



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**EFFECTO DEL ACIDO LINOLEICO DE LA DIETA SOBRE LA
BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS DE
CADENA LARGA (LC-PUFAs) Y SOBRE LA EXPRESION
GENICA DE LA D6D y D5D DESATURASAS QUE
SINTETIZAN LC-PUFAs.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. MARICELA RODRIGUEZ CRUZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. NIMBE TORRES Y TORRES

MEXICO, D.F.

ABRIL, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LA UNIDAD DE INVESTIGACION MEDICA EN NUTRICION, DEL HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SXXI-IMSS, Y EN EL LABORATORIO DE FISIOLOGIA DE LA NUTRICION DEL INCMNSZ.

TRABAJO FINANCIADO POR CONACYT, CLAVE 39804

*Dame señor,
acierto al empezar,
dirección al avanzar
y perfección al terminar*

DEDICATORIA

DIOS

MI MADRE

MI ABUELITA

ARIADNA

ANGELES

HUMBERTO

INDICE

	Página
I. RESUMEN	1
 II. INTRODUCCION	
A. Ácidos grasos poli-insaturados	6
B. Lactancia	12
C. Contribución de los PUFAs y LC-PUFAs dietarios en la composición de los lípidos de la leche	15
D. Síntesis endógena de los PUFAs	16
a). Expresión génica de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$	19
b) Regulación de la expresión génica de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$	19
 III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
 IV. OBJETIVOS	
 V. HIPOTESIS	
 VI. ESTRATEGIA METODOLOGICA	
A. Tipo de estudio	29
B. Ubicación espacio temporal	29
C. Animales	29
D. Registro de la ingesta diaria	31
E. Registro del peso corporal de las madres y de las crías	31
F. Conversión del ácido linoléico (^{13}C -AL) de la dieta en ácido araquidónico (^{13}C -AA) en el organismo materno	31
G. Incorporación a los tejidos maternos y oxidación total del ácido linoléico (^{14}C -AL) de la dieta	34
H. Expresión del RNAm de $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1, PGC α , PGC β y PPAR α en glándula mamaria, hígado y tejido adiposo de rata lactante	35

I. Análisis estadístico	40
J. Consideraciones éticas	40
VII. RESULTADOS	
A. Caracterización del modelo animal	42
B. Conversión del ácido linoléico (¹³ C-AL) de la dieta en ácido araquidónico (¹³ C-AA) en el organismo materno	44
C. Incorporación a los tejidos maternos y oxidación total del ácido linoléico (¹⁴ C-AL) de la dieta	51
D. Expresión del RNAm de $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1, PGC α , PGC β y PPAR α en glándula mamaria, hígado y tejido adiposo de rata lactante	56
VIII. DISCUSION	64
IX CONCLUSIONES	75
X. BIBLIOGRAFIA	77

I. RESUMEN

Antecedentes. El recién nacido requiere ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (LC-PUFAs) para su crecimiento y su desarrollo cerebral. Estos son proporcionados por la leche materna, sin embargo, no se sabe si la glándula mamaria puede sintetizar LC-PUFAs a través de la acción de las delta desaturasas. La $\Delta 5$ ($\Delta 5D$) y $\Delta 6$ ($\Delta 6D$) desaturasas son enzimas microsomales que forman parte de un sistema de tres enzimas que incluye NADH-citocromo b5 reductasa, citocromo b5, y $\Delta 6D$ o $\Delta 5D$. Estas enzimas convierten a los ácidos grasos indispensables (AGI): ácido linoléico (AL; 18:2 n-6) y ácido α -linolénico (ALN; 18:3 n-3), en LC-PUFAs como el ácido araquidónico (AA) y el ácido docosahexaenoico (DHA) respectivamente. Los mamíferos son incapaces de sintetizar AGI a partir de acetil-CoA, así que deben ser proporcionados en su dieta. **Objetivo.** Determinar el efecto de la cantidad del ácido linoléico de la dieta, sobre la biosíntesis de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga en ratas lactantes. **Estrategia metodológica.** Ratas de la cepa Sprague Dawley fueron alimentadas durante el embarazo y hasta el día 12 de la lactancia con una dieta que contenía el 2, 5 y 10% de lípidos (grupos: dieta baja, DBL; suficiente, DSL y alta, DAL en lípidos), los cuales fueron proporcionados por el aceite de maíz (rico en AL, 55.3%). El día 12 de lactancia a los animales se les administró una dosis oral de ^{14}C -AL o ^{13}C -AL, en las ratas que se les administró el ^{14}C -AL se midió la oxidación y distribución del AL en el organismo materno mediante la extracción de lípidos totales de los tejidos, seguida de la medición de la radiactividad en los lípidos. En las ratas que se les administró el ^{13}C -AL se midió la conversión del AL en AA en el hígado, tejido adiposo, glándula mamaria y contenido estomacal (cuajo) de las crías mediante espectrometría de masas de relaciones isotópicas. Además, en estas ratas se evaluó la expresión del RNAm de $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1, PPAR α , PGC-1 α , PGC-1 β en hígado, glándula mamaria, tejido adiposo mediante Northern blot y PCR en tiempo real. **Resultados.** En el día 12 de lactancia aproximadamente el 35 % del AL de la dieta es transferido a la glándula mamaria independientemente del contenido de lípidos de la dieta. Además el 1.14 ± 0.53 %, 0.49 ± 0.09 % y 0.20 ± 0.06 % (grupos DBL, DSL y DAL respectivamente) del AL de la dieta fue utilizado para la síntesis endógena de AA secretado en la leche. Los resultados mostraron una menor síntesis de AA cuando los animales fueron alimentados con una dieta con mayor contenido en lípidos (aceite de maíz) en comparación con el grupo DSL. Asimismo, se observó que en la

glándula mamaria se expresa el RNAm de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas además del hígado y el tejido adiposo. El contenido de ácido linoléico del aceite de maíz reguló la expresión de ambas desaturasas en la glándula mamaria y en el hígado, pero no en el tejido adiposo. La dieta con mayor cantidad de aceite de maíz disminuyó la expresión del RNAm de las dos desaturasas. Además, la expresión de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ estuvo asociada positivamente con cambios similares en la expresión de SREBP-1 y PGC-1 β en la glándula mamaria y el hígado. Por otro lado, la expresión de ambas desaturasas estuvo inversamente asociada con la abundancia del RNAm de PPAR α y PGC 1- α en el hígado, sin embargo, en la glándula mamaria el RNAm de PPAR α apenas fue perceptible y su expresión no se afectó por la cantidad de ácido linoléico de la dieta, mientras que el RNAm de PGC-1 α incremento cuando el contenido de ácido linoléico de la dieta fue mayor. **Conclusión.** Debido a que una cantidad importante (35%) del AL de la dieta se transfiere a la glándula mamaria y que además se expresa el RNAm de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ en este tejido, la glándula mamaria lactante tiene la capacidad de sintetizar LC-PUFAs de la misma manera que el hígado, y que esta síntesis puede ser regulada por la cantidad de ácido linoléico presente en el aceite de maíz en ambos tejidos.

Background. Newborn requires long chain-polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) for his normal growth and brain development. They are provided by maternal milk; however, it is not known whether the lactating mammary gland can synthesize LC-PUFAs through the action of the enzymes $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases. $\Delta 5$ ($\Delta 5D$) and $\Delta 6$ ($\Delta 6D$) desaturases are microsomal enzymes that form part of a three enzymes system that includes NADH-cytochrome b5 reductase, cytochrome b5, and $\Delta 6D$ or $\Delta 5D$. These enzymes convert the essential fatty acids (EFA); linoleic acid (LA) and alfa linolenic acid (LNA) in LC-PUFAs such as arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA) respectively. Mammals are unable to synthesize EFA from acetyl-CoA, thus must be supplied in its diet. **Objective.** To evaluate the effect of dietary linoleic acid on long chain polyunsaturated fatty acids synthesis in lactating rats. **Methods.** Sprague Dawley rats were fed during gestation and lactation with 2, 5 and 10% (groups low; LCOD, adequate; ACOD and high; HCOD corn oil diet respectively) of lipids, these were supplied by corn oil (contains 55.3 % LA). In the 12th day of lactation an oral doses of ^{13}C -LA or ^{14}C -LA was given to the animals. In rats with oral doses of ^{14}C -LA the oxidation and distribution of LA were evaluated in the maternal organism. The ^{13}C -LA was administered to evaluate on the liver, mammary gland, adipose tissue and clot, the conversion of linoleic acid in arachidonic acid by isotope ratio mass spectrometry. Besides, in experimental groups (LCOD, ACOD and HCOD) the $\Delta 5D$ and $\Delta 6D$, PPAR α , SREBP-1, PGC-1 α , PGC-1 β mRNA were measured in the same tissues by Northern blot and real time PCR. **Results.** On day 12 of lactation approximately 35% of the linoleic acid in the diet, which is the precursor of LC-PUFAs is transferred to the mammary gland independently of dietary corn oil content. Also the 1.14 ± 0.53 %, 0.49 ± 0.09 % and 0.20 ± 0.06 % (LCOD, ACOD and HCOD respectively) dietary linoleic acid was utilized to endogenous synthesis of AA secreted in the milk. There was less synthesis of AA when animals were feeding with higher corn oil content. In addition, there was expression of $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases in mammary gland as well as in liver and adipose tissue. The LA of the corn oil in the diet regulated the expression of $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases in mammary gland and liver but not in adipose tissue. The higher the corn oil contents in the diet the lower the expression of both desaturases. Expression of $\Delta 5$ and $\Delta 6D$ was associated positively with similar changes in SREBP-1 and PGC-1 β in mammary gland and liver. On the other hand, the expression of both desaturases was inversely

associated with PPAR α mRNA and PGC-1 α in the liver, however, in the mammary gland PPAR α was barely detected and it was not affected by the corn oil content in the diet, whereas PGC-1 α expression increased as the corn oil in the diet increased. Conclusion. These results indicate that due to an important (35%) quantity of dietary linoleic acid is transferred to the mammary gland and that Δ^5 and Δ^6 RNAs are expressed in this tissue, the lactating mammary gland has the capacity to synthesize LC-PUFAs similar to liver, and can be regulated by the LA content in the corn oil in both tissues.

II. INTRODUCCION

Existen tres formas principales de lípidos que se encuentran en el organismo de los mamíferos y en la dieta humana: triacilgliceroles (TG), fosfolípidos y esteroides. Los TG son la forma de almacenamiento de la grasa y son los más abundantes en los alimentos, ya que conforman del 95-98% de los lípidos ingeridos. Un porcentaje similar de esta grasa se encuentra en los tejidos del humano. La estructura de los TG está formada por tres ácidos grasos, unidos a una molécula de glicerol mediante un enlace éster.¹

Los ácidos grasos consisten de una cadena hidrocarbonada con un grupo metilo hidrofóbico y un grupo carboxílico hidrofílico. La longitud de la cadena y la presencia de insaturaciones determinan las propiedades de los diferentes ácidos grasos. Se conoce con el nombre de insaturaciones a las dobles ligaduras que se encuentran dentro de la estructura del ácido graso. Los ácidos grasos saturados no tienen estas dobles ligaduras, los ácidos grasos insaturados pueden ser mono-insaturados (una doble ligadura) ó poli-insaturados (más de una doble enlace).¹

A. Ácidos grasos poli-insaturados

a) Familias de ácidos grasos poli-insaturados

Los ácidos grasos indispensables (AGI), linoléico y alfa linolénico, que obtiene el organismo a través de la dieta son ácidos grasos poli-insaturados (PUFAs por sus siglas en inglés polyunsaturated fatty acid), pertenecen a las familias n-6 y n-3 respectivamente. Estas dos familias se diferencian por la posición del primer doble enlace, contando a partir del extremo metilo de la molécula del ácido graso. Los ácidos grasos linoléico (AL) y alfa linolénico (α ALN) son indispensables, debido a que los mamíferos carecen de las enzimas necesarias para insertar dobles enlaces en los átomos de carbono que están antes del carbono 9 contando a partir del extremo metilo. El AL es una molécula de 18 átomos de carbono con dos dobles ligaduras, la primera se localiza en el sexto carbono, su nomenclatura es 18:2 ω 6 y pertenece a la familia n-6. El α ALN también es una molécula de 18 átomos de carbonos y tiene tres dobles ligaduras, la primera se encuentra en el tercer carbono, su nomenclatura es 18:3 ω 3 y pertenece a la familia n-3, (Figura 1).² Dentro del organismo los PUFAs, se pueden transformar en ácidos grasos de cadena larga y con mayor número de

insaturaciones (LC-PUFAs). Los ácidos araquidónico (AA), eicosapentaenoico y docosahexaenoico (DHA) son ejemplos de LC-PUFAs.²

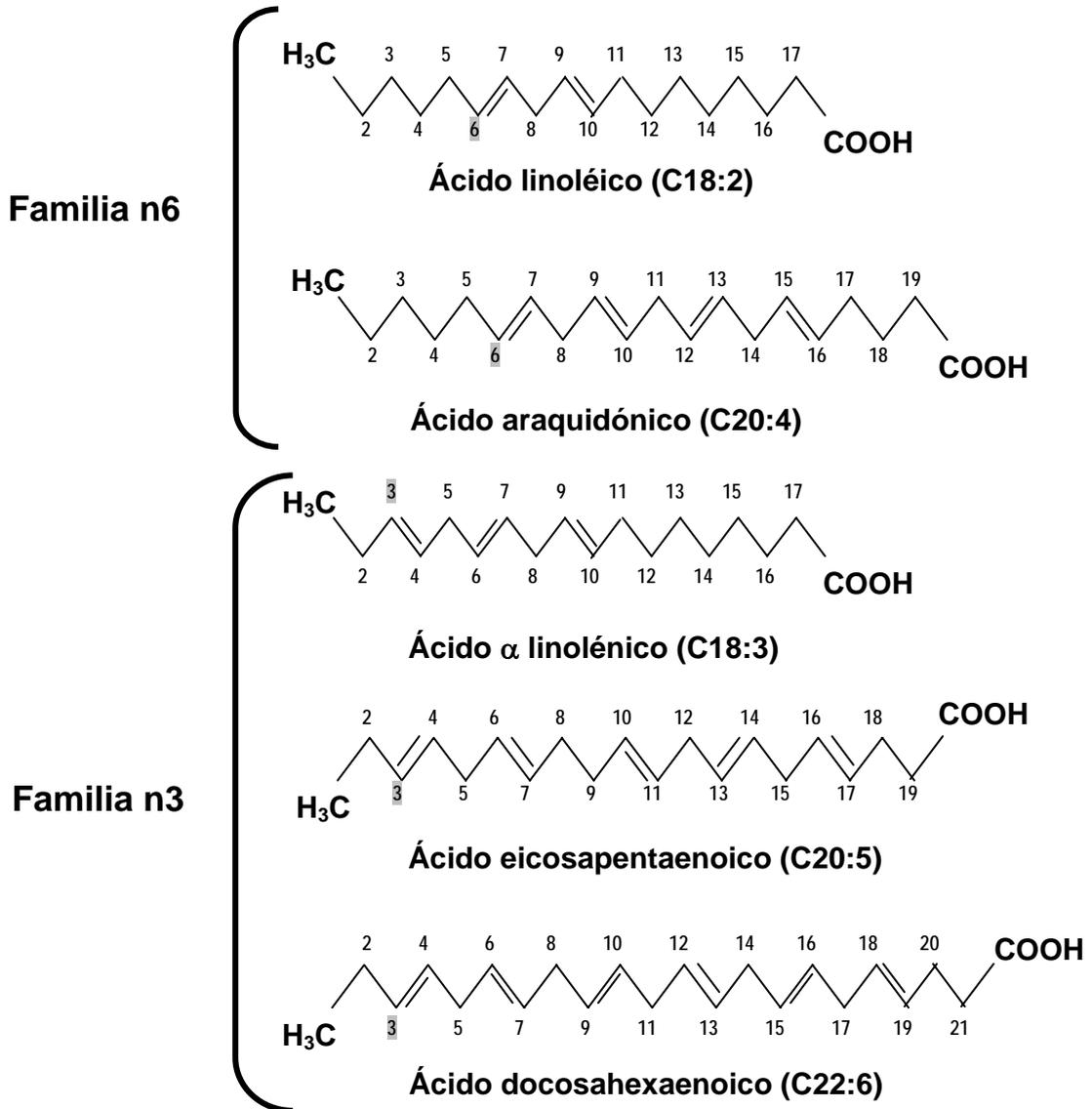


Figura 1. Estructura química de los ácidos grasos poli-insaturados de las familias n-6 y n-3.

b) Funciones de los PUFAs

Los PUFAs tienen funciones biológicas muy importantes entre las que destacan:

1). Estructural.

Algunos PUFAs forman parte de las membranas celulares. Los ácidos grasos constitutivos de las membranas pueden influir directa o indirectamente en diferentes funciones de las células, ya que afectan la permeabilidad de éstas, las actividades del transporte y el funcionamiento de enzimas asociadas a las membranas y receptores que controlan la partición de metabolitos y señales (hormonas) entre las células y dentro de ellas. Por lo tanto, las funciones de los receptores y de algunas enzimas dependen de la fluidez de la membrana, la cual a su vez depende de la cantidad y del tipo de ácidos grasos, colesterol y vitamina D en la dieta.³

2). Respuesta inflamatoria.

Los PUFAs también participan en la respuesta inflamatoria y en la hemostasia debido a que son precursores de productos oxidados a los que, en conjunto, se les denomina eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos). Estos se sintetizan por la acción de la ciclo-oxigenasa y la lipo-oxigenasa sobre los LC-PUFAs y existe una competencia entre el EPA y el AA por estas enzimas. El AA es el precursor de las prostaglandinas y los tromboxanos de la serie 2 y de los leucotrienos de la serie 4, mientras que el EPA es el precursor de las prostaglandinas y los tromboxanos de la serie 3 y leucotrienos de la serie 5.^{4, 5} Los eicosanoides más potentes son los derivados del ácido araquidónico, los que se forman a partir del EPA tienen efectos opuestos o más débiles que los provenientes del AA. Los tromboxanos y las prostaglandinas, causan vasoconstricción y agregación plaquetaria. Los leucotrienos son potentes agentes quimiotácticos que desempeñan un papel importante en la contracción del músculo liso y en la inflamación ya que pueden aumentar la secreción de linfocinas (interleucinas, interferón) y son moduladores de las funciones de las células B y NK (natural killer).^{3, 6}

3). Desarrollo cognoscitivo.

Algunos LC-PUFAs como el DHA y el AA son importantes para el desarrollo cerebral fetal y cognoscitivo de los mamíferos, lo cual ha aumentado el interés por su estudio.⁷⁻⁹ Estos ácidos grasos son abundantes tanto en la retina como en el cerebro, ya que más del 30% de los ácidos grasos de los fosfolípidos están formados por AA y DHA.¹⁰ Esta concentración alta de DHA incrementa la fluidez de la membrana y modifica la movilidad de las proteínas y las actividades de las enzimas de la retina para la transducción de señales visuales.¹¹ Los efectos del AA y sus metabolitos en las células nerviosas consisten en la modulación de la señalización a través de la membrana, la regulación de la liberación de neurotransmisores y la captación de glucosa.⁵ En el humano, el incremento en el contenido de DHA y AA en el cerebro y en la retina se lleva a cabo durante el último trimestre del embarazo y los primeros meses post-natal, etapas en las cuales se presenta un aumento en el crecimiento del cerebro.¹²

Debido a la importancia de estos ácidos grasos es necesario que el ser humano los consuma. Además, dado que la madre debe consumir tanto los PUFAs como los de cadena larga desde el embarazo y la lactancia para proporcionarlos al feto y al recién nacido, es necesario conocer las fuentes alimenticias de éstos.

c) Fuentes alimenticias de los PUFAs

Los ácidos grasos n-3 se encuentran principalmente en los aceites vegetales y en el pescado. El pescado es una fuente importante de EPA y DHA, el α ALN se encuentra principalmente en los cloroplastos de los vegetales de hojas verdes, en los aceites de soya, en la canola y en la linaza. Entre otras fuentes de ácidos grasos n-3 se encuentran las semillas, las nueces y algunas frutas. Los alimentos que contienen más α ALN es el aceite de canola (7.9-9.3 g/100g alimento), de soya (6.8 g/100 g alimento) y la linaza (14.2-22.8 g/100g alimento). Aunque esta última es la más enriquecida con α ALN, la linaza no es un alimento que se consuma comúnmente en nuestro país. Con respecto al EPA y al DHA, algunos aceites de pescado como el de sardina, salmón y bacalao son ricos en estos ácidos grasos. El aceite de bacalao es el más enriquecido, ya que contiene 13.2 y 10.9 g/100g de aceite de EPA y DHA

respectivamente. Sin embargo, el contenido de estos ácidos grasos puede variar entre los diferentes tipos de pescado (Tabla 1).¹³

Con respecto a los ácidos grasos de la familia n-6, las principales fuentes de AL son los aceites de origen vegetal. En la tabla 1 se puede observar que el AL es más abundante en los aceites de cártamo (74 g/100 alimento), girasol (65 g/100g alimento), maíz (58 g/100g alimento) y soya (51 g/100g alimento). Las fuentes alimenticias del AA son algunos alimentos de origen animal, como la yema de huevo, la carne, el hígado y el aceite de bacalao. Debido a que en nuestra dieta no se consume habitualmente la linaza y el aceite de canola, alimentos que son ricos en α ALN, podría presentarse una baja ingesta en los ácidos grasos de la familia n-3. Además, el consumo de pescado en nuestro país es bajo, de manera que los PUFAs del tipo n-3 son muy escasos en nuestra dieta, en comparación con los de la familia n-6.¹³

Tabla 1. Contenido de ácidos grasos de las familias n-3 y n-6 en diferentes alimentos

ALIMENTO	PUFAs-n6		PUFAs-n3		
	AL (18:2)	AA (20:4)	g/100 g de alimento		
			ALN (18:3)	EPA (20:5)	DHA (20:6)
Yema de huevo	3.5	0.4	0.10	0.01	0.11
Sardina	0.05	0	0.02	0.12-0.47	0.57
Salmón	0.22	0.26	0.13	0.32-0.67	1.11-1.96
Aceite de bacalao	2.2	1.2	0.93-1.5	6.89-13.2	10.9
Aguacate	1.67	0	0.1	0	0
Aceite de canola	19.2-20.3	0	7.9-9.3	0	0
Aceite de cártamo	74.1	0	0	0	0
Aceite de girasol	65.7	0	0	0	0
Aceite de maíz	58	0	0.7	0	0
Aceite de oliva	7.9-9.2	0	0.6-0.79	0	0
Aceite de soya	51	0	6.8	0	0
Ajonjolí	23.2	0	2.0	0	0
Almendras	12.21	0	0	0	0
Cacahuete	15.69	0	0.003	0	0
Linaza	4.3	0	14.2-22.8	0	0
Nuez de castilla	38		9		
Pistaches	14.0		0.26		
Nuez	21		1		
Nuez de la india	7.7		0.16		

AL = ácido linoléico, AA = ácido araquidónico, α ALN = ácido alfa linolénico, EPA = ácido eicosapentaenoico, DHA = ácido docosahexaenoico. Tomada de Rodríguez-Cruz et al., 2005.¹³

B. Lactancia

La lactancia se considera como la fase final del ciclo reproductivo de los mamíferos,¹⁴ en este periodo se incrementa la demanda de los sustratos por la glándula mamaria necesarios para la síntesis de los componentes de la leche (lactosa, lípidos y proteínas) por las células epiteliales del alveolo, para sustentar a la progenie en el periodo neonatal (Figura 2).¹⁵ La etapa en la cual la glándula mamaria de los mamíferos desarrolla la capacidad para secretar la leche se denomina lactogénesis. En esta fase se sintetizan los componentes de la leche dentro de las células del alveolo y pasan al lumen alveolar.¹⁴ La etapa de lactogénesis se divide en 2 fases: cerca de la mitad del embarazo la glándula mamaria es capaz de secretar leche, a este proceso de maduración se le conoce como lactogénesis fase 1. La fase 2 se caracteriza por una abundante secreción de leche y tiene lugar alrededor del parto, el inicio de este proceso toma cerca de cuatro días en el humano.¹⁶

Durante las primeras horas posparto en el humano, las células del alveolo presentan una citología similar a las células exocrinas. En estas células se observan ribosomas libres, que son substituidos por membranas del retículo endoplásmico rugoso, estas se hacen evidentes a las 48 horas. Mientras tanto, el epitelio alveolar adopta una forma cuboidal y aumenta su actividad secretora, la cual puede iniciarse con la repentina disminución o cese de la liberación de progesterona y con la liberación de los productos que forman el calostro.^{17, 18}

La leche es secretada continuamente hacia el interior del lumen alveolar, donde es almacenada hasta que se inicia la succión por el recién nacido.¹⁶ El alvéolo se distiende en presencia de la leche, el epitelio se hace flácido y se distorsiona, las células mioepiteliales se contraen y la leche es forzada a salir del alveolo hacia el pezón. A este proceso se le conoce como eyección láctea (Figura 2),¹⁹ sólo entonces la leche se encuentra bajo presión y disponible para la succión.^{14, 16, 20} La producción de la leche es alta cuando la presión en los ductos y alvéolos alcanza un nivel muy bajo. En cambio, a medida que la presión aumenta, la producción disminuye.²⁰ El mantenimiento de la secreción láctea depende del estímulo mecánico de la succión recibido en las terminaciones nerviosas del pezón. Este estímulo produce impulsos nerviosos que llegan a la médula espinal, siguen la vía espinotalámica hasta el

mesencéfalo donde es posible que se bifurquen siguiendo dos rutas separadas hasta las áreas del hipotálamo, determinando así la liberación de prolactina, oxitocina y de la hormona de crecimiento, hormonas que regulan la producción de leche.^{18, 21}

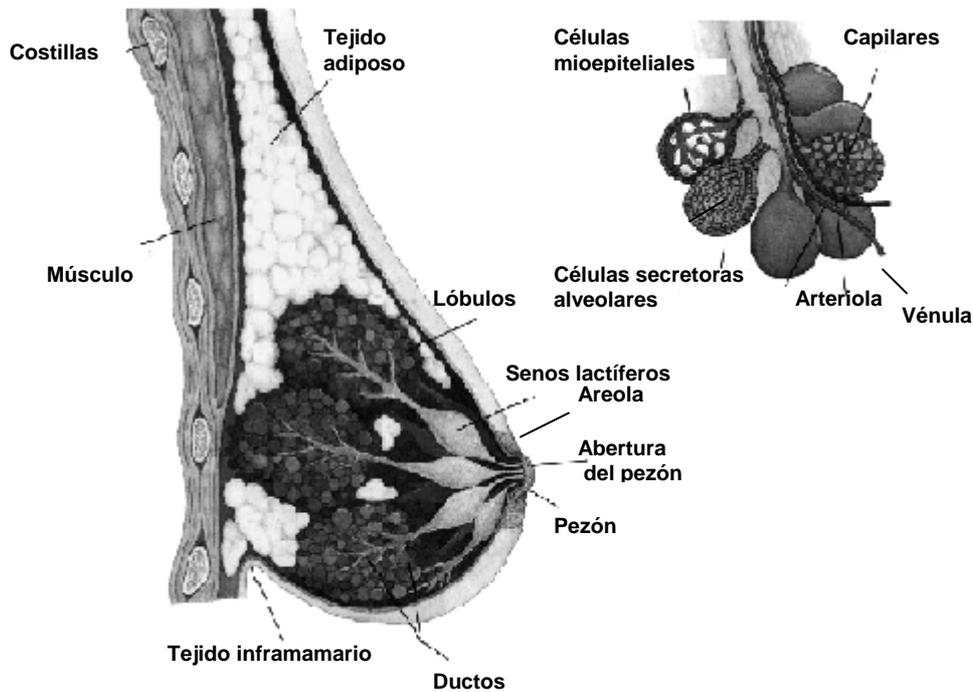


Figura 2. Anatomía de la glándula mamaria humana. Tomada de Averbach K., et., al 1999.²²

La síntesis de la leche esta determinada por la capacidad y el número de células secretoras, este número de células esta ligado a factores genéticos, mientras que la capacidad de cada una está influenciada por factores externos, tales como la succión por el neonato. Por otro lado, la composición de la leche varía de persona a persona. Los lípidos son los componentes más variables en la leche,²³ ya que su concentración y composición depende de factores como; la alimentación, la duración

de la gestación, la etapa de lactancia y la hora del día.²⁴⁻²⁷ Los lípidos de la leche se encuentran contenidos en los glóbulos de grasa formados por membranas compuestas por fosfolípidos, colesterol y proteínas. Entre el 97 y el 99% de los lípidos contenidos en estos glóbulos son triacilglicérolos los cuales proporcionan del 40 al 50% de la energía total de la leche.^{22, 24, 28}

Durante la lactancia, los componentes de la leche son formados de diferentes fuentes, ya que la glándula mamaria capta glucosa, aminoácidos y ácidos grasos no esterificados de la circulación.^{15, 19} Para que se lleve a cabo la síntesis de estos componentes, deben ocurrir diferentes procesos dentro de la célula alveolar. Se han definido 5 vías que actúan de manera paralela para la síntesis y la secreción de la leche. A través de estas vías los precursores derivados de la sangre se transforman en los constituyentes de la leche. Estas vías son; 1) exocitosis, 2) vía paracelular 3) secreción de iones y agua, 4) secreción de inmunoglobulinas y 5) síntesis y secreción de lípidos.^{16, 26, 29, 30}

Los lípidos, en especial los constituidos por PUFAs (ácidos linoléico y linolénico) y por LC-PUFAs (AA, EPA, y DHA) que se encuentran en la leche materna provienen de diversas fuentes: de la dieta, de la movilización desde el tejido adiposo y de la síntesis *de novo* (AA, EP y DHA) llevada a cabo en el hígado (Figura 3).³¹

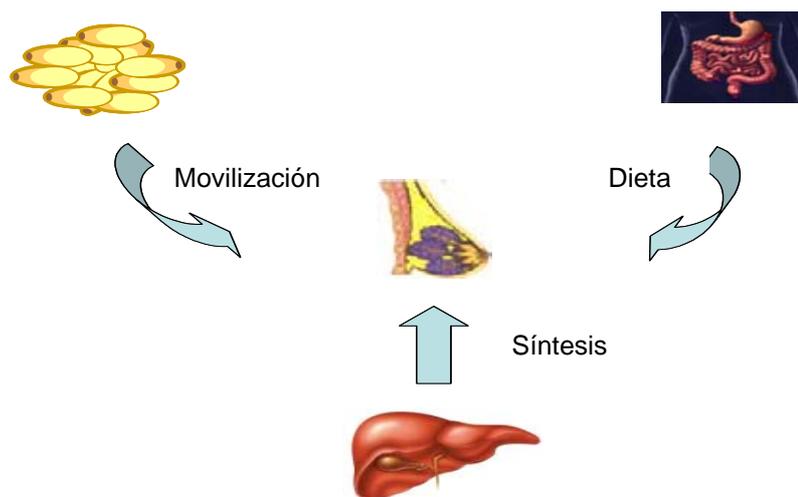


Figura 3. Origen de los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga que se encuentran en la leche.

C) Contribución de los PUFAs y LC-PUFAs dietarios en la composición de los lípidos de la leche.

La lactancia se ha descrito como el mayor estrés fisiológico del ciclo de vida, debido principalmente al incremento en las necesidades de proteína y de energía para sintetizar la leche. Existe además, una gran demanda de PUFAs necesarios para el recién nacido. La madre satisface estas necesidades en parte por el consumo de lípidos de la dieta. El consumo de éstos durante la lactancia influyen su concentración en la leche, esto se ha observado claramente en estudios donde muestran que mujeres que consumen una dieta rica en AA, EPA y DHA, tienen una leche con mayor cantidad de éstos ácidos grasos.³²⁻³⁴ Sin embargo, no existen suficientes estudios que demuestren con cuanto contribuyen los LC-PUFAs ni de sus precursores (AA y α ALN) de la dieta en la síntesis de los lípidos de la leche.

Algunos estudios metabólicos indican las vías que siguen los precursores dietarios de los LC-PUFAs dentro del organismo lactante.^{35, 36} Utilizando isótopos estables en mujeres lactantes con nutrición marginal de nuestro país, se ha observado que una pequeña proporción (15-20%) del ácido linoléico de la dieta es dirigida directamente a la leche. En este estudio se propuso que alrededor del 60% es retenido en tejidos de recambio lento como el tejido adiposo.³⁷ Adicionalmente, se observó que la leche de estas mujeres tiene niveles adecuados de AA, comparables a los de mujeres de países desarrollados a pesar de que en nuestra población el consumo de este ácido graso es hasta 10 veces menor. La medición de la síntesis endógena del AA en estas mujeres utilizando isótopos estables mostró que ésta contribuye solamente con el 0.1% del AA presente en la leche.³⁷ De manera que la baja ingestión y la reducida síntesis endógena del AA no cubren las necesidades de este ácido graso para la síntesis de la leche.

Debido a esto se ha propuesto que la contribución de los ácidos grasos de cadena larga ω 6 a los lípidos de la leche, parece no depender principalmente del contenido en la dieta de la madre. Un origen posible para los LC-PUFAs de la leche, que no ha sido explorado, podría ser su síntesis en tejidos extrahepáticos como la glándula mamaria o la movilización de éstos del tejido adiposo para la síntesis de los lípidos de la leche. Debido a que esta hipótesis no puede ser probada en humanos,

por la imposibilidad de obtener muestras de tejidos es necesario utilizar un modelo animal como la rata.

La rata es un buen modelo para estudiar estos parámetros debido a que en los mamíferos los lípidos siguen las mismas rutas metabólicas.³⁸ Además se sabe que la transición que experimenta la rata durante el embarazo, se caracteriza por cambios rápidos en el metabolismo de los lípidos en la glándula mamaria y en otros tejidos maternos.^{39, 40}

D) Síntesis endógena de LC-PUFAs

La síntesis de AA, EPA y DHA se lleva a cabo en los microsomas hepáticos por las desaturasas delta 5 ($\Delta 5D$) y delta 6 ($\Delta 6D$)^{41, 42} y por las elongasas⁴³ Esta síntesis ocurre a través de la secuencia de reacciones alternas de desaturación y elongación de la cadena de ácidos grasos indispensables; ácido linoléico y ácido alfa linolénico. El DHA es sintetizado a partir del α ALN, inicialmente por la adición de un doble enlace por la $\Delta 6D$, para formar el ácido estearidónico (SDA, C18:4n-3 por sus siglas en inglés); de la elongación del SDA se produce el ácido eicosatetraenoico (ETA, C20:4 n-3); la adición a éste ácido graso de otro doble enlace por la $\Delta 5D$ da como producto el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n-3); la elongación de EPA produce ácido docosapentaenoico (n3-DPA, C22:5n-3); éste es elongado a ácido tetracosapentaenoico (TPA, C24:5n-3); una doble ligadura es agregada al TPA por una $\Delta 6D$ para formar el ácido tetracosahexaenoico (THA, C24:6n-3) y el THA es oxidado a DHA en los peroxisomas.⁴⁴⁻⁴⁶ La misma $\Delta 6D$ adiciona un doble enlace al ácido linoléico para sintetizar el ácido γ -linolénico (GLN; 18:3n-6), la elongación del GLN produce el ácido dihomogamma-linolénico (DHGLN; 20:3N-6), la misma $\Delta 5D$ que desatura los ácidos grasos de la familia n-3 también agrega un doble enlace al DHGLN para sintetizar el AA.⁴⁴ Las desaturasas son complejos enzimáticos microsomales supuestamente formados por un sistema de tres enzimas que incluye: la NADH-citocromo b5 reductasa, la citocromo b5 y la desaturasa respectiva⁴⁷ Las elongasas también son enzimas microsomales, éstas interaccionan con la 3-ceto acil

CoA reductasa, una deshidratasa y una trans 2,3-enoil CoA reductasa para elongar ácidos grasos.⁴³ La tasa de elongación de ácidos grasos esta determinada por la actividad de la elongasa (enzima condensante) y no por la reductasa o la deshidratasa.⁴⁸ Existen seis subtipos diferentes de elongasas de ácidos grasos (Elovl-1 a Elovl-6) en el ratón, la rata y el humano. De éstas la Elovl-2 y la Elovl-5 son las que participan en la síntesis endógena de LC-PUFAs.⁴⁸ Sin embargo aun no se sabe cuales ácidos grasos de las familias n3 y n6 elongan estas enzimas (Figura 4).

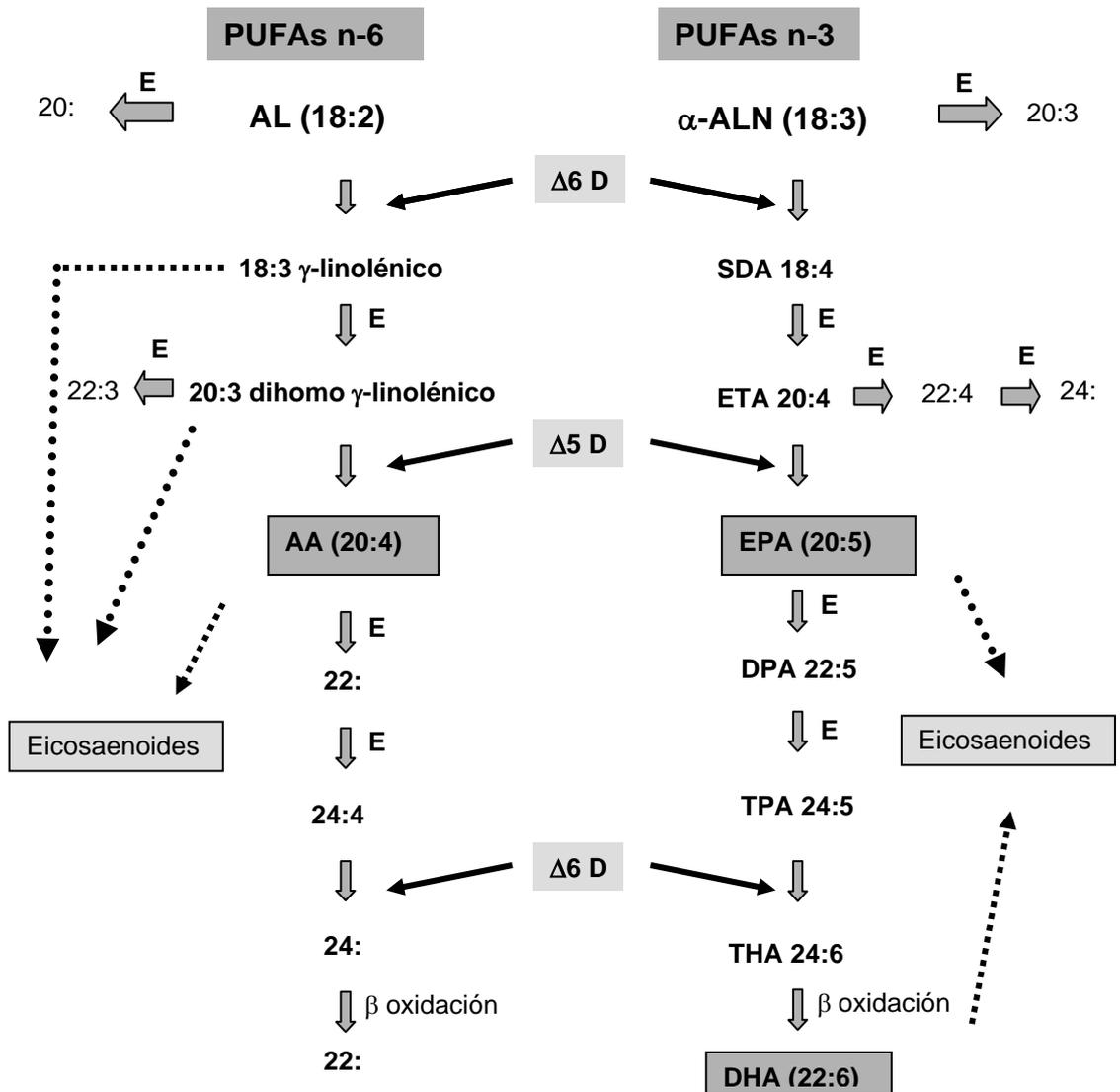


Figura 4. Síntesis de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga a partir de los ácidos grasos indispensables ácido linolénico (AL) y ácido alfa linolénico (α ALN). PUFAs = ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga; AA = ácido araquidónico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DHA = ácido docosahexaenoico; SDA = ácido estearidónico; ETA = ácido eicosatetraenoico; DPA = ácido docosapentaenoico; TPA = ácido tetracosapentaenoico; THA, ácido tetracosahexaenoico; $\Delta 6$ D = delta 6 desaturasa, $\Delta 5$ D = delta 5 desaturasa, E = elongasa.

a) Expresión génica de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$

Estudios realizados en animales y en el humano han mostrado que el hígado es el órgano principal de síntesis de la $\Delta 5D$ y la $\Delta 6D$. Sin embargo, en los últimos cinco años se ha identificado el RNAm de ambas desaturasas en tejidos extrahepáticos como el cerebro, riñón, pulmón, glándula adrenal, testículos, tejido adiposo, placenta y músculo esquelético de humanos y de roedores. Estos hallazgos han mostrado que los niveles del RNAm de estas desaturasas en el pulmón y el corazón son comparables a los encontrados en el hígado. Inclusive la abundancia del RNAm de la $\Delta 6D$ en el cerebro fue mayor que en otros tejidos, incluyendo el hígado.^{41, 42, 49} Estos resultados sugieren que probablemente otros órganos al igual que el hígado tienen la capacidad de sintetizar LC-PUFAs. De manera que el AL y el α -ALN además de ser convertidos a LC-PUFAs en el hígado, almacenados en el tejido adiposo o captados por la glándula mamaria para su transferencia directa a la leche, también podrían ser metabolizados hasta LC-PUFAs en órganos extrahepáticos. Asimismo, se ha reportado que la abundancia del RNAm de la $\Delta 5D$ en la glándula mamaria de ratas lactantes es mayor que la encontrada en el hígado.⁵⁰

b) Regulación de la expresión génica de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$

La expresión génica y la actividad enzimática de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ son reguladas por 1) factores exógenos incluyendo los componentes específicos de la dieta; 2) por factores fisiológicos tales como: estado posprandial, ayuno, estado hormonal, ritmo circadiano, edad, fondo genético y 3) por factores patológicos.⁵⁰⁻⁵⁴

Con respecto a la regulación por componentes de la dieta, actualmente se sabe que los PUFAs y los de cadena larga controlan la expresión génica y la actividad enzimática de las desaturasas. La velocidad de conversión del AL y α -ALN en LC-PUFAs esta determinada por la actividad de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ desaturasas. La actividad y la expresión génica de estas desaturasas en el hígado dependen de la composición de los lípidos de la dieta. La ingestión de dietas bajas en PUFAs o LC-PUFAs n-3 o n-6 da como resultado niveles más altos de la actividad enzimática y de la abundancia del RNAm de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ comparadas con el consumo de lípidos ricos en estos

ácidos grasos.^{41, 42, 47, 51} Además, el RNAm está incrementado por una dieta libre de grasa y por una dieta que contiene ácidos grasos monoinsaturados (18:1 n-9) como única fuente de carbono, este tipo de dietas podría considerarse baja en PUFAs.^{41, 42}

La regulación de la expresión de las desaturasas por los ácidos grasos de la dieta es a través de mecanismos que censan los niveles de lípidos en la célula. Los factores de transcripción, proteínas de unión a elementos de respuesta regulatorios de esteroides (SREBPs por sus siglas en inglés; sterol regulatory element binding protein) y los receptores activados por proliferadores de peroxisoma (PPAR por sus siglas en inglés; peroxisome proliferator activated receptor) regulan la expresión de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ ⁴⁹. A su vez, estos factores de transcripción (SREBP-1 y PPAR α) son regulados por co-activadores específicos que aumentan o reprimen su actividad. La familia de co-activadores PGC-1 está involucrada en la expresión de genes que son regulados por SREBP-1 y PPAR α . Existen dos miembros de la familia de PGC-1; PGC-1 α y PGC-1 β . PGC-1 α está asociado con la activación de la oxidación de ácidos grasos, mientras que PGC-1 β está asociado con la lipogénesis entre otras funciones.^{55, 56}

1. Regulación a través de SREBP-1a.

Las SREBPs son una familia de factores de transcripción formada por tres miembros SREBP-1a, 1c y 2. SREBP-2 regula genes involucrados en el metabolismo de colesterol, mientras que SREBP-1a y 1c regulan genes involucrados en la lipogénesis. Las SREBP-1 se sintetizan como una proteína precursora de 125 kDa unida al retículo endoplásmico. Estas proteínas tienen una región amino terminal de 480 aminoácidos con 2 dominios transmembranales y una región carboxilo terminal, y se encuentran unidas a SCAP (SCAP por sus siglas en inglés SREBP cleavage activating protein; proteína que activa el rompimiento de SREBP). Cuando hay disminución en la concentración de colesterol intracelular, SREBP-1/SCAP son translocadas de la membrana del retículo endoplásmico a la del aparato de Golgi. En donde la región amino terminal debe ser liberada proteolíticamente, para este proceso se requieren dos proteasas, una de ellas denominada como S1P (proteasa del sitio 1) y S2P (proteasa del sitio 2). La proteasa S1P divide a SREBP1 en dos fragmentos

COOH y NH₂ terminal. Posteriormente S2P libera el NH₂ terminal y se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes que participan en el metabolismo de los lípidos.⁵⁷ Se ha demostrado que las SREBP-1a aumentan los niveles basales de transcripción de enzimas lipogénicas como la acetil-CoA carboxilasa, la enzima málica y la sintasa de los ácidos grasos.⁵⁷ Interessantemente, la expresión génica de la Δ 6D y la Δ 5D se induce en ratones transgénicos que sobreexpresan a la SREBP-1a.⁴⁹ Lo anterior se debe a que la región promotora del gen Δ 6D contiene un SRE.⁵⁸ Así que la expresión del gen de la Δ 6D es regulada por SREBP-1a (Figura 5).

Recientemente se han propuesto algunos mecanismos que sugieren que los PUFAs y los LC-PUFAs no sólo regulan la expresión de genes que participan en la lipogénesis, sino que también regulan la expresión de las desaturasas que los sintetizan a través de SREBP-1. El primero propone que estos ácidos grasos reducen la forma nuclear activa de SREBP-1 en el hígado de ratas.⁵⁹ Segundo, disminuyen la estabilidad del mensajero de SREBP-1⁶⁰ y tercero suprimen la expresión del RNAm de SREBP-1.⁶¹ Por lo que dietas con alto contenido en PUFAs y de LC-PUFAs favorecen la disminución de SREBP-1 y como consecuencia disminuye la expresión de la Δ 6D y la lipogénesis (Figura 5).

2. Regulación a través de PPAR α .

Los PPARs son receptores nucleares que pertenecen a la familia de factores de transcripción involucrados en la regulación de la expresión de genes del metabolismo de los lípidos. Existen 3 subtipos de PPAR, el α , γ y δ la activación de PPAR α induce la expresión de genes que codifican proteínas hepáticas, cardíacas y del músculo esquelético involucradas en el transporte y oxidación de lípidos, y en la termogénesis (carnitin palmitoiltransferasa, acil CoA oxidasa y proteína-3 desacoplante). Los PPARs son activados por ligandos sintéticos^{62, 63} o naturales, los PUFAs pertenecen a éstos últimos e incrementan la capacidad oxidativa de los tejidos a través de su unión a PPAR α dando como resultado la inducción de la transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos.⁶⁴ Los PUFAs se unen a las tres isoformas y con mayor afinidad para PPAR α . El

PPAR α activado se une a elementos de respuesta para PPAR llamados PPRE (elementos de respuesta para PPAR) que se encuentran en genes que participan en el metabolismo de los lípidos.⁶⁴

Los PUFAs n-3 son más potentes que los PUFAs n-6 como activadores de PPAR *in vivo*. Los metabolitos de los PUFAs como los eicosanoides o ácidos grasos oxidados son los más potentes activadores de PPAR debido probablemente a su alta insaturación.⁶⁴ Además, se ha observado que la administración de fibrato, un ligando sintético-farmacológico que activa a PPAR α genera un incremento en la expresión de la Δ 5D y la Δ 6D.⁴⁹ Esto se debe a que en el promotor de la Δ 6D se encuentra un PPRES⁶⁵ (Figura 5), lo cual indica que la expresión de la Δ 6D es regulada por PPAR que puede ser activado por ácidos grasos o por ligandos sintéticos.

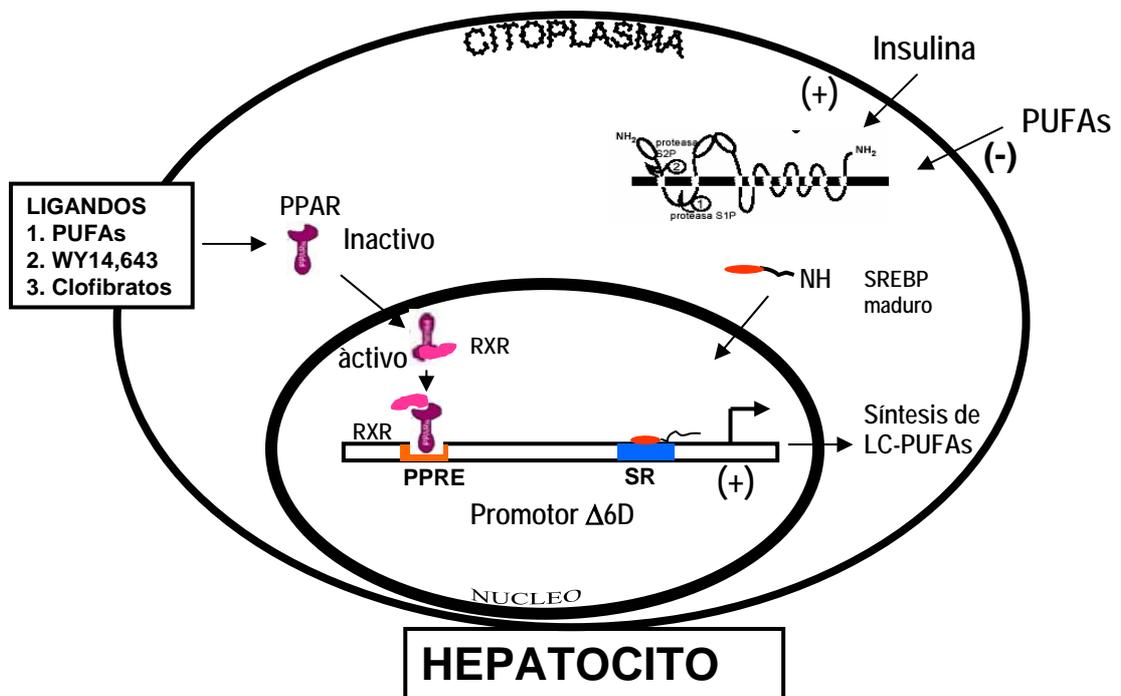


Figura 5. Regulación del promotor del gene de la Δ 6D por los PUFAs. SREBP-1 proteínas de unión a elementos de respuesta de esteroides; PPAR, receptor activado por proliferadores de peroxisomas; PUFAs, ácidos grasos poli-insaturados; RXR, receptor X para el ácido retinoico; PPRES, elemento de respuesta para PPAR; SRE, elemento de respuesta para SREBP. Tomada de Rodríguez-Cruz et al., 2005.¹³

Los estudios de expresión y regulación de $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ se han realizado en células hepáticas de ratones, por lo que se desconoce como se regula la expresión génica de ambas desaturasas en el hígado y en la glándula mamaria durante la lactancia. Etapa en la que existe un aumento en las necesidades de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la importancia de los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (LC-PUFAs) durante el desarrollo fetal y postnatal, es fundamental conocer las adaptaciones metabólicas en el organismo materno que permiten cubrir las elevadas demandas de estos ácidos grasos durante la lactancia. Especialmente cuando la ingesta materna no cubre los requerimientos de estos ácidos grasos.

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la cantidad del ácido linoléico de la dieta, sobre la biosíntesis de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga en ratas lactantes.

A. Objetivos específicos

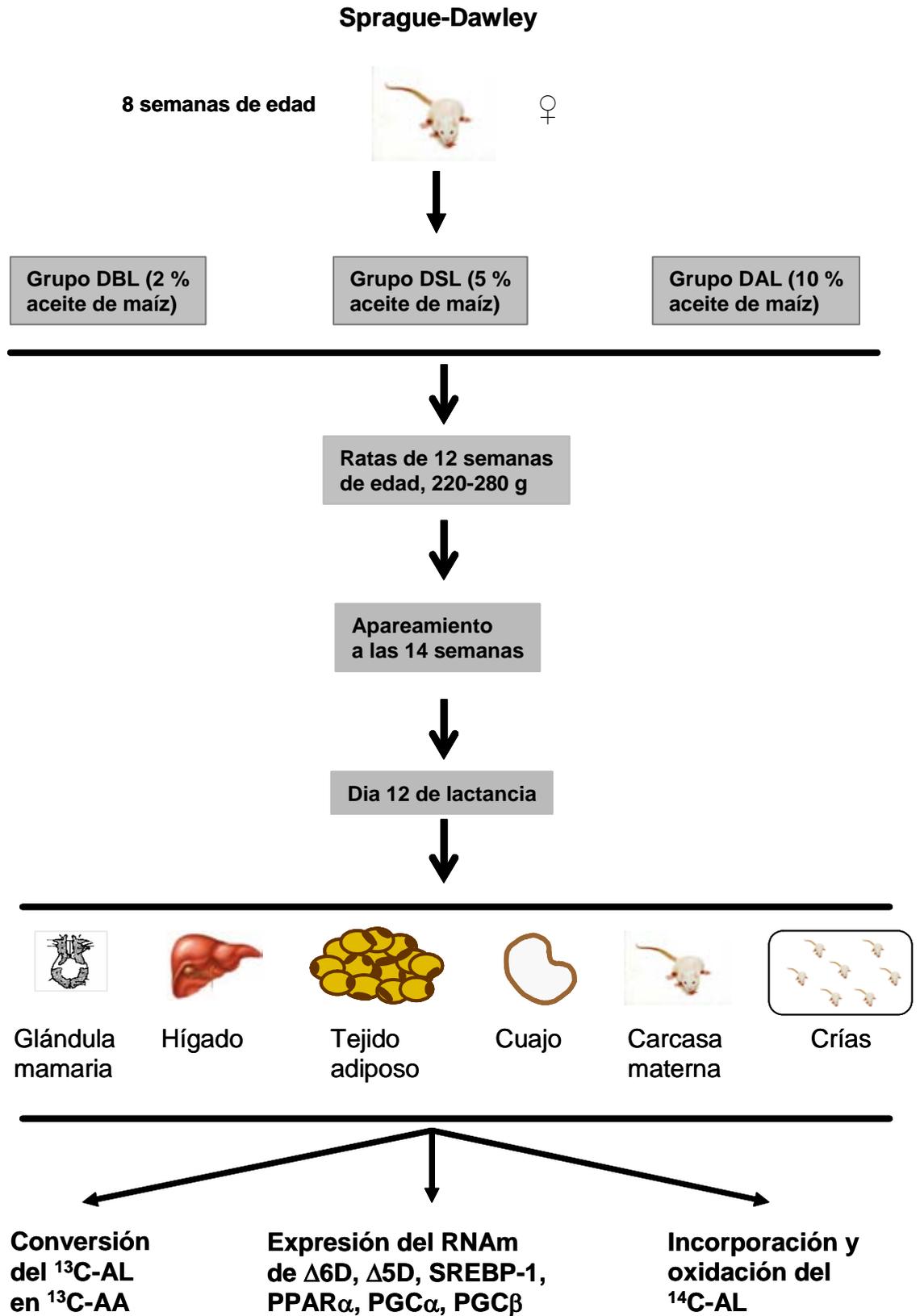
Estudiar comparativamente en ratas lactante alimentadas con dieta baja (2 %), adecuada (5 %) y alta (10 %) en lípidos (aceite de maíz, 53.4 % de AL) lo siguiente:

1. El porcentaje del ácido linoléico de una dosis oral transferido directamente a la leche o incorporado a la glándula mamaria, hígado y tejido adiposo.
2. La conversión del ácido ^{13}C -linoléico en ácido ^{13}C -araquidónico.
3. La composición de ácidos grasos en la glándula mamaria, hígado, y tejido adiposo de la madre y cuajo de la cría.
4. La presencia y cuantificación de la expresión del RNAm de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas en la glándula mamaria, hígado y tejido adiposo.
5. La relación entre la expresión de los RNAm de SREBP-1 y PPAR α con la expresión de la $\Delta 5$ y $\Delta 6$ desaturasas en la glándula mamaria, hígado y tejido adiposo.

V. HIPOTESIS

La biosíntesis de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga, será menor en las ratas lactantes alimentadas con una dieta alta en ácido linoléico durante el embarazo y hasta el día 12 de la lactancia.

VI. ESTRATEGIA METODOLOGICA



A. Tipo de estudio

- a) Experimental, en el que se varió la concentración de lípidos de la dieta.
- b) Prospectivo, ya que los resultados se recopilaron al término del estudio.
- c) Estudio de tipo transversal donde las variables se midieron una sola vez.
- d) Comparativo, ya que se compararon tres grupos.

B. Ubicación espacio temporal

El estudio se realizó durante el periodo de septiembre del 2002 a septiembre del 2005 en:

- a) Unidad de Investigación Médica en Nutrición del Instituto Mexicano del Seguro Social (Centro Médico Nacional Siglo XXI). Ubicado en Av. Cuauhtémoc N° 330 Col. Doctores, D. F.
- b) Departamento de Fisiología de la Nutrición, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. Ubicado en Vasco de Quiroga No 15 México, D.F 14000.

C. Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 8 semanas de edad. Se formaron aleatoriamente tres grupos (16 ratas por grupo) y fueron alimentadas a libre demanda con una dieta baja (2 %), suficiente (5 %) o alta (10 %) en lípidos. Los lípidos fueron proporcionados por el aceite de maíz, la composición de las dietas se indica en la tabla 2. Debido a que los ácidos grasos saturados (esteárico y palmítico) y mono-insaturados (oleico) no afectan la expresión de las desaturasas^{41, 42, 49} y los ácidos grasos poli-insaturados (ácido linoléico y linolénico) si lo hacen, en este estudio se utilizó aceite de maíz que contiene 55.3 % de ácido linoléico. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz y oscuridad de 12h, en el bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS.

A las 14 semanas de edad (adultos jóvenes), los animales se aparearon con machos de su misma cepa y se alimentaron con la misma dieta inicial durante el embarazo y hasta el día 12 de la lactancia. Mediante una citología vaginal, se determinó el primer día de la gestación y en ese día, la rata fue transferida a una jaula individual. De cada uno de los grupos de ratas se formaron dos subgrupos en los cuales se midió 1) la oxidación total y la incorporación a los tejidos maternos del ¹⁴C-

ácido linoléico y 2) la conversión del ^{13}C -ácido linoléico en ^{13}C -ácido araquidónico y la expresión génica de las desaturasas ($\Delta 6\text{D}$ y $\Delta 5\text{D}$) y de los factores de transcripción (SREBP-1c y PPAR α) en los tejidos.

Tabla 2. Composición de las dietas experimentales

Ingrediente	DBL	DSL	DAL
		g/Kg	
Caseína ¹	222	222	222
Glucosa	336	307.5	272.5
Fécula de maíz	336	307.5	272.5
Aceite de maíz ²	20	50	100
Vitaminas ³	10	10	10
Minerales ⁴	40	40	60
Celulosa ⁵	36	63	63
Energía Kcal/Kg	3756	3798	3968

DBL= dieta baja en lípidos, DSL= dieta suficiente en lípidos, DAL= dieta alta en lípidos.

1.- Caseinato de calcio (Biotecnología y Nutrición, S.A. de C.V.) cada 100 g contienen: proteínas 86 a 90 g que equivalen a 13.5-14.1 g de nitrógeno, minerales 3.8 a 6 g, grasa 0.0 a 2.0 g y humedad de 0.0 a 6.2 g. **2.-** Aceite de maíz (La Gloria): 55.3 % linoléico, 30.7 % oleico, 11 % palmítico, 2.1 % esteárico. **3.-** Mezcla de vitaminas, Tecklad (Harlan, Tecklad) Contenido por Kg: ácido p-aminobenzoico 11.01 g, ácido ascórbico 101.66 g, biotina 0.044 g, cianocobalamina 2.97 g, pantotenato de calcio 6.61 g, citrato de colina 349.69 g, ácido fólico 0.20 g, inositol 11.01 g, menadiona 4.95 g, niacina 9.91 g, piridoxina HCl 2.20 g, riboflavina 2.20 g, tiamina HCl 2.20 g, palmitato de retinol anhidro 3.96 g, ergocalciferol anhidro 24.23 g, almidón de maíz 466.67 g. **4.-** Mezcla de minerales, Rogers-Harper (Harlan, Tecklad) Contenido por Kg: molibdato de amonio 0.025 g, carbonato de calcio 292.9 g, fosfato de calcio 4.3 g, sulfato cúprico 1.56 g, citrato férrico 6.23 g, sulfato de magnesio 99.8 g, sulfato de manganeso 1.21 g, yoduro de potasio 0.005 g, fosfato de potasio 343.1 g, cloruro de sodio 250.6 g, selenito de sodio 0.015 g, cloruro de zinc 0.2 g. **5.** Celulosa marca Harlan. Los ingredientes se mezclaron con agua hasta formar una pasta, posteriormente se formaron galletas, las cuales se dejaron secar para proporcionarlas a los animales.

D. Registro de la ingesta dietaria

A partir del primer día de estudio (8 semanas de edad) y hasta el día 12 de la lactancia (día del experimento), se registró diariamente el consumo del alimento. Se les proporcionó 100 g del alimento y al siguiente día a la misma hora se colectó el alimento residual. El consumo de alimento se calculó a partir de la diferencia entre el alimento proporcionado y el alimento residual.

E. Registro del peso corporal de las madres y de las crías

Desde las 8 semanas de edad y hasta el día 12 de lactancia se registró diariamente el peso de la rata madre con una báscula OHAUS con sensibilidad de 0.01 g. El día del parto, se registró el número y el peso de todas las crías con la misma báscula, posteriormente la camada se ajustó a 8 crías por rata madre y se registró diariamente el peso de las camadas hasta el día 12 de lactancia.

F. Conversión del ácido linoléico ($^{13}\text{C-AL}$) de la dieta en ácido araquidónico ($^{13}\text{C-AL}$) en el organismo materno.

Para medir la conversión del ácido linoléico de la dieta, el día 12 de la lactancia las ratas de cada subgrupo (8 ratas) alimentadas con diferentes concentraciones de lípidos (2, 5 y 10 %) recibieron 1.0 mg de ^{13}C -ácido linoléico por vía oral. Las ratas más la camada se introdujeron dentro de una jaula, 5h después de la administración de la dosis la rata madre se sacrificó para medir el enriquecimiento del ^{13}C - en ácido linoléico y ácido araquidónico en el hígado, tejido adiposo parametrial, glándula mamaria y cuajo. Las crías se sacrificaron para diseccionar el contenido estomacal (cuajo de leche) del cual se extrajeron los lípidos. Se pesaron muestras por duplicado de cada uno de los tejidos (aproximadamente 0.5 g), y los lípidos se extrajeron utilizando el método de Folch modificado.⁶⁶ Este método se basa en la extracción de lípidos de los tejidos y del cuajo con una mezcla de solventes orgánicos (cloroformo:metanol, 2:1) y posteriormente cuantificados por gravimetría. Con el fin de determinar los niveles basales del enriquecimiento natural dado por el consumo del aceite de maíz de la dieta, que contiene ^{13}C , se incluyeron tres ratas por grupo a las cuales no se les administró la dosis oral de ^{13}C -ácido linoléico.

a. Análisis de la composición de ácidos grasos

Los ácidos grasos presentes en los lípidos del cuajo o de los tejidos (hígado, glándula mamaria, tejido adiposo) se identificaron por cromatografía de gases. Los ácidos grasos fueron trans-esterificados con metanol en ácido clorhídrico (HCl 3N) y extraídos en hexano, posteriormente fueron identificados como ésteres metílicos.³⁷ El ácido clorhídrico en metanol es útil para preparar metil ésteres de ácidos grasos volátiles. Los ácidos grasos son esterificados calentándolos con un alcohol anhídrido (por ejemplo metanol en presencia de un catalizador ácido como el HCl). En la reacción, una molécula del ácido graso y una molécula del alcohol son unidas, con la liberación de una molécula de agua, los derivados son recuperados fácil y rápidamente. El proceso de metilación consistió en lo siguiente: A 20 mg de los lípidos extraídos se agregó 1 ml de metanol (99.9 %), 1ml de HCl 3N y 0.5ml de hexano (pureza 97 %) que contenía ácido margárico (C17) como estándar interno (ácido heptadecaenoico 1 mg/0.75ml de hexano). La mezcla se incubó a 90 °C durante 1h, posteriormente se eliminó el exceso de agua agregando una mezcla anhidra en polvo de Na₂SO₄/NaHCO₃/NaCO₃ 2:2:1. A continuación se agregó 1 ml de hexano y se centrifugó para separar la fase orgánica. La fase orgánica se evaporó con gas nitrógeno (99.999 % pureza). Finalmente los ácidos grasos metilados fueron disueltos en 1ml de hexano que contenía butilhidroxitolueno (BHT 2 g/L) como agente antioxidante (67). De esta solución se inyectó 1 µl en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 Serie II para la identificación de los ácidos grasos, utilizando una columna capilar de 50 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y con CP-Sil 88 % como fase estacionaria. Los ácidos grasos fueron separados en las siguientes condiciones: temperatura del inyector 270 °C, temperatura del detector de ionización de flama 300 °C, la temperatura inicial de la columna fue de 130 °C durante 1 min con un incremento posterior de 0.1 °C/min hasta alcanzar 131 °C, y un segundo incremento de 2.5 °C/min hasta alcanzar 210 °C y se mantuvo en esta temperatura durante 5 min. Los ácidos grasos de las muestras se identificaron por su comparación con los tiempos de retención de estándares de referencia (Poly Science, Illinois USA).

b. Análisis de la relación isotópica ¹³C/¹²C en el ácido linoléico y ácido araquidónico.

Para la determinación del enriquecimiento de ^{13}C en ácido linoléico y ácido araquidónico se inyectó 1 μl de la solución que contenía los ácidos grasos transesterificados en un cromatógrafo de gases (GC) Agilent 6890, acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (EMRI) mediante una interfase GC Combustión III Finnigan Termo Quest. En este análisis, primero los ácidos grasos fueron separados en un cromatógrafo de gases en las siguientes condiciones: temperatura del inyector 250 $^{\circ}\text{C}$, la temperatura inicial de la columna fue de 130 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min con un incremento posterior de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar 180 $^{\circ}\text{C}$, y un segundo incremento de 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar 200 $^{\circ}\text{C}$; finalmente un tercer incremento de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar 210 $^{\circ}\text{C}$, se mantuvo en esta temperatura durante 27 min. La columna utilizada para la separación tiene las mismas características que la mencionada anteriormente. Los ácidos grasos pasan a través de la columna capilar del cromatógrafo de gases en donde son separados en base a su peso molecular y al número de insaturaciones. Posteriormente llegan al reactor de oxidación, los primeros ácidos grasos que llegan a éste son los que tienen un menor número de átomos de carbono. El reactor consiste de un tubo de aluminio (Al_2O_3), que tiene tres alambres entrelazados, uno de cobre, uno de níquel y uno de platino (Cu/Ni/Pt). En el reactor se lleva a cabo la combustión de cada ácido graso hasta CO_2 a 940 $^{\circ}\text{C}$. A continuación el CO_2 pasa a una fuente de ionización en donde es ionizado por un impacto electrónico, los iones generados son acelerados por un gradiente de potencial proporcionándoles energía cinética. Los iones son deflectados al pasar por un campo magnético, el radio de giro es menor para los iones (isótopos) ligeros, es decir su trayectoria se defleca en mayor medida que la de los iones pesados. Estos isótopos son colectados simultáneamente en diferentes colectores de Faraday, que identifican las masas 44, 45 o 46. La concentración de las masas 44 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$), 45 ($^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$ y $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$) y 46 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$), resultado de las diferentes combinaciones posibles de los isótopos ^{18}O , ^{17}O , ^{16}O , ^{13}C y ^{12}C , se determinó a partir de las corrientes iónicas medidas en los colectores. El enriquecimiento en ^{13}C se calculó en base a un gas de referencia (CO_2), valores positivos de $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ indican un enriquecimiento de las muestras con ^{13}C . A partir de los valores de las $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ se calculó el % de ^{13}C -AL presente en las muestras y el % de ^{13}C -AL convertido en AA. El análisis de la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en los ácidos grasos se realizó en el laboratorio

de espectrometría de masas de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición-CMN, IMSS.

G. Incorporación a los tejidos maternos y oxidación total del ácido linoléico (^{14}C -AL) de la dieta.

Para medir la incorporación y la oxidación total del ácido linoléico de la dieta en las ratas, se utilizó el método descrito por Oller Do Nascimento (1986).⁶⁸ El día 12 de la lactancia las ratas de cada subgrupo (8 ratas) alimentadas con diferentes concentraciones de lípidos (2, 5 y 10 %) recibieron por vía oral una dosis de 0.8 μCi (0.5 g) de ^{14}C -AL. Posteriormente las ratas (más las crías) se introdujeron en un sistema diseñado para capturar el $^{14}\text{CO}_2$ proveniente de la oxidación del ^{14}C -AL. El $^{14}\text{CO}_2$ fue atrapado en una mezcla de etanolamina/etilenglicol 1:1, la mezcla se cambio cada hora durante 5h. De ésta se tomaron por duplicado 500 μl y se agregaran 5 ml de líquido de centelleo (Instagel) y se cuantificó la radiactividad del ^{14}C en un contador de centelleo líquido (Beckman Fullerton, CA).

a) Determinación de la incorporación de los lípidos marcados con ^{14}C a los tejidos.

Cinco horas después de la administración del ^{14}C -AL las ratas madres se anestesiaron con pentobarbital sódico (35 mg/kg de peso corporal) y se disecaron el hígado, el tejido adiposo, la glándula mamaria y el tracto gastrointestinal, éste último fue homogeneizado con 100 ml de ácido perclórico (HClO_4) al 3%. Además, las crías se sacrificaron introduciéndolas en una cámara con éter etílico y se disecó el estómago para obtener el cuajo de leche. Posteriormente, se extrajeron los lípidos de los tejidos, de la carcasa de la madre, de la cría y del cuajo utilizando el método de Stansbie. Este método consiste en pesar muestras por duplicado de cada uno de los tejidos (aproximadamente 0.5 g), de los homogeneizados del tracto gastrointestinal y de la carcasa se pesaron aproximadamente 5 g. Los lípidos se saponificaron con la adición de 1.5 ml de KOH al 60% y se incubaron a 70 °C por dos horas. Después de la incubación, las muestras se neutralizaron con 1.5 ml de H_2SO_4 6M y los lípidos se extrajeron tres veces con éter de petróleo. En la última extracción se evaporó el

solvente y los lípidos se disolvieron con líquido de centelleo (Instagel), la radiactividad del ^{14}C se cuantificó en un contador de centelleo líquido (Beckman Fullerton, CA).

H. Expresión del RNAm de $\Delta 6\text{D}$, $\Delta 5\text{D}$, SREBP-1, PGC α , PGC β , y PPAR α en glándula mamaria, hígado y tejido adiposo de rata lactante.

a. Extracción de RNA total

A partir de tres ratas de cada subgrupo utilizado para medir la conversión del ácido linoléico (^{13}C -AL) de la dieta, se obtuvieron muestras de hígado, tejido adiposo y glándula mamaria, las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis. De los tejidos se extrajo el RNA total usando el método de Chirgwin (1979).⁶⁹ Este método consiste en moler 0.5 g de tejido en un homogeneizador (Polytron® PT 1200, Kinematica AG) con 8 ml de tiocianato de guanidina y 56 μl de β -mercaptoetanol. Posteriormente se agregaron 400 μl de sarcosil al 10 % y se centrifugó para obtener el sobrenadante, el cual se transfirió a un tubo que contenía 4 ml de CsCl 5.7 M y se centrifugó a 29,000 rpm durante 18h a $18\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado se disolvió en agua con dietilpirocarbonato (DEPC) estéril, posteriormente el RNA se extrajo y se precipitó con acetato de sodio 3 M y etanol absoluto, finalmente el RNA se disolvió en agua DEPC estéril.⁶⁹ Se tomaron alícuotas para su cuantificación e integridad y el resto se conservó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

b. Cuantificación del RNA total.

Las muestras de RNA total se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Beckman) con lámpara UV. A partir de los valores de absorbancia a 260 nm se calculó su concentración utilizando la siguiente ecuación.

$$[\text{RNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = (\text{Absorbancia a } 260 \text{ nm}) (\text{Dilución}) (40 \mu\text{g}/\mu\text{l})/1000$$

Sabiendo que 1 densidad óptica a 260 nm (1 DO_{260}) = 40 μg de RNA.

La relación de absorbancia a 260/280 indica la pureza de RNA, se considera que las relaciones cercanas a 2.0 unidades de $\text{DO}_{260/280}$ son las óptimas.

c. Integridad del RNA

Para determinar la integridad de RNA total, se sometió una muestra del mismo a electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1.0 % teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). La electroforesis se llevó a cabo a 90 voltios durante 2 horas. El RNA se observó en un transiluminador con luz ultravioleta.

El RNA extraído se utilizó primeramente para saber si se expresaba el RNAm de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ en la glándula mamaria y el tejido adiposo mediante transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), posteriormente se cuantificó la abundancia de los RNAm utilizando la técnica de Northern blot.

d. RT-PCR

El cDNA se sintetizó a partir del RNA total obtenido de los tejidos por medio de la transcripción reversa, utilizando oligo dT. Las moléculas de RNAm funcionan como molde y el oligo dT como cebador. Además, se requiere la presencia de dNTP's que funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa, de lo que resulta una hebra de DNA complementario. El cDNA sintetizado sirvió como molde para su amplificación por PCR. El RT-PCR se realizó en dos etapas:

1. RT

En 11 µl de volumen final se mezclaron; 5 µg de RNA total, 2 µl de solución amortiguadora de transcriptasa reversa 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8.3; KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM de), 2 µl de la mezcla de dNTP's (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) 2 mM, 1 µl de inhibidor de RNAsa (40 U/µl, Boehringer Mannheim), 1 µl de ditiotreitolo (DTT) 0.1 M, 1 µl de oligo (dT₁₂₋₁₈ 500 µg/ml) y 0.25 µl de transcriptasa reversa M-MLV (por sus siglas en inglés Moloney Murine Leucemia Virus, 200 U/µl, Invitrogen™ Life Technologies). La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera, primero se alineo el oligo dT a 65 °C durante 5 min y posteriormente la síntesis se llevó a cabo a 42 °C durante 60 min y finalmente a 94 °C por 5 min.

2. PCR

El cDNA obtenido se uso para la PCR en un volumen final de 25 µl, la mezcla de reacción contenía lo siguiente: 2.5 µl amortiguador de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8.4, KCl 500 mM), 1.5 µl de MgCl₂ (25 mM), 1 µl de la mezcla de dNTP's (10 mM), 1 µl del oligonucleotido (20 pmoles) específico, 2 µl del cDNA y 0.5 µl de la Taq

polimerasa (5 U/ μ l). La secuencia de cada oligonucleótido, el tamaño de los productos de amplificación y la temperatura de alineamiento de cada uno de los genes estudiados se muestra en la tabla 3. Todas las regiones génicas se amplificaron bajo las siguientes condiciones:

- 1) Un ciclo a 95 °C por 5 min; T_m por 1 min y 72 °C por 90 seg.
- 2) Treinta y tres ciclos a 95 °C, 1 min; T_m, 1 min y 72 °C, 90 seg.
- 3) Un ciclo 95 °C, 1 min; T_m, 1 min y 72 °C, 7 min.

La T_m o temperatura de alineamiento fue específica para cada oligonucleótido, ver tabla 3.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml). Para identificar el tamaño de los productos de PCR, en la electroforesis se incluyó un marcador de pares de 100 pares de bases.

Para confirmar las secuencias de bases, los productos de PCR de la Δ 6D y Δ 5D fueron secuenciados usando ABI PRISM Big Dye Terminators v3 en un secuenciador automatizado siguiendo los procedimientos del fabricante (Applied Biosystems).

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de las regiones génicas.

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Producto de PCR (pb)	Temperatura de alineamiento (Tm)
Δ6D	Upper	5' TGC CTT CCG TGC CTT CCA C 3'	925	59.4 °C
	Lower	5' GTG CCC GCT GAA CCA GTC ATT 3'		
Δ5D	Upper	5' TCT TGC CCA CGA TGC CAC GAC 3'	688	60.6 °C
	Lower	5' CTT TGC CCC GCC TGC TTC TGA 3'		
SREBP-1	Upper	5' TCC CAG AGT AGC CCC TTG TTC 3'	1008	60.7 °C
	Lower	5' CCA GTC CCC ATC CAC GAA 3'		
FAS	Upper	5' GCT TTG CTG CCG TGT CCT TCT 3'	850	61 °C
	Lower	5' GTG TCT GCT GGG GTC CTC GTT 3'		
PPAR α	Upper	5' GTC GAA TAT GTG GGG ACA AGG 3'	977	56.4 °C
	Lower	5' AAG GAG CTT TGG GAA GAG GAA 3'		

Secuencia de los oligonucleótidos de la Δ6D = delta 6 desaturasa, Δ5D = delta 5 desaturasa, SREBP-1 = proteína de unión a elementos de respuesta a esteroides, PPAR α = receptor activado por proliferadores de peroxisoma, pb = pares de bases.

e. Análisis por Northern Blot

Para cuantificar la abundancia de los RNAm de los genes estudiados se utilizó el método de Northern Blot. Este procedimiento consta de diferentes pasos a partir del RNA total aislado: 1) Separación del RNA total de acuerdo a su tamaño en un gel desnaturante de agarosa; 2) transferencia del RNA a un soporte sólido de manera que permita conservar su distribución topológica; 3) fijación del RNA a una matriz sólida; 4) hibridación del RNA con sondas complementarias a las secuencias de interés; 5) eliminación del exceso de sonda unida no específicamente a la matriz sólida y 6) detección, captura y análisis de una imagen de la sonda unida a su secuencia específica.⁶⁹

Brevemente este método consiste en lo siguiente: 15 µg de RNA total previamente desnaturalizado (65 °C durante 5 min) se sometieron a electroforesis horizontal utilizando un gel de agarosa al 1.0 % con 37 % de formaldehído (desnaturalizante). Se utilizó GRB 1x como amortiguador para la electroforesis, ésta se llevo a cabo a 90 volts durante 2.5 horas. Posteriormente, el RNA se transfirió a una membrana de nylon (soporte sólido, Hybond-N+, Amersham, Buckinghamshire, UK) durante 24 h a temperatura ambiente, y después se fijo con luz UV en un crosslinker (Amersham). Las membranas fueron prehibridadas con el amortiguador rapid-hyd (Amersham) a 65 °C durante 1 hora y posteriormente hibridadas con la sonda de DNA complementario durante 2.5 h a 65 °C. Las sondas de cDNA de los genes $\Delta 5D$, $\Delta 6D$, SREBP-1, FAS (sintasa de ácidos grasos) y PPAR α se obtuvieron del RNA de hígado y se prepararon mediante RT-PCR. Se incluyó a FAS porque es un gene blanco para SREBP-1. Inmediatamente se marcaron con desoxicitidina 5' [α -³²P] trifosfato (110 Tbq/mmol, Amersham) usando el sistema rediprime para el marcaje del DNA (Amersham). Las membranas se lavaron una vez con citrato de sodio estándar (SSC) 2X / sulfato dodecil de sodio (SDS) 0.1 % a temperatura ambiente durante 20 minutos, después se lavaron dos veces con SSC 0.1X / SDS 0.1 % a 65°C durante 15 minutos cada lavado. Las membranas se expusieron a películas de rayos X (Eastman Kodak) a -70 °C utilizando una pantalla intensificadora. Las imágenes se digitalizaron y las bandas radiactivas se cuantificaron (cpm) usando un Instant Imager (Packard Instrument, Meriden CT). Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias.

f. PCR en tiempo real

Para la cuantificación del RNAm por PCR en tiempo real, el RNA total fue extraído de glándula mamaria de acuerdo al método de Chirgwin (1979).⁶⁹ El cDNA se sintetizó a partir de 350 ng de RNA total con el Multiscribe Master Mix (PE Applied Biosystems). El cDNA fue amplificado por PCR en tiempo real usando la sonda Taqman y los oligonucleòtidos para PGC-1 α (Rn 00580241) y PGC1-1 β (Rn 00598552). La reacción y detección se llevó a cabo en un sistema ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems). La sonda estaba marcada con FAM en el extremo 5' y con

TAMRA en el extremo 3'. La amplificación se llevó a cabo en un volumen total de 10 µl conteniendo 22 ng de cDNA, 900 nM de cada oligonucleotido y 12.5 µl de mezcla maestra Universal Taqman. En cada reacción la polimerasa se activo pre-incubando a 95 °C por 10 min. La amplificación se realizó en 45 ciclos de 95 °C por 15 seg, finalmente una extensión final de 60 °C por 60 seg. La cantidad de cDNA de PGC-1 α y de PGC-1 β en cada muestra se normalizó con el gene *housekeeping* para β -actina. La sonda y los oligonucleotidos para PGC 1- α , 1 β y β -actina se obtuvieron de PE Applied Biosystems (Pre-developed TaqMan Assay Reagents Control kits). El PCR en tiempo real se realizó por triplicado para cada muestra.

I. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar. Las series longitudinales de datos (peso corporal de la rata madre, ingesta de alimento) y la comparación en la incorporación, conversión del ácido linoléico y % de cada ácido graso entre los 3 grupos de estudio se hizo con análisis de ANOVA de una vía y con una pos prueba de Bonferroni.

J. Consideraciones éticas

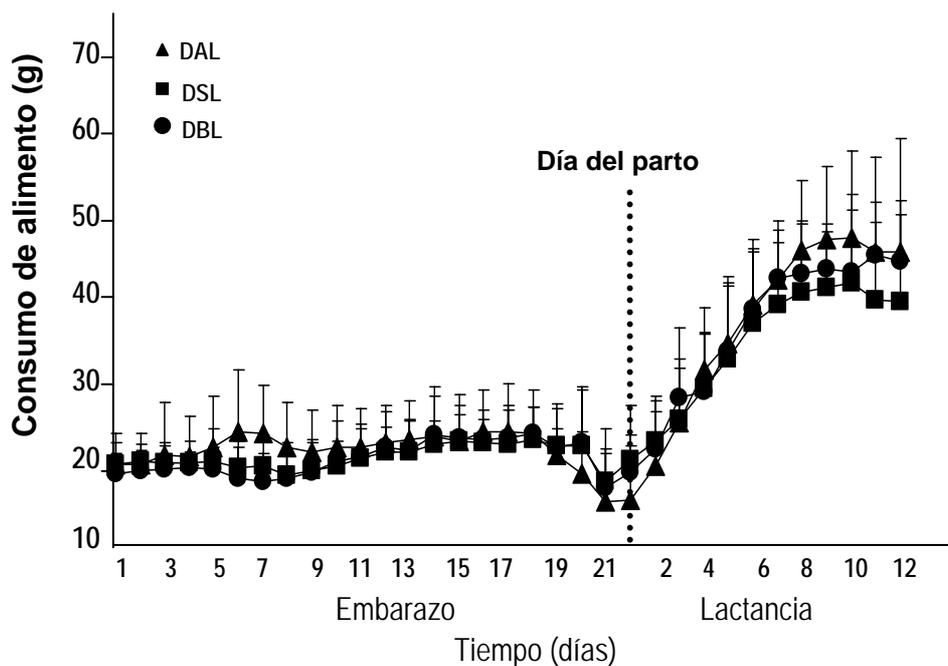
La presente investigación cumple con las consideraciones éticas, los reglamentos institucionales y con las normas propuestas por la ley General de Salud. El sacrificio de los animales esta de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

VII. RESULTADOS

A. Caracterización del modelo animal

a) Ingesta materna

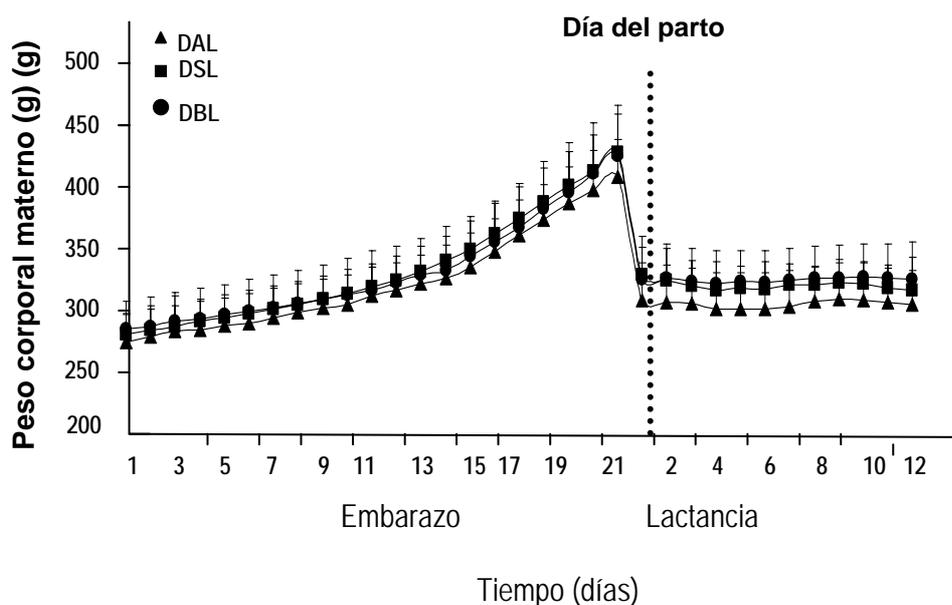
La ingesta de alimento (g/día) de las ratas madre durante el embarazo y hasta el día 12 de la lactancia de los tres grupos experimentales se muestra en la gráfica 1. Al inicio de la gestación la ingesta dietaria fue 19.5 g/día, la cual se incrementó ligeramente hasta alcanzar 21 g/día en la última etapa de la gestación, estos valores se observaron en promedio en los tres grupos experimentales. Durante la lactancia, la ingesta de alimento se incrementó en un 100 % en todos los grupos, al iniciar fue de 21 g/día y aumento hasta 42 g/día en promedio en los tres grupos experimentales en el día 12 de lactancia. No se encontraron diferencias significativas en la ingesta de alimento durante el embarazo y los primeros 12 días de la lactancia entre los grupos experimentales.



Gráfica 1. Ingesta de alimento de la rata madre durante el embarazo y hasta el día 12 de lactancia de ratas alimentadas con diferente concentración de aceite de maíz. DBL = dieta baja (2 %); DSL = dieta suficiente (5 %); y DAL = dieta alta (10 %) en lípidos (aceite de maíz), n = 20 ratas por grupo. Los valores se presentan como promedio \pm desviación estándar.

b). Peso corporal materno

El peso corporal (en gramos) de las ratas madre durante el embarazo y hasta el día 12 de la lactancia de los tres grupos experimentales se muestra en la **gráfica 2**. Durante el periodo de gestación, el peso de las ratas aumentó progresivamente desde 276 g en el día uno de embarazo hasta alcanzar un peso de 415 g al final del embarazo, estos valores fueron en promedio en los tres grupos experimentales. El día del parto se presentó una disminución en el peso, el cual no llegó a descender al que la rata tenía al inicio del embarazo. En el día 1 de la lactancia la rata tuvo un peso corporal promedio en los tres grupos de 324.9 g, éste se mantuvo constante durante los primeros 12 días de lactancia. En este día (día del experimento) la rata madre tuvo un peso de 312.65 g. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal entre los grupos (DBL, DSL y DAL) en las etapas estudiadas.



Gráfica 2. Peso corporal (en gramos) de las ratas madre durante el embarazo y hasta el día 12 de la lactancia de ratas alimentadas con diferente concentración de aceite de maíz. DBL = dieta baja (2 %); DSL = dieta suficiente (5 %); y DAL = dieta alta (10 %) en lípidos (aceite de maíz), n = 20 ratas por grupo. Los valores se presentan como promedio \pm desviación estándar.

B. Conversión del ácido linoléico ($^{13}\text{C-AL}$) de la dieta en ácido araquidónico ($^{13}\text{C-AA}$) en el organismo materno.

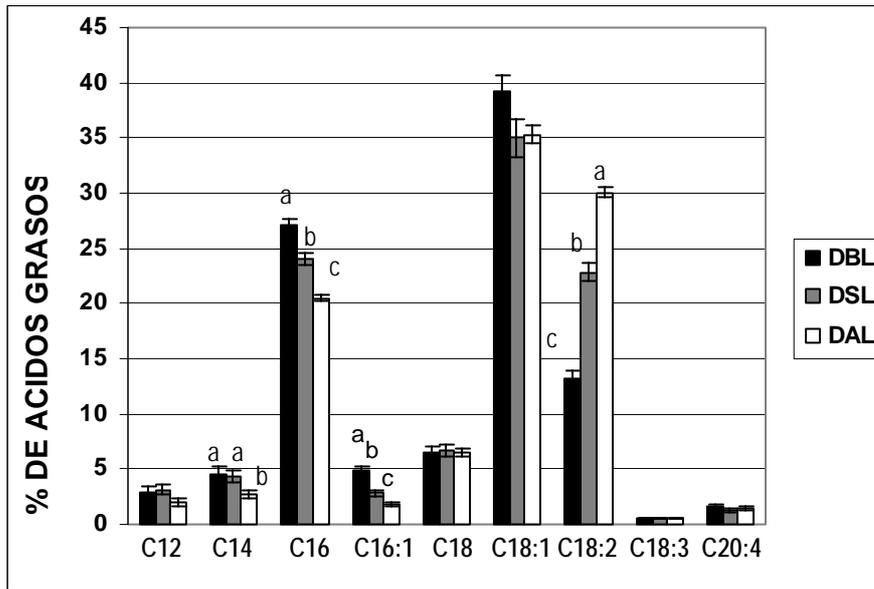
A ratas alimentadas con una dieta baja (2 %), suficiente (5 %) o alta (10 %) en lípidos durante el embarazo y hasta el día 12 de la lactancia se les administró una dosis oral de ^{13}C -AL, cinco horas después se obtuvo el cuajo de las crías y los tejidos maternos en donde se midió la conversión de este ácido graso en ^{13}C -ácido araquidónico (^{13}C -AA). Para calcular esta conversión es necesario conocer el contenido de AL y AA en cada uno de los tejidos, de tal manera que se determinó la composición de ácidos grasos en éstos.

a) Análisis de la composición de ácidos grasos.

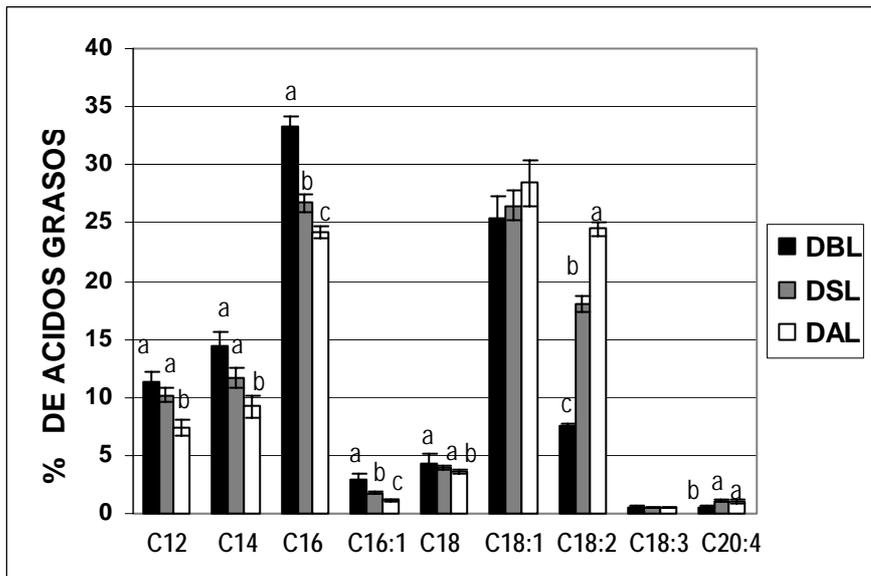
En las **gráficas 3A-D** se muestran la composición de ácidos grasos que se encuentran en el cuajo y en los tejidos analizados (glándula mamaria, hígado y tejido adiposo) de ratas de 12 días de lactancia. En la glándula mamaria los ácidos grasos más abundantes fueron; C16:0, C18:1 y C18:2, de estos el más abundante fue el C18:1. De éstos, sólo los porcentajes del C16:0 y C18:2 fueron estadísticamente diferente en los grupos experimentales. Siendo para el C16:0 de 27.11 ± 0.54 %, 23.96 ± 0.55 % y 20.44 ± 0.26 % en los grupos DBL, DSL y DAL respectivamente, y para el C18:2 fue de 13.23 ± 0.64 %, 22.77 ± 0.81 % y 30.07 ± 0.45 % en los grupos DBL, DSL y DAL respectivamente (**gráfica 3A**). Los ácidos grasos más abundantes en el cuajo fueron; laúrico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), oleico (C18:1) y linoléico (C18:2), siendo el más abundante el palmítico. El porcentaje de C16:0 y C18:2 fueron estadísticamente diferentes en los tres grupos experimentales, el C16:0 fue del 33.3 ± 0.82 %, 26.7 ± 0.75 %, 24.2 ± 0.53 % en los grupos DBL, DSL y DAL respectivamente, y para el C18:2 fue de 7.5 ± 0.31 %, 18.02 ± 0.74 % y 24.49 ± 0.59 % en los grupos DBL, DSL y DAL respectivamente (**gráfica 3B**). Los ácidos grasos más abundantes en el hígado fueron; C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 y araquidónico (C20:4), siendo el más abundante el C18:1. De éstos se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tres grupos experimentales en el C18:1 y C18:2. Siendo para el C18:1 el 30.33 ± 1.90 %, 21.62 ± 1.87 % y 13.96 ± 0.34 % en los grupos DBL, DSL y DAL respectivamente, y para el C18:2 de 8.41 ± 1.83 %, 11.0 ± 1.18 % y 17.63 ± 0.62 % en los grupos DBL, DSL y DAL respectivamente (**gráfica 3C**). Los ácidos grasos más abundantes en el tejido adiposo fueron: C16:0, C18:1 y C18:2, no se encontraron diferencias en el porcentaje de los ácidos grasos entre los

grupos experimentales. Los valores se expresan como promedio del porcentaje \pm error estándar (**gráfica 3D**).

A) Composición de ácidos grasos en la glándula mamaria

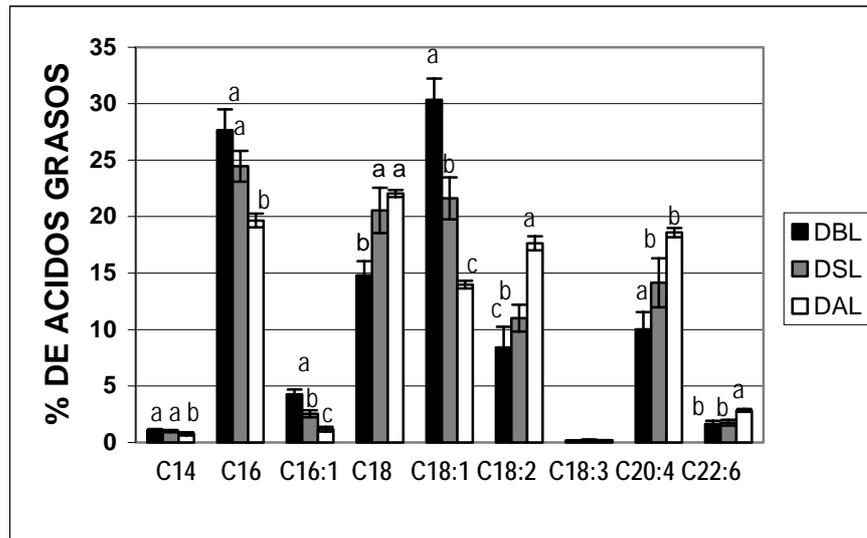


B) Composición de ácidos grasos en el cuajo de crías

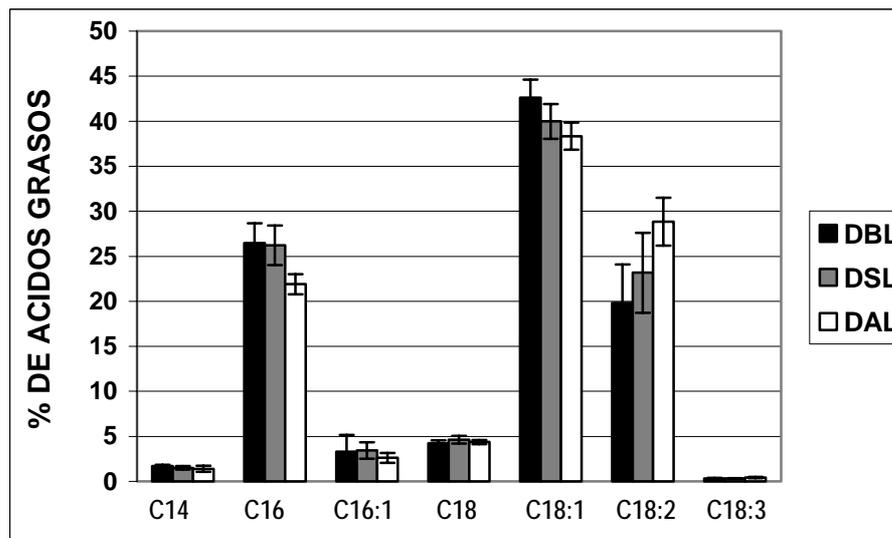


Gráficas 3A-B. Composición de ácidos grasos de la glándula mamaria, n = 10 (3A) y del cuajo de 7 crías por camada, n = 12 (3B) de ratas lactantes (12 días) alimentadas con diferente concentración de lípidos (aceite de maíz). Los resultados se muestran como promedio \pm error estándar. Diferente letra en las barras que representan cada ácido graso indican $p < 0.05$.

C) Composición de ácidos grasos en el hígado



D) Composición de ácidos grasos en el tejido adiposo



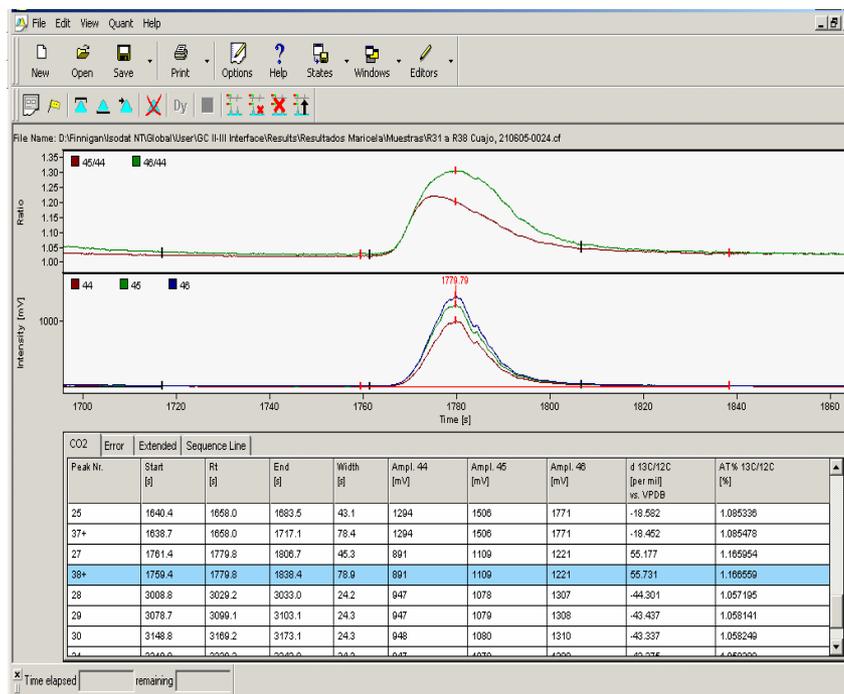
Gráficas 3C-D. Composición de ácidos grasos del hígado, n = 10 (3C) y del tejido adiposo n = 5 (3D) de ratas lactantes (12 días) alimentadas con diferente concentración de lípidos (aceite de maíz). Los resultados se muestran como promedio \pm error estándar.

La composición de ácidos grasos de la dieta proporcionada a los animales en estudio, en su mayoría contiene LC-PUFAs, cuya composición es la siguiente; C16:0 11.9%, C18:0 2.1%, C18:1 30.7% y C18:2 55.3%.

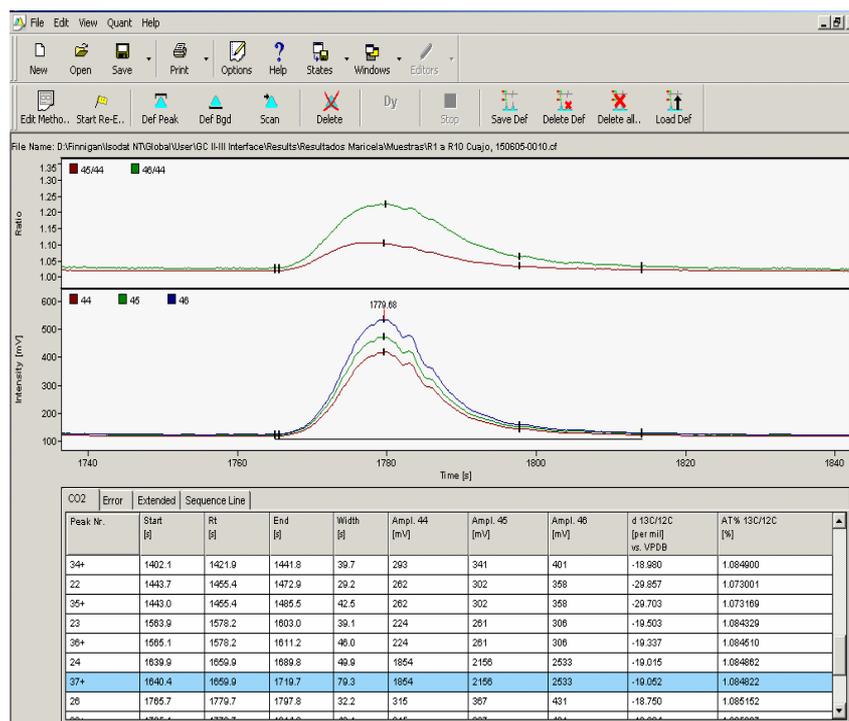
b. Análisis de la relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ en los ácidos grasos.

En las **gráficas 4A-B** se representan las masas isotópicas del CO_2 , 45, 46 y 47 con los valores de $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, en este caso el CO_2 proviene de la combustión del AL de una muestra de cuajo de una cría, cuya madre recibió una dosis oral de ^{13}C -AL (4A). En 4B se muestra lo mismo, pero la madre no recibió la dosis, por lo que el valor de delta $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ es el enriquecimiento basal. En promedio el valor de $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ para el gas de referencia fue de -43.47, en base a este valor se calcularon los $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de las muestras.

4A



4B



Gráficas 4A y B. Gráficas representativas de las masas isotópicas del CO₂; 44,45 y 46. Cuajo de cría, cuya madre recibió una dosis oral de ¹³C-AL (A) y una que no la recibió (B).

En la **tabla 4** se muestra la incorporación del ¹³C-AL y su conversión en ¹³C-AA. Los resultados muestran que la mayor incorporación del AL fue en la glándula mamaria de 20.93 ± 6.22 %, 19.62 ± 2.74 % y 10.17 ± 2.05 % en los tres grupos experimentales; DBL, DSL y DAL respectivamente. La incorporación al cuajo, a la glándula mamaria y al hígado fue similar entre los tres grupos siendo menor en el hígado. En el tejido adiposo no se detectó AL marcado con el isótopo. En la misma tabla se muestra el % de ¹³C-AL convertido en ¹³C-AA. El ¹³C-AA sintetizado a partir del ¹³C-AL que se encontró en el hígado fue similar en los tres grupos experimentales. Además, el ¹³C-AA se encontró en mayor porcentaje en la glándula mamaria y en menor cantidad en el cuajo, siendo en ambos casos estadísticamente menor en el grupo DAL en comparación con el grupo DSL. No se detectó ¹³C-AA en el tejido adiposo en ninguno de los grupos experimentales. Los valores se expresan como promedio del porcentaje \pm error estándar.

Tabla 4. Incorporación y conversión del ácido linoléico en ácido araquidónico en hígado, glándula mamaria, tejido adiposo y cuajo.

	DBL	DSL	DAL
	% de incorporación del ¹³C-AL/tejido total		
Hígado	2.60 ± 0.22	3.25 ± 0.38	2.48 ± 0.37
Glándula mamaria	20.93 ± 6.22	19.62 ± 2.74	10.17 ± 2.05
Cuajo	7.16 ± 2.33	13.73 ± 1.35	6.01 ± 2.43
Tejido adiposo	ND	ND	ND
	% del ¹³C-AL convertido en AA/tejido total		
Hígado	0.62 ± 0.12	0.81 ± 0.17	0.39 ± 0.12
Glándula mamaria	1.04 ± 0.49 ^{a,b}	0.36 ± 0.08 ^a	0.17 ± 0.05 ^b
Cuajo	0.10 ± 0.04 ^{a,b}	0.13 ± 0.01 ^a	0.03 ± 0.01 ^b
Tejido adiposo	ND	ND	ND
¹³C-AL convertido en AA (GM+Cu)	1.35 ± 0.46	0.46 ± 0.08	0.18 ± 0.05

Los resultados son expresados como el promedio ± error estándar. ND = no detectado, DBL = dieta baja (2 %, n = 14); DSL = dieta suficiente (5 %, n = 10) y DAL = dieta alta (10 % n = 10) en lípidos (aceite de maíz). Las letras indican el ANOVA ^{abc}p < 0.05.

C. Incorporación a los tejidos maternos y oxidación total del ácido linoléico (^{14}C -AL) de la dieta.

En la **tabla 5 y 6**, se muestra la incorporación del ácido linoléico y sus derivados marcados con ^{14}C en las crías y en el organismo materno en el día 12 de lactancia. Los animales fueron alimentados con dieta baja (2 %), suficiente (5 %) y alta (10 %) en lípidos (aceite de maíz) desde el embarazo hasta el día 12 de lactancia (día del experimento), en este día a la rata madre se le administró una dosis oral de ^{14}C -ácido linoléico (1- ^{14}C -AL). No se encontraron diferencias significativas en la cantidad de 1- ^{14}C -AL de la dosis que fue absorbida por el intestino de los animales (promedio \pm error estándar DBL 80.9 ± 3.3 %, DSL 82.7 ± 1.8 % y DAL 78.2 ± 2.9 %). Sin embargo, los resultados se presentan como porcentaje de la dosis absorbida y no de la dosis administrada. Cinco horas después de la administración del 1- ^{14}C -AL, el compartimiento con la mayor incorporación fue la glándula mamaria seguida del cuajo y de las crías. Los resultados de la tabla 5 muestran que aproximadamente el 35 % del ácido linoléico de la dieta es transferido a la glándula mamaria. El total de 1- ^{14}C -AL transferido a la glándula mamaria se definió como la suma de los porcentajes de la dosis absorbida/tejido total en la glándula mamaria, cuajo y crías.

Además, con los datos de incorporación del ^{14}C (en los lípidos del cuajo, glándula mamaria y las crías) y los datos del análisis del perfil de ácidos grasos del aceite de maíz, el cual mostró que contiene un 55.3 % de ácido linoléico, se calcularon los gramos de AL de la dieta /100g de alimento consumido que son transferidos a la glándula mamaria para la síntesis de la leche. Considerando que el 55.3 % de aceite de maíz es AL, entonces la DBL (2 g aceite de maíz) contiene 1.1 g, la DSL (5 g aceite de maíz) contiene 2.75 g y la DAL (10 g aceite de maíz) contiene 5.5 g de AL/100g de dieta. El 1.1, 2.75 y 5.5 g de AL/100g de dieta representan el 100 %, de AL, sin embargo, la incorporación de este ácido graso no fue del 100%. Con base a esto se calcularon cuantos g de AL se incorporaron considerando el % de incorporación ^{14}C a los lípidos en los tejidos. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el % de incorporación del 1- ^{14}C -AL a los diferentes tejidos, si se observaron diferencias en los g AL incorporados/100 g dieta a la glándula mamaria, los resultados muestran que las ratas alimentadas con la dieta alta en

lípidos incorporan a la glándula mamaria 2.06 y 5.9 veces más AL de la dieta que el grupo DSL y DBL respectivamente.

Tabla 5. Incorporación del ¹⁴C-ácido linoléico de la dieta en el día 12 de lactancia en la glándula mamaria, cuajo y crías de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de aceite de maíz.

Grupo experimental (g AL /100g de dieta)	Glándula mamaria	% de dosis absorbida/tejido total			Transferido a la glándula mamaria (GM + Cu + CC)	g AL incorporado/100 g dieta consumida (GM + Cu + CC)
		Cuajo	Carcasa de las crías			
DBL (1.1)	24.3 ± 3.3	10.1 ± 2.2	5.8 ± 1.6	32.6 ± 7.0	0.36 ± 0.08 ^c	
DSL (2.75)	21.6 ± 1.3	12.1 ± 1.7	4.4 ± 0.6	37.9 ± 2.6	1.04 ± 0.08 ^b	
DAL (5.5)	22.6 ± 3.2	12.5 ± 2.5	5.1 ± 0.7	34.0 ± 3.1	2.15 ± 0.32 ^a	

Los resultados son expresados como el promedio ± error estándar. DBL = dieta baja (2 %, n = 14); DSL = dieta suficiente (5 %, n = 10); y DAL = dieta alta (10 % n = 10) en lípidos (aceite de maíz). GM = glándula mamaria, Cu = cuajo, CC = carcasa de las crías, la n = número de camadas. Diferente letra dentro de la columna indica la diferencia estadística por el ANOVA de una vía ^{abc}p<0.05.

Además, el 1-¹⁴C-AL se incorporó a otros tejidos como el hígado, seguido de la carcasa materna y el tejido adiposo parametrial (tabla 6). No se observaron diferencias significativas en % de incorporación del 1-¹⁴C-AL a los diferentes tejidos.

Tabla 6. Incorporación del ¹⁴C-ácido linoléico en el día 12 de lactancia en el hígado, carcasa y tejido adiposo parametrial de ratas alimentadas con diferentes concentraciones de aceite de maíz.

Grupo experimental (contenido de AL g/100g)	% de dosis absorbida/tejido total		
	Tejido adiposo Parametrial	Hígado	Carcasa materna
DBL (1.1)	0.54 ± 0.08	8.3 ± 1.2	7.0 ± 1.2
DSL (2.75)	0.42 ± 0.11	5.2 ± 0.7	4.5 ± 0.9
DAL (5.5)	0.65 ± 0.13	6.1 ± 1.0	5.8 ± 1.4

Los resultados son expresados como el promedio ± error estándar. DBL = dieta baja (2 %, n = 14); DSL = dieta suficiente (5 %, n = 10); y DAL = dieta alta (10 % n = 10) en lípidos (aceite de maíz).

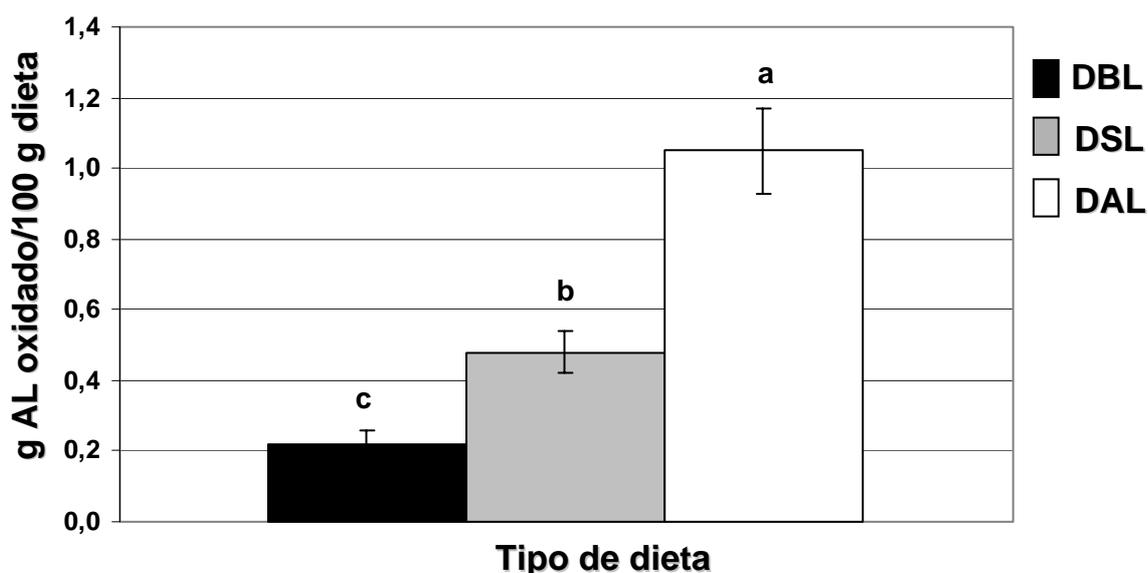
En la **tabla 7** y en la **gráfica 5** se observa el % de CO₂ espirado por la rata madre (en el día 12 de lactancia) y sus crías, proveniente de la dosis oral del ¹⁴C-AL administrada a las ratas alimentadas con una dieta con diferente contenido de lípidos (aceite de maíz). La oxidación total del ácido graso marcado ¹⁴C se monitoreó cada hora durante 5 horas. Además, se calcularon los gramos de AL oxidado/100g dieta de la misma manera que se calcularon los gramos de AL incorporados/100 g dieta, para este calculo se utilizó % de CO₂ producido durante las 5 horas después de administrar ¹⁴C-AL. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el % de CO₂ producido a partir del 1-¹⁴C-AL durante las 5 horas, si se hubo diferencias en

los g AL oxidados/100 g dieta. Los resultados muestran que las ratas alimentadas con la dieta alta en lípidos oxidan 2.1 y 4.8 veces más ácido linoléico de la dieta que las ratas de los grupos DSL y DBL respectivamente. Es decir, la oxidación del 1-¹⁴C-AL hasta CO₂ es directamente proporcional a la concentración de aceite de maíz de la dieta.

Tabla 7. Oxidación total del ¹⁴C-ácido linoléico en el día 12 de lactancia de ratas alimentadas con diferente concentración de lípidos.

Grupo experimental (contenido de AL g/100g)	% de CO ₂ de dosis absorbida	g AL oxidado/100g dieta
DBL (1.1)	18.09 ± 3.14	0.22 ± 0.04 ^c
DSL (2.75)	15.95 ± 1.85	0.48 ± 0.06 ^b
DAL (5.5)	17.43 ± 2.0	1.05 ± 0.12 ^a

Los resultados son expresados como el promedio ± error estándar. DBL = dieta baja (2 %, n = 14); DSL = dieta suficiente (5 %, n = 10); y DAL = dieta alta (10 % n = 10) en lípidos (aceite de maíz). AL = ácido linoléico. ANOVA de una vía ^{abc}p<0.05.



Gráfica 5. Efecto del contenido del aceite de maíz de la dieta sobre la oxidación total del ácido linoléico y sus derivados. Los resultados son expresados como el promedio \pm error estándar. DBL = dieta baja (2 %, n = 14); DSL = dieta suficiente (5 %, n = 10); y DAL = dieta alta (10 % n = 10) en lípidos (aceite de maíz). AL = ácido linoléico. ANOVA de una vía ^{abc} $p < 0.05$.

D. Expresión del RNAm de $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1, PGC α , PGC β , y PPAR α en glándula mamaria, hígado y tejido adiposo de rata lactante.

Se estudio el efecto de diferentes concentraciones de aceite de maíz en la dieta sobre los niveles de expresión del RNAm de $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1, PGC α , PGC β y PPAR α en glándula mamaria, hígado y tejido adiposo en el día 12 de la lactancia en ratas.

a) Expresión del RNAm de la $\Delta 6D$, $\Delta 5D$ en tejido adiposo y glándula mamaria.

Primeramente se investigó la presencia del RNAm de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ en la glándula mamaria y el tejido adiposo mediante RT-PCR. En la **figura 6** se muestra la expresión del RNAm de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ en tejido adiposo, glándula mamaria y en los tejidos previamente reportados que expresan estas desaturasas como el hígado y el cerebro. Los productos de PCR de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ desaturasa fueron

secuenciados como se describe en la estrategia metodológica, la secuencia de ambas desaturasas coincidió en un 100 % con el cDNA reportado en el GenBank para estos genes.

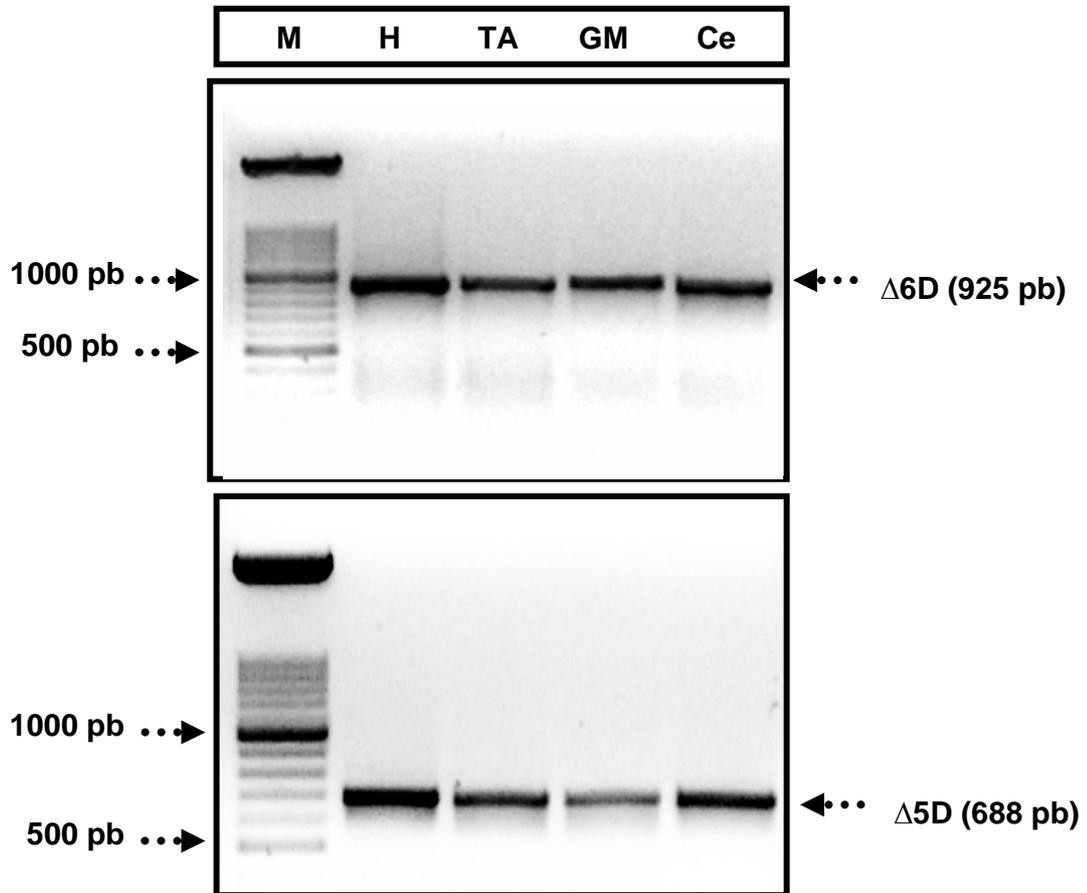


Figura 6. Producto de la reacción en cadena de la polimerasa del gen delta 6 ($\Delta 6D$) y delta 5 desaturasa ($\Delta 5D$). La PCR se hizo del cDNA sintetizado a partir del RNA total de; H = hígado, TA = tejido adiposo, GM = glándula mamaria y Ce = cerebro. M = marcador de pares de bases (100 pares de bases, pb). Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$).

b) Cuantificación de la abundancia del RNAm de la $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1 y PPAR α por Northern blot.

Mediante el análisis de Northern blot en hígado y glándula mamaria se identificaron dos transcritos de la $\Delta 6D$, uno reportado como dominante y uno menor con aproximadamente 4.0 y 2.2 kb respectivamente (**Figura 7A**). Además, los resultados muestran que en el hígado y en la glándula mamaria la abundancia del RNAm de la $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1 y FAS disminuye cuando las ratas fueron alimentadas con una dieta alta (10 %) en aceite de maíz (55.3 % de ácido linoléico) en la dieta, lo que sugiere que el RNAm de estos genes depende del contenido de ácido linoléico de la dieta. La mayor expresión del RNAm de $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1 y FAS se observó en el grupo de animales alimentado con una dieta baja en aceite de maíz (2 %).

Estos resultados indican que el alto contenido del ácido linoléico en el aceite de maíz disminuye la lipogénesis ya que se observó una menor expresión del RNAm de FAS, esto fue más claro en el hígado de los animales del grupo DAL, ya que se reprimió totalmente la expresión del RNAm de FAS. La disminución de la expresión es mediada a través de SREBP-1, ya que FAS es un gen blanco de este factor de transcripción. La expresión del RNAm de FAS siguió un patrón similar al de SREBP-1 (**Figura 7A**). Esos datos indican que el consumo del aceite de maíz disminuye la lipogénesis en el hígado y en la glándula mamaria. Además, los resultados muestran que la abundancia del RNAm de PPAR α en el hígado incrementa cuando aumenta el contenido de aceite de maíz de la dieta (**Figura 7A**). La abundancia del RNAm de PPAR α fue 1.33 veces mayor en el grupo DAL que en el grupo DBL y DSL (**Figura 7B**). Por otro lado, en la glándula mamaria el RNAm de PPAR α fue imperceptible por el análisis de Northern blot y apenas detectable por PCR en tiempo real.

En el tejido adiposo se expresó exclusivamente el transcrito dominante de la $\Delta 6D$, además de la expresión del RNAm de $\Delta 5D$. Asimismo, en este tejido no se observaron cambios en la abundancia del RNAm de $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1 y FAS en los grupos experimentales alimentados con diferentes concentraciones de aceite de

maíz en la dieta. La expresión del RNAm de PPAR α en el tejido adiposo fue mínima (**Figura 7A**).

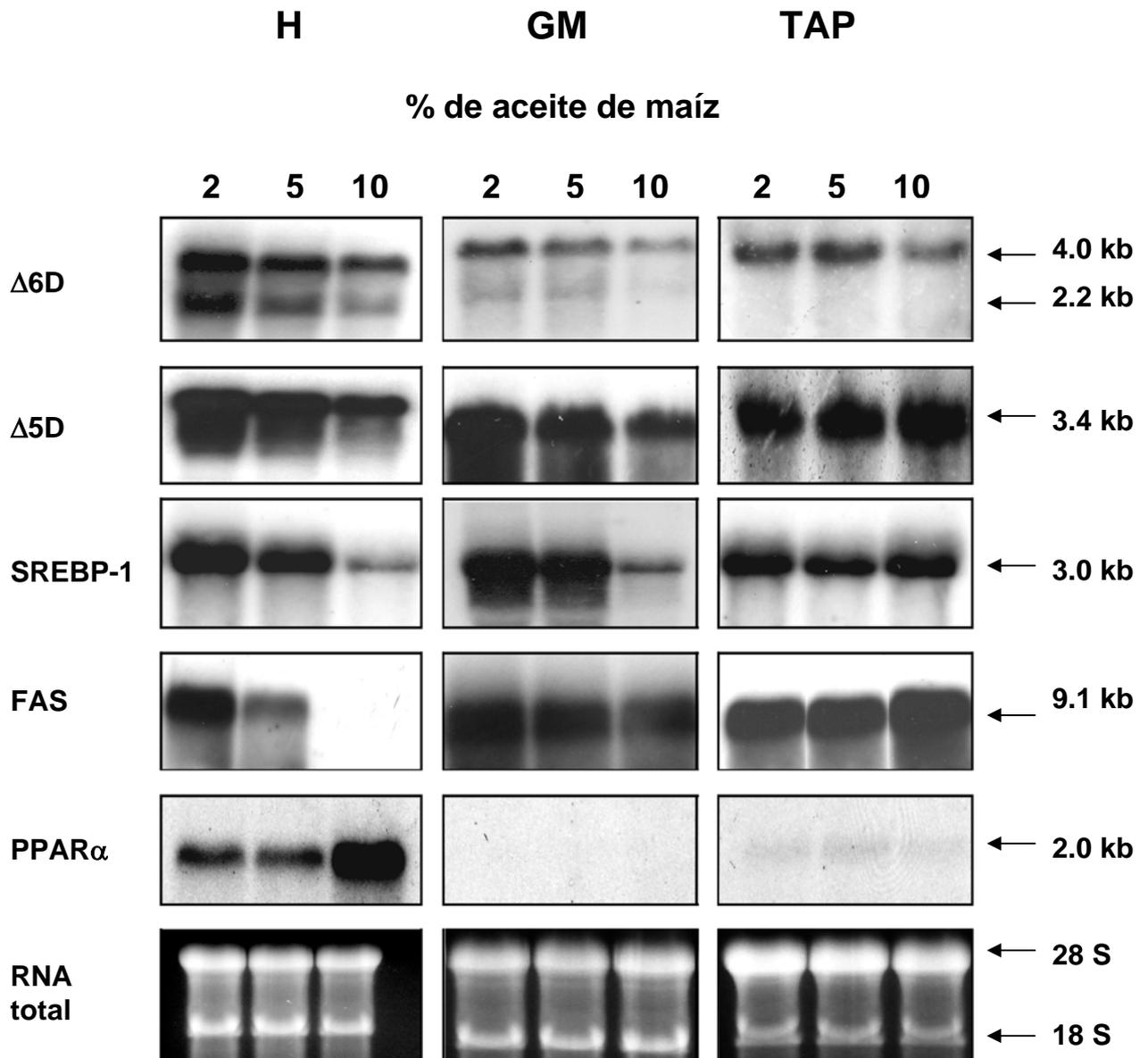


Figura 7A. Análisis de Northern blot de $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, SREBP-1, FAS y PPAR α en el H = hígado, GM = glándula mamaria y TAP = tejido adiposo parametrial de ratas de 12 días de lactancia, alimentadas con diferente concentración de aceite de maíz. 15 μ g de RNA total fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa desnaturizante. El RNA fue transferido a una membrana de nylon e hibridado con la sonda específica marcada con dioxicitidina 5' [α - ^{32}P] trifosfato. Finalmente las membranas se expusieron a películas de rayos X.

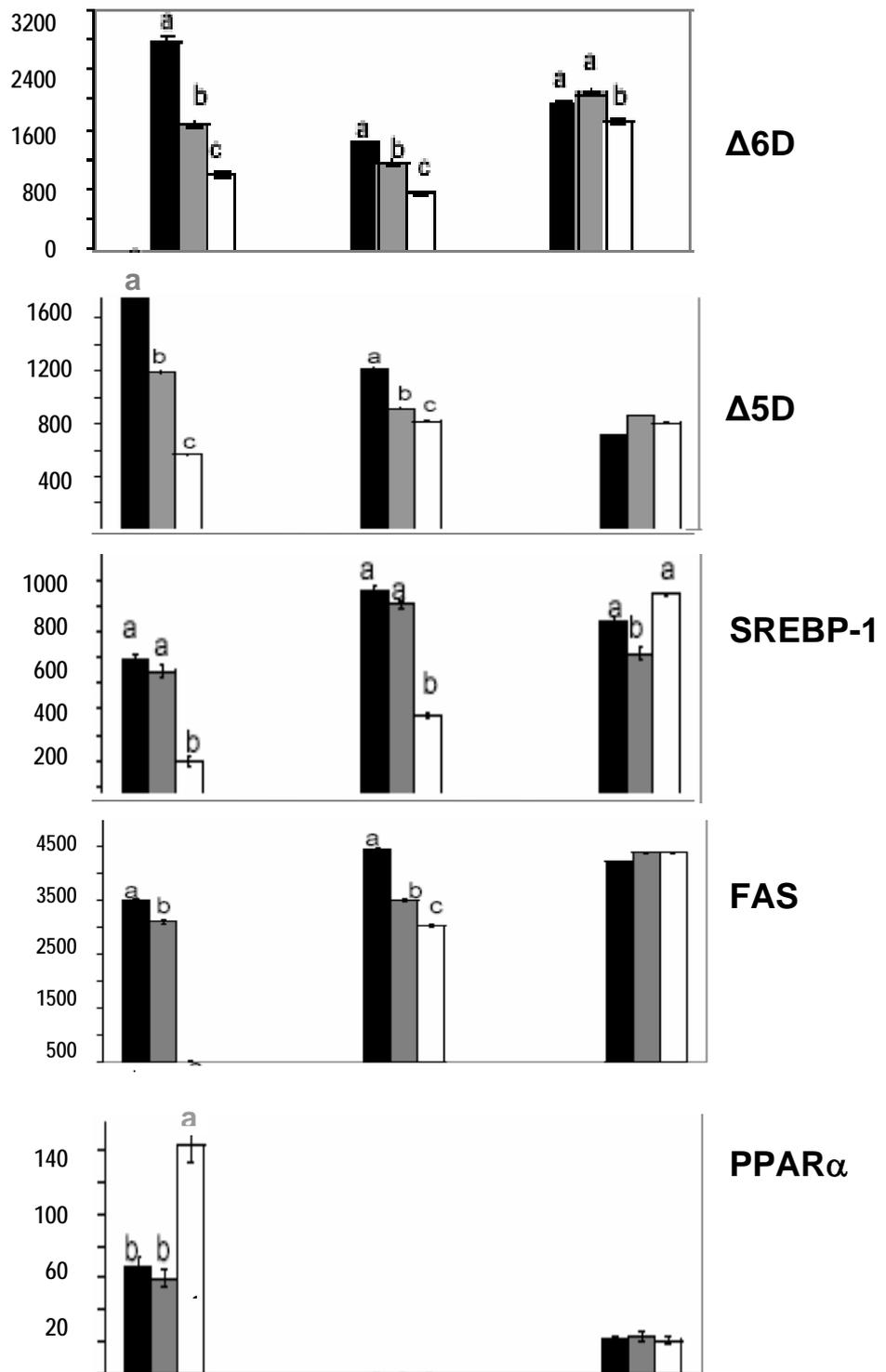


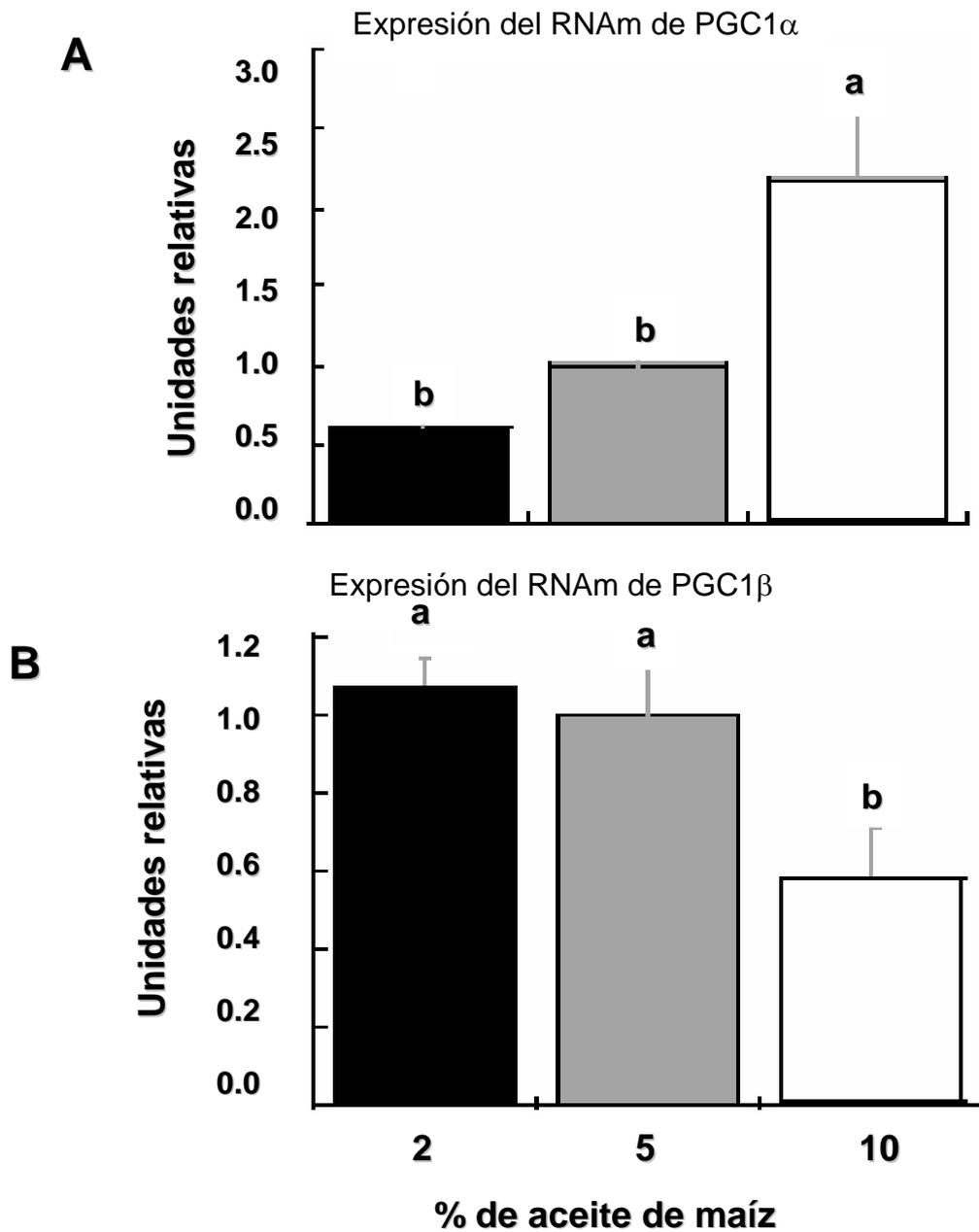
Figura 7B. Las imágenes autorradiográficas del Northern blot se digitalizaron y las bandas radiactivas se cuantificaron (cpm) usando un Instant Imager (Packard Instrument, Meriden CT). ■ = DBL, ▒ = DSL, □ = DAL.

c) Cuantificación de la abundancia del RNAm de PGC1 α y PGC1 β por PCR en tiempo real.

La represión coordinada de la expresión de Δ 6D, Δ 5D y FAS por SREBP-1 en la glándula mamaria en respuesta al aceite de maíz de la dieta, nos condujo a investigar si los coactivadores PGC1 α y PGC1 β son regulados por la presencia del ácido linoléico de la dieta. Los PGC-1 tienen una actividad eficaz transcripcional cuando se acoplan a un factor de transcripción.

PGC-1 α se une y puede coactivar a la mayoría de los miembros de la familia de los receptores nucleares como PPAR α , sin embargo, la expresión de PPAR α en la glándula mamaria fue mínima medida por Northern blot y PCR en tiempo real. En la **gráfica 6** se puede observar que la abundancia expresada en unidades relativas del RNAm PGC-1 α en la glándula mamaria, fue significativamente mayor en el grupo de animales alimentado con la dieta alta en aceite de maíz que en los grupos DBL y DSL.

Interesantemente PGC-1 β puede interactuar con SREBP-1. Como puede verse en la **gráfica 6**, en la glándula mamaria hubo una disminución en el RNAm PGC-1 β cuando la concentración del aceite de maíz en la dieta incrementó, y se asoció con una expresión más baja de SREBP-1 y de los genes blanco de SREBP-1: FAS, Δ 5D y Δ 6D, sin embargo, esto solo fue significativo en los animales alimentados con una dieta alta en aceite (10 %).



Gráfica 6. Expresión del RNAm de **(A)** PGC1 α y **(B)** PGC-1 β en glándula mamaria de ratas alimentadas con dieta baja (2 %), suficiente (5 %) y alta (10 %) en aceite de maíz determinado por PCR en tiempo real. La abundancia del RNAm se expresa como unidades relativas, los valores se muestran como el promedio \pm error estándar; n= 3. Las letras indican las diferencias significativas entre los grupos, $p < 0.05$. ■ = DBL, ■ = DSL, □ = DAL.

VIII. DISCUSSION

Uno de los objetivos del presente estudio fue identificar la contribución del ácido linoléico (AL) en los lípidos de la leche, así como conocer la distribución y conversión del AL en ácido araquidónico (AA) en el organismo materno. Adicionalmente se estudio la expresión del RNAm de la $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ responsables de la conversión en la glándula mamaria, y si esta expresión es regulada por el contenido de AL de la dieta a través de los factores de transcripción SREBP-1 y PPAR α en el hígado, tejido adiposo y glándula mamaria de ratas lactantes alimentadas con diferentes concentraciones de aceite de maíz. Los resultados mostraron que en el día 12 de la lactancia aproximadamente el 35% del ácido linoléico de la dieta es transferido a la glándula mamaria. Además del hígado y el tejido adiposo, se observó que en la glándula mamaria se expresa el RNAm de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$. La presencia del AL de la dieta reguló negativamente la expresión de estas desaturasas en la glándula mamaria y el hígado, pero no en el tejido adiposo. Los resultados sugieren que en ambos tejidos, esta regulación es mediada a través del factor de transcripción SREBP-1. Los hallazgos del presente estudio indican que al igual que el hígado, la glándula mamaria tiene la maquinaria necesaria para sintetizar LC-PUFAs, y que esta síntesis puede ser regulada por la cantidad de ácido linoléico de la dieta en ambos tejidos.

El modelo animal que se utilizó en este estudio fue ratas hembras de la cepa Sprague Dawley, a las cuales se les proporcionó una dieta elaborada en el laboratorio con diferente contenido de lípidos proporcionados por el aceite de maíz (55.3 % de AL), durante todo el embarazo y hasta el día 12 de lactancia. En estas ratas se evaluó el consumo de alimento durante el embarazo y hasta el día 12 de lactancia. En el embarazo la ingesta de alimento fue incrementando conforme éste se desarrollaba.⁷⁰ El aumento en el consumo de alimento en esta etapa se debe a que la rata necesita generar las reservas energéticas que le ayudarán en el futuro para sustentar la lactancia. Además, este incremento también se debe a que la madre necesita suministrar un aporte adecuado de nutrimentos hacia el feto, para que éste tenga un crecimiento normal. Como se puede observar en la gráfica 1 el consumo de alimento disminuye el día anterior al parto, esto se ha reportado en otros estudios como el de Evans R. et al (1989) y el de Wilde & Kuhn (1979), en el cual observaron que la

ingesta no sólo disminuye desde los 4 días previos al parto, sino que también disminuye en las 24 horas posteriores a éste.⁷¹

Esta bien documentado que la hiperfagia acompaña el establecimiento de la lactancia, estudios previos muestran que el consumo de alimento aumentó de 21 g/día en animales vírgenes hasta 50g/ día a la mitad de la lactancia.⁷¹ En nuestro estudio se observó un incremento en la ingesta, semejante al reportado desde el primer día de lactancia y hasta el día 12 de lactancia.⁷⁰ Esto se debe a que la rata madre necesita consumir mayor cantidad de alimento para sintetizar los componentes de la leche.⁷¹ Durante la gestación y hasta el día 12 de la lactancia existe un aumento en el consumo de alimento, este consumo no se afectó por la cantidad de aceite de maíz que contenía la dieta.⁷⁰

El peso corporal de la rata madre aumentó conforme se desarrolló la gestación,⁷⁰ en la primera etapa, este aumento se debe principalmente al crecimiento del feto, de la placenta, de los fluidos y los almacenes de tejido adiposo.^{72, 73} A partir del primer día de lactancia el peso disminuyó y se mantuvo constante hasta el día 12 de lactancia. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal entre los grupos (DBL, DSL y DAL) experimentales en ninguna de las etapas estudiadas.⁷⁰ Nuestros resultados coinciden con lo previamente reportado, en donde no se encontraron diferencias significativas en el peso corporal durante la lactancia en ratas alimentadas con dietas que contenían diferente cantidad de lípidos.⁷⁴

Para medir la conversión del AL en AA se administró una dosis oral de ¹³C-AL a ratas de 12 días de lactancia. En los tejidos maternos de estas ratas y en el cuajo de las crías, se determinó la composición de ácidos grasos.

La composición de ácidos grasos en el cuajo mostró una mayor cantidad de ácidos grasos de cadena media (AGCM) en el grupo DBL en comparación con el grupo DAL, ya que se observó un mayor porcentaje de C12, C14 y C16 (Gráfica 3A). Cuando el organismo materno no recibe los ácidos grasos en la dieta, la glándula mamaria toma estos AGCM del plasma que provienen de la movilización del tejido adiposo o bien los sintetiza a partir de hidratos de carbono como la glucosa, que es su principal precursor.^{75, 76} La composición de los ácidos grasos de la leche está influenciada por el tipo de ácidos grasos y por la cantidad de lípidos de la dieta de la

madre lactante.⁷⁷⁻⁸² Nuestros resultados indican que la proporción de ácidos grasos en el cuajo esta determinada por los ácidos grasos presentes en la dieta de la rata madre, ya que el grupo de animales alimentados con una dieta alta en aceite de maíz (10 %) secretaron una leche que mostró mayor similitud con la composición de ácidos grasos del aceite de maíz, utilizado para la preparación de las dietas. Esto se muestra claramente en la cantidad de AL, ya que el cuajo de los animales alimentados con la DBL contiene cantidades significativamente menores de este ácido graso que los grupos DSL y DAL. Por otro lado, la cantidad de ácido araquidónico en el cuajo fue significativamente menor en el grupo de animales alimentados con la DBL en comparación con los grupos DSL y DAL. Esto indica que las adaptaciones metabólicas que realizó el organismo materno, las cuales se mencionarán más adelante no fueron las suficientes para aportar leche a las crías con cantidades suficientes de AA, aunque la cantidad de este ácido graso es igual en la glándula mamaria en los tres grupos experimentales. Lo que sugiere que podría existir menor transferencia de AA de la glándula mamaria a la leche de los animales alimentados con una DBL.

La composición de ácidos grasos de la glándula mamaria muestra una menor cantidad de AGCM que los presentes en el cuajo, probablemente debido a que una vez sintetizados son rápidamente transferidos a la leche. La mayor proporción de ácidos grasos esta dada por los ácidos grasos de cadena larga como el C18:1 y el C18:2. Este último se encontró en mayor cantidad en el grupo de animales alimentados con una DAL (Gráfica 3A). Lo cual refleja la composición de los ácidos grasos presentes en el aceite de maíz.

Con respecto a la composición de ácidos grasos del hígado, es interesante notar que la mayor cantidad de AA y C18:0 se encontró en este órgano en comparación con el resto de los tejidos (Gráfica 3A). El alto contenido de AA en el hígado, se debe a que este órgano es uno de los principales sitios de síntesis de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga como el AA.⁸³ Existe un estudio en donde también encuentran un mayor porcentaje de AA en el hígado con respecto a otros tejidos (carcasa, cerebro, piel, tejido adiposo y músculo). En esta investigación

se midió el contenido de AA y DHA en crías cuyas madres fueron alimentadas con dietas que contenían diferentes concentraciones de estos ácidos grasos.⁸⁴

El tejido adiposo fue abundante en los ácidos grasos C16:0, C18:1 y C18:2, ya que estos constituyeron en promedio aproximadamente el 90% del total de ácidos grasos (Gráfica 3D). Existen otros estudios que indican que de los LC-PUFAs, el AL es el más abundante en el tejido adiposo de ratones lactantes.⁸⁵ El ácido linoléico es un ácido graso indispensable, por lo tanto la rata lo obtuvo a través de la dieta que se le proporcionó, la cual tiene un alto contenido de este ácido graso (55.3%). Esto indica que durante el embarazo y la lactancia la rata madre almacenó parte del ácido linoléico de la dieta en el tejido adiposo.

En cuanto a la síntesis de AA, observamos que el $1.35 \pm 0.46 \%$, $0.46 \pm 0.08 \%$ y $0.18 \pm 0.05 \%$ (grupos DBL, DSL y DAL respectivamente) del AL de la dieta se utiliza para la síntesis endógena del ácido araquidónico que se encuentra en los lípidos de la leche. Aunque se observa una tendencia en la disminución de la síntesis de AA conforme aumenta el contenido de aceite de maíz en la dieta, la diferencia sólo fue estadísticamente significativa entre los grupos DSL y DAL. Lo que sugiere que hay una menor síntesis de AA cuando la dieta que consumieron los animales contenía mayor cantidad de ácido linoléico. Son pocos los estudios que se han hecho acerca de la síntesis del AA en organismos lactantes, uno de estos realizado en humanos muestra una recuperación de la marca (^{13}C) como AA en la leche del 0.01 %, el cual proviene del ^{13}C -AL, esta recuperación fue menor a la de nuestro estudio.³⁷ Esta diferencia en la recuperación podría deberse a diferentes factores: primero a que en nuestro estudio se pudo medir la cantidad de ^{13}C -AA en la glándula mamaria de la rata, lo cual no fue posible en el estudio de Del Prado y col., segundo, el ^{13}C -AA medido en las mujeres se hizo entre el 5 y 6 mes postparto, se sabe que la cantidad de LC-PUFAs como el AA y el DHA disminuyen aproximadamente el 38 % en la leche durante el primer mes de la lactancia.

Con respecto al tejido adiposo, no se detectó ^{13}C -AL ni ^{13}C -AA, lo que sugiere que durante la lactancia el AL que consume la madre y el AA recién sintetizado se utiliza preferentemente para sintetizar los lípidos de la leche y no para formar parte de las reservas corporales.

Durante la lactancia existe un incremento en los requerimientos de los nutrimentos para la madre y el recién nacido.⁸⁶ Para cubrir la demanda de nutrientes por el recién nacido, la madre los proporciona a través de la leche. De manera que la glándula mamaria tiene una gran demanda de nutrientes para sintetizar la leche, y para mantener las funciones metabólicas de los lactocitos.⁸⁶ Entre los nutrientes presentes en la leche están los LC-PUFAs como el AA, EPA y DHA, los cuales tienen una función importante en el desarrollo neurológico y de la retina del recién nacido.^{47, 87, 88} La madre obtiene estos ácidos grasos de la dieta o de la síntesis endógena a partir de los ácidos grasos indispensables AL y ALN

Existen pocos estudios acerca de la distribución de los ácidos grasos indispensables de la dieta en un organismo lactante (hígado, tejido adiposo y glándula mamaria principalmente), además de que no existen reportes de como es esta distribución en respuesta a una dieta baja en estos ácidos grasos. En relación a esto, en el estudio realizado por Del Prado y col. se observó que la dieta consumida por los habitantes de San Mateo Capulhuac, Edo. de México, es rica en productos de origen vegetal y escasa en los de origen animal,³⁷ esto provoca que haya un consumo deficiente de AA. Interesantemente, aún con esta deficiencia, las mujeres de esta zona tienen concentraciones adecuadas de AA en su leche, esto en comparación con mujeres de países desarrollados con un buen estado de nutrición. Esto sugiere que en el organismo materno se llevan a cabo algunas adaptaciones metabólicas para proporcionar al recién nacido leche con una cantidad adecuada de LC-PUFAs, las cuales podrían incluir la movilización de las reservas corporales maternas (tejido adiposo), o la participación de tejidos extrahepáticos en la síntesis de estos ácidos grasos.

Informes previos indican que el hígado³⁷ es considerado el órgano principal de síntesis de AA a partir de ácido linoléico requerido por los tejidos extrahepáticos.⁸⁹ Sin embargo, en el presente estudio, observamos que aproximadamente entre el 5 y el 8 % del [¹⁴C]-LA y sus [¹⁴C]-derivados se incorporaron al hígado. Mientras que la transferencia de estos ácidos grasos, particularmente fue mayor en la glándula mamaria (35 %). Por otro lado, en la leche se transfirió el 12 %, independientemente del contenido de aceite de maíz en la dieta.⁷⁰ Es notable observar que el porcentaje

de recuperación del [^{14}C]-LA en la leche fue similar a lo reportado en estudios previos de mujeres lactantes, en donde recuperaron entre el 10 y el 12% de ^{13}AL en la leche hasta 108 h después de proporcionar la dosis.^{35, 90} Asimismo, asumiendo que la tasa de transferencia de $^{14}\text{C-AL}$ es aplicable al AL no marcado de la dieta, podríamos sugerir que aproximadamente el 35% del ácido linoléico de la dieta es utilizado para sintetizar los lípidos de la leche. Por otro lado, se analizó la contribución del ácido linoléico de la dieta de la madre a los lípidos presentes en la leche, para esto se calcularon los gramos de AL/100 g de dieta que se transfirieron a la glándula mamaria (la transferencia a la glándula mamaria se definió como la suma de los gramos de AL/100 g de dieta que se incorporaron a la glándula mamaria, cuajo y crías). Los resultados muestran que hubo menor transferencia del AL en el grupo DBL que en los grupos DSL y DAL, esto fue debido a la menor cantidad de AL presente en la dieta en comparación a la dieta que consumieron los otros grupos experimentales. Nuestros resultados indican que la glándula mamaria podría ser un almacén temporal de ácido linoléico durante la lactancia antes de ser secretado a la leche o ser metabolizado hasta AA en este mismo tejido.⁷⁰

Asimismo, se observó baja captación del [^{14}C]-AL por el tejido adiposo (0.5 % de la dosis adsorbida), estos resultados no coinciden con el modelo teórico sugerido por Koletzko et al., en donde proponen que aproximadamente el 67% de una dosis oral de [^{13}C]-AL administrada oralmente a mujeres lactantes era captada por el tejido adiposo y otros depósitos.³² Sin embargo, es importante resaltar que en este estudio no fue posible medir la captación del [^{13}C]-AL en el tejido adiposo de dichas mujeres. Nuestros resultados fueron consistentes cuando a las ratas se les administró una dosis oral de $^{13}\text{C-AL}$. La baja proporción de los lípidos que son captados por el tejido adiposo, se debe a que durante la lactancia la mayor demanda de éstos es para la síntesis de leche y no de reservas corporales.⁹¹

También se evaluó la oxidación total del [^{14}C]-AL en el organismo materno lactante tal y como se indica en la estrategia metodológica. Los resultados muestran que las ratas alimentadas con la dieta alta en aceite de maíz oxidan 2.1 y 4.8 veces más ácido linoléico de la dieta que las ratas de los grupos DSL y DBL. Es decir, la tasa de oxidación del ácido linoléico de la dieta hasta CO_2 aumenta cuando se

incrementa la cantidad de este ácido graso en la dieta.⁷⁰ Esto coincide con estudios previos que muestran disminución en la oxidación de trioleína (triglicérido con solo ácido oleico, ácido graso mono-insaturado) de la dieta durante la lactancia en ratas alimentadas con una dieta baja en lípidos.^{82, 68} Nuestros resultados sugieren que en un organismo lactante la oxidación del ácido linoléico de la dieta no es la principal vía metabólica que sigue este ácido graso, ya que éste se utiliza preferentemente para la síntesis de los lípidos de la leche.⁷⁰

Para probar nuestra hipótesis acerca de si la glándula mamaria posee la maquinaria enzimática para metabolizar el AL hasta AA, se procedió a la identificación del RNAm de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$. Nuestros resultados mostraron la presencia del RNAm de ambas desaturasas en la glándula mamaria, sugiriendo que este tejido podría tener la capacidad para sintetizar AA y DHA a partir de los ácidos grasos indispensables AL y ALN respectivamente.⁷⁰

Posteriormente, se evaluó el efecto del ácido linoléico de la dieta sobre la expresión del RNAm de las desaturasas ($\Delta 6D$ y $\Delta 5D$), los factores de transcripción (SREBP-1 y PPAR α) y los coactivadores (PGC α y PGC β) mediante Northern blot y PCR en tiempo real. El análisis de expresión de la $\Delta 5D$ mostró un transcrito de 3.4 kb en hígado, glándula mamaria y tejido adiposo. En el caso de la $\Delta 6D$, se observaron dos transcritos: uno denominado dominante de 4.0 kb y otro menor de 2.2 kb en hígado y glándula mamaria, mientras que en el tejido adiposo se expresó solo el transcrito de 4.0 kb (Figura 7A).⁷⁰ La presencia del transcrito menor sólo había sido identificada en el hígado y no en otros tejidos.⁴¹ Se ha propuesto que existen dos isoformas de la $\Delta 6D$: una que cataliza la desaturación inicial del 18:2 (ácido linoléico; n6) o 18:3 (ácido linolénico; n3), y otra que cataliza la conversión de 24:5(n3) a 24:6(n3)⁴¹ (Figura 4). Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar si existen dos isoformas de la $\Delta 6D$.

La actividad enzimática y la expresión del RNAm de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ pueden ser reguladas por factores hormonales y nutricios. Específicamente, la ingestión de bajas niveles de ácidos grasos indispensables resulta en mayor expresión hepática de ambas desaturasas.^{41, 42} En nuestro estudio se observó por análisis de Northern blot

que la expresión de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$, fue reducida en el hígado y en la glándula mamaria cuando se incrementó la cantidad de ácido linoléico de la dieta, indicando que además del hígado, la glándula mamaria juega un papel importante en la síntesis de LC-PUFAs durante la lactancia.⁷⁰ Estos resultados coinciden con reportes previos que demuestran que tanto los PUFAs, como los de cadena larga n-3 y n-6 suprimen la expresión hepática de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ por inhibición de la tasa de transcripción de los genes $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ en roedores. La inhibición de la transcripción de estos genes aplica para ambos el humano y la rata.⁶⁵ Interesantemente, en el tejido adiposo no se observaron cambios en la expresión de ambas desaturasas, lo que sugiere que la regulación de la expresión del RNAm de éstas es tejido específico para el hígado y la glándula mamaria. Nuestro trabajo es el primer reporte que muestra algunos de los mecanismos de regulación de la expresión del RNAm de las desaturasas en la glándula mamaria lactante.⁷⁰

Se ha reportado que en el hígado, SREBP-1 activa genes de la síntesis de ácidos grasos, incluyendo las tres desaturasas ($\Delta 6D$, $\Delta 5D$ y $\Delta 9D$ esteroil CoA desaturasa). La activación de los genes blanco, es a través de la unión del factor de transcripción SREBP-1 a elementos reguladores de esteroides (SRE) en el promotor de dichos genes.⁵⁷ Se han identificado SRE en el gene de la $\Delta 6D$ y $\Delta 9D$ y probablemente también se encuentren en el promotor de la $\Delta 5D$ aunque esto no ha sido demostrado. A su vez los PUFAs regulan a SREBP-1, recientemente se han propuesto diferentes mecanismos por los cuales estos ácidos grasos y los de cadena larga n3 y n6 regulan la lipogénesis a través de SREBP-1 en el hígado. El primero sugiere que los PUFAs y los de cadena larga reducen la forma nuclear activa de SREBP-1 en ratas.⁵⁹ Segundo, disminuyen la estabilidad del mensajero de SREBP-1⁶⁰ y tercero suprimen la expresión del RNAm de SREBP-1⁶¹ Por lo que dietas con alto contenido en estos ácidos grasos favorecerán la disminución de SREBP-1 y como consecuencia disminuye la lipogénesis, (Figura 7A). En el presente estudio demostramos que la mayor cantidad de ácido linoléico presente en el aceite de maíz de la dieta disminuyó la expresión del RNAm de SREBP-1 conduciendo a una reducción en la expresión de $\Delta 6D$, $\Delta 5D$ y FAS no sólo en el hígado, sino también en la glándula mamaria indicando

que la lipogénesis y la síntesis de LC-PUFAs esta disminuida. Este efecto no se observó en el tejido adiposo en ninguno de los grupos analizados, lo que sugiere que durante la lactancia la expresión de SREBP-1 en el tejido adiposo no es regulada por la cantidad de ácido linoléico de la dieta.⁷⁰ Dado que SREBP-1 regula la expresión de $\Delta 6D$,⁵⁸ es razonable pensar que al no haber cambios en su expresión tampoco se presenten cambios en la expresión del RNAm de sus genes blanco como la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$, tal y como se observó en el tejido adiposo (Figura 7A).⁷⁰

Por otro lado, nuestros resultados sugieren que la oxidación de ácidos grasos parece ocurrir preferentemente en el hígado vía PPAR α , esto se deduce dado que en la glándula mamaria y en el tejido adiposo se expresaron muy bajos niveles del RNAm de PPAR α . Además, el grupo de animales que consumieron mayor concentración de ácido linoléico mostró una mayor expresión del RNAm de PPAR α , lo cual incrementó la oxidación de ácidos grasos en el hígado. Esto se infiere de los resultados de oxidación del AL de la dieta, los cuales muestran que en el grupo experimental DAL, la oxidación de este ácido graso fue mayor en comparación con los grupos DSL y DBL. Referente a la glándula mamaria lactante, es necesario realizar más investigación para aclarar los mecanismos de oxidación de ácidos grasos en este órgano.⁷⁰

Los resultados sugieren que cuando el contenido de ácido linoléico de la dieta es alto (10 % de aceite de maíz), las desaturasas actúan a mayor velocidad porque hay más sustrato. Por lo contrario, a bajos niveles de AL el organismo ajusta la deficiencia de AA y aumenta la expresión de las desaturasas $\Delta 6D$, $\Delta 5D$ para aumentar la síntesis de AA.⁷⁰

Los coactivadores PGC-1 α tienen una poderosa actividad transcripcional cuando se unen al factor de transcripción PPAR α .^{55, 56} La mínima expresión de PPAR α en todos los grupos experimentales y la mayor expresión del RNAm de PGC-1 α en el grupo DAL en la glándula mamaria, sugieren que aunque la presencia del RNAm de PPAR α es insignificante, PGC-1 α se requiere para la expresión normal de una gran cantidad de genes mitocondriales⁵⁵ incrementando la capacidad enzimática para la β -oxidación de ácidos grasos, cuando los animales son alimentados con una dieta alta en ácido linoléico. Por otro lado, la baja expresión de PGC-1 β estuvo

asociada con baja expresión de SREBP-1 y sus genes blanco FAS, $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ (Figura 7A). Estos resultados sugieren que PGC-1 β esta involucrada en la represión de genes lipogénicos después del consumo de altas concentraciones de ácido linoléico (10 % de aceite de maíz). Esta represión parece ser mediada a través de la represión de SREBP-1 en la glándula mamaria, contrario a lo que se ha reportado en roedores alimentados con una dieta alta en grasa saturada en el cual la expresión de PGC1- β esta inducida.⁵⁶ Estos resultados indican que la expresión de PGC1- β esta influenciado por el tipo de grasa de la dieta en la glándula mamaria y bajo diferentes condiciones fisiológicas como la lactancia.

Los resultados del presente estudio nos permiten inferir que, cuando la cantidad de PUFAs en la dieta es baja (2 %), existe un mecanismo adaptativo para sintetizar LC-PUFAS a través de un incremento en la expresión de SREBP-1 en la glándula mamaria y el hígado, el cual entonces incrementa la expresión de la $\Delta 6D$, $\Delta 5D$ y FAS. Al mismo tiempo, existe una reducción en la expresión de PPAR α reduciendo así la oxidación de ácidos grasos. Esas adaptaciones tienen la finalidad de que la glándula mamaria sintetice leche con concentraciones adecuadas de ácidos grasos indispensables y LC-PUFAs n3 y n6 requeridos para enfrentar las necesidades del recién nacido.

Finalmente, los resultados sugieren que durante la lactancia, el ácido linoléico que proviene de la dieta se incorpora preferentemente en la glándula mamaria. Sitio en el cual, además del hígado y el tejido adiposo expresan el transcrito de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ desaturasas. Así que, estos hallazgos sugieren que conjuntamente con el hígado, la glándula mamaria podría tener una participación importante en la síntesis de AGPI-CL. Asimismo, esta síntesis parece ser regulada por el contenido de AL dietario a través de SREBP-1 y no de PPAR α . Por el contrario, no se observaron cambios en la expresión de los transcritos de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ desaturasas en el tejido adiposo.

IX. CONCLUSIONES

1. El ácido linoléico de la dieta se incorpora principalmente en la glándula mamaria de la rata lactante, este efecto es independiente del contenido de lípidos presentes en la dieta consumida por la rata.
2. La oxidación total del ácido linoléico fue directamente proporcional al contenido de lípidos de la dieta consumido por la rata.
3. Existe una menor síntesis endógena de ácido araquidónico a partir del ácido linoléico, cuando la dieta es alta en lípidos que cuando es adecuada.
4. En la glándula mamaria se expresan las dos isoformas de la $\Delta 6D$ desaturasa y en el tejido adiposo solo se expresa uno de ellas.
5. La expresión del RNAm de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$ en el hígado y en la glándula mamaria es regulada por la cantidad de ácido linoléico del aceite de maíz de la dieta. La mayor expresión de los mensajeros se observó en los animales alimentados con el 2 % de aceite de maíz. Esta expresión está directamente relacionada con la expresión del factor de transcripción SREBP1, en el hígado y en la glándula mamaria
6. La expresión del RNAm de la $\Delta 6D$ y la $\Delta 5D$ en el tejido adiposo no es regulada por el contenido de lípidos de la dieta ni existe relación con la expresión del RNAm de SREBP1.
7. La expresión del factor transcripcional PPAR α en el hígado, depende del contenido de ácido linoléico en la dieta, ya que esta fue mayor cuando los animales fueron alimentados con una dieta alta en aceite de maíz. Tal efecto no se observó en la glándula mamaria.

X. BIBLIOGRAFIA

1. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers. New York, 2000.
2. Sprecher H. Long chain fatty acid metabolism. En: *Polyunsaturated fatty acids in human nutrition*. Bracco U, Deckelbaum RJ (Ed). New York: Raven Press; 1992.
3. Kinsella JE. Food lipids and fatty acids: Importance in food quality, nutrition and health. *Food Technol*. 1988;42:124-140.
4. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:438-463.
5. Innis SM. Lipidos esenciales alimentarias. En: Ziegler EE, y Filter Jr LJ. *Conocimientos actuales sobre nutrición*. 7a. ed. Washington, DC: ILSI-OPS, 1998.
6. Jumpsen J, Clandinin MT. *Brain development: relationship to dietary lipid and lipid metabolism*. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1995.
7. Calder PC. Dietary fatty acids and the immune system. *Nutrition Rev*. 1998;56:S70-S83.
8. Nettleton JA. Omega 3 and immune/inflammatory responses. In: *Omega 3-fatty acids and health*. Chapman and Hall, New York 1995.
9. Uauy R, Peirano P, Hoffman D, Mena P, Birch D, Birch E. Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. *Lipids*. 1996;31:S167-S176.
10. Clandinin MT, Chapell JE, Leong S. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: Implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev*. 1980;4:121-129.

11. Uauy R, and Hoffman DR. Essential fat requirements of preterm infants. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:245S-250S.
12. Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatr.* 2003;111:39-44.
13. Rodríguez-Cruz M, Tovar AR, Del Prado M, Torres N. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y su importancia en la salud. *Rev Invest Clín.* 2005;57(3):457-472.
14. Cowie AT, Forsyth YA, and Hart IC. Hormonal control of lactation. Germany. Springer-Verlag Berlin Heiderberg. 1980.
15. Williamson DH. Regulation of metabolism during lactation in the rat. *Reprod Nutr Develop.* 1986;26:597-603.
16. Neville MC. Physiology of lactation. *Clin Perinatol.* 1999;262:251-279.
17. Mather IH, and Keenan TW. The cell biology of milk secretion. Historical notes. *J Mamm Gland Biol Neop.* 1998;33:227-232.
18. Mepham TB. Physiological aspects of lactation. Biochemistry of lactation. Edited by Mepham TB. Elsevier Science Publishers B.V. 1983.
19. Gould SF, Neville MC, and Neifert MR. Anatomy of the breast. Lactation: Physiology, nutrition and breast-feeding. New York. Plenum press. 1983.
20. Jensen RG. Hand book of milk composition. Academic Press. University of Connecticut. New York. 1995.

21. Toker HA. General Endocrinological Control of Lactation. In lactation, Vol.1. Eds Larson RL, & Smith VR. New York: Academic Press. 1974.
22. Averbach KG, Riordan J. Breast Feeding and Human lactation (2^a Edition). Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts. 1999.
23. Stafford J, Villalpando S, Urquieta B. Circadian variation and changes alter meal in volume and lipid production of human milk from rural mexican women. *Ann Nutr Metab.* 1994;38:232-237.
24. Hamosh M, Bitman J, Wood L, Hamosh P and Mehta NR. Lipids in milk and the first steps in their digestion. *Pediatrics.* 1984;758:146-150.
25. Allen JC, Keller RP, Archer P. and Neville MC. Studies in human lactation: Milk composition and daily secretion rates of macronutriments in the first year of lactation. *Am J Clin Nutr.* 1991;54:69-80.
26. Neville Mc, Allen JC and Watters C. The mechanism of milk secretion. Lactation: Physiology, nutrition and breast-feeding. Neville MC and Neifert MR. Plenum Press. New York. 1983; Pág.49-102.
27. Francois C, Connor S, Wander R, Connor W. Acute effects of dietary fatty acids on the fatty acids of human milk. *Am J Clin Nutr.* 1998;67:301-8.
28. Neville MC and Picciano MF. Regulation of milk lipid secretion and composition. *Annu Rev Nutr.* 1997;17:159-183.
29. Shenna DB and Peaker M. Transport of milk constituent by the mammary gland. *Physiol Rev.* 2000;80:925-951.

30. Neville Mc. Mammary gland biology and lactation: a short course. Given at the meeting of the international society for research in human milk and lactation. Plymouth, New Hampshire. 1997.
31. Sadurskis A, Kabit N, Wager J, Forsum E. Energy metabolism, body composition, and milk production in healthy Swedish women during lactation. *Am J Clin Nutr.* 1988;48:44-9.
32. Koletzko B, Rodríguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sauerwald T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Human Development* (supplement). 2001; 65:s3-s18.
33. Francois C, Connor S, Wander R, Connor W. Acute effects of dietary fatty acids on the fatty acids of human milk. *Am J Clin Nutr.* 1998;67:301-8.
34. Villalpando S and Del Prado M. Interrelation among dietary energy and fat intakes, maternal body fatness, and milk total lipid in humans. *J Mamm Gland Biol Nep.* 1999;4:285-295.
35. Demmelmair H, Baumheuer M, Koletzko B, Dokoupil K. and Kratl G. Metabolism of U-13C-labeled linoleic acid in lactating women. *J. Lip Res.* 1998;39:1389-1396.
36. Fidler N, Sauerwald T, Pohl A, Demmelmair H, Koletzko B. Docosahexaenoic acid transfer into human milk after dietary supplementation: A randomized trial. *J Lip Res.* 2000;41:1376-1383.
37. Del Prado M, Villalpando S, Elizondo A, Rodríguez M, Demmelmair H, Koletzko B. Contribution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low- fat diet. *Am J Clin Nutr.* 2001;74:242-7.

38. Williamson DH. Obesity and Cachexia. In: Regulation of adipose tissue mass and metabolism. Edited by N.J. Rothwell and M.J. Stock. John Wiley & Sons Ltd.1991.
39. Otto SJ, Houwelingen A, Badart-Smook A, Hornstra G. Changes in the maternal essential fatty acid profile during early pregnancy and the relation of the profile to diet. *Am Soc Clin Nutr.* 2001;73:302-307.
40. Evans R., Williamson D. Lipids metabolism during the initiation of lactation in the rat (the effects of starvation and tumor growth). *Biochem J.* 1989;262:887-895.
41. Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Δ -6 desaturase. *J Biol Chem.* 1999;274:471-477.
42. Cho HP, Nakamura M and Clarke SD. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human Δ -5 desaturase. *J Biol Chem.* 1999;274:37335-37339.
43. Leonard AE, Pereira SL, Sprecher H, Huang YS. Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lip Res.* 2004;43:36-54.
44. Sprecher H. Biochemistry of essential fatty acids. *Prog Lipid Res.* 1981;20:13-22.
45. Ferdinandusse S, Denis S, Mooijer PA., Zhang Z, Reddy JK, Spector AA., Wanders RJ. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid. *J Lip Res.* 2001;42:1987-1995.
46. Sprecher H. Luthria DL, Mohammed BS, Baykousheva SP. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J Lip Res.* 1995;36:2471-2477.

47. Brenner RR. The role of fats in human Nutrition. In: Vergroesen AJ, Crawford M., editors. 2nd Ed. San Diego, CA. Academic Press, Academic Press. 1989.
48. Wang Y, Botolin D, Christian B, Busik J, Xu J, Jump DB. Tissue-specific, nutritional and development regulation of rat fatty acid elongases. *J Lip Res.* 2005;46:706-715.
49. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hastay AH, Tamura Y, Oruga J, Okazaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Dual regulation of mouse delta (5)- and delta (6)- desaturase gene expression by SREBP-1 and PPAR alpha. *J Lipid Res.* 2002;43:107-114.
50. Zolfaghari R, Cifelli CJ, Banta MD, Ross C. Fatty acid Δ^5 - desaturase mRNA is regulated by dietary vitamin A and exogenous retinoic acid in liver of adult rats. *Arch Biochim Biophys.* 2001;391:8-15.
51. Igal RA, Mandon EC. and de Gomez Dumm INT. Abnormal metabolism of polyunsaturated fatty acids in adrenal glands of diabetic rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1991;77: 217–227.
52. Mimouni, V., and Poisson, J. P. Liver fatty acid composition in the spontaneously diabetic BB rat. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.* 1991;99:111-121.
53. Maniongui, J. P., Blond, L. U., Durand, G., Poisson, J. P., and Bezard, J. Age-related changes in delta 6 and delta 5 desaturase activities in rat liver microsomes. *Lipids.* 1993;28:291–297.
54. Ves-Losada A and Peluffo RO. Effect of L-triiodothyronine on liver microsomal delta 6 and delta 5 desaturase activity of male rats *Mol Cell Biochem.* 1993;121:149-153.

55. Lin J, Handschin C and B. Spiegelman M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*. 2005;1:361-370.
56. Lin J, Yang R, Tarr PT, Wu PH, Handschin C, Li S, Yang W, Pei L, Uldry M and Tontonoz P. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1 beta coactivation of SREBP. *Cell*. 2005;120:261-273.
57. León MN, Torres N, Tovar AR. Mecanismo de acción de las proteínas que se unen a los elementos regulatorios de esteroides (SREBPs) en la biosíntesis del colesterol y ácidos grasos. *Revista de Investigación Clínica*. 2002;54:468-476.
58. Nara TY, He WS, Tang C, Clark SD. and Nakamura MT. The E box like sterol regulatory element mediates the suppression of human delta-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;296:111-117.
59. Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, Isibashi S, Osuga J, Yamada N, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology*. 2003;38 (6):1529-39.
60. Yahagi N, Shimano H, Hasty AH, Amemiya-Kudo M, Okazaki H, Tamura Y, Lizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Osuga J, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 1999;274:35840-4.
61. Kim HJ, Takahashi M, Ezaki O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. *J Biol Chem*. 1999;274:25892-8.
62. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and

- eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:4318-23.
63. Wahle KWJ, Rotondo D, Heys SD. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and gene expression in mammalian systems. *Proc Nutr Soc.* 2003;62:349-60.
64. Clarke SD. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: A molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *J Nutr.* 2001;131:1129-1132.
65. Tang C, Cho HP, Nakamura MT. and Clarke SD. Regulation of human Δ -6 desaturase gene transcription: Identification of a functional repeat-1 element. *J Lip Res.* 2003;44:686-695.
66. Folch J, Less M, and Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol Chem.* 1957;226:449-509.
67. Jensen RG, Clark RM, Bitman J, Wood L, Hamosh M, Clandinin MT. Methods for the sampling and analysis of human milk lipids. IN: Human lactation I. Milk components and methodologies. Jensen RG and Neville MC. ed Plenum Press. New York 1985.
68. Oller Do Nascimento C. and Williamson DH. Evidence for conservation of dietary lipid in the rat during lactation and the immediate period after removal of the litter. Decreased oxidation of oral (1-14C) triolein. *Biochem J.* 1986;239:233-236.
69. Sambrook J, and Russell D. Molecular Cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 3a. ed. New York. 2001.
70. Maricela Rodríguez-Cruz, Armando R. Tovar, Berenice Palacios-González, Martha del Prado, Nimbe Torres. Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids

in lactating mammary gland: role of Δ^5 and Δ^6 desaturases, SREBP-1, PPAR α , and PGC-1. *J Lip Res.* 2006;47(3):553-560.

71. Evans R, Williamson D. Lipids metabolism during the initiation of lactation in the rat (the effects of starvation and tumor growth). *Biochem J.* 1989;262:887-895.

72. Moore BJ, Olsen JL, Marks F. and Brasel JO. The effects of high fat feeding during one cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation and recovery on body composition and fat pad cellularity in the rat. *J Nutr.* 1984;114:1566-1573.

73. Otway S. and Robinson DS. The significance of changes in tissue clearing-factor lipase activity in relation to the lipaemia of pregnancy. *Biochem J.* 1968;106:677-682.

74. Burnol AF, Leturque A, De Saintaurin MA, Penicaud L. and Girard J. Glucose turnover rate in the lactating rat: Effect of feeding a high fat diet. *J Nutr.* 1987;117:1275-1279.

75. Souza P, Williamson D. Effects of feeding medium-chain triacylglycerols on maternal lipid metabolism and pup growth in lactating rats. *Brits J Nutr.* 1993;69:779-787.

76. Smith S. Mechanisms of chain length determination in biosynthesis of milk fatty acids. *J Dairy Sci.* 1980;63:337-350.

77. Vuori E, Kiuro K, Marinen M, Vayrynen P, Kara R, Maternal diet and fatty acid pattern of breast milk. *Acta Paediatr Scand.* 1982;71:959-963.

78. Mellies M, Ishikawa T, Gartside P, Burton K, Mc Gee J, Allen K, Steiner P, Brady D., Glueck C. Effects of varying maternal dietary fatty acids in lactating woman and their infants. *Am J Clin Nutr.* 1979;32:299-303.

79. Insul W Jr, Hirsch J, James T, Ahrens EH Jr. The fatty acids of human milk. Alterations produced by manipulation of caloric balance and exchange of dietary fats. *J Clin Invest.* 1985;38:443-450.
80. Harzer G, Dieterich I, Haug M. Effects of the diet on the composition of human milk. *Ann Nutr Metab.* 1984;28:231-249.
81. Grigor Mr, Warren SM. Dietary regulation of mammary lipogenesis in lactating rats. *Biochem J.* 1980;188:61-65.
82. Zhou L, Vessby B, Nilsson A. Quantitative role of plasma free fatty acids in the supply of arachidonic acid to extra hepatic tissues in rats. *Am Soc Nutr Sci.* 2002;132:2626-2631.
83. Del Prado M, Villalpando S, Gordillo J, Hernández-Montez H. A high dietary lipid intake during pregnancy and lactation enhances mammary gland lipid uptake and lipoprotein lipase activity in rats. *Am Soc Nutr Sci.* 1999;129:1574-578.
84. Bourre JM, Piciotti M. and Dumont O. Delta 6 desaturase in brain and liver during development and aging. *Lipids.* 1990;25:354-356.
85. Bandyopadhyay GK, Lee L, Guzmán RL, Nandi S. Effect of Reproductive States on lipid Mobilization and Linoleic Acid Metabolism in Mammary Gland. *Lipids.* 1995;30:155-162.
86. Tovar AR, E Becerril, Hernández-Pando R, Lopez G, Suryawan A, De Santiago S, Hutson SM and Torres N. Localization and expression of BCAT during pregnancy and lactation in the rat mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 280:E480-E488.

87. Birch EE, Hoffman DR, Uauy R, Birch DG. and Prestidge C. Visual acuity and essentiality of docosahexaenoic acid and arachidonic acid in the diet of term infants. *Pediatr Res.* 1998;44:201-208.
88. Crawford MA, Hassam AG. and Williams G. Essential fatty acids and fetal brain growth. *Lancet.* 1976;1:452-453.
89. Scott BL. and Bazan NG. Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:2903-2907.
90. Hachey DL, Thomas MR. and Emken EA. Human lactation: maternal transfer of dietary triglycerides labeled with stable isotopes. *J Lipid Res.* 1987;28:1185-1192.
91. Del Prado M, Delgado G, Villalpando S. Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *Am Soc Nutr Scien.* 1996;132:458-462.