Mitchell, P.L. y Currie, D.L. (2004).  
835 Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein  
836 metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 1169S-1174S.

837 Meraz-Torres, L.S. y Hernandez-Sanchez, H. (2012). Conjugated Linoleic Acid in Dairy  
838 Products: A Review. *Am. J. Food Technol.* 7, 176-179.

839 Mir, Z., Goonewardene, L.A., Okine, E., Jaegar, S. y Scheer, H.D. (1999). Effect of  
840 feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain  
841 fatty acids in goats milk. *Small Ruminant Res.* 33, 137-143.

842 Mohan, M.S., Anand, S., Kalscheur, K.F., Hassan, A.N. y Hippen, A.R. (2013). Starter  
843 cultures and cattle feed manipulation enhance conjugated linoleic acid  
844 concentrations in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 96, 2081-2094.

845 Morales-Almaraz, E., Soldado, A., Gonzalez, A., Martinez-Fernandez, A., Dominguez-  
846 Vara, I., de la Roza-Delgado, B. y Vicente, F. (2010). Improving the fatty acid  
847 profile of dairy cow milk by combining grazing with feeding of total mixed ration.  
848 *J. Dairy Res.* 77, 225-30.

849 Mozzon, M., Frega, N.G., Fronte, B. y Tocchini, M. (2002). Effect of Dietary Fish Oil  
850 Supplements on Levels of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids, trans Acids and  
851 Conjugated Linoleic Acid in Ewe Milk *Food Technol. Biotechnol.* 43, 213-219.



852 Murphy, J.J., Coakley, M. y Stanton, C. (2008). Supplementation of dairy cows with a  
853 fish oil containing supplement and sunflower oil to increase the CLA content of  
854 milk produced at pasture. *Livest. Sci.* 116, 332-337.

855 Nagao, K., Inoue, N., Wang, Y.M., Hirata, J., Shimada, Y., Nagao, T., Matsui, T. y  
856 Yanagita, T. (2003). The 10trans,12cis isomer of conjugated linoleic acid  
857 suppresses the development of hypertension in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty  
858 rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 134-8.

859 Nascimento, P.M.L.d., Farjalla, T.B. y Nascimento, J.L.d. (2009). Fatty acids and  
860 conjugated linoleic acids content in beef cattle. *REDVET* 10, 1-84.

861 Noci, F., Monahan, F.J. y Moloney, A.P. (2011). The fatty acid profile of muscle and  
862 adipose tissue of lambs fed camelina or linseed as oil or seeds. *Animal.* 5, 134-47.

863 Ntambi, J.M. (1999). Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty  
864 acids and cholesterol. *J. Lipid Res.* 40, 1549-58.

865 Nunes, J.C. y Torres, A.G. (2010). Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy  
866 products, and contribution to daily intake of CLA. *J. Food Compos. Anal.* 23, 782-  
867 789.

868 O'Shea, E.F., Cotter, P.D., Stanton, C., Ross, R.P. y Hill, C. (2012). Production of  
869 bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic  
870 mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 152,  
871 189-205.

872 O'Shea, M., Bassaganya-Riera, J. y Mohede, I.C. (2004). Immunomodulatory properties  
873 of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 1199S-1206S.

874 Ogawa, J., Kishino, S., Ando, A., Sugimoto, S., Mihara, K. y Shimizu, S. (2005).  
875 Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* 100,  
876 355-64.

877 Pandit, A., Anand, S., Kalscheur, K. y Hassan, A. (2012). Production of conjugated  
878 linoleic acid by lactic acid bacteria in milk without any additional substrate. *Int. J.*  
879 *Dairy Technol.* 65, 603-608.

880 Pariza, M.W. y Hargraves, W.A. (1985). A beef-derived mutagenesis modulator inhibits  
881 initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene.  
882 *Carcinogenesis* 6, 591-3.

- 883 Park, Y., Albright, K.J., Liu, W., Cook, M.E. y Pariza, M.W. (1995). Dietary conjugated  
884 linoleic acid (CLA) reduces body fat content and isomers of CLA are incorporated  
885 into phospholipid fraction. *IFT Book of Abstract* 183.
- 886 Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W. y Pariza, M.W. (2005). Biological  
887 activities of conjugated fatty acids: conjugated eicosadienoic (conj.  
888 20:2delta(c11,t13/t12,c14)), eicosatrienoic (conj. 20:3delta(c8,t12,c14)), and  
889 heneicosadienoic (conj. 21:2delta(c12,t14/c13,t15)) acids and other metabolites of  
890 conjugated linoleic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 1687, 120-9.
- 891 Park, Y. y Pariza, M.W. (2007). Mechanisms of body fat modulation by conjugated  
892 linoleic acid (CLA). *Food Res. Int.* 40, 311-323.
- 893 Park, Y. (2009). Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat? *J. Food*  
894 *Compos. Anal.* 22, Supplement, S4-S12.
- 895 Patiño, E.M., Judis, M.A., Negrette, M.S., Pochon, D.O., Cedres, J.F., Rebak, G.,  
896 Romero, A.M., Doval, M.M. y Crudeli, G.A. (2012). Influence of fish oil in the  
897 concentration of conjugated linoleic acid and omega 6 and 3 in buffalo milk. *Arq.*  
898 *Bras. Med. Vet. Zootec.* 64, 427-433.
- 899 Pordomingo, A.J., Garcia, T.P. y Volpi Lagreca, G. (2012). Effect of feeding treatment  
900 during the backgrounding phase of beef production from pasture on: II.  
901 Longissimus muscle proximate composition, cholesterol and fatty acids. *Meat Sci.*  
902 90, 947-55.
- 903 Poulson, C.S., Dhiman, T.R., Ure, A.L., Cornforth, D. y Olson, K.C. (2004). Conjugated  
904 linoleic acid content of beef from cattle fed diets containing high grain, CLA, or  
905 raised on forages. *Livest. Prod. Sci.* 91, 117-128.
- 906 Prandini, A., Sigolo, S., Tansini, G., Brogna, N. y Piva, G. (2007). Different level of  
907 conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *J. Food Compos. Anal.*  
908 20, 472-479.
- 909 Puniya, A., Reddy, C., Kumar, S. y Singh, K. (2009). Influence of sunflower oil on  
910 conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus*  
911 *casei*. *Ann. Microbiol.* 59, 505-507.

912 Puniya, A.K., Chaitanya, S., Tyagi, A.K., De, S. y Singh, K. (2008). Conjugated linoleic  
913 acid producing potential of lactobacilli isolated from the rumen of cattle. *J. Ind.*  
914 *Microbiol. Biotechnol.* 35, 1223-8.

915 Radunz, A.E., Wickersham, L.A., Loerch, S.C., Fluharty, F.L., Reynolds, C.K. y Zerby,  
916 H.N. (2009). Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation on fatty  
917 acid composition in muscle and subcutaneous adipose tissue of lambs. *J. Anim. Sci.*  
918 87, 4082-91.

919 Raes, K., De Smet, S. y Demeyer, D. (2004). Effect of dietary fatty acids on  
920 incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid  
921 in lamb, beef and pork meat: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 113, 199-221.

922 Rego, O.A., Portugal, P.V., Sousa, M.B., Rosa, H.J.D., Vouzela, C.M., Borba, A.E.S. y  
923 Bessa, R.J.B. (2004). Effect of diet on the fatty acid pattern of milk from dairy  
924 cows. *Anim. Res.* 53, 213–220.

925 Reynolds, C.K., Cannon, V.L. y Loerch, S.C. (2006). Effects of forage source and  
926 supplementation with soybean and marine algal oil on milk fatty acid composition  
927 of ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131, 333-357.

928 Reynolds, C.M., Toomey, S., McBride, R., McMonagle, J., Morine, M.J., Belton, O.,  
929 Moloney, A.P. y Roche, H.M. (2013). Divergent effects of a CLA-enriched beef  
930 diet on metabolic health in ApoE<sup>-/-</sup> and ob/ob mice. *J. Nutr. Biochem.* 24, 401-  
931 411.

932 Ringseis, R., Muller, A., Dusterloh, K., Schleser, S., Eder, K. y Steinhart, H. (2006).  
933 Formation of conjugated linoleic acid metabolites in human vascular endothelial  
934 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 377-83.

935 Ritzenthaler, K.L., McGuire, M.K., Falen, R., Shultz, T.D., Dasgupta, N. y McGuire,  
936 M.A. (2001). Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary  
937 assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by food duplicate  
938 methodology. *J. Nutr.* 131, 1548-54.

939 Rocha-Uribe, A. y Hernández, E. (2004). Synthesis of linoleic conjugated acid by alkali  
940 isomerization using propylene glycol as solvent. *Rev. Mex. Ing. Q.* 3, 193-200.

941 Rodríguez-Alcalá, L.M., Braga, T., Xavier Malcata, F., Gomes, A. y Fontecha, J. (2011).  
942 Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacterium

943 and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag<sup>+</sup>-HPLC  
944 techniques. *Food Chem.* 125, 1373-1378.

945 Roy, A., Chardigny, J.M., Bauchart, D., Ferlay, A., Lorenz, S., Durand, D., Gruffat, D.,  
946 Faulconnier, Y., Sebedio, J.L. y Chilliard, Y. (2007). Butters rich either in trans-10-  
947 C18:1 or in trans-11-C18:1 plus cis-9, trans-11 CLA differentially affect plasma  
948 lipids and aortic fatty streak in experimental atherosclerosis in rabbits. *Animal.* 1,  
949 467-76.

950 Salamon, R.V., Lóki, K., Varga-Visi, É., Mándoki, Z. y Csapó, J. (2009). Increase of  
951 conjugated linoleic acid content of dairy products by adding sunflower oil. *Acta*  
952 *Univ. Sapientiae Alimentaria* 2, 287–293.

953 Santos-Silva, J., Bessa, R.J. y Mendes, I.A. (2003). The effect of supplementation with  
954 expanded sunflower seed on carcass and meat quality of lambs raised on pasture.  
955 *Meat Sci.* 65, 1301-8.

956 Scerra, M., Luciano, G., Caparra, P., Foti, F., Cilione, C., Giorgi, A. y Scerra, V. (2011).  
957 Influence of stall finishing duration of Italian Merino lambs raised on pasture on  
958 intramuscular fatty acid composition. *Meat Sci.* 89, 238-42.

959 Sebedio, J.L., Juaneda, P., Gregoire, S., Chardigny, J.M., Martin, J.C. y Ginies, C.  
960 (1999). Geometry of conjugated double bonds of CLA isomers in a commercial  
961 mixture and in their hepatic 20:4 metabolites. *Lipids* 34, 1319-25.

962 Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Laskaridis, K. y Sagredos, A. (2012). Chemical  
963 characteristics, fatty acid composition and conjugated linoleic acid (CLA) content of  
964 traditional Greek yogurts. *Food Chem.* 134, 1839-1846.

965 Serafeimidou, A., Zlatanov, S., Kritikos, G. y Tourianis, A. (2013). Change of fatty acid  
966 profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated  
967 storage of yogurt made of cow and sheep milk. *J. Food Compos. Anal.* 31, 24-30.

968 Shingfield, K.J., Reynolds, C.K., Hervás, G., Griinari, J.M., Grandison, A.S. y Beever,  
969 D.E. (2006). Examination of the Persistency of Milk Fatty Acid Composition  
970 Responses to Fish Oil and Sunflower Oil in the Diet of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*  
971 89, 714-732.

972 Sieber, R., Collomb, M., Aeschlimann, A., Jelen, P. y Eyer, H. (2004). Impact of  
973 microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products—a review. *Int.*  
974 *Dairy J.* 14, 1-15.

975 Straarup, E.M., Porsgaard, T., Mu, H., Hansen, C.H. y Hoy, C.E. (2005). Lymphatic  
976 transport in rats of interesterified oils containing conjugated linoleic acids. *Lipids*  
977 40, 677-84.

978 Sugano, M., Tsujita, A., Yamasaki, M., Yamada, K., Ikeda, I. y Kritchevsky, D. (1997).  
979 Lymphatic recovery, tissue distribution, and metabolic effects of conjugated linoleic  
980 acid in rats. *J. Nutr. Biochem.* 8, 38-43.

981 Timm-Heinrich, M., Skall Nielsen, N., Xu, X. y Jacobsen, C. (2004). Oxidative stability  
982 of structured lipids containing C18:0, C18:1, C18:2, C18:3 or CLA in sn2-position –  
983 as bulk lipids and in milk drinks. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 5, 249-261.

984 Torres, C.F., Lin, B., Moeljadi, M. y Hill, J.C.G. (2003). Lipase-catalyzed synthesis of  
985 designer acylglycerols rich in residues of eicosapentaenoic, docosahexaenoic,  
986 conjugated linoleic, and/or stearic acids. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105, 614-623.

987 Tsiplakou, E. y Zervas, G. (2008). The effect of dietary inclusion of olive tree leaves and  
988 grape marc on the content of conjugated linoleic acid and vaccenic acid in the milk  
989 of dairy sheep and goats. *J. Dairy Res.* 75, 270-8.

990 Tsiplakou, E., Kotrotsios, V., Hadjigeorgiou, I. y Zervas, G. (2010). Differences in  
991 sheep and goats milk fatty acid profile between conventional and organic farming  
992 systems. *J. Dairy Res.* 77, 343-9.

993 Tsiplakou, E. y Zervas, G. (2013). Changes in milk and plasma fatty acid profile in  
994 response to fish and soybean oil supplementation in dairy sheep. *J. Dairy Res.* 80,  
995 205-13.

996 Tsuzuki, T., Kawakami, Y., Abe, R., Nakagawa, K., Koba, K., Imamura, J., Iwata, T.,  
997 Ikeda, I. y Miyazawa, T. (2006). Conjugated linolenic acid is slowly absorbed in rat  
998 intestine, but quickly converted to conjugated linoleic acid. *J. Nutr.* 136, 2153-9.

999 Tsuzuki, T. y Ikeda, I. (2007). Slow absorption of conjugated linoleic acid in rat  
1000 intestines, and similar absorption rates of 9c,11t-conjugated linoleic acid and  
1001 10t,12c-conjugated linoleic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 2034-40.

- 1002 Tyagi, A.K., Kewalramani, N., Dhiman, T.R., Kaur, H., Singhal, K.K. y Kanwajia, S.K.  
1003 (2007). Enhancement of the conjugated linoleic acid content of buffalo milk and  
1004 milk products through green fodder feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 133, 351-358.
- 1005 Vahmani, P., Fredeen, A.H. y Glover, K.E. (2013). Effect of supplementation with fish  
1006 oil or microalgae on fatty acid composition of milk from cows managed in  
1007 confinement or pasture systems. *J. Dairy Sci.* 96, 6660-6670.
- 1008 Valenzuela B, A., Sanhueza C, J. y Nieto K, S. (2002). El uso de lípidos estructurados  
1009 en la nutrición: una tecnología que abre nuevas perspectivas en el desarrollo de  
1010 productos innovadores. *Rev. Chil. Nutr.* 29, 106-115.
- 1011 Van Nieuwenhove, C.P., Oliszewski, R., Gonzalez, S.N. y Perez Chaia, A.B. (2007a).  
1012 Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and  
1013 buffalo milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 467-74.
- 1014 Van Nieuwenhove, C.P., Oliszewski, R., González, S.N. y Pérez Chaia, A.B. (2007b).  
1015 Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on  
1016 conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Res. Int.* 40, 559-564.
- 1017 Villeneuve, P., Barouh, N., Baréa, B., Piombo, G., Figueroa-Espinoza, M.C., Turon, F.,  
1018 Pina, M. y Lago, R. (2007). Chemoenzymatic synthesis of structured  
1019 triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position. *Food*  
1020 *Chem.* 100, 1443-1452.
- 1021 Wall, R., Ross, R.P., Shanahan, F., O'Mahony, L., O'Mahony, C., Coakley, M., Hart, O.,  
1022 Lawlor, P., Quigley, E.M., Kiely, B., Fitzgerald, G.F. y Stanton, C. (2009).  
1023 Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of  
1024 murine and porcine liver and adipose tissues. *Am. J. Clin. Nutr.* 89, 1393-401.
- 1025 Wang, Y. y Jones, P.J. (2004). Dietary conjugated linoleic acid and body composition.  
1026 *Am. J. Clin. Nutr.* 79, 1153S-1158S.
- 1027 Wolff, R. y Precht, D. (2002). Reassessment of the contribution of bovine milk fats to  
1028 the trans-18:1 isomeric acid consumption by European populations. Additional data  
1029 for ruminic (cis-9,trans-11 18:2) acid. *Lipids* 37, 1149-1150.
- 1030 Yadav, H., Jain, S. y Sinha, P.R. (2007). Production of free fatty acids and conjugated  
1031 linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and  
1032 *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *Int. Dairy J.* 17, 1006-1010.

1033 Yamasaki, M., Kishihara, K., Mansho, K., Ogino, Y., Kasai, M., Sugano, M., Tachibana,  
1034 H. y Yamada, K. (2000). Dietary conjugated linoleic acid increases immunoglobulin  
1035 productivity of Sprague-Dawley rat spleen lymphocytes. *Biosci. Biotechnol.*  
1036 *Biochem.* 64, 2159-64.

1037 Yamasaki, M., Chujo, H., Hirao, A., Koyanagi, N., Okamoto, T., Tojo, N., Oishi, A.,  
1038 Iwata, T., Yamauchi-Sato, Y., Yamamoto, T., Tsutsumi, K., Tachibana, H. y  
1039 Yamada, K. (2003). Immunoglobulin and cytokine production from spleen  
1040 lymphocytes is modulated in C57BL/6J mice by dietary cis-9, trans-11 and trans-10,  
1041 cis-12 conjugated linoleic acid. *J. Nutr.* 133, 784-8.

1042 Zhang, R.H., Mustafa, A.F. y Zhao, X. (2006). Effects of feeding oilseeds rich in  
1043 linoleic and linolenic fatty acids to lactating ewes on cheese yield and on fatty acid  
1044 composition of milk and cheese. *Anim. Feed Sci. Tech* 127, 220-233.

1045

1046

1047

1048

1049

1050

1051

1052

1053

1054

1055 Figura 1. Estructuras del LA y los isómeros *c9*, *t11* y *10t*, *12c*.

1056 Figura 2. Síntesis de CLA en rumen y glándula mamaria a partir de LA y LNA.

1057

1058 Tabla 1. Concentración de CLA en alimentos derivados de animales rumiantes

1059 Tabla 2. Consumo dietario de CLA en humanos

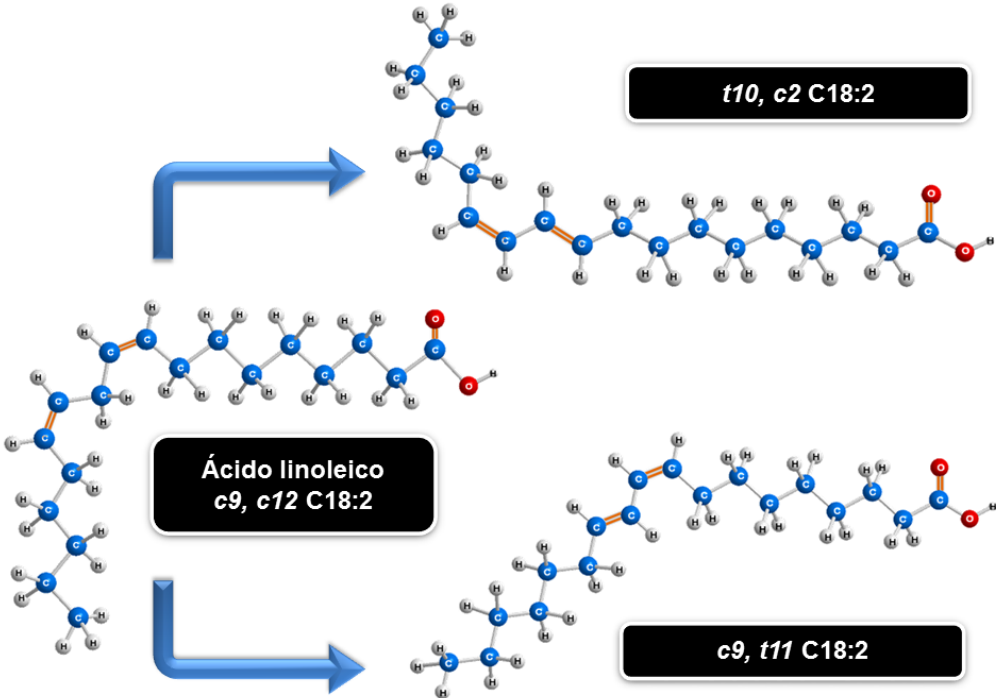
1060 Tabla 3. Lácteos fermentados con BAL productoras de CLA

1061 Tabla 4. Lípidos estructurados con CLA

1062 Tabla 5. Contenido de CLA en leche y carne de rumiantes alimentados con diferentes  
1063 dietas

1064

Figura 1. Estructuras del LA y los isómeros *c9*, *t11* y *10t*, *12c*.



1065

1066

1067

1068

1069

1070

1071

1072

1073

1074

1075

1076

1077

1078

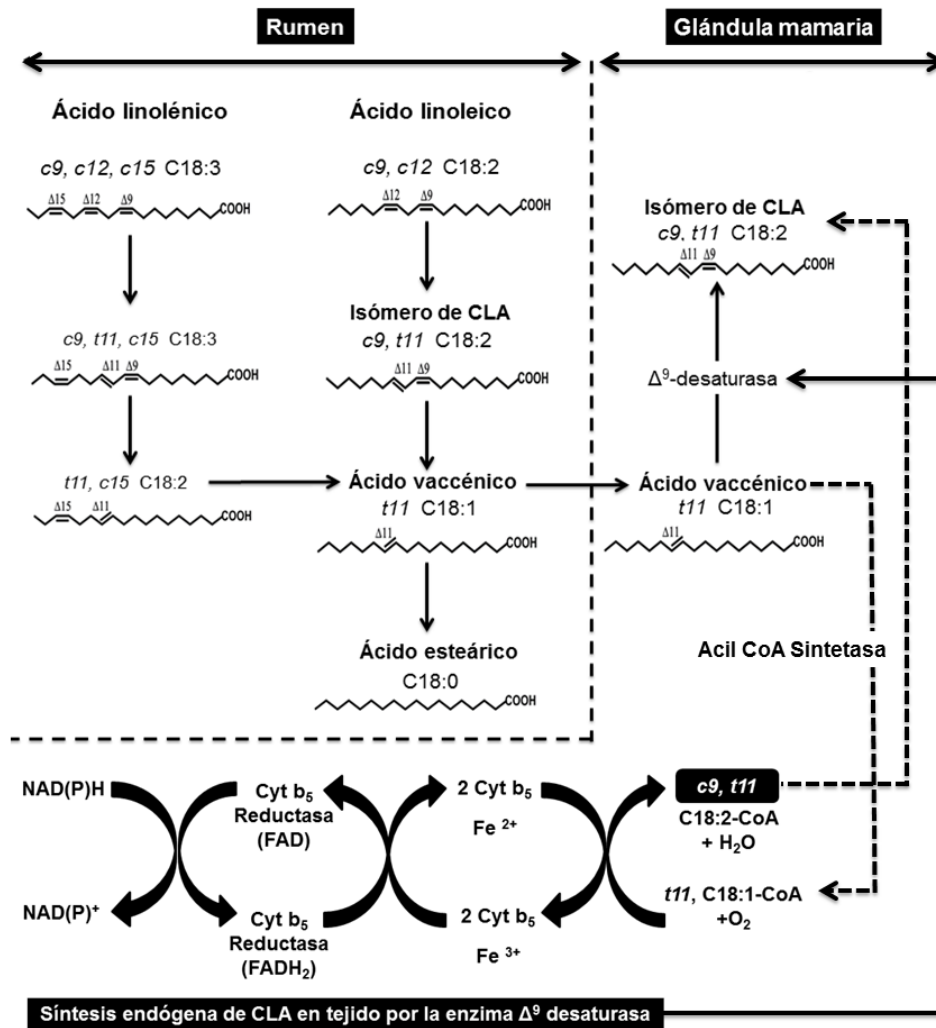
1079

1080

1081



1082 Figura 2. Síntesis de CLA en rumen y glándula mamaria a partir de LA y LNA.  
 1083



1084  
 1085  
 1086  
 1087  
 1088  
 1089  
 1090  
 1091  
 1092

1093 Tabla 1. Concentración de CLA en alimentos derivados de animales rumiantes

1094

<b>Fuente</b>	<b>Concentración de CLA</b>	<b>Referencia</b>	<b>1095</b>
Leche oveja	1.17 - 2.97 g/100g de grasa	Gagliostro y <i>col.</i> (2005)	1096
Leche cabra	0.59 - 3.24 g/100 g de grasa	Gagliostro y <i>col.</i> (2005)	1097
Leche bovino	6.5 - 8.5 mg/g de grasa	Nunez y <i>col.</i> (2010)	1098
Yogurt oveja	0.76 g/100 g de grasa	Serafeimidou y <i>col.</i> (2013)	1099
Yogurt cabra	0.522 g/100g de grasa	Serafeimidou y <i>col.</i> (2012)	1100
Yogurt bovino	0.859 g/100g de grasa	Serafeimidou y <i>col.</i> (2012)	1101
Queso oveja	0.907 - 2.780 mg/g de ácidos grasos	Abd El-Salam y El-Shibiny (2014)	1102
Queso cabra	0.690 - 0.710 mg/g de ácidos grasos	Abd El-Salam y El-Shibiny (2014)	1103
Queso bovino	0.750-0.840 mg/g de ácidos grasos	Adb El-Salam y <i>col.</i> (2011)	1104
Mantequilla	4.0 - 5.5 mg/g de grasa	Nunez y <i>col.</i> (2010)	1105
Crema	1.78 - 1.95 g/100 g de ácidos grasos	Avilez y <i>col.</i> (2009)	1106
Carne cordero	5.6 mg/g de grasa	Chin y <i>col.</i> (1992)	1107
Carne bovino	5.37 - 6.31 mg/g de grasa	Do Nascimento y <i>col.</i> (2009)	1108

1109

1110

1111

1112 Tabla 2. Consumo dietario de CLA en humanos

<b>País</b>	<b>Alimentos</b>	<b>Ingesta de CLA (mg/día)</b>	<b>Referencia</b>
Alemania	Dieta habitual	360	Jahreis (1997)
Alemania	Dieta habitual	440 H- 360 M	Fritsche y Steinhart (1998)
Suecia	Dieta habitual	160 H	Jiang y <i>col.</i> (1999)
Canadá	Dieta habitual	15 – 174	Ens y <i>col.</i> (2001)
Estados Unidos	Dieta habitual	210 H – 150 M	Ritzenthaler y <i>col.</i> (2001)
Alemania	Dieta habitual	320 M	Fremann y <i>col.</i> (2002)
Unión Europea	Lácteos	140 H- 380 M	Wolff y Precht (2002)
Francia	Dieta habitual	210 H- 180 M	Laloux y <i>col.</i> (2007)
Chile	Lácteos	30 – 240	Avilez y <i>col.</i> (2009)
Brasil	Lácteos	36	Nunez y <i>col.</i> (2010)

1113 H= Hombres; M=Mujeres.

1114

1115

1116

1117

1118

1119 Tabla 3. Lácteos fermentados con BAL productoras de CLA

Producto lácteo fermentado	Sustrato	Concentración de CLA	Referencia
Leche fermentada:			
<i>Lactobacillus, Streptococcus, Bifidobacterium</i>	LA	90 - 198.6 mg/L	Van Nieuwenhove y col. (2007a)
<i>Lactobacillus</i>	AG	5.67 – 10.53 mg/g de grasa	Puniya y col. (2008)
<i>Lactobacillus</i>	AG	2.73 - 11 mg/L	Puniya y col. (2009)
<i>Lactobacillus</i>	AG	142.22 – 188.64 mg/100 g de grasa	Salamon y col. (2009)
<i>Lactobacillus, Propionibacterium, Leuconostoc, Lactococcus, Enterococcus</i>	ASL	4.52 – 21.6 mg/L	Adb El-Salam y col. (2010)
<i>Lactobacillus, Lactococcus, Bifidobacterium</i>	LA, AG	8.01 – 41.62 mg/L	Rodríguez-Alcalá y col. (2011)
<i>Pediococcus, Bifidobacterium, Lactobacillus, Lactococcus</i>	SN	0.43 – 0.87 g/100g de ácidos grasos	Pandit y col. (2012)
Dahi (CI, <i>L. acidophilus, L. casei</i> )	SN	10.5 mg/g de grasa	Yadav y col. (2007)
Yogurt (CI, <i>L. acidophilus La-5, B. animalis Bb-12</i>	SN	2.07-6.01 mg/g de grasa	Akalin y col. (2007)
Yogurt (CI, <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> )	SN	1.18-1.85 g/100g	Florence y col. (2009)
Yogurt (CI, <i>L. acidophilus, B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> )	SN	0.5-1.1 g/100 g de grasa	do Espírito Santo y col. (2012)
Crema (CI)	SN	3.81-4.13 mg/g de grasa	Domagala y col. (2009)
Queso (CI, <i>L. rhamnosus, L. casei, S. thermophilus</i> )	AG	4.9 6.9 mg/g de grasa	Van Nieuwenhove y col. (2007b)
Queso (CI, <i>L. acidophilus, L. casei</i> )	AS	0.76-0.86% ácidos grasos	Abd El-Salam y col. (2011)

1120 Son mezclas de bacterias que incluyen un cultivo iniciador y un probiótico productor de CLA. CI, cultivo iniciador; LA, ácido linoleico; AG, aceite de  
 1121 girasol; ASL aceite de sésamo lipolizado; AS, aceite de soya; SN, sin fuente de LA.

1122

1123 Tabla 4. Lípidos estructurados con CLA

<b>Lípido estructurado</b>	<b>Sustrato/Sistema de reacción</b>	<b><sup>1</sup>R (%)</b>	<b>Referencia</b>
Fosfatidilcolina	Lecitina de soya, CLA/Acidólisis	85.8	Baeza-Jiménez y col. (2012)
Triacilglicerol	<i>sn</i> -1,3-DAG, CLA/Esterificación	81.5	Blasi y col. (2008)
Lisofosfatidilcolina	<i>sn</i> -1,2-Fosfatidilcolina, CLA/Esterificación	70 mol	Hong y col. (2011)
Triacilglicerol	Glicerol, CLA/Esterificación	90	Hong y col. (2012)
Diacilglicerol	Aceite de soya, CLA/Re-esterificación	84	Hernández-Martín y Otero (2009)
Triacilgliceridos	Glicerol, CLA, ácido cáprico/Acidólisis	73.2	Maurelli y col. (2009b)
Triacilglicerol	Aceite de canola, CLA/Acidólisis	26.6 mol	Goli y col. (2008)
Triacilglicerol	<i>sn</i> -1,3-DAG, CLA/Acidólisis	46.3	Blasi y col. (2009)
Triacilglicerol	<i>sn</i> -1,3-DAG, CLA/Acidólisis	47.5	Maurelli y col. (2009a)
Lípido estructurado	<i>sn</i> -1,3-DAG, CLA/Acidólisis	39.45	Rocha-Uribe y Hernández, (2004)
Fosfolípido	Fosfatidilcolina, CLA/Acidólisis	16	Hossen y Hernández (2005)
Triacilglicerol	Glicerol, CLA/Esterificación	76 mol	Huesca-Toral y col. (2005)

1124

1125 <sup>1</sup> R, rendimiento. CLA, mezcla de isómeros de ácido linoleico conjugado; DAG, diacilglicerol.

1126

1127

1128

1129 Tabla 5. Contenido de CLA en leche y carne de rumiantes alimentados con diferentes dietas

Especie	Propósito	Alimentación	Concentración de CLA	Referencia	
Bovinos	Leche	Dieta	0.71 g/100g de ácidos grasos	Donovan y col. (2000)	
		Dieta+AP	2.53 g/100g de ácidos grasos		
	Leche	Ración mezclada	0.59 g/100g de ácidos grasos	Bargo y col. (2006)	
		Pastura	1.21 g/100g de ácidos grasos		
	Leche	Pastura	0.8 g/100g de ácidos grasos	AbuGhazaleh, (2008)	
		Pastura+AP+AG	1.6 g/100g de ácidos grasos		
	Leche	Concentrado	0.66 g/100g de ácidos grasos	Brown y col. (2008)	
		Pastura+AP+AL	2.56 g/100g de ácidos grasos		
	Leche	Pastura	Pastura	1.76 g/100g de ácidos grasos	Murphy y col. (2008)
			Pastura+AP	2.16 g/100g de ácidos grasos	
			Pastura+AG	1.87 g/100g de ácidos grasos	
			Pastura+AP+AG	2.36 g/100g de ácidos grasos	
	Leche	Dieta	0.71 g/100g de ácidos grasos	Lahlou y col. (2014)	
		Pastura	1.06 g/100g de ácidos grasos		
Oveja	Leche	Dieta	6.9 mg/g de grasa	Mozzon y col. (2002)	
		Dieta+AP	29.8 mg/g de grasa		
	Leche	Concentrado	2.4 g/kg de grasa	Atti y col. (2006)	
		Pastura	10.4 g/kg de grasa		
	Leche	Pastura	0.71 g /100g de grasa	Reynolds y col. (2006)	

		Pastura+AS+AAM	2.80 g/100g de grasa	
	Leche	Concentrado	11 g/kg de ácidos grasos	Zhang y col. (2006)
		Concentrado+SL	17 g/kg de ácidos grasos	
		Concentrado+SG	25 g/kg de ácidos grasos	
	Leche	Dieta	1.04 g/100g de ácidos grasos	Gómez-Cortés y col. (2008)
		Dieta+AS	3.44 g/100g de ácidos grasos	
	Leche	Dieta	0.47 g /100g de grasa	Luna y col. (2008)
		Dieta+SL+AG	0.85 g /100g de grasa	
	Leche	Concentrado	15.88 $\mu$ mol/g de grasa	de Renobales y col. (2012)
		Pastura	50.25 $\mu$ mol/g de grasa	
Búfala	Leche	Concentrado	7.7 mg/g de grasa	Tyagi y col. (2007)
		Forraje	17 mg/g de grasa	
	Leche	Pastura	3.83 mg/g de grasa	Patiño y col. (2012)
		Pastura+AP	7.14 mg/g de grasa	
Bovino	Carne	Forraje	4 g/kg de ácidos grasos	Aharoni y col. (2004)
		Forraje+SL	6.7 de ácidos grasos	
	Carne	Dieta	0.25 g/100g de ácidos grasos	Poulson y col. (2004)
		Pastura	0.46 g/100g de ácidos grasos	
	Carne	Concentrado	11.7 mg/100 g de musculo fresco	Dannenberger y col. (2005)
		Pastura	14.4 mg/100 g de musculo fresco	
	Carne	Dieta	2.85 mg/g de grasa	Lorenzen y col. (2007)

		Pastura	5.24 mg/g de grasa	
		Pastura+AS	9.38 mg/g de grasa	
	Carne	Concentrado	2.65 mg/g de grasa	Alfaia y col. (2009)
		Concentrado+pastura	5.76 mg/g de grasa	
		Pastura	5.14 mg/g de grasa	
Oveja	Carne	Dieta	3.9 mg/g de lípidos	Ivan y col. (2001)
		Dieta+AG	5.2 mg/g de lípidos	
	Carne	Concetrado	0.43 g/100g de ácidos grasos	Radunz y col. (2009)
		Concetrado+AAM+AS	0.61 g/100g de ácidos grasos	
	Carne	Dieta+MG	0.82 g/100g de ácidos grasos	Noci y col. (2011)
		Dieta+AC	0.95 g/100g de ácidos grasos	
		Dieta+AL	0.98 g/100g de ácidos grasos	
		Dieta+SC	1.24 g/100g de ácidos grasos	
		Dieta+SL	1.41 g/100g de ácidos grasos	

1130 AP, aceite de pescado; AL, aceite de linaza; AG, aceite de girasol; AS, aceite de soya; AAM, aceite de alga marina; SL, semilla de lino; SG, semilla de  
1131 girasol; AC, aceite de camelia; SC, semilla de camelia; Concentrado, alimento a base de granos; Dieta, alimento formulado y balanceado.

1132

1133

1134

1135

1136

1137



## **Capítulo 2.** Producción de ácido linoleico conjugado (CLA) por bacterias ácido lácticas (BAL) y su efecto benéfico para la salud

*Sosa-Castañeda, Jesús; Hernández-Mendoza, Adrián; González-Córdova, Aarón Fernando; Vallejo-Cordoba, Belinda.* Artículo aceptado en la revista *INTERCIENCIA*.

### **Resumen**

El ácido linoléico conjugado (CLA) es un lípido bioactivo que se encuentra de forma natural principalmente en alimentos derivados de animales rumiantes. Se ha demostrado que la suplementación con CLA ejerce efectos positivos en la salud en una amplia variedad de modelos *in vivo*, sin embargo, este no se encuentra en cantidades suficientes en los alimentos. Por lo anterior, se han propuesto estrategias para incrementar la disponibilidad de CLA en el organismo por medio de procesos biotecnológicos. Una de estas estrategias ha sido el empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de CLA en los alimentos. Otra ha sido, a través de la ingesta de BAL, que por sus características particulares, una vez implantadas en el intestino, producen CLA. Este trabajo presenta una revisión de las investigaciones realizadas sobre la producción endógena (a nivel intestinal en organismos monogástricos) de CLA y exógena en alimentos lácteos fermentados. Además, presenta el potencial del CLA para promover efectos benéficos en la salud humana.



## RESUMEN

32

33

34 El ácido linoléico conjugado (ALC) es un lípido bioactivo que se  
35 encuentra de forma natural principalmente en alimentos derivados de animales  
36 rumiantes. Se ha demostrado que la suplementación con ALC ejerce efectos  
37 positivos en la salud en una amplia variedad de modelos *in vivo*, sin embargo,  
38 este no se encuentra en cantidades suficientes en los alimentos. Por lo anterior,  
39 se han propuesto estrategias para incrementar la disponibilidad de ALC en el  
40 organismo por medio de procesos biotecnológicos. Una de estas estrategias ha  
41 sido el empleo de bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de ALC (BAL-ALC)  
42 en los alimentos. Otra ha sido, la ingesta de BAL, que por sus características  
43 particulares, una vez implantadas en el intestino, producen ALC. Este trabajo  
44 presenta una revisión de las investigaciones realizadas sobre la producción  
45 endógena de ALC a nivel intestinal en organismos monogástricos y exógena en  
46 alimentos lácteos fermentados. Además, presenta el potencial del ALC para  
47 promover efectos benéficos en la salud humana.

48 Palabras clave: ácido linoleico conjugado, bacterias ácido lácticas, alimentos  
49 lácteos fermentados, efectos benéficos en la salud.

50

## 51 1. INTRODUCCIÓN

52

53 El ALC es un grupo de ácidos grasos poliinsaturados que se encuentra  
54 de manera natural en una amplia variedad de alimentos como isómeros  
55 geométricos y posicionales del ácido linoleico (AL). Los principales organismos  
56 productores de ALC son los animales rumiantes, y esto se debe principalmente  
57 a la bioisomerización del AL por la compleja microflora ruminal que poseen. Es  
58 por ello, que el ALC se puede encontrar de forma natural en la carne de res y  
59 cordero, así como en los productos lácteos derivados de la leche de estos  
60 animales (Park y Pariza, 2007; Baddini Feitoza et al., 2009; Andrade et al.,  
61 2012).

62           Diversos estudios, principalmente realizados en modelos animales, han  
63           demostrado que el ALC posee efectos benéficos para el organismo, dichos  
64           efectos incluyen, disminución del riesgo de padecer cáncer, prevención de  
65           enfermedades cardiovasculares; disminución del tejido graso y aumento del  
66           tejido muscular y masa ósea; aumento de la producción de anticuerpos e  
67           interferones y disminución del proceso inflamatorio a través de la regulación de  
68           citocinas pro-inflamatorias y prostaglandinas (O'Shea et al., 2004; Changhua et  
69           al., 2005; Bhattacharya et al., 2006). Dichos efectos biológicos se le han  
70           atribuido principalmente a los isómeros *cis-9, trans-12 (c9, t11)* y *trans-10, cis-*  
71           *12 (t10,c12)* (Obregón y Valenzuela, 2009; Soto-Rodríguez et al., 2011). Sin  
72           embargo, estudios realizados sobre el consumo de ALC en los alimentos,  
73           sugieren que la ingesta diaria está por debajo de la dosis necesaria para ejercer  
74           los efectos benéficos (Ritzenthaler et al., 2001).

75

76           Debido a que el contenido de ALC presente en los alimentos no provee la  
77           cantidad suficiente para cubrir los requerimientos necesarios para inducir dichos  
78           beneficios y que en organismos monogástricos como el humano, no se generan  
79           cantidades importantes de ALC, se han buscado diferentes alternativas que  
80           ayuden a cubrir dichos requerimientos. Aunque la isomerización alcalina del AL  
81           es un método industrial comúnmente usado para preparar ALC para consumo  
82           humano, este método presenta algunas desventajas, como presencia de  
83           residuos tóxicos y baja proporción de los isómeros biológicamente activos  
84           (Gaullier et al., 2002; Rocha-Urbe y Hernández, 2004; Hernandez-Mendoza et  
85           al., 2009, Blasi et al., 2012).

86

87           En los últimos años, algunas investigaciones han demostrado que las  
88           BAL, principalmente probióticas, han mostrado capacidad de sintetizar ALC *in*  
89           *vitro*, generando altas proporciones de los isómeros más activos biológicamente  
90           (Ogawa et al., 2005; Andrade et al., 2012). Esto ofrece interesantes  
91           posibilidades para la elaboración de productos lácteos fermentados con BAL-  
92           ALC. Además, el uso de BAL-ALC probióticas posibilitó el hecho de aumentar

93 los niveles de ALC en el organismo a través de la ingesta directa de estas  
94 bacterias. El objetivo de esta revisión es presentar una actualización de la  
95 información disponible sobre las BAL-ALC a través de síntesis endógena  
96 (implantación a nivel intestinal) y exógena, por su producción en la leche como  
97 matriz alimentaria. Además, analiza el potencial de estos métodos para  
98 incrementar la disponibilidad de ALC en el organismo para promover efectos  
99 benéficos en la salud.

100

## 101 **2. ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (ALC)**

102

103 El ALC es una mezcla de isómeros geométricos (*cis/trans*) y posicionales  
104 (localización de los dobles enlaces) del ácido linoleico (AL) (*ácido 9, 12-*  
105 *octadecadienoico*) que se puede encontrar en alimentos como los lácteos y  
106 cárnicos. El isómero de mayor abundancia en los alimentos es el *c9, t11* (ácido  
107 ruménico), el cual representa más del 80% del total de ALC, y su concentración  
108 depende de la fuente y procesamiento del alimento (Chin et al., 1992;  
109 Gagliostro, 2005; Bhattacharya et al., 2006).

110

111 Estudios previos realizados con ratas, ratones, cerdos y conejos, han  
112 demostrado que el ALC posee una amplia variedad de propiedades benéficas  
113 para el organismo cuando es incluido en la dieta como suplemento  
114 (Bhattacharya et al., 2006; Park, 2009; Churruca et al., 2009). En años  
115 recientes, gracias a los avances tecnológicos, se ha venido estudiando el efecto  
116 de los isómeros de ACL por separado, principalmente los isómeros *c9, t11* y  
117 *t10, c12*, evidenciando que los efectos benéficos son inducidos y/o  
118 potencializados por algún isómero en particular (Cuadro 1). Sin embargo, la  
119 mayoría de estos estudios se han realizado utilizando ALC producido por  
120 síntesis química (Park, 2009). Por lo que, la biogeneración de ALC por medio  
121 de BAL, ya sea de manera endógena en el intestino de monogástricos o  
122 exógena en el alimento o en ambos, constituye una alternativa para incrementar  
123 la disponibilidad de ALC en el organismo.

### 124 3. SÍNTESIS DE ALC

125

126 Para propósito de esta revisión, se considera a la síntesis endógena  
127 como toda aquella biosíntesis de ALC que ocurre a nivel fisiológico en el  
128 intestino de monogástricos por acción de las BAL. En algunos estudios se ha  
129 visto que la flora bacteriana intestinal de humanos tiene la capacidad de  
130 sintetizar ALC *in vitro* (Oh et al., 2003; Coakley et al., 2003; Alonso et al., 2003;  
131 Conte-Junior et al., 2007; McIntosh et al., 2009; Gorissen et al., 2010). Por lo  
132 que, con la finalidad de potenciar la producción de ALC a nivel intestinal, se ha  
133 estudiado el efecto de la inoculación de animales monogástricos con BAL. En  
134 un estudio *in vivo* se detectó el isómero *t10, c12* en suero de ratones sometidos  
135 a una dieta alta en grasa, después de la inoculación por tres semanas de una  
136 cepa específica de *L. rhamnosus PL60* (Lee et al., 2006a). En otro estudio, se  
137 detectó el isómero *c9, t11* en tejido de ratones y cerdos inoculados con  
138 *Bifidobacterium breve NCIMB 702258* y suplementados con AL y aceite de  
139 girasol (Wall et al., 2009). De manera similar, se detectaron los isómeros *c9,*  
140 *t11; t9, c11 y t10, c12* en tejido de ratones inoculados con *Butyrivibrio*  
141 *fibrisolvens* y una dieta rica en AL (Fukuda et al., 2006).

142

143 Por otro lado, para incrementar aún más la concentración de ALC en el  
144 organismo, se inocularon cepas recombinantes de *Lactobacillus*, que  
145 expresaban altas cantidades de linoleato isomerasa, en ratones con dieta  
146 suplementada con AL y se observó cuatro veces más cantidad del isómero *t10,*  
147 *c12* en tejido, que cuando se utilizó una cepa no productora (Rosberg-Cody et  
148 al., 2011). En estudios con humanos, se detectó *L. rhamnosus PL60* (productor  
149 de ALC *in vitro e in vivo*) en heces después de una semana de ingesta y los  
150 isómeros *c9, t11 y t10, c12* en suero después de 21 días de administración (Lee  
151 y Lee, 2009). En base a lo anterior, es evidente que es posible aumentar la  
152 disponibilidad de ALC en el organismo, y en particular, proporcionar los  
153 isómeros biológicamente más activos a través de la implantación de BAL  
154 específicas a nivel intestinal. Sin embargo, debido a que tanto la producción de

155 ALC, como la capacidad de implantación en el intestino, es dependiente de la  
156 cepa, la búsqueda de nuevas cepas de BAL-ALC, continúa siendo un área de  
157 investigación con gran potencial para ser explorada

158

159 Se considera a la síntesis exógena como todos aquellos cambios o  
160 incrementos en el contenido de ALC que no ocurren a nivel fisiológico y que son  
161 producidos por las BAL en un medio de cultivo o en un alimento. Además, para  
162 fines de esta revisión se consideraron a los isómeros *c9*, *t11y t10*, *c12* como los  
163 principales isómeros de AL sintetizados por las BAL. Se ha visto que las BAL  
164 aisladas de distintos orígenes son capaces de sintetizar ALC bajo diferentes  
165 condiciones de fermentación (Owaga et al., 2001; Ham et al., 2002; Coakley et  
166 al., 2003; Alonso et al., 2003; Gorissen et al. (2010). Sin embargo, también se  
167 ha reportado que no todas las BAL poseen esa capacidad, aunque pertenezcan  
168 al mismo género y a la misma especie y que la producción de ALC es  
169 dependiente de la cepa (Kishino et al., 2002).).

170

171 Diferentes estudios han evaluado la capacidad productora de ALC de  
172 ciertas BAL en medio de cultivo suplementado con una fuente de AL como  
173 sustrato bajo diferentes condiciones de temperatura, tiempos de incubación y  
174 pH (Cuadro 2) (Lin et al., 2003; Alonso et al., 2003; Lee et al., 2003 a, b; Song  
175 et al. 2005; Roman-Nuñez et al., 2007; Hernández-Mendoza et al., 2009; Lui et  
176 al., 2011; Dubey et al., 2012). Las BAL-ALC son más susceptibles o disminuyen  
177 su crecimiento celular por efecto del AL, lo que sustenta la hipótesis de que la  
178 isomerización del AL es un mecanismo de desintoxicación (Jenkins y Courtney,  
179 2003).

180

181 Otras investigaciones han reportado la capacidad de cepas de BAL para  
182 sintetizar ALC utilizando como medio de cultivo leche descremada  
183 suplementada con una fuente de AL (Cuadro 3). Algunos investigadores han  
184 fortificado leche con diferentes concentraciones de AL (Pandit et al., 2012;  
185 Nieuwenhove et al., 2007a), aceite de girasol (Kim y Lui, 2002; Puniya et al.

186 2008; Salamon *et al.* 2009; Puniya *et al.* 2009; Rodriguez-Alcala *et al.*, 2011) y  
187 aceites hidrolizados (Xu *et al.*, 2004; El-Salam *et al.*, 2010; Dubey *et al.* 2012;  
188 Ye *et al.* 2013). Se ha demostrado que la producción de ALC es mayor cuando  
189 el aceite es hidrolizado y que la grasa de leche produce mayor concentración de  
190 ALC que el aceite de soya (Xu *et al.*, 2004). Además, se ha reportado que la  
191 suplementación con aceite hidrolizado favorece la concentración celular (El-  
192 Salam *et al.* 2010).

193

194 Con la finalidad de incrementar la concentración de ALC, se ha explorado  
195 el uso de co-cultivos y prebióticos en leche. Una mezcla de microorganismos  
196 puede incrementar la producción de ALC en relación al uso de cultivos puros  
197 (Ye *et al.*, 2013). Además, el uso de prebióticos con co-cultivos incrementa la  
198 producción de ALC (Oliveira *et al.*, 2009) y con cultivos puros mejora  
199 significativamente la bioconversión de AL a ALC (Hennessy *et al.*, 2009). El uso  
200 de suplementos como extracto de levadura o caseína hidrolizada, puede  
201 mejorar la bioconversión de AL a ALC en leche (Hennessy *et al.*, 2009), aunque  
202 el uso de algunos aditivos como la sucrosa, lactosa, fructosa y cloruro de sodio  
203 pueden disminuir la concentración de ALC (Lin *et al.*, 2000).

204

205 La concentración de ALC en los productos lácteos fermentados está  
206 influenciada por la cantidad inicial de ALC en leche, tipo de procesamiento, BAL  
207 utilizadas en la fermentación y prebióticos (Prandini *et al.*, 2007; do Espírito  
208 Santo *et al.*, 2012). La variabilidad en la actividad enzimática de los cultivos  
209 iniciadores en los productos lácteos fermentados ha sido identificada como un  
210 factor que puede contribuir a las diferencias en el contenido de ALC (Sieber *et*  
211 *al.*, 2004) y se ha visto que cepas específicas pueden incrementar la producción  
212 en estos productos (Akalin *et al.*, 2007). Por lo anterior, las investigaciones se  
213 han enfocado en la búsqueda de nuevas cepas de BAL capaces de incrementar  
214 el contenido de ALC en los productos lácteos fermentados (Cuadro 4). Por el  
215 contrario, otro estudio reportó que el contenido de ALC en leche fermentada con  
216 cultivos iniciadores y probióticos no mostró cambios (Gorissen *et al.*, 2012), lo



217 cual podría deberse a que la producción de ALC es dependiente de la cepa  
218 utilizada.

219

220 La fortificación con aceites (girasol y aceite de sésamo) y la fermentación  
221 con cultivos iniciadores y probióticos influenció la concentración de ALC en  
222 quesos (Nieuwenhove et al., 2007b; El-Salam et al., 2011; Lima Alves et al.,  
223 2011). También se ha estudiado el efecto de diferentes aceites sobre la  
224 producción del ALC en crema fermentada con cultivos iniciadores y probióticos  
225 (Ekinci et al., 2008; Domagala et al., 2009). Sin embargo, es importante señalar  
226 que la síntesis de ALC a partir de aceites puede estar influenciada por la  
227 cantidad de AL que aporta el aceite y a la capacidad de las bacterias para  
228 sintetizar esterasas que hidrolicen el aceite y liberen al LA del triglicérido para  
229 dejarlo en su forma libre, pues este hecho implica un paso extra en la síntesis  
230 de CLA por las enzimas microbianas (Holland et al., 2005; Rodríguez-Alcalá et  
231 al., 2011).

232

#### 233 **4. EFECTOS BENÉFICOS DE BAL PRODUCTORAS DE ALC**

234

235 Los efectos benéficos del ALC se han demostrado cuando este se usa  
236 como suplemento obtenido químicamente y cuando este es producido por BAL  
237 probióticas en el intestino de monogástricos. Entre los diferentes efectos  
238 benéficos de BAL-ALC probióticas en modelos animales se encuentran el efecto  
239 antiobesogénico (Lee et al., 2006a; Lee et al., 2007; Lee y Lee, 2009) y el  
240 antiinflamatorio (Wall et al., 2009). Se ha demostrado que ratones tratados por 8  
241 semanas con una dieta alta en grasa (45%) e inoculados con *Lactobacillus*  
242 *rhamnosus* PL60, productor de los isómeros *c9*, *t11* y *t10 in vitro*, disminuyeron  
243 el peso corporal sin disminuir la ingesta de energía, lo que causó una  
244 disminución significativa del tejido adiposo con respecto a los ratones  
245 alimentados solo con la dieta alta en grasa. Además, fue detectada la presencia  
246 del isómero *t10*, *c12* (1.906 µg/mL) en suero de sangre solo en los ratones  
247 tratados con la BAL-ALC lo que sugiere la participación del ALC como el

248 principal mecanismo de acción (Lee et al., 2006a). Utilizando esta misma cepa  
249 de BAL-ALC en cuatro voluntarios alimentados con una dieta habitual más 1  
250 gramo ( $10^{12}$  UFC/mL) de bacterias liofilizadas por 21 días, se encontró que los  
251 niveles séricos de leptina disminuyeron, en comparación con el estado basal de  
252 los mismos individuos. Además los niveles en suero de sangre del isómero 9c,  
253 t11 se presentaron en un rango de 1.69 a 10.19  $\mu\text{g/mL}$  en estado basal e  
254 incrementaron en un rango de 1.76 a 23.31  $\mu\text{g/mL}$  después de 21 días de  
255 tratamiento. Mientras que, los niveles séricos del isómero t10, c12 se  
256 presentaron en un rango de 0 a 2.68  $\mu\text{g/mL}$  e incrementaron en un rango de  
257 0.71 a 3.42  $\mu\text{g/mL}$  después de 21 días de tratamiento, sugiriendo que tal efecto  
258 fue debido al ALC (Lee y Lee, 2009). Por otro lado, *Lactobacillus plantarum*  
259 PL62 productor de los isómeros c9, t11 y t10, c12 *in vitro*, en combinación con  
260 una dieta alta en grasa (45%), disminuyó los niveles de glucosa total en sangre  
261 y triglicéridos, así como los pesos del tejido adiposo blanco epididimal, inguinal,  
262 mesentérico, perirenal y el peso de los ratones, en comparación con los ratones  
263 alimentados solo con la dieta alta en grasa. Aunque en este estudio no se  
264 evaluó la presencia de ALC incorporado en los ratones se asume que el efecto  
265 fue debido al ALC microbiano (Lee et al., 2007). Por otro lado, Wall et al. (2009)  
266 reportaron que en ratones inmunodeficientes con colitis inducida tratados por 10  
267 semanas con AL y *Bifidobacterium breve* NCIMB 702258 productora del  
268 isómero c9, t11, no disminuyeron los niveles de TNF- $\alpha$ , IL-6 e Interferón gamma  
269 (INF- $\gamma$ ) en esplenocitos de bazo con respecto a los tratados con AL. Sin  
270 embargo, se encontraron 2.4 veces más cantidad del isómero c9, t11 en tejido  
271 hepático y 2 veces más cantidad en tejido del intestino grueso. Cabe señalar  
272 que los autores reportaron 2.4 veces más cantidad de CLA en heces en los  
273 ratones tratados con la BAL-ALC y AL con respecto a los tratados con solo AL.  
274 Lo anterior sugiere que posiblemente el efecto benéfico no se presentó debido a  
275 que el ALC no fue eficientemente absorbido. Por lo tanto es de suma  
276 importancia tomar en cuenta el lugar en donde se implantará la BAL-ALC,  
277 siendo lo deseable que se implantara en el intestino delgado y no en el intestino  
278 grueso. Por otro lado, en cerdos tratados con esta misma bacteria y

279 suplementados con aceite de girasol por 21 días se encontró que los niveles de  
280 las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-12 disminuyeron, mientras que los niveles de IL-10  
281 aumentaron y los niveles de INF- $\gamma$  no presentaron cambios. Por lo anterior, los  
282 autores concluyeron que esta bacteria probiótica presentó un efecto  
283 antiinflamatorio, además se detectó la incorporación del isómero c9, t11 en los  
284 fosfolípidos de las células de hígado en esos mismos cerdos, lo que sugiere la  
285 participación del ALC como posible mecanismo de acción (Wall et al., 2009).

286

287 También se han demostrado diferentes efectos benéficos de las BAL-  
288 ALC en líneas celulares, tales como efecto anticarcinogénico (Kim et al., 2002,  
289 Lee et al., 2006b; Ochoa et al., 2004; Rosberg-Cody et al., 2007) y  
290 antiinflamatorio (Ewaschuk et al., 2006; Kim et al., 2008; Hwang et al., 2012).

291

292 Aunque algunos autores han demostrado que los cultivos iniciadores y  
293 bacterias probióticas pueden contribuir a incrementar el contenido de ALC en  
294 alimentos lácteos fermentados (Yadav et al., 2007; Akalin et al., 2007; Florence  
295 et al., 2009), no se han reportado estudios en modelos *in vivo* que evalúen el  
296 efecto benéfico del ALC biogenerado por BAL a través de la ingesta de leche  
297 fermentada. Algunas investigaciones han mostrado que el consumo de leches  
298 fermentadas puede disminuir los niveles de colesterol LDL y aumentar el  
299 colesterol HDL, así como promover la actividad antioxidante en sangre, la cual  
300 está relacionada con un efecto protector contra el cáncer (Ebringer et al., 2008).  
301 También se han demostrado los beneficios de las leches fermentadas tales  
302 como el efecto antimutagénico en líneas celulares (Guzel-Seymid et al., 2006),  
303 la capacidad para inhibir el crecimiento de ciertos tipos de tumores en modelos  
304 animales (Perdigon et al., 2002) y la mejora del sistema inmune (Vinderola et  
305 al., 2005a; 2005b; 2006).

306

307 Un método eficiente para incrementar la ingesta de ALC en la dieta para  
308 humanos es aumentar la concentración de ALC en productos lácteos  
309 fermentados usando BAL con potencial para producirlo. Los probióticos pueden

310 ofrecer la ventaja de producir ALC en alimentos lácteos fermentados, así como  
311 su producción a nivel intestinal una vez que estos microorganismos son  
312 implantados (Lee et al., 2007). Hasta donde es de nuestro conocimiento, no hay  
313 estudios que demuestren los efectos benéficos en la salud, de las BAL-ALC  
314 utilizando lácteos fermentados como vehículo y su efecto biológico una vez  
315 implantadas en el intestino.

316

## 317 **5. CONCLUSIONES**

318

319 Aunque se ha demostrado que la suplementación con ALC ejerce efectos  
320 benéficos en la salud, este no se encuentra en cantidades suficientes en los  
321 alimentos para ejercer dichos efectos. Sin embargo, existen las estrategias  
322 para incrementar la disponibilidad de este importante compuesto en el  
323 organismo por medio de su producción a través de la fermentación por BAL.  
324 Mucho de los esfuerzos se han enfocado en la búsqueda de nuevas cepas de  
325 BAL-ALC y las diferentes condiciones que potencian su producción, ya sea de  
326 manera exógena (en medio de cultivo, leche o producto lácteo fermentado) o de  
327 manera endógena (en el intestino). Además se han estudiado los efectos  
328 benéficos que estas BAL probióticas ejercen tras su ingesta como tales. Sin  
329 embargo, son muy pocos los estudios en los cuales, se reportó la capacidad  
330 productora de ALC de BAL en productos lácteos fermentados y no se  
331 encontraron estudios que evalúen el efecto benéfico de ALC en la salud  
332 utilizando un alimento lácteo fermentado como vehículo. El uso de BAL-ALC  
333 probióticas en productos lácteos fermentados podría proporcionar una doble  
334 fuente de ALC, por su producción exógena en el alimento y por su producción  
335 endógena a nivel intestinal una vez consumido el alimento. Por lo anterior, sería  
336 muy importante, estudiar el efecto benéfico en la salud de productos lácteos  
337 fermentados como vehículo de BAL-ALC en modelos *in vivo*.

338

339

340

## REFERENCIAS

341

342

343 Akalin AS, Tokuşoğlu Ö, Gönç S, Aycan Ş (2007) Occurrence of conjugated  
344 linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with  
345 fructooligosaccharide. *Int. Dairy J.* 17: 1089-1095.

346 Alonso L, Cuesta EP, Gilliland SE (2003) Production of free conjugated linoleic  
347 acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human  
348 intestinal origin. *J. Dairy Sci.* 86: 1941-1946.

349 Ando A, Ogawa J, Kishino S, Shimizu S (2003) CLA production from ricinoleic  
350 acid by lactic acid bacteria. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 80: 889-894.

351 Andrade JC, Ascencao K, Gullon P, Henriques SMS, Pinto JMS, Rocha-Santos  
352 TAP, Freitas AC, Gomes AM (2012) Production of conjugated linoleic  
353 acid by food-grade bacteria: A review. *Int. J. Dairy Technol.* 65: 467-481.

354 Baddini Feitoza A, Fernandes Pereira A, Ferreira da Costa N, Gonçalves  
355 Ribeiro B (2009) Conjugated linoleic acid (CLA) effect modulation of body  
356 composition and lipid profile. *Nutr. Hosp.* 24: 422-428.

357 Bassaganya-Riera J, Pogradichniy RM, Jobgen SC, Halbur P G, Yoon K J,  
358 O'Shea M, Mohede I, Hontecillas R (2003) Conjugated linoleic acid  
359 ameliorates viral infectivity in a pig model of virally induced  
360 immunosuppression. *J. Nutr.* 133: 3204–3214.

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

364 Blasi F, Dominici L, Moretti M, Villarini M, Maurelli S, Simonetti MS, Damiani P,  
365 Cossignani L (2012) In vitro genotoxicity/antigenotoxicity testing of some  
366 conjugated linoleic acid isomers using comet assay. *Eur. J. Lipid Sci.*  
367 *Tech.* 114: 1016-1024.

368 Changhua L, Jindong Y, Defa L, Lidan Z, Shiyan Q, Jianjun X (2005)  
369 Conjugated linoleic acid attenuates the production and gene expression  
370 of proinflammatory cytokines in weaned pigs challenged with  
371 lipopolysaccharide. *J. Nutr.* 135: 239-244.

- 372 Chin SF, Liu W, Storkson JM, Ha YL, Pariza MW (1992) Dietary sources of  
373 conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of  
374 anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5: 185-197.
- 375 Churruca I, Fernandez-Quintela A, Portillo MP (2009) Conjugated linoleic acid  
376 isomers: differences in metabolism and biological effects. *Biofactors* 35:  
377 105-111
- 378 Coakley M, Ross RP, Nordgren M, Fitzgerald G, Devery R, Stanton C (2003)  
379 Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived Bifidobacterium  
380 species. *J. Appl. Microbiol.* 94: 138-145.
- 381 Conte-Junior CA, Soncin S, Hierro PE, Fernández AM (2007) Estudio de la  
382 producción de ácido linoleico conjugado por cepas de *Lactobacillus* Y  
383 *Enterococcus* de distintos orígenes. *RCCV* 1: 482-489.
- 384 Domagała, M. Sady, D. Najgebauer-Lejko, M. Czernicka, Wieteska (2009) The  
385 content of conjugated linoleic acid (cla) in cream fermented using  
386 different starter cultures. *Biotech. Anim. Husbandry* 25: 745-751.
- 387 do Espirito Santo AP, Cartolano NS, Silva TF, Soares FA, Gioielli LA, Perego P,  
388 Converti A, Oliveira MN (2012) Fibers from fruit by-products enhance  
389 probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in  
390 yoghurts. *Int. J. Food Microbiol.* 154: 135-144.
- 391 Dubey V, Ghosh AR, Mandal BK (2012) Appraisal of conjugated linoleic acid  
392 production by probiotic potential of *Pediococcus* spp. GS4. *Appl.*  
393 *Biochem. Biotechnol.* 168: 1265-1276.
- 394 Ebringer L, Ferencik M, Krajcovic J (2008) Beneficial health effects of milk and  
395 fermented dairy products--review. *Folia Microbiol.* 53: 378-394.
- 396 Ekinci FY, Okur OD, Ertekin B, Guzel-Seydim Z (2008) Effects of probiotic  
397 bacteria and oils on fatty acid profiles of cultured cream. *Eur. J. Lipid Sci.*  
398 *Technol.* 110: 216-224.
- 399 El-Salam MH, El-Shafei K, Sharaf OM, Effat BA, Asem FM & El-Aasar M (2010)  
400 Screening of some potentially probiotic lactic acid bacteria for their ability  
401 to synthesis conjugated linoleic acid. *Int. J. Dairy Technol.* 63: 62-69.

- 402 El-Salam MH, Hippen AR, Assem FM, El-Shafei K, Tawfik NF, El-Aassar M  
403 (2011) Preparation and properties of probiotic cheese high in conjugated  
404 linoleic acid content. *Int. J. Dairy Technol.* 64: 64-74.
- 405 Ewaschuk JB, Walker JW, Diaz H, Madsen KL (2006) Bioproduction of  
406 conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in  
407 mice. *J. Nutr.* 136: 1483-1487.
- 408 Fukuda S, Suzuki Y, Murai M, Asanuma N, Hino T (2006) Isolation of a novel  
409 strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that isomerizes linoleic acid to  
410 conjugated linoleic acid without hydrogenation, and its utilization as a  
411 probiotic for animals. *J. Appl. Microbiol.* 100: 787-794.
- 412 Florence A, Silva R, Santo A, Gioielli L, Tamime A, Oliveira M (2009) Increased  
413 CLA content in organic milk fermented by bifidobacteria or yoghurt  
414 cultures. *Dairy Sci. Technol.* 89: 541-553.
- 415 Gagliostro GA (2005) Control nutricional del contenido de ácido linoleico  
416 conjugado (cla) en leche y su presencia en alimentos naturales  
417 funcionales. *Rev. Agr. Prod. Anim.* 24: 137-163.
- 418 Gaullier J-M, Berven G, Blankson H, Gudmundsen O (2002) Clinical trial results  
419 support a preference for using CLA preparations enriched with two  
420 isomers rather than four isomers in human studies. *Lipids* 37: 1019-  
421 1025.
- 422 Gorissen L, Raes K, Weckx S, Dannenberger D, Leroy F, De Vuyst L, De Smet  
423 S (2010) Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic  
424 acid isomers by *Bifidobacterium* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87:  
425 2257-2266.
- 426 Gorissen L, De Vuyst L, Raes K, De Smet S, Leroy F (2012) Conjugated linoleic  
427 and linolenic acid production kinetics by bifidobacteria differ among  
428 strains. *Int. J. Food Microbiol.* 155: 234-240.
- 429 Guzel-Seydim ZB, Seydim AC, Greene AK, Tas T (2006) Determination of  
430 antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and  
431 changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids.  
432 *Int. J. Dairy Technol.* 59: 209-215.

- 433 Ham JS, In YM, Jeong SG, Kim JG, Lee EH, Kim HS, Yoon SK, Lee BH (2002)  
434 Screening of conjugated linoleic acid producing lactic acid bacteria from  
435 fecal samples of healthy babies. *Asian Austral. J. Anim. 15*: 1031-1035.
- 436 Hennessy AA, Ross RP, Devery R, Stanton C (2009) Optimization of a  
437 reconstituted skim milk based medium for enhanced CLA production by  
438 bifidobacteria. *J. Appl. Microbiol. 106*: 1315-1327.
- 439 Hennessy AA, Barrett E, Paul Ross R, Fitzgerald GF, Devery R, Stanton C  
440 (2012) The production of conjugated alpha-linolenic, gamma-linolenic and  
441 stearidonic acids by strains of bifidobacteria and propionibacteria. *Lipids*  
442 *47*: 313-327.
- 443 Henriksen EJ, Teachey MK, Taylor ZC, Jacob S, Ptock A, Kramer K,  
444 Hasselwander O (2003) Isomer-specific actions of conjugated linoleic  
445 acid on muscle glucose transport in the obese Zucker rat. *Am. J. Physiol.*  
446 *Endocrinol. Metab. 285*: 98-105.
- 447 Hernandez-Mendoza A, Lopez-Hernandez A, Hill CG, Garcia HS (2009)  
448 Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus*  
449 *reuteri* under different growth conditions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*  
450 *84*: 180-185.
- 451 Holland R, Liu SQ, Crow VL, Delabre ML, Lubbers M, Bennett M, Norris G  
452 (2005). Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat  
453 hydrolysis, alcoholysis and esterification. *Int. Dairy J. 15*: 711–718.
- 454 Hwang SW, Kim N, Kim JM, Huh CS, Ahn YT, Park SH, Shin CM, Park JH, Lee  
455 MK, Nam RH, Lee HS, Kim JS, Jung HC, Song IS (2012) Probiotic  
456 suppression of the *H. pylori*-induced responses by conjugated linoleic  
457 acids in a gastric epithelial cell line. *Prostag. Leukot. Ess. 86*: 225-231.
- 458 Jenkins JK, Courtney PD (2003) *Lactobacillus* growth and membrane  
459 composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. *Can. J.*  
460 *Microbiol. 49*: 51-57.
- 461 Kim YJ, Liu RH (2002) Increase of Conjugated Linoleic Acid Content in Milk by  
462 Fermentation with Lactic Acid Bacteria. *J. Food Sci. 67*: 1731-1737.



463 Kim EJ, Holthuizen PE, Park HS, Ha YL, Jung KC, Park JH (2002) Trans-10,cis-  
464 12-conjugated linoleic acid inhibits Caco-2 colon cancer cell growth. *Am.*  
465 *J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 283: G357-367.

466 Kim JM, Kim JS, Kim YJ, Oh YK, Kim IY, Chee YJ, Han JS, Jung HC (2008)  
467 Conjugated linoleic acids produced by *Lactobacillus dissociates* IKK- $\gamma$   
468 and Hsp90 complex in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells.  
469 *Lab. Invest.* 88: 541–552.

470 Kishino S, Ogawa J, Omura Y, Matsumura K, Shimizu S (2002) Conjugated  
471 linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. *J. Am. Oil*  
472 *Chem. Soc.* 79: 159-163.

473 Kritchevsky D, Tepper S, Wright S, Czarnecki S, Wilson T, Nicolosi R (2004)  
474 Conjugated linoleic acid isomer effects in atherosclerosis: Growth and  
475 regression of lesions. *Lipids* 39: 611-616.

476 Lai C, Yin J, Li D, Zhao L, Chen X (2005) Effects of dietary conjugated linoleic  
477 acid supplementation on performance and immune function of weaned  
478 pigs. *Arch. Anim. Nutr.* 59: 41-51.

479 Lee SO, Hong GW, Oh DK (2003a) Bioconversion of linoleic acid into  
480 conjugated linoleic acid by immobilized *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol.*  
481 *Prog.* 19: 1081-1084.

482 Lee SO, Kim CS, Cho SK, Choi HJ, Ji GE, Oh DK (2003b) Bioconversion of  
483 linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by  
484 washed cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol. Lett.* 25: 935-938.

485 Lee HY, Park JH, Seok SH, Baek MW, Kim DJ, Lee KE, Paek KS, Lee Y  
486 (2006a) Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60,  
487 produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-  
488 induced obese mice. *Biochim. Biophys. Acta* 1761: 736-744.

489 Lee SH, Yamaguchi K, Kim JS, Eling TE, Safe S, Park Y, Baek SJ (2006b)  
490 Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in  
491 an isomer specific manner. *Carcinogenesis* 27: 972-981.

492 Lee K, Paek K, Lee HY, Park JH & Lee Y (2007): Antiobesity effect of trans-  
493 10,cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum*  
494 PL62 on diet-induced obese mice. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1140-1146.

495 Lee K, Lee Y (2009) Production of c9,t11- and t10,c12-conjugated linoleic acids  
496 in humans by *Lactobacillus rhamnosus* PL60. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19:  
497 1617-1619.

498 Lima Alves L, Santos Richards N, Mariutti L, Nogueira G, Bragagnolo N (2011)  
499 Inulin and probiotic concentration effects on fatty and linoleic conjugated  
500 acids in cream cheeses. *Eur. Food. Res. Technol.* 233: 667-675.

501 Lin TY, Lin C-W, Lee C-H (1999) Conjugated linoleic acid concentration as  
502 affected by lactic cultures and added linoleic acid. *Food Chem.* 67: 1-5.

503 Lin TY (2000) Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic  
504 cultures and additives. *Food Chem.* 69: 27-31.

505 Lin TY, Lin CW, Wang YJ (2003) Production of conjugated linoleic acid by  
506 enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus* CCRC 14079. *Food Chem.*  
507 83: 27-31.

508 Liu P, Shen SR, Ruan H, Zhou Q, Ma LL, He GQ (2011) Production of  
509 conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from  
510 naturally fermented Chinese pickles. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 12: 923-930.

511 McIntosh FM, Shingfield KJ, Devillard E, Russell WR, Wallace RJ (2009)  
512 Mechanism of conjugated linoleic acid and vaccenic acid formation in  
513 human faecal suspensions and pure cultures of intestinal bacteria.  
514 *Microbiology* 155: 285-294.

515 Nieuwenhove CP, Oliszewski R, Gonzalez SN, Perez Chaia AB (2007a)  
516 Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS  
517 broth and buffalo milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 467-474.

518 Nieuwenhove CP, Oliszewski R, González SN, Pérez Chaia AB (2007b)  
519 Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on  
520 conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Res. Int.* 40: 559-  
521 564.

- 522 Obregón R AM, Valenzuela B A (2009) Acido linoleico conjugado (alc),  
523 metabolismo de lípidos y enfermedad cardiovascular. *Rev. Chil. Nutr.* 36:  
524 258-268.
- 525 Ochoa JJ, Farquharson AJ, Grant I, Moffat LE, Heys SD, Wahle KW (2004)  
526 Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell  
527 proliferation: different molecular mechanisms for cis-9, trans-11 and  
528 trans-10, cis-12 isomers. *Carcinogenesis* 25: 1185-1191.
- 529 Ogawa J, Matsumura K, Kishino S, Omura Y, Shimizu S (2001) Conjugated  
530 linoleic acid accumulation via 10-hydroxy-12-octadecaenoic acid during  
531 microaerobic transformation of linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus*.  
532 *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1246-1252.
- 533 Ogawa J, Kishino S, Ando A, Sugimoto S, Mihara K, Shimizu S (2005)  
534 Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. *J. Biosci.*  
535 *Bioeng.* 100: 355-364.
- 536 Oh D-K, Hong G-H, Lee Y, Min S, Sin H-S, Cho S (2003) Production of  
537 conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium* strains. *World. J.*  
538 *Microb. Biot.* 19: 907-912.
- 539 Oliveira RP, Florence AC, Silva RC, Perego P, Converti A, Gioielli LA, Oliveira  
540 MN (2009) Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics,  
541 probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented  
542 milk. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 467-472.
- 543 O'Shea M, Bassaganya-Riera J, Mohede IC (2004) Immunomodulatory  
544 properties of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 79: 1199-1206.
- 545 Pandit A, Anand S, Kalscheur K, Hassan A (2012) Production of conjugated  
546 linoleic acid by lactic acid bacteria in milk without any additional  
547 substrate. *Int. J. Dairy Technol.* 65: 603-608.
- 548 Park Y (2009) Conjugated linoleic acid (CLA) Good or bad trans fat?. *J. Food*  
549 *Compos. Anal.* 22: 4-12.
- 550 Park Y, Pariza MW (2007) Mechanisms of body fat modulation by conjugated  
551 linoleic acid (CLA). *Food Res. Int.* 40: 311-323.

552 Perdigon G, de Moreno de LeBlanc A, Valdez J, Rachid M (2002) Role of  
553 yoghurt in the prevention of colon cancer. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56: 65-68.

554 Prandini A, Sigolo S, Tansini G, Brogna N, Piva G (2007) Different level of  
555 conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *J. Food*  
556 *Compos. Anal.* 20: 472-479.

557 Puniya AK, Chaitanya S, Tyagi AK, De S, Singh K (2008) Conjugated linoleic  
558 acid producing potential of lactobacilli isolated from the rumen of cattle. *J.*  
559 *Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35: 1223-1228.

560 Puniya A, Reddy C, Kumar S, Singh K (2009) Influence of sunflower oil on  
561 conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* and  
562 *Lactobacillus casei*. *Ann. Microbiol.* 59: 505-507.

563 Rainio A, Vahvaselka M, Suomalainen T, Laakso S (2001) Reduction of linoleic  
564 acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by  
565 *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*. *Can. J. Microbiol.* 47:  
566 735-740.

567 Ritzenthaler KL, McGuire MK, Falen R, Shultz TD, Dasgupta N, McGuire MA  
568 (2001) Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary  
569 assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by  
570 food duplicate methodology. *J. Nutr.* 131: 1548-1554.

571 Rocha-Uribe A, Hernández E (2004) Síntesis de ácido linoleico conjugado por  
572 isomerización alcalina usando propilenglicol como solvente. *Rev. Mex.*  
573 *Ing. Quím.* 3: 193-200.

574 Rodríguez-Alcalá LM, Braga T, Xavier Malcata F, Gomes A, Fontecha J (2011)  
575 Quantitative and qualitative determination of CLA produced by  
576 *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric  
577 and Ag+-HPLC techniques. *Food Chem.* 125: 1373-1378.

578 Roman-Nunez M, Cuesta-Alonso EP, Gilliland SE (2007) Influence of sodium  
579 glycocholate on production of conjugated linoleic acid by cells of  
580 *Lactobacillus reuteri* ATCC 55739. *J. Food Sci.* 72: M140-143.

581 Rosberg-Cody E, Johnson MC, Fitzgerald GF, Ross PR, Stanton C (2007)  
582 Heterologous expression of linoleic acid isomerase from

583 Propionibacterium acnes and anti-proliferative activity of recombinant  
584 trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid. *Microbiology* 153: 2483-2490.

585 Rosberg-Cody E, Stanton C, O'Mahony L, Wall R, Shanahan F, Quigley EM,  
586 Fitzgerald GF, Ross RP (2011) Recombinant lactobacilli expressing  
587 linoleic acid isomerase can modulate the fatty acid composition of host  
588 adipose tissue in mice. *Microbiology* 157: 609-615.

589 Ryder JW, Portocarrero CP, Song XM, Cui L, Yu M, Combatsiaris T, Galuska D,  
590 Bauman DE, Barbano DM, Charron MJ, Zierath JR, Houseknecht KL  
591 (2001) Isomer-specific antidiabetic properties of conjugated linoleic acid.  
592 Improved glucose tolerance, skeletal muscle insulin action, and UCP-2  
593 gene expression. *Diabetes* 50: 1149-1157.

594 Salamon RV, Lóki K, Varga-Visi É, Mándoki Z, Csapó J (2009) Increase of  
595 conjugated linoleic acid content of dairy products by adding sunflower oil.  
596 *Acta Univ. Sapientiae Alimentaria* 2: 287–293

597 Sieber R, Collomb M, Aeschlimann A, Jelen P, Eyer H (2004) Impact of  
598 microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products - a review.  
599 *Int. Dairy J.* 14: 1-15.

600 Song Y-S, Kang S-W, Oh D-k, Rho Y-T, Hong S-I, Kim S-W (2005)  
601 Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by  
602 *Bifidobacterium breve*. *Biotechnol. Bioproc. E.* 10: 357-361.

603 Soto-Rodríguez I, Pulido-Camarillo E, Hernández-Díaz G, Alexander-Aguilera A,  
604 García HS (2011) A CLA enriched diet improves organ damage  
605 associated with the metabolic syndrome in spontaneous hypertensive  
606 rats. *Grasas y Aceites* 62: 49-54.

607 Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E, Matar C  
608 (2005a) Immunomodulating capacity of kefir. *J. Dairy Res.* 72: 195-202.

609 Vinderola CG, Duarte J, Thangavel D, Perdigon G, Farnworth E, Matar C  
610 (2005b) Distal mucosal site stimulation by kefir and duration of the  
611 immune response. *Eur. J. Rheumatol. Infl.* 3: 63-73.

- 612 Vinderola CG, Perdigon G, Duarte J, Thangavel D, Farnworth E, Matar C (2006)  
613 Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology* 211: 341-  
614 350.
- 615 Wall R, Ross RP, Shanahan F, O'Mahony L, O'Mahony C, Coakley M, Hart O,  
616 Lawlor P, Quigley EM, Kiely B, Fitzgerald GF, Stanton C (2009) Metabolic  
617 activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of  
618 murine and porcine liver and adipose tissues. *Am. J. Clin. Nutr.* 89: 1393-  
619 1401.
- 620 Wang L-M, Lv J-P, Chu Z-Q, Cui Y-Y, Ren X-H (2007) Production of conjugated  
621 linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Chem.* 103: 313-  
622 318.
- 623 Xu S, Boylston T, Glatz B (2004) Effect of lipid source on probiotic bacteria and  
624 conjugated linoleic acid formation in milk model systems. *J. Am. Oil*  
625 *Chem. Soc.* 81: 589-595.
- 626 Yadav H, Jain S, Sinha PR (2007) Production of free fatty acids and conjugated  
627 linoleic acid in probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and  
628 *Lactobacillus casei* during fermentation and storage. *Int. Dairy J.* 17:  
629 1006-1010.
- 630 Yamasaki M, Chujo H, Hirao A, Koyanagi N, Okamoto T, Tojo N, Oishi A, Iwata  
631 T, Yamauchi-Sato Y, Yamamoto T, Tsutsumi K, Tachibana H, Yamada K  
632 (2003) Immunoglobulin and cytokine production from spleen lymphocytes  
633 is modulated in C57BL/6J mice by dietary cis-9, trans-11 and trans-10,  
634 cis-12 conjugated linoleic acid. *J. Nutr.* 133: 784-788.
- 635 Ye S, Yu T, Yang H, Li L, Wang H, Xiao S, Wang J (2013) Optimal culture  
636 conditions for producing conjugated linoleic acid in skim-milk by co-  
637 culture of different *Lactobacillus* strains. *Ann. Microbiol.* 63: 707-717.
- 638 Zeng Z, Lin J, Gong D (2009) Identification of lactic acid bacterial strains with  
639 high conjugated linoleic acid-producing ability from natural sauerkraut  
640 fermentations. *J. Food Sci.* 74: M154-158.

641

642

643 **Cuadro 1.** Efectos biológicos benéficos en la salud de los isómeros de ALC\*

<b>Efecto biológico</b>	<b>c9, t11</b>	<b>t10, c12</b>	<b>Referencias</b>
Anti-cancerígeno	+	+	Bhattacharya et al. (2006); Park, (2009); Churruca et al. (2009)
Disminución de la masa grasa	-	+	Bhattacharya et al. (2006); Park y Pariza, (2007); Park, (2009)
Anti-aterogénico	-	+	Kritchevsky et al. (2004); Park, (2009)
Anti-diabetogénico	+	+	Ryder et la. (2001); Henriksen et al. (2003); Churruca et al. (2009)
Modulación del sistema inmune	+	+	Yamasaki et al. (2003); Bassaganya-Riera et al. (2003); O'Shea, (2004)
Anti-inflamatorio	+	+	Changhua et al. (2005); Lai et al. (2005)

\*Efecto significativo (+); Sin efecto significativo (-).

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653 **Cuadro 2.** Producción de ALC por bacterias ácido lácticas en medio de cultivo fortificado con una fuente de AL

Género	Rango de CLA mg L <sup>-1</sup>	Referencias
<i>Propionibacterium</i>	1600	Rainio et al. (2001)
<i>Enterococcus, Pediococcus, Propionibacterium, Lactobacillus</i>	70 – 3410	Kishino et al. (2002)
<i>Lactobacillus</i>	300	Lee et al. (2003a)
<i>Lactobacillus</i>	175	Lee et al. (2003b)
<i>Bifidobacterium</i>	1 – 242.1	Coakley et al. (2003)
<i>Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc</i>	105.7 – 1135	Ando et al. (2003)
<i>Bifidobacterium</i>	577	Song et al. (2005)
<i>Propionibacterium</i>	78.8	Wang et al. (2007)
<i>Streptococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium</i>	17 – 35.9	Nieuwenhove et al. (2007a)
<i>Lactobacillus</i>	17.4	Roman-Nunez et al. (2007)
<i>Lactobacillus</i>	623	Zeng et al. (2009)
<i>Lactobacillus</i>	108	Hernandez-Mendoza et al. (2009)
<i>Bifidobacterium</i>	40.7 – 53.5	Gorissen et al. (2010)
<i>Lactobacillus</i>	141.8	Lui et al. (2011)
<i>Lactococcus, Bifidobacterium, Lactobacillus</i>	3.89 – 8.57	Rodríguez-Alcalá et al. (2011)
<i>Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus, Propionibacterium</i>	8 – 300	Hennessy et al. (2012)

654

655



656 **Cuadro 3.** Producción de ALC por bacterias ácido lácticas en leche con adición de un sustrato de AL

Género	Sustrato*	Concentración de CLA	Referencia
<i>Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc</i>	LA	63 – 105.5 mg L <sup>-1</sup>	Lin et al. (1999)
<i>Lactobacillus</i>	LA	54.31 – 116.53 mg L <sup>-1</sup>	Alonso et al. (2003)
<i>Lactobacillus, Streptococcus, Bifidobacterium</i>	LA	90 – 198.6 mg L <sup>-1</sup>	Nieuwenhove et al. (2007a)
<i>Lactobacillus</i>	AG	2.73 - 11 mg L <sup>-1</sup>	Puniya et al. (2009)
<i>Lactobacillus, Propionibacterium, Leuconostoc,</i>	ASL	4.52 – 21.6 mg L <sup>-1</sup>	El-Salam et al. (2010)
<i>Lactobacillus, Lactococcus, Bifidobacterium</i>	LA, AG	8.01 – 41.62 mg L <sup>-1</sup>	Rodríguez-Alcalá et al. (2011)
<i>Lactobacillus</i>	AG	5.67 – 10.53 mg g <sup>-1</sup> de grasa	Puniya et al. (2008)
<i>Lactobacillus</i>	AG	142.22 – 188.64 mg 100g <sup>-1</sup> de grasa	Salamon et al. (2009)
<i>Lactobacillus, Propionibacterium, Enterococcus</i>	AS, ASH	0.42 – 1.64 g 100g <sup>-1</sup> de ácidos grasos	Xu et al. (2004)
<i>Pediococcus, Bifidobacterium, Lactobacillus, Lactococcus</i>	SN	0,43 - 0,87 g 100g <sup>-1</sup> de ácidos grasos	Pandit et al. (2012)

\*AL, ácido linoleico; AG, aceite de girasol; ASL aceite de sésamo lipolizado; AS; aceite de soya; ASH, aceite de soya hidrolizado; SN, sin sustrato.

657

658

659

660

661 **Cuadro 4.** Producción de ALC por co-cultivos\* específicos en productos lácteos fermentados

<b>Tipo de producto</b>	<b>Sustrato**</b>	<b>Aditivos</b>	<b>Concentración de CLA</b>	<b>Referencia</b>
Dahi	SN		10.5 mg g <sup>-1</sup> grasa	Yadav et al. (2007)
Yogurt	SN	Prebióticos	2.07-6.01 mg g <sup>-1</sup> grasa	Akalin et al. (2007)
Yogurt	SN		1.18-1.85 g 100g <sup>-1</sup>	Florence et al. (2009)
Yogurt	SN	Fibra	0.5-1.1 g 100g <sup>-1</sup> grasa	do Espírito Santo et al. (2012)
Crema	SN		3.81-4.13 mg g <sup>-1</sup> grasa	Domagala et al. (2009)
Queso	AG		4.9 6.9 mg g <sup>-1</sup> grasa	Nieuwenhove et al. (2007b)
Queso	AS		0.76-0.86% del total de ácidos grasos	El-Salam et al. (2011)

\*Los Co-cultivos son mezclas de bacterias que incluyen un cultivo iniciador y un probiótico.

\*\*AG, aceite de girasol; AS, aceite de soya; SN, sin sustrato.

**Capítulo 3.** Selección de cepas de *Lactobacillus* por su habilidad para producir CLA en leche y adherirse al tracto gastrointestinal. Artículo en revisión por la revista *Journal of Dairy Science*.

J. Sosa-Castañeda<sup>1</sup>, P. Y. Heredia-Castro<sup>1</sup>, A. Hernández-Mendoza<sup>1</sup>, H. Astiazarán-García<sup>2</sup>, H. S. Garcia<sup>3</sup>, A. F. González-Córdova<sup>1</sup>, B. Vallejo-Cordoba<sup>1</sup>.

### **Resumen**

El ácido linoleico conjugado (CLA) es un lípido bioactivo que ha demostrado proporcionar efectos beneficiosos sobre la salud; sin embargo, la cantidad que se consume en los alimentos no es suficiente para que se presenten los efectos benéficos deseados. Por lo tanto, para aumentar el consumo de CLA en la dieta se ha explorado la manera de aumentar su contenido en los productos lácteos por medio de la fermentación de la leche con bacterias ácido lácticas específicas (BAL). Además, algunas BAL pueden ser capaces de sobrevivir a las condiciones gastrointestinales, adherirse a la mucosa intestinal y producir CLA, aumentando con esto su disponibilidad. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue seleccionar BAL con capacidad de producir CLA en leche descremada adicionada con ácido linoléico y bajo condiciones gastrointestinales simuladas. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de las BAL que produjeron CLA para adherirse a la mucosa intestinal en un modelo murino. Los resultados mostraron que solo cuatro de trece cepas de *Lactobacillus* evaluadas sólo fueron capaces de producir CLA en leche ( $13.44 \pm 0.78$  a  $50.9 \pm 0.26$   $\mu\text{g/mL}$ ). Además, estas cuatro cepas fueron capaces de sobrevivir en condiciones gastrointestinales simuladas, así como adherirse a la mucosa intestinal de ratas Wistar después de siete días de inoculación oral con bacterias marcadas con fluorescencia. Por lo anterior, estas cuatro cepas de *Lactobacillus* no solo fueron capaces de incrementar la concentración de CLA en leche, sino que también fueron capaces de producir CLA bajo condiciones gastrointestinales

simuladas por lo que podrían proporcionar efectos benéficos para la salud si se usaran para la fabricación de productos lácteos fermentados.

1 **SCREENING OF *LACTOBACILLUS* STRAINS FOR THEIR ABILITY TO**  
2 **PRODUCE CONJUGATED LINOLEIC ACID IN MILK AND TO ADHERE TO**  
3 **THE INTESTINAL TRACT**

4  
5 J. Sosa-Castañeda<sup>1</sup>, P. Y. Heredia-Castro<sup>1</sup>, A. Hernández-Mendoza<sup>1</sup>, H. Astiazarán-  
6 García<sup>2</sup>, H. S. Garcia<sup>3</sup>, A. F. González-Córdova<sup>1</sup>, B. Vallejo-Cordoba<sup>1</sup>.

7  
8  
9  
10 <sup>1</sup>Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos. Coordinación de  
11 Tecnología de Alimentos de Origen Animal.

12 <sup>1</sup>Laboratorio de Patología Experimental. Coordinación de Nutrición.  
13 Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Carretera a La  
14 Victoria Km. 0.6. Apartado 1735. Hermosillo, Sonora, Mexico. 83304.

15  
16  
17 <sup>3</sup>Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA)  
18 Instituto Tecnológico de Veracruz  
19 M. A. de Quevedo 2279. Col. Formando Hogar. Veracruz, Veracruz 91897. Mexico

20  
21  
22  
23  
24 <sup>1</sup>Corresponding author: Dra. Belinda Vallejo-Cordoba, Tel: 52 (662) 289-2400 Ext. 303  
25 E-mail: [vallejo@ciad.mx](mailto:vallejo@ciad.mx)

26  
27  
28  
29 Manuscript submitted to the Editor of *Journal of Dairy Science* for evaluation

30  
31 June, 2014.

32 **ABSTRACT**

33

34 Conjugated linoleic acid (**CLA**) has been shown to provide beneficial effects on health;  
35 however, the amount consumed in food is far from being the one required for the desired  
36 effects. Thus, increasing CLA consumption by exploring ways to increase its content in  
37 dairy foods, by fermenting milk with specific lactic acid bacteria (LAB) offers an  
38 interesting alternative. Additionally, some LAB may be able to adhere to the intestinal  
39 mucosa and further increase CLA availability. Therefore, the objective of this study was  
40 to select BAL with the ability to produce CLA in skim milk and in simulated  
41 gastrointestinal conditions. Additionally, the ability of selected CLA producing LAB to  
42 adhere to the intestinal mucosa in a murine model was assessed. Results showed that  
43 from thirteen strains of *Lactobacillus* tested, only four strains were able to produce CLA  
44 in skim milk ( $13.44 \pm 0.78$  to  $50.9 \pm 0.26$   $\mu\text{g/mL}$ ). Furthermore, these four *Lactobacillus*  
45 strains were able to survive in simulated gastrointestinal conditions, as well as to adhere  
46 to the intestinal mucosa of Wistar rats after seven days of oral inoculation with  
47 fluorescently labeled bacteria. Accordingly, these four *Lactobacillus* strains may provide  
48 health benefits if used for the manufacture of fermented dairy foods.

49 Keywords: lactic acid bacteria, conjugated linoleic acid, fermented milk.

50

51

## 1. INTRODUCTION

52

53 CLA is a mixture of positional and geometric isomers of linoleic acid (**LA**, *cis-9*,  
54 *cis-12*, C18:2), with the isomers *cis-9*, *trans-11* (**c9**, **t11**) and *trans-10*, *cis-12* (**t10**, **c12**)  
55 being those which have been shown to provide beneficial effects on health. These  
56 include anti-carcinogenic, anti-inflammatory, anti-obesogenic and anti-cholesterolemic  
57 effects (O'Shea et al., 2004, Bhattacharya et al., 2006, Park, 2009).

58

59 It has been reported that milk and dairy products are the foods with the highest  
60 CLA content (Chin et al., 1992, Prandini et al., 2007). CLA concentration in milk ranges  
61 from 0.20 to 3.7 g/100g fat (Hernandez-Mendoza et al., 2009). However, CLA  
62 concentration in milk is dependent on feed (Chouinard et al., 2001, Hernandez-Mendoza

63 et al., 2009), oil supplementation (Flowers et al., 2008, Benchaar et al., 2012) and breed  
64 (Hernandez-Mendoza et al., 2009). Thus, fermenting dairy foods with specific CLA-  
65 producing LAB appears to be a good strategy for increasing CLA consumption in the  
66 diet.

67

68 Some studies have shown that CLA may be synthesized by specific LAB in MRS  
69 broth (Coakley et al., 2003, Hernandez-Mendoza et al., 2009, Liu et al., 2011), milk  
70 (Van Nieuwenhove et al., 2007a, Rodríguez-Alcalá et al., 2011, Pandit et al., 2012),  
71 cream (Domagała et al., 2009), yoghurt (Akalın et al., 2007, Florence et al., 2009, do  
72 Espirito Santo et al., 2012) and cheese (Van Nieuwenhove et al., 2007b, Lima Alves et  
73 al., 2011). In addition, it has been shown that specific BAL may be able to produce CLA  
74 in the intestinal tract in animal models (Wall et al., 2009) or in humans (Lee and Lee,  
75 2009) after its administration as a freeze-dried product.

76

77 Since CLA production is strain dependent (Kim and Liu, 2002), the search for  
78 new LAB capable of producing CLA in milk and in the intestinal tract, may be of  
79 interest for the manufacture of fermented dairy foods. Therefore, the objective of this  
80 research was to look for LAB strains capable of producing CLA in milk and in simulated  
81 gastrointestinal conditions. Additionally, the ability of selected CLA producing LAB to  
82 adhere to the intestinal tract of Wistar rats was assessed.

83

## 84 **2. MATERIALS AND METHODS**

85

### 86 ***2.1. Materials and chemicals***

87 Nonfat dry milk (NFDM) (USDA organic grade A) was from Organic Valley (La  
88 Farge, WI). MRS (De Man, Rogosa, and Sharpe) broth was obtained from BD-Difco  
89 Laboratories (Detroit, MI). Linoleic acid (LA), phosphatidylcholine, methanolic  
90 hydrochloric acid, chloroform, methanol and anhydrous sodium sulfate were obtained  
91 from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO). Methyl 9(Z), 11(E)-octadecadienoate and  
92 methyl 10(E), 12(Z)-octadecadienoate analytical standards were from Matreya LLC  
93 (Pleasant Gap, PA)

94 **2.2. Lactic Acid Bacteria**

95 All thirteen wild *Lactobacillus* strains were obtained from the dairy laboratory of  
96 CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo,  
97 México) culture collection. *Lactobacillus* were activated in MRS broth at pH 6.5. Fresh  
98 cultures were used for the experiments after preparing three subcultures (24, 20 and  
99 18h). MRS broth was inoculated with 1% culture and incubated at 37 °C.

100

101 **2.3. Screening of CLA-producing strains in MRS broth or skim milk**

102 A 7.5 % solution of phosphatidylcholine in linoleic acid (LA) micellar solution  
103 was prepared (Hernandez-Mendoza et al., 2009). Then, 2% of LA micellar solution was  
104 added to 40 mL of either MRS broth (LA-MRS) or reconstituted nonfat dry milk (LA-  
105 RNFD) (10%). LA-MRS or LA-RNFD were sterilized at 121 °C for 15 min and 110  
106 °C for 10 min, respectively. Finally, LA-MRS or LA-RNFD were inoculated with a  
107 fresh culture (1 %) and incubated at 37 °C for 48 h with a water bath shaker (Lab-Line  
108 Instruments, INC, Melrose Park, IL) set at 200 rpm. After this incubation period samples  
109 were analyzed for CLA content by gas chromatography (GC).

110

111 **2.4. CLA determination**

112 Samples (2 mL) lipid fraction was extracted with 20 mL of a mixture of  
113 chloroform and methanol (2:1) (Folch et al., 1957). Subsequently, the lipids were  
114 reconstituted in 200 µL of chloroform and 1 mL of 1 N methanolic hydrochloric acid  
115 was added. The mixture was allowed to react for 30 min at 60 °C. The methylation  
116 reaction was stopped by addition of 200 µL of distilled water. The fatty acid methyl  
117 esters were extracted twice in hexane (1 mL), and the hexane was desiccated by addition  
118 of anhydrous sodium sulfate (Hernandez-Mendoza et al., 2009). Then, fatty acid methyl  
119 esters (1 µL) were injected into an Hewlett Packard 6890 GC system equipped with a  
120 flame ionization detector (Wilmington, DE) and a SP-2560 capillary column (100 m x  
121 0.25 mm, 0.2 µm thickness) (Supelco, Bellefonte, PA). The injector and the detector  
122 temperatures were 240 and 260 °C, respectively. Helium was used as the carrier gas with  
123 a constant flow of 1.5 mL/min with a split ratio of 1:5. The temperature program was as  
124 follows: 140 °C for 4 min, then to 176 °C at 9 °C/min, then to 180 °C at 2 °C/min. The



125 total run time was 70 min. Analytical standards methyl 9(Z), 11(E)-octadecadienoate  
126 and methyl 10(E), 12(Z)-octadecadienoate were used for the identification and  
127 determination of CLA. For CLA quantitation, a five point standard curve was  
128 constructed.

129

### 130 ***2.5. Viable counts under simulated gastric and intestinal conditions***

131 Simulated gastric and intestinal solutions were prepared according to the method  
132 reported by Cruz-Pacheco et al. (2010). Then, 10 mL fresh culture were centrifuged at  
133 5000 rpm for 15 min at 4 °C and washed twice with saline phosphate buffer (PBS) at pH  
134 7.2. The cell pellet was resuspended in 10 mL of gastric solution and incubated at 37 °C  
135 for 3 h. Viable counts were made in MRS agar plates before (0 h) and after 3 h of  
136 exposure to the simulated gastric solution. On the other hand, 100 mL of the simulated  
137 intestinal solution were inoculated with 1 % of fresh culture and incubated at 37 °C for  
138 24 h. Viable counts were made in MRS agar plates after 0, 2, 4, 6, 8, 12 and 24 h. The  
139 results were expressed as colony forming units per milliliter (CFU/mL)

140

### 141 ***2.6. CLA production in simulated gastrointestinal conditions***

142 To simulate the gastrointestinal conditions in a continuous model, 45 mL of MRS  
143 broth were inoculated with 1% of fresh culture and incubated for 18 h at 37°C. The cell  
144 pellet was harvested after centrifugation at 5000 rpm, washed twice with PBS and  
145 resuspended in 4.5 mL of PBS. Subsequently, 6 mL of simulated saliva solution were  
146 added, the pH was adjusted to pH 6.5 with 1 M HCl and the solution was incubated for 5  
147 min at 37 °C. After this time, 12 mL of simulated gastric juice were added, the pH was  
148 adjusted to 3 with 1 M of HCl and the solution was incubated for 2 h at 37 °C. Finally,  
149 18 mL of simulated intestinal juice solution containing 0.2% of LA micellar solution  
150 were added, the pH was adjusted to pH 6.5 with 1 M of NaHCO<sub>3</sub> and the solution was  
151 incubated for 24 h at 37 °C (Kabak and Ozbey, 2012). Saliva, gastric and gastrointestinal  
152 solutions were prepared according to the protocol described by Fernández de Palencia et  
153 al. (2008).

154

155

156 **2.7. Labelled bacteria**

157 LAB were grown in MRS broth and incubated for 18 h at 37 °C, then, the cell  
158 pellet was harvested after centrifugation at 5000 rpm for 15 min at 4 °C, and washed  
159 twice with PBS. LAB cultures were adjusted in suspension to a concentration of 10<sup>9</sup>  
160 LAB/mL with PBS and labelled with 50 µM (per mL of cell suspension) of a fluorescent  
161 dye 5-(and -6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (**CFDA-SE**) at 37 °C for  
162 20 min. Finally, LAB were washed with PBS to remove excess dye (Duangjitcharoen et  
163 al., 2009). The labelled LAB were observed in a fluorescence microscope Axio Scope  
164 A1 Carl Zeiss (Göttingen, Germany) equipped with a 450-490 nm filter and a 100 x/1.25  
165 oil WD = 0.22 M27 immersion objective (A-Plan, Carl Zeiss). Images were analyzed  
166 using Zen 2012 lite software (Carl Zeiss).

167

168 **2.8. In vivo adhesion assay**

169 Seven weeks old Wistar male rats (n = 10) (Harlan Teklad, Inc, México City)  
170 were inoculated orally with 1 mL of 10<sup>9</sup> labelled CFU/mL for 7 days with an intra  
171 gastric tube. After this period, the rats were sacrificed and the small intestine was  
172 removed and washed with sterile distilled water and sterile PBS, to remove residual  
173 blood. Subsequently, the inside of the small intestine was washed with sterile PBS to  
174 remove organic matter and cut into three parts (duodenum, jejunum and ileum) (Lee et  
175 al., 2004). Finally, the three sections of the small intestine were stained with  
176 hematoxylin-eosin and observed by a fluorescence microscope Axio Scope A1.

177

178

**3. RESULTS**

179

180 **3.1. Screening of CLA-producing strains in MRS broth or skim milk**

181 None of the thirteen *Lactobacillus* was able to produce CLA in LA-MRS broth,  
182 however, four strains were able to produce CLA in LA-RNFDM (Table 1). CLA  
183 concentration produced by these four strains of *Lactobacillus* ranged from 13.44±0.78 to  
184 50.9±0.26 µg/mL. The most productive strain was *L. fermentum* J20 and the least  
185 productive strain was *L. pentosus* J26 ( $P<0.05$ ). While *L. fermentum* J23 and *L.*  
186 *plantarum* J25 strains produced 19.98 ±1.03 and 23.53±1.94, respectively. The

187 proportion of the CLA isomers produced by the strains was also strain dependent. *L.*  
188 *fermentum* J20 produced 80.6 % of *c9, t11* and 19.4% of *t10, c12* isomers; *L. fermentum*  
189 J23 produced 31.29% of *c9, t11* and 68.71% of the *t10, c12* isomers; *L. plantarum* J25  
190 produced 71.5% of *c9, t11* and 28.5 % of *t10, c12* isomers; and *L. pentosus* J26  
191 produced only the *c9, t11* isomer.

192

### 193 **3.2. Viable counts under simulated gastric and intestinal conditions**

194 Figure 1 shows the CFU/mL of the four *Lactobacillus* producing CLA in LA-  
195 RNFDM, before and after exposure to simulated gastric conditions. Results showed that  
196 strains *L. fermentum* J23 strain and *L. plantarum* J25 showed no significant difference  
197 after 3 h of being subjected to gastric conditions with respect to time 0 h ( $P>0.05$ ),  
198 although cell concentration decreased by 0.5 and 0.72 logarithmic cycles, respectively.  
199 While strains *L. fermentum* J20 and *L. pentosus* J26 significantly decreased their cell  
200 concentration by 1.11 and 1.14 logarithmic cycles ( $P<0.05$ ). Figure 2 shows the  
201 CFU/mL of the four *Lactobacillus* when exposed to simulated intestinal conditions for  
202 24 h. The results showed that the four *Lactobacillus* remained viable for 24 h in  
203 simulated intestinal juice conditions, although *L. fermentum* J23 and *L. plantarum* J25  
204 decreased in 0.49 and 0.74 logarithmic log cycles, while *L. fermentum* J20 strain and *L.*  
205 *pentosus* J26 decreased in 0.75 and 0.73 logarithmic log cycles. However, differences  
206 between their growth in simulated intestinal juice and MRS broth at 24 h were not  
207 significantly different ( $P>0.05$ ).

208

### 209 **3.3. Production of CLA in simulated gastrointestinal conditions**

210 *L. fermentum* J20 and J23 produced  $4.33\pm 0.42$   $\mu\text{g/mL}$  and  $2.55\pm 0.35$   $\mu\text{g/mL}$  of  
211 CLA, respectively, showing no significant difference between them ( $P>0.05$ ) (Figure 3).  
212 On the other hand, *L. plantarum* J25 and *L. pentosus* J26 produced  $15.05\pm 0.76$   $\mu\text{g/mL}$   
213 and  $36.96\pm 3.24$   $\mu\text{g/mL}$  of CLA, respectively, and were significantly different from *L.*  
214 *fermentum* J20 and J23 strains ( $P<0.05$ ) (Figure 3).

215

216

217

218 **3.4. *In vivo* adhesion assay**

219 Figure 4 A, C and E show histological sections the duodenum, jejunum and  
220 ileum of rats treated with labelled bacteria, while Figure 4 B, D and F show the  
221 fluorescence emitted by labelled bacteria in these same segments of the small intestine.  
222 The presence of fluorescence in the tissue was associated to intestine adhesion,  
223 therefore, the results showed that J20, J23, J25 and J26 strains were able to adhere to the  
224 rats intestinal mucosa.

225 **DISCUSSION**

226  
227 LAB's ability to produce CLA is due to a detoxification mechanism because LA  
228 is generally more toxic to bacteria than CLA (Nieman, 1954, Wang et al., 2007). This  
229 study found that only four *Lactobacillus* were able to synthesize CLA in LA-RNFDM,  
230 additionally, all four strains produced a biologically active isomer. Other investigations  
231 have reported that LAB isolates from different niches have also been able to produce  
232 CLA in skim milk containing LA and the amount of CLA produced was also strain  
233 dependent and varied from  $2.73\pm 0.07$  to  $131.63\pm 5.82$   $\mu\text{g/mL}$  (Alonso et al., 2003,  
234 Puniya et al., 2009). The results of this study indicated that *L. fermentum* J20 was the  
235 strain that was able to produce the most CLA content ( $50.9\pm 0.26$   $\mu\text{g/mL}$ ) at 48 h of  
236 fermentation. Other authors have reported that *L. plantarum-2* and *L. acidophilus* Ki  
237 produced 17.54 and 0.89  $\mu\text{g/mL}$ , respectively of CLA in milk at 48 h (Rodríguez-Alcalá  
238 et al., 2011), whereas *L. acidophilus* O16 and *L. casei* E10 produced  $54.31\pm 4.13$  and  
239  $71.36\pm 2.75$   $\mu\text{g/mL}$  at 24 h of fermentation (Alonso et al., 2003). Therefore, the results  
240 indicated that the ability of LAB to synthesize CLA in LA-RNFDM and the amount  
241 produced is dependent on the strain under study. On the other hand, it is interesting to  
242 point out that none of the strains were able to produce CLA in LA-MRS broth. In other  
243 studies, the production of CLA by *Lactobacillus* strains was two or three-fold higher in  
244 milk than in MRS broth, and all evaluated strains were able to produce CLA from high  
245 LA levels (1000 mg/mL) in milk (Van Niewenhove et al., 2007a). It has been reported  
246 that many milk compounds, like proteins, could neutralize the negative effects of fatty  
247 acids on bacterial metabolism, which could explain bacterial growth in milk even at high  
248 concentrations of LA and higher CLA production (Andrade et al., 2012).

249           The survival of *Lactobacillus* to gastrointestinal conditions is very important  
250 since allows to colonize and maintain the production of CLA in the intestine. The stress  
251 of gastric juice is the first barrier that must endure the bacteria before arriving to the  
252 intestine, and these conditions can modify the intracellular pH of bacteria and cause  
253 death (Kajfasz and Quivey, 2011). The four bacteria producing CLA were able to grow  
254 under simulated gastrointestinal conditions. Other studies have reported similar results to  
255 those obtained in this study; for example, four strains of *L. fermentum* ( IMAU60129,  
256 IMAU60092, IMAU6008 and F6), decreased one logarithmic cycle after being subjected  
257 to the stress of simulated gastric juice for 3 h, whereas seven *L. fermentum* strains  
258 decreased an average of 2 logarithmic cycles (Bao et al., 2010). On the other hand, it has  
259 also been reported that *L. casei* DSPV 318T showed to be highly resistant to simulated  
260 gastric juice (Frizzo et al., 2006). Apparently, this resistance to low pH could be  
261 dependent on the complex enzymatic H<sup>+</sup>-ATPase (Musikasang et al., 2009). In addition,  
262 other studies have reported less BAL stress resistance in comparison to that found in this  
263 study. For example, *L. plantarum subsp. plantarum* WCFS1 decreased 5 logarithmic  
264 cycles, while *L. plantarum subsp. plantarum* DPC6429 decreased 8 logarithmic cycles  
265 upon exposure to simulated gastric juice (Guidone et al., 2014).

266           Additionally, the four bacteria under study were able to grow under simulated  
267 intestinal conditions. Similar results have been reported with 11 strains of  
268 *Propionibacterium* which remained viable and without significant changes in cell  
269 concentration after being subjected to stress in simulated intestinal juice ( $P>0.05$ ), while  
270 *P. freudenreichii* CSCC2207 and *P. acidopropionici* 341 showed a decrease in their cell  
271 concentration ( $P<0.05$ ). However, in that study the pH used was of 8 and exposure to  
272 simulated intestinal juice was for 4 h (Huang and Adams, 2004). In other study, *L.*  
273 *acidophilus* M92 showed high susceptibility since viable counts decreased three  
274 logarithmic cycles after being exposed to simulated intestinal juice for 4 h (Kos et al.,  
275 2000). It is argued that LAB's susceptibility could be related to its low capacity to  
276 hydrolyze bile salts by the action of the bile salt hydrolase enzyme (Moser and Savage,  
277 2001, Begley et al., 2005, Taranto et al., 2006). Thus, results found in this study  
278 indicated that the ability to tolerate gastric or intestinal conditions is strain dependent.

279           Moreover, the four *Lactobacillus* strains maintained the ability to produce CLA  
280 in simulated gastrointestinal conditions, although the production of CLA in milk was  
281 significantly larger than the production of CLA in simulated gastrointestinal conditions  
282 for J20, J23 and J25 strains (91.49, 87.23 and 36.03%, respectively). On the other hand,  
283 it is interesting to note that J26 produced a higher amount of CLA in simulated  
284 gastrointestinal conditions than in milk (63.63%). Roman-Nunez et al. (2007) studied  
285 the effect of bile acid (sodium glycolate) in the increase of CLA content. In that study, it  
286 was reported that there was a possibility that the cell membrane proteins were  
287 dissociated by bile acids and therefore a higher amount of CLA was produced.

288

289           The intestinal adhesion capacity of the four CLA producing *Lactobacillus* strains  
290 was shown in the duodenum, jejunum and ileum. The histological sections of intestinal  
291 tissue after inoculation with labelled LAB showed similar results to those reported by  
292 Valeur et al. (2004). Unlike others studies in which stool samples are taken, or where  
293 intestinal scrapings were performed, the method used in this study allows to visually  
294 detect the bacteria implanted in the intestine.

295

296

## CONCLUSIONS

297

298           The results of this study indicated that *L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23, *L.*  
299 *plantarum* J25 and *L. pentosus* J26 were capable of producing CLA in reconstituted  
300 nonfat dry milk. Also, these strains showed capacity to grow and produce CLA under  
301 simulated gastrointestinal conditions, and to adhere to the rats intestinal mucosal,  
302 suggesting that these strains could produce CLA in the intestine. Further studies are  
303 under way for testing the health benefits that may be conferred by the administration of  
304 these *Lactobacillus* in fermented milk.

305

306

307

308

309

## REFERENCES

- 310  
311
- 312 Akalin, A. S., Ö. Tokuşoğlu, S. Gönç, and Ş. Aycan. 2007. Occurrence of conjugated  
313 linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with fructooligosaccharide. *Int.*  
314 *Dairy J.* 17:1089-1095.
- 315 Alonso, L., E. P. Cuesta, and S. E. Gilliland. 2003. Production of free conjugated  
316 linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human  
317 intestinal origin. *J. Dairy Sci.* 86:1941-1946.
- 318 Andrade, J.C., Ascencao, K., Gullon, P., Henriques, S.M.S., Pinto, J.M.S., Rocha-  
319 Santos, T.A.P., Freitas, A.C. and Gomes, A.M. 2012. Production of conjugated  
320 linoleic acid by food-grade bacteria: a review. *Int. J. Dairy Technol.* 65:467-481.
- 321 Bao, Y., Y. Zhang, Y. Zhang, Y. Liu, S. Wang, X. Dong, Y. Wang, and H. Zhang. 2010.  
322 Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from  
323 traditional dairy products. *Food Control.* 21:695-701.
- 324 Begley, M., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 2005. The interaction between bacteria and  
325 bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:625-651.
- 326 Benchaar, C., G. A. Romero-Perez, P. Y. Chouinard, F. Hassanat, M. Eugene, H. V.  
327 Petit, and C. Cortes. 2012. Supplementation of increasing amounts of linseed oil to  
328 dairy cows fed total mixed rations: effects on digestion, ruminal fermentation  
329 characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. *J. Dairy Sci.*  
330 95:4578-4590.
- 331 Bhattacharya, A., J. Banu, M. Rahman, J. Causey, and G. Fernandes. 2006. Biological  
332 effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J. Nutr. Biochem.* 17:789-  
333 810.
- 334 Coakley, M., R. P. Ross, M. Nordgren, G. Fitzgerald, R. Devery, and C. Stanton. 2003.  
335 Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *J.*  
336 *Appl. Microbiol.* 94:138-145.
- 337 Cruz-Pacheco, K., G. V. del Toro, F. Robles-Martínez, and E. Durán-Páramo. 2010.  
338 Viability of *Lactobacillus delbrueckii* Under Human Gastrointestinal Conditions  
339 Simulated In Vitro. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 5:37-42.

340 Chin, S. F., W. Liu, J. M. Storkson, Y. L. Ha, and M. W. Pariza. 1992. Dietary sources  
341 of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of  
342 anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.* 5:185-197.

343 Chouinard, P. Y., L. Corneau, W. R. Butler, Y. Chilliard, J. K. Drackley, and D. E.  
344 Bauman. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid  
345 concentrations in milk fat. *J. Dairy Sci.* 84:680-690.

346 do Espirito Santo, A. P., N. S. Cartolano, T. F. Silva, F. A. Soares, L. A. Gioielli, P.  
347 Perego, A. Converti, and M. N. Oliveira. 2012. Fibers from fruit by-products  
348 enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in  
349 yoghurts. *Int. J. Food Microbiol.* 154:135-144.

350 Domagała, J., M. Sady, D. Najgebauer-Lejko, M. Czernicka, and I. Wieteska. 2009. The  
351 content of conjugated linoleic acid (CLA) in cream fermented using different starter  
352 cultures. *Biotech. Anim. Husbandry.* 25:745-751.

353 Duangjitcharoen, Y., D. Kantachote, M. Ongsakul, N. Poosaran, and C. Chaiyasut. 2009.  
354 Potential use of probiotic *Lactobacillus plantarum* SS2 isolated from a fermented  
355 plant beverage: safety assessment and persistence in the murine gastrointestinal  
356 tract. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 25:315-321.

357 Fernández de Palencia, P., P. López, A. Corbí, C. Peláez, and T. Requena. 2008.  
358 Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, in vitro  
359 adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. *Eur. Food. Res. Technol.*  
360 227:1475-1484.

361 Florence, A., R. Silva, A. Santo, L. Gioielli, A. Tamime, and M. Oliveira. 2009.  
362 Increased CLA content in organic milk fermented by bifidobacteria or yoghurt  
363 cultures. *Dairy Sci. Technol.* 89:541-553.

364 Flowers, G., S. A. Ibrahim, and A. A. AbuGhazaleh. 2008. Milk fatty acid composition  
365 of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *J. Dairy Sci.* 91:722-  
366 730.

367 Folch, J., M. Lees, and G. H. Sloane Stanley. 1957. A simple method for the isolation  
368 and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226:497-509.

369 Frizzo, L. S., L. P. Soto, E. Bertozzi, G. Sequeira, L. E. Marti, and M. R. Rosmini. 2006.  
370 Evaluación in vitro de las capacidades probióticas microbianas orientadas al diseño



371 de inóculos probióticos multiespecie para ser utilizados en la crianza de terneros.  
372 Revista FAVE - Ciencias Veterinarias. 5:69-81.

373 Guidone, A., T. Zotta, R. P. Ross, C. Stanton, M. C. Rea, E. Parente, and A. Ricciardi.  
374 2014. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A multivariate  
375 screening study. *LWT-Food Sci. Technol.* 56:69-76.

376 Hernandez-Mendoza, A., A. Lopez-Hernandez, C. G. Hill, and H. S. Garcia. 2009.  
377 Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus reuteri*  
378 under different growth conditions. *J. Chem. Technol. Biot.* 84:180-185.

379 Huang, Y. and M. C. Adams. 2004. In vitro assessment of the upper gastrointestinal  
380 tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.*  
381 91:253-260.

382 Kabak, B. and F. Ozbey. 2012. Aflatoxin M1 in UHT milk consumed in Turkey and first  
383 assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. *Food Control.*  
384 28:338-344.

385 Kajfasz, J. K. and R. J. Quivey. 2011. Responses of Lactic Acid Bacteria to Acid Stress.  
386 Pages 23-53 in *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. E. Tsakalidou and K.  
387 Papadimitriou, ed. US: Springer, eds., New York.

388 Kim, Y. J. and R. H. Liu. 2002. Increase of Conjugated Linoleic Acid Content in Milk  
389 by Fermentation with Lactic Acid Bacteria. *J. Food. Sci.* 67:1731-1737.

390 Kos, B., J. Suskovic, J. Goreta, and S. Matosic. 2000. Effect of Protectors on the  
391 Viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in Simulated Gastrointestinal  
392 Conditions. *Food technol. biotechnol.* 38:121-127.

393 Lee, K. and Y. Lee. 2009. Production of c9,t11- and t10,c12-conjugated linoleic acids in  
394 humans by *Lactobacillus rhamnosus* PL60. *J. Microbiol. Biotechnol.* 19:1617-1619.

395 Lee, Y. K., P. S. Ho, C. S. Low, H. Arvilommi, and S. Salminen. 2004. Permanent  
396 colonization by *Lactobacillus casei* is hindered by the low rate of cell division in  
397 mouse gut. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:670-674.

398 Lima Alves, L., N. Santos Richards, L. Mariutti, G. Nogueira, and N. Bragagnolo. 2011.  
399 Inulin and probiotic concentration effects on fatty and linoleic conjugated acids in  
400 cream cheeses. *Eur. Food. Res. Technol.* 233:667-675.

401 Liu, P., S. R. Shen, H. Ruan, Q. Zhou, L. L. Ma, and G. Q. He. 2011. Production of  
402 conjugated linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally  
403 fermented Chinese pickles. *J. Zhejiang Univ-Sc. B.* 12:923-930.

404 Moser, S. A. and D. C. Savage. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to  
405 toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl.*  
406 *Environ. Microbiol.* 67:3476-3480.

407 Musikasang, H., A. Tani, A. H-kittikun, and S. Maneerat. 2009. Probiotic potential of  
408 lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World J.*  
409 *Microbiol. Biotechnol.* 25:1337-1345.

410 Nieman, C. 1954. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of  
411 microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 18:147-163.

412 O'Shea, M., J. Bassaganya-Riera, and I. C. Mohede. 2004. Immunomodulatory  
413 properties of conjugated linoleic acid. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1199-1206.

414 Pandit, A., S. Anand, K. Kalscheur, and A. Hassan. 2012. Production of conjugated  
415 linoleic acid by lactic acid bacteria in milk without any additional substrate. *Int. J.*  
416 *Dairy. Technol.* 65:603-608.

417 Park, Y. 2009. Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat? *J. Food. Compos.*  
418 *Anal.* 22:4-12.

419 Prandini, A., S. Sigolo, G. Tansini, N. Brogna, and G. Piva. 2007. Different level of  
420 conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy. *J. Food. Compos. Anal.*  
421 20:472-479.

422 Puniya, A., C. Reddy, S. Kumar, and K. Singh. 2009. Influence of sunflower oil on  
423 conjugated linoleic acid production by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus*  
424 *casei*. *Ann. Microbiol.* 59:505-507.

425 Rodríguez-Alcalá, L. M., T. Braga, F. Xavier Malcata, A. Gomes, and J. Fontecha.  
426 2011. Quantitative and qualitative determination of CLA produced by  
427 *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag+-  
428 HPLC techniques. *Food. Chem.* 125:1373-1378.

429 Roman-Nunez, M., E. P. Cuesta-Alonso, and S. E. Gilliland. 2007. Influence of sodium  
430 glycocholate on production of conjugated linoleic acid by cells of *Lactobacillus*  
431 *reuteri* ATCC 55739. *J. Food. Sci.* 72:140-143.

- 432 Taranto, M. P., G. Perez-Martinez, and G. Font de Valdez. 2006. Effect of bile acid on  
433 the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Res.*  
434 *Microbiol.* 157:720-725.
- 435 Valeur, N., P. Engel, N. Carbajal, E. Connolly, and K. Ladefoged. 2004. Colonization  
436 and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human  
437 gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1176-1181.
- 438 Van Nieuwenhove, C. P., R. Oliszewski, S. N. Gonzalez, and A. B. Perez Chaia. 2007a.  
439 Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and  
440 buffalo milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 44:467-474.
- 441 Van Nieuwenhove, C. P., R. Oliszewski, S. N. González, and A. B. Pérez Chaia. 2007b.  
442 Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on  
443 conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food. Res. Int.* 40:559-564.
- 444 Wall, R., R. P. Ross, F. Shanahan, L. O'Mahony, C. O'Mahony, M. Coakley, O. Hart, P.  
445 Lawlor, E. M. Quigley, B. Kiely, G. F. Fitzgerald, and C. Stanton. 2009. Metabolic  
446 activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine  
447 and porcine liver and adipose tissues. *Am. J. Clin. Nutr.* 89:1393-1401.
- 448 Wang, L.-M., J.-P. Lv, Z.-Q. Chu, Y.-Y. Cui, and X.-H. Ren. 2007. Production of  
449 conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii*. *Food Chem.* 103:313-  
450 318.

451

452

453

454

455

456

457

458

459

460

461

462 **Table 1.** CLA producing *Lactobacillus* in reconstituted nonfat dry milk containing  
 463 linoleic acid.

Strain	Code	CLA ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		<i>c9, t11</i>	<i>t10, c12</i>	CLA
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<b>J10</b>	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<b>J20</b>	42.63 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>	8.27 $\pm$ 0.64 <sup>a</sup>	50.9 $\pm$ 0.26 <sup>a</sup>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<b>J23</b>	7.73 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>	11.25 $\pm$ 0.51 <sup>b</sup>	19.98 $\pm$ 1.03 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<b>J24</b>	-	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<b>J25</b>	13.72 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	9.81 $\pm$ 1.02 <sup>ab</sup>	23.53 $\pm$ 1.94 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<b>J26</b>	13.44 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	13.44 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<b>J27</b>	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<b>J28</b>	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<b>J211</b>	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<b>J212</b>	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<b>J214</b>	-	-	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	<b>J217</b>	-	-	-
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<b>J218</b>	-	-	-

464 Different literal indicates significant difference between columns ( $P < 0.05$ ).

465

466

467

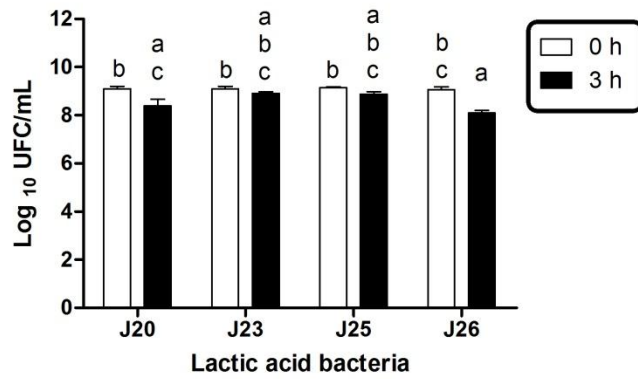
468

469

470

471

472 **Figure 1.** Cell viable counts of *Lactobacillus* strains in simulated gastric conditions.  
473 Different letter indicates significant difference ( $P<0.05$ ).



474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

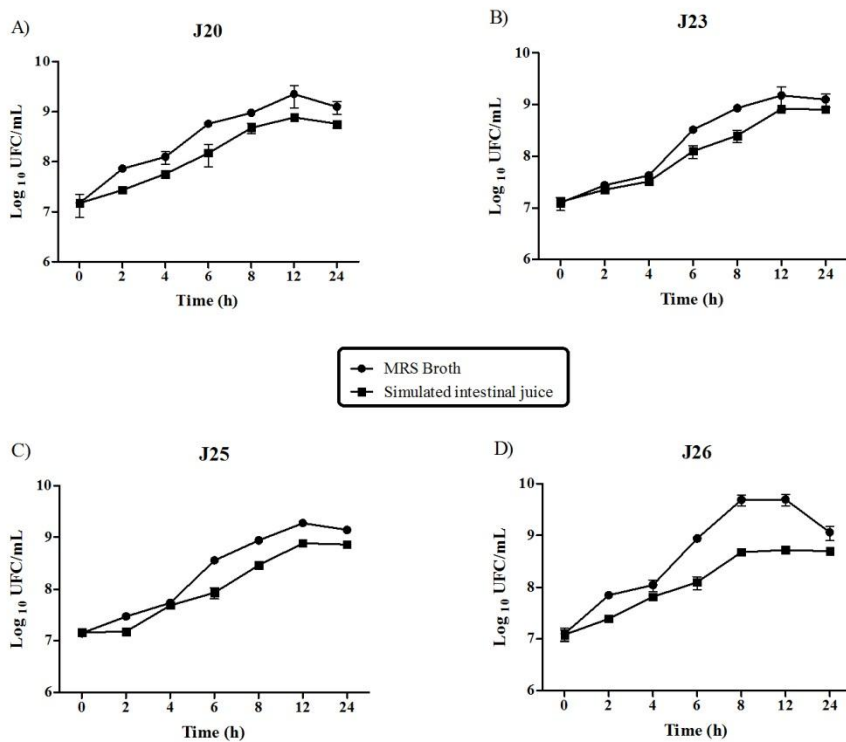
485

486

487

488

489 **Figure 2.** Cell viable counts of *Lactobacillus* strains in simulated intestinal conditions



490

491

492

493

494

495

496

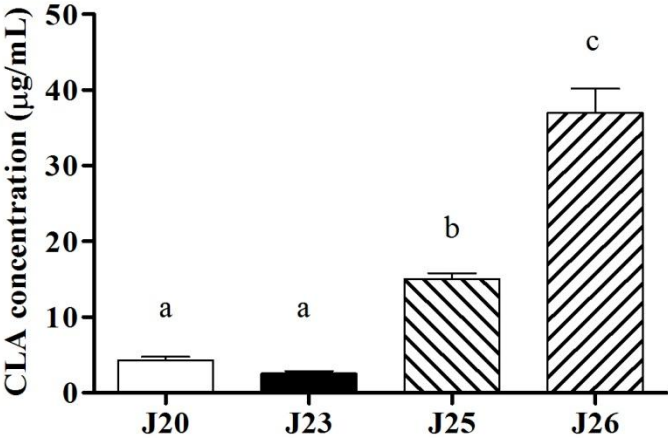
497

498

499

500

501 **Figure 3.** CLA production of *Lactobacillus* strains in simulated gastrointestinal  
502 conditions. Different letter indicates significant difference ( $P<0.05$ ).



503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

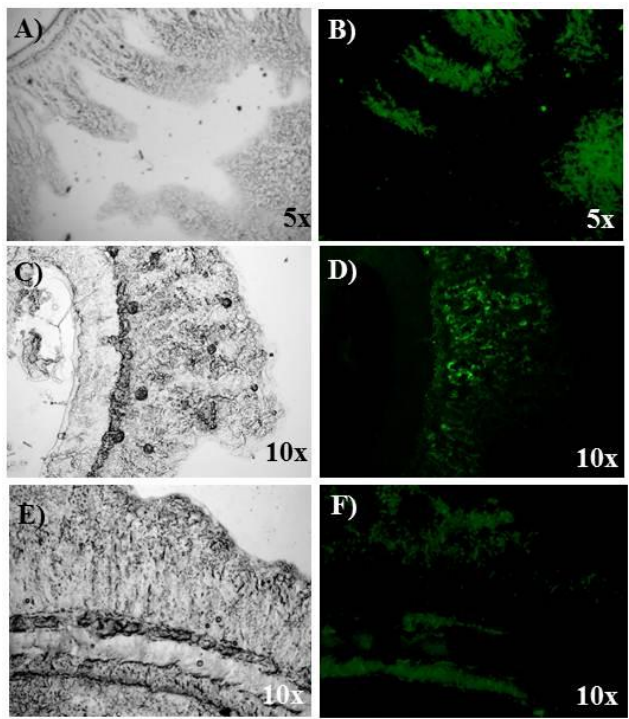
513

514

515

516

517 **Figure 4.** Labelled bacteria with CFDA-SE adhered to the intestinal tissue of rats. A)  
518 Duodenal intestinal tissue without fluorescence (5x); B) Duodenal intestinal tissue with  
519 fluorescence (5x); C) Jejunum intestinal tissue without fluorescence (10x); D) Jejunum  
520 intestinal tissue with fluorescence (10x); E) Ileum intestinal tissue without fluorescence  
521 (10x); F) Ileum intestinal tissue with fluorescence (10x).  
522



523



**Capítulo 4.** Efecto antiinflamatorio asociado al consumo de leches fermentadas con *Lactobacillus* productores de ácido linoléico conjugado (CLA) en un modelo murino. Artículo en revisión por la *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*

J. Sosa-Castañeda<sup>1</sup>, A. Hernández-Mendoza<sup>1</sup>, P. Y. Heredia-Castro<sup>1</sup>, H. F. Astiazarán-García<sup>2</sup>, H. S. Garcia<sup>3</sup>, A. F. González-Córdova<sup>1</sup>, B. Vallejo-Cordoba<sup>1\*</sup>

## Resumen

El ácido linoleico conjugado (CLA) ha mostrado conferir efectos benéficos sobre la salud, sin embargo, su concentración es baja en los alimentos. La utilización de bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de CLA se ha planteado como una estrategia para la elaboración de leches fermentadas con mayor concentración de CLA que la presente naturalmente en la leche. Sin embargo, no se ha explorado si las leches fermentadas con cepas de BAL productoras de CLA confieren un efecto benéfico para la salud. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antiinflamatorio por la administración de leches fermentadas con cuatro BAL productoras de CLA en un modelo murino. Los resultados mostraron que la administración de leches fermentadas con *L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23 o *L. plantarum* J25 a ratas Wistar, disminuyeron los niveles de IL-6 y TNF- $\alpha$  en suero de sangre y la temperatura fisiológica ( $P < 0.05$ ) después de la estimulación con una endotoxina. Por lo que se concluyó que la administración de leches fermentadas con estos *Lactobacillus* presentaron un efecto antipirético y antiinflamatorio.

1 **Efecto antiinflamatorio asociado al consumo de leches fermentadas con**  
2 ***Lactobacillus* productores de ácido linoléico conjugado (CLA) en un**  
3 **modelo murino**

4  
5  
6 J. Sosa-Castañeda<sup>1</sup>, A. Hernández-Mendoza<sup>1</sup>, P. Y. Heredia-Castro<sup>1</sup>, H. F.  
7 Astiazarán-García<sup>2</sup>, H. S. Garcia<sup>3</sup>, A. F. González-Córdova<sup>1</sup>, B. Vallejo-  
8 Cordoba<sup>1\*</sup>.

9  
10  
11  
12 <sup>1</sup>Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos. Coordinación  
13 de Tecnología de Alimentos de Origen Animal. <sup>2</sup>Laboratorio de Patología  
14 Experimental. Coordinación de Nutrición. Centro de Investigación en  
15 Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Carretera a La Victoria Km 0.6,  
16 Apartado 1735. Hermosillo, Sonora, 83304. México.

17  
18  
19  
20  
21 \*Autor para correspondencia. Tel: (662) 289-2400 Local 303 o 365; Fax: (662)  
22 280-0421. E-mail: [vallejo@ciad.mx](mailto:vallejo@ciad.mx).

23  
24  
25  
26  
27 <sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en  
28 Alimentos (UNIDA). Calz. Miguel Ángel de Quevedo No. 2779. Col. Formando  
29 Hogar. Veracruz, Veracruz, 91897. México.

30  
31

32 **Resumen**

33

34 El ácido linoleico conjugado (CLA) ha mostrado conferir efectos  
35 benéficos sobre la salud, sin embargo, su concentración es baja en los  
36 alimentos. La utilización de bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de CLA  
37 se ha planteado como una estrategia para la elaboración de leches  
38 fermentadas, con mayor concentración de CLA, que la presente naturalmente  
39 en la leche. Sin embargo, no se ha explorado si las leches fermentadas con  
40 cepas de BAL productoras de CLA confieren un efecto benéfico para la salud.  
41 Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto  
42 antiinflamatorio por la administración de leches fermentadas con BAL  
43 productoras de CLA en un modelo murino. Los resultados mostraron que la  
44 administración de leches fermentadas con *Lb. fermentum* J20, *Lb. fermentum*  
45 J23 o *Lb. plantarum* J25 a ratas Wistar, disminuyeron los niveles de IL-6 y TNF-  
46  $\alpha$  en suero y la temperatura fisiológica ( $P < 0.05$ ) después de la estimulación con  
47 una endotoxina. La administración de leches fermentadas con estos  
48 *Lactobacillus* (*Lb.*) presentaron un efecto antipirético y antiinflamatorio.

49

50 **Palabras clave:** Bacterias ácido lácticas, Ácido linoleico conjugado, Leches  
51 fermentadas, Efecto Antiinflamatorio y Antipirético.

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63                   **Anti-inflammatory effect of milk fermented by CLA producing**  
64                                   ***Lactobacillus* in a murine model**

65  
66   **Abstract**

67           Conjugated linoleic acid (CLA) has shown to confer beneficial effects on  
68 health, however, it is not present in sufficient amounts in foods. Thus, the use of  
69 CLA producing lactic acid bacteria (LAB) has been proposed as a strategy for  
70 the manufacture of fermented milk with higher CLA concentration than that  
71 naturally present in milk. However, the beneficial effect of fermented milk with  
72 CLA producing LAB has not been explored. Therefore, the objective of this  
73 research was to evaluate the anti-inflammatory effect of fermented milk  
74 containing CLA producing LAB in a murine model. Results showed that the  
75 administration of fermented milk with *Lb. fermentum* J20, *Lb. fermentum* J23 or  
76 *Lb. plantarum* J25 to Wistar rats decreased the levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in  
77 plasma and the physiological temperature ( $P < 0.05$ ) after stimulation with an  
78 endotoxin. Thus it was concluded that the administration of fermented milk with  
79 these *Lactobacillus* (*Lb.*) presented an antipyretic and anti-inflammatory effect.

80  
81   **Keywords:** Bacteria lactic acid, Conjugated linoleic acid, Fermented milks, Anti-  
82 inflammatory, antipyretic.

## 94 **Introducción**

95 La tendencia del consumidor por adquirir productos que no solo nutran  
96 sino que también ayuden a prevenir enfermedades ha aumentado en los últimos  
97 años (1). Un ejemplo de estos alimentos son los productos lácteos, por ser la  
98 fuente más importante de CLA en la dieta (2). El CLA es una mezcla de  
99 isómeros geométricos y posicionales derivados del LA que ha mostrado  
100 capacidad anticancerígena, antiinflamatoria y antihipertensiva, además de  
101 reducir el tejido adiposo y el colesterol LDL y aumentar el colesterol HDL (3-8).

102 Debido a que el CLA no se encuentra en cantidades suficientes en los  
103 alimentos (9-11), algunas investigaciones se han enfocado en estudiar la  
104 capacidad que tienen diferentes BAL para sintetizar CLA en medio de cultivo  
105 (12, 13) y aumentar la cantidad de CLA en leche fermentada (14, 15) y yogurt  
106 (16, 17). Además, se ha demostrado que liofilizados de algunas BAL  
107 productoras de CLA al ser suministradas a animales (18) o humanos (19)  
108 fueron capaces de producir CLA en el intestino.

109 Algunas cepas de BAL o sus metabolitos son benéficas al hospedero y  
110 pueden interactuar con las células del sistema inmune innato y regular la  
111 respuesta pro-inflamatoria y antiinflamatoria a través de la producción de (20).  
112 Por otro lado, el choque séptico y la inflamación sistémica causada por  
113 endotoxinas asociadas a patógenos sigue causando una alta mortalidad en  
114 pacientes (21). En este particular, algunos estudios han investigado el efecto  
115 antiinflamatorio que tienen algunas BAL como resultado del choque séptico  
116 inducido por el lipopolisacárido (LPS) en ratones (20). Sin embargo, en este  
117 estudio el efecto benéfico antiinflamatorio fue atribuido a la estructura celular de  
118 las BAL y sus metabolitos actuando sinérgicamente, sin hacer ninguna  
119 relación con la producción de CLA.

120 En estudios previos en nuestros laboratorios, se encontró que cuatro  
121 cepas nativas de *Lactobacillus* (*Lb.*) aisladas de queso artesanal con  
122 propiedades tecnológicas importantes, presentaron la capacidad de sintetizar  
123 CLA en leche descremada adicionada con ácido linoléico (LA) y conservaron  
124 esa capacidad al ser expuestos a condiciones gastrointestinales simuladas

125 (publicación en revisión). Además estas mismas cepas presentaron adhesión al  
126 tracto intestinal de ratas Wistar. Por lo que, el uso de estos *Lactobacillus*  
127 capaces de producir CLA en leche adicionada con LA podría proporcionar un  
128 efecto benéfico para la salud. Hasta donde es de nuestro conocimiento, no se  
129 ha evaluado el efecto antiinflamatorio de la administración de leche fermentada  
130 con BAL productora de CLA en modelos animales. Por lo anterior, el objetivo de  
131 esta investigación fue evaluar el efecto antiinflamatorio por la administración de  
132 leches fermentadas con *Lactobacillus* productores de CLA a ratas Wistar  
133 estimuladas con LPS como endotoxina.

134

## 135 **Materiales y Métodos**

### 136 Origen y activación de las cepas

137 Se utilizaron 4 *Lactobacillus* aisladas de queso artesanal de Sonora,  
138 México. Las cepas fueron identificadas en estudios previos como *Lb. fermentum*  
139 J20, *Lb. fermentum* J23, *Lb. plantarum* J25 y *Lb. pentosus* J26 y se encuentran  
140 en el cepario del Laboratorio de Química y Biotecnología de Productos Lácteos  
141 del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (Hermosillo,  
142 Sonora, México). Las bacterias fueron propagadas en caldo MRS a pH 6.5  
143 (DIFCO™, Sparks, MD, USA). Se realizaron 3 subcultivos inoculados al 1%, el  
144 primer y segundo subcultivos fueron incubados por 24 h a 37 °C, mientras que  
145 el tercer subcultivo fue incubado por 18 h para la obtención de un cultivo fresco.

146

### 147 Preparación de las leches fermentadas

148 Leche descremada (Organic Valley, USA) fue reconstituida al 10% y  
149 esterilizada a 110 °C por 10 min. Posteriormente, la leche fue inoculada con  
150 cultivos frescos ( $10^9$  UFC/mL) de los diferentes *Lactobacillus* bajo estudio.  
151 Finalmente, la leche fue incubada por 48 h a 37 °C. Para el caso de las leches  
152 suplementadas con LA (Sigma-Aldrich, USA), estas fueron suplementadas con  
153 0.2%

154

155

156 Manejo de los animales y diseño experimental

157 Se utilizaron 72 ratas machos de la cepa Wistar (Harlan, México) con un  
158 peso promedio de  $231.70 \pm 6.98$  g. Las ratas fueron seleccionadas de manera  
159 aleatoria para formar 12 grupos de 6 animales por grupo (Cuadro 1). Las ratas  
160 tuvieron libre acceso al alimento y al agua. Las condiciones de alojamiento  
161 fueron a 25 °C con un fotoperíodo de 12 h de luz. Antes de iniciar el  
162 experimento las ratas tuvieron 7 días de adaptación para reducir el estrés y  
163 estabilizar su metabolismo. Posteriormente, las ratas fueron inoculadas  
164 diariamente con 1 mL de cada tratamiento por 7 semanas (Cuadro 1). La  
165 concentración final de BAL presentes en las leches fermentadas con o sin  
166 fuente de LA fue de  $10^8$  UFC/mL. Al finalizar las 7 semanas, todos los grupos  
167 fueron inyectados vía subcutánea con una dosis de 7.5 mg/kg de peso de LPS  
168 resuspendida en agua estéril (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, USA).  
169 Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Los datos fueron  
170 analizados por un ANOVA y se realizó la comparación de medias por la prueba  
171 de Tukey-Kramer, ambos a un nivel de significancia de 0.05. El análisis de los  
172 datos se realizó por el programa estadístico NCSS versión 2007 (NCSS, LLC,  
173 USA).

174

175 Temperatura fisiológica

176 La temperatura de las ratas fue tomada con un termómetro digital por vía  
177 rectal por 1 min utilizando vaselina como lubricante, antes y después de la  
178 estimulación con LPS. La temperatura fue tomada en los tiempos 0, 1, 2, 4, 6,  
179 8, 10, 12 y 24 h y fue expresada como  $\Delta T$ . Los cambios en la temperatura  
180 fisiológica fueron calculados a partir de la siguiente ecuación:  $\Delta T = T_t - T_0$ ,  
181 donde  $T_t$  corresponde a las temperaturas después de la estimulación con LPS y  
182  $T_0$  corresponde a la temperatura antes de la estimulación con LPS.

183

184 Cuantificación de citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$

185 Se utilizaron los kits comerciales IL-6 Rat ELISA kit y TNF- $\alpha$  Rat ELISA  
186 kit (LifeTechnologies, USA) para la cuantificación de citocinas proinflamatorias

187 en suero. La cuantificación se hizo siguiendo el protocolo recomendado por el  
188 proveedor. Las muestras de sangre fueron colectadas por punción cardíaca a  
189 las 24 h posterior a la estimulación con LPS y fueron reposadas por 24 h a 25  
190 °C previo a la recolección de suero.

191

## 192 **Resultados y Discusión**

193 Durante las 7 semanas de administración de las leches fermentadas, no  
194 se observó presencia de diarrea ni modificaciones en los pesos corporales de  
195 las ratas en los grupos tratados ( $P>0.05$ ). Al finalizar las 7 semanas de  
196 tratamiento, las ratas pesaron en promedio  $356.88 \pm 11.11$  g y la temperatura  
197 fisiológica de las ratas sanas se mantuvo en  $36.6 \pm 0.13$  °C. En la semana 7 se  
198 indujo sepsis con LPS de *E. coli* para simular una infección bacteriana  
199 sistémica. Los resultados mostraron que después de 2 h pos-estimulación las  
200 ratas presentaron síntomas clínicos como exudación ocular, letargia y pelo  
201 erizado. Además, se observó un incremento de la temperatura fisiológica, lo que  
202 indicó que la endotoxina estimuló al sistema inmune.

203 La Fig. 1 muestra las temperaturas fisiológicas de las ratas después de la  
204 estimulación con LPS. Los resultados mostraron que en los tiempos 2, 4 y 6 h la  
205 temperatura fisiológica tuvo un incremento significativamente menor en los  
206 grupos suministrados con leches fermentadas L(J20), L(J20) + LA, L(J23),  
207 L(J23) + LA, L(J25) y L(J25) + LA ( $P<0.05$ ), con respecto a los grupos testigo  
208 (D, L, L + LA y L + CLA) y los grupos L(J26) o L(J26) + LA. Además, no se  
209 observaron diferencias significativas entre las leches fermentadas ( $P>0.05$ ). Los  
210 grupos tratados con leche fermentada, con excepción del grupo administrado  
211 con L(J26) o L(J26) + LA, tuvieron un menor aumento en la temperatura  
212 fisiológica que los grupos testigo, y estas diferencias variaron con un  $\Delta T$  de 0.2  
213 a 3.0 a través de las 24 h (Figura 1). Por último, a las 24 h post-estimulación  
214 todos los grupos presentaron el mismo incremento en la temperatura fisiológica  
215 ( $P>0.05$ ). Por lo que, el efecto antipirético fue atribuido a la ingesta de las  
216 leches fermentadas con las cepas *Lb. fermentum* J20, *Lb. fermentum* J23 y *Lb.*  
217 *plantarum* J25. Por otro lado, hasta donde es de nuestro conocimiento, no



218 existen reportes en donde se haya evaluado la temperatura fisiológica en  
219 modelos murinos suministrados con leches fermentadas con BAL y desafiados  
220 con patógenos o endotoxinas. Sin embargo, los resultados encontrados en este  
221 estudio fueron similares a los reportados por (22) para lechones inoculados con  
222 *Lb. rhamnosus* GC y desafiados con *Escherichia coli* K88, los cuales no  
223 incrementaron su temperatura fisiológica a diferencia de los lechones no  
224 tratados con *L. rhamnosus* GC.

225 La Fig 2. muestra los niveles séricos de las citocinas proinflamatorias  
226 TNF- $\alpha$  e IL-6 a las 24 h post-estimulación con LPS. Los resultados mostraron  
227 que los grupos tratados con leches fermentadas L(J20), L(J20) + LA, L(J23),  
228 L(J23) + LA, L(J25) y L(J25) + LA presentaron menor incremento en la  
229 concentración sérica de TNF- $\alpha$  e IL-6 con respecto a los grupos testigo (D, L, L  
230 + LA, L + CLA) y los grupos L(J26) o L(J26) + LA ( $P < 0.05$ ). Por otro lado, no se  
231 encontraron diferencias significativas entre los grupos que recibieron leche  
232 fermentada (L(J20), L(J23) y L(J25)) y leches fermentadas adicionadas con LA  
233 ( $P > 0.05$ ). Por lo anterior, la disminución en la concentración del TNF- $\alpha$  e IL-6  
234 podría ser atribuída a la administración de las leches fermentadas con las cepas  
235 *Lb. fermentum* J20, *Lb. fermentum* J23 y *Lb. plantarum* J25 y esta disminución  
236 no se vió incrementada cuando a la leche se le adicionó LA como sustrato para  
237 la producción de CLA. Por ello, el efecto antiinflamatorio de las leches  
238 fermentadas de este estudio no podría ser atribuido al CLA producido por la  
239 adición de LA. Aunque estas cepas (J20, J23 y J25) fueron capaces de producir  
240 CLA (20.0-51.0 mg/L) en leche adicionada con LA (publicación en revisión), es  
241 posible que las concentraciones de CLA producidas por los *Lactobacillus* no  
242 hayan sido suficientes para mostrar un efecto antiinflamatorio en el modelo  
243 murino. Es importante señalar que la cepa (J26), que produjo la menor  
244 concentración de CLA (13.4 mg/L) en leche (publicación en revisión), no  
245 presentó efecto antipirético o antiinflamatorio. Por lo anterior, no se descarta  
246 que una posible inflamación aguda inducida en los animales de  
247 experimentación, haya podido enmascarar el efecto antipirético o

248 antiinflamatorio esperado atribuible al CLA producido por los *Lactobacillus* J20,  
249 J23 y J25 en leche fermentada adicionada con LA.

250 Por otro lado, el efecto antiinflamatorio de las leches fermentadas podría  
251 estar asociado a las BAL *per se* (23, 24) o a otros componentes de la leche  
252 fermentada que pudieran ser capaces de modular la respuesta inmune tales  
253 como péptidos bioactivos (25, 26) y/o exopolisacáridos (27, 28). Se ha  
254 reportado que *Lactobacillus reuteri* CRL1101, redujo la inflamación durante un  
255 choque endotóxico con LPS inducido en ratones y que este beneficio fue  
256 atribuido a la bacteria *per se* y a los compuestos excretados por la bacteria en  
257 el medio de cultivo (20). Los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en plasma de los animales  
258 tratados con la cepa CRL1101 fueron significativamente reducidos con respecto  
259 a los animales no tratado con la cepa. Por otro lado, otros estudios han  
260 mostrado que la administración de leches fermentadas con *L. casei* CRL 431 a  
261 ratones, disminuyeron tumoraciones inducidas artificialmente (29). También fue  
262 reportado que los niveles séricos de TNF- $\alpha$  y de IL-6 disminuyeron  
263 significativamente en ratones con cáncer de colon tratados con leche  
264 fermentada con *L. helveticus* R389 (30). De manera similar, en este estudio los  
265 niveles séricos de TNF- $\alpha$  y de IL-6 disminuyeron cuando las ratas fueron  
266 administradas con leche fermentada con cepas de *L. fermentum* J20, *L.*  
267 *fermentum* J23 y *L. plantarum* J25 y sometidas a una inflamación sistémica  
268 inducida con una endotoxina.

269

## 270 **Conclusiones e implicaciones**

271 En este estudio, las leches fermentadas con las cepas *L. fermentum* J20,  
272 *L. fermentum* J23 y *L. plantarum* J25 mostraron efecto antiinflamatorio y  
273 antipirético en ratas estimuladas con una endotoxina. Sin embargo, dichos  
274 efectos benéficos no pudieron ser potenciados con la adición de LA en la leche  
275 como sustrato para la producción de CLA. Por lo anterior, es necesario realizar  
276 estudios *in vivo* para elucidar si el efecto benéfico de la administración de estas  
277 leches fermentadas fue debido a la bacteria *per se* y/o a los metabolitos  
278 producidos por ésta, en el extracto libre de células.

279

## 280 **Agradecimientos**

281 El primer autor agradece el apoyo al Consejo Nacional de Ciencia y  
282 Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el programa de  
283 Doctorado en Ciencias en el Centro de Investigación en Alimentación y  
284 Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.). Se agradece el apoyo técnico recibido por parte  
285 de los M. en C. María del Carmen Estrada Montoya y Ricardo Reyes Díaz; así  
286 como de Gerardo Reyna-Cañez.

287

## 288 **Literatura citada**

- 289 1. Khan RS, Grigor J, Winger R. Functional food product development –  
290 Opportunities and challenges for food manufacturers. *Trends in Food*  
291 *Science & Technology* 2013; (30):27-37.
- 292 2. Andrade JC, Ascensão K, Gullón P, Henriques SMS, Pinto JMS, Rocha-  
293 Santos TAP, *et al.* Production of conjugated linoleic acid by food-grade  
294 bacteria: A review. *International Journal of Dairy Technology*  
295 2012;(65):467-481.
- 296 3. Belury MA. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects  
297 and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition* 2002;(22):505-31.
- 298 4. O'Shea M, Bassaganya-Riera J, Mohede IC. Immunomodulatory  
299 properties of conjugated linoleic acid. *The American Journal of Clinical*  
300 *Nutrition* 2004;(79):1199S-1206S.
- 301 5. Bhattacharya A, Banu J, Rahman M, Causeyb J, Fernandes G. Biological  
302 effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *The Journal of*  
303 *Nutritional Biochemistry* 2006;(17):789-810.
- 304 6. Churruca I, Fernandez-Quintela A, Portillo MP. Conjugated linoleic acid  
305 isomers: differences in metabolism and biological effects. *Biofactors*  
306 2009; (35):105-11.
- 307 7. Park Y. Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat? *Journal of*  
308 *Food Composition and Analysis* 2009;(22):4-12.

- 309 8. Soto-Rodríguez I, Pulido-Camarillo E, Hernández-Díaz G, Alexander-  
310 Aguilera A, García HS. A CLA enriched diet improves organ damage  
311 associated with the metabolic syndrome in spontaneous hypertensive  
312 rats. *Grasas y Aceites* 2011;(62):49-54.
- 313 9. Fritsche J, Steinhart H. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in  
314 German foods and evaluation of daily intake. *Zeitschrift für  
315 Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A* 1998;(206):77-82.
- 316 10. Fremann D, Linseisen J, Wolfram G. Dietary conjugated linoleic acid  
317 (CLA) intake assessment and possible biomarkers of CLA intake in young  
318 women. *Public Health Nutrition* 2002;(5):73-80.
- 319 11. Ritzenthaler KL, McGuire MK, Falen R, Shultz TD, Dasgupta N, McGuire  
320 MA. Estimation of conjugated linoleic acid intake by written dietary  
321 assessment methodologies underestimates actual intake evaluated by  
322 food duplicate methodology. *The Journal of Nutrition* 2001;(131):1548-54.
- 323 12. Hernandez-Mendoza A, Lopez-Hernandez A, Hill Jr CG, Garcia HS.  
324 Bioconversion of linoleic acid to conjugated linoleic acid by *Lactobacillus*  
325 *reuteri* under different growth conditions. *Journal of Chemical Technology  
326 & Biotechnology* 2009;(84):180-185.
- 327 13. Liu P, Shen SR, Ruan H, Zhou Q, Ma L, He G. Production of conjugated  
328 linoleic acids by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally  
329 fermented Chinese pickles. *Journal of Zhejiang University. Science. B*  
330 2011;(12):923-30.
- 331 14. Van Nieuwenhove CP, Oliszewski R, Gonzalez SN, Chaia ABP.  
332 Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS  
333 broth and buffalo milk. *Letters in Applied Microbiology* 2007;(44):467-74.  
334
- 335 15. Rodríguez-Alcalá LM, Braga T, Xavier Malcata F, Gomes A, Fontecha J.  
336 Quantitative and qualitative determination of CLA produced by  
337 *Bifidobacterium* and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric  
338 and Ag<sup>+</sup>-HPLC techniques. *Food Chemistry* 2011;(125):1373-1378.

- 339 16. Akalin AS, Tokuşoğlu Ö, Gönç S, Aycan Ş. Occurrence of conjugated  
340 linoleic acid in probiotic yoghurts supplemented with  
341 fructooligosaccharide. *International Dairy Journal* 2007;(17):1089-1095.
- 342 17. do Espirito Santo AP, Cartolano NS, Silva TF, Soares FASM, Gioielli LA,  
343 Perego P, *et al.* Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability  
344 and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *International*  
345 *Journal of Food Microbiology* 2012;(154):135-44.
- 346 18. Wall R, Ross RP, Shanahan F, O'Mahony L, O'Mahony C, Coakley M, *et*  
347 *al.* Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid  
348 composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *The*  
349 *American Journal of Clinical Nutrition* 2009;(89):1393-401.
- 350 19. Lee K, Lee Y. Production of c9,t11- and t10,c12-conjugated linoleic acids  
351 in humans by *Lactobacillus rhamnosus* PL60. *Journal of Microbiology and*  
352 *Biotechnology* 2009;(19):1617-9.
- 353 20. Juarez GM, Villena J, Salva S, De Valdez GF, Rodriguez AV.  
354 *Lactobacillus reuteri* CRL1101 beneficially module lipopolysaccharide-  
355 mediated inflammatory response in a mouse model of endotoxic shock.  
356 *Jornal of Functional Food* 2013;(5):1761-1773.
- 357 21. Brandenburg K, Andra J, Garidel P, Gutschmann T. Peptide-based  
358 treatment of sepsis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011;(90):799-808.
- 359 22. Zhang L, Xu Y-Q, Liu H-Y, Lai T, Maa J-L, Wang J-F, *et al.* Evaluation of  
360 *Lactobacillus rhamnosus* GG using an *Escherichia coli* K88 model of  
361 piglet diarrhoea: Effects on diarrhoea incidence, faecal microflora and  
362 immune responses. *Veterinary Microbiology* 2010;(141):142-148.
- 363 23. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B,  
364 Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from  
365 dairy products. *International Dairy Journal* 2006;(16):189-199.
- 366 24. Ghadimi D, Folster-Holst R, de Vrese M, Winklera P, Hellerc KJ,  
367 Schrezenmeira J. Effects of probiotic bacteria and their genomic DNA on  
368 TH1/TH2-cytokine production by peripheral blood mononuclear cells

- 369 (PBMCs) of healthy and allergic subjects. *Immunobiology*  
370 2008;(213):677-92.
- 371 25. LeBlanc J, Fliss I, Matar C. Induction of a humoral immune response  
372 following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an  
373 immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus*  
374 *helveticus*-fermented milk. *Clinical and Diagnostic Laboratory*  
375 *Immunology* 2004;(11):1171-81.
- 376 26. Qian B, Xing M, Cui L, Deng Y, Xu Y, Huang M, *et al.* Antioxidant,  
377 antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions  
378 from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*  
379 LB340. *Journal of Dairy Research* 2011;(78):72-79.
- 380 27. Wu M-H, Pan T-M, Wu Y-J, Chang S-J, Chang M-S, Hu C-Y.  
381 Exopolysaccharide activities from probiotic bifidobacterium:  
382 Immunomodulatory effects (on J774A.1 macrophages) and antimicrobial  
383 properties. *International Journal of Food Microbiology* 2010;(144):104-  
384 110.
- 385 28. Ciszek-Lenda M. Biological functions of exopolysaccharides from  
386 probiotic bacteria. *Central European Journal of Immunology*  
387 2011;(36):51-55.
- 388 29. Aragón F, Carino S, Perdigón G, De LeBlanc A de M. The administration  
389 of milk fermented by the probiotic *Lactobacillus casei* CRL 431 exerts an  
390 immunomodulatory effect against a breast tumour in a mouse model.  
391 *Immunobiology* 2014; (219) 457–464
- 392 30. LeBlanc AM, Perdigón G. The application of probiotic fermented milks in  
393 cancer and intestinal inflammation. The 3rd International Immunonutrition  
394 Workshop was held at Platja D’Aro 2010: 421-428.

395

396

397

398

## Cuadros y gráficas

399

**Cuadro 1.** Tratamientos suministrados, adicional a la dieta estándar, en el modelo murino bajo estudio

400

TRATAMIENTOS	CÓDIGO
Agua	D
<sup>1</sup> Leche	L
<sup>2</sup> Leche + LA	L+LA
<sup>3</sup> Leche + CLA	L+CLA
<sup>4</sup> Leche fermentada con J20	L(J20)
<sup>4</sup> Leche fermentada con J20 + LA	L(J20) + LA
<sup>4</sup> Leche fermentada con J23	L(J23)
<sup>4</sup> Leche fermentada con J23 + LA	L(J23) + LA
<sup>4</sup> Leche fermentada con J25	L(J25)
<sup>4</sup> Leche fermentada con J25 + LA	L(J25) + LA
<sup>4</sup> Leche fermentada con J26	L(J26)
<sup>4</sup> Leche fermentada con J26 + LA	L(J26) + LA

401

402 <sup>1</sup>Leche reconstituida sin fermentar. <sup>2</sup>Leche reconstituida adicionada con 0.2%  
 403 de LA sin fermentar. <sup>3</sup>Leche reconstituida adicionada con 50.45 ppm de CLA  
 404 comercial (Tonalin® CLA, GNC, USA) sin fermentar. <sup>4</sup>Leche reconstituida  
 405 adicionada con 0.2% de LA o sin fuente de LA y fermentada con alguna BAL  
 406 bajo estudio (J20, J23, J25 o J26). J20=*Lactobacillus fermentum* J20; J23=*L.*  
 407 *fermentum* J23; J25=*L. plantarum* J25; J26= *L. pentosus* J26.

408

409

410

411

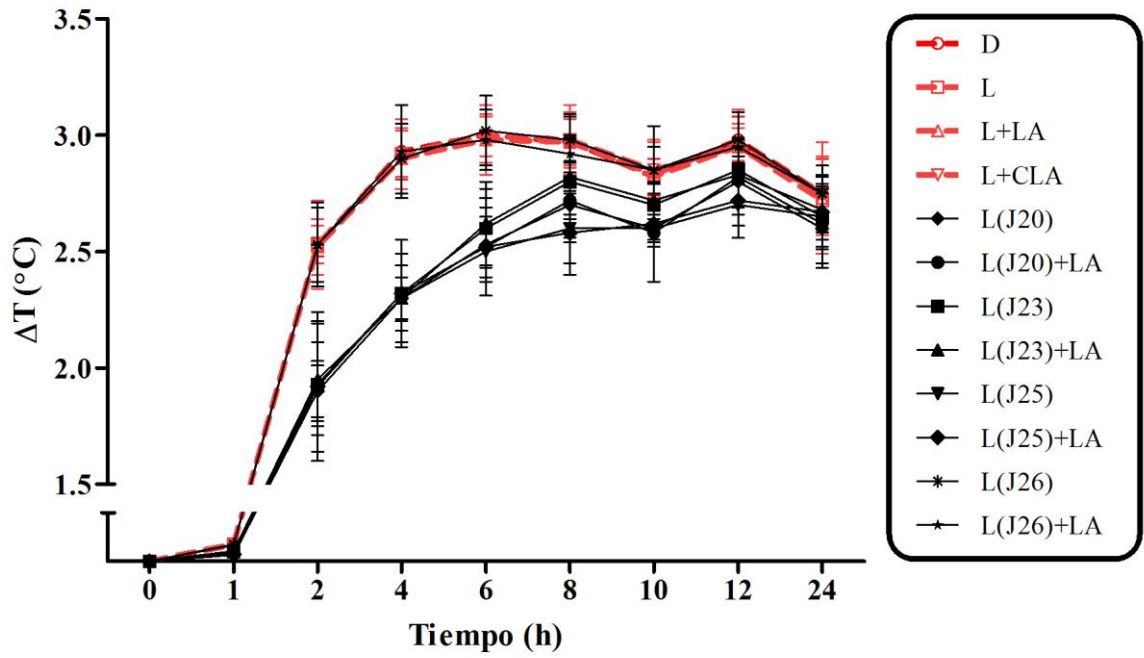
412

413

414

415

Figura 1. Temperaturas fisiológicas



417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

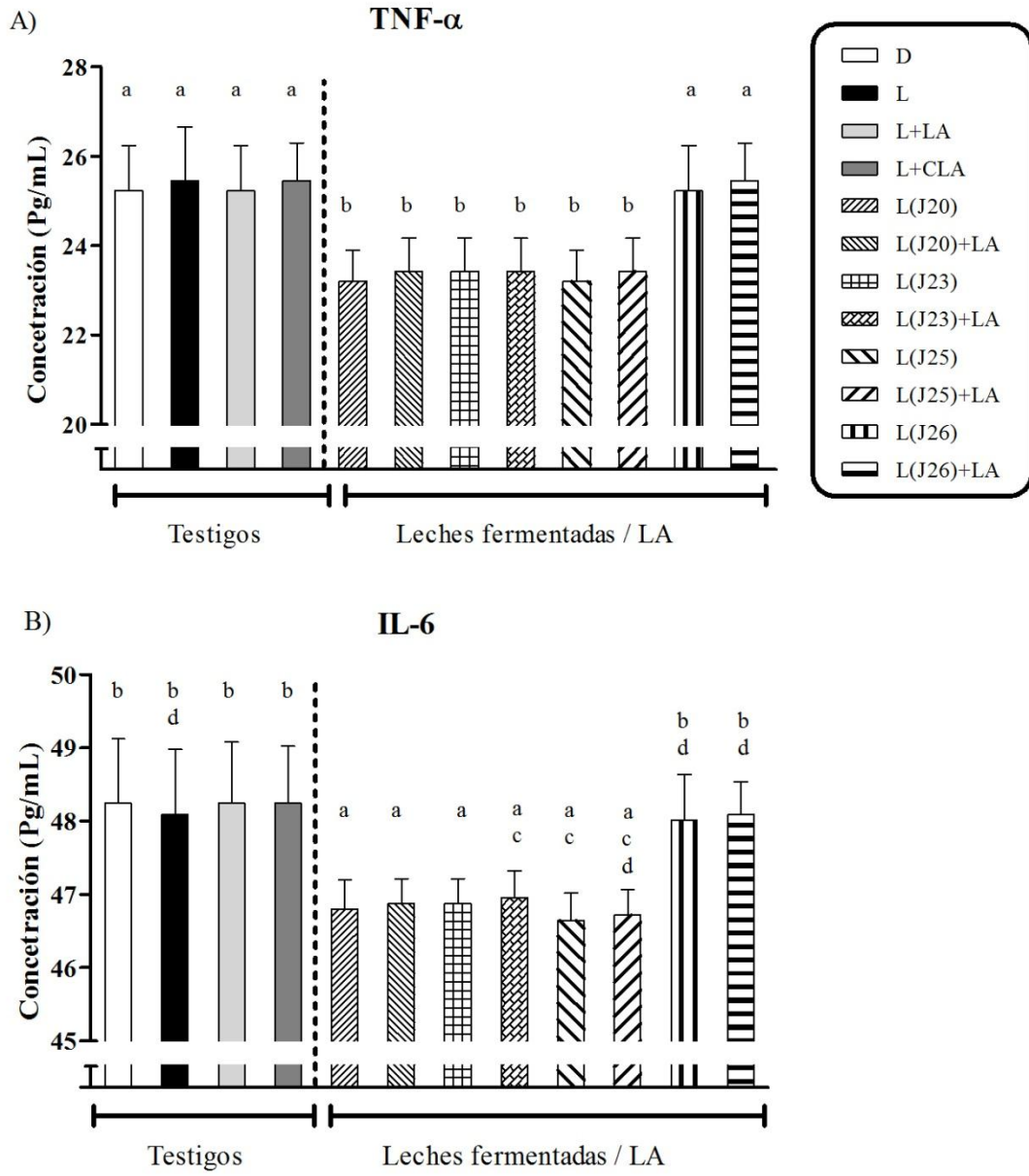
429

430

431



Figura 2. Concentración sérica de TNF- $\alpha$  e IL-6.



433

434

435

436

## CONCLUSIONES

- En este estudio, los *Lactobacillus* con potencial probiótico aislados de “queso Cocido” (*L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23, *L. plantarum* J25 y *L. pentosus* J26) mostraron la capacidad de sintetizar CLA en leche descremada adicionada con ácido linoleico, pero no en medio de cultivo (caldo MRS). Lo cual sustenta la hipótesis de que las proteínas de la leche podrían estar ejerciendo un efecto protector para las bacterias.
- Por otra parte, a pesar de que las condiciones digestivas evaluadas redujeron la capacidad de síntesis de CLA de *L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23 y *L. plantarum* J25, los 4 *Lactobacillus* productores de CLA en leche descremada mostraron la capacidad de sintetizar CLA en condiciones gastrointestinales simuladas. Adicionalmente, ya que todas las cepas lograron adherirse a las células del epitelio intestinal de las ratas, los resultados sugieren que estos 4 *Lactobacillus* podrían sintetizar CLA en leche y podrían producir CLA a nivel intestinal.
- Las leches fermentadas con las cepas *L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23 y *L. plantarum* J25 mostraron efecto antiinflamatorio y antipirético en un modelo murino estimulado con una endotoxina. Sin embargo, dichos efectos benéficos no pudieron ser relacionados con la adición de ácido linoleico en la leche como sustrato para la producción de CLA. Esto, posiblemente debido al potente estímulo generado por la endotoxina. Por lo cual se recomienda evaluar éstos *Lactobacillus* en ratas estimuladas con una concentración más baja de endotoxina. El efecto antipirético observado en las primeras horas posterior a la estimulación con la endotoxina, sugiere que el efecto antiinflamatorio más importante ocurrió en las primeras horas,

lo cual evidencia la necesidad de evaluar los niveles de citocinas antiinflamatorias en las primeras 6 horas después de la estimulación.

- El efecto antiinflamatorio de estos *Lactobacillus* pudo ser resultado de la participación de diferentes metabolitos como exopolisacáridos, péptidos inmunomoduladores, o a los componentes de la pared celular de la propia bacteria. Por lo anterior, esta investigación abre la posibilidad de estudiar otros posibles mecanismos de acción, por ejemplo, evaluar el efecto de los extractos de leche fermentada libre de células para determinar si el efecto antiinflamatorio fue debido a péptidos inmunomoduladores, o evaluar la administración de los *Lactobacillus* en una solución salina, para elucidar si el mecanismo de acción fue por los componentes de la pared celular de las bacterias.
  
- Finalmente, las leches fermentadas con las cepas *L. fermentum* J20, *L. fermentum* J23 y *L. plantarum* J25 podrían ser utilizadas como coadyuvantes en el tratamiento de la inflamación causada por endotoxinas.