



Universidad
Nacional
de Córdoba



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ESCUELA DE POSGRADO

**“PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS Y FLUJO DE SALIVA
SUBMANDIBULAR DE RATAS CON RELACIÓN AL TIEMPO
DE INGESTA DE LÍPIDOS DIETARIOS”**

TESISTA:

OD. JORGE DARÍO ESCANDRIOLO NACKAUZI

DIRECTOR:

PROF. DRA. ADRIANA BEATRIZ ACTIS

CÓRDOBA, 2017



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/).



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE POSGRADO



*Perfil de ácidos grasos y flujo de saliva submandibular de ratas
con relación al tiempo de ingesta de lípidos dietarios*

Tesista

Od. Jorge Darío Escandriolo Nackauzi

Directora de tesis

Prof. Dra. Adriana Beatriz Actis

Co-directora de tesis

Prof. Dra. Raquel Vivian Gallará

Córdoba, Argentina

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
CARRERA DE DOCTORADO



Trabajo de tesis presentado como requisito para obtener el título universitario de

Doctor en Odontología

Od. Jorge Darío Escandriolo Nackauzi

Comisión de tesis doctoral

Prof. Dra. **Ana Beatriz Finkelberg**

Prof. Dra. **María Eugenia Pasqualini**

Prof. Dr. **Rubén Hugo Ponce**

Jurado de tesis doctoral

Prof. Dra. **Ana Beatriz Finkelberg**

Prof. Dra. **María Eugenia Pasqualini**

Prof. Dra. **María Elena López**

*Dejaste tus sueños para que yo soñase,
dejaste de alimentarte para que yo comiese,
trabajaste muy duro para que yo progresase,
derramaste muchas lágrimas para que yo fuese feliz,
perdiste noches de descanso para que yo durmiese tranquilo...*

*Siempre me amaste a pesar de mis errores,
siempre creíste en mí a pesar de mis limitaciones...*

*Siempre llevaré dentro de mí la esencia de tu ser,
y por siempre te estaré agradecido, a vos, Mamá.*

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis representa un arduo trabajo de escritorio y también el de varios años de intensa labor en distintos laboratorios, el que hubiese sido imposible sin la participación de tantas personas que colaboraron desinteresadamente para que llegara a un feliz término. Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas ellas. Al reflexionar sobre todos estos años de carrera, reconozco que han sido muy enriquecedores. Por ello, es un verdadero placer expresarles mi enorme gratitud a:

Dios, por darme la oportunidad de vivir, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haberme bendecido al poner en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo este período de estudio. Además, porque su amor hacia mí es leal, real e incondicional.

A mi directora, profesora y amiga Dra. **Adriana Beatríz Actis**, por el ánimo infundido y la confianza depositada en mí, así como también por guiarme y apoyarme desde el principio y a través de todo este tiempo que compartimos juntos. Su experiencia, rigurosidad y participación constante han sido de un valor incalculable en el desarrollo de esta tesis doctoral y una contribución a mi formación personal y como investigador. Su excelencia y profundo compromiso en todo lo que realiza representa para mí un modelo a seguir, con el que, realmente, me siento en deuda.

A mi codirectora de tesis, profesora y amiga Dra. **Raquel Vivian Gallará**, por aceptar la realización de esta tesis doctoral bajo su codirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo, así como también su experiencia y capacidad para guiar y ordenar mis ideas, han sido un aporte importante en la realización de este trabajo. Su buena predisposición y su profundo compromiso han enriquecido, significativamente, el trabajo realizado.

A los miembros de la comisión de tesis doctoral, Dres. **Ana Beatriz Finkelberg**, **María Eugenia Pasqualini** y **Rubén Hugo Ponce**, quienes con su orientación, participación y rigurosidad científica durante toda la carrera de doctorado han contribuido con mi formación científica.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Córdoba por el apoyo académico y económico brindado a través de una beca para finalización de doctorado y de los subsidios de investigación otorgados al proyecto macro. Además, mi profundo agradecimiento a esta universidad, pública y gratuita, que me dió la posibilidad de realizarme en lo personal, científico y profesional.

Al Dr. **Pablo Fontanetti**, Subsecretario de Relaciones Internacionales de la Facultad de Odontología, y a la Prosecretaría de Relaciones Internacionales de la Universidad Nacional de Córdoba, por las oportunidades de visitar otras universidades, lo que contribuyó a mi formación científica y al intercambio académico y humano con personas valiosas en todo aspecto.

A los Dres. **Claudio Bernal** de la Universidad Nacional del Litoral, **Gustavo Bonacci** de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, **José Miguel Amenábar Céspedes** de la Universidad Federal de Paraná, Brasil y **Enrique de Álava Casado** del Instituto de Biomedicina de Sevilla-Hospital Virgen del Rocío, España, un agradecimiento muy especial por abrirme las puertas de sus prestigiosos laboratorios para la ejecución de parte de este trabajo de investigación.

Al personal del Bioterio del Instituto Mercedes y Martín Ferreyra, así como también al Sr. **Ricardo Mattos**, que siempre tuvieron buena disposición cuando las necesidades lo requerían.

A los Dres. **Adriana Arriaga y Gastón Repossi**, por su acompañamiento sincero y desinteresado durante todo este proceso. Sus aportes, ideas y comentarios han sido absolutamente invaluable.

A la Od. **Evangelina Costantino**, compañera de equipo de investigación, por el trabajo y las horas compartidas durante estos últimos años.

A todos mis compañeros del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA) que con su entusiasmo y aliento constante tuvieron una participación activa, consciente o inconsciente, en el desarrollo de mi formación científica.

A todos los docentes de la Cátedra B de Anatomía de la Facultad de Odontología, Dra. **Alicia Simbrón**, Dr. **Luis Giambartolomei**, Od. **Rodrigo Juárez**, Od. **Adriana Sanz**, Od. **Viviana Flores**, Od. **Noelia Sica**, por los momentos de camaradería y trabajo compartido día a día.

A todos los docentes de la Cátedra A de Química Biológica de la Facultad de Odontología, por permitirme compartir su espacio para la realización de las experiencias con animales. Gracias por su apoyo y amistad.

A los alumnos, ahora colegas, **Javier Mischutín Saravia**, **César Combina Herrera**, **Karen Zapana** y **Mariana Blanco**, quienes me acompañaron y colaboraron en este proceso. Aprendí mucho de ellos, al tiempo que les enseñaba.

A mi madre **Alexandra**, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto personal como académica, por su apoyo incondicional a través del tiempo.

A mis hermanos **Darío**, **Jessica** y **Ariel**, porque la perseverancia y constancia que los caracteriza han sido ejemplos a seguir y fuerza para avanzar.

A mi esposa **Laura**, quien con una mezcla de romanticismo y erudición me permitió descubrir el ideario del amor. Su inagotable entrega hizo más llevaderos todos estos años de arduo trabajo. Llegué a este día, por ella... ¡Gracias por ser parte de mi vida y de mis logros!

Y finalmente, a mis hijos **Camila**, **Lucas** y **Ezequiel**, quienes con su sola existencia y su picardía espontánea supieron hacerme la persona más dichosa del universo... *In perpetuum usque in sempiternum erit, et amor vitae meae..!*

אתה אבל עדן בגג לי יש למי
אדמות עלי שואף שאני דבר אין, אתה מזה וחויץ

Salmos 73:25

*Don't only practice your art, but force your way into its secrets,
for it and knowledge can raise men to the Divine.*

Ludwig van Beethoven

*No solamente debemos golpear el hierro cuando está
caliente,
sino también calentar el hierro a golpes.*

Elena G. de White

En esta página va el certificado del Comité de Ética.

INDICE

Abreviaturas	12
Resumen	14
Abstract	16
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	18
1.1. Hipótesis.....	22
1.2. Objetivo general.....	22
1.3. Objetivos específicos.....	22
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	23
2.1. Glándulas salivales.....	24
2.1.1. Glándula submandibular.....	26
2.2. Saliva humana.....	28
2.2.1. Flujo salival.....	30
2.2.2. Relevancia clínica de la saliva.....	33
2.3. Lípidos.....	35
2.3.1. Digestión y absorción.....	35
2.3.2. Metabolismo.....	36
2.3.3. Lípidos en la saliva humana.....	37
2.4. Ácidos grasos (AG).....	37
2.4.1. Clasificación.....	38
2.4.2. Ácidos grasos esenciales.....	42
2.4.3. Ácido linoleico conjugado (CLA).....	44
2.4.4. Ingesta dietaria y perfil de AG en plasma y en saliva.....	45
2.5. Biomarcadores.....	46
2.5.1. Generalidades.....	46
2.5.2. Biomarcadores nutricionales.....	48
CAPÍTULO 3: MATERIALES y MÉTODOS	50
3.1. Animales.....	51
3.2. Dietas.....	52
3.3. Diseño experimental.....	56

3.3.1. Protocolo experimental 1.....	56
3.3.2. Protocolo experimental 2.....	58
3.4. Control de ingesta y peso corporal.....	59
3.5. Recolección de saliva submandibular y medición de flujo salival.....	59
3.6. Obtención de glándulas submandibulares y de tejido adiposo.....	61
3.7. Recolección de sangre.....	62
3.8. Homogeneización de tejidos.....	62
3.9. Extracción de lípidos.....	62
3.10. Metilación de AG.....	63
3.11. Análisis cromatográfico de los AG.....	63
3.12. Microscopía óptica.....	64
3.13. Microscopía electrónica.....	64
3.14. Análisis estadístico.....	65
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	67
4.1. Perfil de AG en fluidos y tejidos.....	68
4.1.1. Perfil de AG del grupo dietario maíz.....	68
4.1.2. Perfil de AG del grupo dietario oliva.....	75
4.1.3. Perfil de AG del grupo dietario chía.....	82
4.1.4. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 1 día de ingesta....	90
4.1.5. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 15 días de ingesta..	91
4.1.4. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 30 días de ingesta..	93
4.2. Flujo salival.....	95
4.2.1. Comparación del flujo salival submandibular entre grupos dietarios según tiempo de ingesta.....	95
4.2.2. Flujo salival submandibular en cada grupo dietario según tiempo de ingesta.....	96
4.2.3. Flujo salival y AG de la glándula submandibular según dieta y tiempo de ingesta.....	96
4.2.4. Cuantificación de acinos serosos y mucosos de glándula submandibular mediante microscopía óptica.....	100
4.2.5. Análisis de células acinares de glándula submandibular mediante microscopía electrónica.....	103

4.3. Biodisponibilidad de isómeros de CLA en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular.....	108
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN	111
5.1. Perfil de AG en fluidos y tejidos.....	112
5.1.1. Ingesta inmediata.....	113
5.1.2. Ingesta habitual.....	116
5.2. Flujo salival submandibular.....	123
5.3. Biodisponibilidad de isómeros CLA en fluidos y tejidos.....	129
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	134
6.1. Conclusiones parciales.....	135
6.2. Conclusión final.....	137
6.3. Limitaciones del trabajo de tesis doctoral.....	138
6.4. Aportes esperados del trabajo de tesis doctoral.....	138
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
ANEXOS	159

ABREVIATURAS

AA: ácido araquidónico

AAL: ácido α -linolénico

ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico

ADH: ácido docosaheptaenoico

ADP: ácido docosapentaenoico

AE: ácido esteárico

AEP: ácido eicosapentaenoico

AG: ácido graso / ácidos grasos

AGE: ácidos grasos esenciales

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

AL: ácido linoleico

AMP: adenosinmonofosfato

AO: ácido oleico

AP: ácido palmítico

APO: ácido palmitoleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNmi: micro ácido ribonucleico

CLA: ácido linoleico conjugado (*conjugated linoleic acid*)

DCh: dieta chía

DCLA: dieta CLA

DM: dieta maíz

DO: dieta oliva

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

FS: flujo salival

g: gramo

GS: glándula submandibular

H/E: hematoxilina/eosina

HDLP: lipoproteína de alta densidad (*high density lipoprotein*)

IMyMF: Instituto de Investigación Mercedes y Martín Ferreyra

Kg: kilogramo

LDLP: lipoproteína de baja densidad (*low density lipoprotein*)

mg: miligramo

min: minuto

mL: mililitro

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: plasma

PAS: ácido periódico de Schiff

PBS: solución *buffer* fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

RER: retículo endoplásmico rugoso

rpm: revoluciones por minuto

S: saliva

SECyT: Secretaría de Ciencia y Tecnología

TAP: tejido adiposo periglandular

TER: resistencia eléctrica transepitelial (*transepithelial electrical resistance*)

TRPV1: receptor de potencial transitorio vanilloide subtipo-1 (*transient receptor potential vanilloid type 1*)

UNC: Universidad Nacional de Córdoba

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad (*very low density lipoprotein*)

%á: porcentaje de área

μL: microlitro

μm: micrómetro

RESUMEN

OBJETIVO: Analizar el perfil de ácidos grasos (AG) y el flujo de saliva submandibular (FS) de ratas con relación al tiempo de ingesta de lípidos dietarios.

MÉTODOS: 78 ratas *Wistar* machos adultas fueron alimentadas con dieta maíz (rica en ácido linoleico; AL) durante 7 días y luego distribuidas en un grupo control (dieta maíz, DM) y dos experimentales, en los que se reemplazó el aceite de maíz por aceites de oliva (DO, rico en ácido oleico; AO) o de chía (DCh, rico en ácido alfa-linolénico; AAL). Las ratas fueron alimentadas con esas dietas durante 1, 15 y 30 días. Previa anestesia, se canalizaron los conductos submandibulares para obtener saliva (S). Se indujo su secreción con inyección intraperitoneal de isoproterenol/pilocarpina (5 mg/Kg de peso corporal c/u) y se recolectó durante 20 minutos (flujo salival; FS). Se extrajeron glándulas submandibulares (GS) y tejido adiposo periglandular (TAP). Se obtuvo sangre (punción cardíaca) que fue centrifugada para obtener plasma (P). Las muestras fueron congeladas brevemente a -20°C hasta su procesamiento. Se extrajeron los lípidos y se metilaron los AG con metóxido de sodio. Los metilésteres obtenidos fueron determinados por cromatografía gaseosa. Los valores fueron expresados en porcentaje de área. Se empleó prueba de *Kruskal Wallis* para comparar los valores de AG entre dietas, test *t* de *Student* para comparar el flujo salival ($\mu\text{l}/\text{minuto}$) entre grupos y correlación de *Spearman* para determinar asociaciones entre muestras ($p \leq 0.05$). Se utilizó el programa Infostat.

RESULTADOS: a 1 día de ingesta, el nivel de AO fue mayor en S y P de DO que de DM y DCh ($p < 0.05$) y el del ácido dihomo- γ -linolénico (ADGL) en S de DM que de DO ($p < 0.05$). El AAL presentó un valor mayor en S de DM y DO que de DCh ($p = 0,026$), mientras que el AG eicosapentaenoico (AEP) fue detectado en S, P y TAP y el AG docosahexaenoico (ADH) en S solo de DCh. A 15 días, el AAL fue mayor en S de DCh que de DM ($p = 0,002$). El porcentaje del AG araquidónico (AA) fue superior en P de DM comparado con DCh ($p = 0,037$) y DO ($p = 0,045$), mientras que el AEP mostró mayor valor en P y GS de DCh que en DM ($p < 0,05$) y DO ($p < 0,05$). A 30 días, el AAL fue detectado en S, P y GS solo en DCh. En P, el AO fue mayor en DO que en DM y DCh ($p = 0,041$). En cuanto al FS, a 1 día de ingesta fue de $6,18 \pm 0,34$ (DM), $6,04 \pm 0,31$ (DO) y $6,00 \pm 0,50$ (DCh), sin diferencias estadísticamente significativas entre grupos. A 15 días, fue de

8,26±0,43 (DM), 8,00±0,61 (DO) y 6,18±0,53 (DCh), y a 30 días los valores fueron 4,68±0,44 (DM), 6,08±0,2 (DO) y 7,82±0,7 (DCh). Las diferencias observadas entre grupos dietarios, a 15 días y a 30 días, fueron estadísticamente significativas ($p<0.001$).

CONCLUSIÓN: los niveles salivales de AO, ADGL, AEP y ADH refleja la ingesta dietaria inmediata, mientras que el AAL salival podría constituir un adecuado biomarcador de la ingesta habitual. Los AG dietarios, y su ingesta a diferentes tiempos, regulan el FS de las GS, siendo mayor en grupo DCh a los 30 días de consumo.

Palabras clave: ácidos grasos – dieta - ingesta inmediata - ingesta habitual - saliva - flujo salival.

ABSTRACT

OBJECTIVE: to analyze the fatty acid (FA) profile and the salivary flow rate (SFR) of rat submandibular glands in relation to the time elapsed from the dietary lipid intake.

METHODS: 78 Wistar adult male rats were fed on a corn diet (rich in linoleic acid; LA) for 7 days and then divided into a control (corn diet, CD) and two experimental groups in which the corn oil was replaced by olive oil (OD; rich in oleic acid; OA) or chia oil (ChD; rich in alpha-linolenic acid; ALA). Rats were fed on these diets for 1, 15 and 30 days. After anaesthesia, the submandibular ducts were canalized to obtain saliva (S). The salivary secretion was induced by isoproterenol/pilocarpine (5 mg/kg body weight) and then collected for 20 minutes (salivary flow rate; SFR). Submandibular gland (SG) and periglandular adipose tissue (PAT) were extracted. Blood samples (cardiac puncture) were centrifuged to obtain plasma (P). Samples were frozen at -20°C until processing. Lipids were extracted according to Folch's method and the FA were methylated with sodium methoxide. They were then determined by gas chromatography. Values are expressed as area percentage. The Kruskal Wallis test was applied to compare the FA values between diets, the Student t test to compare the SFR ($\mu\text{L}/\text{minute}$) between groups and the Spearman correlation analysis was used to determine the associations between samples ($p \leq 0.05$). The Infostat statistical software was employed.

RESULTS: at 1-day intake, the OA levels were higher in S and P of OD than those of CD and ChD ($p < 0.05$) and dihomo- γ -linolenic acid (DGLA) percentage was higher in S of CD than OD ($p < 0.05$). ALA showed a higher value in S of CD and OD than ChD ($p = 0.026$), whereas the eicosapentaenoic acid (EPA) was detected in S, P and PAT of ChD and the docosahexaenoic acid (DHA) in S only in this group. At 15-day intake, the ALA level was higher in S of ChD than CD ($p = 0.002$). The arachidonic acid (AA) percentage was higher in P of CD as compared with ChD ($p = 0.037$) and OD ($p = 0.045$), whereas EPA showed a higher value in P and SG of ChD than CD ($p < 0.05$) and OD ($p < 0.05$). At 30-days, AAL was detected in S, P and SG only in ChD. The OA level was greater in P of OD than CD and ChD groups ($p = 0.041$). Regarding the SFR, the following values were obtained at 1-day intake: 6.18 ± 0.34 (CD), 6.04 ± 0.31 (OD) and 6.00 ± 0.50 (ChD), with no significant differences between them. At 15-day intake, those values were 8.26 ± 0.43 (CD), 8.00 ± 0.61

(OD) and 6.18 ± 0.53 (ChD) whereas 4.68 ± 0.44 (CD), 6.08 ± 0.2 (OD), and 7.82 ± 0.7 (ChD) corresponded to the 30-day intake groups. Differences between the dietary groups at both 15 and 30 day intake were statistically significant ($p < 0.001$).

CONCLUSION: the salivary levels of OA, DGLA, EPA and DHA reflect the immediate dietary intake, whereas the salivary ALA could constitute an adequate biomarker of habitual intake. Dietary FA, and their intake at different times, modulate the submandibular SFR, being highest in ChD group at 30-day consumption.

KEY WORDS: fatty acids - diet - immediate intake - habitual intake - saliva - salivary flow rate.

1

INTRODUCCIÓN

1.1. Hipótesis

1.2. Objetivo general

1.3. Objetivos específicos

1. INTRODUCCIÓN

La saliva es una secreción que desempeña un papel importante en el procesamiento de los alimentos, en la protección de la cavidad bucal y en el mantenimiento de la salud sistémica (Humphrey y Williamson, 2001; Puy, 2006; Brosky, 2007). En los últimos años se ha incrementado la investigación en saliva debido a que ésta refleja las condiciones fisiológicas y/o patológicas de las personas, incluyendo las variaciones emocionales, endocrinas, metabólicas y nutricionales (Wong, 2012). Por ello, la saliva constituye un valioso fluido biológico para el análisis de biomarcadores, para el diagnóstico y el pronóstico de ciertas enfermedades bucales y sistémicas, así como también de factores de riesgo asociados a ellas (Lawrence, 2002; Kaufman, 2002; Pink y col., 2009; Zhang, 2014). Este fluido ofrece numerosas ventajas con relación al plasma, ya que puede ser obtenido a través de técnicas sencillas, económicas, no invasivas y posibles de aplicar en métodos de monitoreo a grandes poblaciones (Hoffman, 2001).

La saliva contiene componentes orgánicos e inorgánicos. Dentro de los primeros se encuentran los lípidos, cuya presencia es conocida a partir de los trabajos de Doubleday en el año 1909 (Doubleday, 1909) y también ha sido demostrada en años posteriores por otros investigadores (Weber, 1930; Mandel y Einstein, 1969; Slomiany y col., 1986). La mayoría de los autores sólo clasifican y, en menor medida, cuantifican los lípidos salivales en seres humanos (Mandel y Einstein, 1969; Larsson y col., 1996), con discrepancias en cuanto a los resultados. Ello podría deberse, entre otros factores, a la utilización de diferentes métodos de recolección de la saliva y al empleo de distintas técnicas analíticas, la mayoría de ellas hoy superadas por otras con una mayor especificidad y sensibilidad en la medición de estos analitos. Actualmente, la cromatografía gaseosa permite detectar compuestos de menor peso molecular con una mayor precisión. La fracción lipídica en la saliva total humana varía de acuerdo a la glándula (Slomiany, 1983) y está constituida por lípidos simples y complejos que alcanzan los 2-3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kalburgi y col., 2014).

La función de las glándulas salivales puede ser afectada por diversos factores fisiológicos y patológicos. Entre los primeros se encuentran la edad, el ritmo circadiano y la ingesta dietaria, los que tienen un impacto en el volumen de saliva secretada y en las concentraciones de electrolitos salivales (Turner y Sugiya, 2002; Iwasaki y col., 2015; Belstrøm y col., 2016). Con relación a las condiciones patológicas, diversos autores han

observado cambios en el volumen y la composición salival de pacientes que consumen determinados medicamentos (antidepresivos, ansiolíticos, etc.), que padecen enfermedades sistémicas autoinmunes (síndrome de Sjögren) o que se encuentran bajo radioterapia en la región de la cabeza y el cuello (Aps y col., 2005; Belstrøm y col., 2016).

Estudios llevados a cabo en animales y seres humanos indican que la alimentación puede modificar la composición química de la saliva. Alam y Shi (1997) reportaron que la deficiencia de ácidos grasos esenciales (AGE), inducida en ratas mediante la dieta, produce cambios en la composición de ácidos grasos (AG) de las tres glándulas salivales principales, en concordancia con lo encontrado en saliva mixta y en plasma (Alam y Shi, 1997). Actis y col. (2005) observaron diferencias en el perfil de AG salivales entre personas con alimentación mixta y vegetariana. En ese estudio se hallaron mayores niveles de ácido araquidónico (20:4 n-6) en la saliva de personas con una dieta mixta, posiblemente debido al mayor consumo de carnes, mientras que en la saliva de vegetarianos se presentaron valores más elevados de ácido α -linolénico (18:3 n-3). Este último cambio podría estar relacionado con un consumo importante de alimentos ricos en AG esenciales tales como legumbres, frutas secas, aceites de maíz y girasol (Actis y col., 2005).

Algunos compuestos orgánicos encontrados en fluidos corporales pueden ser utilizados como marcadores biológicos de la ingesta nutricional. En este sentido, el análisis de un biomarcador presenta ventajas con respecto a los métodos tradicionales de recolección de datos sobre la ingesta dietética (encuestas, por ejemplo). La mayoría de estos últimos requiere de la memoria del encuestado lo que, ante la falta de precisión en el tamaño de las porciones, puede generar una falsa estimación del consumo habitual. Además, la variabilidad en las tablas de composición de alimentos suele traducirse en un cálculo impreciso de la ingesta de un determinado nutriente (Feunekes y col., 1993; Cantwell, 2000).

Por otra parte, el perfil de AG salivales ha sido investigado en relación con la composición del *biofilm* bucal, la artritis reumatoidea y el estrés oxidativo, entre otros. Sin embargo, no se encontraron referencias bibliográficas acerca del tiempo transcurrido entre la ingesta de lípidos y los cambios en el perfil de AG salivales, es decir, si este último refleja el consumo inmediato o habitual de lípidos dietarios. En suero, por ejemplo, los valores de triglicéridos reflejan el consumo de grasas en la última ingesta; los niveles de

ésteres de colesterol y fosfolípidos, el de los últimos días, en tanto que la composición lipídica de las membranas de los eritrocitos y del tejido adiposo se corresponde con largos periodos de ingesta (varias semanas a años) (Sun y col., 2007).

1.1. Hipótesis

El perfil de AG en saliva submandibular de ratas refleja la ingesta habitual de lípidos dietarios, por lo que constituye un adecuado biomarcador de la misma, y el flujo de esa saliva se modifica también con el consumo lipídico habitual.

1.2. Objetivo general

Analizar el perfil de AG y el flujo de saliva submandibular de ratas con relación al tiempo de ingesta de lípidos dietarios.

1.3. Objetivos específicos

1.3.1. Clasificar y cuantificar los AG de la saliva submandibular, así como también del plasma sanguíneo, de la glándula submandibular y del tejido adiposo periglandular con relación a las diferentes dietas.

1.3.2. Analizar el flujo salival de ratas según el tipo de dieta y tiempo de ingesta.

1.3.3. Correlacionar el perfil de AG salivales y plasmáticos según el tiempo de ingesta de los lípidos dietarios.

1.3.4 Correlacionar el perfil de AG de saliva submandibular/glándula submandibular y saliva submandibular/tejido adiposo periglandular.

1.3.5. Determinar la biodisponibilidad de isómeros del ácido linoleico conjugado (CLA) en saliva submandibular, plasma sanguíneo, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular según el tiempo de ingesta.

2

MARCO TEÓRICO

2.1. Glándulas salivales

2.1.1. Glándula submandibular

2.2. Saliva humana

2.2.1. Flujo salival

2.2.2. Relevancia clínica de la saliva

2.3. Lípidos

2.3.1. Digestión y absorción

2.3.2. Metabolismo

2.3.3. Lípidos en la saliva humana

2.4. Ácidos grasos

2.4.1. Clasificación

2.4.2. Ácidos grasos esenciales

2.4.3. Ácido linoleico conjugado (CLA)

2.4.4. Ingesta dietaria y perfil de AG en plasma y en saliva

2.5. Biomarcadores

2.5.1. Generalidades

2.5.2. Biomarcadores nutricionales

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Glándulas salivales

Las salivales son glándulas anexas a la cavidad bucal cuya función es la secreción de saliva que lubrica y protege sus estructuras blandas y duras. Estas glándulas poseen dos tipos de unidades -secretoras o adenómeros y excretoras o conductos- cuyo conjunto es conocido como parénquima glandular. El conjunto de adenómeros conforman un lobulillo y el conjunto de éstos constituye un lóbulo. Alrededor del parénquima se dispone el estroma, tejido conectivo denso con numerosos vasos y nervios, que le brinda soporte estructural y metabólico. Además, ese tejido fibrilar envuelve la glándula formando una verdadera cápsula que envía tabiques hacia su interior, separando a los lóbulos. (Aps y Martens, 2005; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009; Actis, 2014).

En función al tamaño glandular y a la cantidad de saliva secretada, las glándulas salivales se clasifican en menores y mayores. Las primeras comprenden un grupo de pequeñas glándulas (entre 600 y 1000) que se localizan en la submucosa de diversas áreas de la cavidad bucal y se abren a la superficie mucosa a través de pequeños conductos. Representan pequeñas unidades, generalmente de 1-3 mm, formadas por escasos adenómeros y un sistema ductal poco desarrollado. Las glándulas diseminadas en labios, mejillas y paladar presentan una secreción preferentemente mucosa o mixta, mientras que las que se encuentran en el sector posterior de la lengua poseen una secreción serosa pura, lo que favorece la percepción de los estímulos gustativos (Latarjet y Ruiz Liard, 2005; Actis, 2014).

Las glándulas salivales mayores comprenden la parótida, la submandibular y la sublingual. Ellas producen un gran volumen de secreción tras la estimulación mecánica o química de las terminaciones nerviosas de la mucosa bucal, así como también en respuesta a determinados estímulos olfatorios. Las porciones secretoras de las glándulas salivales mayores están representadas por adenómeros acinosos que vierten su producto de secreción, serosa, mucosa o mixta, a través de un sistema de conductos con varios grados de ramificaciones. Entre las células secretoras y la lámina basal de todos los acinos salivales existen células mioepiteliales de naturaleza contráctil con numerosas prolongaciones citoplasmáticas que rodean a las células secretoras formando una especie de canasta (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009; Aps y Martens, 2005).

Los acinos de las glándulas salivales mayores se continúan con un sistema ductal formado por conductos intercalares, estriados y excretorios. Según su localización con respecto al lobulillo glandular, estos conductos se denominan intralobulillares (intercalares y estriados), interlobulillares, interlobulares y conducto excretor principal. Los conductos intercalares están formados por una capa de células cúbicas bajas que carecen de especialización ultraestructural significativa, poseen escaso desarrollo de sus organelas y están rodeadas por una membrana plasmática que muestra poca amplificación de su superficie. Los conductos estriados, de mayor diámetro, están recubiertos por una capa de células altas con especialización citológica generalmente asociada al transporte activo de electrolitos (figura 1). Los conductos interlobulillares están constituidos por un epitelio cúbico biestratificado y se sitúan en los tabiques conectivos que separan los lobulillos glandulares (Humphrey, 2001; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

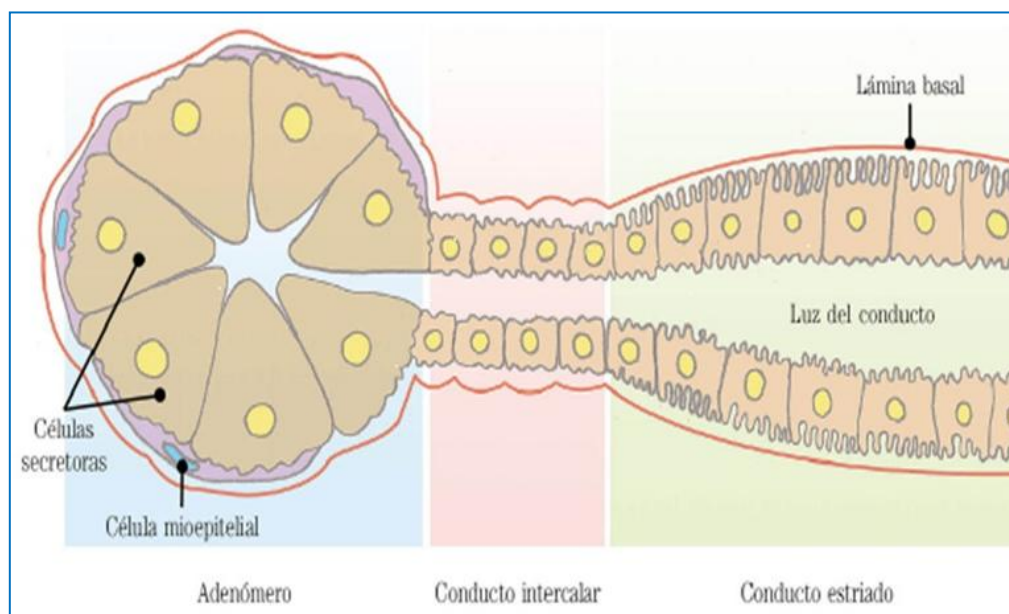


Figura 1. Organización del parénquima intralobulillar de las glándulas salivales (imagen tomada de Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

Los conductos interlobulares poseen un epitelio cilíndrico estratificado, con células caliciformes intercaladas en el estrato más superficial, y están rodeados por delgadas capas concéntricas de fibras musculares lisas y tejido conectivo. Estos conductos se unen para formar el conducto principal o excretor de la glándula, el que se abre en la superficie de la mucosa bucal (Gartner y Hiatt, 2011).

Mientras la saliva primaria producida en los acinos, isotónica con respecto al plasma, se desplaza por los diferentes conductos glandulares, las concentraciones de sus electrolitos más abundantes (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-) van cambiando debido a los diferentes mecanismos de intercambio iónico (transporte activo, difusión simple, cotransporte, etc.) que existen en ellos y que conducen a que el fluido salival secundario que llega a la boca sea hipotónico con respecto al plasma (Aps y Martens, 2005).

2.1.1. Glándula submandibular

Es la segunda glándula de mayor tamaño en el sistema estomatognático. Se encuentra contenida en la celda submandibular que es un compartimiento osteofibroso conformado por una prolongación de la aponeurosis cervical superficial, los vientres anterior y posterior del músculo digástrico y el borde inferior del cuerpo mandibular. La glándula submandibular en humanos pesa 10-15 g y posee una cápsula fibrosa bien desarrollada (Actis, 2014; Latarjet y Ruiz Liard, 2005; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009).

Está constituida por estructuras tubuloacinares con acinos serosos y mixtos en una relación 10/1, respectivamente. En el estroma de estas glándulas se observan abundantes adipocitos, aunque en menor cantidad que en la parótida. El sistema ductal se caracteriza por la presencia de conductos intercalares muy cortos que dificultan su identificación al microscopio óptico, mientras que los conductos estriados son de mayor longitud y, por ende, más fáciles de identificar (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2009; Actis, 2014) (figura 2).

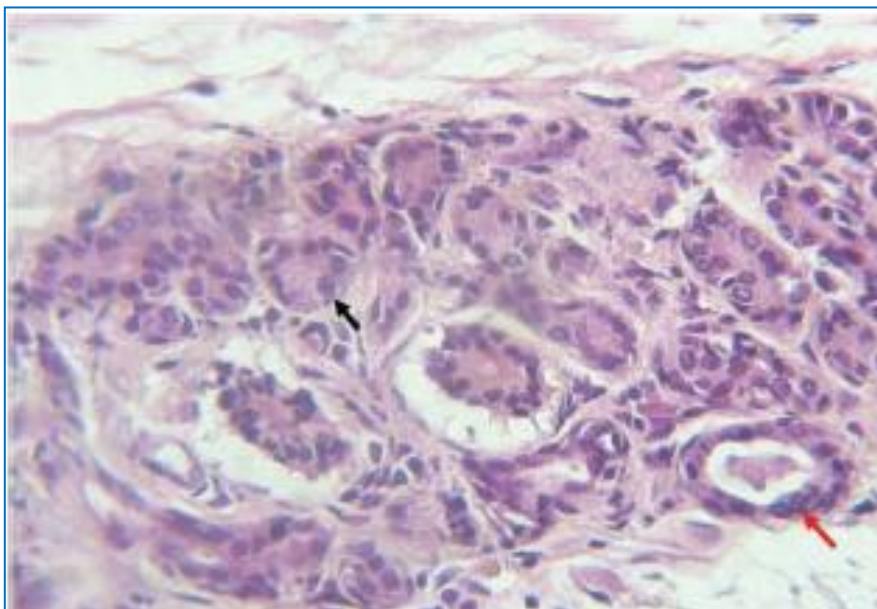


Figura 2. *Microfotografía del parénquima de una glándula submandibular.*

Se observan acinos serosos (flecha negra) y un conducto estriado (flecha roja). Técnica de H/E, aumento original 40x (Imagen tomada de Suazo Galdames y Roa Henríquez, 2008).

El conducto secretor de esta glándula se denomina submandibular (o de Wharton), el que posee un diámetro de 2-3 mm y mide, aproximadamente, 5 cm de longitud. Desde su origen en la parte media glandular, se dirige hacia adelante, por debajo de la mucosa del piso de la boca y se abre en las carúnculas salivales ubicadas a cada lado del frenillo lingual. Esta glándula está irrigada por la arteria facial y su colateral -la arteria submentoniana- mientras que el desagüe venoso se produce a través de la vena facial. Por otro lado, el drenaje linfático se dirige hacia los ganglios submandibulares y la cadena yugular interna.

La secreción de saliva se encuentra bajo el control del sistema nervioso autónomo y está regulado por el hipotálamo (Pink y col., 2009). Tanto la división parasimpática como la simpática estimulan la secreción salival, aunque con efectos diferentes sobre su composición. La primera genera una secreción de tipo seroso, que es abundante, fluida y rica en iones, mientras que la segunda da lugar a una secreción de naturaleza mucosa que es viscosa, filante y rica en proteínas (Espín y col., 2003; Manns Freese, 2013; Actis, 2014).

La inervación parasimpática proviene de centros ubicados en el bulbo raquídeo y en la protuberancia anular. La fibra nerviosa del facial que hace sinapsis en el ganglio submandibular emerge del núcleo salival superior y la fibra de la neurona postganglionar

alcanza la glándula submandibular mediante la liberación de acetilcolina que se une a los receptores colinérgicos de tipo muscarínico y activa el trifosfato de inositol aumentando el nivel de Ca^{++} intracelular. Éste favorece la secreción de proteínas y activa la bradicinina, produciendo una vasodilatación y una secreción salival acuosa y abundante (Manns Freese, 2013; Actis, 2014).

Por otra parte, la fibra preganglionar simpática emerge del I y II segmento torácico y hace sinapsis en el ganglio cervical superior, desde donde la fibra postganglionar se dirige a inervar la glándula submandibular e induce la secreción salival al liberar adrenalina y noradrenalina, las que estimulan los receptores adrenérgicos tipo alfa y beta de los acinos glandulares. La activación de los receptores alfa posee un efecto vasoconstrictor que disminuye el contenido de agua, mientras que la de los beta aumenta los niveles de adenosinmonofosfato (AMP) cíclico que favorece la secreción proteica. El resultado es una saliva viscosa y escasa (Prestifilippo y col., 2013; Actis, 2014).

La glándula submandibular produce una secreción mixta, viscosa y rica en mucinas (MUC5B y MUC7) que corresponde al 70% del volumen total diario de secreción salival (Pink y col., 2009).

2.2. Saliva humana

La saliva es un fluido biológico estéril, incoloro, de consistencia acuosa o viscosa que representa el producto de secreción de las glándulas salivales mayores y menores (Humphrey, 2001; Tavella, 2003). Al llegar a la cavidad bucal, la saliva parcial proveniente de las diferentes glándulas se mezcla para conformar la saliva total (Jaeger, 2009; Aps y Martens, 2005).

La saliva desempeña diversas funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis bucal y sistémica, tales como las que se mencionan a continuación (Schenkels y col., 1995; Hofman, 2001; Dodds, 2005; Llana-Puy, 2006; Pink y col., 2009; Actis, 2014):

1. Lubrica los tejidos blandos y duros de la cavidad bucal.
2. Contribuye a la formación del bolo alimenticio e inicia el proceso de digestión.
3. Facilita la masticación y la deglución de los alimentos.
4. Diluye las sustancias sápidas que estimulan las papilas gustativas (sabor).

5. Protege las estructuras bucales a través de su capacidad tampón.
6. Facilita la fonoarticulación ya que, al lubricar, permite los movimientos de labios y lengua sobre la superficie de los dientes.
7. Contribuye a la higiene dentaria y bucal en general.
8. Interviene en la reparación de los tejidos blandos.
9. Favorece el proceso de remineralización dentaria.
10. Neutraliza la acción de microorganismos.
11. Participa en el mantenimiento y reparación del epitelio del sistema digestivo.

La saliva es una solución acuosa (99% de agua) en la que se encuentran diluidas sustancias orgánicas (0,5%) e inorgánicas (0,5%). Sus componentes orgánicos son hidratos de carbono (principalmente glucosa), proteínas, glucoproteínas, histatinas, lipasa, alfa-amilasa, lactoperoxidasa, inmunoglobulina A secretoria, lisozima, mucinas, lactoferrina, fibronectina, proteínas ricas en prolina y lípidos (ácidos grasos libres, colesterol, fosfolípidos, estearinas), entre otros (tabla 1) (Slomiany y col., 1983).

Los compuestos inorgánicos incluyen calcio, fosfatos, fluoruros, yoduro, cloruro, bicarbonato, sodio, zinc, magnesio, entre otros (Ronchi y col., 2008). La saliva final es un fluido hipotónico comparado con el plasma ya que las concentraciones iónicas no son constantes. Ello se debe a que, al atravesar el sistema ductal, la saliva primaria sobrelleva un reajuste electrolítico con reabsorción de sodio y cloro y secreción de potasio, bicarbonato, algunas proteínas e IgA, aunque el volumen de agua no es afectado por la impermeabilidad de las células tubulares (Humphrey and Williamsom, 2001; Actis, 2014).

Tabla 1. *Funciones de la saliva según sus componentes*

Objetivo	Función	Componentes salivales
Dientes	Remineralización	Proteínas ricas en prolina, estaterina, calcio, fosfato
	Inhibición de desmineralización	Mucinas
	Lubricación y humidificación	Proteínas ricas en prolina, mucinas
	Capacidad tampón	Bicarbonato, fosfato, proteínas
Alimentos	Digestión	Lipasa, amilasa, proteasa
	Gusto	Zinc
	Bolo alimenticio	Mucinas
Microorganismos	Acción antiviral	Mucinas, inmunoglobulinas, cistatinas
	Acción antifúngica	Inmunoglobulinas, mucinas, histatinas
	Acción antibacteriana	Mucinas, histatinas, cistatinas, lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa

En condiciones de salud, el volumen salival varía entre 500 y 1500 mL por día y es influenciado por el ritmo circadiano, la herencia, la higiene bucal y el estado psicológico de la persona (disminuye en situación de estrés) (Aps y Martens, 2005). El pH salival normalmente oscila entre 6,2 y 7,5 y suele elevarse con un aumento de la secreción salival (Ronchi, 2008).

2.2.1. Flujo salival

Corresponde al cociente entre el volumen de saliva secretada por las glándulas salivales y el tiempo requerido para su recolección (Lasisi y col., 2014), expresándose en mililitros/minuto (mL/min). En seres humanos, el flujo salival *basal* o *en reposo* se produce en ausencia de movimientos masticatorios u otros estímulos exógenos y oscila entre 0,25 y 0,35 mL/min. Por otra parte, la secreción salival *estimulada* se debe a la acción constante ejercida sobre los receptores y la activación de reflejos condicionados o incondicionados involucrados y oscila entre 0,5 y 2 mL/min (Humphery y Williamson, 2001; Chiappin y

col., 2007; Actis, 2014). La velocidad de secreción depende de la hora del día (ritmo circadiano), así como también de la presencia y tipo de estimulación.

Muchos compuestos orgánicos se almacenan en gránulos de secreción (lípidos asociados a proteínas, por ejemplo) de los acinos glandulares salivales y son secretados mediante mecanismos de transferencia celular que incluyen vías intracelulares y extracelulares. La vía intracelular más común es la difusión pasiva, aunque también se ha informado el transporte activo. Por otra parte, la vía extracelular más común es la ultrafiltración, la que se produce a través de las uniones estrechas existentes entre las células (Singh y col., 2016).

Los epitelios glandulares poseen características que le permiten funcionar como una verdadera barrera de permeabilidad selectiva. El transporte adecuado de agua a través de dicha barrera epitelial es de vital importancia para el mantenimiento de la homeostasis fisiológica normal de humanos y animales. Por ello, el líquido se desplaza atravesando la membrana plasmática de las células epiteliales, denominada vía *transcelular*, o lo hace utilizando los espacios intersticiales de esas células, vía *paracelular*. Ambos mecanismos son capaces de transportar grandes volúmenes de fluidos, estimado en 200 litros por día en un ser humano de 70 kg (Kawedia y col., 2007).

En este sentido, existe una complejidad importante en los mecanismos que regulan las rutas transcelular y paracelular del transporte de agua. A fin de determinar la relación entre ambos mecanismos, Murakami y col. (2001) emplearon glándulas salivales submandibulares de rata perfundidas y demostraron que la mayor parte del agua de dicha glándula se transporta a través de la vía paracelular y que sólo una fracción relativamente pequeña lo hace mediante la transcelular. Por otra parte, Kawedia y col. (2007) reportaron que la ausencia de aquaporina-5 en las glándulas salivales de ratones deriva en una disminución del transporte de agua a través de la membrana plasmática y de las uniones intercelulares. Los autores concluyeron que tanto la vía transcelular como la paracelular actúan de manera conjunta y no por compensación y que, a la vez, están influenciadas por el sexo.

Durante la masticación, estímulos gustativos (químicos), sensitivos (olfativos y visuales), o mecánicos (acto masticatorio) actúan sobre receptores salivales -saliva estimulada- produciendo un volumen que puede llegar hasta 2 mL/min. La principal responsable es la glándula parótida y la saliva es rica en enzimas digestivas. Actúa por dos

horas, aproximadamente, y facilita la percepción gustativa, el inicio del proceso digestivo con la formación del bolo alimenticio y la deglución (Suneetha y Rambabu, 2014). Entre las comidas se secreta una saliva no estimulada -fundamentalmente por la glándula submandibular- la que cumple funciones importantes tales como limpieza constante, lubricación, protección y aporte de sustancias que contribuyen a reparar y mantener la integridad de los tejidos blandos y duros de la cavidad bucal. La saliva no estimulada expresa el flujo salival basal y está presente en la boca aproximadamente durante 14 horas (Sreebny, 2000; Mese y Matsuo, 2007).

Entre los receptores de membrana que influyen sobre el flujo salival se encuentran los *canabinoides* (CB₁ y CB₂), que fueron identificados en las glándulas salivales, específicamente en la submandibular y sublingual, así como también en otros tejidos tales como cardíaco, nervioso, hepático, adiposo y vascular (Fernandez-Solari y col., 2010). En este sentido, Prestifilippo y col. (2006) detectaron dichos receptores en acinos, conductos y terminaciones nerviosas de la glándula submandibular de ratas. Hipkæo y col. (2015) estudiaron, a nivel experimental, la localización de los receptores canabinoides durante el desarrollo posnatal de ratas. Ellos observaron que la inmunoreactividad a los receptores CB₁ fue positiva en la mayoría de las células acinares de recién nacidos y hasta el primer mes de vida. A partir del tercer mes, esa inmunoreactividad fue positiva en el plasmalema apical de las células ductales intercalares.

La secreción salival puede ser modificada, de manera reversible o irreversible, por factores fisiológicos y patológicos. Entre los primeros, la edad y la ingesta dietaria tienen un impacto en el volumen de saliva secretada y en las concentraciones de electrolitos salivales (Turner y Sugiya, 2002; Belstrøm y col., 2016). En este sentido, Tomita y col. (2007) comprobaron, en un estudio experimental, que el envejecimiento produce cambios en la composición de AG de las glándulas salivales, lo que afecta sus funciones secretorias. Por otra parte, Iwasaki y col. (2015) observaron una tasa de flujo salival significativamente menor en personas de 80 años de edad, con una escasa ingesta dietaria de AG poliinsaturados n-3, potasio, vitamina D, vitamina E, vitamina B6 y folatos comparado con personas de la misma franja etaria que consumieron verduras, pescados y mariscos. Además, Prestifilippo y col. (2006) reportaron que la anandamida -un producto bioactivo obtenido del metabolismo del ácido araquidónico (AA) que, a su vez, deriva del ácido linoleico (AL) incorporado por la dieta- disminuye la secreción salival de la glándula

submandibular estimulada por norepinefrina y metacolina, a través de la activación de los receptores cannabinoides, CB₁ y CB₂, que están acoplados a las proteínas Gi/o de la membrana glandular.

En cuanto a las condiciones patológicas, diversos autores han reportado cambios en el flujo y la composición salival en pacientes con administración de ciertos medicamentos (antidepresivos, ansiolíticos, etc.) y en aquellos que están bajo terapias citostáticas de cáncer y/o que sufren enfermedades autoinmunes o sistémicas, tales como el síndrome de Sjögren y artritis reumatoidea (Aps y col., 2005; Belstrøm y col., 2016; Gil-Montoya, 2016).

Algunas manifestaciones bucales asociadas a la disminución del flujo salival son: higiene bucal deficiente, aumento de acumulación de *biofilm*, proliferación de microorganismos, aumento de incidencia de caries y enfermedad periodontal, halitosis, problemas en la fonoarticulación, dificultades en la masticación, deglución y percepción del gusto, así como también infecciones digestivas (Sreebny, 2000; Gil-Montoya, 2016; Chee y col. 2016).

2.2.2. Relevancia clínica de la saliva

En los últimos veinte años se ha demostrado el papel relevante de la saliva en áreas clínicas y de investigación, tales como la virología, inmunología, microbiología, endocrinología, epidemiología, medicina forense y odontología (Lawrence, 2002). Al igual que en otros fluidos biológicos, el análisis de la saliva puede ser importante para la vigilancia de la salud y para el diagnóstico temprano de enfermedad debido a que, como ya se ha mencionado, varias condiciones fisiológicas y/o patológicas pueden modificar cuantitativamente y/o cualitativamente su producción y secreción (Chiappin y col., 2007; Pink y col., 2009; Wong, 2012).

La saliva ha sido utilizada con éxito en el diagnóstico de infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis B y C (Marley, 2014), diagnóstico de enfermedades periodontal y cardiovascular (Pink y col., 2009), monitoreo de enfermedad renal (Cardoso, 2009) y otras patologías sistémicas como el síndrome de Sjögren (Tomita y col., 2008; Kibayashi, 2012), monitoreo de hormonas y abuso de drogas (Kaufman, 2002), monitoreo emocional y neurológico e influencias metabólicas-nutricionales (Hofman, 2001; Humphrey y Williamson, 2001). A la vez, existen laboratorios clínicos que están

empleando de rutina el ADN salival para evaluar la susceptibilidad genética del paciente a diversas enfermedades (Soares Nunes, 2014).

La progresiva utilización de la saliva en la práctica clínica se debe al perfeccionamiento de las técnicas y aparatologías analíticas, tales como los *tests* de ELISA, Western Blot y la reacción en cadena de la polimerasa -conocida como PCR por sus siglas en inglés (*polymerase chain reaction*) (Chiappin, 2007; Pink y col., 2009)- y también a las ventajas de su recolección (no invasiva), almacenamiento y transporte, los que son sencillos y económicos en relación con otros fluidos corporales tales como sangre y orina.

Entre las ventajas de la saliva como herramienta diagnóstica se mencionan las siguientes:

- La recolección no requiere equipamiento sofisticado ni el uso de técnicas invasivas.
- La obtención puede ser realizada por la misma persona después de un simple entrenamiento.
- El método de obtención es más cómodo, en comparación con la extracción de sangre, y de preferencia para niños, ancianos y personas con capacidades diferentes.
- La preservación es igual que la de suero o plasma.
- El uso implica una disminución en el riesgo de infección del personal de laboratorio en comparación con la manipulación de las muestras de sangre.
- Los ensayos de rutina son técnicamente sencillos, como en el caso de la determinación de hormonas esteroideas y monitoreo de drogas.
- La obtención de muestras, al ser realizada por métodos no invasivos, reduce la ansiedad y el malestar de las personas cuando se repiten las tomas para monitoreo de salud.

Por lo tanto, la saliva ofrece una alternativa adecuada al suero y a la orina como un medio práctico y confiable de vigilancia de la salud, de lo que se desprende la importancia de maximizar el potencial de este fluido biológico en investigación para su posterior aplicación clínica (Hofman, 2001; Lawrence, 2002; Zhang y col., 2009; Lima, 2010; Singh y col., 2016).

2.3. Lípidos

Los lípidos son un grupo de biomoléculas no polares y químicamente diferentes que se caracterizan por ser insolubles en agua (Singh y col., 2016). No forman estructuras moleculares poliméricas como los polipéptidos y/o polisacáridos. En la molécula de casi todos los lípidos se encuentran ácidos orgánicos monocarboxílicos denominados, genéricamente, *ácidos grasos*. Estos últimos están compuestos por carbono, hidrógeno y oxígeno, en tanto que algunos también pueden tener nitrógeno o fósforo (Blanco y Blanco, 2015).

Los lípidos pueden ser simples o complejos. Los simples son los acilgliceroles y las ceras, en tanto que los complejos comprenden fosfolípidos, glicolípidos y lipoproteínas. Además, existen sustancias asociadas a los lípidos como son los esteroides, terpenos y vitaminas liposolubles, entre otros.

Desde el punto de vista biológico, los lípidos son de especial interés porque cumplen importantes funciones (Blanco y Blanco, 2015), las que se detallan a continuación:

- Constituyen una parte fundamental de las membranas celulares y de las vainas de mielina.
- Representan importantes fuentes de energía por su alto contenido calórico (proporcionan 9 Kcal/g).
- Aportan AG esenciales.
- Intervienen en la absorción y el transporte de vitaminas liposolubles.
- Participan en la regulación del metabolismo celular.
- Forman parte de numerosas moléculas: hormonas, algunas vitaminas, ácidos biliares.
- Producen aislamiento térmico.

2.3.1. Digestión y absorción

La ingesta diaria de lípidos de una persona adulta oscila entre 60 y 150 g. Los triacilgliceroles o grasas neutras constituyen más del 90%, mientras que el 10% restante se encuentra en forma de fosfolípidos, esteroides (colesterol) y otros lípidos menores (Devlin, 2004).

Para que los triacilglicerolos de la dieta sean absorbidos por las células intestinales debe acontecer, previamente, un proceso de solubilización en el que la combinación de la acción peristáltica del intestino delgado y la acción tensoactiva y emulsionante de la bilis reduzca los grandes glóbulos de grasa a pequeñas micelas solubles en agua. Posteriormente, esa emulsión es sometida a un proceso de digestión enzimática mediante la lipasa pancreática, la que cataliza la hidrólisis de triacilglicerolos y da como resultado AG libres y monoacilglicerolos. Estos pueden difundirse o transportarse eficientemente hacia los enterocitos de la pared intestinal donde son utilizados para sintetizar triacilglicerolos, cuyo catabolismo en los tejidos genera abundante energía. Ambos procesos son estimulados por la hormona colecistocinina que provoca la contracción de la vesícula biliar y la relajación del esfínter hepatopancreático (de Oddi) para que los lípidos lleguen al intestino delgado. En condiciones adecuadas, se absorbe alrededor del 95% de las grasas consumidas (Wardlaw, 2004; Blanco y Blanco, 2015).

2.3.2. *Metabolismo*

Los lípidos son vehiculizados en el plasma sanguíneo en complejos formados también por proteínas. Las grasas neoformadas en la mucosa intestinal son incorporadas, junto con una pequeña proporción de colesterol, a partículas lipoproteicas denominadas *quilomicrones*, las que se encargan del transporte plasmático procedente de los alimentos (lípidos exógenos). Por otra parte, los AG de cadena corta y de cadena media (menos de 14 átomos de carbono) entran directamente en el sistema porta y son transportados hasta el hígado donde también se produce una síntesis de triacilglicerolos. Estos son enviados a la circulación sanguínea en partículas de muy baja densidad conocidas como lipoproteínas de baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés *Very Low Density Lipoprotein*), responsables del transporte de lípidos endógenos. En los capilares sanguíneos, las grasas de los quilomicrones y de las VLDL son degradados (hidrólisis total) por la lipoproteína lipasa que origina AG y glicerol, los que ingresan en las células de los diferentes tejidos (Wardlaw, 2004).

2.3.3. *Lípidos en la saliva humana*

La presencia de lípidos en la saliva humana ha sido conocida a partir del trabajo de Doubleday (Doubleday, 1909) y también demostrada en años posteriores por otros investigadores (Weber, 1930; Mandel y Einstein, 1969; Slomiany y col., 1986). La mayoría de los autores sólo clasificaron y, en menor medida, cuantificaron los lípidos salivales en seres humanos (Larsson y col., 1996), con discrepancias en los resultados. Ello podría deberse, entre otros factores, a la utilización de diferentes métodos de recolección de la saliva, a la baja concentración de lípidos en este fluido y al empleo de distintas técnicas analíticas, la mayoría de ellas con una limitada sensibilidad y especificidad para el análisis de los componentes salivales. Actualmente, la cromatografía gaseosa permite detectar compuestos de menor peso molecular con una mayor precisión y especificidad.

La fracción de lípidos en la saliva humana varía según provenga de las glándulas salivales mayores o menores (Slomiany, 1983; Tomita y col., 2007) y está representada por lípidos simples y complejos, totalizando 2-3 $\mu\text{g/mL}$ (Kalburgi y col., 2014). El total de lípidos en saliva submandibular varía entre 0,9 y 8 mg/100 mL y entre 0,24 y 7,6 mg/mL en la saliva parotídea (Mandel y Einstein, 1969; Rabinowitz y Shannon, 1975; Slomiany, 1986; Larsson y col., 1996). En cuanto al origen, los lípidos salivales son principalmente glandulares aunque también pueden difundirse directamente del plasma (Kalburgi y col., 2014). Como los lípidos están presentes en la saliva, se puede evaluar el perfil de AG (Singh y col., 2016).

2.4. *Ácidos grasos*

Los AG son moléculas orgánicas, constituidas exclusivamente por carbono, hidrógeno y oxígeno en proporciones variables, que forman parte de la estructura de los lípidos. Los AG aislados de lípidos animales son monocarboxílicos y de cadena lineal. Sus átomos de carbono, en número par entre 4 y 26 según el tipo de AG, están unidos entre sí formando una cadena con un grupo carboxilo en un extremo y un grupo metilo en el otro extremo de la molécula (Blanco y Blanco, 2015). En los organismos animales, los AG se sintetizan o degradan por adición o separación de unidades de dos carbonos.

Los AG cumplen una función estructural (cuando forman parte de lípidos complejos) y de producción y almacenamiento de energía, dos de las más importantes funciones en los tejidos de mamíferos (Kassem y col., 2011).

2.4.1. Clasificación

Según el número de átomos de carbono, los AG se clasifican de la siguiente manera:

- AG de cadena corta: 4 a 6 átomos de carbono.
- AG de cadena media: 8 a 14 átomos de carbono.
- AG de cadena larga: 16 a 20 átomos de carbono o más.

Según el tipo de enlace, los AG son de dos tipos (Blanco y Blanco, 2015):

- AG saturados: no poseen dobles enlaces entre los átomos de carbono. Son sólidos a temperatura ambiente.
- AG insaturados: presentan dobles enlaces entre los átomos de carbono de su cadena. Son líquidos a temperatura ambiente.
 - Monoinsaturados: contienen un doble enlace (monoetilénicos).
 - Poliinsaturados: poseen dos o más dobles enlaces.

La presencia de un doble enlace en los AG crea la posibilidad de isomería geométrica. Según la orientación espacial de los átomos de hidrógeno enlazados a los de carbono, existen isómeros *cis* y *trans* (figura 3) (Blanco y Blanco, 2015; Tavella, 2003):

- AG *cis*: los átomos de hidrógeno están del mismo lado del plano, delimitado por el doble enlace de carbono.
- AG *trans*: los átomos de hidrógeno están en lados opuestos al plano, delimitado por el doble enlace de carbono.

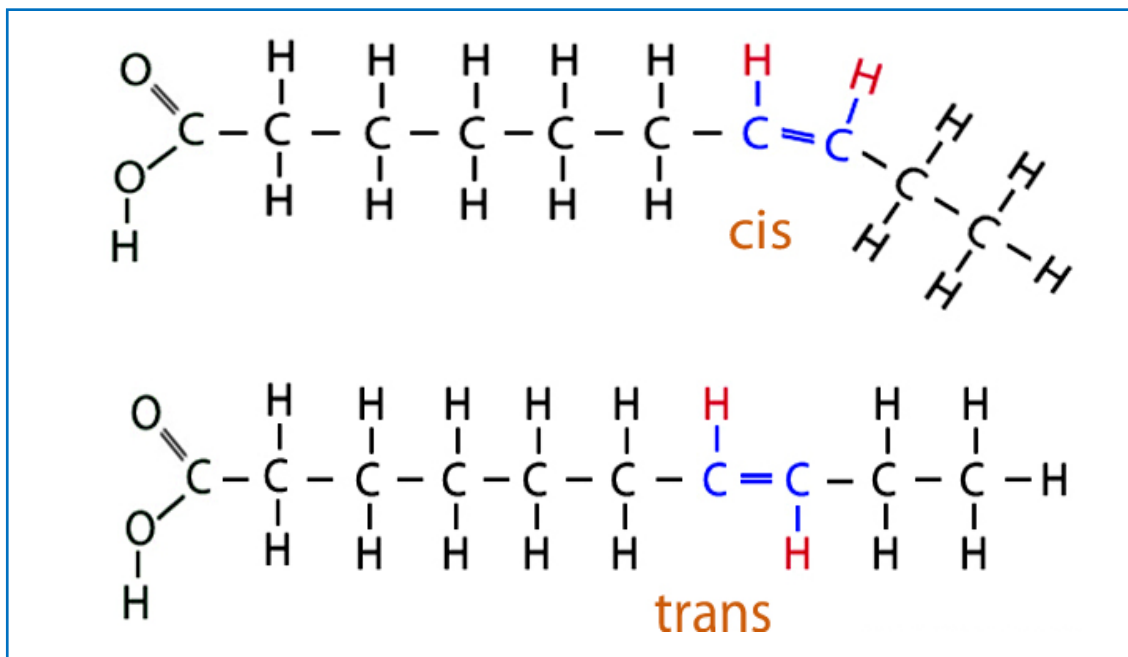


Figura 3. *Isomería de AG: configuración cis y trans.*

La tabla 2 presenta los AG que se encuentran en la naturaleza con sus respectivos nombres, común y sistemático, y sus correspondientes números de átomos de carbono.

Tabla 2. Ácidos grasos comunes en la naturaleza

Nombre común	Nombre sistemático	Nº de átomos de carbono
AG SATURADOS		
Butírico	Butanoico	4:0
Caproico	Hexanoico	6:0
Caprílico	Octanoico	8:0
Cáprico	Decanoico	10:0
Láurico	Dodecanoico	12:0
Mirístico	Tetradecanoico	14:0
Palmítico	Hexadecanoico	16:0
Esteárico	Octadecanoico	18:0
Araquídico	Eicosaenoico	20:0
Behénico	Docosaenoico	22:0
Lignocérico	Tetracosanoico	24:0
AG INSATURADOS		
<i>Monoinsaturados</i>		
Lauroleico	9-dodecaenoico	12:1
Miristoleico	9-tetradecaenoico	14:1
Palmitoleico	9-hexadecaenoico	16:1
Oleico	9-octadecaenoico	18:1
Elaídico	9-octadecaenoico	18:1
Vaccénico	11-octadecaenoico	18:1
Nervónico	15-tetracosanoico	24:1
<i>Poliinsaturados</i>		
Linoleico	9,12-octadecadienoico	18:2
Dihomo- γ -linoléico	8,11,14-eicosatrienoico	18:2
Linoléico	9,12,15-octadecatrienoico	18:3
Araquidónico	5,8,11,14-eicosatetraenoico (AA)	20:4
Timnodónico	5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (AEP)	20:5
Clupanodónico	7,10,13,16,19-docosapentaenoico (ADP)	22:5
Cervónico	4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (ADH)	22:6

Las principales fuentes alimentarias de los diferentes AG son de origen vegetal o animal y se detallan en la tabla 3 (Rodríguez-Cruz, 2005).

Tabla 3. *Principales fuentes alimentarias de AG*

Nombre común	Alimento fuente
AG SATURADOS	
Butírico	Manteca, lácteos
Caproico	Margarina, manteca
Caprílico	Aceite de coco
Cáprico	Aceite de coco
Láurico	Aceite de coco
Mirístico	Manteca, lácteos, carnes y derivados, aceite de coco
Palmítico	Lácteos, carnes y derivados, vísceras, huevos, frutas secas, aceites
Esteárico	Lácteos, vísceras, huevos, frutas secas, grasa de vaca y cerdo, aceites
Araquídico	Aceite de maní, vísceras, fiambres y embutidos
Behénico	Maní y su aceite, avellana, soja
AG INSATURADOS	
<i>Monoinsaturados</i>	
Lauroleico	Manteca
Miristoleico	Manteca
Palmitoleico	Lácteos, carne y derivados, aceites de pescado, huevos
Oleico	Aceites (en especial de oliva), aceitunas, frutas secas, palta, carnes y lácteos
Elaídico	Manteca
Vaccénico	Manteca
Nervónico	Carnes, yema de huevo, piel de pollo, aceitunas, aceites de uva, girasol, maíz
<i>Poliinsaturados</i>	
Linoleico	Aceites vegetales: cártamo, maíz, girasol y soja. Trigo, sésamo y nueces
Dihomo- γ -linolénico	Aceites vegetales: cártamo, maíz, girasol y soja
Linolénico	Canola, chía, nueces, soja, semillas de lino, maní y sus aceites
Araquidónico (AA)	Yema de huevo, carne de vaca, pescados
Timnodónico (AEP)	Sardina, salmón, caballa, arenque, aceites de pescado
Clupanodónico (ADP)	Algunos aceites de pescado, pollo
Cervónico (ADH)	Sardina, salmón, caballa, algunos aceites de pescado

2.4.2. AG esenciales

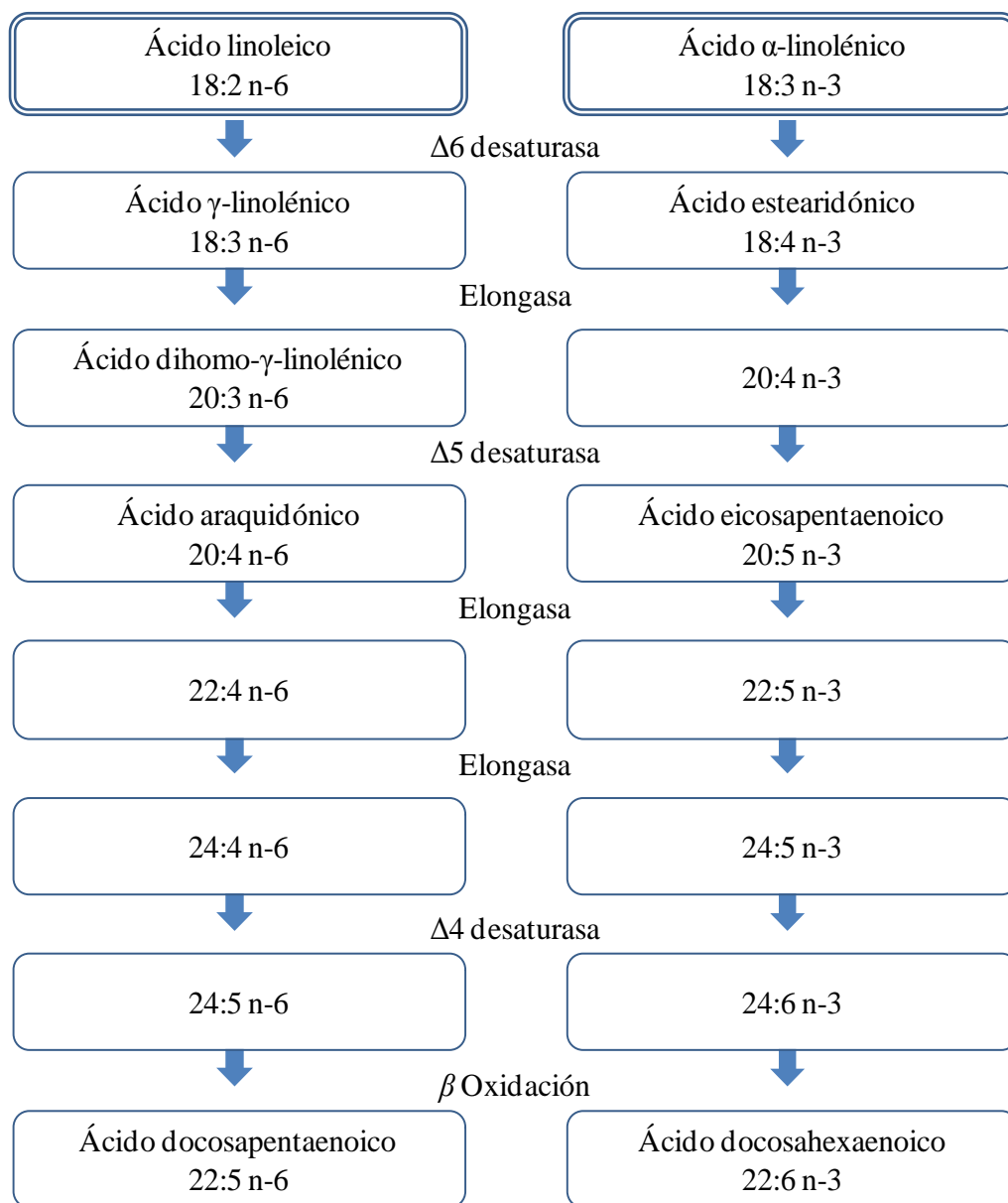
El ser humano es capaz de producir todos los AG que necesita a excepción de dos, los que deben ser aportados por la dieta: ácidos linoleico (AL) y alfa-linolénico (AAL). El AL es una molécula de 18 átomos de carbono con dos dobles ligaduras, la primera de las cuales se localiza en el 6^{to} átomo de carbono a partir del metilo terminal. Su nomenclatura es 18:2 y pertenece a la familia n-6. El AAL también es una molécula de 18 átomos de carbono, aunque presenta tres dobles ligaduras. La primera se encuentra en el 3^{er} átomo de carbono a partir del metilo terminal. Su nomenclatura es 18:3 y pertenece a la familia n-3 (Rodríguez-Cruz, 2005).

Estos son denominados AG esenciales (AGE) y ello se debe a la incapacidad del organismo humano para añadir dobles enlaces en las posiciones n-3 y n-6 de la cadena acílica porque carece de las enzimas $\Delta 12$ y $\Delta 15$ desaturasas. Ambos AG son de gran importancia biológica ya que desempeñan funciones significativas en los seres humanos (Astorg y col, 2008, Rincón-Cervera, 2016), tal como se detalla a continuación:

- Integran lípidos estructurales en las células.
- Son precursores de AG poliinsaturados de cadena larga (20 y 22 átomos de carbono).
- Son precursores de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos.
- Participan en el metabolismo de las grasas.
- Intervienen en la respuesta inmunológica y en la conservación de la función e integridad de las membranas celulares.
- Cumplen un rol fundamental en el crecimiento y el desarrollo normal.
- Participan en la constitución de ésteres de colesterol en el plasma sanguíneo.
- Desempeñan un papel importante en el progreso y/o prevención de enfermedades crónicas no transmisibles como hipertensión, artritis, cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunes.

La deficiencia de AGE en humanos y en animales produce consecuencias negativas tales como retraso del crecimiento, pérdida de la integridad cutánea, alteraciones en la reproducción, degeneración hepática y renal, esteatosis hepática, fragilidad capilar, etc. A la vez, puede agravar la malabsorción de grasas, empeorando aún más la carencia de AGE (Fariña y col., 2013)

Las dos familias de AGE, mencionadas anteriormente, atraviesan por una serie de reacciones enzimáticas de desaturación (los hidrógenos son removidos y se forma un nuevo doble enlace) y de elongación de la cadena hidrocarbonada, dando lugar a la formación de nuevos AG poliinsaturados dentro de cada familia (cuadro 1) (Harwood, 1996; Astorg y col, 2008).



Cuadro 1. Vías metabólicas de AGE en mamíferos

El metabolismo enzimático de AA, AEP y ADH produce una amplia variedad de productos oxidados, que en su conjunto son denominados eicosanoides, los que intervienen en la regulación de diversos procesos celulares. Dentro del grupo de los eicosanoides se encuentran los endocannabinoides, leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas (Rodríguez-Cruz, 2005). Algunos de ellos son beneficiosos para la salud, como la prostaglandina de la serie 3, el tromboxano y el leucotrieno de la serie 5, mientras que otros, como la prostaglandina de la serie 2, el tromboxano y el leucotrieno de la serie 4, resultan perjudiciales cuando se encuentran en exceso. Por otra parte, los AG monoinsaturados, particularmente el AO, produce una reducción de los niveles séricos de LDL-colesterol, además del efecto protector sobre el endotelio, con una reducción del riesgo trombogénico (Simopoulos, 2008; Blanco y Blanco, 2015).

2.4.3. *Ácido linoleico conjugado*

Es el término genérico utilizado para describir los isómeros posicionales y geométricos del AG 18:2 que contienen un doble enlace conjugado separado por un solo enlace (Kramer y col., 1998a). Existen varios isómeros del ácido linoleico conjugado o CLA (por sus siglas en inglés), pero la configuración *cis*-9, *trans*-11-CLA es la más abundante en la naturaleza y es denominada por consenso *ácido ruménico* (Salim de Castro y col., 2014). Este isómero de CLA es formado por la bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* en el rumen de animales como intermediario en la biohidrogenación del AL a ácido vaccénico (Chardigny, 2003; Zlatanov y col., 2008).

El CLA puede encontrarse en la carne y en los productos lácteos de animales rumiantes. Posee una importante actividad biológica (O'Shea, 2000) ya que se han observado potenciales efectos beneficiosos con suplementos de CLA en enfermedades crónicas como aterosclerosis, obesidad, pérdida de densidad ósea y diabetes (McGuire y McGuire, 1999; Fariña y col., 2003). Además, el consumo de CLA demostró inhibir el crecimiento de diversas líneas celulares de cáncer humano, así como también suprimir el desarrollo de tumores inducidos químicamente en modelos experimentales (Parodi, 1999; McGuire y McGuire, 1999; Kritchevsky, 2000; Bialek y col., 2010).

Existe un interés considerable en el desarrollo de estrategias nutricionales para incrementar los niveles de CLA en el organismo humano debido a los posibles beneficios de este compuesto en la salud humana (Shingfield y col., 2006). Es por ello que se han

realizado diversos estudios sobre la incorporación de isómeros de CLA en membranas celulares de animales y seres humanos mediante la administración de suplementos dietarios comercialmente disponibles. En este sentido, Malovrh y col. (2013) reportaron que el CLA se incorpora a los eritrocitos porcinos de una manera dosis-dependiente y tiempo-dependiente. Sin embargo, ellos también observaron que después de 4 semanas de suplementación dietaria, la incorporación de CLA alcanza una meseta. Salim de Castro y col. (2014) observaron una amplia y rápida incorporación del CLA en suero, hígado y tejido adiposo de ratas alimentadas con dietas ricas en grasas (aceites de soja, con CLA y combinados) durante 24 horas y después de 48 horas de ayuno.

Según Burdge y col. (2004), los isómeros de CLA se incorporaron fácilmente a lípidos plasmáticos y a células mononucleares de sangre periférica de personas sanas que habían consumido cantidades crecientes de suplementos de CLA equivalentes a uno, dos y cuatro cápsulas (600 mg cada una) por períodos secuenciales de 8 semanas. Por otra parte, Sato y col. (2011) informaron que la concentración de CLA en sangre aumentó luego de 3 semanas de consumo pero disminuyó a la semana posterior de finalizada su ingesta, disminución que fue mayor en el plasma que en las membranas de las células rojas de la sangre.

Sin embargo, son escasas las referencias bibliográficas relacionadas con la retención o la persistencia de isómeros de CLA en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular luego de un período de suplementación dietaria. El uso seguro y efectivo del CLA requiere de información sobre su absorción y su metabolismo. Estudios de esa naturaleza podrían establecer la utilización del CLA como un biomarcador de ingesta dietaria y también determinar su tiempo de permanencia en fluidos y tejidos biológicos. Esto último permitiría establecer la frecuencia de su incorporación a través de suplementos dietarios para mantener un nivel apropiado y estable dentro del organismo a fin de conseguir sus potenciales efectos beneficiosos.

2.4.4. La ingesta dietaria y el perfil de AG en plasma y en saliva

Estudios realizados en personas aparentemente sanas y con diversos hábitos alimentarios indican que la naturaleza lipídica de la dieta afecta la composición de AG plasmáticos (Kuriki y col, 2003). Astorg y col. (2007) encontraron una correlación débil

pero significativa entre la ingesta dietética habitual de AL, AA, AEP y ADH y sus respectivos porcentajes plasmáticos en una población de hombres y mujeres adultas.

Kassem y col. (2012) demostraron cambios en los niveles de AG en plasma, hígado y tejido adiposo al variar la proporción de AG poliinsaturados n-6/n-3 dietarios en ratas preñadas después de diez semanas de alimentación. Actis y col. (2005) encontraron diferencias en las concentraciones de AG salivales según el tipo de dieta (mixta y vegetariana). Así, la concentración de AA fue mayor en la saliva de personas con una dieta mixta -probablemente debido al aumento en el consumo de carne- en comparación con los vegetarianos. Además, se encontró una mayor concentración salival de AAL en vegetarianos que en personas con dieta mixta, probablemente relacionada con un consumo significativo de alimentos ricos en AGE tales como legumbres, nueces y aceite de girasol.

Se han encontrado escasos estudios referidos al perfil de AG en saliva. Aunque las evidencias científicas son limitadas, una asociación entre los AG dietarios y los salivales sugerirían la posibilidad de utilizarlos como marcadores de ingesta dietaria.

2.5. Biomarcadores

2.5.1. Generalidades

Los biomarcadores son parámetros biológicos que proveen información sobre el estado normal y/o patológico de una persona o de una población y son utilizados para la comprensión de diferentes enfermedades, en aspectos tales como prevención, diagnóstico y progresión, respuestas al tratamiento, evaluación experimental toxicológica de medicamentos o pesticidas, medición de riesgo ambiental y epidemiológico (Santosh, 2016; OMS, 2002).

Un biomarcador permite medir la interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, la que es evaluada como una respuesta funcional o fisiológica que ocurre a nivel celular o molecular y que además está asociada con la probabilidad del desarrollo de una enfermedad. La interacción depende de las características heredadas y adquiridas del individuo (o del sistema biológico) y de las circunstancias de la exposición, y es posible encontrar algún efecto o ninguno.

Los primeros biomarcadores utilizados en la práctica clínica para el diagnóstico de enfermedades fueron indicadores fisiológicos tales como la temperatura corporal, la

frecuencia cardíaca o la presión sanguínea, todos fácilmente accesibles, medidos de manera sencilla y directamente relacionados con la fisiopatología de una enfermedad. Sin embargo, esos criterios clínicos tradicionales son insuficientes para determinar sitios activos de enfermedad, monitorear la respuesta terapéutica o medir el grado de susceptibilidad a la progresión de una patología futura (Suneetha y Rambabu, 2014).

Los biomarcadores se clasifican de la siguiente manera (Knudsen, 2007; Hayes, 2015 y Santosh, 2016):

- De exposición: evalúa, en un organismo, la presencia de una sustancia exógena, un metabolito o el producto de la interacción entre el agente xenobiótico (compuestos naturales o sintéticos del ambiente que el organismo metaboliza y acumula) y una molécula o célula diana.
- De efecto: analiza la alteración bioquímica, fisiológica y/o de comportamiento, producida en el organismo, que puede asociarse a una enfermedad.
- De susceptibilidad: indica la capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder a la exposición a una sustancia xenobiótica.

En los últimos años, el surgimiento de las tecnologías *ómicas* (genómica, proteómica, transcriptómica, metabolómica, etc.) ha provocado la aparición de nuevos biomarcadores analizados en fluidos corporales como la sangre y el plasma y en diferentes tejidos. Éstos se corresponden con variaciones en la estructura, en la secuencia o en los niveles de expresión de genes, proteínas o metabolitos y proporcionan una visión molecular de las patologías. Todo este proceso comenzó tras el desciframiento del genoma humano, hito que proporcionó gran volumen de información con impacto directo sobre la práctica médica. Los nuevos biomarcadores permiten detectar señales tempranas de la presencia de una patología o el riesgo de desarrollarla en el futuro, lo que contribuye a una medicina personalizada (Chantell y col, 2007; Hayes, 2015).

El término *salivómica* surgió en el año 2008 (Soares Nunes, 2015) como consecuencia del rápido desarrollo del conocimiento de varios constituyentes “ómicos” de la saliva. La *salivómica* incluye componentes del “alfabeto diagnóstico” (proteínas, ARNm, ARNmi, compuestos metabólicos y microbios) y ofrece ventajas sustanciales para detectar

y monitorear enfermedades a través de un método no invasivo. El futuro de las técnicas aplicadas en saliva para el diagnóstico temprano de enfermedades dentarias y sistémicas es promisorio y podría ofrecer una alternativa importante a mediano plazo (Koneru and Tanikonda, 2014).

2.5.2. Biomarcadores nutricionales

Un biomarcador nutricional es aquel compuesto o su metabolito que se mide en el organismo para conocer la exposición de la persona a un determinado alimento (Zamora-Ros, 2006). Un biomarcador nutricional válido debe cumplir con los requisitos de especificidad, adecuada vida media y buena correlación ingesta dietaria-biomarcador (Brunner, 2001).

Uno de los mayores desafíos que enfrenta la epidemiología nutricional es la falta de precisión en los registros dietarios, los que limitan la detección de una posible asociación dieta-enfermedad. Por tal motivo, es importante encontrar biomarcadores nutricionales en los fluidos corporales que permitan complementar los estudios epidemiológicos basados en el consumo alimentario (Sun y col., 2007).

En este sentido, el análisis de un biomarcador presenta ventajas con respecto a los métodos tradicionales de recolección de datos sobre la ingesta dietética (encuestas, por ejemplo). La mayoría de estos últimos requiere de la memoria del encuestado lo que, ante la falta de precisión en el tamaño de las porciones, puede generar una falsa estimación del consumo habitual. Además, la variabilidad en las tablas de composición de alimentos suele traducirse en un cálculo impreciso de la ingesta de un determinado nutriente (Feunekes y col., 1993; Cantwell, 2000).

Algunos compuestos orgánicos encontrados en fluidos corporales pueden ser utilizados como marcadores biológicos de la ingesta nutricional. El plasma es el fluido más usado para el análisis de biomarcadores nutricionales debido a que es más sensible a la ingesta dietaria (Astorg y col, 2008). La orina también es un buen indicador de ingesta de compuestos solubles en agua (Montejo González, 2006).

Diversos estudios realizados en animales y en seres humanos mostraron que los AG n-3 y n-6 dietarios tienden a correlacionarse bien con su perfil sérico o plasmático y, por lo tanto, podrían considerarse un biomarcador de su consumo a largo plazo (Arab, 2003; Kassem y col., 2012). En este sentido, Sun y col. (2007) también observaron que los AG n-

3 y los AG *trans* (16:1 n-7 *trans*; 18:2 n-6 *trans*-9, *trans*-12; 18: 2 n-6 *cis*-9, *trans*-12) de eritrocitos son biomarcadores adecuados de la ingesta habitual.

En un estudio clínico transversal, Kuriki y col. (2003) demostraron correlaciones positivas entre los niveles plasmáticos de algunos AG y su ingesta dietaria. Por ello, los autores sugirieron que los valores en plasma de AEP, ADH y otros AG n-3 insaturados derivados de los alimentos marinos podrían ser biomarcadores útiles en la evaluación de la ingesta de AG dietarios.

A fin de validar la saliva como medio de diagnóstico no invasivo para el estudio del perfil lipídico, Singh y col. (2014) evaluaron y compararon -en personas sanas- el perfil lipídico plasmático -colesterol, HDLP, LDLP, VLDL y triacilglicérol- y el de saliva total. Los autores observaron una correlación positiva significativa entre los valores medios de esos componentes lipídicos en los dos fluidos analizados.

Sin embargo, no se encontraron referencias bibliográficas acerca del tiempo transcurrido entre la ingesta de lípidos y los cambios en el perfil de AG salivales, es decir, si este último refleja el consumo inmediato o habitual de lípidos dietarios.

En el marco del conocimiento anteriormente expuesto y con la finalidad de determinar si el perfil de AG en saliva submandibular de ratas refleja la ingesta habitual de lípidos dietarios, así como también si el flujo de esa saliva se modifica con el consumo lipídico habitual, se desarrolla el presente trabajo de tesis según los objetivos y métodos planteados a continuación.

3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

3.2. Dietas

3.3. Diseño experimental

3.3.1. Protocolo experimental 1

3.3.2. Protocolo experimental 2

3.4. Control de ingesta y peso corporal

3.5. Recolección de saliva submandibular y medición de flujo salival

3.6. Obtención de glándulas submandibulares y de tejido adiposo

3.7. Recolección de sangre

3.8. Homogeneización de tejidos

3.9. Extracción de lípidos

3.10. Metilación de AG

3.11. Análisis cromatográfico de los AG

3.12. Microscopía óptica

3.13. Microscopía electrónica

3.14. Análisis estadístico

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se desarrolló en el marco de un proyecto de investigación científica titulado *Influencia de los ácidos grasos dietarios, y su reflejo en la saliva, sobre la modulación de citoquinas proinflamatorias y sobre procesos moleculares relacionados con la prevención de cáncer*, que se lleva a cabo bajo la dirección de la Dra. Adriana Beatriz Actis. Dicho proyecto ha sido aprobado y subsidiado por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC) (Resolución N° 313/16).

3.1. *Animales*

Se emplearon un total de 78 ratas *Wistar*, machos adultos sanos, las que fueron adquiridas en el Instituto de Investigación “Mercedes y Martín Ferreyra” (IMyMF) y mantenidas en el bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA, CONICET-Facultad de Ciencias Médicas-UNC), Córdoba, Argentina. Los animales (300 ± 50 g de peso corporal o 12 ± 1 semana de edad) fueron alojados en jaulas separadas, en condiciones normales de temperatura (23 ± 2 °C), humedad y ventilación, con ciclos de 12 horas de luz-oscuridad, con acceso *ad libitum* a los alimentos y agua. En cada uno de los animales se registró la ingesta diaria de alimentos (g/día), así como también el peso corporal inicial, semanal y final (g). Al concluir los procedimientos de cada experimento, los animales fueron sacrificados mediante una maniobra de dislocación cervical y almacenados en bolsas de residuos patógenos.

El manejo de los animales se realizó de acuerdo a las pautas de la *Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio* (National Research Council, Washington D.C. 1996) y al *Convenio Europeo para la protección de los animales vertebrados utilizados para fines experimentales u otros fines científicos* (European Treaty Series 123, Estrasburgo 1986). Asimismo, el protocolo de trabajo experimental fue aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación en Salud (CIEIS) de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (Protocolo # 12/2013).

Los animales recibieron diferentes dietas, las que se detallan en la siguiente sección.

3.2. Dietas

Luego del destete (3 semanas), todos los animales recibieron una dieta comercial estándar (*Asociación Balanceado Cooperación, Gilardoni*) de consistencia dura (*pellets*) hasta la 11^a semana de vida (figura 4-A). Esa dieta posee la siguiente composición nutricional centesimal: proteínas 23%, extracto etéreo (grasas) 5%, fibra cruda 6%, minerales totales 10%, calcio 1-1,4%, fósforo 0,5-0,8%, humedad 12%, cloro 0,3%, sodio 0,2%, potasio 0,7%, magnesio 0,2% y azufre 0,16%.

Posteriormente, y de acuerdo al cronograma de las experiencias (véase sección *Diseño experimental*), las ratas adultas fueron alimentadas durante 1, 15 y 30 días con dietas de consistencia blanda (*panes*) preparadas en laboratorio (figura 4-B) a partir de componentes individuales de una pureza grado alimenticio (cuadro 2). Los tiempos de consumo dietario -1 y 30 días- fueron establecidos en función de los hallazgos en la bibliografía consultada acerca de la ingesta inmediata, considerada entre 24 y 48 horas (Salim de Castro y col., 2014), y la ingesta habitual. En cuanto a esta última, Malovrh y col. (2013) reportaron que los niveles de ciertos AG en eritrocitos alcanzan un *plateau* luego de 30 días de suplementación dietaria, sin posterior modificación. Por otra parte, no se encontraron trabajos en modelos similares que se refieran a los 15 días de ingesta. Debido a que experimentos previos en nuestro laboratorio –así como también de otros autores- mostraron cambios en el perfil de AG de fluidos y tejidos (Muñoz y col., 1999) en tiempos intermedios de consumo, se decidió incorporar el análisis en este tiempo con la intención, además, de efectuar un aporte original en el estudio que se aborda,

La elaboración de todas las dietas fue basada en las recomendaciones del Comité *ad hoc* del Instituto Americano de Nutrición (*American Institute of Nutrition*) para roedores en crecimiento.

Las dietas varían según los diferentes aceites incorporados:

- **Dieta Maíz** (DM; control): 7% de aceite de maíz.
- **Dieta Oliva** (DO; dieta experimental 1): 7% de aceite de oliva.
- **Dieta Chía** (DCh; dieta experimental 2): 7% de aceite de chía.
- **Dieta CLA** (DCLA; dieta experimental 3): 6% de aceite de maíz + 1% de aceite rico en CLA cuyos isómeros son *cis*-9, *trans*-11-CLA y *trans*-10, *cis*-12-CLA.

El porcentaje de aceite incorporado en cada dieta elaborada en el laboratorio también se estableció en función de la bibliografía consultada. Diversos autores han encontrado que valores inferiores al 5% pueden producir deficiencia de AG esenciales con alteraciones cutáneas, necrosis periférica, etc. (Monis y Eynard, 1981; Mollard y col., 2005; Comba y col., 2010), mientras que los superiores al 15% no generan beneficios adicionales sino que, por el contrario, producen hiperlipidemia, hiperglucemia, aumento del peso y grasa corporal, así como también disminución del componente óseo mineral y resistencia a la insulina (Wilkes y col., 1998; Buettner y col., 2006; Macri y col., 2012; Suarez y col., 2012). Además, se tuvieron en cuenta las recomendaciones de la OMS con respecto a la ingesta de lípidos en seres humanos (OMS, 2012).



Figura 4. *Presentación de las dietas. A. Pellets. B. Panes*

Composición de dietas (g/100 g)	Dieta Maíz	Dieta Oliva	Dieta Chía	Dieta CLA
Aceite de maíz	7	-	-	6
Aceite de oliva	-	7	-	-
Aceite de chía	-	-	7	-
Aceite enriquecido con CLA	-	-	-	1
Proteínas	20	20	20	20
Almidón	52,95	52,95	52,95	52,95
Sacarosa	10	10	10	10
Fibras	5	5	5	5
Vitaminas	1,0	1,0	1,0	1,0
Minerales	3,5	3,5	3,5	3,5
Cistina/Metionina/Colina	0,55	0,55	0,55	0,55
Energía (Kjoule/g)	14,83	14,83	14,83	14,83

Cuadro 2. *Composición nutricional de las dietas preparadas en laboratorio.*

Tal como se observa en el cuadro 2, todas las dietas fueron isoenergéticas. La composición de AG dietarios de la dieta comercial y de cada uno de los aceites empleados para preparar las dietas de laboratorio fue determinada mediante cromatografía de gas y se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. *Composición de AG de la dieta comercial y de cada uno de los aceites utilizados para la elaboración de las diferentes dietas*

Ácidos grasos	Dieta comercial	Aceite de Maíz	Aceite de Oliva	Aceite de Chía	Aceite con CLA
8:0	Nd	Nd	Nd	Nd	13,01
10:0	Nd	Nd	Nd	Nd	7,43
14:0	0,82	0,03	Nd	Nd	Nd
16:0	17,54	12,21	17,10	6,83	1,56
16:1 n-9	2,18	0,12	1,97	Nd	Nd
17:0	Nd	Nd	0,08	0,12	Nd
18:0	8,09	1,93	1,58	2,62	2,08
18:1 n-9	32,62	31,95	55,19	5,05	21,50
18:1 n-7	Nd	0,54	Nd	Nd	Nd
18:1 n-11	Nd	Nd	4,76	0,96	1,77
18:2 n-6	35,55	51,26	17,21	18,91	1,39
20:0	Nd	0,50	0,30	0,17	Nd
CLA c9,t11	Nd	Nd	Nd	Nd	25,02
20:1 n-9	Nd	0,25	Nd	Nd	Nd
CLA t10,c12	Nd	Nd	Nd	Nd	25,32
Otros CLA	Nd	Nd	Nd	Nd	0,47
20:1 n-11	Nd	Nd	0,25	Nd	Nd
18:3 n-3	3,19	0,88	0,75	65,11	Nd
22:0	Nd	0,16	0,13	Nd	0,24
24:0	Nd	0,15	Nd	Nd	Nd
Ratio AGPI n-6/n-3	11,13	58,25	22,95	0,29	-

AG: ácido graso; CLA: ácido linoleico conjugado. AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

Los valores corresponden al porcentaje de área (% á) total. Nd= no detectado.

El valor correspondiente al *ratio* AGPI n-6/n-3 es referido a 1 (p. ej. 11,13/1).

El AG más abundante en la dieta comercial y en cada uno de los aceites empleados está resaltado con **negrita**.

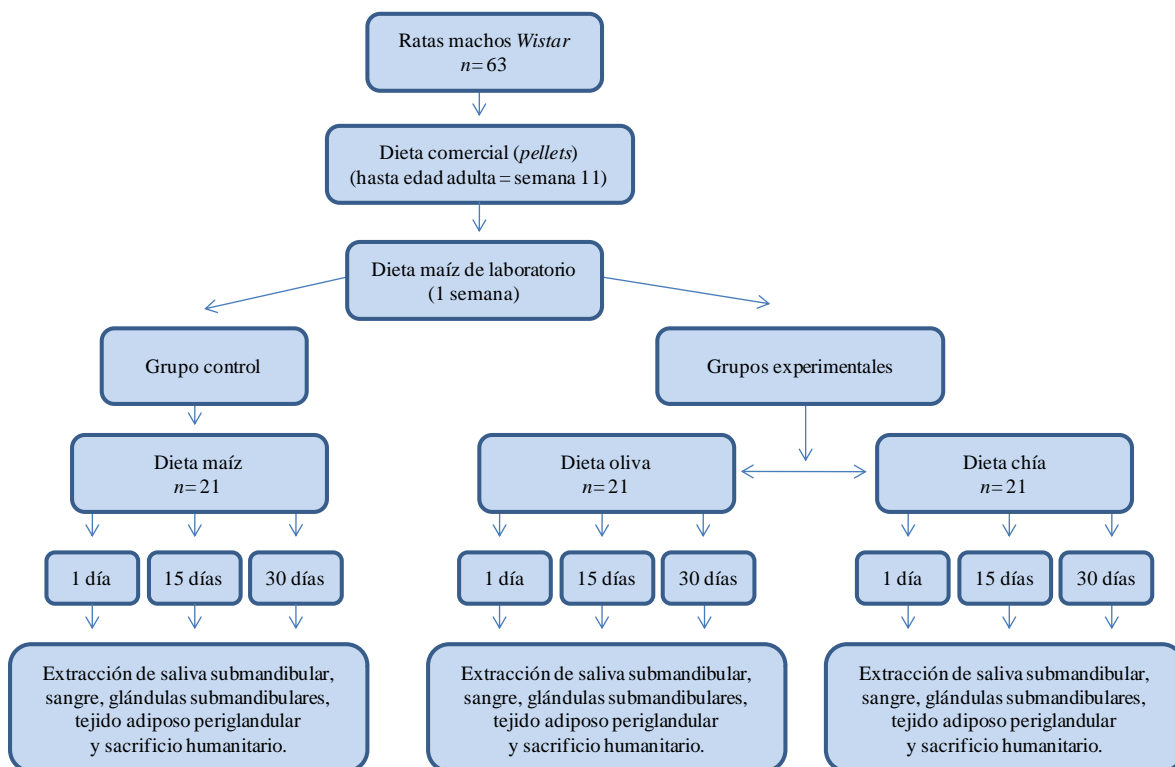
3.3. Diseño experimental

A continuación se presentan las condiciones experimentales (protocolos 1 y 2) propuestas en esta investigación a fin de responder a los objetivos específicos (1.3.1 - 1.3.4, respectivamente) de este trabajo de tesis doctoral.

3.3.1. Protocolo experimental 1

A partir de la 11^a semana de vida, las ratas (n=63) fueron alimentadas, para su adaptación, con una dieta elaborada con un 7% de aceite de maíz (rico en AG 18:2 n-6) durante una semana. Posteriormente, los animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos dietarios: DM (control) y dos grupos experimentales: DO y DCh. Estos últimos fueron alimentados con dietas en las que se reemplazó el aceite de maíz por aceite de oliva (rico en AG 18:1 n-9) o chía (rico en AG 18:3 n-3) durante 1, 15 o 30 días, de acuerdo al calendario experimental (grupos DM1, DM15, DM30; DO1, DO15, DO30; DCh1, DCh15 y DCh30).

El esquema 1 sintetiza el protocolo experimental 1 con la distribución de los animales, sus respectivas dietas, intervalos de sacrificio y procedimientos realizados. En la figura 5 se representan, en una línea de tiempo, los acontecimientos involucrados en el protocolo experimental 1.



Esquema 1. *Protocolo experimental 1*

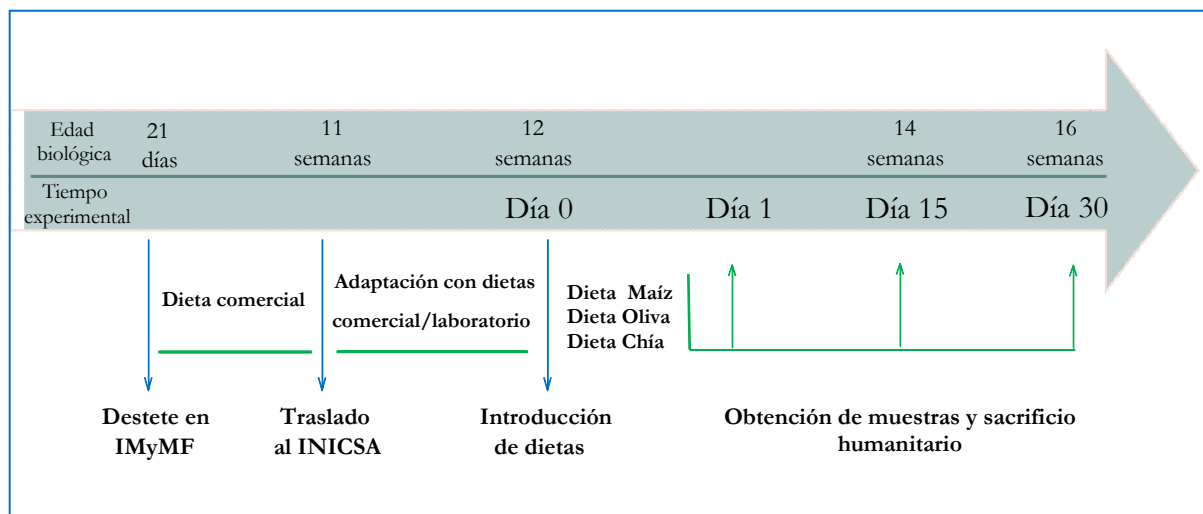
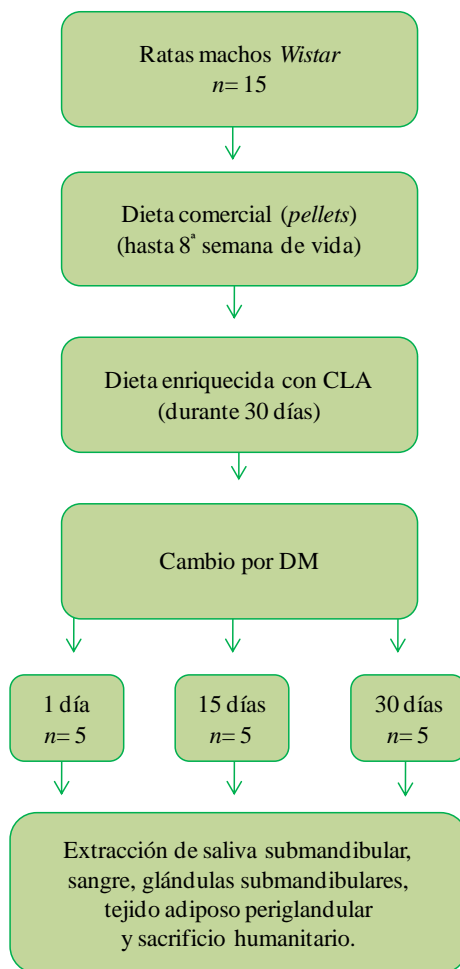


Figura 5. *Línea de tiempo correspondiente al protocolo experimental 1*

3.3.2. Protocolo experimental 2

Las ratas ($n=15$) fueron alimentadas con dieta comercial hasta la 8^a semana de vida, a partir de la cual continuaron con la dieta CLA durante cuatro semanas más. Posteriormente, la DCLA fue sustituida por DM y, al cabo de 1, 15 y 30 días, se efectuó la recolección de los fluidos y la obtención de los tejidos por estudiar; finalmente, se prosiguió con el sacrificio de los animales.

El esquema 2 sintetiza el protocolo de experimentación 2 con la distribución de los animales, sus respectivas dietas, intervalos de sacrificio y procedimientos realizados. En la figura 6 se representan, en una línea de tiempo, los acontecimientos involucrados en el protocolo experimental 2.



Esquema 2. Protocolo experimental 2

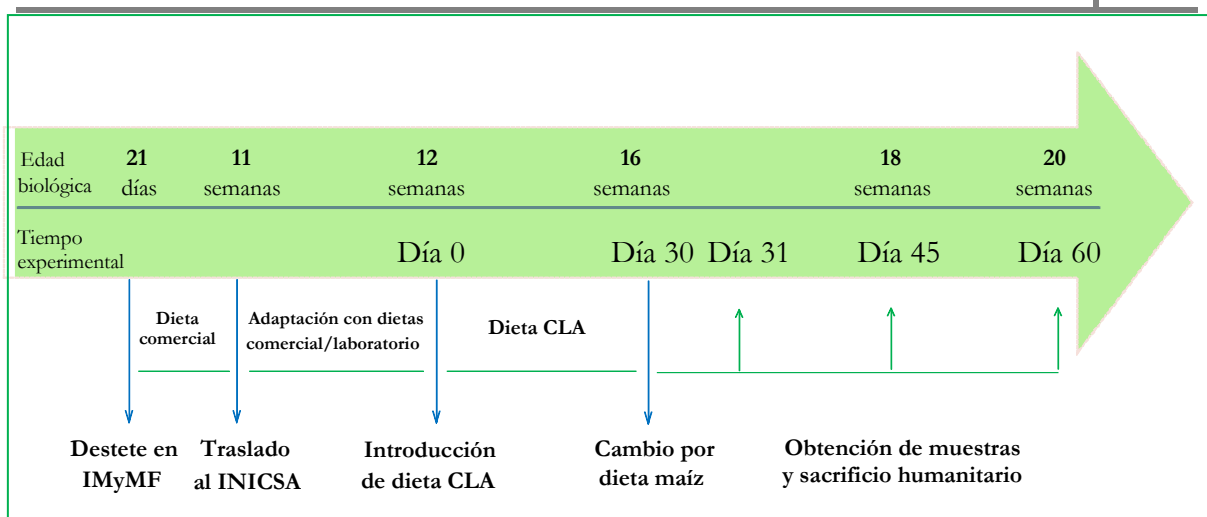


Figura 6. Línea de tiempo correspondiente al protocolo experimental 2

3.4. Control de ingesta y peso corporal

El alimento prepesado (balanza NCI, sensibilidad 1g) fue colocado diariamente en el bolsillo metálico de la puerta de acceso de cada jaula entre las 09:00 y las 10:00 horas. La diferencia en peso (g) de alimento entre un día y el siguiente (restando el alimento no ingerido y los fragmentos encontrados en el piso de la jaula) fue considerada el valor de la ingesta diaria. Por otra parte, el peso de cada animal de los grupos control y experimentales fue registrado una vez por semana entre las 08:00 y las 12:00 horas a fin de realizar la curva de peso corporal.

3.5. Recolección de saliva submandibular y medición de flujo salival

Tal como se ha mencionado previamente, luego de 1, 15 y 30 días de ingesta de las diferentes dietas, los animales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (0,6 g/kg de peso corporal). Se realizó una traqueotomía para lograr una ventilación pulmonar libre y se midió la temperatura corporal, a través de un termómetro rectal, a fin de mantenerla a 37,5 °C.

Para la recolección de la saliva, los conductos de secreción de ambas glándulas submandibulares fueron expuestos y, posteriormente, canulados con finos tubos de vidrio (Ohlin, 1964; Schneyer y Schneyer, 1960). Debido a que la secreción salival está regulada por ramas del sistema nervioso autónomo que actúan sinérgicamente, las respuestas secretorias se obtuvieron mediante la inyección intraperitoneal conjunta de 5 mg/kg de peso corporal de isoproterenol (agonista β -adrenérgico) y pilocarpina (agonista muscarínico)

colinérgico) disueltos en una solución salina isotónica (Johnson y col., 1988; Koller y col., 1992; Koller y col., 2000). Los volúmenes inyectados variaron de 0,8 a 1,0 mL dependiendo del peso corporal del animal. La saliva submandibular secretada fue recolectada durante 20 minutos (desde el momento de aparición de la primera gota en el extremo de la cánula) en tubos de plástico prepesados. La respuesta secretoria fue expresada como μL de saliva por minuto (flujo salival) y por glándula. El procedimiento de recolección de la saliva se presenta en la figura 7.



Figura 7. *Recolección de saliva submandibular*. A. Exposición de conductos salivales submandibulares y sublinguales. B. Localización de un conducto submandibular. C. Canalización de los conductos submandibulares. D. Recolección de saliva en tubos de plástico.

3.6. Obtención de glándulas submandibulares y tejido adiposo

Luego de la obtención de la saliva, se extrajeron en conjunto las glándulas submandibulares y sublinguales de cada lado. Posteriormente, se identificó la glándula sublingual para su separación (figura 8). Las glándulas submandibulares fueron incorporadas en el estudio para determinar si su composición de AG está regulada por el contenido lipídico de la dieta y su tiempo de ingesta, además de analizar la correlación entre su perfil de AG y el de la saliva.

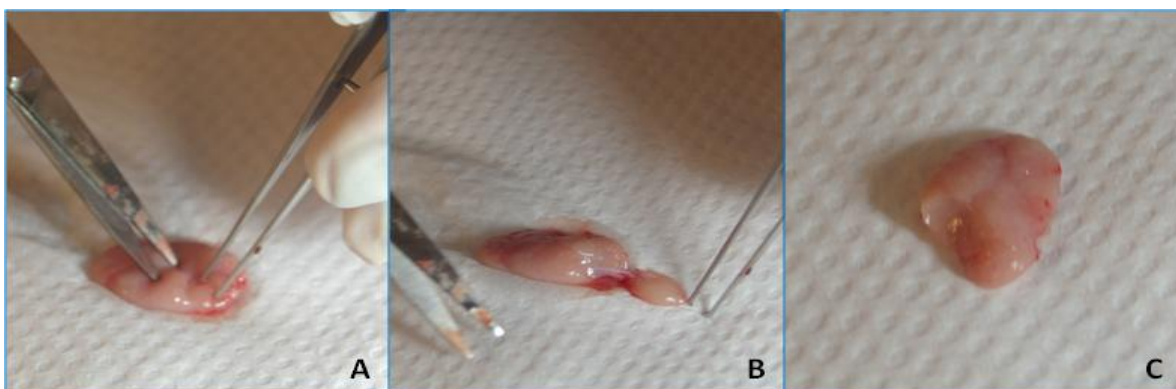


Figura 8. *Obtención de glándula submandibular.* A. Identificación de la glándula sublingual. B. Separación de las dos glándulas salivales. C. Obtención de la glándula submandibular.

Se registró el peso húmedo de la glándula submandibular derecha y, luego de 48 horas en estufa a 70 °C, su peso seco. Además, se tomaron muestras de tejido adiposo periglandular (1 g, aproximadamente), las que fueron almacenadas en tubos de plástico prepesados. Se obtuvo tejido adiposo periglandular a fin de determinar si su perfil de AG se correlaciona con el de la dieta consumida, ya que diversos autores consideran que el tejido adiposo siempre refleja la ingesta habitual debido a su lento periodo de recambio, aunque cada zona de éste en el cuerpo humano tiene su propio patrón de AG (Hodson y col., 2008; Kassem y col., 2012).

Tanto las muestras de glándulas como las de tejido adiposo periglandular fueron almacenadas brevemente a -20 °C hasta su procesamiento.

3.7. *Recolección de sangre*

Una vez finalizado el proceso de obtención de la saliva y de los tejidos de estudio, se realizó una punción cardíaca (figura 9-A) mediante agujas de calibre 21 a fin de tomar una muestra de sangre (figura 9-B y 9-C). Las agujas y jeringas fueron previamente heparinizadas para evitar la coagulación de la sangre en su interior. Las muestras fueron recolectadas en tubos de hemólisis, identificadas y centrifugadas a 3000 rpm en frío durante 10 minutos (figura 9-D). El plasma sobrenadante fue separado, almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y empleado, posteriormente, para el análisis cromatográfico.

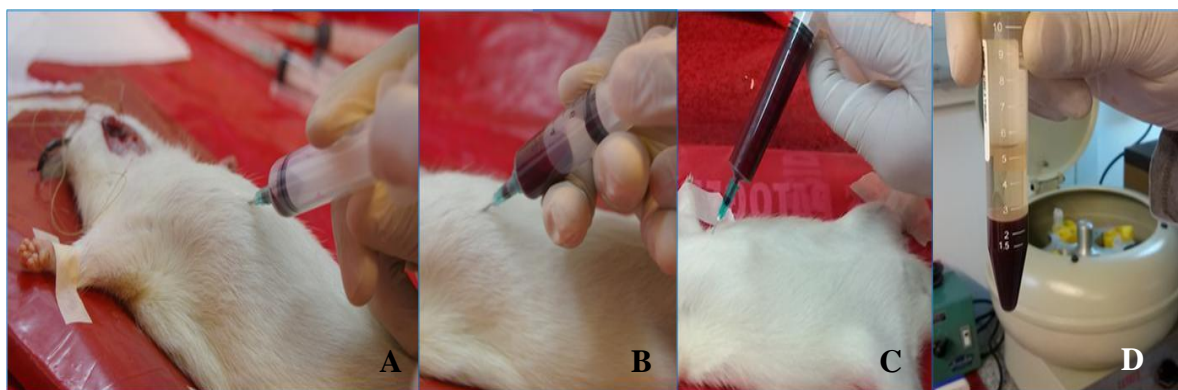


Figura 9. *Recolección de sangre y obtención de plasma*

Al finalizar el procedimiento quirúrgico los animales fueron sacrificados mediante una maniobra de dislocación cervical y fueron almacenados en bolsas de residuos patógenos.

3.8. *Homogeneización de tejidos*

La glándula submandibular izquierda y el tejido adiposo periglandular fueron homogeneizados, según técnica de rutina del laboratorio de INICSA (Dain y col., 2016), diez veces con un homogeneizador de vidrio (Omni TH, Internacional) y luego diluidos en una solución *buffer* fosfato (PBS) (0,02 mol, 1-1, pH 7,0 - 7,2).

3.9. *Extracción de lípidos*

Los lípidos totales de las muestras de saliva, plasma, glándulas submandibulares y de tejido adiposo periglandular fueron extraídos con cloroformo/metanol 2:1 (V/V) de

acuerdo a la técnica de Folch (Folch, 1957). La fase inferior, que contiene los lípidos totales, fue recuperada y evaporada hasta sequedad bajo atmósfera de nitrógeno.

3.10. Metilación de AG

La metilación de los AG fue realizada con metóxido de sodio (Cantellops, 1999). La fase superior, que contiene los metilésteres, fue recuperada y secada bajo atmósfera de nitrógeno.

3.11. Análisis cromatográfico de los AG

La separación, identificación y cuantificación de AG de saliva, plasma, glándulas submandibulares y tejido adiposo periglandular fue realizada mediante un cromatógrafo de gas Shimadzu 2014 equipado con un detector de ionización de llama (Jenck S.A. Instrumental, Buenos Aires, Argentina). La temperatura de los inyectores y del detector fue de 250 °C y se utilizó nitrógeno como gas portador. Los ésteres metílicos de AG fueron analizados mediante el uso de una columna capilar de 100 metros de longitud, ID 0,25 mm x 0,2 mm, espesor de película SP-Sil. 88 (Varian, Darmstadt, Alemania).

Los resultados fueron expresados como porcentaje del área total (%á) de todos los picos de AG individuales comprendidos entre el ácido palmítico (16:0) y el ácido docosahexaenoico (22:6 n-3). Los valores de AG por debajo de 0,5% no fueron considerados. Los AG fueron identificados por comparación con los tiempos de retención de estándares internos comerciales (autenticado Accustandard, New Haven, Estados Unidos y Sigma, St. Louis MO, Estados Unidos). Los datos cromatográficos fueron procesados por el *software* de solución de cromatografía de gases (Jenck S.A. Instrumental, Buenos Aires, Argentina).

El análisis de los AG fue realizado en función de su relevancia nutricional y biológica, habiéndose seleccionado los siguientes: ácido palmítico 16:0 (AP); ácido palmitoleico 16:1 n-9 (APO); ácido esteárico 18:0 (AE); ácido oleico 18:1 n-9 (AO); ácido linoleico 18:2 n-6 (AL); 18:2 n-6 *cis-9 trans-11*-CLA; 18:2 n-6 *trans-10 cis-12*-CLA; ácido dihomo- γ -linolénico 20:3 n-6 (ADGL); ácido araquidónico 20:4 n-6 (AA); ácido α -linolénico 18:3 n-3 (AAL); ácido eicosapentaenoico 20:5 n-3 (AEP); ácido docosapentaenoico 22:5 n-3 (ADP) y ácido docosahexaenoico 22:6 n-3 (ADH).

3.12. Microscopía óptica

Una parte de las muestras de las glándulas submandibulares derechas fueron fijadas en formol al 10% diluido en tampón fosfato, posteriormente incluidas en parafina y seccionadas. Esas secciones de 5 μm de espesor fueron teñidas con hematoxilina y eosina (HE) y ácido periódico de Schiff (PAS) de acuerdo con los procedimientos de rutina del Laboratorio de Histología del INICSA. La evaluación de las muestras de glándulas salivales fue realizada mediante microfotografías a 10x y a 40x obtenidas a través de un videomicroscopio óptico *LeicaDM750* (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Alemania).

Las imágenes fueron analizadas mediante el programa informático *Image J* (1.48, *National Institute of Health*, Maryland, Estados Unidos). En los preparados con tinción de H/E se estimó la densidad de acinos serosos (expresados como % área de la imagen), mientras que la de acinos mucosos se examinó en las imágenes de preparados con tinción de PAS/H (específica para marcación de glúcidos y glicoproteínas). Los valores expresados corresponden a la media obtenida en 4 cortes por tratamiento y por tiempo.

Los análisis de microscopía óptica fueron realizados solamente en las glándulas salivales submandibulares de los animales alimentados con las dietas maíz, oliva y chía durante 15 y 30 días, debido a que sólo en ellas se esperó observar cambios estructurales (1 día de ingesta es un tiempo demasiado breve).

3.13. Microscopía electrónica

Las glándulas salivales fueron lavadas y fijadas en una mezcla de formaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en un *buffer* de cacodilato 0,1 M durante 2 horas y luego tratadas con 1% OsO_4 durante 1 hora, antes de ser teñidas en bloque con acetato de uranilo al 1% en un *buffer* de acetato 0,1 M de pH 5,2 durante 20 minutos (De Paul y col., 2009). Después de la deshidratación por acetonas frías graduadas, las glándulas fueron incluidas en Araldite. Se obtuvieron secciones finas mediante ultramicrotomo JEOL con un cuchillo de diamante, las que luego fueron teñidas con citrato de acetato de uranilo/plomo y examinadas a través de un microscopio electrónico Zeiss Leo 906-E (Oberkochen, Baden-Württemberg, Alemania).

Las imágenes obtenidas fueron analizadas a través del programa informático *Image J* (1.48, *National Institute of Health*, Maryland, EEUU) para determinar el diámetro

promedio de los núcleos de células secretoras, el % área ocupada por el RER y las vesículas secretoras con su respectivo tamaño.

Es importante mencionar que los análisis de microscopía electrónica fueron realizados solamente en los grupos DM, DO y DCh luego de 30 días de ingesta debido a las modificaciones observadas mediante microscopía óptica.

3.14. Análisis estadístico

Los datos obtenidos en el presente trabajo fueron ingresados a una base de datos confeccionada para tal fin (planilla de cálculo del programa Excel). En primer lugar, se realizó un análisis estadístico descriptivo que permitió expresar los resultados de las variables de estudio como valores medios, error estándar de la media, mínimo y máximo.

Se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para determinar la variación del perfil de AG de saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular dentro de cada grupo (DM, DO y DCh) según las series temporales (1, 15 y 30 días).

Se empleó la prueba de correlación de Spearman (positiva $r > 0 < 1$, negativa $r > -1 < 0$) para analizar el nivel de asociación entre el perfil de AG salivales y plasmáticos según el tiempo de ingesta de lípidos dietarios, así como también para establecer la correlación entre los perfiles de AG salivales/plasmáticos, salivales/glandulares y salivales/adiposos. Las asociaciones según su potencia estadística, pueden ser: muy fuerte (0,8 a 1,0 o -0,8 a -1,0); fuerte (0,6 a 0,8 o -0,6 a 0,8); moderada (0,3 a 0,5 o -0,3 -0,5); débil (0,1 a 0,3 o -0,1 a -0,3); muy débil o ninguna (0,1 a -0,1).

Se aplicó la prueba de ANOVA para comparar los niveles de AG entre los distintos grupos dietarios (DM, DO y DCh), bloqueando por tiempo y tipo de muestra.

Además, se utilizó la prueba *t* de Student para comparar la tasa de flujo salival submandibular ($\mu\text{L}/\text{min}$) de cada grupo dietario según los diferentes tiempos experimentales (1, 15 y 30 días) y, posteriormente, entre los distintos grupos dietarios.

También se empleó la prueba de correlación de Spearman para analizar el nivel de asociación entre el flujo salival y algunos AG de la glándula submandibular de cada grupo dietario.

Se aplicó la prueba de ANOVA para establecer la significancia estadística del porcentaje de área de los acinos mucosos y serosos.

En todos los análisis se consideró un nivel de significancia del 5% ($p \leq 0,05$).

Se utilizó el programa *Infostat* (2005) para la realización de los análisis estadísticos antes mencionados.

4

RESULTADOS

4.1. Perfil de AG en fluidos y tejidos

4.1.1. Perfil de AG del grupo dietario maíz

4.1.2. Perfil de AG del grupo dietario oliva

4.1.3. Perfil de AG del grupo dietario chía

4.1.4. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 1 día de ingesta

4.1.5. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 15 días de ingesta

4.1.4. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 30 días de ingesta

4.2. Flujo salival

4.2.1. Comparación del flujo salival submandibular entre grupos dietarios según tiempo de ingesta

4.2.2. Flujo salival submandibular en cada grupo dietario según el tiempo de ingesta

4.2.3. Flujo salival y AG de la glándula submandibular según dieta y tiempo de ingesta

4.2.4. Cuantificación de acinos serosos y mucosos de glándula submandibular mediante microscopía óptica

4.2.5. Análisis de células acinares de glándula submandibular mediante microscopía electrónica

4.3. Biodisponibilidad de isómeros de CLA en saliva, plasma glándula submandibular y tejido adiposo periglandular

4. RESULTADOS

Se presentan los resultados obtenidos en este trabajo de tesis sobre la base del objetivo general y de los objetivos específicos.

4.1. *Perfil de AG dietarios*

Los perfiles de AG de los fluidos y tejidos analizados según los distintos tiempos experimentales se presentan en tablas, las que se acompañan de gráficos que contienen **solo** los valores de aquellos que poseen diferencias estadísticamente significativas según los tiempos de ingesta. Además, se incluye una tabla con las correlaciones estadísticamente significativas entre los AG de las diferentes muestras analizadas y, por último, se exponen los resultados obtenidos al comparar el perfil de AG de saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular de los distintos grupos dietarios entre sí, según cada tiempo experimental.

4.1.1. *Perfil de AG del grupo DM*

El perfil de AG de saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular, según los distintos tiempos experimentales, se presentan en la tabla 5.

Tabla 5. Perfil de AG en fluidos y tejidos del grupo DM según los tiempos experimentales

AG	Saliva				Plasma				Glándula submandibular				Tejido adiposo periglandular			
	1 día	15 días	30 días	p*	1 día	15 días	30 días	p*	1 día	15 días	30 días	p*	1 día	15 días	30 días	p*
AP	16,58 ± 2,54 ^A	9,95 ± 1,24 ^{AB}	6,6 ± 0,91 ^B	0,001	23,05 ± 1,68 ^A	16,38 ± 0,54 ^B	15,85 ± 2,01 ^B	0,024	29,03 ± 0,71	22,15 ± 0,9	24,39 ± 2,31	0,066	27,52 ± 0,21	32,08 ± 2,37	29,74 ± 2,46	0,211
APO	6,89 ± 0,19	1,55 ± 0,01	2,73 ± 0,35	0,200	2,12 ± 0,51	Nd	3,02 ± 0,91	0,533	2,77 ± 0,21	1,97 ± 0,32	2,38 ± 0,41	0,275	6,56 ± 0,25 ^A	2,73 ± 0,22 ^B	3,33 ± 0,41 ^B	0,008
AE	8,29 ± 1,42 ^A	4,04 ± 0,41 ^B	3,79 ± 0,69 ^B	0,018	10,81 ± 0,26 ^A	8,79 ± 0,38 ^{AB}	7,31 ± 0,61 ^B	0,006	11,04 ± 0,58 ^A	7,94 ± 0,39 ^B	9,22 ± 0,58 ^{AB}	0,011	4,3 ± 0,25	5,19 ± 0,45	3,74 ± 0,37	0,103
AO	18,83 ± 3,37 ^A	0,6 ± 0,14 ^B	2,36 ± 1,15 ^B	0,004	10,73 ± 2,11	4,04 ± 0,51	6,31 ± 2,24	0,086	11,35 ± 1,09	9,95 ± 1,09	10,95 ± 1,36	0,766	34,27 ± 0,77 ^A	23,55 ± 1,52 ^B	26,02 ± 1,01 ^{AB}	0,007
AL	10,34 ± 1,36 ^A	2,89 ± 2,13 ^B	2,6 ± 0,81 ^B	0,012	19,44 ± 2,15 ^A	9,14 ± 0,51 ^B	8,77 ± 2,72 ^B	0,037	12,94 ± 1,24	9,86 ± 0,96	11,82 ± 1,74	0,368	21,7 ± 1,33 ^A	28,64 ± 1,61 ^B	27,4 ± 2,44 ^{AB}	0,041
AAL	4,21 ± 0,97	0,59 ± 0,35	Nd	0,057	0,74 ± 0,01	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-	0,34 ± 0,06 ^A	1,74 ± 0,18 ^B	1,06 ± 0,11 ^{AB}	0,003
ADGL	3,49 ± 1,01	3,57 ± 0,51	6,27 ± 1,83	0,441	1,79 ± 0,33 ^A	2,09 ± 0,12 ^{AB}	3,69 ± 0,58 ^B	0,024	3,84 ± 0,31 ^A	1,77 ± 0,15 ^B	2,52 ± 0,21 ^{AB}	0,006	0,43 ± 0,07	0,61 ± 0,06	0,55 ± 0,13	0,187
AA	Nd	Nd	2,8 ± 0,01	-	18,99 ± 2,12	12,57 ± 0,71	16,16 ± 2,81	0,371	23,82 ± 1,01 ^A	10,69 ± 1,21 ^B	15,11 ± 1,71 ^B	0,007	Nd	Nd	Nd	-
AEP	Nd	28,22 ± 3,45	31,48 ± 2,75	0,343	Nd	16,14 ± 1,09	20,81 ± 0,99	0,057	Nd	8,89 ± 0,79	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-
ADP	Nd	13,55 ± 1,43	14,48 ± 2,52	0,800	3,26 ± 0,01	Nd	Nd	-	0,5 ± 0,17	Nd	Nd	-	Nd	0,13 ± 0,03	Nd	-
ADH	Nd	1,35 ± 0,01	Nd	-	1,38 ± 0,16	1,24 ± 0,36	1,32 ± 0,01	0,889	0,62 ± 0,04	Nd	0,57 ± 0,13	0,905	27,52 ± 0,21	32,08 ± 2,37	29,74 ± 2,46	0,211
Ratio AGPI n-6/n-3	4,46	0,15	0,25		7,14	1,37	1,29		36,25	2,51	51,67		0,79	0,86	0,90	

AG: ácido graso; DM: dieta maíz; AP: ácido palmítico; APO: ácido palmitoleico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α -linolénico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; ADP: ácido docosapentaenoico; ADH: ácido docosahexaenoico. AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

Los valores se expresan como porcentaje de área (%á) y corresponden a la media \pm EE. Nd: no detectado.

El valor correspondiente al *ratio* AGPI n-6/n-3 es referido a 1 (p. ej. 4,46/1).

*Prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

- Saliva:** los niveles de AP, AE, AO y AL mostraron una disminución en el grupo DM30 con respecto al grupo DM1 ($p=0,001$; $p=0,018$; $p=0,004$ y $p=0,012$, respectivamente) (figura 11). El AAL se observó solamente en los grupos DM1 y DM15 con diferencias que no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$). El AA, derivado del AL, fue observado solo en el grupo DM30, mientras que los AEP y ADP presentaron altas concentraciones en los grupos DM15 y DM30 ($p>0,05$), aunque no fueron detectados en el grupo DM1. Por último, un bajo porcentaje del ADH fue encontrado solo en DM15 (tabla 5).

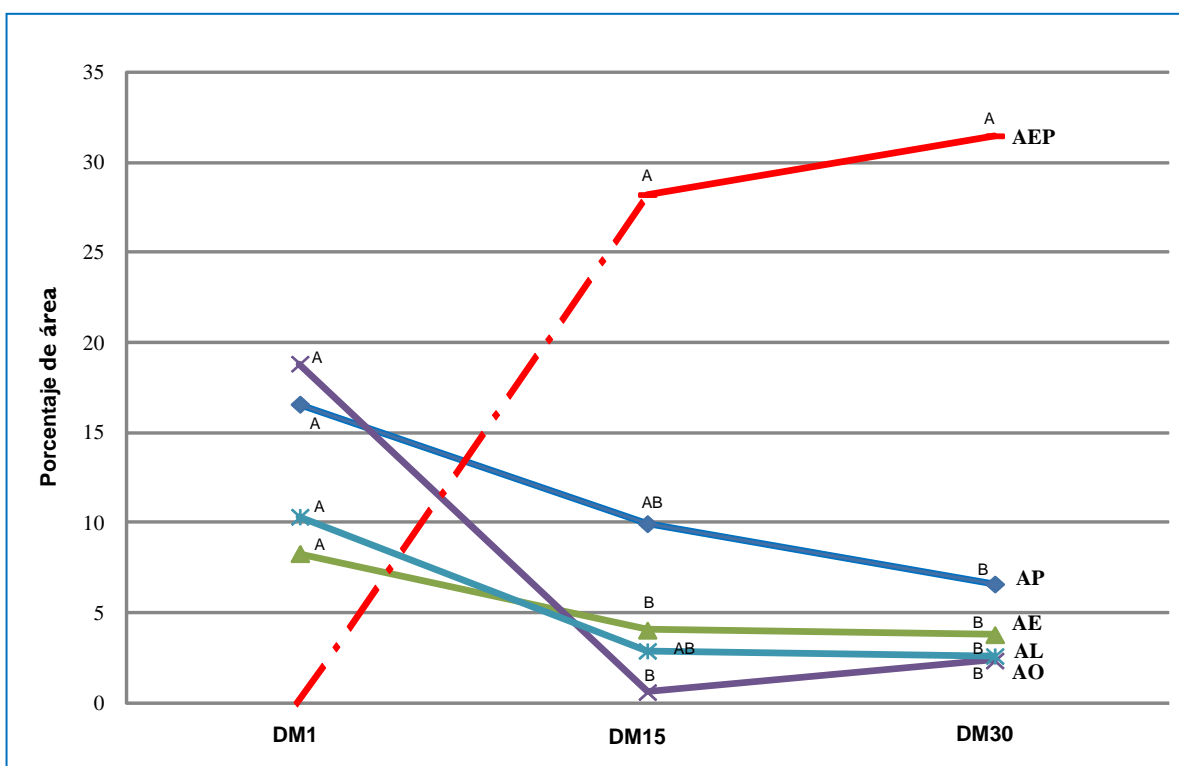


Figura 11. Niveles de AG salivales en grupo DM según tiempos experimentales.

DM1: dieta maíz 1 día; DM15: dieta maíz 15 días; DM30: dieta maíz 30 días.

AEP: ácido eicosapentaenoico; AP: ácido palmítico; AE: ácido esteárico; AL: ácido linoleico; AO: ácido oleico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Además, se incorporan los porcentajes del AEP que fueron elevados a los 15 y 30 días pero no detectados al día 1 de ingesta (línea discontinua), lo que imposibilitó su análisis estadístico.

- Plasma:** los niveles de AP, AE y AL presentaron una disminución en el grupo DM30 con respecto al grupo DM1 ($p=0,024$; $p=0,006$ y $p=0,037$, respectivamente) (figura

12). En cuanto al AAL plasmático sólo se lo observó en el grupo DM1. Por otra parte, el AEP no fue detectado en el grupo DM1 aunque se encontraron niveles altos en los grupos DM15 y DM30 ($p>0,05$). Un alto porcentaje de AA fue detectado en los tres tiempos experimentales del grupo DM, pero sus diferencias no son estadísticamente significativas. El nivel del ADGL presentó un incremento en el grupo DM30 con respecto al grupo DM1 ($p=0,024$).

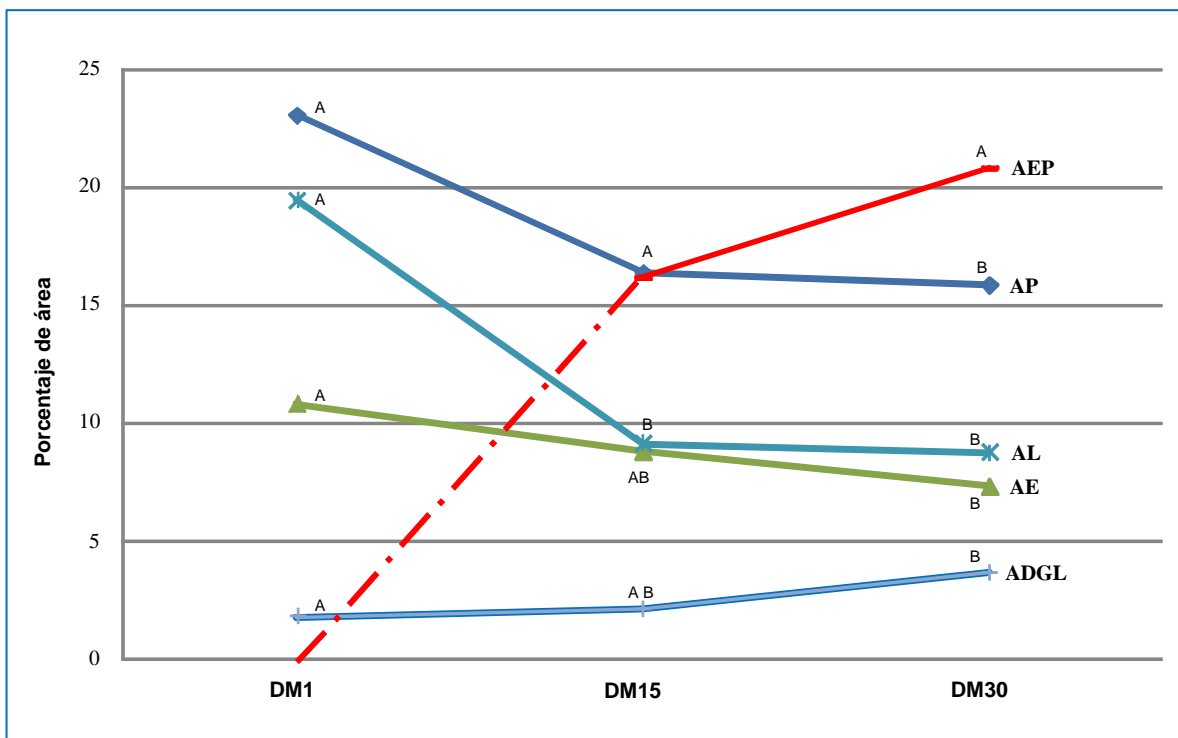


Figura 12. Niveles de AG plasmáticos en grupo DM según tiempos experimentales.

DM1: dieta maíz 1 día; DM15: dieta maíz 15 días; DM30: dieta maíz 30 días.

AEP: ácido eicosapentaenoico; AP: ácido palmítico; AL: ácido linoleico; AE: ácido esteárico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas (A/B $p\leq 0,05$). Además, se incorporan los porcentajes del AEP que fueron elevados a los 15 y 30 días pero no detectados al día 1 de ingesta (línea discontinua), lo que imposibilitó su análisis estadístico.

- *Glándula submandibular*: los niveles de AE y ADGL fueron mayores en el grupo DM1 que en los grupos DM15 ($p=0,011$ y $p=0,006$) y DM30 ($p>0,05$) (figura 13). Los porcentajes de AL y AO mostraron valores semejantes en los tres tiempos analizados. No se detectó AAL en ningún tiempo experimental, mientras que un alto porcentaje de

AEP fue observado solamente en el grupo DM15. El nivel de AA fue mayor en el grupo DM1 que en los grupos DM15 y DM30 ($p=0,007$), aunque la diferencia fue menor con respecto a este último debido a un ligero incremento en su valor medio.

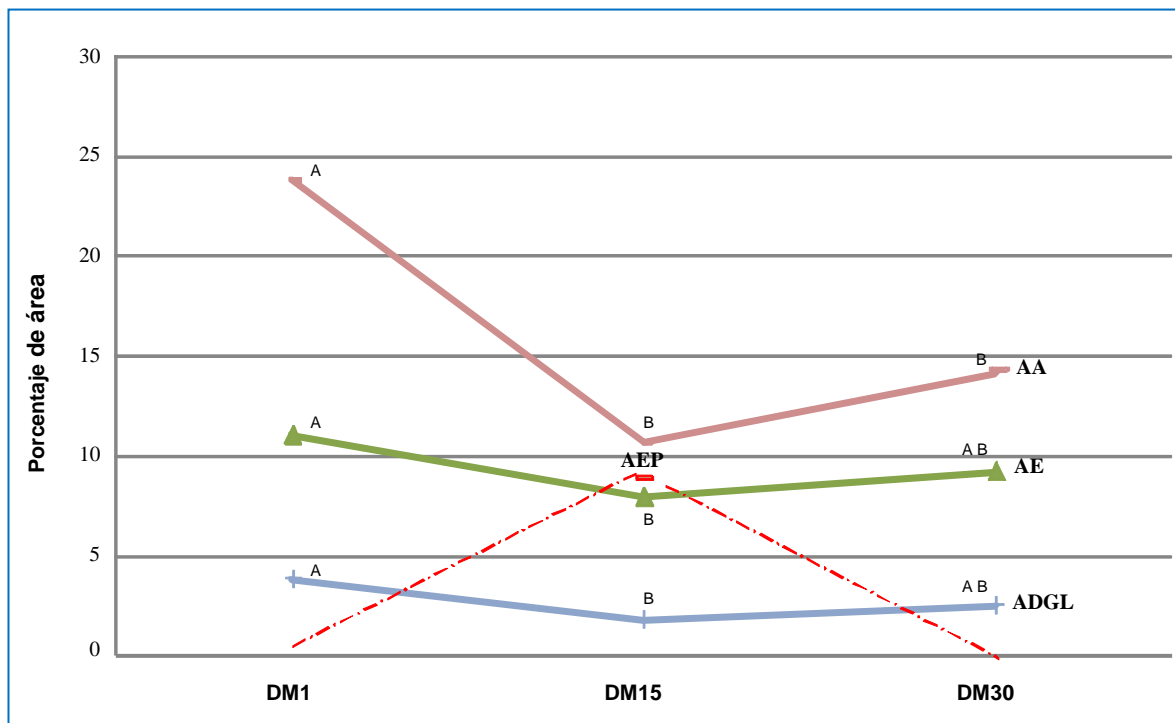


Figura 13. Niveles de AG en glándula submandibular en grupo DM según tiempos experimentales

DM1: dieta maíz 1 día; DM15: dieta maíz 15 días; DM30: dieta maíz 30 días.

AEP: ácido eicosapentaenoico; AA: ácido araquidónico; AE: ácido esteárico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas ($^{A/B} p \leq 0,05$). Además, se incorporan los porcentajes del AEP que fueron elevados a los 15 días pero no detectados a 1 y 30 días de ingesta (línea discontinua), lo que imposibilitó su análisis estadístico.

- *Tejido adiposo periglandular*: el grupo DM15 presentó niveles mayores de AL y AAL comparados con los del grupo DM1 ($p=0,041$ y $p=0,003$, respectivamente), pero no se registraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los del grupo DM30 (figura 14). Los porcentajes de AO y APO mostraron una disminución a los 15 días con respecto a 1 día ($p=0,007$ y $p=0,008$, respectivamente) y un ligero incremento en el grupo DM30 ($p > 0,05$). Tanto el AA como el AEP no fueron detectados en este

tejido en ninguno de los tiempos experimentales, mientras que el ADP fue observado sólo a los 15 días y en un bajo porcentaje.

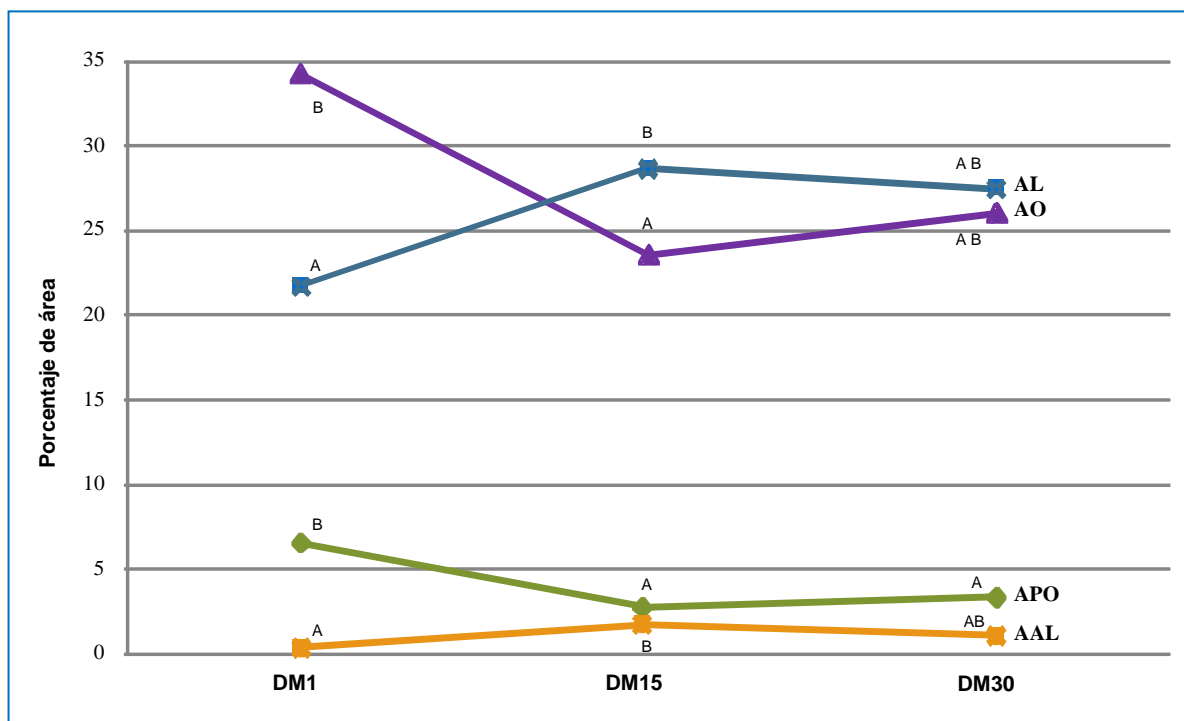


Figura 14. Nivel de AG en tejido adiposo periglandular en grupo DM según tiempos experimentales.

DM1: dieta maíz 1 día; DM15: dieta maíz 15 días; DM30: dieta maíz 30 días.

AL: ácido linoleico; AO: ácido oleico; APO: ácido palmitoleico; AAL: ácido α -linolénico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

En la tabla 6 se presentan las correlaciones significativas observadas entre los AG de saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular según el tiempo de ingesta de los lípidos dietarios en el grupo DM.

Tabla 6. Asociación entre AG salivales, plasmáticos, glandulares y adiposos en el grupo DM según el tiempo de ingesta

	AO Plasma DM1	AA Plasma DM1	AO Saliva DM15	AEP Saliva DM15	AEP Plasma DM15	AL Plasma DM15	AO Saliva DM30	AO Plasma DM30	AL Glándula DM30	AL Saliva DM30	AO TAP DM1	ADH Plasma DM1	AL TAP DM1	AA TAP DM1	AL TAP DM15	AO TAP DM15	AA TAP DM15	ADH Plasma DM15
AO Plasma DM1	1	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA Plasma DM1	-0,88	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AO Saliva DM15	-	-	1	0,03	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AEP Saliva DM15	-	-	-0,97	1	0,02	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AEP Plasma DM15	-	-	-0,99	0,98	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL Plasma DM15	-	-	-	-0,96	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AO Saliva DM30	-	-	-	-	-	-	1	0,05	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AO Plasma DM30	-	-	-	-	-	-	0,87	1	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
AL Glándula DM30	-	-	-	-	-	-	0,93	-	1	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
AL Saliva DM30	-	-	-	-	-	-	0,95	0,88	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AO TAP DM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,02	-	-	-	-	-	-
ADH Plasma DM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,98	1	-	-	-	-	-	-
AL TAP DM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,05	-	-	-	-
AA TAP DM1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,88	1	-	-	-	-
AL TAP DM15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,02	-	-
AO TAP DM15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,93	1	-	-
AA TAP DM15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,01
ADH Plasma DM15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,99	1

AG: ácidos grasos; DM: dieta maíz; AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; ADH: ácido docosahexaenoico. DM1: dieta maíz 1 día; DM15: dieta maíz 15 días; DM30: dieta maíz 30 días. TAP: tejido adiposo periglandular. Prueba de correlación de Spearman ($p \leq 0,05$).

También se observaron otras correlaciones (moderada, fuerte y muy fuerte), aunque no fueron estadísticamente significativas, en las distintas muestras analizadas ($p > 0,05$):

- En el grupo DM1 se observaron: ácido oleico (S y GS= 0,78; S y TAP= -0,71; P y TAP= 0,82); ácido linoleico (S y P= -0,63; P y GS= 0,6; P y TAP= 0,79).
- En el grupo DM15: ácido oleico (S y GS= 0,78; S y TAP= -0,67; P y GS= 0,6); ácido linoleico (S y P= 0,61; S y GS= 0,83; P y GS= 0,98).
- En el grupo DM30: ácido oleico (S y TAP= 0,72; P y GS= 0,67); ácido linoleico (S y P= 0,72; S y GS= 0,88; P y GS= 0,76); ácido α -linolénico (P y TAP= 0,7).

4.1.2. Perfil de AG del grupo DO

La tabla 7 muestra el perfil de AG de saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular de la dieta oliva según los diferentes tiempos experimentales.

Tabla 7. Perfil de AG en fluidos y tejidos del grupo DO según los tiempos experimentales

AG	Saliva				Plasma				Glándula submandibular				Tejido adiposo periglandular			
	1 día	15 días	30 días	p*	1 día	15 días	30 días	p*	1 día	15 días	30 días	p*	1 día	15 días	30 días	p*
AP	24,27 ± 4,42 ^A	9,07 ± 1,0 ^B	7,76 ± 2,06 ^B	0,003	21,46 ± 2,68	13,33 ± 1,23	18,72 ± 2,47	0,125	28,87 ± 0,18	25,57 ± 2,03	27,56 ± 0,55	0,185	27,35 ± 0,60	32,63 ± 1,79	31,74 ± 3,14	0,184
APO	Nd	Nd	8,35 ± 0,91	-	2,62 ± 1,27	Nd	2,15 ± 0,66	0,857	2,52 ± 0,41	2,17 ± 0,41	2,62 ± 0,17	0,689	6,37 ± 0,68 ^A	3,12 ± 0,23 ^B	4,53 ± 0,59 ^{AB}	0,007
AE	8,68 ± 0,51 ^A	3,46 ± 0,27 ^B	3,36 ± 0,56 ^B	0,002	9,05 ± 1,41	7,19 ± 0,9	7,18 ± 0,72	0,533	11,95 ± 0,33 ^A	8,44 ± 0,58 ^B	9,03 ± 0,28 ^B	0,007	4,05 ± 0,14	5,21 ± 0,28	4,25 ± 0,57	0,084
AO	32,59 ± 2,96 ^A	3,86 ± 2,31 ^B	4,61 ± 3,09 ^B	0,007	21,22 ± 3,92 ^A	5,44 ± 0,81 ^B	14,4 ± 2,88 ^{AB}	0,016	10,11 ± 0,59 ^A	14,35 ± 1,9 ^{AB}	15,77 ± 0,81 ^B	0,049	32,59 ± 0,93 ^A	27,26 ± 1,04 ^B	33,02 ± 2,39 ^A	0,049
AL	14,11 ± 2,07 ^A	1,97 ± 1,33 ^B	2,73 ± 1,33 ^{AB}	0,004	19,39 ± 2,63 ^A	6,91 ± 1,18 ^B	7,65 ± 2,22 ^B	0,016	10,31 ± 0,36	9,47 ± 0,67	11,9 ± 0,71	0,057	23,65 ± 1,89 ^A	22,33 ± 1,17 ^A	17,59 ± 1,28 ^B	0,005
AAL	4,29 ± 0,97	Nd	Nd	-	0,6 ± 0,04	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-	0,52 ± 0,06 ^A	1,57 ± 0,13 ^B	0,83 ± 0,10 ^{AB}	0,003
ADGL	1,75 ± 0,01	3,04 ± 0,39	9,61 ± 4,16	0,102	0,7 ± 0,14 ^A	3,06 ± 0,27 ^B	2,55 ± 0,44 ^B	0,018	5,06 ± 0,31 ^A	1,96 ± 0,32 ^B	2,25 ± 0,17 ^{AB}	0,006	0,44 ± 0,06	0,47 ± 0,07	0,37 ± 0,05	0,663
AA	2,64 ± 0,07	1,24 ± 0,01	1,19 ± 0,01	0,300	10,34 ± 2,15	10,81 ± 0,85	14,09 ± 2,78	0,762	22,52 ± 1,09 ^A	9,83 ± 0,93 ^B	15,07 ± 1,31 ^B	0,001	Nd	Nd	Nd	-
AEP	Nd	28,99 ± 0,91	30,32 ± 2,58	0,800	Nd	17,79 ± 1,05	20,38 ± 2,45	0,571	0,12 ± 0,02 ^A	8,35 ± 1,05 ^B	Nd	0,036	Nd	Nd	Nd	-
ADP	Nd	14,91 ± 0,22	12,46 ± 0,64	0,133	Nd	Nd	Nd	-	0,39 ± 0,04	Nd	Nd	-	Nd	0,10 ± 0,01	Nd	-
ADH	Nd	Nd	Nd	-	1,65 ± 0,35	1,67 ± 0,14	1,72 ± 0,25	0,971	0,63 ± 0,04	Nd	0,89 ± 0,12	0,057	27,35 ± 0,60	32,63 ± 1,79	31,74 ± 3,14	0,184
Ratio AGPI n-6/n-3	4,31	0,14	0,31		13,52	1,06	1,09		33,23	2,54	32,83		0,86	0,66	0,55	

AG: ácido graso; DO: dieta oliva; AP: ácido palmítico; APO: ácido palmitoleico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α -linolénico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; ADP: ácido docosapentaenoico; ADH: ácido docosaheptaenoico. AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

Los valores se expresan como porcentaje de área (%á) y corresponden a la media \pm EE. Nd: no detectado.

El valor correspondiente al *ratio* AGPI n-6/n-3 es referido a 1 (p. ej. 4,46/1).

*Prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

- Saliva:** los niveles de AP y AE fueron mayores en el grupo DO1 que en los grupos DO15 y DO30 ($p=0,003$ y $p=0,002$, respectivamente) (figura 15). Se encontró una disminución importante del nivel del AO en los grupos DO15 y DO30 con respecto al grupo DO1 ($p=0,007$). El porcentaje de AL fue mayor en el grupo DO1 con respecto al grupo DO15 ($p=0,004$) y al DO30 ($p>0,05$). El AAL solo se detectó en el grupo DO1 mientras que un elevado porcentaje de AEP y ADP, derivados del AAL, fueron observados en los grupos DO15 y DO30. Por otra parte, el ADH no fue detectado en ningún tiempo experimental (tabla 7).

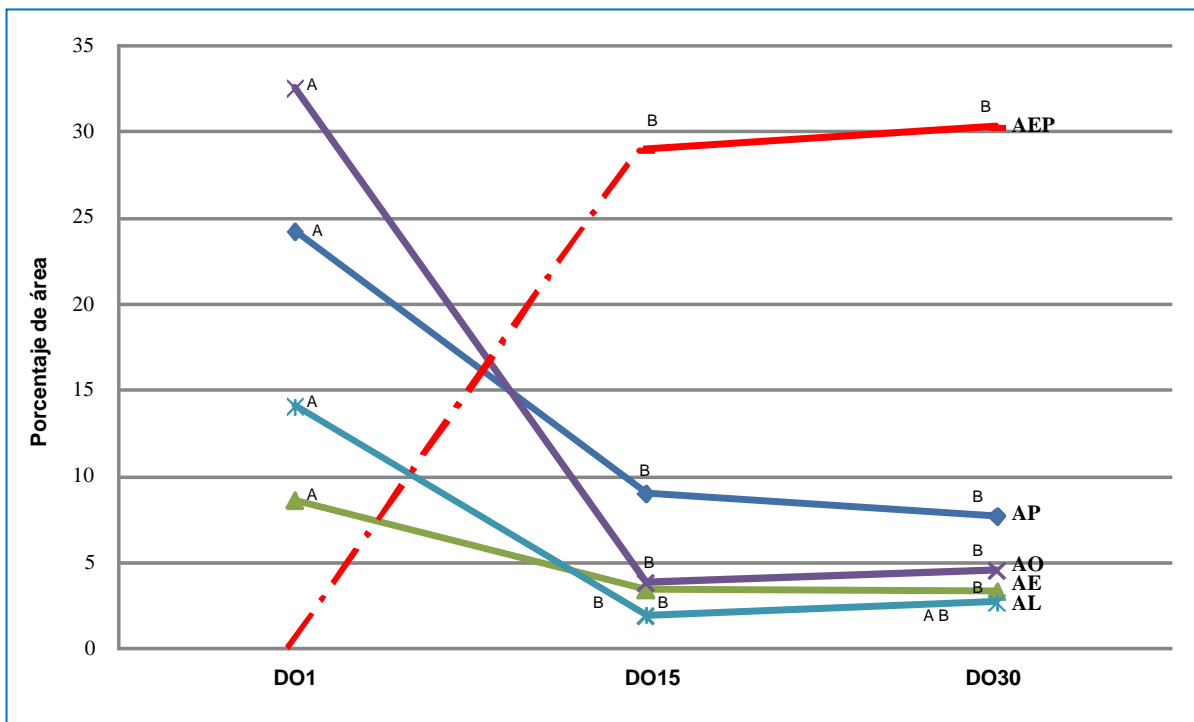


Figura 15. Niveles de AG salivales en grupo DO según tiempos experimentales

DO1: dieta oliva 1 día; DO15: dieta oliva 15 días; DO30: dieta oliva 30 días.

AEP: ácido eicosapentaenoico; AP: ácido palmítico; AO: ácido oleico; AE: ácido esteárico; AL: ácido linoleico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas (A/B $p \leq 0,05$). Además, se incorporan los porcentajes del AEP que fueron elevados a los 15 y 30 días pero no detectados al día 1 de ingesta (línea discontinua), lo que imposibilitó su análisis estadístico.

- Plasma:** el nivel del AO presentó una disminución en el grupo DO15 con respecto a DM1 ($p=0,016$) y un aumento en el grupo DO30 ($p>0,05$) (figura 16). El porcentaje del AL fue mayor en el grupo DO1 comparado con el grupo DO15 y al DO30 ($p=0,016$).

El AAL fue observado sólo en la DO1 mientras que el AEP, un derivado de ese AG, no fue detectado en el día 1, pero mostró valores altos a los 15 y 30 días posteriores a su ingesta. El nivel del ADGL fue mayor en los grupos DO15 y DO30 ($p=0,018$) que en el grupo DO1.

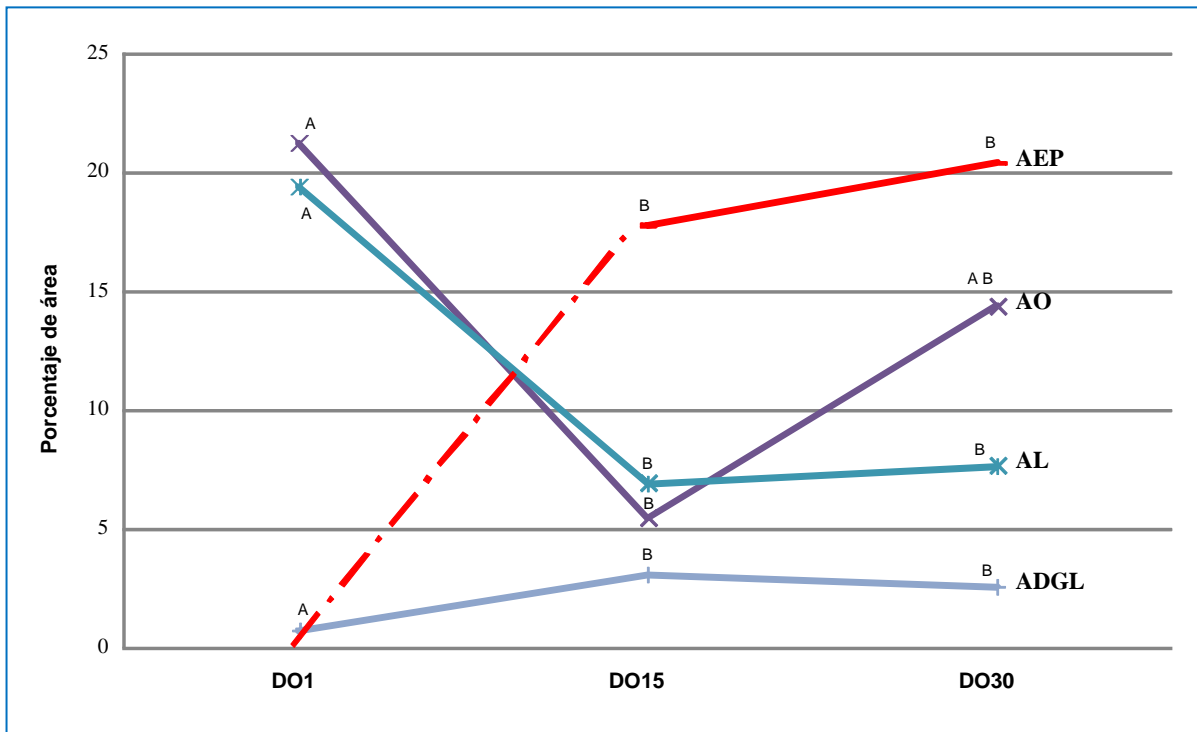


Figura 16. Niveles de AG plasmáticos en grupo DO según tiempos experimentales

DO1: dieta oliva 1 día; DO15: dieta oliva 15 días; DO30: dieta oliva 30 días.

AEP: ácido eicosapentaenoico; AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; ADGL: ácido dihomo- γ -linoléico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas ($A/B p \leq 0,05$). Además, se incorporan los porcentajes del AEP que fueron elevados a los 15 y 30 días pero no detectados al día 1 de ingesta (línea discontinua), lo que imposibilitó su análisis estadístico.

- Glándula submandibular:** el nivel del AE fue mayor en el grupo DO1 que en los grupos DO15 y DO30 ($p=0,007$) (figura 17). Se observó un incremento en los niveles del AO en los grupos DO15 y DO30 ($p=0,049$) con respecto al grupo DO1. Por otra parte, el AAL no fue detectado en ninguno de los tiempos experimentales. El grupo DO15 presentó valores menores de ADGL comparado con los del grupo DO1 ($p=0,006$), pero no registró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los del grupo DO30 ($p > 0,05$). El porcentaje del AA fue mayor en el grupo DO1 que en

los grupos DO15 y DO30 ($p=0,001$), aunque la diferencia fue menor con respecto a este último debido a un ligero incremento en su valor medio. El valor del AEP aumentó del día 1 al día 15 ($p=0,036$), pero no se registró su presencia a los 30 días posteriores a su ingesta. El ADP fue detectado solamente en el grupo DO1 mientras que el ADH fue registrado en DO1 y DO30, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$) (tabla 7).

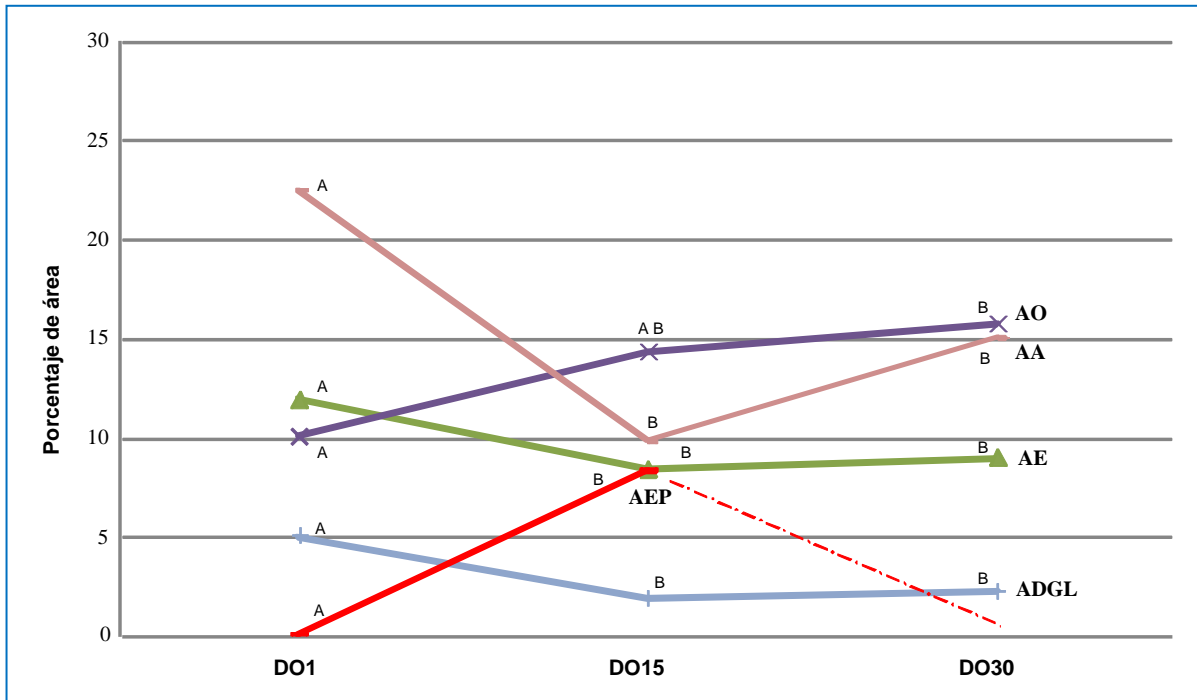


Figura 17. Niveles de AG en glándula submandibular en grupo DO según tiempos experimentales

DO1: dieta oliva 1 día; DO15: dieta oliva 15 días; DO30: dieta oliva 30 días.

AO: ácido oleico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; AE: ácido esteárico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas ($^{A/B} p \leq 0,05$). Además, se incorporan los porcentajes del AEP que fueron elevados a los 15 días pero no detectados a los 30 días de ingesta (línea discontinua), lo que imposibilitó su análisis estadístico.

- *Tejido adiposo periglandular*: se observó una disminución en los niveles del APO y AO en el grupo DO15 al compararlo con el grupo DO1 ($p=0,007$ y $p=0,049$, respectivamente) (figura 18) y un incremento en el grupo DO30 ($p>0,05$). El AL

mostró una disminución en el grupo DO30 comparado con DO1 ($p=0,005$). El grupo DO15 presentó un incremento del AAL con respecto al grupo DO1 ($p=0,003$), pero no se registró una diferencia significativa con el grupo DO30. Los AA y AEP no fueron observados en ninguno de los tiempos experimentales, mientras que el ADP fue detectado a los 15 días de ingesta pero con un bajo porcentaje (tabla 7).

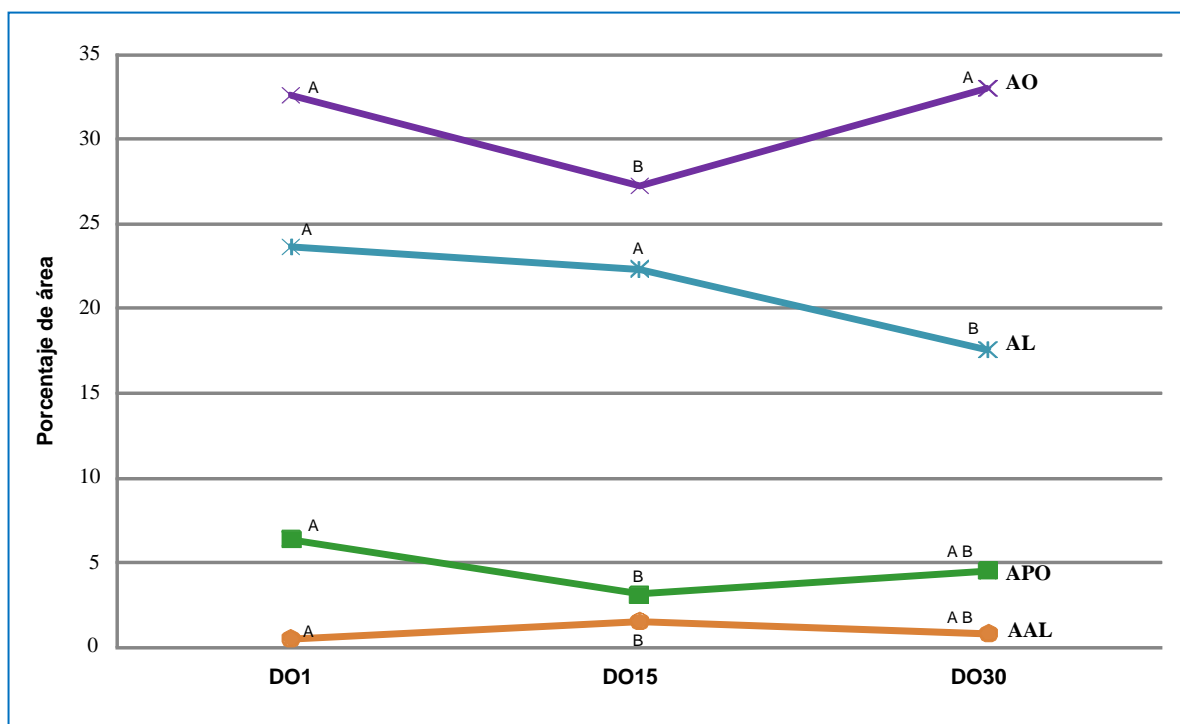


Figura 18. Niveles de AG en tejido adiposo periglandular en grupo DO según tiempos experimentales.

DO1: dieta oliva 1 día; DO15: dieta oliva 15 días; DO30: dieta oliva 30 días.

AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; APO: ácido palmitoleico; AAL: ácido α -linolénico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas ($^{A/B} p \leq 0,05$).

En la tabla 8 se presentan las correlaciones significativas observadas entre los AG de saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular en el grupo experimental DO según el tiempo de ingesta de lípidos dietarios.

Tabla 8. Asociación entre AG salivales, plasmáticos, glandulares y adiposos en el grupo DO según el tiempo de ingesta

	AO Plasma DO1	AA Saliva DO1	AO Saliva DO1	AAL Saliva DO1	AL Saliva DO1	AO Plasma DO15	AL Plasma DO15	AEP Saliva DO15	AEP Plasma DO15	AA Saliva DO15	AA Plasma DO15	AO Plasma DO30	AL Plasma DO30	AA Plasma DO30	AA Glándula DO30	ADH Glándula DO30	AO TAP DO30	AA TAP DO30
AO Plasma DO1	1	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA Saliva DO1	-	1	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AO Saliva DO1	0,88	-	1	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	0,05
AAL Saliva DO1	-	-0,97	-0,91	1	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL Saliva DO1	-	-	-	0,89	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AO Plasma DO15	-	-	-	-	-	1	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL Plasma DO15	-	-	-	-	-	0,87	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AEP Saliva DO15	-	-	-	-	-	-	-	1	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
AEP Plasma DO15	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-
AA Saliva DO15	-	-	-	-	-	-	-	-0,98	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
AA Plasma DO15	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,87	-	1	-	-	-	-	-	-	-
AO Plasma DO30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,04	-	-	-	0,01	-
AL Plasma DO30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,96	1	0,02	-	-	0,01	-
AA Plasma DO30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,98	1	0,05	-	-	-
AA Glándula DO30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,95	1	-	-	-
ADH Glándula DO30	-	-	0,99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
AO TAP DO30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,97	0,99	-	-	-	1	-
AA TAP DO30	-	-	0,94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

AG: ácidos grasos; DO: dieta oliva; AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; ADH: ácido docosahexaenoico.

DO1: dieta oliva 1 día; DO15: dieta oliva 15 días; DO30: dieta oliva 30 días. TAP: tejido adiposo periglandular.

Prueba de correlación de Spearman ($p \leq 0,05$).

También se observaron otras correlaciones (moderada, fuerte y muy fuerte) en las distintas muestras analizadas, pero estas no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$):

- En el grupo DO1 se observaron: ácido oleico (S y GS= -0,74); ácido linoleico (S y GS= 0,83; P y GS= 0,89).
- En el grupo DO15: ácido oleico (S y P= 0,91; P y GS= -0,65); ácido linoleico (S y TAP= -0,59; P y GS= -0,58; P y TAP= 0,55); ácido α -linolénico (S y GS= -0,67).
- En el grupo DO30: ácido oleico (S y P= 0,51; S y GS= 0,61; S y TAP=0,57; P y GS= -0,73; P y TAP= 0,97); ácido linoleico (S y P= 0,86; S y GS= 0,98; P y GS= 0,72; P y TAP= 0,72).

4.1.3. Perfil de AG del grupo DCh

El perfil de AG de saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular de la dieta chíá, según los diferentes tiempos experimentales, se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Perfil de AG en fluidos y tejidos del grupo DCh según los tiempos experimentales

AG	Saliva				Plasma				Glándula submandibular				Tejido adiposo periglandular			
	1 día	15 días	30 días	p*	1 día	15 días	30 días	p*	1 día	15 días	30 días	p*	1 día	15 días	30 días	p*
AP	17,09 ± 3,91 ^A	8,43 ± 1,16 ^B	8,09 ± 2,75 ^B	0,040	23,23 ± 1,85 ^A	14,28 ± 1,31 ^B	19,2 ± 2,31 ^{AB}	0,006	29,12 ± 0,47 ^A	23,99 ± 1,15 ^B	26,5 ± 1,56 ^{AB}	0,015	31,2 ± 2,21	32,29 ± 4,52	30,22 ± 3,74	0,873
APO	4,06 ± 0,01	Nd	5,18 ± 0,01	1,000	1,93 ± 0,55	Nd	1,4 ± 0,01	0,798	2,38 ± 0,11	2,33 ± 0,32	2,62 ± 0,49	0,585	3,52 ± 0,28	3,08 ± 0,41	4,96 ± 1,01	0,248
AE	4,74 ± 0,79	3,36 ± 0,41	3,13 ± 0,57	0,249	11,06 ± 0,89 ^A	7,35 ± 0,98 ^B	9,1 ± 0,46 ^{AB}	0,014	10,88 ± 0,47 ^A	8,73 ± 0,28 ^B	10,66 ± 0,33 ^A	0,021	4,47 ± 0,16	5,37 ± 0,83	4,16 ± 0,33	0,370
AO	13,9 ± 4,31	1,19 ± 0,36	4,93 ± 2,27	0,077	8,67 ± 0,69 ^A	3,02 ± 0,43 ^B	6,39 ± 1,37 ^{AB}	0,001	12,97 ± 0,71	10,57 ± 1,05	10,42 ± 0,73	0,066	25,57 ± 0,81 ^A	20,65 ± 1,61 ^B	22,3 ± 1,22 ^{AB}	0,044
AL	14,07 ± 6,34	3,06 ± 2,24	4,66 ± 1,93	0,306	14,42 ± 1,01 ^A	7,58 ± 1,61 ^B	8,49 ± 3,18 ^{AB}	0,010	12,4 ± 0,81 ^{AB}	10,82 ± 0,36 ^A	15,5 ± 1,05 ^B	0,001	27,78 ± 1,56	26,19 ± 2,39	19,57 ± 3,86	0,269
AAL	0,87 ± 0,02 ^A	4,83 ± 0,35 ^B	5,25 ± 1,41 ^B	0,013	2,71 ± 0,53 ^A	Nd	4,13 ± 0,11 ^B	0,036	0,81 ± 0,15 ^A	1,3 ± 0,37 ^{AB}	3 ± 0,59 ^B	0,007	2,97 ± 0,28 ^A	6,83 ± 0,65 ^B	13,43 ± 1,57 ^B	0,003
ADGL	Nd	3,19 ± 0,83	7,5 ± 2,03	0,114	3,21 ± 0,71	3,25 ± 0,66	3,9 ± 0,28	0,794	4,13 ± 0,19 ^A	1,6 ± 0,24 ^B	1,98 ± 0,09 ^{AB}	0,002	0,53 ± 0,05	0,42 ± 0,05	0,32 ± 0,08	0,135
AA	Nd	Nd	Nd	-	18,38 ± 2,23 ^A	7,05 ± 0,33 ^B	9,66 ± 2,05 ^{AB}	0,009	16,42 ± 1,11 ^A	7,88 ± 0,62 ^B	9,76 ± 0,12 ^{AB}	0,003	Nd	0,12 ± 0,01	Nd	-
AEP	3,91 ± 1,27 ^A	25,21 ± 3,34 ^B	31,51 ± 0,01 ^B	0,041	2,38 ± 0,12 ^A	22 ± 1,74 ^B	23,06 ± 0,01 ^B	0,041	0,81 ± 0,09 ^A	11,8 ± 0,52 ^B	4,08 ± 0,56 ^{AB}	0,001	0,06 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,078
ADP	Nd	13,3 ± 2,92	13,64 ± 0,01	1,000	Nd	Nd	Nd	-	0,48 ± 0,06 ^A	Nd	1,28 ± 0,11 ^B	0,016	0,07 ± 0,02 ^A	0,1 ± 0,01 ^{AB}	0,13 ± 0,01 ^B	0,041
ADH	2,87 ± 0,01	Nd	Nd	-	1,96 ± 0,18 ^A	1,05 ± 0,21 ^B	1,59 ± 0,02 ^{AB}	0,005	0,84 ± 0,11	Nd	0,77 ± 0,11	0,683	31,2 ± 2,21	32,29 ± 4,52	30,22 ± 3,74	0,873
Ratio AGPI n-6/n-3	1,82	0,14	0,24		5,10	0,77	0,76		11,20	1,54	2,98		0,82	0,67	0,45	

AG: ácido graso; DCh: dieta chía; AP: ácido palmítico; APO: ácido palmitoleico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α-linolénico; ADGL: ácido dihomo-γ-linolénico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; ADP: ácido docosapentaenoico; ADH: ácido docosahexaenoico. AGPI: ácidos grasos poliinsaturados.

Los valores se expresan como porcentaje de área (%á) y corresponden a la media ± EE. Nd: no detectado.

El valor correspondiente al ratio AGPI n-6/n-3 es referido a 1 (p. ej. 4,46/1).

*Prueba de Kruskal Wallis. Letras distintas indican diferencias significativas (^{A/B} p ≤ 0,05).

- Saliva:** los niveles de AAL y AEP fueron mayores en los grupos DCh15 y DCh30 que en el grupo DCh1 ($p=0,013$ y $p=0,041$, respectivamente) (figura 19). Se observó una disminución en el nivel del AP en los grupos DCh15 y DCh30 con respecto al grupo DCh1 ($p=0,040$). El ADH fue detectado solamente en el grupo DCh1 mientras que altos valores del ADP fueron registrados en DCh15 y DCh30, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$). Por otra parte, no se detectó AA en ninguno de los tiempos experimentales (tabla 9).

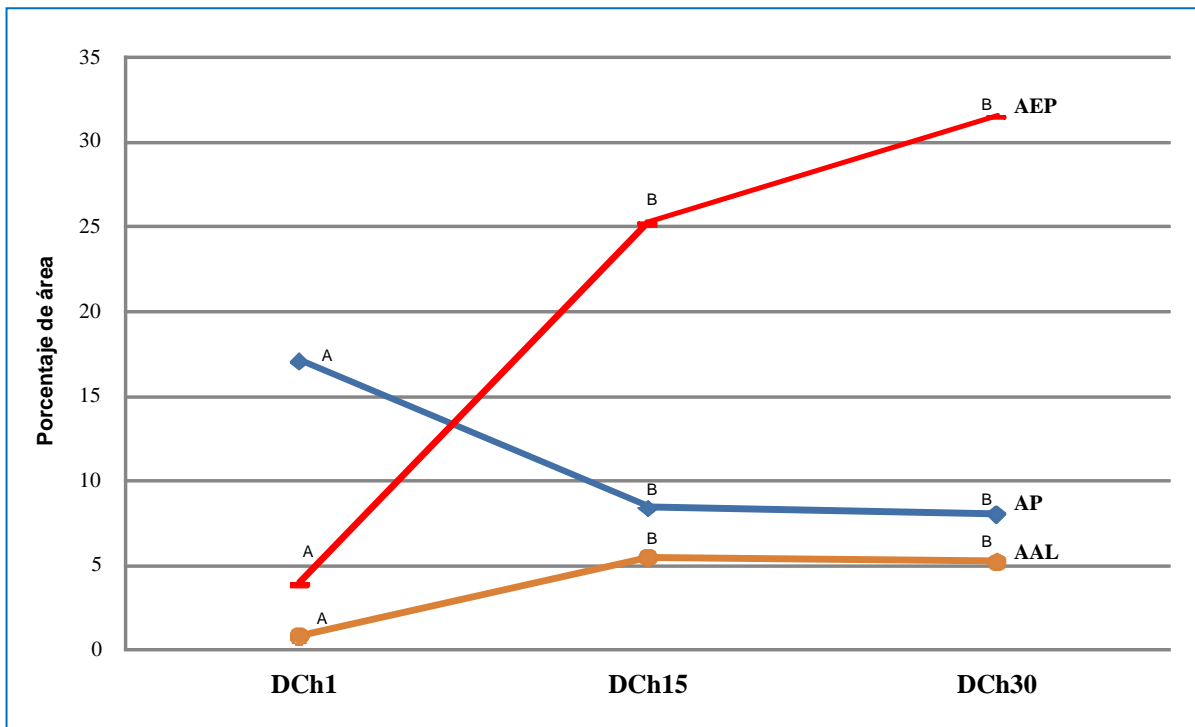


Figura 19. Niveles de AG salivales en grupo DCh según tiempos experimentales

DCh1: dieta chíá 1 día; DCh15: dieta chíá 15 días; DCh30: dieta chíá 30 días.

AEP: ácido eicosapentaenoico; AP: ácido palmítico; AAL: ácido α -linolénico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas ($A^B p \leq 0,05$).

- Plasma:** los niveles de AAL y AEP presentaron un incremento significativo en el grupo DCh30 respecto al grupo DCh1 ($p=0,036$ y $p=0,041$, respectivamente) (figura 20). Por otro lado, los porcentajes de AP, AE, AO, AL, AA fueron mayores en el grupo DCh1 que en DCh15 ($p=0,006$; $p=0,014$; $p=0,001$; $p=0,010$ y $p=0,009$,

respectivamente), pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el grupo DCh30.

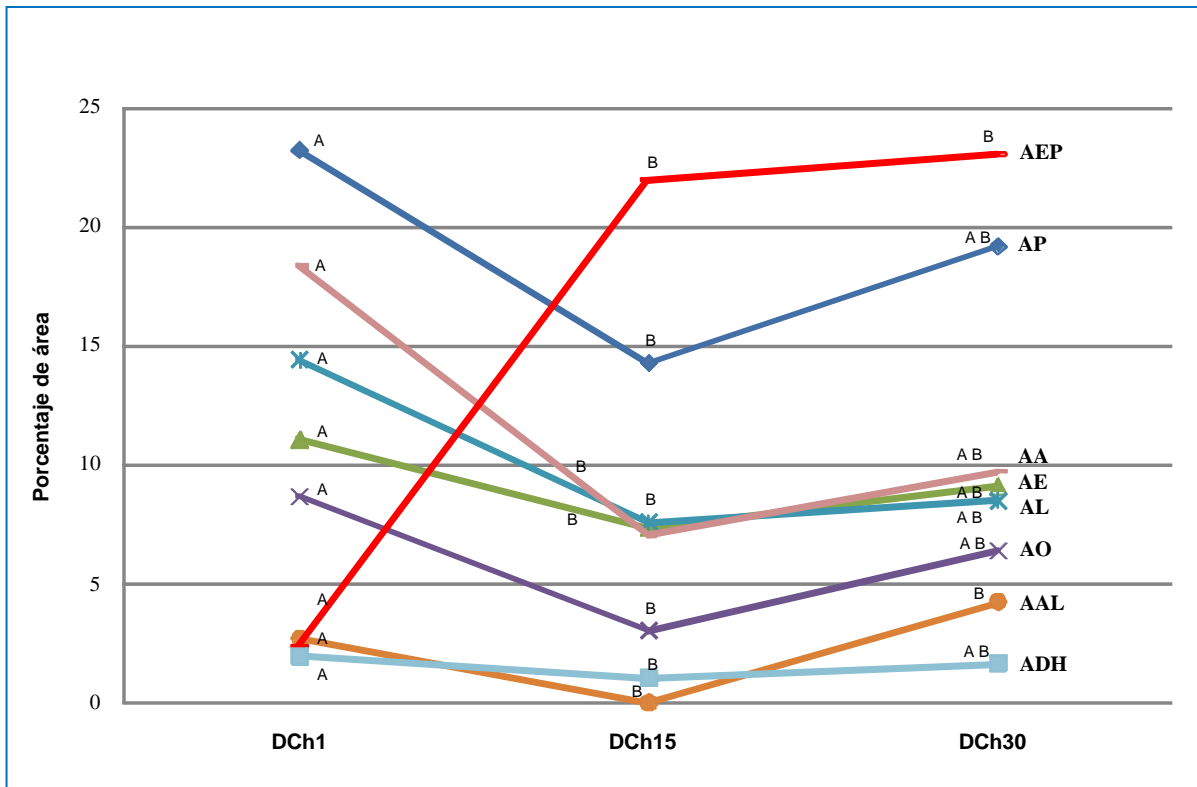


Figura 20. Niveles de AG plasmáticos en grupo DCh según tiempos experimentales

DCh1: dieta chíá 1 día; DCh15: dieta chíá 15 días; DCh30: dieta chíá 30 días.

AEP: ácido eicosapentaenoico; AP: ácido palmítico; AA: ácido araquidónico; AE: ácido esteárico; AL: ácido linoleico; AO: ácido oleico; AAL: ácido α -linolénico; ADH: ácido docosahexaenoico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

- Glándula submandibular:** se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles de AAL y ADP entre los grupos DCh1 y DCh30, con valores superiores en este último grupo ($p=0,007$ y $p=0,016$, respectivamente) (figura 21). El porcentaje del AEP mostró un incremento significativo en el grupo DCh15 con respecto al grupo DCh1 ($p=0,001$) pero no en relación con DCh30 ($p>0,05$). Se observó un aumento en el nivel del AL en el grupo DCh30 con respecto al grupo DCh15 ($p=0,001$). También se detectó una disminución de los porcentajes del AP, AE, ADGL y del AA a los 15 días posteriores a su ingesta dietaria con respecto al día 1

($p=0,015$; $p=0,021$; $p=0,002$ y $p=0,003$, respectivamente), pero al compararlos con el grupo DCh30 no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

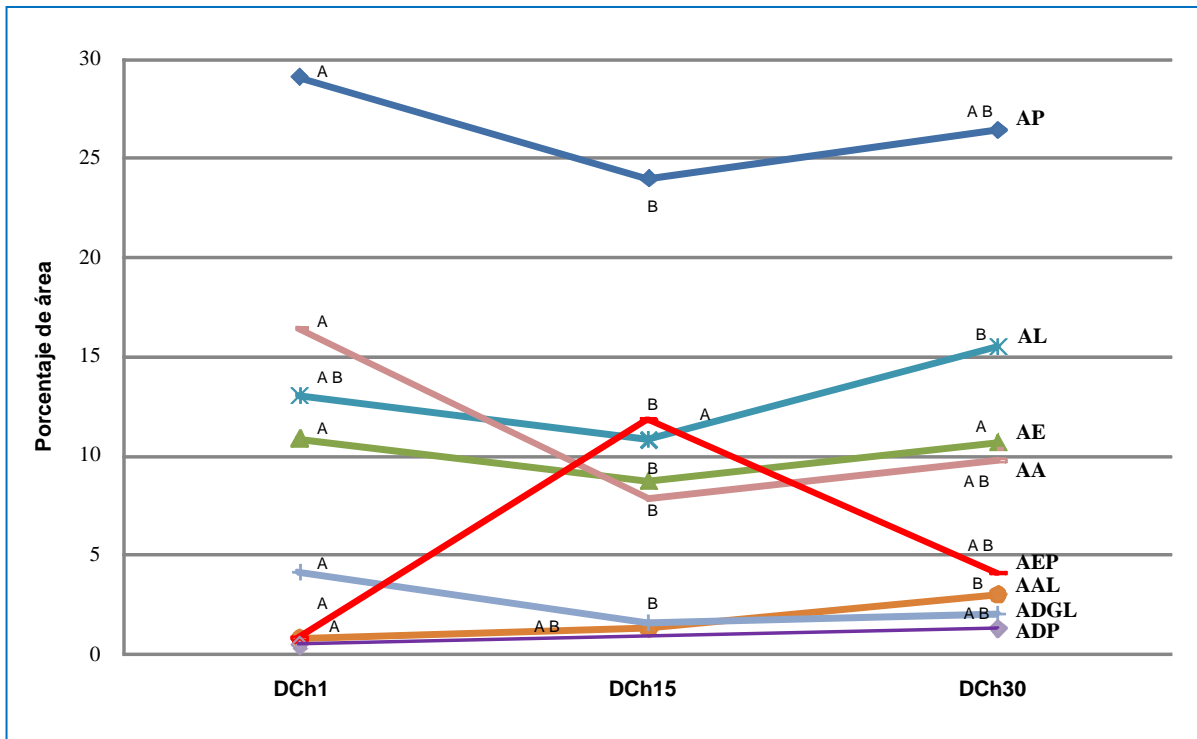


Figura 21. Niveles de AG en glándula submandibular en grupo DCh según tiempos experimentales

DCh1: dieta chíá 1 día; DCh15: dieta chíá 15 días; DCh30: dieta chíá 30 días.

AP: ácido palmítico; AL: ácido linoleico; AE: ácido esteárico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; AAL: ácido α -linolénico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico; ADP: ácido docosapentaenoico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas ($^{A/B} p \leq 0,05$).

- Tejido adiposo periglandular:** se observó que los porcentajes de AAL y ADP fueron significativamente mayores en el grupo DCh30 en comparación con el grupo DCh1 ($p=0,003$ y $p=0,041$, respectivamente) (figura 22). Además, se encontraron bajos niveles de AEP en todos los tiempos experimentales de este grupo dietario. El porcentaje del AO mostró una disminución en el grupo DCh15 con respecto al grupo DCh1 ($p=0,044$). Un mínimo porcentaje del AA fue detectado solo en el grupo DCh15 mientras que altos valores del ADH fueron registrados en los tres tiempos experimentales, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

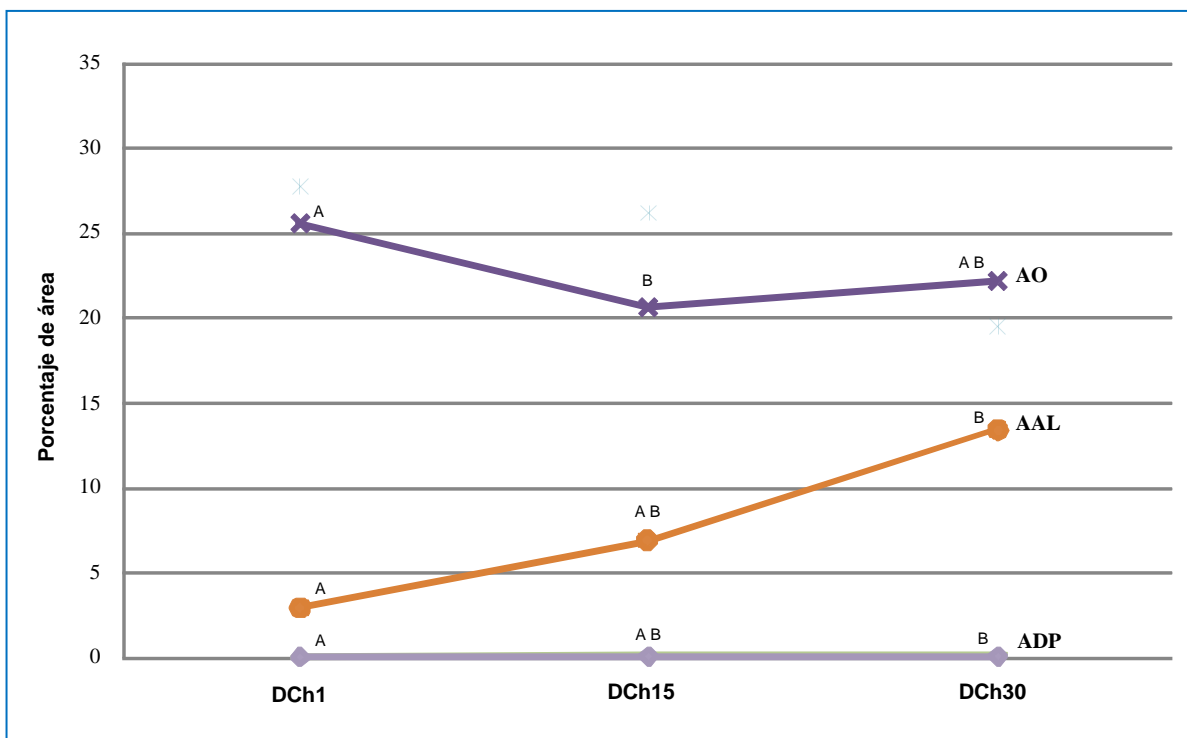


Figura 22. Nivel de AG en tejido adiposo periglandular en grupo DCh según tiempos experimentales

DCh1: dieta chía 1 día; DCh15: dieta chía 15 días; DCh30: dieta chía 30 días.

AO: ácido oleico; AAL: ácido α -linolénico; ADP: ácido docosapentaenoico.

Se incluyen en el gráfico **sólo** los AG que presentaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

En la tabla 10 se presentan las correlaciones significativas observadas entre los AG de saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular del grupo experimental DCh según el tiempo de ingesta de los lípidos dietarios.

Tabla 10. Asociación entre AG salivales, plasmáticos, glandulares y tisulares en el grupo DCh según el tiempo de ingesta

	AL Saliva DCh1	AA Saliva DCh1	AO Glándula DCh1	AL Plasma DCh1	AA Plasma DCh1	AAL Plasma DCh1	AL Saliva DCh15	AEP Saliva DCh15	AO TAP DCh15	AL TAP DCh15	AO Glándula DCh15	AAL TAP DCh15	AAL Saliva DCh30	AL Saliva DCh30	AO Plasma DCh30	EPA Glándula DCh30	AAL TAP DCh30	AO Glándula DCh30	
AL Saliva DCh1	1	0,03	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA Saliva DCh1	-0,99	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AO Glándula DCh1	0,99	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL Plasma DCh1	-	-	-	1	0,01	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA Plasma DCh1	-	-	-	0,99	1	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AAL Plasma DCh1	-	-	-	-0,97	-0,98	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL Saliva DCh15	-	-	-	-	-	-	1	0,02	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AEP Saliva DCh15	-	-	-	-	-	-	-0,96	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AO TAP DCh15	-	-	-	-	-	-	-0,97	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AL TAP DCh15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,02	0,01	-	-	-	-	-	-	-
AO Glándula DCh15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,93	1	-	-	-	-	-	-	-	-
AAL TAP DCh15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,97	-	1	-	-	-	-	-	-	-
AAL Saliva DCh30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,02	0,02	-	-	-	-
AL Saliva DCh30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,98	1	-	-	-	-	-
AO Plasma DCh30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0,99	-	1	0,04	-	-	-
EPA Glándula DCh30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,99	1	-	-	-
AAL TAP DCh30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,03	-
AO Glándula DCh30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,97	1	-

AG: ácidos grasos; DCh: dieta chía; AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico. DCh1: dieta chía 1 día; DCh15: dieta chía 15 días; DCh30: dieta chía 30 días. TAP: tejido adiposo periglandular. Prueba de correlación de Spearman ($p \leq 0,05$)

También se observaron otras correlaciones (moderada, fuerte y muy fuerte), aunque no estadísticamente significativas, en las distintas muestras analizadas ($p > 0.05$):

- En el grupo DCh1 se observaron: ácido oleico (S y P= 0,74; S y GS= 0,64; PGS= -0,55); ácido linoleico (S y P= 0,59; S y GS= 0,99; P y GS= 0,55); ácido α -linolénico (S y P= -0,91; S y GS= -0,77; P y GS= -0,5; P y TAP= 0,65).
- En el grupo DCh15: ácido oleico (S y G= -0,56); ácido linoleico (S y P= -0,92; S y GS= 0,67; S y TAP= -0,97; P y TAP= 0,67); ácido α -linolénico (S y GS= 0,98; S y TAP= -0,81; P y GS= -0,84; P y TAP= 0,63).
- En el grupo DCh30 se observaron: ácido oleico (S y P= 0,79; S y GS= 0,94; S y TAP= 0,99; P y GS= -0,99); ácido linoleico (S y P= 0,95; S y GS= 0,52; S y TAP= -0,89; P y GS= 0,99; P y TAP= -0,99); ácido α -linolénico (P y TAP= 0,81).

4.1.4. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 1 día de ingesta

La comparación de los principales AG y sus derivados metabólicos, observados en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular, entre los grupos dietarios y luego de 1 día de ingesta se presentan en la tabla 11.

Tabla 11. Comparación de AG entre grupos dietarios y luego de 1 día de ingesta

AG	Saliva			Plasma			Glándula submandibular			Tejido adiposo periglandular		
	DM	DO	DCh	DM	DO	DCh	DM	DO	DCh	DM	DO	DCh
AO	18,8±3,37 ^A	32,5±2,96 ^B	13,9±4,31 ^A	10,7±2,11 ^A	21,2±3,92 ^B	8,6±0,69 ^A	11,3±1,09	10,1±0,59	12,9±0,71	34,2±0,77 ^A	32,6±0,93 ^A	25,5±0,81 ^B
AL	10,3±1,36	14,1±2,07	14,1±6,34	19,4±2,15	19,4±2,63	14,4±1,01	12,9±1,24	10,3±0,36	12,4±0,81	21,7±1,33 ^A	23,6±1,89 ^A	27,7±1,56 ^B
AAL	4,2±0,97 ^A	4,3±0,97 ^A	0,8±0,02 ^B	0,7±0,01 ^A	0,6±0,04 ^A	2,7±0,53 ^B	Nd	Nd	0,8±0,15*	0,34±0,06 ^A	0,5±0,06 ^A	2,9±0,28 ^B
ADGL	3,6±1,01 ^A	1,7±0,01 ^B	Nd	1,8±0,33	0,7±0,14	3,2±0,71	3,8±0,31 ^A	5,1±0,31 ^B	4,1±0,19 ^A	0,4±0,07	0,4±0,06	0,5±0,05
AA	Nd	2,6±0,07	Nd	18,9±2,12 ^A	10,3±2,15 ^B	18,3±2,23 ^A	23,8±1,01 ^A	22,5±1,09 ^A	6,4±1,11 ^B	Nd	Nd	Nd
AEP	Nd	Nd	3,9±1,27*	Nd	Nd	2,3±0,12*	Nd	0,1±0,02 ^A	0,8±0,09 ^B	Nd	Nd	0,06±0,01*
ADP	Nd	Nd	Nd	3,3±0,01*	Nd	Nd	0,5±0,17	0,3±0,04	0,5±0,06	Nd	Nd	0,1±0,02*
ADH	Nd	Nd	2,8±0,01*	1,38±0,16	1,6±0,35	1,9±0,18	0,6±0,04 ^A	0,6±0,04 ^A	0,8±0,11 ^B	27,5±0,21	27,3±0,60	31,2±2,21

AG: ácido graso; DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chía.

AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α -linolénico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; ADP: ácido docosapentaenoico; ADH: ácido docosahexaenoico.

Los valores se expresan como porcentaje de área (%á) y corresponden a la media \pm EE. Nd: no detectado.

Prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

*Valores únicos que no pueden compararse con los de otros grupos.

- *Saliva*: el nivel de AO en la DO fue mayor con respecto al de los grupos DM y DCh ($p=0,009$). El AL mostró un porcentaje menor en el grupo DM al compararlo con los grupos DO y DCh ($p > 0,05$) mientras que el ADGL fue mayor en DM que en DO y esa diferencia fue estadísticamente significativa. El AA, derivado del AL, fue observado sólo en el grupo DO. El AAL presentó un valor mayor en DM y DO con respecto a DCh ($p=0,026$), en tanto que sus derivados metabólicos, los AEP y ADH, tuvieron un valor alto en el grupo DCh y no fueron detectados en DM y DO. El ADP no fue detectado en ninguno de los grupos dietarios.

- *Plasma*: el AO presentó un mayor nivel en DO con respecto a DM y DCh ($p=0,011$). El porcentaje del AAL fue más alto en DCh que en DO ($p=0,05$) y DM. El AA tuvo un valor mayor en DM y DCh que en DO ($p=0,037$). El AEP fue detectado solamente -y con valores elevados- en DCh mientras que el ADH fue observado en las tres dietas ($p>0,05$), pero con un mayor porcentaje en DCh.
- *Glándula submandibular*: el AAL fue encontrado sólo en DCh, aunque en un bajo porcentaje. El valor de ADGL en DO fue mayor a DM y DCh ($p=0,031$). El AA fue mayor en DM y DO con respecto a DCh ($p<0,001$). Se observó un porcentaje ligeramente mayor de AEP y ADH en el grupo DCh en comparación con DM y DO ($p=0,006$ y $p=0,05$, respectivamente).
- *Tejido adiposo periglandular*: el nivel de AO fue mayor en DO y DM que en DCh ($p<0,001$) y el de AL fue más alto en DCh con respecto a DM ($p=0,05$). Los porcentajes de AAL y ADH fueron mayores en DCh que en DM y DO, aunque esa diferencia fue estadísticamente significativa sólo en el AAL ($p<0,001$). El AEP y el ADP fueron detectados en niveles bajos sólo en el grupo DCh, mientras que el AA no fue observado en ninguno de los tres grupos.

4.1.5. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 15 días de ingesta

La comparación de los principales AG y sus derivados metabólicos, observados en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular, entre los grupos dietarios y luego de 15 días de ingesta se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 15 días de ingesta

AG	Saliva			Plasma			Glándula submandibular			Tejido adiposo periglandular		
	DM	DO	DCh	DM	DO	DCh	DM	DO	DCh	DM	DO	DCh
AO	0,6±0,14	3,86±2,83	1,2±0,36	4,1±0,51	5,4±0,81	3,0±0,43	9,9±1,09 ^A	14,3±1,9 ^B	10,5±1,05 ^A	23,5±1,52 ^A	27,2±1,04 ^B	20,6±1,61 ^A
AL	2,9±2,13	1,9±1,33	3,1±2,24	9,1±0,51	6,9±1,18	7,6±1,61	9,8±0,96	9,4±0,67	10,8±0,36	28,6±1,61 ^B	22,3±1,17 ^A	26,2±2,39 ^B
AAL	0,6±0,35 ^A	Nd	4,8±0,35 ^B	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	1,3±0,37*	1,7±0,18 ^A	1,6±0,13 ^A	6,8±0,65 ^B
ADGL	3,6±0,51	3,1±0,39	3,2±0,83	2,1±0,12	3,1±0,27	3,2±0,66	1,7±0,15	1,9±0,32	1,6±0,24	0,6±0,06	0,5±0,07	0,4±0,05
AA	Nd	1,2±0,01	Nd	12,5±0,71 ^A	10,8±0,85 ^B	7,1±0,33 ^B	10,7±1,21	9,8±0,93	7,8±0,62	Nd	Nd	0,1±0,01
AEP	28,2±3,45	28,9±0,91	25,2±3,34	16,1±1,09 ^A	17,8±1,05 ^A	22,1±1,7 ^B	8,9±0,79 ^A	8,3±1,05 ^A	11,8±0,52 ^B	Nd	Nd	0,2±0,01
ADP	13,5±1,43	14,9±0,22	13,3±2,92	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0,1±0,03	0,1±0,01	0,1±0,01
ADH	1,3±0,01	Nd	Nd	1,2±0,36	1,6±0,14	1,1±0,21	Nd	Nd	Nd	32,1±2,37	32,6±1,79	32,3±4,52

AG: ácido graso; DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chía.

AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α -linolénico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; ADP: ácido docosapentaenoico; ADH: ácido docosahexaenoico.

Los valores se expresan como porcentaje de área (%á) y corresponden a la media \pm EE. Nd: no detectado.

Prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

*Valor único que no puede compararse con los de otros grupos.

- *Saliva*: el porcentaje del AO fue mayor en DO que en DM y DCh pero esa diferencia no fue estadísticamente significativa. El nivel del AAL fue más alto en el grupo DCh con respecto a DM ($p=0,002$), mientras que el AEP presentó un valor inferior en DCh que en DO y DM ($p>0,05$).
- *Plasma*: los niveles de AO y AL fueron mayores en DO y DM, respectivamente, aunque esas diferencias no fueron significativas. Los AAL y ADP no fueron detectados en ninguno de los tres grupos dietarios. Un elevado porcentaje del AA fue observado en el grupo DM en comparación con DCh ($p=0,037$) y DO ($p<0,045$). Por otra parte, el AEP mostró un valor más alto en DCh que en DM ($p=0,029$) y DO ($p=0,04$).
- *Glándula submandibular*: el nivel del AO fue mayor en DO que en DM ($p=0,05$) y DCh ($p>0,05$). El AAL fue detectado solamente en el grupo DCh mientras que el AEP se observó en los tres grupos dietarios, con un valor mayor en DCh ($p=0,023$). El AA fue más alto en DM al compararlo con DO y DCh ($p>0,05$).

- *Tejido adiposo periglandular*: se encontró un nivel más alto de AO en DO con respecto a DCh ($p=0,019$), mientras que el de AL fue más elevado en DM que en DO ($p=0,05$). El porcentaje de AAL fue mayor en DCh que en DM y DO ($p=0,001$). Los AA y AEP sólo fueron detectados en DCh. Por otra parte, el ADH presentó valores muy altos en los tres grupos dietarios, pero las diferencias entre ellos no fueron estadísticamente significativas.

4.1.6. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 30 días de ingesta

La comparación de los principales AG y sus derivados metabólicos, observados en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular, entre los grupos dietarios y luego de 30 días de ingesta se presentan en la tabla 13.

Tabla 13. Comparación de AG entre grupos dietarios luego de 30 días de ingesta

AG	Saliva			Plasma			Glándula submandibular			Tejido adiposo periglandular		
	DM	DO	DCh	DM	DO	DCh	DM	DO	DCh	DM	DO	DCh
AO	2,3±1,15	4,6±3,09	4,9±2,27	6,3±2,24 ^A	14,4±2,88 ^B	6,4±1,37 ^A	10,9±1,31 ^A	15,7±0,81 ^B	10,4±0,73 ^A	26,1±1,1 ^A	33,1±2,39 ^B	22,3±1,22 ^A
AL	2,6±0,81	2,7±1,33	4,6±1,93	8,7±2,72	7,6±2,22	8,5±3,18	11,8±1,74	11,9±0,71	15,5±1,05	27,4±2,4 ^A	17,6±1,28 ^B	19,5±3,86 ^B
AAL	Nd	Nd	5,2±1,41*	Nd	Nd	4,1±0,11*	Nd	Nd	3±0,59*	1,1±0,11 ^A	0,8±0,10 ^A	13,4±1,57 ^B
ADGL	6,2±1,83	9,6±4,16	7,5±2,03	3,7±0,58	2,5±0,44	3,9±0,28	2,5±0,21	2,2±0,17	1,9±0,09	0,5±0,13	0,3±0,05	0,3±0,08
AA	2,8±0,01	1,2±0,01	Nd	16,1±2,81	14,1±2,78	9,6±2,05	14,1±1,7 ^A	15,1±1,31 ^A	9,7±0,12 ^B	Nd	Nd	Nd
AEP	31,4±2,75	30,3±2,58	31,5±0,01	20,8±0,99	20,3±2,45	23,1±0,01	Nd	Nd	4,1±0,56*	Nd	Nd	0,2±0,03*
ADP	14,5±2,52	12,4±0,64	13,6±0,01	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	1,3±0,11*	Nd	Nd	0,1±0,01*
ADH	Nd	Nd	Nd	1,3±0,01	1,7±0,25	1,6±0,02	0,5±0,13	0,9±0,12	0,7±0,11	29,7±2,46	31,7±3,14	30,2±3,74

AG: ácido graso; DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chía.

AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α -linolénico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; ADP: ácido docosapentaenoico; ADH: ácido docosahexaenoico.

Los valores se expresan como porcentaje de área (%á) y corresponden a la media \pm EE. Nd: no detectado.

Prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

*Valores únicos que no pueden compararse con los de otros grupos.

- *Saliva*: los niveles de AO y AL fueron mayores en DCh que en DM y DO, aunque esas diferencias no fueron estadísticamente significativas. El AAL fue detectado solo en DCh y en un alto porcentaje. Se observó un mayor valor de AA en DM con respecto a

DO y éste no fue detectado en DCh. Los porcentajes de AEP y ADP fueron elevados pero similares en los tres grupos dietarios ($p>0,05$).

- *Plasma*: el AO fue más alto en DO que en DM y DCh ($p=0,041$). El AL fue ligeramente mayor en DM que en DO y DCh ($p>0,05$). Se observó un alto porcentaje del AAL en DCh mientras que éste no fue detectado en los grupos DM y DO. Además, el AA fue mayor en DM con respecto a DO y DCh, pero esa diferencia no fue estadísticamente significativa. El AEP, derivado del AAL, fue mayor en el grupo DCh en comparación con DM y DO ($p>0,05$).
- *Glándula submandibular*: el AO fue mayor en DO que en DM y DCh ($p=0,012$). Los AAL, AEP y ADP fueron detectados solamente en el grupo DCh. El AA mostró un porcentaje más alto en DM y DO que en DCh ($p=0,049$).
- *Tejido adiposo periglandular*: el AO fue más alto en DO que en DM y DCh ($p=0,005$), mientras que el nivel de AL lo fue en DM con respecto a DO ($p=0,049$). El AAL fue mayor en el grupo DCh que en DM y DO ($p<0,001$). El AA no fue detectado en ningún grupo dietario, en tanto que los AEP y ADP solo fueron observados en DCh y en porcentajes muy bajos. El nivel de ADH fue alto en los tres grupos dietarios, aunque las diferencias entre ellos no fueron estadísticamente significativas.

4.2. Flujo salival

4.2.1. Comparación del flujo salival submandibular entre grupos dietarios según tiempo de ingesta

La tasa del flujo salival submandibular estimulado de los animales pertenecientes a los tres grupos dietarios se presenta en la tabla 14.

Tabla 14. *Flujo de saliva submandibular según grupo dietario y tiempo de ingesta*

Tiempo	Grupo dietario		
	DM	DO	DCh
1 día	6,18 ± 0,34 ^A	6,04 ± 0,31 ^A	6,00 ± 0,50 ^A
15 días	8,26 ± 0,43 ^A	8,00 ± 0,61 ^A	6,18 ± 0,53 ^B
30 días	4,68 ± 0,44 ^A	6,08 ± 0,21 ^B	7,82 ± 0,71 ^C

DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chía.

Los valores son expresados como $\mu\text{L}/\text{min}$ y corresponden a la media \pm EE.

Prueba *t* de Student. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el flujo salival entre los grupos DM1, DO1 y DCh1 ($p > 0,05$). Sin embargo, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos DM15 y DO15 con respecto al grupo DCh15 ($p = 0,008$ y $p = 0,039$, respectivamente), con una mayor tasa de flujo salival en los dos primeros. Por otra parte se observó que, a los 30 días de ingesta dietaria, los grupos DM y DO presentaron una reducción en el flujo salival, siendo mayor la disminución en el primero de ellos ($p = 0,002$). Además, el grupo DCh mostró un valor medio mayor, siendo esa diferencia estadísticamente significativa con respecto a DM ($p < 0,001$) y a DO ($p = 0,038$).

4.2.2. Flujo salival submandibular en cada grupo dietario según el tiempo de ingesta

Cuando se analizó el flujo salival de cada grupo dietario según el tiempo de ingesta, se observó que el grupo DM1 presentó un aumento del 33% después de 15 días de ingesta ($p < 0,001$) y, a continuación, una disminución del 43% a los 30 días del consumo dietario ($p < 0,001$). Del mismo modo, el grupo DO1 tuvo un aumento del 24,5% después de 15 días de ingesta ($p = 0,013$), seguido de una disminución del 24% luego de 30 días de consumo ($p = 0,014$). Por el contrario, el grupo DCh1 presentó un ligero incremento del 3% a los 15 días de ingesta de la dieta con aceite de chía, pero alcanzó un incremento del 30,4% a los 30 días de consumo de dicha dieta ($p = 0,02$) (figura 23).

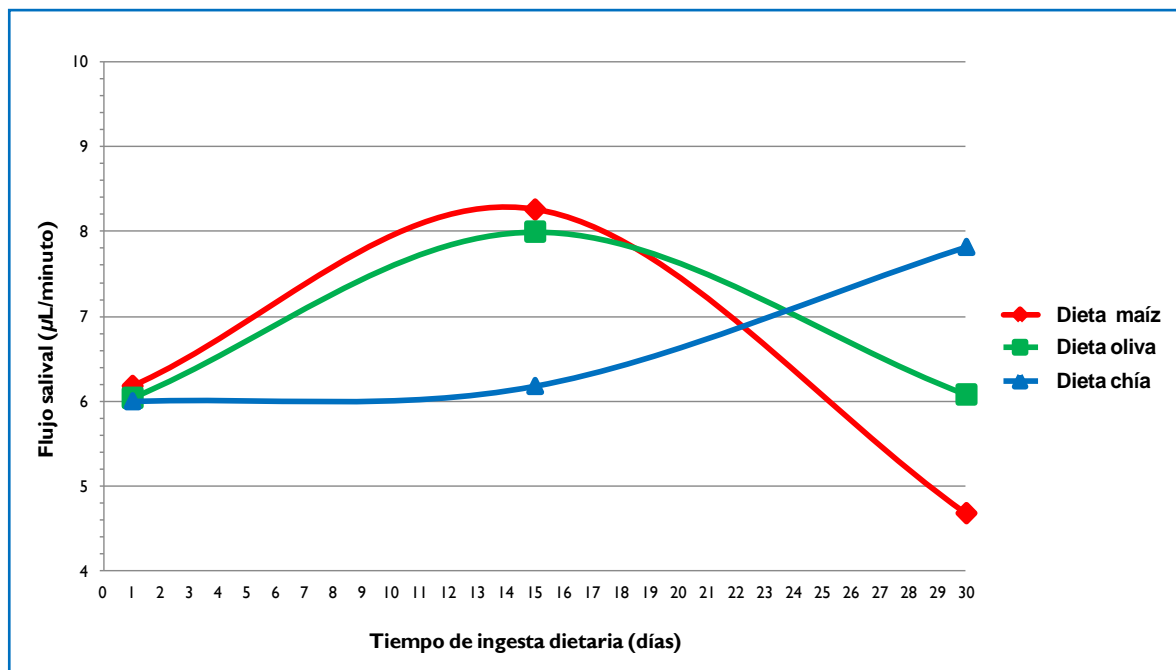


Figura 23. Flujo salival submandibular en cada grupo dietario según el tiempo de ingesta

4.2.3. Flujo salival y AG de la glándula submandibular según dieta y tiempo de ingesta

Para este análisis se han seleccionado los AG más representativos de cada grupo dietario: AL, AA, AO, AAL y AEP.

Grupo DM: a 1 día de ingesta la tasa del flujo salival (6,18 µL/min) se acompañó de un alto porcentaje del AA (23,82 %á) y de niveles moderados de AL (12,94 %á) y AO (11,35 %á), mientras que los AAL y AEP no fueron detectados. A los 15 días de ingesta, se

observó un incremento del flujo salival (8,26 $\mu\text{L}/\text{min}$) junto con un aumento notorio del AEP (8,89 %á) y una fuerte disminución en el contenido de AA (10,69 %á), así como también una reducción de AL (9,86 %á) y AO (9,95 %á) en la glándula submandibular. A los 30 días de consumo dietario, el flujo salival disminuyó (4,68 $\mu\text{L}/\text{min}$), el AEP no fue detectado y el porcentaje de AA (15,11 %á), AL (11,82 %á) y AO (10,95 %á) de la glándula submandibular mostraron un ligero incremento (figura 24).

Por otra parte, al analizar la asociación entre flujo salival y AG de la glándula submandibular del grupo DM se observó una correlación positiva muy fuerte, pero no significativa al 5%, sólo para AEP ($r= 0,85$; $p>0,05$), mientras que el AA presentó una correlación negativa débil ($r= -0,24$; $p>0,05$).

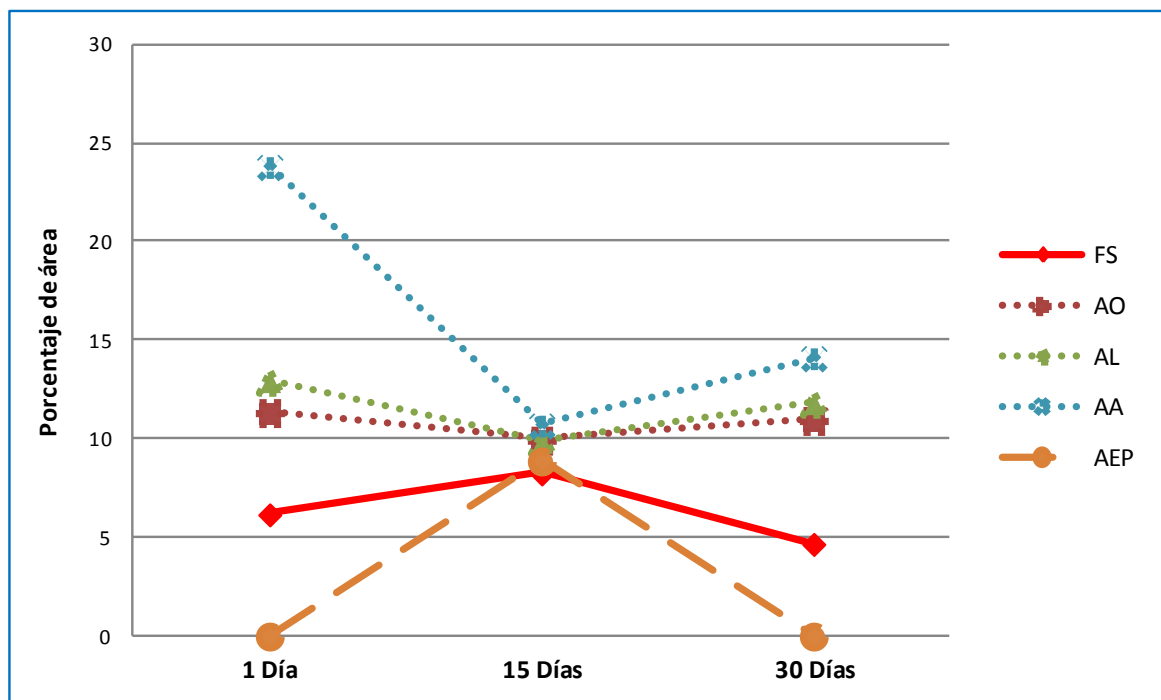


Figura 24. *Flujo salival y AG de la glándula submandibular en grupo DM según tiempo de ingesta*

AG: ácido graso; DM: dieta maíz; FS: flujo salival ($\mu\text{L}/\text{min}$).

AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AA: ácido araquidónico AEP: ácido eicosapentaenoico (con guiñon largo porque no fue detectado a 1 y 30 días de ingesta).

Grupo DO: a 1 día de consumo de esta dieta, la tasa del flujo salival (6,04 $\mu\text{L}/\text{min}$) fue acompañada de un bajo contenido de AEP (0,12 %á), niveles moderados de AO (10,11 %á) y AL (10,31 %á) y un elevado porcentaje del AA (22,52 %á) en la glándula

submandibular. A los 15 días de ingesta, se observó un aumento del flujo salival (8,00 $\mu\text{L}/\text{min}$) acompañado de un incremento de AO (14,35 %á) y AEP (8,35 %á) y una disminución marcada del AA (9,83 %á) y moderada del AL (9,47 %á). Finalmente, luego de 30 días de ingesta de DO, el flujo salival disminuyó hasta alcanzar su nivel basal/inicial, mientras que el porcentaje de AO (15,77 %á), AA (15,07 %á), AL (11,9 %á) tuvieron un incremento moderado y, por otra parte, los AEP y AAL no fueron detectados en la estructura de la glándula submandibular (figura 25).

Al analizar la asociación entre el flujo salival y los AG de la glándula submandibular del grupo DO se encontraron correlaciones negativas significativas, moderada y fuerte, para el AL ($r = -0,59$; $p = 0,05$) y AA ($r = -0,61$; $p = 0,05$), respectivamente, mientras que se observó una correlación positiva muy fuerte, no significativa, para el AEP ($r = 0,82$; $p = 0,09$).

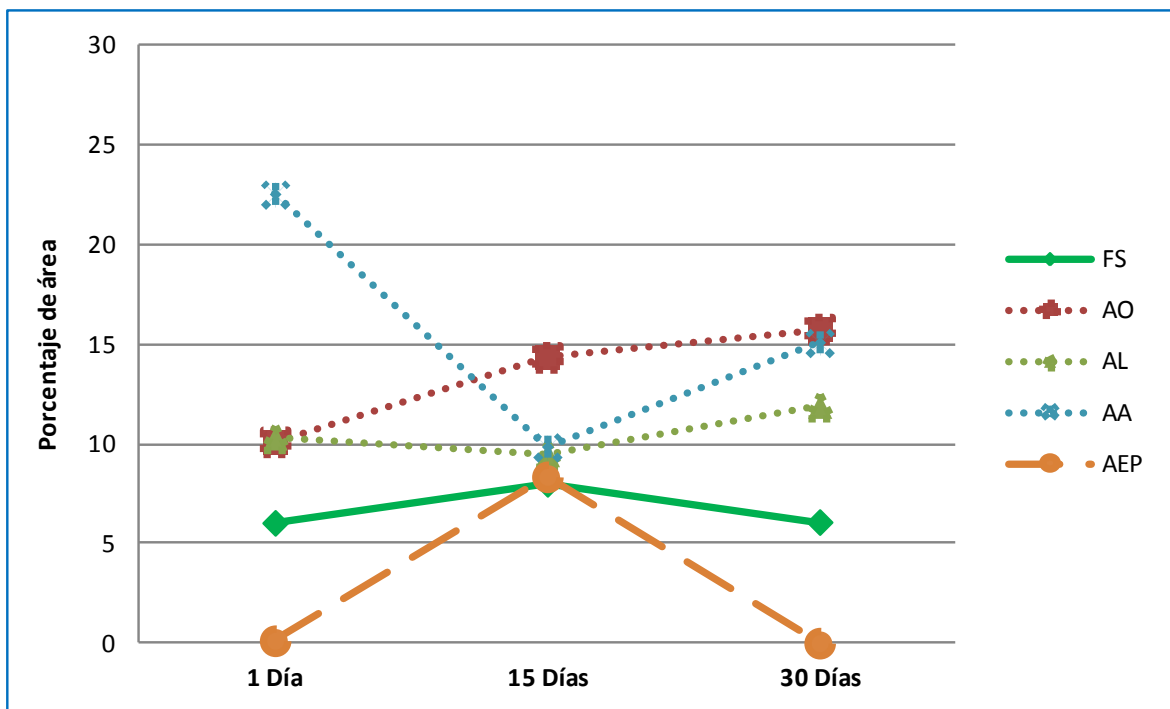


Figura 25. Flujo salival y AG de la glándula submandibular en grupo DO según tiempo de ingesta

AG: ácido graso; DO: dieta oliva; FS: flujo salival ($\mu\text{L}/\text{min}$).

AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AA: ácido araquidónico AEP: ácido eicosapentaenoico (con guiñón largo porque no fue detectado a 1 y 30 días de ingesta).

Grupo DCh: a 1 día de ingesta, la tasa del flujo salival (6,00 $\mu\text{L}/\text{min}$) se correlacionó con niveles moderados de AL (12,4 %á), AO (12,97 %á), AA (16,42 %á) y con un bajo porcentaje de AAL (0,81 %á) y AEP (0,81 %á) en la glándula submandibular. Luego de 15 días de ingesta, se observó que la tasa de flujo salival tuvo un ligero aumento (6,18 $\mu\text{L}/\text{min}$), al igual que el nivel del AAL (1,3 %á) y un aumento marcado del AEP (11,8 %á), mientras que disminuyeron los contenidos de AA (7,88 %á), AL (10,82 %á) y AO (10,57 %á). A los 30 días de consumo dietario, la tasa del flujo salival alcanzó su valor más alto (7,82 $\mu\text{L}/\text{min}$) acompañado de un incremento moderado en el porcentaje de AL (15,5 %á), AAL (3 %á) y AA (9,76 %á). El nivel de AO (10,42 %á) se mantuvo prácticamente igual mientras que el del AEP se mostró con niveles más bajos (4,08 %á) (figura 26).

Por último, al analizar la asociación entre el flujo salival y los mencionados AG glandulares del grupo DCh se observaron correlaciones negativas significativa, moderada y fuerte, para AA ($r = -0,53$; $p = 0,05$) y ADH ($r = -0,71$; $p = 0,02$) respectivamente, mientras que el AEP presentó una asociación positiva débil no significativa ($r = 0,25$; $p > 0,05$).

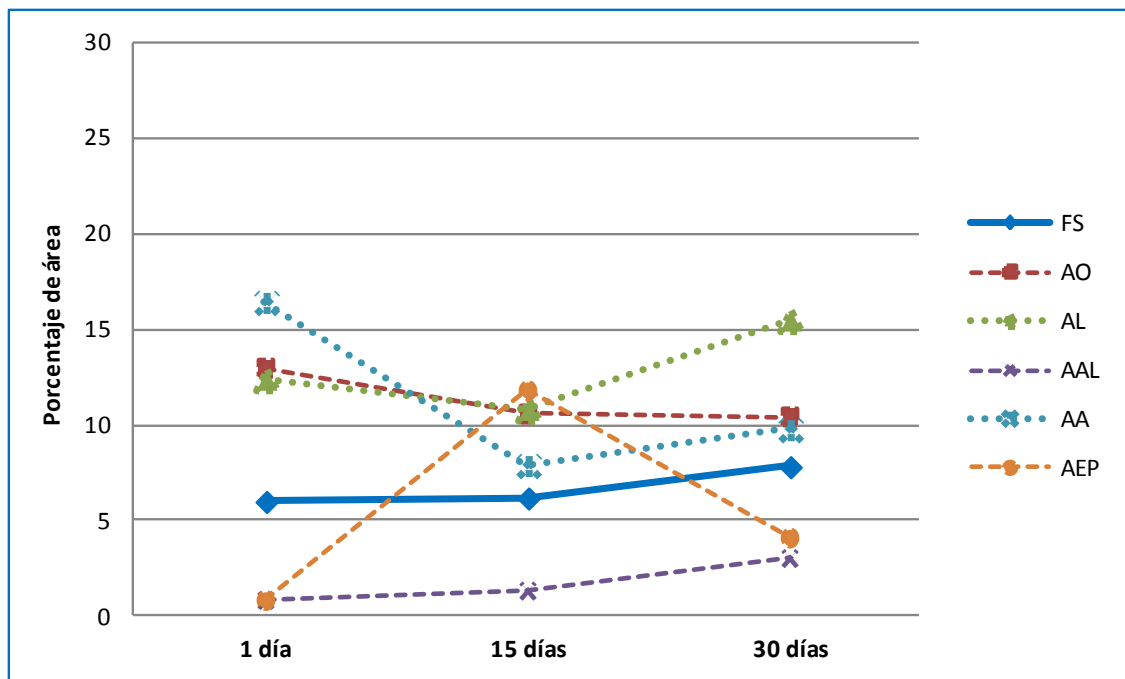


Figura 26. *Flujo salival y AG de la glándula submandibular en grupo DCh según tiempo de ingesta*

AG: ácido graso; DCh: dieta chíá; FS: flujo salival ($\mu\text{L}/\text{min}$).

AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; AAL: ácido α -linolénico; AA: ácido araquidónico AEP: ácido eicosapentaenoico.

4.2.4. Cuantificación de acinos serosos y mucosos de la glándula submandibular mediante microscopía óptica

La figura 27 muestra microfotografías de los acinos serosos de las glándulas salivales submandibulares de los grupos maíz, oliva y chía luego de 15 y 30 días de ingesta (DM15, DM30; DO15, DO30; DCh15, DCh30). Es importante destacar que los análisis de microscopía óptica no fueron realizados en las muestras de los grupos dietarios a 1 día debido a que, en un corto periodo de ingesta, no se espera observar cambios estructurales.

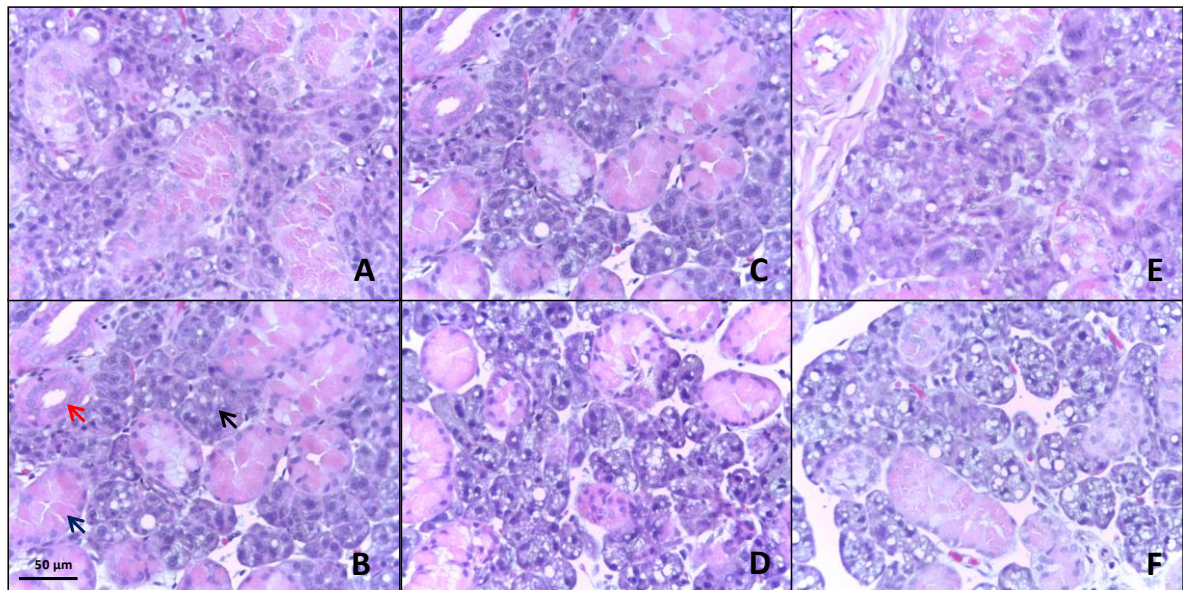


Figura 27. Microfotografías de acinos serosos de glándulas submandibulares. Grupos dietarios según tiempo: DM15 (A) y DM30 (B); DO15 (C) y DO30 (D) y DCh15 (E) y DCh30 (F). Se observan acinos serosos (flecha negra), mucosos (flecha azul) y conductos estriados (flecha roja). Técnica de H/E, aumento original 40x.

Se observó que, a los 30 días de ingesta dietaria, el grupo DM mostró una disminución en el porcentaje de área de los acinos serosos con respecto al grupo DM15, mientras que el grupo DO30 presentó un valor medio ligeramente mayor comparado con DO15 ($p > 0,05$). Por otra parte, se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos DCh15 y DCh30 ($p < 0,001$), con un mayor porcentaje de área de acinos serosos en este último (figura 28).

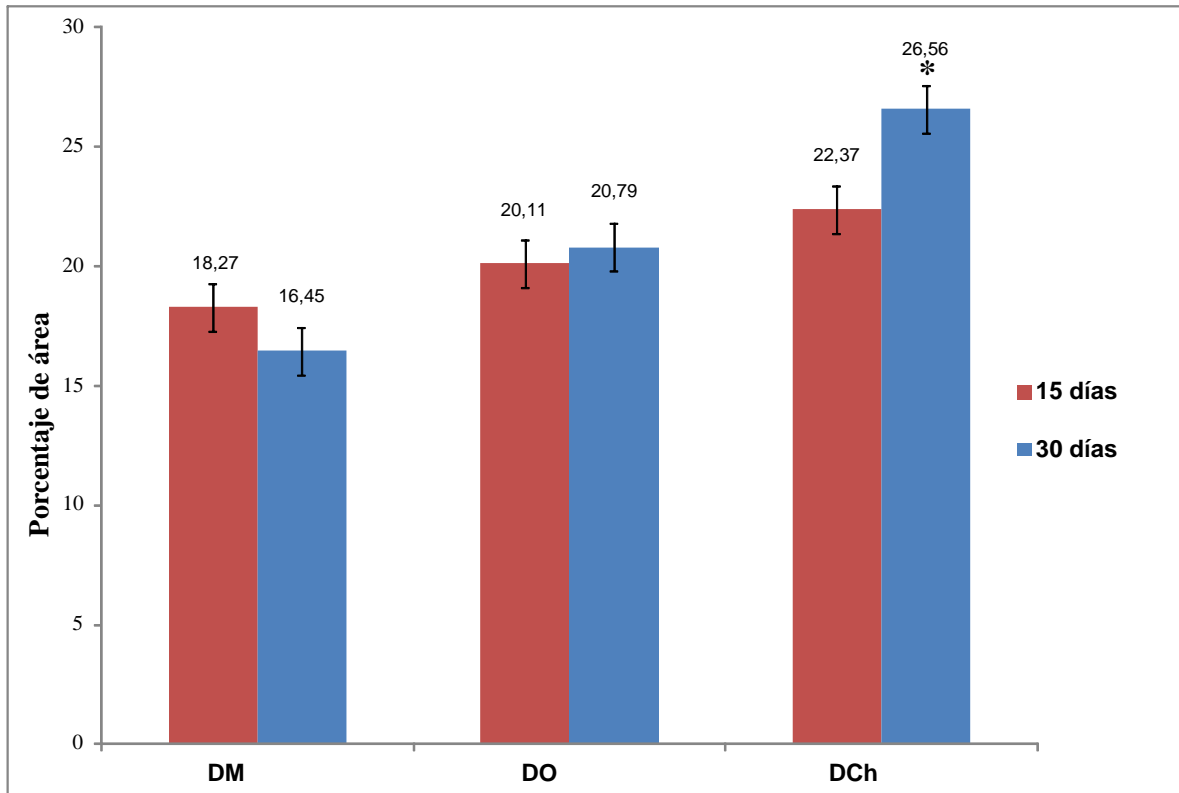


Figura 28. Cuantificación de acinos serosos en glándulas submandibulares de los tres grupos a 15 y 30 días de ingesta dietaria

DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chía.

Los valores se expresan como porcentaje de área (% á) y corresponden a la media \pm EE.

Prueba de ANOVA. * Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

La figura 29 muestra microfotografías de los acinos mucosos de las glándulas salivales submandibulares de los grupos maíz, oliva y chía luego de 15 y 30 días de ingesta (DM15, DM30; DO15, DO30; DCh15, DCh30).

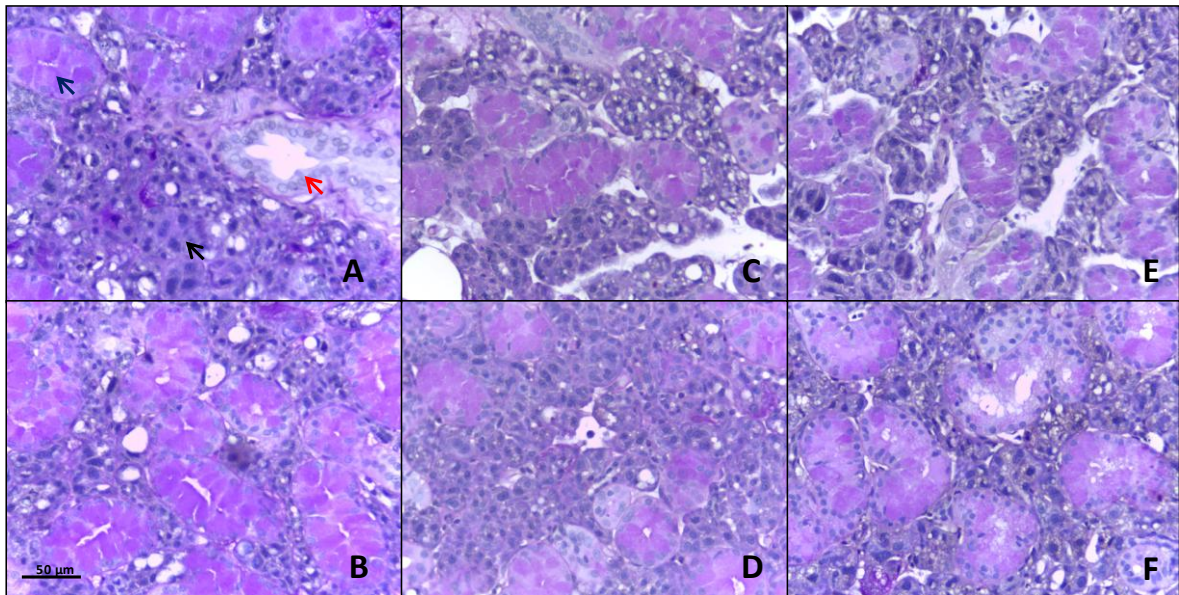


Figura 29. Microfotografías de acinos mucosos de glándulas submandibulares. Grupos dietarios según tiempo: DM15 (A) y DM30 (B); DO15 (C) y DO30 (D); DCh15 (E) y DCh30 (F). Se observan acinos mucosos (flecha azul), serosos (flecha negra) y conductos estriados (flecha roja). Técnica de PAS, aumento original 40x.

En la figura 30 se muestra el porcentaje de área de los acinos mucosos en las glándulas submandibulares de los tres grupos dietarios. Se observó un aumento en la densidad de acinos mucosos de DM30 comparado con DM15 ($p=0,005$), mientras que DO15 y DO30 presentaron valores similares. Además, se apreció un leve incremento en el porcentaje de área de estos acinos en DCh30 con respecto a DCh15, aunque esa diferencia no fue estadísticamente significativa ($p>0,05$).

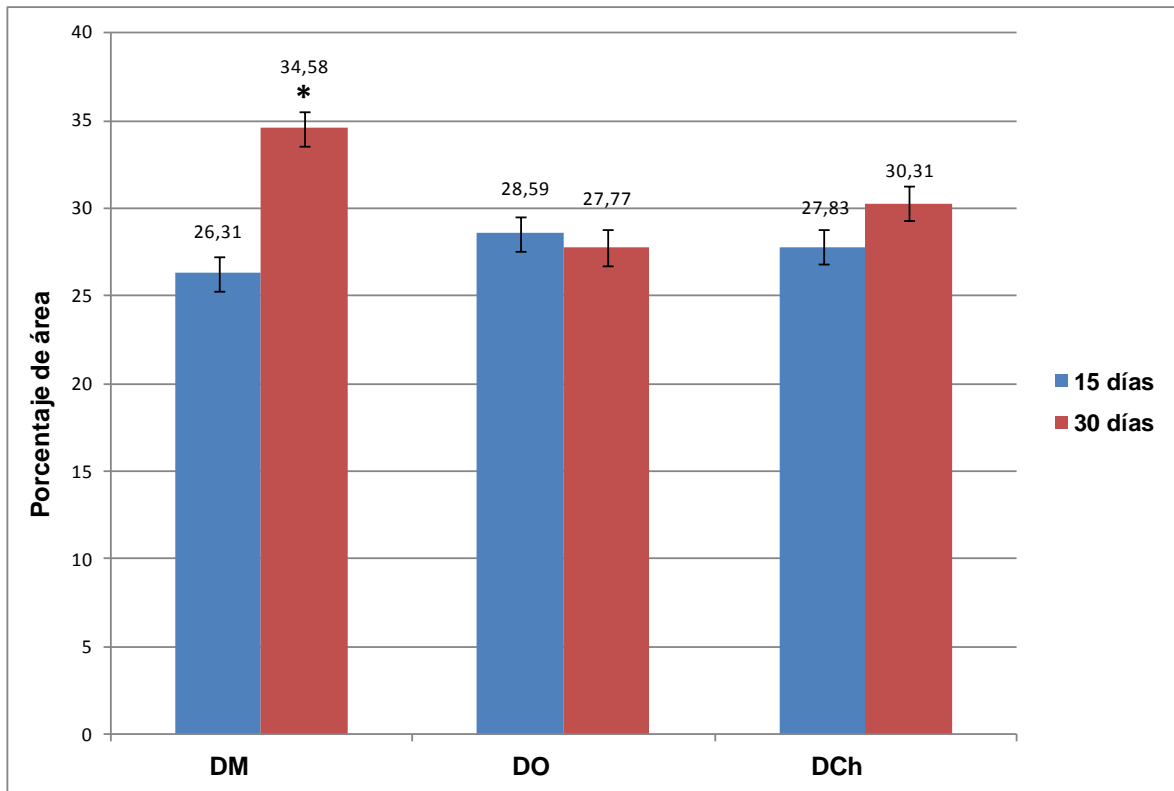


Figura 30. Cuantificación de acinos mucosos en glándulas submandibulares de los tres grupos a 15 y 30 días de ingesta dietaria

DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chía.

Los valores se expresan como porcentaje de área (%á) y corresponden a la media \pm EE.

Prueba de ANOVA. * Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

4.2.5. Análisis de células acinares de glándula submandibular mediante microscopía electrónica

La figura 31 muestra microfotografías de los núcleos de las células epiteliales submandibulares, el retículo endoplásmico rugoso (RER) y las vesículas secretoras de dichas glándulas de los grupos maíz, oliva y chía luego de 30 días de ingesta (DM30, DO30, DCh30).

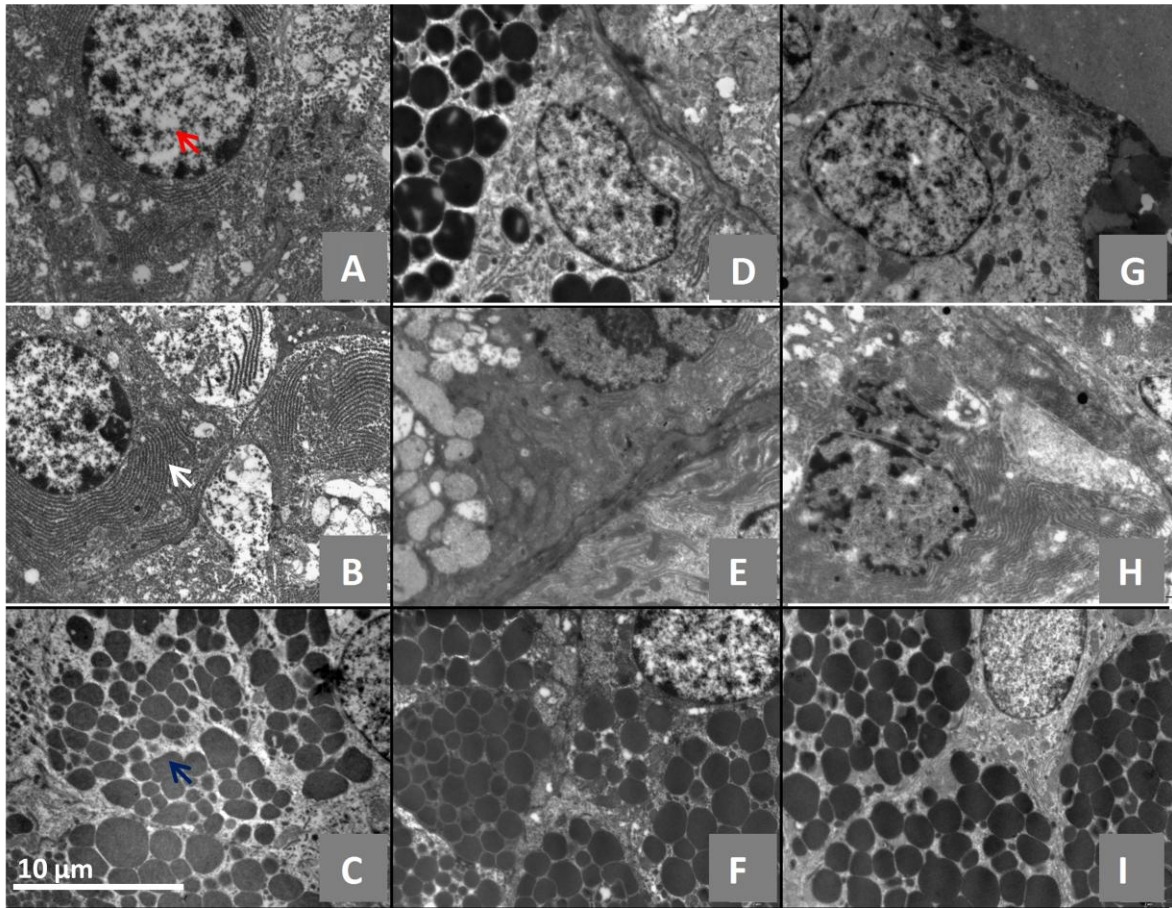


Figura 31. *Microfotografías de glándulas submandibulares mediante microscopía electrónica.* DM30 (A, B, C); DO30 (D, E, F); DCh30 (G, H, I). Se observan núcleos (flecha roja), retículo endoplásmico rugoso (flecha blanca) y vesículas secretoras (flecha azul). Aumento original 6000x.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el diámetro promedio de los núcleos de células secretoras (figura 32), en el porcentaje de área ocupada por el RER (figura 33) y tampoco en el porcentaje de área vesicular (figura 34), entre los distintos grupos analizados.

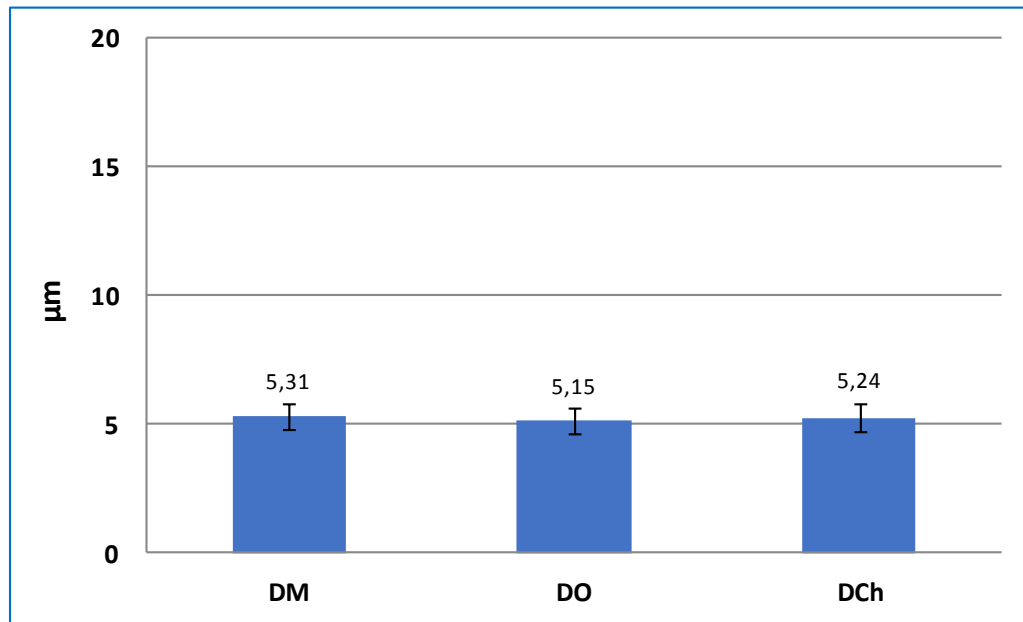


Figura 32. Núcleos de células secretoras de glándulas submandibulares en los tres grupos a 30 días de ingesta dietaria

DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chía. Los valores del diámetro de los núcleos de las células secretoras se expresan en micrómetros (µm) y corresponden a la media ± EE. Prueba de *Kruskal Wallis* ($p \leq 0,05$).

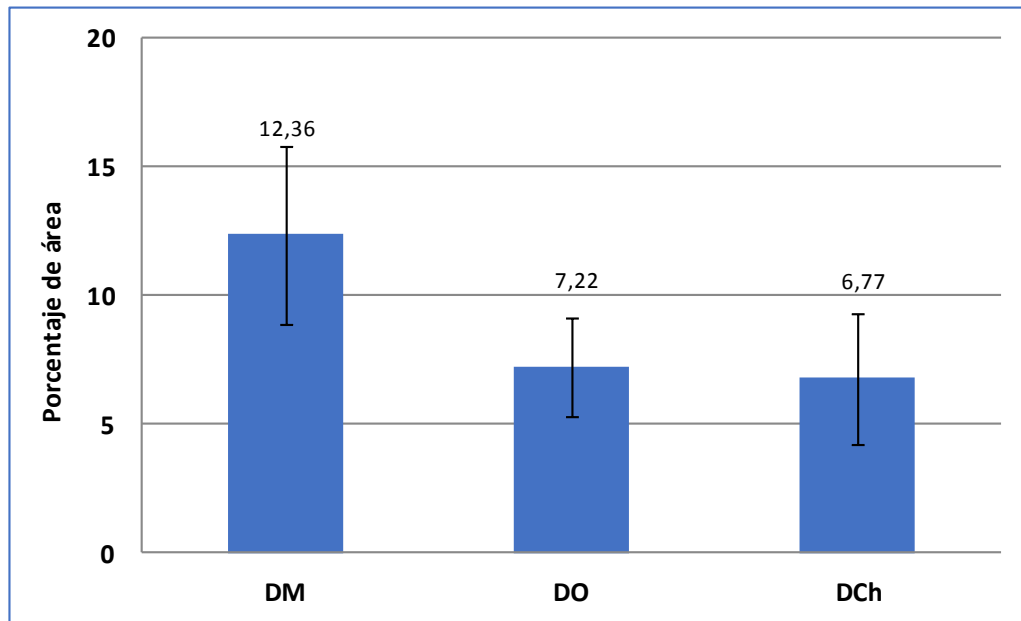


Figura 33. RER de células secretoras de glándulas submandibulares en los tres grupos a 30 días de ingesta dietaria

DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chía. Los valores del RER se expresan en porcentaje de área y corresponden a la media ± EE. Prueba de *Kruskal Wallis* ($p \leq 0,05$).

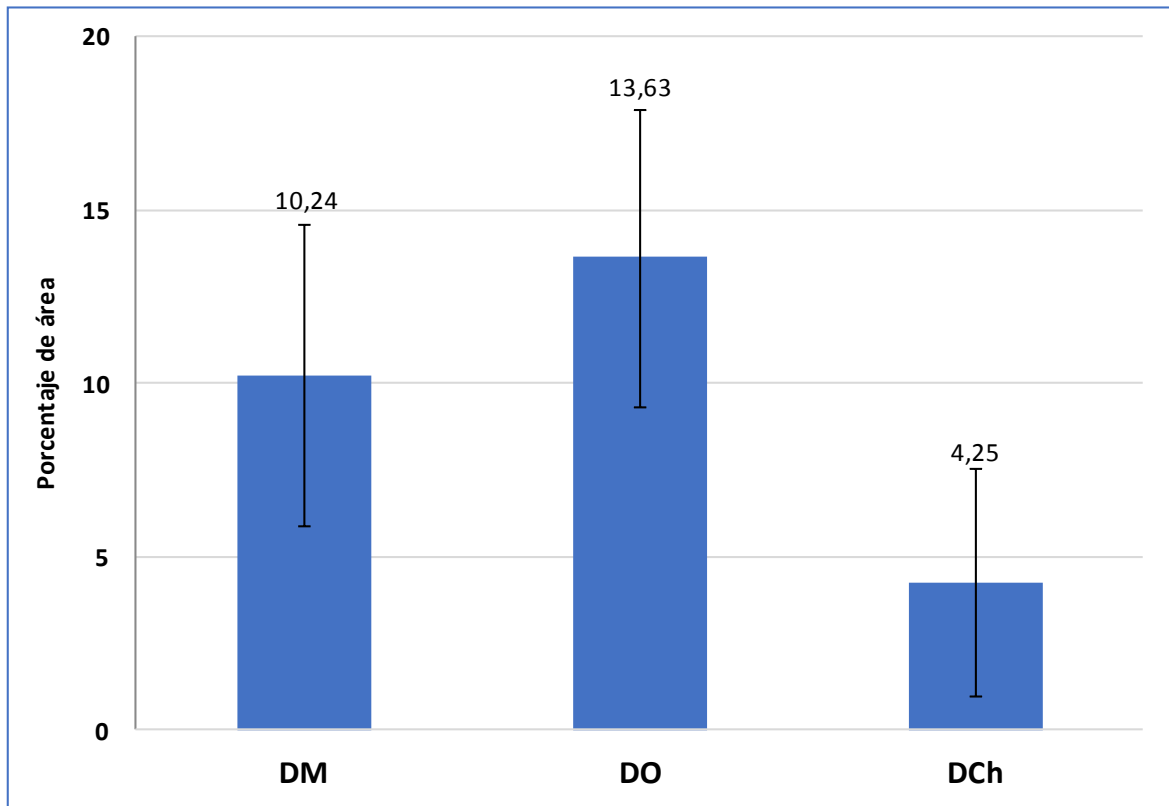


Figura 34. Área de vesículas secretorias de glándulas submandibulares en los tres grupos a 30 días de ingesta dietaria

DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chí.

Los valores del área de vesículas secretorias se expresan en porcentaje de área y corresponden a la media \pm EE.

Prueba de *Kruskal Wallis* ($p \leq 0,05$).

Por otra parte, el tamaño promedio de vesículas secretorias fue la única variable que mostró diferencias estadísticamente significativas (figura 35). Dicho tamaño fue menor en DCh que en DM y DO. Por lo tanto, como el área ocupada por el total de vesículas fue similar en los tres grupos de estudio, se puede inferir que en las células del grupo DCh existe, en promedio, una mayor cantidad de vesículas secretorias.

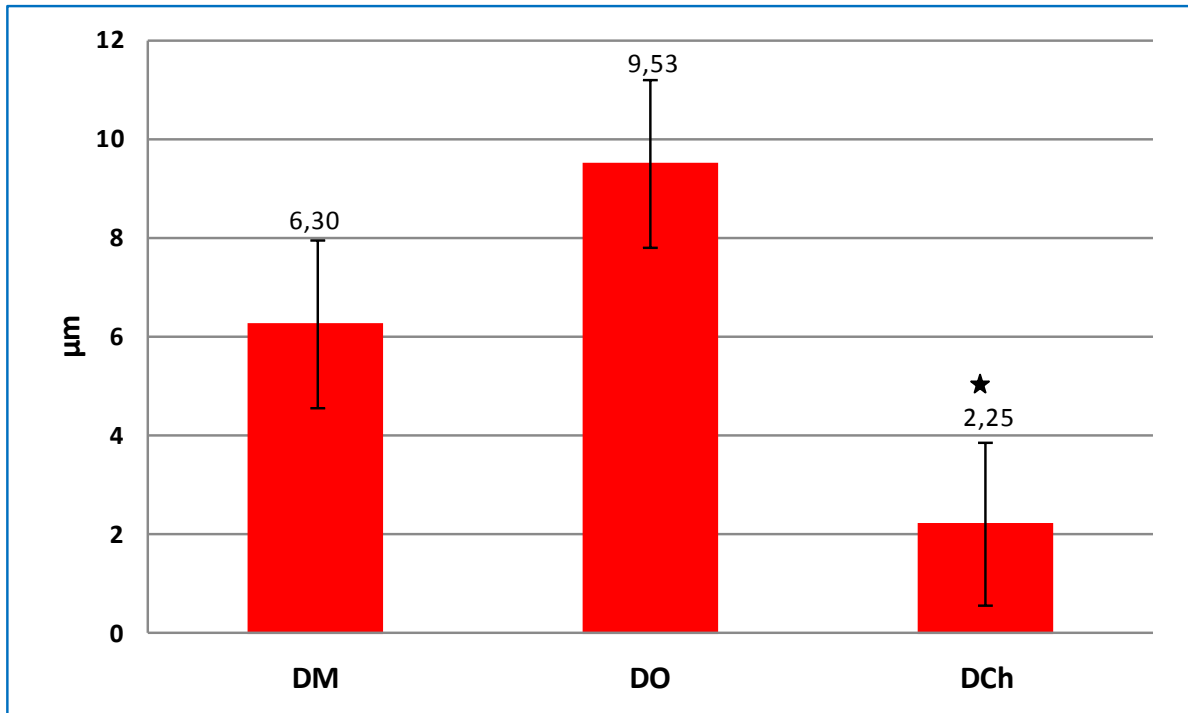


Figura 35. *Tamaño de vesículas secretorias en glándulas salivales submandibulares de los tres grupos a 30 días de ingesta dietaria*

DM: dieta maíz; DO: dieta oliva; DCh: dieta chía.

Los valores del tamaño de las vesículas secretorias se expresan en micrómetros (μm) y corresponden a la media \pm EE. Prueba de *Kruskal Wallis*.

*Indica diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

4.3. Biodisponibilidad de isómeros de CLA en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular

La tabla 15 muestra la presencia de los isómeros de CLA (*cis-9 trans-11*; *trans-10 cis-12*) y su efecto sobre el perfil de AG en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular según los diferentes tiempos experimentales.

- *Saliva*: no se detectaron isómeros de CLA luego de 1 día de reemplazada la DCLA por DM. Los niveles de AP y AL mostraron una disminución en el grupo DCLA/30 con respecto al DCLA/1 ($p=0,006$ y $p=0,006$, respectivamente). Por otro lado, el porcentaje de AA fue mayor en DCLA/30 que en DCLA/1 ($p=0,05$), pero no significativamente diferente al compararlo con DCLA/15. Los AAL y AEP no fueron detectados en ningún tiempo experimental.
- *Plasma*: tampoco se observaron isómeros de CLA a 1, 15 o 30 días de reemplazo de DCLA por DM. El AL presentó una tendencia a disminuir en el grupo DCLA/30 en comparación con DCLA/1 ($p>0,05$), mientras que el AA mostró un aumento en DCLA/30 en relación con DCLA/1 ($p=0,02$).
- *Glándula submandibular*: sólo se encontraron bajos niveles de isómeros de CLA en el grupo DCLA/1. El porcentaje de AL fue menor en DCLA/15 y DCLA/30 que en DCLA/1 ($p=0,05$), mientras que el de AA fue mayor en el grupo DCLA/30 que en el grupo DCLA/1 ($p=0,02$). Por otro lado, el AE mostró un aumento en DCLA/15 y DCLA/30 comparados con DCLA/1 ($p=0,04$), así como también el nivel de ADH fue mayor en DCLA/15 que en los otros grupos ($p=0,02$).
- *Tejido adiposo periglandular*: se observaron isómeros de CLA en los tres tiempos experimentales. El grupo DCLA/15 presentó una disminución de aproximadamente un 50% con respecto al valor del grupo DCLA/1 ($p>0,05$), y su valor se redujo a 0,09% en el grupo DCLA/30 ($p=0,001$), indicando que la disminución en el tiempo fue casi lineal (figura 35). En contraste, el nivel de AO fue mayor en DCLA/30 que en DCLA/1 y DCLA/15 ($p=0,007$).

Tabla 15. Persistencia de isómeros de CLA en fluidos y tejidos de ratas según los tiempos experimentales

AG	Saliva				Plasma				Glándula submandibular				Tejido adiposo periglandular			
	1 día ¹	15 días ²	30 días ³	p ⁴	1 día ¹	15 días ²	30 días ³	p ⁴	1 día ¹	15 días ²	30 días ³	p ⁴	1 día ¹	15 días ²	30 días ³	p ⁴
AP	16,78±7,0 ^A	11,67±2,68 ^{AB}	4,8±2,78 ^B	0,006	17,87±1,47	21,09±5,89	17,48±3,31	0,68	30,5±1,59	30,22±2,94	32±1,42	0,44	26,69±3,95	25,36±1,73	25,78±1,8	0,89
APO	1,54±0,58	Nd	Nd	-	2,3±0,74	3,55±,5	Nd	0,67	2,47±0,62	2,52±0,99	3,29±0,75	0,45	2,94±1,77	3,54±0,96	3,1±1,14	0,89
AE	4,6±1,42	7,45±4,69	2,56±1,88	0,19	8,05±1,07	7,43±3,19	9,28±0,78	0,33	8,71±1,34 ^A	11,58±0,75 ^B	11,63±0,89 ^B	0,04	4,1±0,64	3,67±0,65	3,59±0,49	0,38
AO	21,25±6,21	13,57±1,97	9,73±9,38	0,13	11,03±5,53	13,46±3,26	10,32±1,93	0,47	15,07±2,16	12,71±1,34	14,07±0,15	0,21	25,49±0,91 ^A	26,29±0,48 ^A	28,14±1,07 ^B	0,007
AL	28,23±7,62 ^A	23,94±4,35 ^A	7,2±3 ^B	0,006	22,91±2,05	20,76±5,92	18,25±2,41	0,19	19,53±2,49 ^A	12,93±0,6 ^B	12,88±0,58 ^B	0,05	29,78±3,61	30,38±1,83	31,08±2,29	0,98
CLA	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-	0,26 ± 0,05	Nd	Nd	-	0,84±0,07 ^A	0,42±0,05 ^{AB}	0,09±0,01 ^B	0,001
AAL	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-
ADGL	Nd	Nd	Nd	-	2,94±0,52	2,34±0,7	3,25±1,4	0,59	2,15±0,26	2,54±0,35	2,56±0,41	0,28	Nd	Nd	Nd	-
AA	1,9±0,04 ^A	3,17±0,51 ^B	3,38±1,4 ^B	0,05	11,87±2,14 ^A	13,33±2,61 ^A	21,21±1,99 ^B	0,02	11,83±0,49 ^A	16,76±2,48 ^{AB}	17,51±1,54 ^B	0,02	0,78±0,38	0,71±0,35	0,7±0,26	0,92
AEP	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-
ADP	1,37±1,1	3,52±1,8	1,93±0,3	0,21	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-	Nd	Nd	Nd	-
ADH	0,67±0,43	2,14±0,75	1,94±0,95	0,47	1,48±0,32	1,16±0,37	3,07±1,55	0,28	0,73±0,31 ^A	1,29±0,11 ^B	0,71±0,49 ^A	0,02	Nd	Nd	Nd	-
20:4 n-6 / 18:2 n-6 Ratio	0,067±0,01 ^A	0,13±0,02 ^{AB}	0,46±0,05 ^B	0,01	0,52±0,06 ^A	0,64±0,08 ^{AB}	1,16±0,1 ^B	0,01	0,60±0,06 ^A	1,30±0,11 ^{AB}	1,36±0,07 ^B	0,03	0,026±0,01 ^A	0,023±0,01 ^A	0,022±0,003 ^A	0,72

AG: ácido graso; AP: ácido palmítico; APO: ácido palmitoleico; AE: ácido esteárico; AO: ácido oleico; AL: ácido linoleico; CLA: ácido linoleico conjugado (*cis*-9,*trans*-11-CLA y *trans*-10,*cis*-12-CLA); AAL: ácido α -linolénico; ADGL: ácido dihomo- γ -linolénico; AA: ácido araquidónico; AEP: ácido eicosapentaenoico; ADP: ácido docosapentaenoico; ADH: ácido docosahexaenoico.

El valor correspondiente al *ratio* AGPI n-6/n-3 es referido a 1 (p. ej. 4,46/1).

Los valores se expresan como porcentaje de área (%á) y corresponden a la media \pm EE. Nd: no detectado.

El tiempo corresponde a los días posteriores al reemplazo de la dieta CLA, administrada durante 30 días, por DM: ¹ CLAD/1; ² CLAD/15; ³ CLAD/30.

⁴ Prueba de *Kruskal Wallis*. Letras distintas indican diferencias significativas (^{A/B} $p \leq 0,05$).

La relación 20:4 n-6/18:2 n-6 fue menor en DCLA/1 en comparación con DCLA/30 en saliva ($p=0,01$), plasma ($p=0,01$) y glándula submandibular ($p=0,03$), con la tasa más baja en el primer fluido. Con respecto al tejido adiposo periglandular, la tasa de conversión fue muy baja y ligeramente decreciente en el tiempo, diferente a lo que ocurrió en la glándula submandibular.

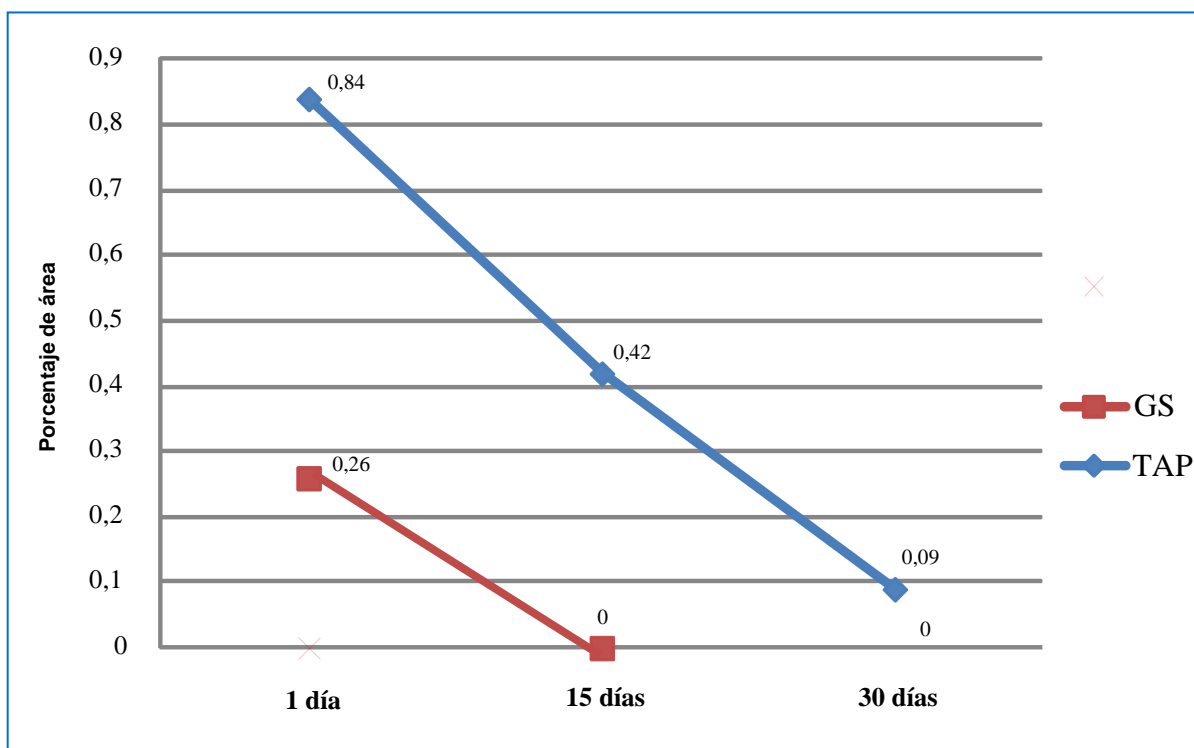


Figura 35. Persistencia de isómeros de CLA en glándula submandibular y en tejido adiposo periglandular según los tiempos experimentales

GS: glándula submandibular; TAP: tejido adiposo periglandular.

CLA: ácido linoleico conjugado (del inglés *conjugated linoleic acid*.)

El tiempo corresponde a los días posteriores al reemplazo de la dieta CLA, administrada durante 30 días, por DM.

5

DISCUSIÓN

5.1. Perfil de AG dietarios

5.1.1. Ingesta inmediata

5.1.2. Ingesta habitual

5.2. Flujo salival submandibular

5.3. Biodisponibilidad de isómeros de CLA en fluidos y tejidos

DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis doctoral tuvo como objetivo general el análisis del perfil de AG y el flujo de saliva submandibular de ratas con relación al tiempo de ingesta de lípidos dietarios. Así, el perfil de AG en saliva podría constituir un biomarcador de ingesta dietaria, ya sea inmediata y/o habitual y, por ende, un indicador de riesgo de enfermedades no trasmisibles y estrechamente vinculadas a la alimentación como diversos tipos de cáncer y/o enfermedades cardiovasculares.

Este trabajo pone en evidencia la influencia de los AG dietarios sobre el flujo de saliva submandibular. Ello constituiría un aporte a la clínica y a la epidemiología debido al importante papel que desempeña dicho fluido biológico en la preservación e integridad de los tejidos blandos y duros de la cavidad bucal, así como también en el mantenimiento de la salud sistémica, entre otras funciones relevantes.

Por otra parte, debido a que la información relacionada con perfiles cinéticos mejora la investigación básica para definir la eficacia en el uso de cualquier suplemento dietario, en este trabajo se intentó determinar la biodisponibilidad de los isómeros de CLA en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular para ser empleado como un biomarcador de ingesta dietaria, ya que no es sintetizado ni degradado por el organismo humano. A la vez, ello podría contribuir a establecer la frecuencia de ingesta que permitiría mantener un nivel de CLA en el organismo a fin de que se obtengan sus potenciales efectos preventivos y saludables.

A continuación, se confrontan los resultados de este estudio con los de otros autores. La discusión está ordenada según los aspectos analizados en este trabajo de tesis: *perfil de AG en fluidos y tejidos, flujo de saliva submandibular y biodisponibilidad de isómeros de CLA*.

5.1. Perfil de AG en fluidos y tejidos

En primera instancia, se presenta la discusión de los resultados sobre la base de los tres principales AG de cada aceite incorporado a las dietas de laboratorio (AO, AL y AAL) y administrada a los animales de cada grupo (DM, DO y DCh). A continuación, se hace referencia a otros AG, derivados o no de aquellos, pero que también poseen importancia

biológica, siempre analizados en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular.

Los resultados encontrados en la literatura científica consultada pertenecen, en general, a investigaciones relacionadas con la ingesta inmediata y habitual, las que corresponden a cortos (horas) o largos (meses) periodos de consumo dietario. En este sentido, son pocos los trabajos que abordan tiempos intermedios de ingesta, es decir 15 días, lo que representa una dificultad para comparar nuestros resultados con los de otros autores aunque también constituye un aporte original de este trabajo de investigación. A pesar de que se tendrán en cuenta los datos obtenidos con el consumo de AG a 15 días - cuando se menciona en el texto se aclara para evitar confusiones- la discusión de esta tesis se centrará, mayoritariamente, en 1 día (ingesta inmediata) y en 30 días (ingesta habitual).

Por otra parte, los trabajos publicados a nivel internacional evidencian que aún no se cuenta con información clara y precisa acerca de la utilización de los AG salivales como biomarcadores nutricionales.

5.1.1. Ingesta inmediata

Luego de 1 día de consumo dietario, en el presente trabajo se observó un incremento del porcentaje de **AO** en *saliva* y en *plasma* de **DO** comparado con los de **DM** y **DCh**, siendo las diferencias estadísticamente significativas. También se detectó que los niveles de **AAL** fueron mayores en *plasma* y en *tejido adiposo periglandular* del grupo **DCh** que en **DM** y **DO**, con diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados coinciden parcialmente con los de Salim de Castro y col. (2014), quienes analizaron el perfil de AG y la incorporación de isómeros de CLA en fluidos y tejidos de ratas mediante la ingesta de diversas dietas ricas en grasas durante 24 horas, después de 48 horas de ayuno. Estos autores concluyeron que el perfil de AG sérico refleja el tipo de dieta ingerida y que el CLA se incorpora notoriamente en suero, hígado y tejido adiposo del epididímo, a pesar del corto período de realimentación. Además, Katan y col. (1997) reportaron que la incorporación de algunos AG tales como AEP o ADH es más rápido, y algunas veces en mayor cantidad, en plasma que en tejidos y que los precursores, AL y AAL, se incorporan en éstos últimos para conformar lípidos estructurales y de almacenamiento.

Es interesante que a 1 día de ingesta los niveles de **AAL** fueron mayores en *saliva* de los grupos DM y DO que en DCh. La alta concentración de AAL en la dieta chía y la gran afinidad de ese AG por las enzimas Δ -6 y Δ -5 desaturasas (Gibson y col., 2011), así como también el alto porcentaje de AEP observado solo en el grupo DCh, podrían justificar la disminución del AAL en el grupo DCh. Ello pondría en evidencia la activación de la vía metabólica que conduce a la conversión endógena del AAL al AEP, mientras que en las DM y DO dicho mecanismo estaría inhibido –debido a que requiere de las mismas enzimas- manteniendo valores superiores de AAL. Del mismo modo se explicarían los niveles inferiores de AL encontrados en saliva de DM con respecto a los de DO y DCh, aunque con valores superiores de ADGL –un derivado metabólico del AL- en DM con respecto a DO, mientras que en DCh no fue detectado.

En relación con los AG de cadena larga, se observó un bajo porcentaje de **AEP**, derivado del AAL, en *saliva, plasma y tejido adiposo periglandular* en el grupo DCh mientras que no fue detectado en los grupos DM y DO. En la *glándula submandibular* el nivel del AEP fue mayor en DCh que en DO -no hallado en DM- y esa diferencia fue estadísticamente significativa. Los niveles de **ADH** también fueron más altos en los fluidos y tejidos de DCh con respecto a DM y DO, pero las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en *glándula submandibular*. En cuanto a *saliva*, es importante destacar que ese AG sólo fue detectado en DCh. Por otra parte, se observó un mayor contenido de **ADGL** en *saliva* de DM que de DO -no hallado en DCh-, con diferencias estadísticamente significativas. Ding y col. (2003) reportaron que la composición de AG en plasma y en tejido adiposo reflejan el consumo dietario a largo plazo y también la síntesis *de novo* de AG a partir de elongación y desaturación de cadena de carbonos. Nuestros resultados sugieren que los AO, AAL, AEP, ADH y ADGL también reflejan la ingesta dietaria a corto plazo en fluidos y tejidos y que el metabolismo de los AL y AAL varía en función de la afinidad enzimática y de la cantidad de AG consumido, ya que ambos son sustratos competitivos para la misma secuencia de enzimas (Gibson y col., 2011).

En ese sentido, la Δ -6 desaturasa es una enzima reguladora clave en la vía metabólica que conduce a la conversión endógena del AAL al ADH e interviene en dos oportunidades (1°: conversión de 18:3 n-3 a 18:4 n-3 y 2°: conversión de 24:5 n-3 a 24:6 n-3) (Gibson y col., 2011; Brenna y col., 2009). Berlin y col. (1980) han reportado un efecto

inhibidor de los AG de cadena larga n-3 sobre la actividad de la Δ -6 desaturasa al observar una reducción del AA plasmático de ratas suplementadas con aceite de hígado de bacalao. Según Kassem y col. (2012), la afinidad de dicha enzima por los AG es AAL>AL>AO y una baja concentración del AAL es muy eficaz para suprimir el metabolismo del AL, pero se necesitan niveles moderados de este último para inhibir el del AAL. Por otra parte, solamente altas concentraciones del AO pueden suprimir el metabolismo del AL.

En cuanto a la *glándula submandibular*, se observó un bajo porcentaje del **AAL** en los animales alimentados con DCh, mientras que no fue detectado en los grupos DM y DO. Delporte y col. (2007) mencionan que la deficiencia de AG n-3 en fosfolípidos y triacilglicerol de ratas afecta, entre otros tejidos, a la glándula salival submandibular, pero que una inyección intravenosa de una emulsión de aceite de pescado, 1 o 2 horas antes de su sacrificio, aumenta el contenido de AG poliinsaturados de cadena larga n-3 en los fosfolípidos de membrana de dicha glándula.

En el *tejido adiposo periglandular* se observó una mayor incorporación del **AAL** en DCh que en los otros grupos y esa diferencia fue estadísticamente significativa. Además, sus derivados metabólicos, **AEP** y **ADP**, sólo fueron detectados en este grupo dietario. Del mismo modo, el **ADH** mostró un mayor porcentaje en DCh comparado con DM y DO, aunque esa diferencia no fue significativa. Estos resultados no son coincidentes con los observados por Popp-Snijders (1995), quien sugirió que los triacilglicerol del tejido adiposo tienen una pobre afinidad por los AG poliinsaturados de la serie n-3. Tampoco se asemejan a lo reportado por Katan y col. (1997), quienes mencionan que el AEP se incorpora en los ésteres de colesterol séricos a los 4 días de suplementación dietaria, mientras que en el tejido adiposo subcutáneo glúteo y abdominal recién lo hace a los 182 días. Por ello, los autores concluyeron que el suero refleja la ingesta dietaria de las últimas semanas, los eritrocitos la de los últimos meses y el tejido adiposo la de los últimos meses, e incluso, años.

5.1.2. Ingesta habitual

Si bien se considera ingesta habitual a partir de los 30 días de consumo, se incluyen los 15 días en esta sección, ya que tampoco se trata de una ingesta inmediata, por lo que se la podría denominar “intermedia”.

A los 15 días de ingesta se observó un elevado porcentaje de **AAL** en la *saliva* del grupo DCh comparado con DM y esa diferencia fue estadísticamente significativa. Luego de 30 días de consumo dietario (*ingesta habitual*), se observó un incremento del contenido del AAL en saliva y en plasma de DCh mientras que en las DM y DO no fue detectado. Estos resultados son semejantes a los reportados por Actis y col. (2005), quienes observaron diferencias en el perfil de AG salivales entre personas con alimentación vegetariana y mixta. En ese estudio, los autores hallaron mayores niveles de AAL en la saliva de personas con dieta vegetariana, posiblemente debido al mayor consumo de alimentos ricos en AGE tales como legumbres, frutas secas, etc., mientras que la saliva de personas con alimentación mixta presentó valores más elevados de AA. Este último cambio podría estar relacionado con un consumo importante de carnes.

Otro resultado interesante fue el alto contenido del **AEP** -de origen vegetal- que se observó a 30 días en *saliva* de los animales de los grupos DM, DO y DCh. En cuanto a *plasma*, a los 15 y 30 días de ingesta se apreció un mayor porcentaje del AEP en DCh comparado con DM y DO, diferencia que sólo fue estadísticamente significativa a los 15 días. A pesar que el AEP no fue incorporado por la dieta, sino que es un producto metabólico, sus valores siempre fueron mayores en DCh en los dos fluidos biológicos, lo cual es consistente con una ingesta rica en AAL. Este resultado a nivel experimental es coincidente con los del estudio clínico-transversal realizado por Kuriki y col. (2003), quienes reportaron correlaciones positivas entre el AEP de plasma, plaquetas, eritrocitos y tejido adiposo con el consumo de pescado, rico en AG de la serie n-3. Por otra parte, ellos observaron que los porcentajes del AEP y ADH -derivados de aceites de pescados de mar- no tenían ninguna asociación con factores ambientales, tales como el ejercicio habitual, la ingesta de alcohol y el hábito de fumar, y señalan que podría ser un biomarcador útil para establecer la ingesta relativa de AG dietarios.

En el presente estudio, el **AA** tampoco fue incorporado por la dieta pero se observó un mayor porcentaje de dicho AG en *saliva* de DM que de DO -no detectado en DCh- a los 30 días de consumo, aunque esa diferencia no fue estadísticamente significativa. Paralelamente, se encontró un mayor contenido de AA en *plasma* de DM comparado con DO y DCh, a los 15 y 30 días de consumo, con diferencias estadísticamente significativas solo a los 15 días. Estos resultados se aproximan a lo reportado por Rosell y col. (2005) en cuanto a que el plasma refleja la conversión enzimática producida por la actividad de las desaturasas y elongasas hepáticas mientras que en saliva, especialmente en la glándula submandibular, ese proceso aún no está claro. Dicha conversión contribuye a incrementar los niveles de ADGL y AA partir del AL, cuyo metabolismo se regula, como se mencionó anteriormente, mediante la afinidad por las enzimas y la cantidad de AG consumido (Kassem y col., 2012). En este sentido, cabe mencionar que los niveles medios de AA hallados en saliva, plasma y glándula submandibular en DO se debe al porcentaje moderado de AL -precursor del AA- que contiene el aceite de oliva empleado en esta dieta (véase tabla 4, pág. 54)

Al correlacionar los porcentajes del **AL** en *saliva* y *plasma* del grupo DM y también los niveles de **AO** en ambos fluidos del grupo DO, tanto a los 15 como a los 30 días de ingesta, se observaron asociaciones positivas moderadas, fuertes y muy fuertes, pero no significativas -quizás debido al número de muestras- entre saliva y plasma de los dos grupos. Estos resultados sugieren que el aumento o la disminución de los niveles de AL y AO en plasma se corresponderían con un comportamiento equivalente en la saliva submandibular. Singh y col. (2014) reportaron una correlación positiva moderada y significativa entre colesterol, triacilgliceroles, colesterol asociado a HDLP y colesterol asociado a VLDL de la saliva total y el plasma sanguíneo. Estos autores concluyeron que la saliva podría ser utilizada como un medio diagnóstico no invasivo para establecer el perfil lipídico de las personas.

Por otra parte, se observó que los niveles de **AL** y **AO** en *plasma* a los 30 días fueron más altos en las DM y DO, respectivamente, aunque las diferencias encontradas solo fueron estadísticamente significativas en la DO; por otra parte, el **AAL** sólo fue detectado en la DCh. Cabe aclarar que los mayores valores de AL y AO observados, comparativamente, en el día 1 con respecto al 30 podría deberse a que el primer tiempo de

ingesta reflejaría la persistencia de los AG de la dieta comercial -vida media- sumados a los de la dieta de laboratorio, las que fueron administradas conjuntamente durante el periodo de adaptación, mientras que el segundo tiempo reflejaría solamente los provenientes de la dieta de laboratorio. No obstante, nuestros resultados a 30 días de ingesta coinciden, en parte, con los trabajos de Arab (2003), quien también reportó una correlación positiva significativa entre el perfil de AG plasmático y las dietas elaboradas con AG de las series n-3 y n-6 en estudios realizados en animales y en seres humanos. Por ello, este autor propone que los AL y AAL plasmáticos podrían considerarse biomarcadores de su ingesta a largo plazo. Por otra parte, los resultados de nuestro trabajo no coinciden con el estudio clínico de Astorg y col. (2007), quienes indicaron que el AL puede considerarse un marcador aceptable de ingesta habitual al observar una correlación débil, pero significativa, entre su ingesta y el respectivo porcentaje plasmático. Sin embargo, estos autores no llegaron a la misma conclusión en cuanto al consumo del AAL.

En relación con el **ADH**, es importante destacar que sus porcentajes en *plasma* a los 15 y 30 días de ingesta fueron similares en todas las dietas y en todos los tiempos experimentales. Este resultado es coincidente con lo publicado por Brenna y col. (2009) en una revisión bibliográfica acerca de que son muy pocos los estudios que muestran que el porcentaje de ADH en sangre o en leche materna aumentan después de varias semanas de ingesta de dietas enriquecidas con AAL. Por ello, los autores concluyeron que la ingesta de dietas que contienen simultáneamente AAL y AL contribuye muy poco a la circulación de ADH, y que solamente el consumo de suplementos dietarios con ADH pueden incrementar considerablemente sus porcentajes sanguíneos.

Según Ahmad y col. (1990), la suplementación dietaria con AG de aceites de maíz y de pescado produce cambios estructurales y funcionales en la *glándula salival submandibular*. Hallazgos similares fueron encontrados en nuestro trabajo experimental ya que el perfil de AG de dicha glándula fue modificado por el tipo de AG dietario y su tiempo de ingesta. El nivel del **AO** fue mayor en el grupo DO30 en comparación con DO15 y éste último con respecto al DO1. Las diferencias observadas entre los valores del día 1 y del día 30 fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, los porcentajes de ese AG fueron mayores, y también estadísticamente significativos, al compararlos con los de los grupos DM y DCh a los 15 y 30 días de ingesta.

El contenido del **AAL** en la *glándula submandibular* aumentó con el tiempo, habiéndose observado un valor superior y estadísticamente significativo en el grupo DCh30 con respecto al DCh1. A la vez, es importante mencionar que ese AG no fue detectado en ninguno de los tiempos experimentales (1, 15 y 30 días) de los grupos DM y DO. Estos resultados son comparables con los del trabajo experimental publicado por Alam y Alam (1988), quienes encontraron que los AG dietarios n-3 se incorporaron en los fosfolípidos de membrana de las glándulas salivales submandibulares luego de seis semanas de ingesta. Posteriormente, el mismo equipo de investigación reportó que los cambios en la composición de AG de la membrana de la glándula submandibular -grado de insaturación y fluidez-, producto de una ingesta de grasas saturadas durante cinco semanas, podría ser revertido, en gran medida, al reemplazar esa dieta por otra enriquecida con AG n-3 (Alam y col., 1993).

En el presente estudio se observó un alto porcentaje del **AEP** en *glándula submandibular* en todas las dietas luego de 15 días de ingesta, siendo mayor en DCh, y esa diferencia fue estadísticamente significativa. Sin embargo, luego de 30 días de consumo se apreció una disminución del AEP en DCh y una ausencia de ese AG en DM y DO. Por otra parte, el contenido del **AA** de la *glándula submandibular* fue similar entre los grupos dietarios a los 15 días de consumo, pero los valores de ese AG aumentaron en DM y DO con respecto a DCh luego de 30 días de ingesta, siendo esa diferencia estadísticamente significativa. A pesar de no estar bien documentado el papel de la *glándula submandibular* en la síntesis y secreción de AG, nuestros resultados sugerirían que existe algún mecanismo endógeno que permite la conversión del AAL y AL en sus derivados metabólicos. En este sentido, Ge y col. (2002) demostraron la expresión de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa en las capas suprabasales de glándulas sebáceas humanas, la que convertiría los AGE, AL y AAL, en lípidos bioactivos como AA, AEP y ADH. Rodríguez-Cruz y col. (2006) también identificaron la presencia de enzimas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ -desaturasas en glándula mamaria de ratas y reportaron que dicha glándula no solo tiene la capacidad de sintetizar AG poliinsaturados de cadena larga (AEP, ADH y AA) sino que, también, podría estar regulada por el contenido lipídico de la dieta.

Se observó una situación particular en los niveles de **AP**, **AE**, **AO** y **AL** en *saliva*, *plasma* y *glándula submandibular* en las tres dietas y a lo largo de los tres tiempos

experimentales analizados. Se encontraron valores altos a 1 día de ingesta dietaria, los que disminuyeron a los 15 días para aumentar, finalmente, a los 30 días de consumo. Los altos porcentajes de esos AG en el día 1 podrían deberse a los AG de la dieta comercial -que todavía persistirían debido a su vida media- sumados a los de la dieta de laboratorio, las que fueron administradas conjuntamente durante el periodo de adaptación. Por lo tanto, a los 15 y 30 días, los niveles de AP, AE, AO y AL reflejarían solamente los provenientes de la dieta de laboratorio propiamente dicha. En el tejido adiposo periglandular, el comportamiento de esos AG fue diferente en los grupos dietarios y en las muestras analizadas, ya que algunos disminuyeron mientras que otros aumentaron según el tiempo de ingesta. Esos cambios podrían deberse a que la acción de la enzima liposintetasa y el metabolismo en los adipocitos es más lento que en otros fluidos y tejidos, por lo que la dieta inmediata modificaría los porcentajes de algunos A G, aunque no así los de otros.

Con respecto al *tejido adiposo periglandular*, en este trabajo se observó un incremento de **AL**, **AO** y **AAL** luego de 30 días de ingesta en los grupos DM, DO y DCh, respectivamente, y esas diferencias fueron estadísticamente significativas. A los 15 días de consumo también se encontraron diferencias, pero solamente en AO y AAL en las DO y DCh, respectivamente. Estos resultados son similares a los de Shepherd y col. (1980), quienes analizaron la composición de AG del tejido adiposo subcutáneo, a intervalos semanales, en animales alimentados con dieta rica en AG n-6. A las dos semanas de iniciada la ingesta, los autores observaron un aumento estadísticamente significativo del contenido de AL en ese tejido. En un estudio clínico, Popp-Snijders y col. (1995) reportaron que el contenido de AG de los triacilgliceroles del tejido adiposo refleja la ingesta dietaria habitual o a largo plazo de AG poliinsaturados de la serie n-3. Los resultados de Baylin y col. (2002) fueron semejantes y estos autores concluyeron que el tejido adiposo también es un biomarcador adecuado de la ingesta de los AG dietarios n-6 y *trans* y que, en los estudios epidemiológicos, los biomarcadores deben complementarse con los cuestionarios dietéticos, en lugar de sustituirse.

En estudios posteriores, Sun y col. (2007) también indicaron que el tejido adiposo refleja la ingesta de AG a largo plazo debido a que la vida media de algunos de ellos es de 680 días, aproximadamente. Por otra parte y en un estudio clínico, estos autores observaron una fuerte correlación entre la ingesta dietaria de AG n-3 de origen marino y su presencia en eritrocitos, por lo que sugirieron que estos últimos serían una alternativa al tejido adiposo como

biomarcadores de ingesta a largo plazo. Trabajos de Hodson y col. (2008) y de Huang y col. (2014) mostraron que la composición de AG en plasma y en tejido adiposo es utilizada como marcador biológico de la ingesta dietaria pero que el tejido adiposo -considerado el *gold standard*- representa mejor la ingesta dietaria habitual debido a su lento periodo de recambio y a la falta de capacidad de respuesta a la enfermedad aguda.

En cuanto al **ADH**, se observó que sus porcentajes en el *tejido adiposo periglandular* a los 15 y 30 días de ingesta fueron similares en todos los grupos experimentales aunque el grupo DCh mostró valores más altos de otros AG poliinsaturados de la serie n-3. No se encontraron trabajos científicos con similitudes en aspectos metodológicos con los cuales se pudiera comparar este resultado. Sin embargo, un estudio publicado por Neijat y col. (2017) podría explicar parcialmente lo observado en el grupo DCh, ya que ellos analizaron el impacto de dietas con AAL y con ADH exógeno en los perfiles de AG de huevos, hígado y tejido adiposo de gallinas. Los autores observaron que ambas dietas contribuyeron a una mayor acumulación de AG poliinsaturados de cadena larga en los triacilgliceroles del tejido adiposo y concluyeron que este tejido representa una vía potencial de almacenamiento dirigido a reducir un gran flujo y la acumulación de ADH -tanto los sintetizados endógenamente como su contraparte exógena- en el hígado, actuando como un medio de depósito ante un exceso de AAL y ADH. En base a la evidencia de que todos los grupos de estudio tienen un alto contenido de ADH, se podría inferir que el tejido adiposo periglandular en estos animales acumula preferentemente el ADH.

Al analizar la relación **AG n-6/n-3** en *saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular* luego de 1, 15 y 30 días de ingesta se observó, en general, una mayor proporción de AG n-6/n-3 en el grupo DM, mientras que los valores menores se detectaron en animales alimentados con DCh. Por otra parte, en el grupo DO se apreciaron valores intermedios en dicho *ratio*. Kassem y col. (2011) demostraron que las variaciones en la proporción de AG dietarios n-6/n-3 inducen cambios en el contenido de AG plasmáticos, hepáticos y adiposos de ratas preñadas luego de diez semanas de suplementación alimentaria.

Según Liu y col. (2016), la OMS considera que la proporción de AG n-6/n-3 es saludable para seres humanos cuando no superan un máximo de 4/1. En nuestro trabajo de investigación se observó que esta proporción, en la dieta comercial, se asemeja a la de la

dieta occidental de seres humanos. Por otra parte, las dietas de laboratorio DM, DO y DCh fueron elaboradas con una alta concentración de n-6, n-9 y n-3, respectivamente, con la intención de maximizar la presencia de esos AG en los fluidos y tejidos analizados. En este sentido, las dietas comercial, DM y DO mostraron proporciones de AG n-6/n-3 muy superiores a la recomendada por la OMS, no así la DCh, la que sería más beneficiosa según lo mencionado por Lands y col. (1990) para seres humanos. Según Weisburger (1997), existe un consumo excesivo y/o desequilibrado del AG n-6 en la dieta humana occidental, lo que interviene fuertemente en la patogénesis de muchas enfermedades relacionadas con el estilo de vida. Ello se debe a que el AL atraviesa un proceso de desaturación y elongación de su cadena para convertirse en AA, el que deriva posteriormente en eicosanoides proinflamatorios (leucotrienos, lipoxinas, prostaglandinas y tromboxanos) que favorecen la aparición de enfermedades tales como artritis, asma, alergias, trombosis, ateromas, etc. Por otra parte, el AAL es metabolizado por el mismo paquete de enzimas que el AL para convertirse en sus derivados, EPA y DHA, los que inhiben competitivamente los efectos adversos de la cascada del AA (Kuriki y col., 2003). Además, Senkal y col. (2005) observaron que la administración de dietas enriquecidas con AG de cadena larga n-3 conduce a una mayor incorporación de AEP y ADH, tanto en suero como en tejidos (hígado y mucosa intestinal), y afirman que la dieta puede modificar no sólo el perfil lipídico de los diferentes tejidos, sino también su respuesta inmune, especialmente la respuesta inflamatoria.

Simopoulos (2011) reportó que las enfermedades crónicas (cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunes y cáncer) son multigénicas y multifactoriales por lo que es necesario disminuir la ingesta de aceites ricos en n-6 (maíz, girasol, cártamo, semilla de algodón y soja) y aumentar la ingesta de aceites ricos en n-3 (canola, linaza, chía) y n-9 (particularmente el de oliva, que es bajo en AG n-6). Por lo tanto, el equilibrio dietario de los AG n-6/n-3 es un factor determinante en el mantenimiento de la homeostasis, el desarrollo normal y la salud mental durante todo el ciclo de vida.

5.2. Flujo salival submandibular

En el presente trabajo se observó un incremento del flujo de saliva submandibular estimulada en ratas luego de 15 y 30 días de consumo de **dieta chía** (rica en AAL), siendo mayor el valor en este último con respecto a los otros tiempos experimentales y esa diferencia fue estadísticamente significativa. Este resultado coincide con los de Iwasaki y col. (2015), quienes reportaron que la ingesta de AG poliinsaturados n-3, potasio, folatos y vitaminas antioxidantes presentes en verduras, pescados y mariscos inducen un incremento en la tasa del flujo salival en seres humanos. Además, estudios experimentales han demostrado que los AG n-3 provenientes de la dieta son incorporados en los fosfolípidos de membrana de glándulas salivales e inducen cambios en su composición lipídica (estructura) y en las actividades de la $(Na^+ K^+)$ -ATPasa y de la adenil-ciclase (función) (Alam y Alam, 1988; Ahmad y col., 1990). Según Rodríguez-Cruz y col. (2006), los AG altamente insaturados, como AEP, ADH y AA, se esterifican principalmente en fosfolípidos y contribuyen al mantenimiento de la fluidez de la membrana plasmática.

Por otra parte se observó que, a los 15 días de ingesta dietaria, los grupos **DO** y **DM** mostraron un aumento del flujo salival mientras que a los 30 días presentaron una disminución del mismo, siendo mayor la reducción del flujo en DM. Calderón y col. (1998) reportaron modificaciones en la composición de AG de membrana urotelial de animales que fueron alimentados con dietas enriquecidas con AL o con AO, las que tuvieron efectos diferenciales sobre la rigidez de la misma y, especialmente, sobre la secreción de vesículas. Años más tarde, el mismo equipo de investigación añadió que la composición de AG de la membrana celular puede influenciar diferencialmente sobre el mecanismo y el grado de secreción de vesículas. Ellos observaron que una dieta rica en AO aumentó la liberación de vesículas endocíticas, mientras que una rica en AL no modificó el mecanismo ni la cantidad de material liberado en relación con su grupo control (Grasso y Calderón, 2009).

Ahmad y col. (1990) reportaron que los AG exógenos o provenientes de la dieta se incorporan en los fosfolípidos de membrana como resultado de la acción de fosfolipasas y aciltransferasas y que modifican algunas de sus funciones, tales como el transporte celular, las características del receptor y las actividades de las enzimas asociadas a membrana. Años más tarde, Delporte y col. (2007) ratificaron que la suplementación dietaria con AG genera

modificaciones bioquímicas en los lípidos de membrana de las glándulas salivales submandibulares y, como consecuencia, la fluidez de su bicapa fosfolipídica.

La secreción de saliva mediante los órganos epiteliales de secreción o glándulas puede realizarse a través de una vía transcelular o de una vía paracelular (Kawedia y col., 2007). Murakami y col. (2001, 2006) emplearon glándulas salivales submandibulares de rata perfundidas y demostraron que la mayor parte del agua glandular se transporta mediante la vía paracelular, mientras que una fracción pequeña lo hace por la vía transcelular. Hashimoto y Murakami (2009) reportaron que la secreción salival inducida por agonistas, tales como carbacol e isoproterenol (este último utilizado en las experiencias de este trabajo de tesis), implica una mayor permeabilidad paracelular, además del transporte transcelular mediado por la acuaporina-5. Kawedia y col. (2007) indicaron que la ausencia de acuaporina-5 en las glándulas salivales de ratones deriva en una disminución del transporte de agua a través de la membrana plasmática y de las uniones intercelulares y concluyeron que las vías transcelular y paracelular actúan de manera conjunta y no por compensación. En este sentido, Saitou y col. (1998) destacaron que la ocludina se encuentra expresada en casi todas las uniones estrechas de las células epiteliales y es indispensable en la regulación de la función de barrera paracelular.

Cong y col. (2012) reportaron que tanto la ocludina como el receptor potencial transitorio vanilloide subtipo-1 (TRPV1) se expresan en las células C6 de la glándula submandibular y que la activación de este último, mediada por la capsaicina, impulsa un cambio en la permeabilidad paracelular debido a una redistribución de la oclusión celular seguida de una rápida disminución de la resistencia eléctrica transepitelial (TER) y, por consiguiente, se produce un aumento significativo en el flujo salival paracelular. Según Morales-Lázaro y col. (2013), la anandamida, el más conocido de los endocannabinoides y que deriva del AA al igual que las prostaglandinas, es un ligando endógeno del receptor canabinoide CB1 que también activa TRPV1, uniéndose al mismo sitio que la capsaicina. Ello sugiere que, el aumento en la secreción salival de la glándula submandibular observada en los tres grupos dietarios de esta investigación podría derivar, al menos en parte, a un incremento del transporte paracelular.

Como se mencionó anteriormente, los animales alimentados con DM durante 30 días presentaron una disminución del flujo salival submandibular en comparación con los

grupos DO y DCh. A nivel de la glándula submandibular se detectó un mayor contenido de AA, mientras que el porcentaje de AL fue comparable al de DO aunque inferior al de DCh, el que presentó un valor muy superior. Tomita y col. (2007) observaron un aumento del nivel de AL y una disminución de AA en la glándula submandibular de ratas añosas que no habían recibido una suplementación dietaria especial. Estos autores sugirieron que el envejecimiento podría afectar algunas funciones fisiológicas de las glándulas salivales mayores debido a que genera cambios estructurales en las mismas. En contrapartida, Lasisi y col. (2014) también reportaron que el envejecimiento está asociado con cambios morfológicos de las glándulas salivales, aunque no observaron modificaciones en el mecanismo de secreción glandular y tampoco en la composición bioquímica de la saliva de ratas añejas alimentadas con dieta estándar.

Sin embargo, en el grupo de DM15 se observó un aumento del flujo salival y, coincidentemente, una disminución en los niveles de AL, AO y AA, mientras que en el grupo DM30 se detectó una disminución del flujo salival acompañada de un incremento de esos AG. En este sentido, al analizar la asociación entre el flujo salival y los AG de la glándula submandibular del grupo DM, se encontró una correlación positiva muy fuerte para AEP y una correlación negativa leve para el AA, aunque ambas correlaciones no fueron estadísticamente significativas. Prestifilippo y col. (2006) reportaron que la anandamida, principal metabolito derivado del AA, disminuye la secreción salival de la glándula submandibular a través de la activación de los receptores canabinoides, CB₁ y CB₂, que están acoplados a las proteínas Gi/o de la membrana glandular. Según Oddi y col. (2008), esos productos bioactivos obtenidos del metabolismo del AA pueden ser almacenados en vesículas lipídicas intracelulares, aunque inicialmente se pensaba que se originaban a demanda y que se liberaban cuando era necesario. Por ello, se podría suponer que la disminución y el aumento del flujo salival observado en nuestros resultados podrían estar relacionados con los niveles de AA, derivado del AL proveniente de la dieta.

En cuanto a la asociación entre el flujo de saliva submandibular y los niveles de AG de dicha glándula, también se observó un aumento del porcentaje del AO luego de 15 días de ingesta de DO coincidente con un incremento del flujo salival, aunque este último fue seguido por una disminución a los 30 días, en el que alcanzó un valor semejante al del tiempo inicial y el AO mostró un ligero aumento. Es importante destacar que el nivel de AL

y AA en la glándula submandibular de DO15 fue más bajo que en DO1 y DO30. Por otra parte, el porcentaje del AEP mostró un valor más alto en DO15 que en DO1, mientras que en DO30 no fue detectado. Cuando se analizó la asociación entre el flujo salival y esos AG glandulares del grupo DO, sin discriminar los tiempos experimentales, se encontraron correlaciones negativas significativa, moderada y fuerte, para el AL y el AA, respectivamente, y una correlación positiva muy fuerte, pero no estadísticamente significativa, para el AEP.

Teniendo en cuenta lo mencionado en el párrafo anterior y la comparación del descenso del flujo salival en DO30 con respecto a DM30, se podría inferir que el AO tendría poco o ningún efecto sobre la producción de endocannabinoides. En este sentido, Matias y col. (2007) no hallaron efectos del AO y AP sobre la producción de endocannabinoides derivados del AA -anandamida y 2-araquidonilglicerol- luego de 72 hs de incubación en adipocitos maduros. Sin embargo, los autores observaron un aumento en los niveles de n-palmitoiletanolamina (subtipo particular de endocanabinoide que se produce e inactiva en las células y que ejerce acciones biológicas relacionadas con la inhibición de la inflamación), pero sin cambios en la estructura de fosfolípidos y triacilgliceroles de la célula grasa. Sin embargo, Artman y col. (2008) mostraron que solo es necesario un periodo corto de ingesta de aceites de palma, oliva, cártamo y pescado para producir cambios en el nivel de los endocannabinoides tisulares.

Prestifilippo y col. (2006) detectaron receptores cannabinoides en acinos, conductos y terminaciones nerviosas de la glándula submandibular de ratas. La activación del sistema endocanabinoide produce un efecto inhibitorio de la actividad de la adenil-ciclasa que, como consecuencia, disminuye la producción del AMPc. Según Bruce y col. (2002), el complejo adenil-ciclasa/AMPc es la vía de señalización intracelular que resulta en un incremento de los niveles de Ca^{+2} citosólico. Fernandez-Solari y col. (2010) mencionan que una baja concentración de Ca^{+2} podría inhibir la liberación de neurotransmisores de las terminaciones pre-sinápticas de las glándulas submandibulares, que deriva en una disminución de la secreción de saliva y, según Kopach y col. (2011), también produce una modificación de su contenido. Otro estudio demostró que los endocannabinoides activan al TRPV1 y suprimen la función post-sináptica en la circunvolución dentada del cerebro de roedores mediante la regulación de Ca^{+2} y calcineurina (Chavez y col., 2010).

El calcio representa el principal segundo mensajero que interviene en la secreción salival y un aumento en su concentración resulta fundamental para la fusión de vesículas secretorias con la membrana plasmática, así como también para el proceso de exocitosis. Por ello, la inhibición de la vía adenil-ciclasa/AMPC/ Ca^{+2} citosólico producida por la anandamida, derivado metabólico del AA, y éste a su vez del AL, tendría la capacidad de inhibir la secreción de neurotransmisores –norepinefrina o acetilcolina- por las terminaciones nerviosas simpáticas o parasimpáticas que inervan el parénquima glándular, lo que deriva en una disminución del estímulo nervioso y en una menor secreción salival. Además, la anandamida también se puede acoplar directamente a los receptores CB_1 y CB_2 presentes en las células propias de la glándula e inhibir la exocitosis en las células acinares, disminuyendo la producción de saliva por la vía transcelular (Fernandez-Solari y col., 2010; Prestifilippo y col., 2013).

Por otra parte, en DO15 se halló un aumento del flujo salival acompañado de una disminución del porcentaje del AE en glándula submandibular (diferencia estadísticamente significativa al compararlo con el de DO1) y un aumento del AO. En un trabajo sobre la incorporación de los AE y AO dentro de la membrana plasmática de células de glándula submandibular de ratas, y su efecto sobre la actividad de adenil-ciclasa, Ahmad y col. (1990) observaron que ambos AG exógenos se incorporaron rápidamente en 1-2 horas a esa membrana por la acción de las enzimas fosfolipasas y aciltransferasas. Como el AE es un AG saturado de 18 átomos de carbonos, su incorporación dentro de la membrana resulta en una disminución de su fluidez al compararla con las membranas enriquecidas con AO que es un AG monoinsaturado.

En cuanto al grupo DCh, se encontró que los niveles de AAL en la glándula submandibular fueron más altos a los 15 días y, especialmente, a los 30 días de ingesta, lo que coincidió con un incremento del flujo salival. A la vez, también se observó un aumento de AEP a los 15 días y, una disminución a los 30 días, aunque este nivel se mantuvo más alto que en el inicio del experimento. Por el contrario, se detectó que el AA disminuyó más del 50% en la DCh15 comparado con DCh1, aunque luego tuvo un ligero incremento en DCh30. Por último, cuando se analizó la asociación entre el flujo salival y esos AG n-3 de la glándula submandibular del grupo DCh se hallaron correlaciones negativas significativa,

moderada y fuerte, para los AA y ADH, respectivamente, mientras que el AEP presentó una asociación positiva débil aunque no significativa.

En un estudio experimental sobre obesidad, Alvheim y col. (2012) reportaron que el AL dietario incrementa los niveles de AA en hígado y eritrocitos y, posteriormente, eleva la concentración de endocannabinoides (2-araquidonilglicerol y la anandamida), lo que resulta en el desarrollo de una obesidad inducida por dieta. No obstante, según los autores, ese efecto adipogénico del AL puede prevenirse consumiendo dietas o suplementos con cantidades elevadas de AEP y ADH que reduzcan la concentración del AA incorporado en los fosfolípidos y, por lo tanto, normalice la producción de endocannabinoides. Ese mecanismo podría explicar, en cierta medida, el aumento en la secreción de saliva en los animales alimentados con DCh, ya que una disminución en la producción de anandamida y de 2-araquidonilglicerol derivaría en una menor activación de los receptores cannabinoides, los cuales están involucrados en la disminución de la secreción salival.

Según Naughton y col. (2013), la ingesta de dietas con grasas saturadas y poliinsaturadas producen un incremento de neurotransmisores, hormonas y glucocorticoides circulantes en sangre, los que tienen capacidad de regular la actividad de numerosos receptores de membrana acoplados a la proteína G (RAPG), incluyendo los receptores cannabinoides. Así, estos autores también sugieren que tanto los niveles circulantes de endocannabinoides como la función de sus receptores podrían ser modulados por la ingesta de AG.

En cuanto a la cuantificación de los acinos serosos y mucosos, El-Nozahy y Ahmed Ismail (2013) observaron -al comparar el efecto de dietas proteínicas de origen animal, vegetal de cereal (maíz) y vegetal de leguminosa (soja) sobre las glándulas submandibulares de ratas alimentadas con ellas durante dos meses- una disminución del tamaño de los acinos y conductos de la glándulas salivales submandibulares de los grupos que recibieron maíz y soja. Según estos autores, las dietas produjeron modificaciones sobre la estructura y la función de la glándula salival submandibular. Si bien en nuestro trabajo no se midió el tamaño de acinos y conductos, se observó una disminución en el porcentaje de área de los acinos serosos en DM30 con respecto a DM15, mientras que DO30 y DCh30 presentaron un mayor valor medio comparados con DO15 y DCh15, respectivamente.

Por otra parte, se detectó una situación diferente en el porcentaje de área de los acinos mucosos, ya que su densidad estuvo aumentada en DM30 comparado con DM15, mientras que los grupos DO y DCh presentaron valores similares, tanto a 15 como a 30 días de ingesta. En síntesis, este trabajo también demostró modificaciones estructurales y funcionales en las glándulas submandibulares de ratas alimentadas con diferentes dietas.

5.3. Biodisponibilidad de isómeros CLA en fluidos y tejidos

Aunque es abundante la información sobre los mecanismos de absorción, los efectos benéficos del CLA en las funciones biológicas y la prevención de trastornos metabólicos, no se han encontrado artículos científicos sobre su biodisponibilidad y metabolismo en los fluidos y tejidos analizados en esta investigación. Sería interesante comparar nuestros resultados con los de otros autores, pero no se han encontrado estudios realizados en seres humanos o en animales con un diseño experimental similar a éste, por lo que resulta difícil realizar la discusión de los mismos.

En este trabajo no se detectaron isómeros de CLA en saliva ni en plasma luego de 1 día de reemplazada la DCLA por DM. Sin embargo, estos isómeros fueron encontrados, con distintos porcentajes de incorporación, en glándula submandibular y en tejido adiposo periglandular. Estos resultados son similares a los de Kishita y col. (2016), quienes reportaron que los isómeros de CLA, particularmente el *trans*-10, *cis*-12-CLA, tienden a ser metabolizados rápidamente y, por lo tanto, son difíciles de detectar en sangre, corazón, bazo y riñón, no así en hígado y en tejido adiposo epididimal, los que conservaron bajas concentraciones a las 24 horas posteriores a su administración. Por ello, los autores concluyeron que pequeñas micropartículas de CLA serían más adecuadas para mantener los niveles de este AG en sangre y que se requerirían estrategias adicionales para prolongar la vida media de los isómeros de CLA en los fluidos y tejidos del organismo. En este sentido, Kim y col. (2013) también observaron que el CLA nanoemulsificado tuvo un mejor efecto antiobesidad comparado con otras formas de administración, debido a un incremento en la biodisponibilidad resultante de una mayor absorción en células y órganos de animales.

Aunque en nuestro modelo experimental con ratas no se observaron isómeros de CLA en plasma luego de 1 día del reemplazo dietario, Inversen y col. (1984) observaron que el *cis*-9,*trans*-11-CLA se encuentra normalmente en plasma humano como parte de triacilglicérols, fosfolípidos y ésteres de colesterol. Chardigny y col. (2003) reportaron que la localización del ácido ruménico (*cis*-9,*trans*-11-CLA) dentro de los triacilglicérols puede modular su biodisponibilidad en los fluidos y tejidos de ratas. Posteriormente, Zlatanov y col. (2008) sugirieron que el límite inferior normal de CLA en plasma sanguíneo

humano es, aproximadamente, el 0,1% de los AG totales y que su ingesta a través de suplementos dietarios puede aumentar su contenido plasmático.

En cuanto al perfil de AG de saliva, plasma y glándula submandibular, nuestro estudio mostró que el AL fue mayor en DCLA/1 que en DCLA/30, mientras que ocurrió lo contrario con el AA. Estos resultados indican que la ausencia o el bajo nivel de CLA, asociado con un período de ingesta de DM rica en AL, activaría la vía metabólica de los AG poliinsaturados de la serie n-6 con la posterior bioconversión del AL a AA mediada por las enzimas desaturasas.

Se observó un incremento en el nivel salival del AP en DCLA/1 con respecto a DCLA/30, mientras que el porcentaje de AE en la glándula submandibular fue mayor en DCLA/30 que en DCLA/1. El AAL y el AEP no fueron detectados en los fluidos ni en los tejidos de los tres grupos experimentales. Según Javadi y col. (2004) la suplementación con CLA durante 12 semanas reduce los niveles de ADGL, AA y ADH, así como también los de AP y AEP en hígado de ratón. Estos autores reportaron que la suplementación con isómeros de CLA y su tiempo de administración modifican significativamente el contenido de algunos AG hepáticos y que esos cambios podrían ser el resultado de una menor efectividad en el proceso de desaturación y elongación causado por el CLA.

Tal como ya se mencionado, la relación 20:4 n-6/18:2 n-6 indica la tasa de conversión del AL a AA a través de elongasas y desaturasas. Al analizar esta relación en saliva, plasma y glándula submandibular, los animales del grupo DCLA/1 mostraron la tasa más baja en comparación con los otros grupos experimentales. El plasma refleja la conversión enzimática producida por la actividad de la $\Delta 6$ -desaturasa hepática (Kassem y col., 2012), mientras que en la saliva, y especialmente en la glándula submandibular, ese proceso no está claro. Ge y col., (2002) reportaron la expresión de la Δ -6 desaturasa en las capas suprabasales de la glándula sebácea humana, en tanto que Rodríguez-Cruz y col. (2006) informaron la presencia de desaturasas en la glándula mamaria de rata, lo que indicaría su capacidad para sintetizar AEP, ADH y AA a partir de AG poliinsaturados esenciales. A pesar de que las desaturasas han sido estudiadas en diversos tejidos, no se han encontrado referencias bibliográficas acerca de la actividad de esas enzimas en las glándulas salivales.

La actividad de $\Delta 6$ - y $\Delta 5$ -desaturasas es el principal factor que controla la conversión del AL en AA, el que luego se convierte en eicosanoides derivados de AG poliinsaturados n-6 (leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos). Se conoce que estos derivados, en particular la prostaglandina E_2 , ejercen una acción estimulante en el proceso de carcinogénesis (Stawarska y col., 2015). Nuestros resultados indican que los isómeros de CLA se asocian con una reducción de la biosíntesis endógena de AL a AA. Bialek y col. (2014) demostraron el efecto inhibitorio de los isómeros de CLA sobre la actividad de $\Delta 6$ - y $\Delta 5$ -desaturasas en microsomas hepáticos de ratas con tumores mamarios inducidos químicamente. Esos autores sugirieron que el CLA reduce el nivel de AA en las células, ya sea afectando directamente el contenido de AL en las membranas o, indirectamente, a través de la regulación de su metabolismo. Además, Eder y col. (2003) demostraron que el tratamiento de las células endoteliales con isómeros de CLA reduce la formación de eicosanoides, fenómeno que podría ser el resultado de una disminución de la disponibilidad del AA.

Por otra parte, se apreció que la persistencia de isómeros de CLA varía en los tejidos analizados luego de 15 días de ingesta de DM, permaneciendo únicamente en el tejido adiposo periglandular, cuyos valores presentaron una disminución del 50%, aproximadamente, con respecto al día 1. Fariña y col. (2013) reportaron un comportamiento similar en un modelo experimental con ratas. Ellos también observaron que la máxima retención de isómeros de CLA fue encontrada en el tejido adiposo, seguida por hígado y suero, y que no fue afectada por la deficiencia de AGE. Según Baylin y col. (2002), la elevada retención de CLA en el tejido adiposo, y su alta correlación con la ingesta de ciertos AG, han permitido su empleo como biomarcadores de consumo dietario.

Además, en nuestro estudio se observó que luego de 30 días de reemplazada la DCLA por DM solo el tejido adiposo periglandular reveló la presencia de este AG, aunque en un bajo porcentaje. Con respecto al perfil de AG de ese tejido, se observó un incremento del AO en el grupo DCLA/30 en comparación con DCLA/1. Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, es importante destacar que el AL fue menor a 1 que a 30 días de ingesta de DM, mientras que el AA presentó valores más altos en el grupo DCLA/1 que en DCLA/30. Según Martins y col. (2011), el CLA se incorpora preferentemente en los triacilgliceroles que en los fosfolípidos. De este modo, los isómeros

de CLA en el grupo DCLA/1 podrían actuar como competidores del AL para su incorporación en los triacilgliceroles y no ejercerían un efecto inhibitor sobre la actividad de $\Delta 6$ - y $\Delta 5$ -desaturasa, permitiendo la libre bioconversión endógena de AL a AA.

Estos resultados sugerirían la necesidad de incorporar los isómeros de CLA a través de la ingesta dietaria en forma habitual a fin de mantener sus niveles en fluidos y tejidos y lograr así sus efectos beneficiosos en el organismo humano. Por otra parte, este trabajo también permite confirmar que, en un modelo animal, los valores de CLA no son afectados por el mayor consumo de AL, en el cual es rico el aceite de maíz (DM). Herbel y col. (1998) tampoco detectaron cambios en los valores circulantes de isómeros de CLA en personas a las que se les aumentó 2,5 veces el consumo de AL durante seis semanas. Sin embargo, otros estudios indican que el *cis*9, *trans*-11-CLA se produce en los tejidos de mamíferos a través de la conversión del ácido vaccénico a través de la acción de la enzima Δ -9 desaturasa (Santora y col., 2000; Gruffat y col., 2003).

Basado en los beneficios potenciales de los isómeros de CLA para la salud humana y, atendiendo a su retención diferenciada en el organismo, surge la necesidad de desarrollar estrategias efectivas para mejorar sus valores, tanto en saliva y plasma, como en glándula submandibular y tejido adiposo.

6

CONCLUSIÓN

6.1. Conclusiones parciales

6.1.1. Perfil de AG en fluidos y tejidos

6.1.2. Flujo salival

6.1.3. Biodisponibilidad de isómeros de CLA en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular

6.2. Conclusión final

6.3. Limitaciones del trabajo de tesis doctoral

6.4. Aportes del trabajo de tesis doctoral

CONCLUSIÓN

A continuación, se presentan las conclusiones, parciales y final, derivadas de este trabajo de tesis doctoral.

6.1. Conclusiones parciales

6.1.1 Perfil de AG en fluidos y tejidos

A 1 día de ingesta dietaria

- Incremento en los niveles de **ácido oleico** en saliva y en plasma del grupo DO con respecto a las otras dietas analizadas (DM y DCh).
- Aumento de **ácido α -linolénico** en saliva de DM y DO comparados con DCh.
- Incremento en los valores de ácido **dihomo- γ -linolénico** en saliva submandibular del grupo DM.
- El **ácido eicosapentaenoico** fue detectado en saliva, plasma y tejido adiposo periglandular solo en el grupo DCh y, en glándula submandibular, su porcentaje fue mayor en ese grupo que en DO. El **ácido docosahexaenoico** fue detectado en todos los fluidos y tejidos de DCh, aunque no así en saliva de DM y DO. Ello indica que el metabolismo del ácido α -linolénico en fluidos y tejidos es dinámico y rápido para producir sus derivados bioactivos, el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico.
- Aumento en el porcentaje de **ácido α -linolénico** en plasma y tejido adiposo periglandular de DCh con respecto a DM y DO, reflejando la ingesta dietaria inmediata, mientras que en glándula submandibular este AG solo fue encontrado en DCh.

A 15 días de ingesta dietaria

- Incremento en los niveles de **ácido α -linolénico** en saliva, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular de DCh.
- Aumento de **ácido oleico**, incorporado a través de DO, en glándula submandibular y en tejido adiposo periglandular.

- Incremento en el nivel de **ácido araquidónico** en plasma del grupo DM con respecto al de las otras dietas.
- Aumento en los niveles de **ácido eicosapentaenoico**, proveniente de la actividad metabólica del ácido α -linolénico, en plasma y glándula submandibular del grupo DCh, mientras que en el tejido adiposo periglandular este AG solo fue detectado en este grupo dietario.

A 30 días de ingesta dietaria

- Presencia de **ácido α -linolénico** en saliva, plasma y glándula submandibular solo de DCh. Además, el nivel de este AG fue mayor en el tejido adiposo periglandular de ese grupo dietario con respecto a DM y DO.
- Incremento en los valores de **ácido oleico**, incorporado mediante DO, en plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular, aunque no así en saliva.
- Aumento del **ácido linoleico** en el tejido adiposo periglandular en el grupo DM comparado con DO y DCh, lo que indicaría su utilidad como marcador de ingesta nutricional a largo plazo, teniendo en cuenta que ese AG solo puede ser incorporado mediante la dieta.
- Presencia del **ácido eicosapentaenoico** en glándula submandibular y tejido adiposo periglandular solo del grupo DCh.

6.1.2 Flujo salival

- Incremento del flujo salival a los 15 días de ingesta de DM y DO, el que luego desciende a los 30 días (ingesta habitual). Se desconocen los mecanismos que regulan dicho hallazgo.
- Aumento del flujo de saliva submandibular a los 30 días de ingesta de DCh, con alto porcentaje de AAL, con respecto a las otras dietas.

6.1.3. Biodisponibilidad de isómeros de CLA en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular

- Ausencia de isómeros de CLA en saliva y plasma a 1, 15 y 30 días posteriores al reemplazo de DCLA por DM.
- Biodisponibilidad de isómeros de CLA en tejido adiposo periglandular a 1, 15 y 30 días, aunque inversamente proporcional al tiempo transcurrido.

6.2. Conclusión final

Los hallazgos de este estudio conducen a refutar parcialmente la hipótesis planteada en este trabajo, ya que los niveles salivales de los ácidos **oleico, dihomo- γ -linolénico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico** reflejan la ingesta dietaria *inmediata*, mientras que solamente el **ácido α -linolénico** salival podría constituir un adecuado biomarcador de la ingesta dietaria *habitual*. En este sentido, los AG que no pueden ser sintetizados de manera endógena y que solo son incorporados a través de la dieta constituirían los mejores marcadores de ingesta dietaria, ya sea inmediata o habitual. Sin embargo, se recomienda la realización de nuevos estudios a fin de profundizar los resultados obtenidos con esta tesis doctoral.

En cuanto al flujo salival, los resultados obtenidos en este trabajo conducen a aceptar la hipótesis planteada, ya que los AG dietarios, y su ingesta a diferentes tiempos, modulan el volumen de saliva de las glándulas submandibulares, siendo mayor en el grupo DCh –cuyo aceite dietario es rico en ácido α -linolénico - a los 30 días de consumo. Se recomienda la realización de nuevos estudios referidos a este aceite, y a su principal AG, a mayor tiempo de ingesta y también en seres humanos, así como también sobre los mecanismos de acción en la morfología y fisiología de la glándula submandibular. Ello significaría un aporte al conocimiento de la asociación dieta-saliva, que contribuya al tratamiento y a la mejoría en la calidad de vida de las personas con disfunciones secretorias salivales, tales como la hiposialia.

6.3. Limitaciones del trabajo de tesis doctoral

En el desarrollo de esta tesis doctoral se presentaron los siguientes obstáculos y limitaciones:

- Durante la etapa experimental se debió modificar el modo de administración del aceite dietario a los animales (de incorporación a través de aguja metálica con émbolo en la punta y jeringa milimetrada a dietas en forma de panes preparadas en laboratorio y conteniendo los aceites) por sugerencia de otros investigadores con experiencia en la temática, lo que significó un nuevo diseño experimental.
- Los coeficientes, moderado, fuerte y muy fuerte, observados en algunas correlaciones permiten inferir que existe una importante tendencia de asociación aunque no significativa. Sin embargo se observó que, incrementando ligeramente el tamaño muestral, dichas correlaciones se vuelven altamente significativas. Ello se puede probar en simulaciones estadísticas a través del programa Infostat. Por lo tanto, sería recomendable incrementar el número de muestras a fin de optimizar los resultados de este trabajo.
- Los análisis de glándulas salivales submandibulares mediante microscopía electrónica fueron realizados solamente en algunas muestras de animales alimentados con las dietas de estudio durante 30 días, debido a las modificaciones observadas con microscopía óptica en ese tiempo experimental y al elevado costo de ese procedimiento.

6.4. Aporte del trabajo de tesis doctoral

Uno de los mayores desafíos que enfrenta la epidemiología nutricional es la ambigüedad en las mediciones de los registros dietarios, los cuales limitan la precisión estadística para detectar una posible asociación dieta-enfermedad. Este trabajo de investigación permitió la caracterización del perfil de AG de saliva submandibular de rata con relación al tiempo de ingesta de lípidos dietarios, aplicado a la búsqueda de biomarcadores nutricionales, y mostró que ciertos AG salivales constituyen un biomarcador de ingesta dietaria, ya sea inmediata o habitual, lo que podría ser un indicador de riesgo de

enfermedades no transmisibles y estrechamente vinculadas a la alimentación como diversos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, este trabajo de tesis pone en evidencia la influencia de los AG dietarios sobre el flujo de saliva submandibular, lo que constituiría un aporte a la clínica debido al importante papel de la saliva en la cavidad bucal y en el mantenimiento de la salud sistémica, entre otras funciones relevantes.

Asimismo, se aporta información sobre la biodisponibilidad de isómeros de CLA en saliva, plasma, glándula submandibular y tejido adiposo periglandular luego de su administración a través de la dieta. En este sentido, se comprobó que la biodisponibilidad de los isómeros de CLA en fluidos y tejidos de rata podría ser empleada como un biomarcador de ingesta dietaria, inmediata o habitual y, por otra parte, se estableció la frecuencia que se requiere de su ingesta a fin de obtener sus potenciales efectos preventivos y saludables.

Finalmente, este estudio contribuyó a la investigación en la saliva como un medio práctico y confiable de vigilancia de la salud en diferentes áreas de estudio, ya que ofrece numerosas ventajas en relación con otros fluidos biológicos, tales como plasma y orina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Actis AB, Perovic NR, Defagó D, Beccacece C, Eynard AR (2005). Fatty acid profile of human saliva: a possible indicator of dietary fat intake. *Arch Oral Biol* 50: 1-6.
2. Actis AB. Glándulas salivales. En: Sistema Estomatognático. Bases morfofuncionales aplicadas a la clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, 2014; pág. 211-231.
3. Ahmad SN, Alam SQ, Alam BS (1990). Influence of dietary omega-3 fatty acids on transmembrane signaling in rat submandibular salivary glands. *Cell Signal* 2: 2941-2944.
4. Alam SQ, Alam BS (1988). *In vivo* incorporation of n-3 fatty acids into membrane lipids of salivary glands and changes in adenylate cyclase activity. *Arch Oral Biol* 33: 295-299.
5. Alam SQ, Mannino SJ, Alam BS (1993). Reversal of diet-induced changes in adenylate cyclase activity and fatty acid composition of rat submandibular salivary gland lipids. *Arch Oral Biol* 38: 387-391.
6. Alam SQ, Shi YY (1997). The effect of essential fatty acid deficiency on the fatty acid composition of different salivary glands and saliva in rats. *Arch Oral Biol* 42: 727-734.
7. Alvheim AR, Malde MK, Osei-Hyiaman D, Hong Lin Y, Pawlosky RJ, Madsen L y col. (2012). Dietary linoleic acid elevates endogenous 2-AG and anandamide and induces obesity. *Obesity* 20: 1984-1994.
8. Aps JK, Martens LC (2005). The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 10: 119-131.
9. Arab L (2003). Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J Nutr* 133: 925-932.

10. Artmann A, Petersen G, Hellgren LI, Boberg J, Skonberg C, Nellesmann C y col. (2008). Influence of dietary fatty acids on endocannabinoid and N-acyl ethanolamine levels in rat brain, liver and small intestine. *Biochim Biophys Acta* 1781: 200–212.
11. Astorg P, Bertrais S, Laporte F, Arnault N, Estaquio C, Galan P y col. (2008). Plasma n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids as biomarkers of their dietary intakes: a cross-sectional study within a cohort of middle-aged French men and women. *Eur J Clin Nutr* 62: 1155-1161.
12. Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H (2002). Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr* 76: 750–757.
13. Belstrøm D, Holmstrup P, Bardow A, Kokaras A, Fiehn NE, Paster BJ (2016). Comparative analysis of bacterial profiles in unstimulated and stimulated saliva samples. *J Oral Microbiol* 8: 301-312.
14. Berlin E, Matusik EJ, Young C (1980). Effect of dietary fat on the fluidity of platelet membranes. *Lipids* 15: 604–608.
15. Białek A, Tokarz A, Dudek A, Kazimierska W, Bielecki W (2010). Influence of diet enriched with conjugated linoleic acids on their distribution in tissues of rats with DMBA induced tumors. *Lipids Health Dis* 9: 126-135.
16. Blanco A, Blanco G. Lípidos; Membranas; Metabolismo de lípidos. En: *Química Biológica*. 10^a ed. Editorial El Ateneo, Buenos Aires, Argentina, 2015; pág. 95-113; 197-226; 291-326.
17. Brenna JT, Salem Jr N, Sinclair AJ, Cunnane SC (2009). Alpha-linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in humans. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 80: 85–91.
18. Brosky ME (2007). The role of saliva in oral health: strategies for prevention and management of xerostomia. *J Support Oncol* 5: 215-225.

19. Bruce JI, Shuttleworth TJ, Giovannucci DR, Yule DI (2002). Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in parotid acinar cells. A mechanism for the synergistic effects of cAMP on Ca^{++} signaling. *J Biol Chem* 277: 1340–1348.
20. Brunner E, Stallone D, Juneja M, Bingham S, Marmot M (2001). Dietary assessment in Whitehall II: comparison of 7 d diet diary and food frequency questionnaire and validity against biomarkers. *Br J Nutr* 86: 405–414.
21. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC (2006). Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36: 485–501.
22. Burdge GC, Lupoli B, Russell JJ, Tricon S, Kew S, Banerjee T y col. (2004). Incorporation of *cis*-9,*trans*-11 or *trans*-10,*cis*-12 conjugated linoleic acid into plasma and cellular lipids in healthy men. *J Lipid Res* 45: 736-741.
23. Calderón RO, Glocker M, Eynard AR (1998). Lipid and fatty acid composition of different fractions from rat urinary transitional epithelium. *Lipids* 33: 1017-1024.
24. Cantellops D, Reid AP, Eitenmiller RR, Long AR (1999). Determination of lipids in infant formula powder by direct extraction methylation of lipids and fatty acid methyl esters (FAME) analysis by gas chromatography. *J AOAC* 82: 1128-1139.
25. Cantwell H, Devery R, OShea M, Stanton C (1999). The effect of conjugated linoleic acid on the antioxidant enzyme defense system in rat hepatocytes. *Lipids* 34: 833-839.
26. Cantwell MM (2000). Assessment of individual fatty acid intake. *Proc Nutr Soc* 59: 187–191.
27. Cardoso EML, Arregger AL, Tumilasci OR, Elbert A (2009). Assessment of salivary urea as a less invasive alternative to serum determinations. *Scand J Clin Lab Invest* 69: 330-334.

28. Chantell L, Schultz S, Waldman SA (2007). Cancer biomarkers. Where medicine, business and public policy intersect. *Biotechnol Health* 28: 33-42.
29. Chardigny JM, Masson E, Sergiel JP, Darbois M, Loreau O, Noel JP y col. (2003). The position of rumenic acid on triacylglycerols alters its bioavailability in rats. *J Nutr* 133: 4212-4214.
30. Chavez AE, Chiu CQ, Castillo PE (2010). TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic long-term depression in dentate gyrus. *Nat Neurosci* 13: 1511–1518.
31. Chee B, Park B, Fitzsimmons T, Coates AM, Bartold PM (2016). Omega-3 fatty acids as an adjunct for periodontal therapy - a review. *Clin Oral Invest* 20: 879–894.
32. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 383: 30-40.
33. Cong X, Zhang Y, Shi L, Yang NY, Ding C, Li J y col. (2012). Activation of transient receptor potential vanilloid subtype 1 increases expression and permeability of tight junction in normal and hyposecretory submandibular gland. *Lab Invest* 92: 753-768.
34. Comba A, Maestri DM, Berra MA (2010). Effect of ω -3 and ω -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. *Lipids Health Dis* 9: 112-117.
35. Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación (2008). *Nutrición y Grasas*. Bruselas. Disponible en: <http://www.eufic.org>.
36. Dain A, Repossi G, Diaz-Gerevini GT, Vanamala J, Das UN, Eynard AR (2016). Long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) and nordihydroguaiaretic acid (NDGA) modulate metabolic and inflammatory markers in a spontaneous type 2 diabetes mellitus model (Stillman Salgado rats). *Lipids Health Dis* 15: 205-210.

37. De Paul AL, Attademo AM, Carón RW, Soaje M, Torres AI, Jahn GA y col. (2009). Neuropeptide glutamic-isoleucine (NEI) specifically stimulates the secretory activity of gonadotrophs in primary cultures of female rat pituitary cells. *Peptides* 30: 2081-2087.
38. Delporte C, Malaisse WJ, Jurysta C, Portois L, Sener A, Carpentier YA (2007). Altered fatty acid pattern of phospholipids and triglycerides in the submandibular gland of omega3-depleted rats. *Eur J Oral Sci* 115: 103-110.
39. Devlin TM. Biomoléculas. En *Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ª ed. Editorial Reverte, Barcelona, España, 2004; pág. 1104-1110.
40. Ding NZ, Teng CB, Ma H (2003). Peroxisome proliferator activated receptor delta expression and regulation in mouse uterus during embryo implantation and decidualization. *Mol Reprod Dev* 66: 218-224.
41. Dodds WJ, Johnson DA, Yeh CK (2005). Health benefits of saliva: a review. *J Dent* 3: 223-233.
42. Doubleday AW (1909). Plodding toward diagnosis by salivary analysis. *Dent Cosmos* 51: 412-421.
43. Espín J, Mérida JA, Sánchez-Montesinos I. Glándulas salivares: Estudio de las glándulas parótida, submandibular y sublingual. En *Lecciones de Anatomía Humana*, Editorial Fleming, Granada, España, 2003; pág. 95-98.
44. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *European Treaty Series - No. 123*. Strasbourg, 1986.
45. Fariña AC, González MA, Latorre ME, Bernal CA (2013). Efectos de los conjugados del ácido linoleico sobre la incorporación tisular de ácidos grasos y metabolismo lipídico en ratas deficientes en ácidos grasos esenciales. *Revista FABICIB* 17: 85-102.

46. Fernandez-Solari J, Prestifilippo JP, Ossola CA, Rettori V, Elverdin JC (2010). Participation of the endocannabinoid system in lipopolysaccharide-induced inhibition of salivary secretion. *Arch Oral Biol* 5: 583–590.
47. Feunekes GI, Van Staveren WA, De Vries JH, Burema J, Hautvast JG (1993). Relative and biomarker-based validity of a food-frequency questionnaire estimating intake of fats and cholesterol. *Am J Clin Nutr* 58: 489-496.
48. Folch J, Lees M, Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-508.
49. Gartner LP, Hiat JL. Tejido epitelial de revestimiento y glandular. En: Atlas en color de Histología. 5ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 2011; pág. 56-75.
50. Ge L, Gordon JS, Hsuan C, Steenn K, Prouty S (2003). Identification of Δ -6 desaturase of human sebaceous gland: expression and enzyme activity. *J Investig Dermatol* 120: 707-714.
51. Gibson R, Muhlhauler B, Makrides M (2011). Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr* 7: 17-26.
52. Gil-Montoya JA, Silvestre JF, Barrios R, Silvestre-Rangil J (2016). Treatment of xerostomia and hyposalivation in the elderly: a systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 21: 355–366.
53. Gómez de Ferraris M, Campos Muñoz A. Glándulas salivales. Histología y embriología. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España, 2009; pág. 140-146.
54. Grasso EJ, Calderón RO (2009). Urinary bladder membrane permeability differentially induced by membrane lipid composition. *Mol Cell Biochem* 330: 163-165.

55. Gruffat D, La Torre A, Chardigny JM, Durand D, Loreau O, Sébédio JL y col. (2003). In vitro comparison of hepatic metabolism of 9*cis*-11*trans* and 10*trans*-12*cis* isomers of CLA in the rat. *Lipids* 38: 157-163.
56. Harwood JL (1996). Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acid. *Biochim Biophys Acta* 1301: 7-56.
57. Hashimoto S, Murakami M (2009). Morphological evidence of paracellular transport in perfused rat submandibular glands. *J Med Invest* 56: 395-397.
58. Hayes DF (2015). Biomarker validation and testing. *Mol Oncol* 9: 960–966.
59. Herbel BK, McGuire MK, McGuire MA, Shultz TD (1998). Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans. *Am J Clin Nutr* 67: 332-337.
60. Hipkæo W, Watanabe M, Kondo H (2015). Localization of cannabinoid receptor 1 (CB1) in submandibular and sublingual salivary glands of mice throughout postnatal development. *Int J Morphol* 33: 695-700.
61. Hodson L, Murray Skeaff C, Fielding BA (2008). Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res* 47: 348–380.
62. Hoffman LF (2001). Human saliva as a diagnostic specimen. *J Nutr* 131: 1621-1625.
63. Huang X, Sjögren P, Cederholm T, Ärnlov J, Lindholm B, Risérus U y col. (2014). Serum and adipose tissue fatty acid composition as biomarkers of habitual dietary fat intake in elderly men with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 29: 128–136.
64. Humphrey SP, Williamson RT (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 85: 162-169.

65. Infostat v.p.1. 2005. Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
66. Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996.
67. Inversen SA, CaWood P, Madigan MJ, Lawson AM, Dormandy TL (1984). Identification of a diene conjugated component of human lipid as octadeca-9,11-dienoic acid. FEBS Lett 171: 320-324.
68. Iwasaki M, Yoshihara A, Ito K, Sato M, Minagawa K, Muramatsu K y col. (2015). Hyposalivation and dietary nutrient intake among community-based older Japanese. Geriatr Gerontol Int 1: 1-8.
69. Jaeger SR, Marshall DW, Dawson J (2009). A quantitative characterization of meals and their contexts in a sample of 25 to 49-year-old Spanish people. Appetite 52: 318-327.
70. Johnson DA, Cortez JE (1988). Chronic treatment with beta adrenergic agonists and antagonists alters the composition of proteins in rat parotid saliva. J Dent Res 67: 1103-1118.
71. Kalburgi V, Leburu S, Warad S (2014). Saliva as a surrogate to explore the association between lipid profiles and chronic periodontitis: a case-control study. Dent Res J 11: 619-623.
72. Kassem AA, Abu Bakar MZ, Yong Meng G, Mustapha NM (2012). Dietary (n-6: n-3) fatty acids alter plasma and tissue fatty acid composition in pregnant Sprague Dawley rats. Sci World J 85: 1437-1444.
73. Katan MB, Deslypere JP, van Birgelen APJM, Penders M, Zegwaard M (1997). Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters,

- erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study. *J Lipid Res* 38: 2012–2022.
74. Kaufman E, Lamster IB (2002). The diagnostic applications of saliva. A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 197-212.
75. Kawedia JD, Nieman ML, Boivin GP, Melvin JE, Kikuchi K, Hand AR y col. (2007). Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex. *Proc Natl Acad Sci* 104: 3621–3626.
76. Kibayashi M, Tanaka M, Nishida N, Kuboniwa M, Kataoka K, Nagata H y col. (2007). Longitudinal study of the association between smoking as a periodontitis risk and salivary biomarkers related to periodontitis. *J Periodontol* 78: 859-867.
77. Kim D, Park JH, Kweon DJ, Han GD (2013). Bioavailability of nanoemulsified conjugated linoleic acid for an antiobesity effect. *Int J Nanomed* 8: 451–459.
78. Kishita K, Ibaraki K, Itakura S, Yamasaki Y, Nishikata N, Yamamoto K y col. (2016). Preparation of conjugated linoleic acid microemulsions and their biodistribution. *J Oleo Sci* 65: 949-954.
79. Knudsen LE, Hansen AM (2007). Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *Int J Hyg Environ Health* 210: 461-470.
80. Koller MM, Maeda N, Purushotham KR, Scarpace PJ, Humphreys-Beher MG (1992). A biochemical analysis of parotid and submandibular salivary gland function with age after simultaneous stimulation with pilocarpine and isoproterenol in females fisher 344 rats. *Arch Oral Biol* 37: 219–230.
81. Koller MM, Maeda N, Scarpace PJ, Humphreys-Beher MG (2000). Desipramine changes salivary gland function, oral microbiota, and oral health in rats. *Eur J Pharmacol* 408: 91–98.

82. Koneru S, Tanikonda R (2014). Salivaomics: a promising future in early diagnosis of dental diseases. *Dent Res J* 11: 11-15.
83. Kopach O, Vats J, Netsyk O, Voitenko N, Irving A, Fedirko N (2011). Cannabinoid receptors in submandibular acinar cells: functional coupling between saliva fluid and electrolytes secretion and Ca^{++} signalling. *J Cell Sci* 125: 1884-1895.
84. Kramer JKG, Parodi PW, Jensen RG, Mossoba MM, Yurawecz MP, Adlof RO (1998). Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids* 33: 835-839.
85. Kritchevsky D, Tepper SA, Wright S, Tso P, Czarnecki SK (2000). Influence of conjugated linoleic acid (CLA) on establishment and progression of atherosclerosis in rabbits. *J Am Coll Nutr* 19: 472-477.
86. Kuriki K, Nagaya T, Tokudome Y, Imaeda N, Fujiwara N, Sato J y col. (2003). Plasma concentrations of (n-3) highly unsaturated fatty acids are good biomarkers of relative dietary fatty acid intakes: a cross-sectional study. *J Nutr* 133: 3643-1650.
87. Lands WE, Morris A, Libelt B (1990). Quantitative effects of dietary polyunsaturated fats on the composition of fatty acids in rat tissues. *Lipids* 25: 506-516.
88. Larsson B, Olivecrona G, Ericson T (1996). Lipids in human saliva. *Arch Oral Biol* 41: 105-110.
89. Lasisi TJ, Shittu ST, Oguntokun MM, Tiamiyu NA (2014). Aging affects morphology but not stimulated secretion of saliva in rats. *Ann Ib Postgrad Med* 12: 109-114.
90. Latarjet M, Ruiz A. *Anatomía Humana*. 4ª ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, 2005; pág. 1372-1394; 1779-1782.
91. Lawrence HP (2002). Salivary markers of systemic disease: noninvasive diagnosis of disease and monitoring of general health. *J Can Dent Assoc* 68: 170-174.

92. Lima DP, Diniz DG, Moimaz SA, Sumida DH, Okamoto AC (2010). Saliva: reflection of the body. *Int J Infect Dis* 14: 184-188.
93. Liu L, Hu Q, Wu H, Xue Y, Cai L, Fang M y col. (2016). Protective role of n6/n3 PUFA supplementation with varying DHA/EPA ratios against atherosclerosis in mice. *J Nutr Biochem* 32: 171-180.
94. Llana-Puy C (2006). The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol* 11: 449-555.
95. Macri EV, Gonzales Chaves MM, Rodriguez PN, Mandalunis P, ZeniFima Lifshitz S, Friedman SM (2012). High-fat diets affect energy and bone metabolism in growing rats. *Eur J Nutr* 51: 399-406.
96. Malovrh T, Melkic E, Kompan D, Levart A, Kompan L (2014). Incorporation of conjugated linoleic acid isomers into porcine erythrocytes. *Eur J Nutr* 53: 989-993.
97. Mandel ID, Einstein A (1969). Lipids in human salivary secretion and salivary calculus. *Arch Oral Biol* 14: 231-233.
98. Manns Freese A (2013). Fisiología de la secreción salival (cap. 24). En: *Sistema Estomatognático. Fundamentos clínicos de fisiología y patología funcional*. Editorial Amolca. Venezuela. ISBN: 978-958-8760-75-9.
99. Marley G, Kang D, Wilson EC, Huang T, Qian Y, Li X y col. (2014). Introducing rapid oral-fluid HIV testing among high risk populations in Shandong, China: feasibility and challenges. *BMC Public Health* 14: 422-424.
100. Matias I, Carta G, Murru E, Petrosino S, Banni S, Di Marzo V (2008). Effect of polyunsaturated fatty acids on endocannabinoid and N-acyl-ethanolamine levels in mouse adipocytes. *Biochim Biophys Acta* 1781: 52-60.
101. McGuire MA, McGuire MK (1999). Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *J Anim Sci* 77: 1-8.

102. Mese H, Matsuo R (2007). Salivary secretion, taste and hyposalivation. *J Oral Rehabil* 34: 711–723.
103. Mollard RC, Kovacs HR, Fitzpatrick-Wong SC, Weiler HA (2005). Low levels of dietary arachidonic and docosahexaenoic acids improve bone mass in neonatal piglets, but higher levels provide no benefit. *J Nutr* 135: 505–512.
104. Montejo González JC, Culebras-Fernández JM, García de Lorenzo, Mateos A (2006). Recommendations for the nutritional assessment of critically ill patients. *Rev Med Chile* 134: 1049-1056.
105. Morales-Lázaro SL, Simon SA, Rosenbaum T (2013). The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J Physiol* 591: 3109–3121.
106. Muñoz S, Piegari M, Guzmán C, Eynard A (1999). Differential effects of dietary oenothera, zizyphus mistol, and corn oils, and essential fatty acid deficiency on the progression of a murine mammary gland adenocarcinoma. *Nutrition* 15: 208-112.
107. Murakami M, Shachar-Hill B, Steward MC, Hill AE (2001). The paracellular component of water flow in the rat submandibular salivary gland. *J Physiol* 537: 899–906.
108. Murakami M, Murdiastuti K, Hosoi K, Hill AE (2006). AQP and the control of fluid transport in a salivary gland. *J Membr Biol* 210: 91-103.
109. Naughton SS, Mathai ML, Hryciw DH, McAinch AJ (2013). Fatty acid modulation of the endocannabinoid system and the effect on food intake and metabolism. *Int J Endocrinol*. Article ID 361895, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/361895>
110. O'Shea M, Devery R, Lawless F, Murphy J, Stanton C (2000). Milk fat conjugated linoleic acid (CLA) inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Res* 20: 3591–3601.

111. Oddi S, Fezza F, Pasquariello N (2008). Evidence for the intracellular accumulation of anandamide in adiposomes. *Cell Mol Life Sci* 65: 840-850.
112. Ohlin P (1964). Isoprenaline as secretory agent in salivary gland. *Acta Univ Lund* 17: 1-8, section II.
113. Organización Mundial de la Salud. Informe sobre la salud en el mundo 2002. Reducir los riesgos y promover una vida sana. Ginebra, 2002. Disponible en: http://www.who.int/whr/2002/en/Overview_spain.pdf
114. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Fundación Iberoamericana de Nutrición (FINUT). Granada, España, 2012.
115. Parodi PW (1999). Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J Dairy Sci* 82: 1339-1349.
116. Pink R, Simek J, Vondrakova J, Faber E, Michl P, Pazdera J (2009). Saliva as a diagnostic medium. *Biomed Pap Med* 153: 103-110.
117. Popp-Snijders C, Blonk MC (1995). Omega-3 fatty acids in adipose tissue of obese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus reflect long-term dietary intake of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid. *Am J Clin Nutr* 61: 360-365.
118. Prestifilippo JP, Fernández-Solari J, de la Cal C, Iribarne M, Suburo AM, Rettori V (2006). Inhibition of salivary secretion by activation of cannabinoid receptors. *Exp Biol Med* 231: 1421-1429.
119. Prestifilippo JP, Medina VA, Mohn CE, Rodriguez PA, Elverdin JC, Fernandez-Solari J (2013). Endocannabinoids mediate hyposalivation induced by inflammogens in the submandibular glands and hypothalamus. *Arch Oral Biol* 58: 1251-1259.
120. Puy CL (2006). The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11: 449-4553.

121. Rabinowitz JL, Shannon IL (1975). Lipid changes in human male parotid saliva by stimulation. *Arch Oral Biol* 20: 403-406.
122. Rincón-Cervera MÁ, Valenzuela R, Hernandez-Rodas MC, Barrera C, Espinosa A, Marambio M y col. (2016). Vegetable oils rich in alpha linolenic acid increment hepatic n-3 LCPUFA, modulating the fatty acid metabolism and antioxidant response in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 111: 25-35.
123. Rodríguez-Cruz M, Tovar AR, Palacios-González P, Prado M, Torres N (2006). Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of D5 and D6 desaturases, SREBP-1, PPAR, and PGC-1. *J Lipid Res* 47: 553-560.
124. Rodríguez-Cruz M, Tovar AR, Prado M, Torres N (2005). Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev Invest Clín* 57: 457-472.
125. Ronchi A, Marinari GM, Sukkar SG, Scopinaro N, Adami GF (2008). Behavioral characteristics of severely obese patients seeking bariatric surgery: cross-sectional study with alimentary interview. *Behav Med* 33: 145-150.
126. Rosell MS, Lloyd-Wright Z, Appleby PN, Sanders TAB, Allen NE, Key TJ (2005). Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in plasma in British meat-eating, vegetarian, and vegan men. *Am J Clin Nutr* 82: 327-334.
127. Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M y col. (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141: 397-408.
128. Salim de Castro G, Andreoli MF, Illesca PG, Payao Ovidio P, Bernal CA, Jordao AA y col. (2014). Refeeding with conjugated linoleic acid increases serum cholesterol and modifies the fatty acid profile after 48 hours of fasting in rats. *Nutr Hosp* 30: 1303-1312.

- 129.Santora JE, Palmquist DL, Roehrig KL (2000). Trans vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. *J Nutr* 130: 208-215.
- 130.Santosh AB, Jones T, Harvey J (2016). A review on oral cancer biomarkers: understanding the past and learning from the present. *J Can Res Ther* 15: 486-492.
- 131.Sato M. Salivary gland tumors. En: *Human cell culture*. Editorial Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda, 2001; pág. 161-178.
- 132.Schenkels L, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV (1995). Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Rev Oral Biol Med* 6: 161-175.
- 133.Schneyer CA, Schneyer LH (1960). Electrolyte levels of rat salivary secretions in relation to fluid-flow rate. *Am J Physiol* 199: 55-58.
- 134.Senkal M, Haaker R, Linseisen J, Wolfram G, Homann HH, Stehle P (2005). Preoperative oral supplementation with long-chain omega-3 fatty acids beneficially alters phospholipid fatty acid patterns in liver, gut mucosa, and tumor tissue. *J Parenter Enteral Nutr* 29: 236-240.
- 135.Shepherd J, Stewart JM, Clark JG, Carr K (1980). Sequential changes in plasma lipoproteins and body fat composition during polyunsaturated fat feeding in man. *Brit J Nutr* 44: 265-271.
- 136.Shingfield KJ, Reynolds CK, Hervás G, Griinari JM, Grandison AS, Beever DE (1989). Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to fish oil and sunflower oil in the diet of dairy cows. *Dairy Sci* 714-732.
- 137.Simopoulos AP (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med* 233:674-688.
- 138.Singh S, Ramesh V, Oza N, Balamurali PD, Prashad KV, Balakrishnan P (2014). Evaluation of serum and salivary lipid profile: a correlative study. *J Oral Maxillofac Pathol* 18: 4-8.

- 139.Slomiany BL, Kosmala M, Nadziejko C, Murty VL, Gwozdziński K, Slomiany A y col. (1986). Lipids composition and viscosity of parotid saliva in Sjögren syndrome in man. *Arch Oral Biol* 31: 699-702.
- 140.Slomiany BL, Witas H, Murty VL, Slomiany A, Mandel ID (1983). Association of lipids with proteins and glycoproteins in human saliva. *J Dent Res* 62: 24-27.
- 141.Soares Nunes LA, Mussavira S, Sukumaran Bindhu O (2015). Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med* 25: 177-192.
- 142.Sreebny LM (2000). Saliva in health and disease: an appraisal and update. *Int Dent J* 50: 140-161.
- 143.Suarez C, Ferreira Monteiro A, Macri E, Chiarenza A, Zeni S, Rodríguez P, Boyer P, Friedman S (2012). Dietas ricas en grasa y composición corporal a lo largo de dos generaciones. Estudio experimental. *Endocrinol Nutr* 59: 232-238.
- 144.Suazo GI, Roa HIJ (2008). Anatomía microscópica de las glándulas salivales por medio de una técnica histológica convencional y no convencional. *Int J Morphol* 26: 689-695.
- 145.Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition. Committee on Animal Nutrition. Board on Agriculture. National Research Council. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academy Press; 1995.
- 146.Sun Q, Ma J, Campos H, Hankinson SE, Hu FB (2007). Comparison between plasma and erythrocyte fatty acid content as biomarkers of fatty acid intake in US women. *Am J Clin Nutr* 86: 74-81.
- 147.Tavella M, Perego L, Peterson G, Espeche M, Marteau S (2003). Ácidos grasos trans: concepto e implicancias clínicas. Programa de Prevención del Infarto en Argentina (PROPIA). Instituto de Investigaciones Bioquímicas de la Plata (INIBIOLP).

- Disponible en la URL: [http:// www.nutrinfo.com/pagina/info/trans.htm](http://www.nutrinfo.com/pagina/info/trans.htm). (citado el 9 de agosto, 3:46 pm).
148. Tomita Y, Miyake N, Yamanaka S (2007). Phospholipid profiles in the salivary glands of rats of different ages. *J Oleo Sci* 56: 369-375.
149. Turner RJ, Sugiya H (2002). Understanding salivary fluid and protein secretion. *Oral Dis* 8: 3-11.
150. Wardlaw GM, Hampl JS, DiSilvestro RA. Lipids. En: *Perspectives in Nutrition*. 6^a ed. Editorial Mc Graw Hill, Nueva York, EE.UU, 2004; pág. 217-238.
151. Weber R (1930). Phosphoric acid in saliva and observations on salivary content of lipids and phospholipids. *Z Stomat* 28: 223-225.
152. Weisburger JH (1997). Dietary fat and risk of chronic disease: mechanistic insights from experimental studies. *J Am Diet Assoc* 97: 16-23.
153. Wilkes JJ, Bonen A, Bell RC (1998). A modified high-fat diet induces insulin resistance in rat skeletal muscle but not adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 275: 679-686.
154. Wong DT (2012). Salivaomics. *J Am Dent Assoc* 143: 19-24.
155. Zamora-Ros R, Urpí-Sardà M, Lamuela-Raventós RM, Estruch R, Vázquez-Agell M, Serrano-Martínez M y col. (2006). Diagnostic performance of urinary resveratrol metabolites as a biomarker of moderate wine consumption. *Clin Chem* 52: 1373-1380.
156. Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH y col. (2010). Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology* 138: 949-957.
157. Zhang L, Xiao H, Wong DT (2009). Salivary biomarkers for clinical applications. *Mol Diagn Ther* 13: 245-259.

- 158.Zlatanov SN, Laskaridis K, Sagredos A (2008). Conjugated linoleic acid content of human plasma. *Lipids Health Dis* 7: 34-40.

ANEXOS
