



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA INSULINA POSPRANDIAL Y
DE LOS LÍPIDOS DE LA DIETA SOBRE LA
EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ENZIMAS QUE
SINTETIZAN ÁCIDOS GRASOS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

ALFREDO CRUZ GREGORIO





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: **Blas Lotina Hensen**

VOCAL: Profesor: **Rosario Adelaida Muñoz Clares**

SECRETARIO: Profesor: **Maricela Rodríguez Cruz**

1er. SUPLENTE: Profesor: **José Ignacio Páramo Ramírez**

2° SUPLENTE: Profesor: **María Benita Leonor Fernández Salgado**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Nutrición, Hospital de Pediatría, Centro Medico Nacional Siglo XXI, IMSS.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARICELA RODRIGUEZ CRUZ

SUSTENTANTE (S):

ALFREDO CRUZ GREGORIO

DEDICATORIA

A mis padres que día a día se esfuerzan para proveerme una mejor calidad de vida además de educación. Espero cumplir algunas de sus expectativas sobre mi función tanto dentro de nuestra familia como dentro de la sociedad.

Agradecimientos

A mi madre Zita Gregorio Garrido primeramente por darme la oportunidad de vivir y después de preocuparse celosamente de mi bien estar. Agradezco la libertad inmensa que me ha dado durante estos años de vida donde he hecho lo que me gusta y ahora su amor me ayuda a conquistar un proyecto tan ambicioso de 20 años de educación.

A mi padre Patricio Cruz Guillermo por todo su apoyo, el cual me ha permitido terminar este enorme proceso de educación.

A mi hermana Guadalupe Cruz Gregorio por todo su cariño y presencia.

A Olga Ruvalcaba Gomez que con su presencia y apoyo ha logrado que fije algunos de mis caminos y además de mostrarme que las sensaciones y emociones pueden ser más fuertes y hermosas de las que alguna vez pensé.

Al laboratorio de Biología molecular y especialmente a la Dra. Maricela Rodriguez Cruz por abrirme las puertas del estudio molecular de la vida.

A Claudio por su amistad y tolerancia.

A Noe, Irma y Pancho que además de ser mis amigos fueron los mejores compañeros de clase.

Al tan autobautizado árbol por su compañía en la universidad.

Fuera del aparato académico debo agradecer al Spok por contribuir a abrir mi visión del mundo.

Al barrio (Rodri, Sab, Baba, etc) por que sus comentarios sin buscar ese fin alentaban mis fuerzas para conocer un poco más de la vida.

Índice

	Pags.
Resumen.....	1
Introducción.....	3
I. Marco teórico	
1. Definición de ácidos grasos.....	5
Ácidos grasos poli-insaturados Definición y funciones.....	6
Síntesis de ácidos grasos Desaturasas y elongasas.....	7
Ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga.....	8
Síntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados.....	10
Expresión génica de la $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, Elovl-2 y Elovl-5.....	12
Expresión génica de la $\Delta 9D$, Elovl-1 y Elovl-6.....	13
Regulación de la expresión génica de los desaturasa y elongasas de ácidos grasos.....	14
Componentes específicos: Regulación mediada por los PUFAs.....	14
Estados hormonales: Regulación mediada por insulina.....	15
Mecanismos moleculares de regulación SREBP y PPAR.....	20
Justificación.....	23
Hipótesis.....	24
Objetivos.....	25

II. Diseño experimental

Animales.....	27
Ingesta diaria y registro del peso corporal.....	28
Obtención de la muestra.....	28
Extracción de RNA total, síntesis de cDNA y cuantificación relativa de RNAm.....	29-30
Cuantificación de insulina y glucosa.....	31
Análisis estadístico y aspectos éticos.....	32

III. Resultados

Peso corporal.....	34
Consumo de alimento.....	35
Insulina sérica.....	36
Glucosa sérica.....	38
Efecto de la insulina posprandial sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan LC-PUFAs en el grupo DNL.....	39
Efecto de la insulina posprandial sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan LC-PUFAs en el grupo DAL.....	40
Efecto de la insulina posprandial sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan MUFAs y ácidos grasos saturados en el grupo DNL.....	41
Efecto de la insulina posprandial sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan MUFAs y ácidos grasos saturados en el grupo DAL.....	43

Efecto del aceite de maíz sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan LC-PUFAs.....	45
Efecto del aceite de maíz sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan MUFAS y ácidos grasos saturados.....	49
IV. Discusión.....	52
V. Conclusiones.....	58
VI. Perspectivas.....	59
VI. Referencias.....	60

Resumen

Debido a que los lípidos participan en procesos importantes como; funcionamiento del sistema nervioso, respuesta inflamatoria, regulación de la expresión de genes entre otros, es necesario conocer los mecanismos moleculares que regulan su síntesis. Se sabe que la desaturasa $\Delta 9D$ y las elongasas Elovl-1 y Elovl-6 sintetizan ácidos grasos saturados y monoinsaturados de cadena larga a partir del ácido palmítico, mientras que las desaturasas $\Delta 5$ y $\Delta 6$ junto con las elongasas Elovl-2 y Elovl-5 sintetizan los ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga partir del ácido linoléico y linolénico. La expresión del RNAm de estas enzimas está regulada por el tipo de lípidos de la dieta e insulina. De manera que en este estudio, se evaluó el efecto conjunto de la insulina secretada en respuesta a la alimentación y de los lípidos de la dieta sobre la expresión génica del mensajero de las enzimas que sintetizan ácidos grasos. Por lo que, este estudio nos permitirá saber si los lípidos de la dieta tienen el mismo efecto que la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento en la expresión del RNAm de las desaturasas y elongasas que sintetizan ácidos grasos. Así el objetivo del proyecto es identificar el efecto de la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento y de los lípidos de la dieta sobre la expresión génica del RNAm de las enzimas que sintetizan ácidos grasos en hígado de ratas. Se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley alimentadas con una dieta adecuada o alta en lípidos, después de una semana de adaptación a la dieta experimental, los animales se alimentaron en horario restringido de 7 horas por dos semanas. Al término del periodo de horario restringido los animales fueron sacrificadas a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 minutos posteriores a la ingesta de alimento. Se analizó la expresión del RNAm de la $\Delta 5$, $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas y de las elongasas Elovl-1, Elovl-2, Elovl-5 y Elovl-6 mediante PCR en tiempo real, teniendo como resultado que la mayor concentración de insulina en suero se encontró 30 minutos después de que los animales consumieron alimento. Este aumento podría estar asociado a un efecto positivo de la insulina sobre la expresión génica del RNAm de la D6D y D9D en una dieta normal en lípidos, efecto

inhibido por los lípidos en una dieta alta en lípidos. De la misma manera, se observa que estos mismos lípidos tienen un efecto positivo sobre la expresión de las enzimas $\Delta 5D$, Elovl-2 y Elovl-5 al compararse con la expresión en una dieta normal. Estos dos factores no produjeron cambios en la expresión de las elongasas Elovl-1 y Elovl-6. Los resultados de este trabajo nos permiten concluir que los PUFAs dietarios tienen un mayor efecto que la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento en la regulación de la expresión de la $\Delta 6D$ y $\Delta 9D$, dicha expresión se reprime por los lípidos dietarios. Por lo contrario, los lípidos de la dieta podrían tener un efecto positivo sobre la expresión de la $\Delta 5D$ y de las elongasas Elovl-2 y Elovl-5. La expresión de la Elovl-6 no se afectó por la insulina posprandial ni por los lípidos de la dieta. Por lo contrario, la expresión de la Elovl-1 no mostró cambios asociados a la cantidad de insulina secretada en respuesta al consumo de alimento y sí disminuyó por efecto de los lípidos dieta.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos saturados y monoinsaturados (MUFAs por sus siglas en inglés: Monounsaturated Fatty Acids) de cadena media y larga son moléculas biológicas relacionadas con la producción y reserva energética. Actualmente también se les relaciona con los microdominios lipídicos en la membrana celular, los cuales parecen tener una función como organizadores en el transporte intracelular y eventos de señalización que desencadenan diferentes mecanismos moleculares de la célula. Respecto a los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs por sus siglas en inglés) como el ácido araquidónico (AA), eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), se les relaciona con una gran variedad de funciones fisiológicas, ya que son componentes principales de los fosfolípidos de membrana, substratos para la producción de eicosanoides e interesantemente también se ha demostrado que funcionan como reguladores de la transcripción. Entre los pasos limitantes para la síntesis de los ácidos grasos saturados y MUFAs se encuentran las elongaciones realizadas por la Elovl-1 y Elovl-6 (Elovl por sus siglas en inglés: elongation of very long Chain fatty acids) y una desaturación catalizada por la enzima delta 9 ($\Delta 9D$). Mientras que en la síntesis de LC-PUFAs son necesarias las enzimas delta 6 ($\Delta 6D$) y delta 5 ($\Delta 5D$) desaturasas y las elongasas Elovl-2 y Elovl-5, en donde las desaturaciones son los pasos limitantes en la síntesis de estos ácidos grasos. La expresión de estas enzimas es principalmente en los microsomas hepáticos y su regulación génica y actividad enzimática se regulan por factores exógenos como los componentes de la dieta y factores fisiológicos como los estados hormonales, alimentación y ayuno, ritmo circadiano, edad y fondo genético. Actualmente se sabe que los componentes de la dieta específicamente los PUFAs y los de cadena larga controlan la actividad y expresión génica de algunas de las enzimas antes mencionadas. De manera que dietas bajas en PUFAs n-3 o n-6 dan como resultado niveles más altos de la actividad enzimática y de los RNAm de la $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y $\Delta 9D$ comparados con los ácidos restantes cuando hay consumo de lípidos ricos en estos ácidos grasos. Esto sugiere que la expresión de los transcritos de la $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y $\Delta 9D$

se regula negativamente por los PUFAs de la dieta. Referente a la elongasas sólo existe un reporte que demuestra que Elovl5 responde de manera negativa a los PUFAs, mientras que para Elovl-1, Elovl2 y Elovl-6 no existe información que demuestre que la expresión de estas elongasas se regule por los PUFAs.

Respecto a los factores hormonales se ha reportado que la insulina regula positivamente la expresión de la $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y la $\Delta 9D$. Los niveles bajos de esta hormona están asociados a una menor expresión del RNAm de estas desaturasas. Además, se demostró que la actividad enzimática de estas desaturasas se incrementaba después de la administración de insulina a ratas diabéticas tratadas con estreptozotocina (fármaco que destruye la células β del páncreas). Referente a las elongasas un solo estudio sugiere que solo Elovl-6 es regulada de manera positiva por la insulina. En resumen la expresión y actividad de estas enzimas se controla negativamente con dietas ricas en lípidos PUFAs y de manera positiva por la insulina.

Estudios realizados en ratas diabéticas indican que el tipo de lípidos de la dieta podrían modular la expresión génica de las desaturasas responsables de la síntesis de los ácidos grasos. Sin embargo, hasta donde nosotros sabemos no existen reportes de estudios en los que se analice de manera conjunta el efecto de la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento y la cantidad de lípidos de la dieta sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan ácidos grasos.

El objetivo de la presente investigación fue identificar el efecto de la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento y la cantidad de lípidos de la dieta sobre la expresión génica del RNAm de las enzimas que sintetizan ácidos grasos en hígado de ratas.

MARCO TEORÍCO

Definición de ácidos grasos

Los lípidos son moléculas orgánicas que se encuentran en la naturaleza y pueden ser aislados de las células y de los tejidos por la extracción con disolventes orgánicos no polares. Los lípidos se clasifican en dos tipos generales: I grasas y ceras, los cuales contienen enlaces éster que pueden ser hidrolizados, y II esteroides que no contienen enlaces éster y no pueden ser hidrolizados. Las grasas pueden estar formadas por triacilgliceroles (Tg, también llamados *triglicéridos*), que son triésteres del glicerol con tres ácidos carboxílicos de cadena larga. La hidrólisis del Tg con NaOH acuoso produce glicerol y tres ácidos grasos. Los ácidos grasos que se encuentran en las células de los mamíferos son generalmente no ramificados y contienen un número par de átomos de carbono (McMurry, 2001).

Los ácidos grasos son la forma más sencilla de los lípidos y su estructura básica está formada por un grupo carboxilo unido a un extremo de una cadena hidrocarbonada. Existen dos tipos de ácidos grasos: los saturados, en los que todos los carbonos de la cadena están saturados con átomos de hidrógeno, y los insaturados que contienen uno o más enlaces dobles. En la mayor parte de los ácidos grasos insaturados presentes en la naturaleza, la orientación de los enlaces dobles es *cis* en vez de *trans* (Mathews et al., 2002).

La forma estándar de nombrar a los ácidos grasos es la usada por la *Internacional Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) que utiliza un sistema abreviado. El ácido oleico, ácido graso con 18 carbonos, es designado por 18:1c Δ 9. Las reglas para nombrarlo son sencillas: el número antes de los dos puntos indica el número de carbonos en el ácido graso y el número después de los dos puntos nos muestra el número de dobles enlaces. Las configuraciones y posiciones de los dobles enlaces se indican mediante *cis* (c) o *trans* (t), seguido por delta (Δ), que representa una insaturación, y el número representa la posición

en donde se encuentra ésta desde el grupo carboxilo, nombrando al carbono del carboxilo como carbono número 1. De esta manera un doble enlace entre el carbono 9 y el carbono 10 es un enlace $\Delta 9$ (Mathews et al., 2002). Existe otra clasificación de los ácidos grasos usada comúnmente que los identifica de manera abreviada conocida como ω (la última letra del alfabeto griego), que identifica el número de carbonos en el ácido graso seguido por dos puntos y el número de dobles enlaces (insaturaciones), aquí la posición número 1 del doble enlace se toma a partir del primer metilo de la estructura del ácido graso. De esta manera el ácido linoléico con 18 carbonos tiene la siguiente nomenclatura: 18:2 ω 6 lo que indica que tiene dos insaturaciones por lo que es un ácido graso poli-insaturado (PUFA por sus siglas en inglés; polyunsaturated fatty acid) (Akoh et al., 2002).

Acido grasos poli-insaturados

Definición y funciones

Los PUFAs presentan más de una doble insaturación. Existen dos familias de PUFAs, en donde el ácido linoléico (AL) y el ácido linolénico (ALN) son los precursores esenciales y pertenecen a las familias n-6 ($\omega 6$) y n-3 ($\omega 3$) respectivamente. Los mamíferos no cuentan con las enzimas involucradas en la síntesis de estos ácidos grasos esenciales y por consiguiente el organismo tiene que obtenerlos de la dieta. Los vegetales son una fuente importante de este tipo de ácidos grasos, ya que son capaces de sintetizar los PUFAs como el AL y el ALN de *novo* debido a que tienen las desaturasas con especificidad en las posiciones $\Delta 12$ y $\Delta 15$ contando a partir del grupo carboxilo. La esencialidad de los ácidos grasos n-6 se conoce desde finales de la década de los 1920s. Esto surgió a la luz de la evidencia de que la deficiencia de los ácidos grasos n-6 estaba asociada a una disminución en el crecimiento corporal, aumento en la pérdida del agua dérmica, daño respiratorio y problemas reproductivos entre otros (Chapkin, 1992). Estos PUFAs n-6 y n-3 son un componente de los fosfolípidos y participan de manera importante en la estructura y función de las membranas (Seo et al., 2004). Por ejemplo, las membranas de las células adiposas, hepáticas, musculares y del riñón son ricas en PUFAs n-6, mientras que las células del

cerebro, testículos y retina contienen predominantemente PUFAs n-3 (Gurr et al., 2002). Además los PUFAs participan en mecanismos de señalización celular y son también importantes reguladores de factores de transcripción (Calder, 2005). Una de las principales funciones de los ácidos grasos n-3 y los n-6 es que son sustratos para PUFAs de cadena larga (LC-PUFAs; por sus siglas en inglés *Long Chain-PUFAs*) como el ácido araquidónico (AA; de la familia n-6), ácido eicosapentaenoico (EPA; de la familia n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA; de la familia n-3). Estos ácidos grasos son precursores de eicosaenoides moléculas sumamente importantes para la respuesta inflamatoria (Calder, 1998).

Síntesis de ácidos grasos

Desaturasas y elongasas

Los LC-PUFAs se sintetizan en el retículo endoplásmico por unas enzimas, llamadas elongasas y desaturasas. Las desaturasas forman un complejo incluyen la NADH-citocromo b_5 reductasa, la citocromo b_5 y la desaturasa respectiva, delta 9 desaturasa ($\Delta 9D$), delta 6 desaturasa ($\Delta 6D$) o delta 5 desaturasa ($\Delta 5D$). Se ha identificado que estas reacciones se llevan a cabo en los microsomas hepáticos a partir tioesteres de acil-CoA en presencia de oxígeno y NADH o NADPH. El transporte de electrones se realiza por el complejo enzimático NADH-citocromo b_5 reductasa y el citocromo b_5 , mientras que la desaturación se lleva a cabo por las desaturasas $\Delta 9D$, $\Delta 6D$ o $\Delta 5D$ (Cho et. al., 1999). En el caso de la $\Delta 9D$, esta desaturasa participa en la síntesis de ácidos grasos saturados. Las elongasas también son enzimas microsomales que interaccionan con la 3-ceto acil CoA reductasa, una deshidratasa y una trans 2,3-enoil CoA reductasa para elongar los ácidos grasos. Las elongasas (Elovl, por sus siglas en inglés; elongation of very long-chain fatty acids) catalizan el primer paso de condensación de los ácidos grasos de cadena larga (Leonard et al., 2004, Jakobsson et al., 2006). Actualmente, se han identificado siete Elovl en rata, ratón y humano; cada una tiene su *locus* respectivo, una expresión tejido-específico y un sustrato particular a elongar (Leonard, et al., 2002). Se ha propuesto que dentro de estas siete elongasas existen 3 que elongan a los LC-PUFAs. Estas son la Elovl-2, Elovl-4 y

Elovl-5 (Matsuzaka et al., 2002, Lagali et al., 2003), siendo la Elovl-4 específica de la retina. La síntesis de LC-PUFAs requiere de reacciones alternadas de elongación y desaturación, a partir de los ácidos grasos esenciales AL (C18:2n-6) y ALN (C18:3n-3) (Westerberg et al., 2004). Las desaturaciones se refieren a la introducción de un doble enlace dentro de la cadena hidrocarbonada del ácido graso mediante una reacción oxidativa catalizada por enzimas conocidas como desaturasas ($\Delta 5$ y $\Delta 6$). Uno de los pasos limitantes para la producción de LC-PUFAs es la desaturación de los ácidos grasos esenciales AL y ALN llevada a cabo por la $\Delta 6D$ (Fig. 1). Estudios basados en la expresión del mensajero y actividad enzimática de ambas desaturasas sugieren que el hígado es el principal sitio para la síntesis de LC-PUFAs (Matsuzaka et al., 2002).

Ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga

Actualmente es bien sabido que para la biosíntesis del AA (C20:4n-6), DHA (C22:6n-3) y ETA (C20:3n-9) a partir del AL (C18:2n-6), ALN (C18:3n-3) y ácido esteárico (C18:0) respectivamente, se deben llevar a cabo una serie de reacciones alternadas de desaturación y elongación. Para la síntesis de 22:6n-3 se utiliza como sustrato el C22:5n-3 que es elongado a C24:5n-3 que a su vez se desatura por acción de la $\Delta 6D$ para la síntesis de C24:6n-3, el que seguirá una β -oxidación peroxisomal y de esta forma se obtendrá C22:6n-3. Este mismo mecanismo también se sigue para la síntesis de C22:5n-6. Se ha encontrado que existe una importante competencia entre las familias de ácidos grasos n-3 y n-6 por las enzimas que sintetizan los LC-PUFAs y que existe una autorregulación de su síntesis (Brenner, 2003). En las elongaciones participa la Elovl-5, la cual puede elongar al ácido estearidónico (C18:4n-3) y el ácido γ -linoléico (C18:3n-6) para formar C20:4n-3 y C20:3n-6, respectivamente. Se ha propuesto que esta elongasa no tiene la capacidad para elongar cadenas hidrocarbonadas de más de 22 átomos de carbono. Además, Leonard y col., después de identificar a la Elovl-5, también clonaron el gen de la Elovl-2 y obtuvieron evidencia de que esta elongasa también podría participar en la síntesis de dichos ácidos grasos. (Leonard et al., 2000).

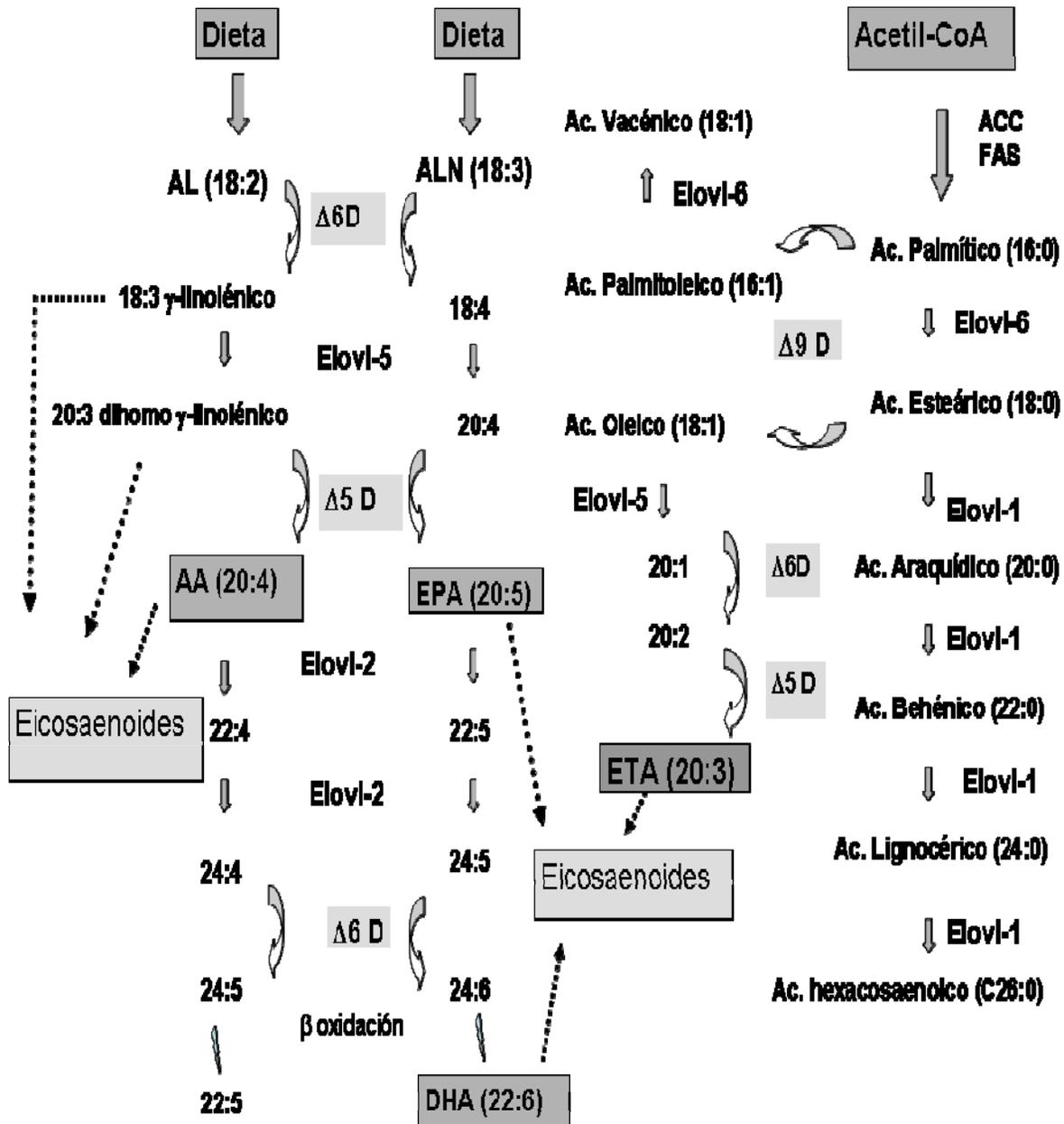


Figura 1. Síntesis de ácidos grasos monoinsaturados, saturados y poli-insaturados de cadena larga. $\Delta 9D$ = delta 9 desaturasa; $\Delta 6D$ = delta 6 desaturasa; $\Delta 5D$ = delta 5 desaturasa; AL = ácido linoléico; ALN = ácido linolénico; AA = ácido araquidónico; EPA = ácido eicosapentaenoico; ETA = ácido eicosatrienoico; DHA = ácido docosahexaenoico; PUFAs = ácidos grasos poli-insaturados; FAS = sintasa de ácidos grasos; ACC = acetil CoA carboxilasa.

Síntesis de ácidos grasos saturados y monoinsaturados.

El hígado tiene una función central en el metabolismo de los lípidos. Los ácidos grasos son sintetizados de *novo* en este órgano a partir de glucosa. Esta vía metabólica usa como sustratos los productos de la glucólisis para sintetizar un ácido graso saturado de 16 carbonos llamado ácido palmítico (16:0). En la síntesis de estos ácidos grasos participan principalmente la acetil-coenzima A carboxilasa (ACC) para la producción de malonil-CoA a partir de acetil-CoA y el complejo enzimático conocido como síntasa de ácidos grasos (FAS por sus siglas en inglés) que cataliza la elongación de un acetil-CoA al cual une dos carbonos donados por el malonil-CoA, el producto de esta condensación se reduce utilizando a NADPH como el donador de electrones, la síntesis se completa con una subsiguiente deshidratación y una segunda reducción mediada de igual manera por NADPH. Las reacciones de condensación, reducción, deshidratación, reducción se repiten por siete veces de manera cíclica hasta sintetizar el ácido palmítico (Mathews et al., 2002). Este ácido graso es precursor de otros ácidos grasos saturados de cadena larga ya que puede ser elongado hasta formar ácido esteárico (18:0), el cual también puede ser elongado para obtener ácidos grasos saturados de cadena más larga como el araquídato (C20:0) Figura 1. La síntesis de ácidos grasos saturados hasta C16:0 se lleva a cabo en el citosol, y la elongación de ácidos grasos con más de 16 átomos de carbonos se realiza en el retículo endoplásmico, peroxisomas y en la mitocondria por enzimas transmembranales. Tanto el palmitato como el estearato son precursores de los dos ácidos grasos monoinsaturados más comunes; el palmitoleato (C16:1) y el oleato (C18:1). Cada uno de éstos tiene una insaturación por lo que para su síntesis requieren de una reacción de desaturación adicional catalizada por la enzima Δ^9 D. Las elongasas que participan en la síntesis de ácidos grasos monosaturados y saturados de cadena larga (AGSCL) son la Elovl 1, 3 y 6 (Westerberg et al., 2004, Jakobsson et al., 2006). Los ácidos grasos sintetizados por la FAS, así como los ácidos grasos obtenidos de la dieta son elongados a ácidos grasos de cadena larga con 18 o más átomos de carbonos. La síntesis de estos ácidos grasos se lleva a cabo principalmente en el retículo endoplasmático por enzimas transmembranales y los pasos involucrados en estos procesos son

muy parecidos al los descritos para la FAS: una condensación de acil-CoA y Malonil CoA por la elongasa respectiva, una consecuente reducción mediada por NADPH, una deshidratación y una reducción final por NADPH. En contraste al complejo FAS, los cuatro procesos principales para la elongación de los ácidos grasos de cadena larga se llevan a cabo por proteínas individuales, los cuales se encuentran físicamente asociadas entre si como se muestran en la Figura 2 (Jakobsson et al., 2006). La Elovl-6 está involucrada en la elongación de ácidos grasos saturados de 12-16 carbonos hasta la obtención de ácidos grasos de 18 carbonos y no tiene capacidad para elongar mas allá del carbono 18 (Moon et al., 2001). Se ha observado que esta elongasa tiene una alta actividad enzimática para elongar los ácidos grasos en los microsomas hepáticos. Por otro lado, diversos estudios han sugerido que la Elovl-1 puede controlar la elongación de los ácidos grasos saturados de cadena larga a partir de C18:0 hasta C26:0. Por su parte Elovl-3 se expresa abundantemente en tejido adiposo café de roedor expuesto a condiciones de frío, pero solo se expresa en piel cuando las condiciones son normales y es capaz de elongar ácidos grasos desde el C16:0 al C18:0 (Jakobsson et al., 2006).

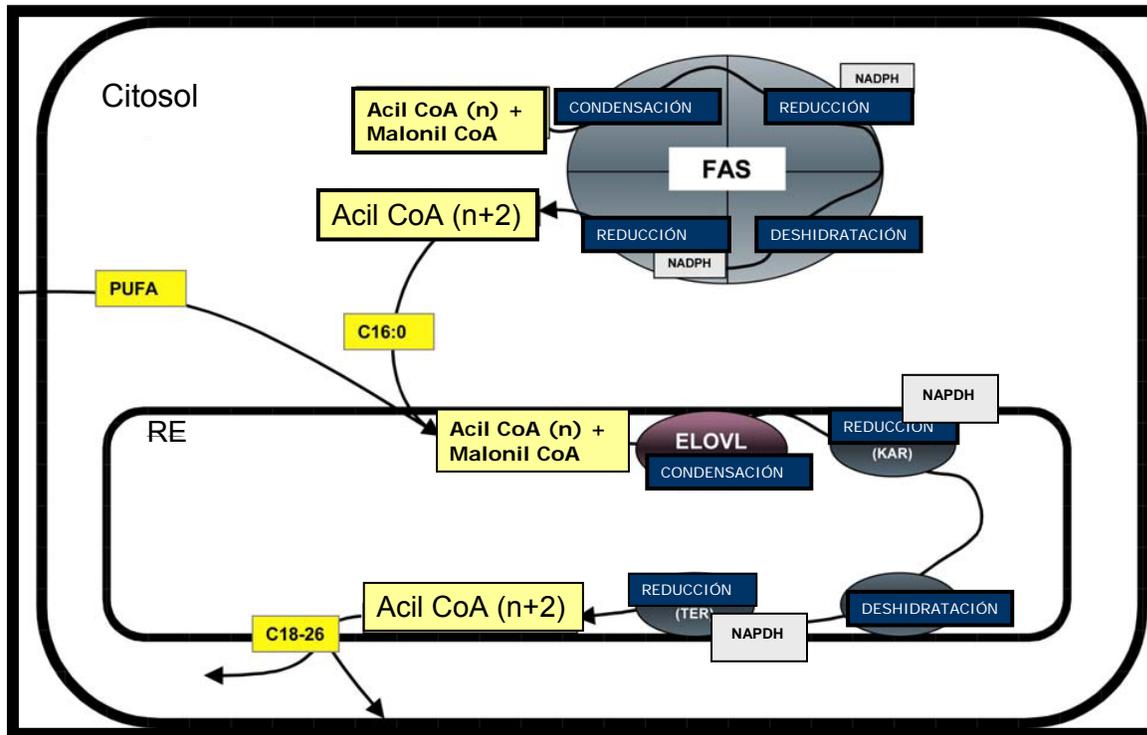


Figura 2. Elongación de ácidos grasos en mamíferos. Los ácidos grasos que son sintetizados en el citosol o que son tomados de la dieta son elongados en el retículo endoplasmático por cuatro enzimas individuales. KAR = 3 cetoacil-CoA reductasa; TER = *trans*-2,3-enoil-CoA reductasa; FAS = sintasa de ácidos grasos; PUFA = ácidos grasos poli-insaturados, RE = retículo endoplasmático; ELOVL = Elongasa. Modificado de Jakobsson et al., 2006.

Expresión génica de la $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, Elov12 y Elov15

Estudios realizados en tejidos de humano y roedores han mostrado la expresión del RNAm de la desaturasa $\Delta 6D$ en corazón, cerebro, riñón, páncreas, bazo y músculo esquelético. Aunque la cantidad del mensajero expresado en hígado fue abundante y similar al expresado en pulmón y corazón, la mayor abundancia se

encontró en cerebro (Cho et al., 1999). Por lo contrario, la expresión del RNAm de la $\Delta 5D$ en tejidos de humano y roedores fue mayor en hígado, corazón, cerebro y pulmón, mientras que los niveles más bajos de este transcrito fueron encontrados en placenta, músculo esquelético, riñón y páncreas, aunque en todos los tejidos la cantidad del $\Delta 6D$ es mayor que la $\Delta 5D$ (Cho et al., 1999). Además, recientemente nuestro grupo de investigación identificó el transcrito de la $\Delta 5D$ y la $\Delta 6D$ en la glándula mamaria y en el tejido adiposo de rata lactante (Rodríguez-Cruz et al., 2006).

El transcrito de la Elov1-2 se ha identificado en hígado, riñón, cerebro (Wang et al., 2005) y testículo (Leonard et al., 2004). Por otra parte el RNAm de la Elov1-5 se expresa en la mayoría de los tejidos como hígado, pulmón, cerebro, testículos y glándulas adrenales de roedores y del humano. Interesantemente los niveles más altos del transcrito fueron hallados en dos de éstos últimos tejidos, lo cual se relaciona con el alto contenido de ácido docosapentaenoico (22:5n-6) en testículos y glándulas adrenales (Inagaki et al., 2002). Debido a esto se ha propuesto que la Elov1-2 y Elov1-5 tienen un papel importante en la síntesis de LC-PUFAs en dichos tejidos.

Expresión génica de la $\Delta 9D$, Elov11 y Elov16

$\Delta 9D$ cataliza la desaturación en sustratos como el ácido palmítico y el esteárico que son transformados en ácidos palmitoleico y oleico respectivamente. Se ha reportado que esta desaturasa se expresa en hígado, tejido adiposo y en menor cantidad en riñón, bazo, corazón y pulmón (Ntambi et al., 1999). Respecto a las elongasas Elov1-1 y 6 se ha observado que Elov1-1 se expresa en diferentes tejidos de roedores y en el hígado humano. Algunos reportes sugieren que esta elongasa tiene como principales sustratos al ácido graso docosaenoico C22:0 y al ácido graso eicosaenoico C20:0. Estos ácidos grasos están asociados con la mielinización nerviosa, ya que se han encontrado altos niveles del RNAm de Elov1-1 en las partes altamente mielinizadas del sistema nervioso central como el cuerpo calloso y la espina dorsal. Además, este gen es altamente expresado en

tejidos que poseen una función de barrera tales como el estómago, pulmón, riñón y piel. Por su parte el gen de la Elovl-6 se expresa en el hígado y en tejidos con alta concentración en lípidos tales como el tejido adiposo café, tejido adiposo blanco y cerebro. Esta elongasa tiene como sustratos únicamente a los ácidos grasos saturados que van de los 12-16 átomos de carbono (Jakobsson et al., 2006).

Regulación de la expresión génica de las desaturasas y elongasas de ácidos grasos.

Es bien sabido que la regulación génica y la actividad enzimática tanto de las desaturasas como de las elongasas se regulan por factores fisiológicos como los estados hormonales, la alimentación, el ayuno, el ritmo circadiano, la edad y el fondo genético (Reza et al., 2001). También existen factores exógenos como los componentes de la dieta específicamente los PUFAs que tienen una participación importante en dicha regulación (Cho et al., 1999).

Regulación mediada por los PUFAs

Con respecto a la regulación por componentes de la dieta, se sabe que los PUFAs y los de cadena larga controlan la expresión génica y la actividad enzimática de las desaturasas y de la elongasa Elovl5 (Tabla 1). La actividad y la expresión génica de estas enzimas en el hígado dependen de la composición de los lípidos de la dieta. La ingestión de dietas altas en PUFAs o LC-PUFAs n-3 o n-6 da como resultado niveles más bajos en 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 (Cho et al., 1999). Interesantemente Rodríguez-Cruz y colaboradores observaron que, tanto en glándula mamaria como en hígado de ratas lactantes disminuye la expresión de los transcritos de ambas desaturasas cuando los animales son alimentados con una dieta con elevado porcentaje de aceite de maíz (contiene 53% de AL). Estos resultados sugieren que la expresión del transcrito de la $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ en la glándula mamaria lactante, se regula

negativamente por los PUFAs de la dieta (Rodríguez-Cruz et al., 2006). Por lo contrario, la suplementación con ácidos grasos saturados (ácido esteárico C18:0) o mono-insaturados (ácido oleico) no afecta la expresión de estas desaturasas (Matsuzaka et al., 2002). Igal y col. han demostrado que la expresión del RNAm de la $\Delta 9D$ disminuía en ratones alimentados con una dieta alta en AL (Igal et al. 1991). En relación a las elongasas, hasta donde sabemos sólo existe un trabajo que sugiere que los LC-PUFAs n-3 disminuyen la expresión hepática del RNAm de la elongasa Elovl-5 y Elovl-6 aproximadamente en un 50 % (Wang et al., 2005).

Tabla 1. Efecto de los PUFAs sobre la regulación génica de las desaturasas y elongasas que sintetizan ácidos grasos.

Enzima	Estudio	Efecto
$\Delta 5D$ $\Delta 6D$	Ratas alimentadas con dietas altas en PUFAs (dietas suplementadas con 10 % en aceite de maíz o girasol)	Suprime la expresión del RNAm de ambas desaturasas
Elovl-2 Elovl-5	Ratas alimentadas con dietas altas en LC-PUFAs (Dietas suplementadas con el 10 % en aceite de pescado, rico en DHA y EPA)	Suprime la expresión del RNAm de la Elovl-5 sin cambios en Elovl-2
$\Delta 9D$	Ratones alimentados con una dieta alta en PUFAs (dieta libre de ácidos grasos suplementada con el 10 % de AL)	Suprime la expresión de RNAm
Elovl-1 Elovl-6	Ratas alimentadas con LC-PUFAs (Dieta suplementada con 10% w/w de aceite de pescado, DHA y EPA).	Suprime la expresión del RNAm de la Elovl-6 sin cambios en Elovl-1

Regulación mediada por insulina

Se ha demostrado que diferentes hormonas regulan la desaturación de los ácidos grasos. Hormonas como los glucocorticoides, la 11-deoxycorticosterona, la testosterona, el estradiol, la triyodotironina y el AMPc regulan de manera negativa la expresión de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$, mientras que lo hacen de manera positiva para la $\Delta 9D$. De manera particular, en la regulación de la síntesis de ácidos grasos por hormonas se ha estudiado ampliamente el efecto que ejerce la insulina (Brenner, 2003). Diversos estudios han sugerido que la insulina tiene una regulación positiva sobre la expresión y actividad enzimática de la $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y $\Delta 9D$ (Tabla 2). Se ha observado que la abundancia del RNAm de estas desaturasas en ratas diabéticas (inducida por estreptozotocina) es hasta siete veces más baja que en ratas sanas y que la administración de insulina a estas ratas induce la expresión del RNAm de la $\Delta 6D$ hasta ocho veces (Brenner, 2003, Rimoldi et al., 2001). Posteriores estudios realizados en hepatocitos primarios tratados con insulina demostraron que el transcrito de la $\Delta 9D$ el de la $\Delta 6D$ presentan una inducción mayor a tres veces con respecto al control (sin insulina). En este mismo estudio también se examinó la expresión de la $\Delta 5D$ y de la elongasa Elovl-6 la cual presentó una inducción mayor a 1.5 veces con respecto al control. Por lo contrario no se produjo ningún aumento en la cantidad del transcrito de la Elovl1, Elovl-2 y Elovl-5 por acción de la insulina (Wang et al., 2006). Así que dependiendo de las concentraciones circulantes de insulina se obtendrá un efecto sobre la expresión de las desaturasas.

Tabla 2. Efecto de la insulina sobre la regulación génica de las desaturasas y elongasas que sintetizan ácidos grasos.

Enzima	Estudio	Efecto
$\Delta 6D$	Ratas diabéticas a las cuales se les administró insulina intraperitonealmente Hepatocitos primarios cultivados con insulina	Incrementaba la expresión del RNAm de esta desaturasa
$\Delta 5D$	Hepatocitos primarios	Incrementa la expresión del RNAm de esta desaturasa
Elovl-2 Elovl-5		No se produjo cambio
$\Delta 9D$		Incrementa la expresión del RNAm de esta desaturasa
Elovl-1		No se produjo cambio
Elovl-6		Incrementa la expresión del RNAm de esta desaturasa

Sin embargo, dado que además de la insulina los PUFAs de la dieta también tienen un efecto regulatorio sobre la expresión de las desaturasas, Igar y col., evaluaron si estos ácidos grasos tienen algún efecto en la expresión de las desaturasas en ratas diabéticas sin la administración de insulina. En este estudio, ratas diabéticas fueron alimentadas con una dieta baja en lípidos que contenía el 2% de aceite de soya (60.8% PUFAs, donde: el 54% es ácido linoléico y el 7.2% es ácido linolénico), lo que produjo una restauración en el nivel del RNAm de la $\Delta 6D$ así como de su actividad enzimática. Dado que son ratas diabéticas, se sugiere que el aumento en el RNAm no depende de los niveles de insulina, lo cual se atribuye al tipo de ácidos grasos contenidos en el aceite de soya (Igar et al., 1991). Los resultados de los anteriores estudios han mostrado que tanto la insulina como los PUFAs producen un efecto sobre la expresión de las

desaturasas y de la Elovl-6, pero no se cuenta con la evidencia experimental de la expresión de estas enzimas considerando de manera simultánea el efecto de la insulina y de los lípidos de la dieta.

Es importante considerar que los niveles circulantes de la insulina dependen del estado de ayuno y alimentación del individuo. El páncreas es el órgano que además de participar en las funciones digestivas también es el sitio de síntesis y secreción de la insulina. Esta síntesis se lleva a cabo en el retículo endoplasmático de las células beta de los islotes de Langerhans en forma de pre-hormona la cual es metabolizada a pro-insulina, para ser finalmente catabolizada en el aparato de Golgi a insulina. La secreción de insulina es controlada totalmente por la concentración de glucosa en sangre. De esta manera cuando los niveles normales de glucosa en ayuno que van de los 80 a los 90 mg/dl, la secreción de insulina es mínima dentro del orden de 25 ng/min/kg de peso. Por lo contrario, si la concentración de glucosa se incrementa dos o tres veces por arriba de la concentración normal, la secreción de insulina incrementa marcadamente en dos fases como se muestra en la Figura 3. En primer lugar existe un aumento en la concentración de insulina plasmática de alrededor de 10 veces dentro de los 3 a 5 minutos después del aumento en la concentración de glucosa; este primer nivel de secreción sólo se mantiene durante 5 a 10 minutos. Después de este periodo la concentración de insulina disminuye cerca de la mitad, estos niveles de insulina obtenidos son el resultado de la liberación de insulina preformada y almacenada en vesículas dentro de las células β del páncreas. Después de este tiempo, la secreción de insulina aumenta una segunda vez llegando a una meseta dentro de las 2 a 3 horas después de la ingesta de alimentos. La secreción de insulina en esta fase es mayor que en la primera y resulta de la activación génica para la síntesis de la insulina así como la respuesta a una menor liberación por parte de las vesículas que contienen la insulina ya pre-formada (Figura 3). Así, la insulina es secretada en grandes cantidades cuando existe un exceso de hidratos de carbono pero no así con los lípidos (Guyton, 1996).

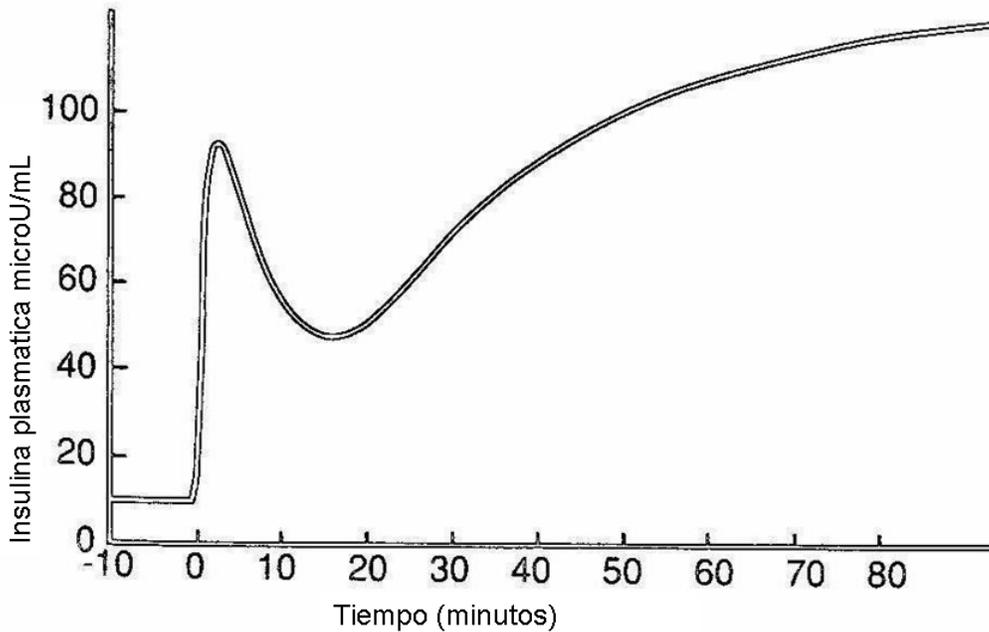


Figura 3. Incremento de la concentración plasmática de insulina después del incremento de glucosa en sangre. Tomada de Guyton, 1996.

La insulina liberada a la circulación se une a un receptor de membrana celular de los tejidos que responden a la insulina como el hígado, el tejido adiposo y el músculo esquelético. En estos tejidos la insulina tiene un efecto regulatorio sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, además de regular el metabolismo proteico. El receptor de la insulina está formado por dos subunidades alfa extramembranales y dos betas intramembranales. La insulina se une a las subunidades alfa lo cual desencadena que las subunidades beta se autofosforilen, induciendo así una cascada de actividad enzimática sobre moléculas intracelulares. Esto da como resultado la translocación de la glucosa, los aminoácidos, el potasio y el fosfato al interior de la célula además de promover la lipogénesis, glucólisis y glucogenogénesis. En el músculo y en el tejido adiposo genera una rápida captación y almacenamiento de la glucosa. Además, la insulina incrementa la transcripción de la FAS, de la acetil CoA carboxilasa-1 y del factor de transcripción proteína de unión a elementos de respuesta regulatorios de esteroides (SREBP por sus siglas en inglés; sterol regulatory element binding protein) entre otras moléculas reguladoras de la

lipogénesis (Guyton, 1996). De acuerdo a lo anterior, la alimentación después de un periodo de ayuno estimula la secreción de insulina e induce la expresión génica del RNAm de SREBP-1c el cual a su vez activa la transcripción de genes que participan en la lipogénesis.

Mecanismos moleculares de regulación SREBP y PPAR

Los mecanismos moleculares propuestos en la regulación de las desaturasas y elongasas están relacionados con ciertos factores de transcripción que sensan los niveles de lípidos en la célula. Tal es el caso de las SREBP y de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPAR por sus siglas en inglés; peroxisome proliferator activated receptor). Las SREBPs son una familia de factores de transcripción formada por tres miembros SREBP-1a, 1c y 2. SREBP-1a y SREBP-2 regulan genes involucrados en el metabolismo del colesterol, mientras que las SREBP-1c están involucradas en la lipogénesis (Horton et al., 2002). Se han propuesto algunos mecanismos por los cuales los PUFAs regulan la lipogénesis a través de SREBP-1c. El primero sugiere que los PUFAs reducen la forma nuclear activa de SREBP-1c (Sekiya et al., 2003), la segunda propuesta se refiere a que los PUFAs disminuyen la estabilidad del RNAm de SREBP-1c (Yahani et al., 1999) y el tercer mecanismo propone la supresión en la expresión del RNAm de SREBP-1c (Kim et al., 1999). Existen evidencias de que la SREBP-1c regula a las desaturasas y a la Elovl-6. En dichos estudios se ha observado que la expresión génica de la $\Delta 6D$ y de la $\Delta 5D$ se induce en ratones transgénicos que sobreexpresan a la SREBP-1c. Esto se debe a que la región promotora del gen $\Delta 6D$ contiene un elemento de respuesta a esteroides (Tang et al., 2003). En estudios posteriores realizados por Wang en los cuales transfectó células hepáticas para sobreexpresar a SREBP-1c, se observó que la expresión de la $\Delta 6D$, $\Delta 5D$ y $\Delta 9D$ así como la de Elovl-6 aumentó. Dichos resultados sugirieron que estas enzimas son reguladas por SREBP-1c (Wang et al., 2006) (Figura 4).

PPAR participa en la regulación de la homeostasis de los lípidos. Los PPARs presentan tres isoformas α , δ y γ , los PUFAs se unen a PPAR α y lo activan, el cual se une a elementos de respuesta a PPAR (PPER) que se encuentran en genes involucrados en el transporte y oxidación de lípidos y en la termogénesis. Las desaturasas ($\Delta 6D$ y $\Delta 5D$) y las elongasas (Elovl-5 y Elovl-6) contienen un promotor donde se encuentra un PPER (Wang et al., 2006) (Figura 4).

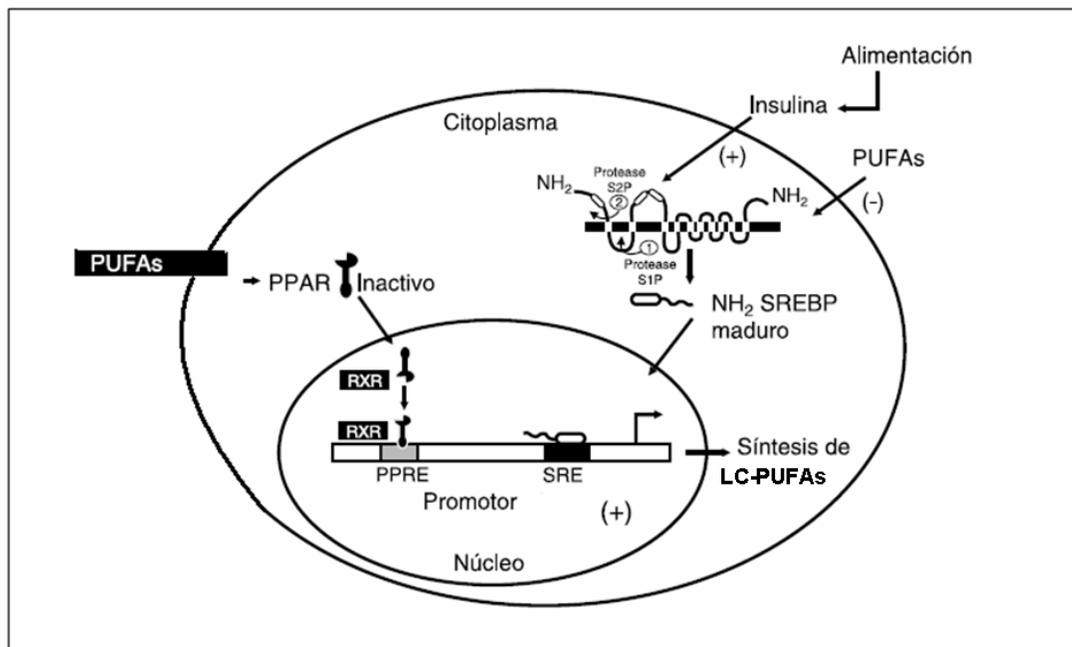


Figura 4. Regulación del promotor de los genes que participan en la síntesis de LC-PUFAs. SREBP-1 = proteínas de unión a elementos de respuesta de esteroides; PPAR = receptor activado por proliferadores de peroxisomas; PUFAs = ácidos grasos poli-insaturados; RXR, receptor nuclear para el ácido retinoico; PPRE = elemento de respuesta para PPAR; SER = elemento de respuesta para SREBP.

Dada la importancia de los LC-PUFAs, MUFAs y de los ácidos grasos saturados de cadena larga (AGSCL) para las diversas funciones celulares, es necesario que el organismo los obtenga de la dieta o los sintetice. Un amplio número de trabajos han mostrado que la insulina induce la expresión génica del RNAm de las desaturasas $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y $\Delta 9D$ así como también de la elongasa Elovl-6, enzimas esenciales para la producción de los ácidos grasos. Por lo contrario, la ausencia o disminución de esta hormona en modelos de ratas diabéticas está asociada a niveles bajos en la expresión y actividad de estas enzimas. Además, es importante enfatizar que el tipo de lípidos de la dieta modula la expresión génica de las desaturasas y, aunque no existen evidencias, también podrían regular a las elongasas Elovl-1, Elovl-2, Elovl-5 y Elovl-6 responsables de la síntesis tanto de LC-PUFAs como de los ácidos grasos saturados de cadena larga y de los ácidos grasos MUFAS.

JUSTIFICACIÓN

Aunque existen evidencias acerca de cómo se regula la síntesis de LC-PUFAs tanto por la insulina como por los PUFAs dietarios, hasta donde sabemos no existen reportes en donde se analice de manera conjunta el efecto de la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento y del tipo y cantidad de lípidos de la dieta sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan ácidos grasos. Por lo que es necesario primeramente conocer en condiciones no patológicas el efecto de la participación conjunta de la insulina (secretada en respuesta al consumo de alimento) y del tipo y cantidad de lípidos (ácidos grasos) de la dieta sobre la expresión génica del RNAm de las enzimas que sintetizan ácidos grasos.

Este estudio contribuirá al conocimiento básico de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de las desaturasas ($\Delta 6D$, $\Delta 5$ y $\Delta 9D$) y elongasas (Elovl-1, Elovl-2, Elovl-5 y Elovl-6) responsables de la síntesis de ácidos grasos. Además, nos permitirá saber si la cantidad de ácidos grasos de la dieta son tan eficientes como la insulina (producida en respuesta al consumo de alimento) en la regulación de la expresión génica de las desaturasas y elongasas.

HIPÓTESIS

La expresión del RNAm de las desaturasas y elongasas en hígado de ratas es menor en las ratas alimentadas con una dieta alta en PUFAs cuando se secreta insulina en respuesta a la alimentación.

OBJETIVOS

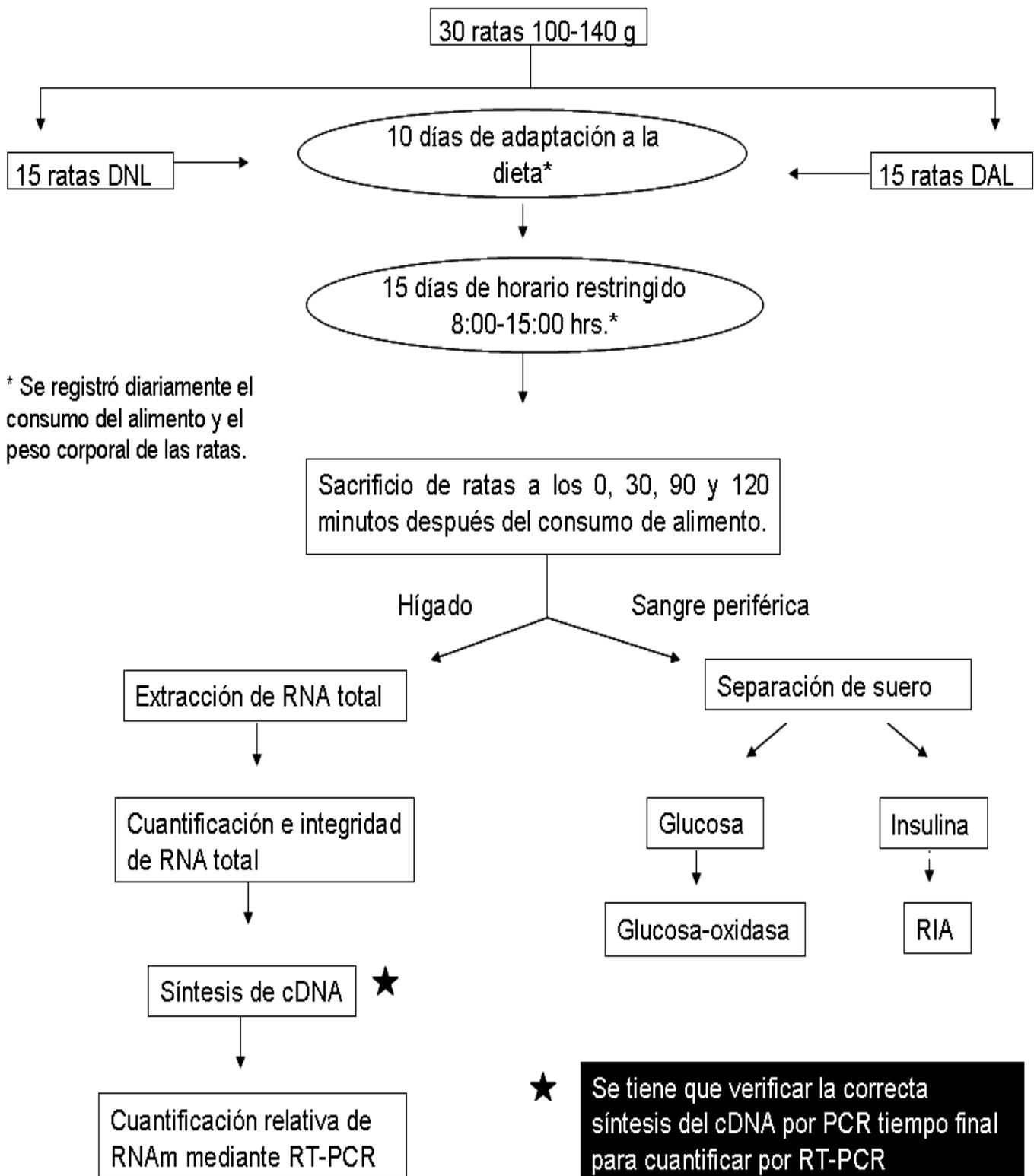
Objetivo general

Identificar el efecto de la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento y de la cantidad de lípidos de la dieta sobre la síntesis del RNAm de las enzimas que sintetizan ácidos grasos en hígado de ratas.

Objetivos específicos

1. Cuantificar el RNAm de las desaturasas y elongasas que sintetizan ácidos grasos a diferentes tiempos después del consumo de alimento en el hígado de ratas alimentadas con una dieta adecuada o alta en PUFAs.
2. Comparar la expresión del transcrito de las desaturasas y elongasas en hígado de ratas alimentadas con una dieta adecuada y alta en PUFAs.

DISEÑO EXPERIMENTAL



Tipo de estudio:

Experimental, prospectivo, comparativo y transversal.

Animales

Se utilizaron 30 ratas machos de la cepa Sprague-Dawley alimentadas *al libitum* con un alimento comercial (Agribands Purina, México, DF, México) desde el destete hasta que alcanzaron un peso corporal entre 100 y 140 g. De éstas se formaron dos grupos al azar con 15 ratas cada uno. Los grupos se designaran como: dieta adecuada (DNL) y dieta alta (DAL) en lípidos. El porcentaje de energía suministrado por las proteínas, los hidratos de carbono y los lípidos se muestran en la Tabla 1. Los lípidos de las dietas fueron proporcionados por el aceite de maíz (53% de ácido linoléico, 25% de oleico, 2% de esteárico, 11 % de palmítico y 1% de linolénico).

Tabla 3. Composición de las dietas experimentales y aporte energético en % de energía de las proteínas, los hidratos de carbono y los lípidos de las dietas experimentales.

Ingrediente	DNL	DAL	DNL	DAL
	g/Kg dieta		% de energía	
Caseína	222	222	23.38	23.38
Glucosa	307.5	272.5	32.96	27.47
Almidón	307.5	272.5	32.96	27.47
Aceite de maíz	50	100	11.85	22.68
Celulosa	63	63	0	0
Vitaminas	10	10	0	0
Minerales	40	60	0	0
Energía kJ/g	15.82	16.53		

Después de la semana de adaptación a las diferentes dietas, las ratas se alimentaron con horario restringido de 7 horas exactas. Esto con la finalidad de sincronizar el comportamiento de alimentación de los animales y de esta manera conocer el horario del aumento de insulina en respuesta al consumo de alimento. Esto consistió en que a las 8:00 se les proporcionaron a los animales 20 g de alimento y se les retiró a las 15:00. Este procedimiento se realizó diariamente durante dos semanas. Los animales se mantuvieron bajo ciclos de luz/oscuridad de 12 h.

Ingesta dietaria y registro del peso corporal

A partir del primer día de estudio (ratas con un peso corporal de 120-140 g) y hasta el día del experimento, se registró diariamente el consumo del alimento y el peso corporal de la rata. A cada una de ellas se le proporcionaron 20 g del alimento. Al siguiente día se colectó el alimento residual a las 8:00 (adaptación a la dieta durante una semana) o a las 15:00 horas (horario restringido durante dos semanas) diariamente durante dos semanas. Es importante mencionar que cuando las ratas se mantuvieron en horario restringido, el alimento se les proporcionó a la 8:00. El consumo de alimento en gramos se calculó a partir de la diferencia entre el alimento proporcionado y el alimento residual.

Obtención de la muestra

Las ratas de cada grupo alimentadas con diferente concentración de lípidos (5 % y 10 % de aceite de maíz) se sacrificaron (tres ratas por cada tiempo) a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de que se les proporcionó el alimento. Los animales se anestesiaron en una cámara de éter, posteriormente se decapitaron y se recolectó la sangre periférica, la cual se centrifugó a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C para separar el suero que se congeló en alícuotas a -20 °C hasta su análisis. Inmediatamente después de obtener la sangre se hizo la disección del hígado el cual se lavó

con solución fisiológica (NaCl 0.9 %) fría para eliminar el resto de sangre. A continuación se tomó un fragmento y se congeló en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

Extracción de RNA total

Se extrajo el RNA total a partir de las muestras de hígado almacenadas de los diferentes grupos de animales usando el método de extracción fenólica con TRIzol (Reagent Invitrogen™ Life Technologies) de Chomczynsky. Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para lisis de las células, la cual separa a las muestras en dos fases (acuosa donde se solubiliza el RNA y una orgánica). Seguida de la extracción y precipitación de RNA total con cloroformo e isopropanol respectivamente a partir de la fase acuosa. El RNA total se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Biophotometer Eppendorf) con lámpara UV. A partir de los valores de absorbancia de los RNAs, 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 $1\text{DO}_{260}=40 \mu\text{g}$ 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 DO_{260} son las óptimas.

Para determinar la integridad del RNA total, se sometió 1 μg de muestra del mismo a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Síntesis de cDNA

Para la cuantificación relativa de los transcritos de los genes en estudio primero se sintetizó el cDNA a partir del RNA total. Para esta reacción se tomaron 2 μg

del RNA total que se pre-incubó con iniciadores random y dNTPs (100 mM) a 65°C durante 5 min, a continuación el producto se incubó a 37°C durante 2 min. en un amortiguador de reacción (250 mM de Tris-HCl, 375 mM de KCl y 15 mM MgCl₂) y DTT (0.1 M). Posteriormente la cadena de cDNA se sintetizó mediante la enzima transcriptasa reversa MMLV en agua desionizada con dietilpirocarbonato (DEPC) libre de RNAsas hasta completar un volumen final de 20 µL. Esta síntesis se llevó a cabo primeramente a 25 °C durante 10 min, seguido de una incubación a 37 °C por 50 min, y por ultimo a 70 °C por 50 min.

Antes de cuantificar el transcrito de los genes en estudio, se verificó la correcta síntesis del cDNA mediante PCR de punto final amplificando una región del gen de la β-actina. Para esto se tomaron 2 µL del cDNA y se incubaron con 2.5 µL de los iniciadores sentido y antisentido de β-actina (20 µM), 1.0 µL de dNTPs (10 mM), 2.5 µL de amortiguador de reacción, 0.75 µL de MgCl₂ (50 mM) y 16.25 µL de agua desionizada DEPC libre de RNAsas. A esta mezcla se le agregaron 0.2 µL de Taq polimerasa (5 U/µL). La síntesis se realizó de la siguiente manera; una pre-incubación de un ciclo a 95 °C por 5 minutos seguida de una segunda incubación a 58 °C durante 1 min y 72 °C por 30 segundos. Después la amplificación se realizó durante 33 ciclos de 95 °C por 1 min, 58 °C por 1 min y 72 °C por 30 seg. Finalmente se completó un ciclo de 95 °C por 1 min, 58 °C por 1 min, 72 °C por 7 min.

Cuantificación relativa del RNAm

Los niveles relativos del RNAm se determinaron mediante PCR en tiempo real usando el cDNA sintetizado. Se utilizaron diluciones 1:10 del cDNA de las cuales se tomaron 5 µL para realizar una amplificación en un volumen total de 20 µL. La reacción se llevó a cabo con 40 pmol de cada primer y 4 µL LightCycler Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green (Roche, Indianapolis, IN), la cual fue detectada por medio de Light Cycler 3.5 detection System (Roche). Para cada reacción la polimerasa fue activada por una pre-incubación a 95 °C durante 10 min, una amplificación realizada por 35 ciclos de 95 °C por 10 sec y

60 °C por 7 sec. Las cantidades relativas de RNAm se calcularon por medio del método comparativo de umbral cíclico (método cíclico; LightCycler software 4.0 versión, de Roche). Todos los resultados se normalizaron comparándolos con la abundancia de RNAm de β -actina.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones génicas por PCR en tiempo real.

Nombre del gen	Sentido	Antisentido
Δ 5D	GCC TTG CTG CCT CTC TAC TT	CGT CAC CCA CAC AAA CCA
Δ 6D	GCC TTT GTC CTT GCT ACC TC	TTG TGG AAG ATG TTG GGC T
Elovl-2	GGA AGA AAT ACC TCA CGC AG	TGG CTT TTT TCG GTA TGT C
Elovl-5	CTC ACC CTG CTG TCT CTC TA	ATC TGG TGG TTG TTC TTA CG
Δ 9D	GCA AGA AGA AAC GCA GAT AC	TAT GCC AGA TTT TCA ACT TCA A
Elovl-1	ACC CCA TCA TCA TCC ACC TC	GCT CCA TTT TGC TGA ACT GC
Elovl-6	AGA TGC TGA TGG GCT GTG TC	TGA GTG AGG ACC AGA AGA TG
β -actina	TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG	TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG

Cuantificación de insulina y glucosa.

La insulina se cuantificó utilizando un estuche comercial (Linco Research, Inc.), el cual se basa en el método de radioinmunoanálisis (RIA), que consiste en la utilización de 125 I-insulina que compete con la insulina de la muestra por el anticuerpo anti-insulina de rata que se agrega en la mezcla de reacción (Human Insulin RIA kit de Linco Research). Las concentraciones se reportaron en ng/ml. Para confirmar que la elevación de la insulina se debe a una respuesta fisiológica a la alimentación, se cuantificó la glucosa en los tiempos

de post-alimentación antes mencionados.

La glucosa se cuantificó mediante el método de glucosa oxidasa. En éste la glucosa es oxidada por la glucosa oxidasa en solución acuosa a ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual reacciona en presencia de la peroxidasa con el fenol y la 4-aminoantipirina, para formar una solución de color rojo. La intensidad del color (medido entre 460 y 560 nm de absorbancia) que se desarrolla es proporcional a la concentración de la glucosa (Glucosa, Trinder GOD-POD de SPINREACT). En cada una de las mediciones de insulina y glucosa se incluyeron controles de calidad comerciales.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Minitab (Minitab 14, State Collage, PA). Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar a menos que se indique lo contrario. Las diferencias en la expresión génica de las desaturasa y elongasas por efecto de la concentración de insulina y de la concentración de lípidos de la dieta se analizaron mediante análisis de varianza de una vía.

Aspectos éticos

La investigación propuesta fue evaluada y aprobada por el Comité Local de Investigación y está de acuerdo con las normas éticas, los reglamentos institucionales y con las normas propuestas por la ley General de Salud. El manejo y sacrificio de los animales está de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. La cual establece lo siguiente:

1. Identificación y registro.

Se colocan tarjetas en las jaulas o cajas y los datos que en ella figuran corresponden a la identificación que llevan los animales que contienen. Además, es necesario asentar los datos sobre la procedencia, método de reproducción y el responsable del proyecto de investigación.

2. Alimentación. El alimento para todas las especies de laboratorio debe cumplir con las siguientes características:

- a). Libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes.
- b). Debe estar dentro de su periodo de caducidad.
- c). Almacenado en bodegas o cuartos desinfectados, secos y ventilados, sobre tarimas o en contenedores.

3. Técnicas experimentales

a). Analgesia y anestesia.

Cualquier procedimiento que cause mayor dolor o molestia en los animales, que la producida por inyección o marcaje en orejas, requerirá el uso de tranquilizantes, analgésicos o anestésicos. Si es necesario efectuar un procedimiento doloroso sin el uso de anestesia, analgésico o tranquilizante, éste debe ser aprobado por el Comité.

El animal debe de ser manejado siempre con cuidado pero con firmeza, procurando la seguridad del personal que lo manipula. Se debe evitar la lucha y el estrés en todo momento, ya que la excitación prolongada puede alterar la circulación y el estado metabólico e inducir un estado de choque.

b). Administración de fluidos y sustancias.

La administración parenteral de fluidos y sustancias deberá hacerse conforme a las prácticas clínicas y científicas generalmente aceptadas en el animal sujeto o inmóvil. Si la técnica causa estrés o dolor, se usarán sedantes, analgésicos o anestésicos, a menos que esté contraindicado en el protocolo experimental, en cuyo caso deberá contar con la aprobación del Comité.

RESULTADOS

Peso corporal

Los resultados que se presentan en la Figura 5 muestran el peso corporal de las ratas durante el periodo de adaptación y del consumo de alimento en horario restringido alimentadas con una dieta normal o alta en lípidos. Estos resultados muestran que el peso corporal del grupo DNL aumentó progresivamente durante los primeros días de adaptación a la dieta, desde 125.89 ± 12.46 g en el primer día de adaptación hasta 188.05 ± 9.49 g al día 11. Respecto al grupo DAL, el peso de las ratas aumentó progresivamente desde 125.49 ± 11.49 g hasta 189.79 ± 12.93 g a los días 1 y 11 del periodo de adaptación a la dieta respectivamente. No se observan diferencias significativas en el peso corporal entre los grupos experimentales. En el día 12, que corresponde al primer día del consumo de alimento en horario restringido, se observó una disminución en el peso corporal en ambos grupos experimentales hasta alcanzar los valores de 171.07 ± 13.25 g y 172.14 ± 13.96 g para el grupo DNL y DAL respectivamente. Posteriormente a esta disminución, se observó que el peso corporal de los animales se recuperó progresivamente hasta el valor de 227.16 ± 20.46 g y 229.14 ± 21.49 g para el grupo DNL y DAL respectivamente.

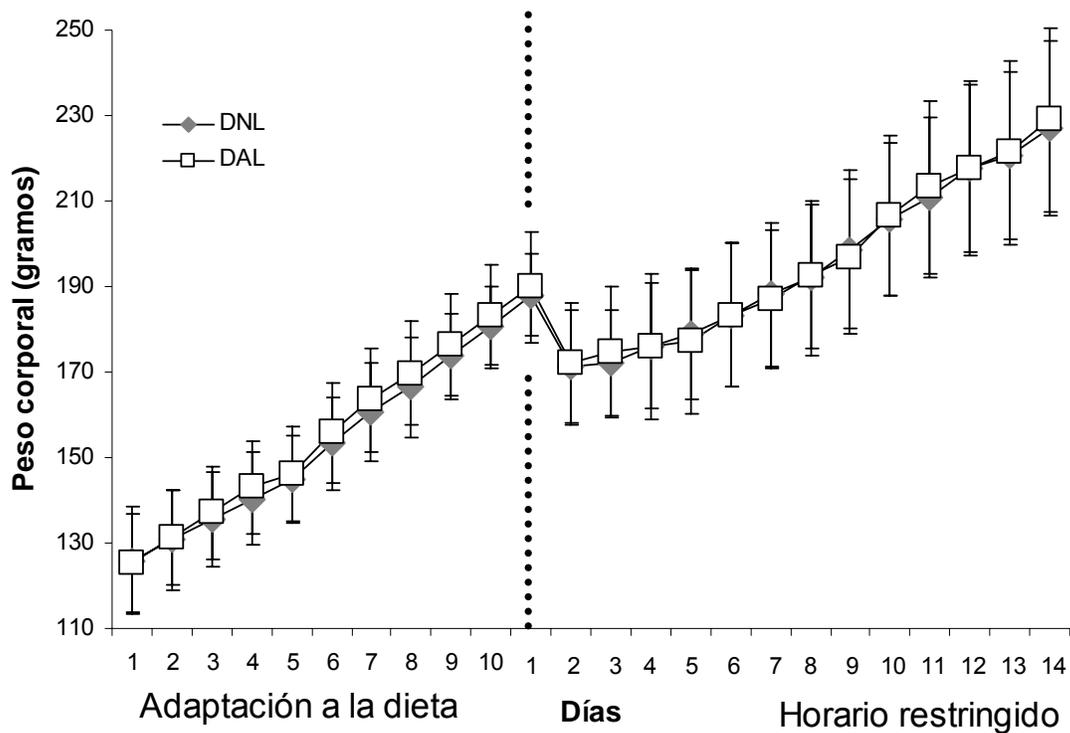


Figura 5. Peso corporal de las ratas alimentadas con una dieta normal (DNL) y alta en lípidos (DAL). Los valores están representados como promedio \pm DE (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz respectivamente.

Consumo de alimento

En la Figura 6 se muestra el consumo de alimento de las ratas alimentadas con una dieta normal o alta en lípidos. El consumo fue similar durante el periodo de adaptación ya que el primer día las ratas consumieron en promedio 15.50 ± 1.80 g y 15.43 ± 1.94 g para el grupo DNL y DAL respectivamente. Un día previo al consumo de alimento con horario restringido éste tuvo valores de 17.59 ± 1.68 g para el grupo DNL y 17.79 ± 2.05 g para el grupo DAL. Sin embargo, en el primer día del horario restringido se observó una disminución importante en donde el consumo fue de 1.1 ± 0.92 g y 1.58 ± 2.04 g para el

grupo DNL y DAL respectivamente. Posteriormente el consumo aumentó progresivamente hasta alcanzar valores máximos de 20.89 ± 3.26 g para el grupo DNL y de 21.5 ± 3.26 g para el grupo DAL al día 13 del periodo de adaptación al alimento con horario restringido.

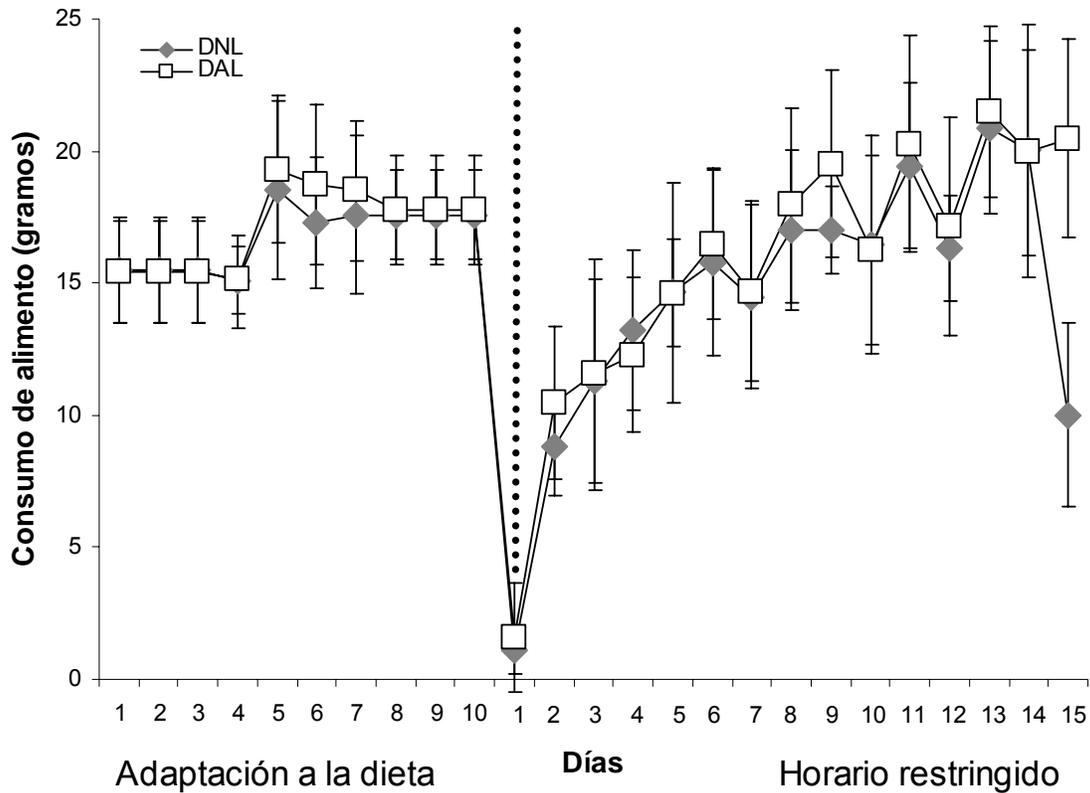


Figura 6. Consumo de alimento de las ratas alimentadas con una dieta normal en lípidos (DNL) y una dieta alta en lípidos (DAL). Los valores están representados como promedio \pm DE (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz respectivamente.

Insulina sérica

La concentración de insulina en ayuno en los grupos experimentales DNL y DAL fue de 0.83 ± 0.09 ng/mL y 0.97 ± 0.02 ng/mL respectivamente. Esta concentración aumentó dentro de los primeros 30 minutos posteriores al consumo de alimento alcanzando un valor de 5.99 ± 0.76 ng/mL para el grupo DNL y 5.14 ± 0.12 ng/mL para el grupo DAL. Estos valores se mantuvieron sin cambios significativos durante el intervalo de tiempo 60, 90 y 120 minutos. Por su parte, los niveles de insulina en el grupo DAL permanecieron constantes a lo largo de los 120 minutos posteriores al consumo de alimento, los valores fluctuaron entre 5.85 ± 0.08 ng/mL a los 60 minutos y 5.31 ± 0.11 ng/mL a los 90.

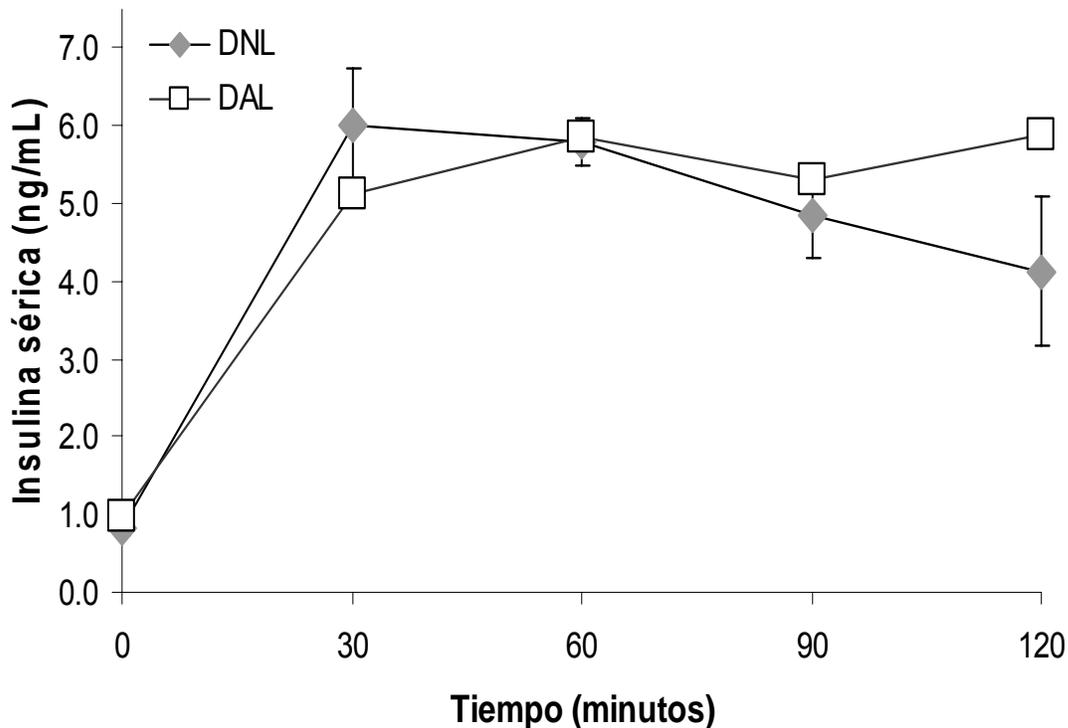


Figura 7. Insulina sérica secretada en respuesta al consumo de alimento en ratas machos alimentados con una dieta normal o alta en lípidos. DNL = Dieta

normal en lípidos; DAL = Dieta alta en lípidos. Los valores están representados como promedio \pm DE (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz respectivamente.

Glucosa sérica

La concentración de glucosa en ayuno fue de 163.77 ± 2.88 mg/dL y 173.04 ± 2.06 mg/dL para el grupo de ratas DNL y DAL respectivamente. En ambos grupos experimentales se observó un aumento en la concentración de glucosa. En el grupo DNL el aumento se presentó a los 30 minutos y en el grupo DAL este incremento fue a los 60 minutos posteriores a la ingesta del alimento hasta alcanzar valores máximos de glucosa a los 90 minutos de 202.12 ± 5.90 mg/dL y de 176.82 ± 1.28 mg/dL para los grupos DNL y DAL respectivamente. Interesantemente en el grupo DNL observamos una disminución en la concentración de glucosa a niveles de 170.58 ± 3.9 mg/dL a los 120 minutos, efecto que no se observó en el grupo DAL que continuó con una concentración de 175.58 ± 2.75 mg/dL.

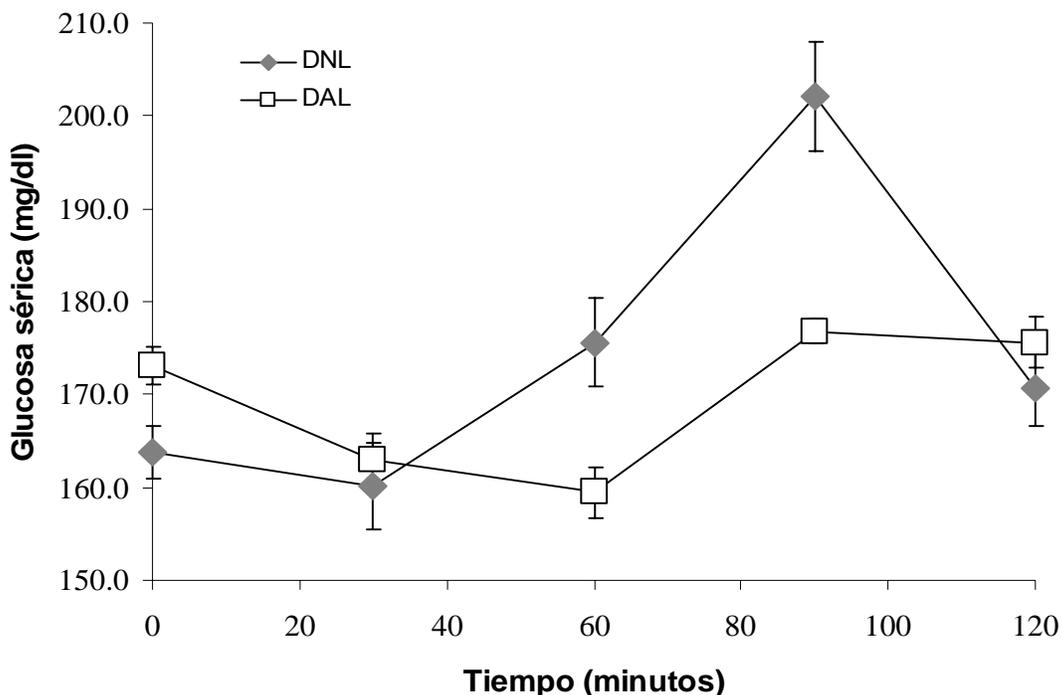


Figura 8. Glucosa sérica después del consumo de alimento en ratas machos alimentados con una dieta normal o alta en lípidos. DNL = Dieta normal en lípidos y DAL = Dieta alta en lípidos. Los valores están representados como promedio \pm DE (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz respectivamente.

Efecto de la insulina posprandial sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan LC-PUFAs en el grupo DNL

En el hígado de ratas alimentadas con una dieta normal en lípidos, la expresión de la $\Delta 5D$ disminuyó significativamente alrededor de un 40, 57, y 54 % a los 60, 90 y 120 minutos respectivamente después del consumo de alimento (T0). Al igual que la $\Delta 5D$ la expresión de la Elovl-5 mostró una disminución significativa del 69 % a los 90 minutos después del consumo de alimento con respecto al ayuno. Sin embargo, la expresión de la $\Delta 6D$ mostró un aumento significativo del 190 % únicamente 30 minutos después del consumo de alimento en comparación con el ayuno o T0. No obstante, la cantidad del transcrito de la elongasa Elovl-2 no cambió durante las dos primeras horas posteriores a la alimentación (Figura 9).

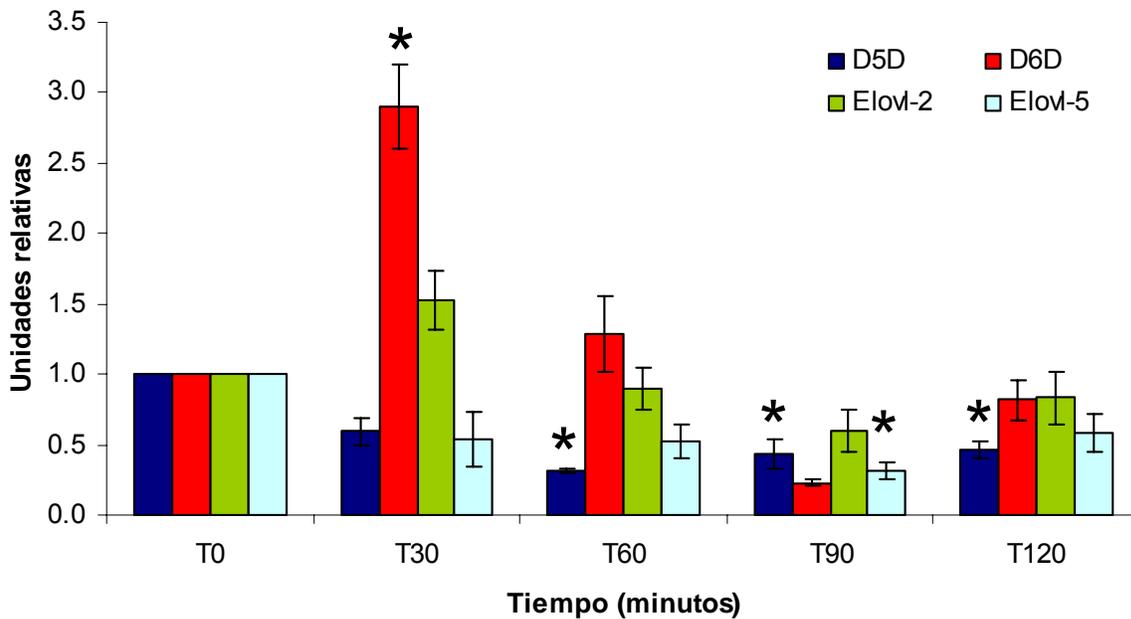


Figura 9. Expresión génica del RNAm de las enzimas que sintetizan LC-PUFAs a los 30, 60, 90 y 120 minutos después del consumo de alimento en el hígado de ratas alimentadas con una dieta normal en lípidos. Los valores están representados como promedios \pm ES (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

Efecto de la insulina posprandial sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan LC-PUFAs en el grupo DAL

En el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en lípidos los resultados muestran que la expresión de la $\Delta 5D$ no presentó cambios significativos durante las dos primeras horas posteriores a la alimentación. Sin embargo, se observaron cambios en la expresión de la $\Delta 6D$, ya que ésta disminuyó significativamente alrededor de un 49, 69 y 51 % a los 60, 90 y 120 minutos respectivamente después del consumo de alimento en comparación con el grupo T0. Por lo contrario la cantidad del transcrito de la elongasa Elovl-2 mostró un aumento significativo del 144 % a los 30 minutos después del

consumo de alimento en comparación con el ayuno o T0. De manera similar los resultados muestran que la expresión de la Elovl-5 también aumentó significativo del 143 y 146 % a los 60 y 120 minutos después del consumo de alimento con respecto al tiempo de ayuno (Figura 10).

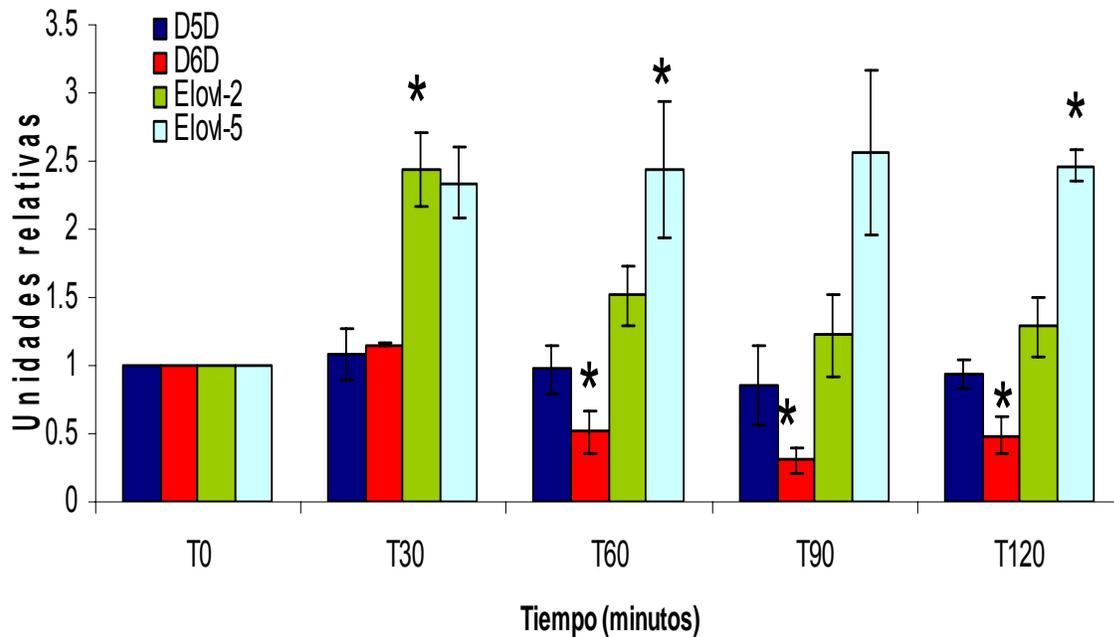


Figura 10. Expresión génica del RNAm de las enzimas que sintetizan LC-PUFAs a los 30, 60, 90 y 120 minutos después del consumo de alimento en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en lípidos. Los valores están representados como promedios \pm ES (n = 3 ratas). Las dietas contienen 100 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

Efecto de la insulina posprandial sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan MUFAs y ácidos grasos saturados en el grupo de DNL.

Los resultados de expresión de las enzimas que participan en la síntesis de MUFAs y ácidos grasos saturados muestran que la cantidad del transcrito de la $\Delta 9D$ aumentó significativamente en un 366% a los 60 minutos después del consumo de alimento en comparación con el tiempo 0 en el hígado de ratas alimentadas con una dieta normal en lípidos. Por lo contrario, la expresión de Elovl-1 y Elovl-6 no muestran cambios significativos durante las dos horas posteriores al consumo de alimento (Fig. 11).

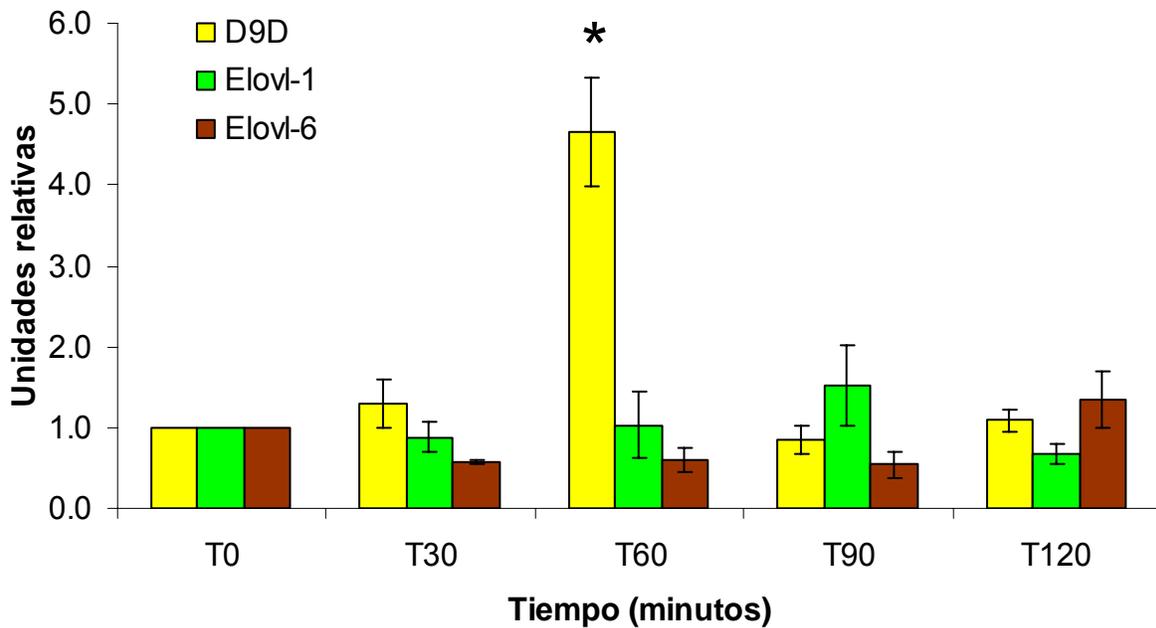


Figura 11. Expresión génica del RNAm de las enzimas que sintetizan MUFAs y ácidos grasos saturados a los 30, 60, 90 y 120 minutos después del consumo de alimento en el hígado de ratas alimentadas con una dieta normal en lípidos. Los valores están representados como \pm ES ($n = 3$ ratas). Las dietas contienen 50 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

Efecto de la insulina posprandial sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan MUFAs y ácidos grasos saturados en el grupo de DAL.

Los resultados de expresión en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en lípidos muestran que la cantidad del transcrito de la $\Delta 9D$ se mantuvo subexpresada durante las dos primeras horas posteriores a la alimentación. Aunque nosotros detectamos el RNAm de esta desaturasa, su expresión fue baja. Las curvas de amplificación (o crossing point = Cp) iniciaron en el ciclo 30, indicando una baja cantidad del transcrito para el gene de la $\Delta 9D$ tal y como puede observarse en la Figura 12. Respecto a las elongasas, nuestros resultados muestran que la expresión de la Elov11 esta reprimida en la etapa posprandial: la expresión presentó una disminución significativa del 53, 34, 67 y 42 % a los 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente después del consumo de alimento. Por otra parte Elov1-6 no muestra cambios significativos en ninguno de estos tiempos (Figura 13).

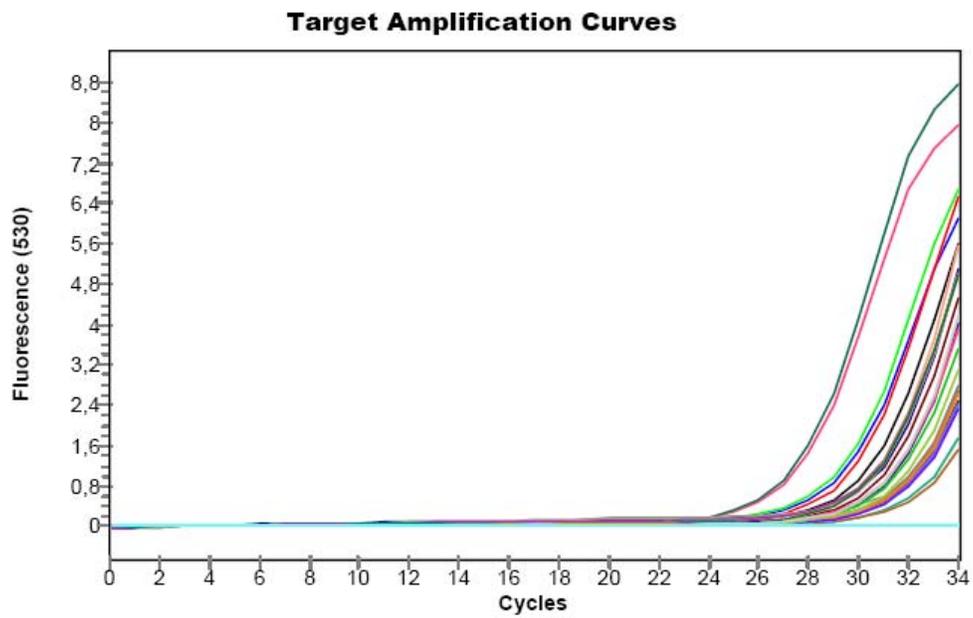


Figura 12. Curvas de amplificación del transcrito de la $\Delta 9D$ en el hígado a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después del consumo de alimento en ratas alimentadas con una dieta alta en lípidos.

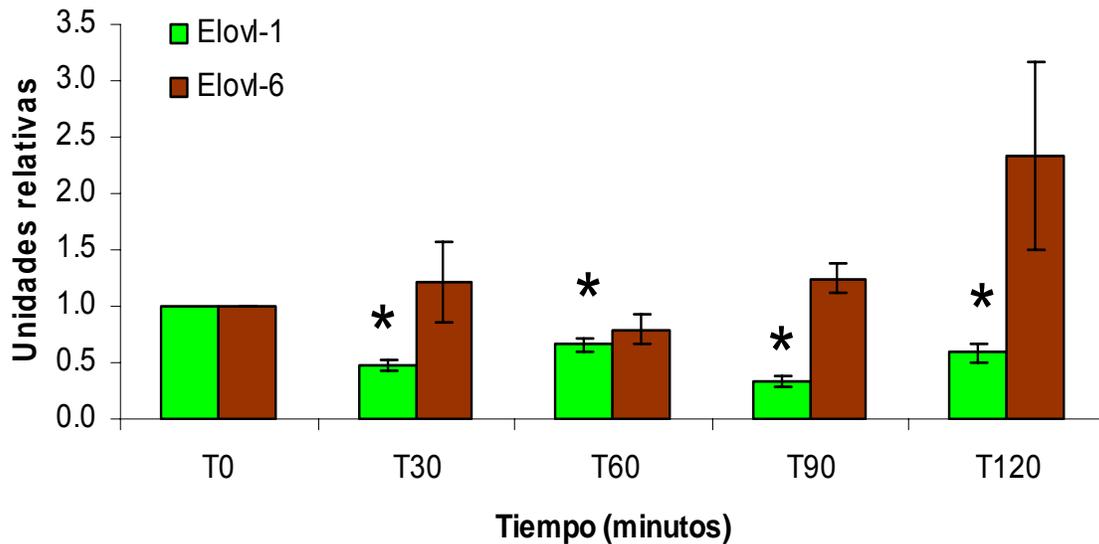


Figura 13. Expresión génica del RNAm de las enzimas que sintetizan MUFAs y ácidos grasos saturados a los 30, 60, 90 y 120 minutos después del consumo de alimento en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en lípidos. Los valores están representados como \pm ES (n = 3 ratas). Las dietas contienen 100 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

Efecto del aceite de maíz sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan LC-PUFAs

En la Figura 14 se muestra la expresión relativa del transcrito de la $\Delta 5D$ a diferentes tiempos después del consumo de alimento en el hígado de ratas alimentadas con una DNL o DAL. Los resultados indican que la cantidad del transcrito de la $\Delta 5D$ aumentó aproximadamente en un 82, 111 y 203% a los 30, 60 y 120 minutos respectivamente después del consumo de alimento en el hígado de ratas pertenecientes al grupo DAL, en comparación con el grupo DNL. Sin embargo, a los 90 minutos no se observaron diferencias significativas de expresión entre los dos grupos experimentales.

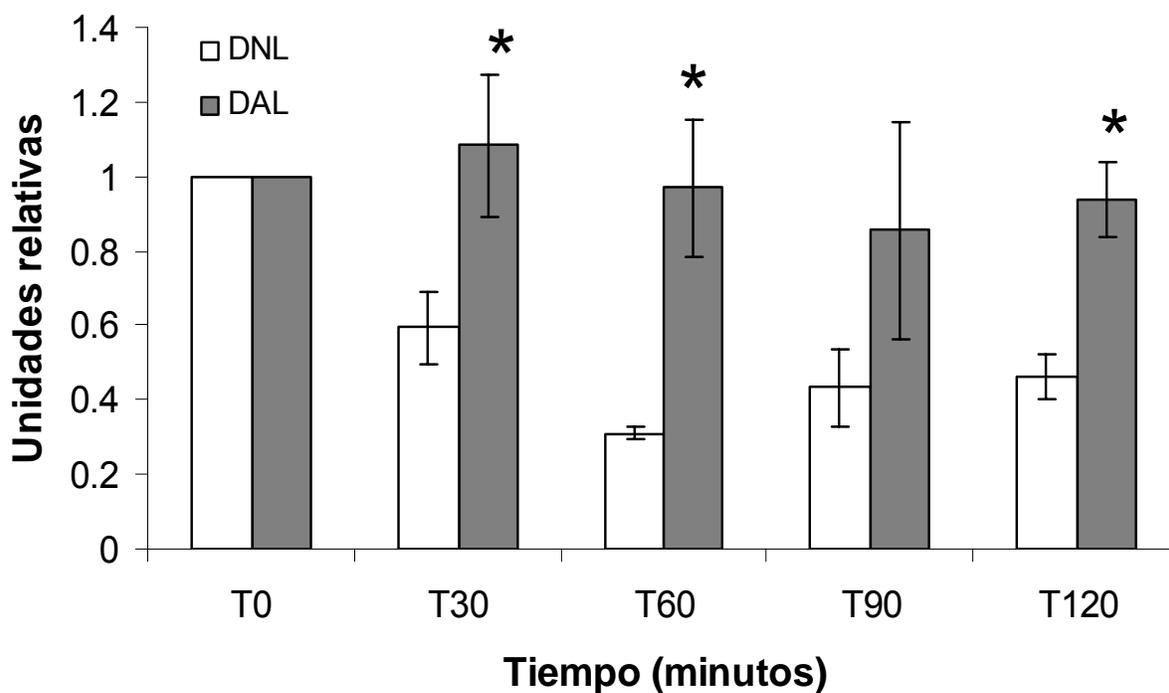


Figura 14. Expresión génica del RNAm de la $\Delta 5D$ a diferentes tiempos después del consumo de alimento en el hígado de ratas pertenecientes al grupo DAL comparada con el grupo DNL. Los valores están representados como promedio \pm ES (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta para los dos grupos experimentales DNL y DAL respectivamente. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

Respecto a la expresión de la $\Delta 6D$, en la Figura 15 se muestra que la cantidad del transcrito está disminuida en un 60 y 52 % a los 30 y 60 minutos después del consumo de alimento en el grupo DAL con respecto al grupo DNL. Sin embargo, la expresión en ambos grupos experimentales fue similar a los 90 y 120 minutos, sugiriendo que no existe efecto de los lípidos de la dieta sobre la expresión génica de la $\Delta 6D$ en las condiciones experimentales estudiadas.

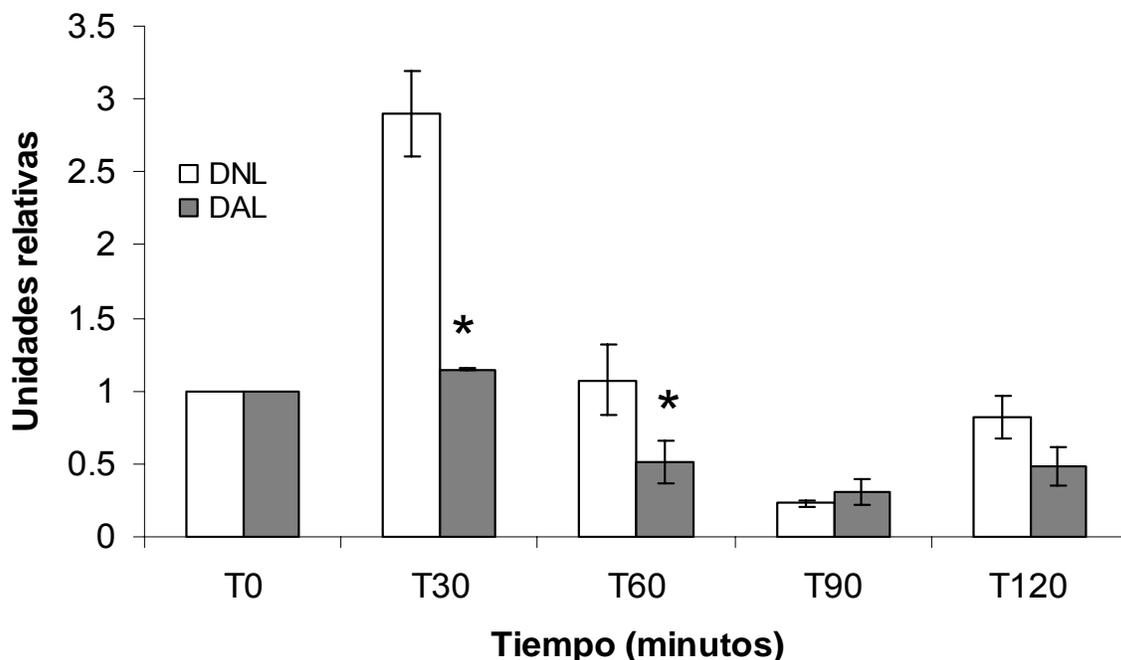


Figura 15. Expresión génica del RNAm de la $\Delta 6D$ a diferentes tiempos después del consumo de alimento en el hígado de ratas pertenecientes al grupo DAL comparada con el grupo DNL. Los valores están representados como promedio \pm ES (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta para los dos grupos experimentales DNL y DAL respectivamente. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

Referente a las elongasas que participan en la síntesis de LC-PUFAs, los resultados muestran que para el caso de la Elovl-2 se observa un aumento en la cantidad del transcrito en un 60 y 68 % a los tiempos 30 y 60 minutos respectivamente después del consumo de alimento en el hígado de los animales alimentados con una dieta alta en lípidos o grupo DAL en comparación con el grupo DNL. No obstante, a los 90 y 120 minutos no se observó ningún efecto en la expresión por los lípidos de la dieta ya que la cantidad del transcrito fue similar en ambos grupos experimentales (Figura 16).

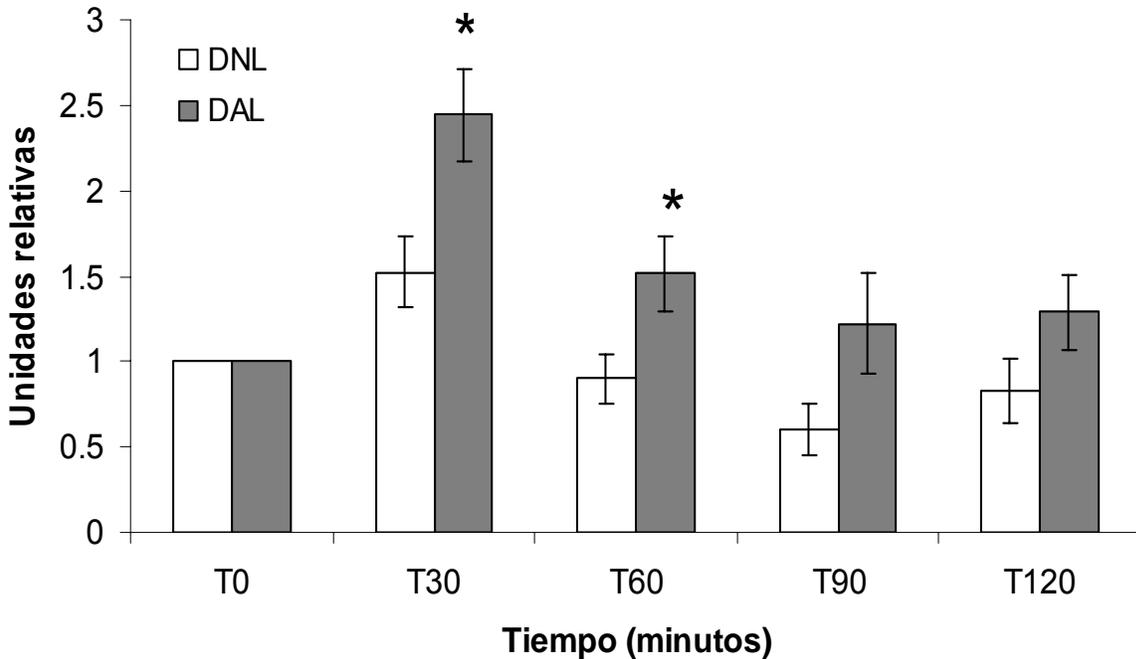


Figura 16. Expresión génica del RNAm de la Elov1-2 a diferentes tiempos después del consumo de alimento en el hígado de ratas pertenecientes al grupo DAL comparada con el grupo DNL. Los valores están representados como promedio \pm ES (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta para los dos grupos experimentales DNL y DAL respectivamente. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

Respecto a la expresión de la Elov1-5, en la Figura 17 se muestra un aumento en la cantidad del transcrito de aproximadamente 337, 366 y 323 % en los tiempos 30, 60 y 120 respectivamente después del consumo de alimento en el hígado de los animales pertenecientes al grupo DAL en comparación con el grupo de DNL.

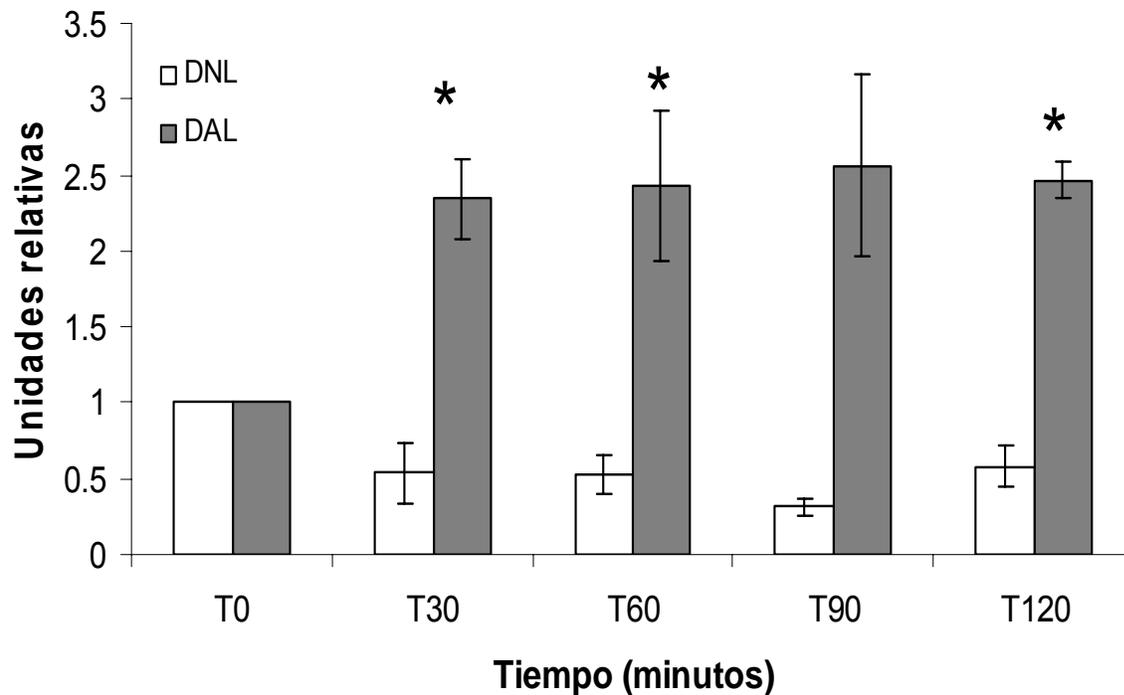


Figura 17. Expresión génica del RNAm de la Elov1-5 a diferentes tiempos después del consumo de alimento en el hígado de ratas pertenecientes al grupo DAL comparada con el grupo DNL. Los valores están representados como promedio \pm ES (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta para los dos grupos experimentales DNL y DAL respectivamente. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

Efecto del aceite de maíz sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan MUFAS y ácidos grasos saturados

La $\Delta 9D$ es una de las principales enzimas que participan en la síntesis de ácidos grasos monoinsaturados como el ácido palmitoléico y el ácido oléico. Es importante resaltar que la expresión de esta desaturasa está disminuida en el grupo de animales alimentados con una dieta alta en grasa en comparación con el control (DNL). Esta propuesta esta dada por el hecho de que la identificación del transcrito de la $\Delta 9D$ ocurrió después del ciclo 30,

demostrando que existe una concentración muy baja de este transcrito, lo cual se ilustra en la Figura 12 que representa los ciclos de amplificación por PCR.

Referente a las elongasas como la Elovl-1 que participan en la síntesis de los MUFAs y los ácidos grasos saturados, nuestros resultados sugieren que existe una tendencia a una menor expresión de este gen en el hígado de ratas del grupo DAL de 30 a 60 minutos después del consumo de alimento de alimento en comparación con el grupo DNL (Figura 18).

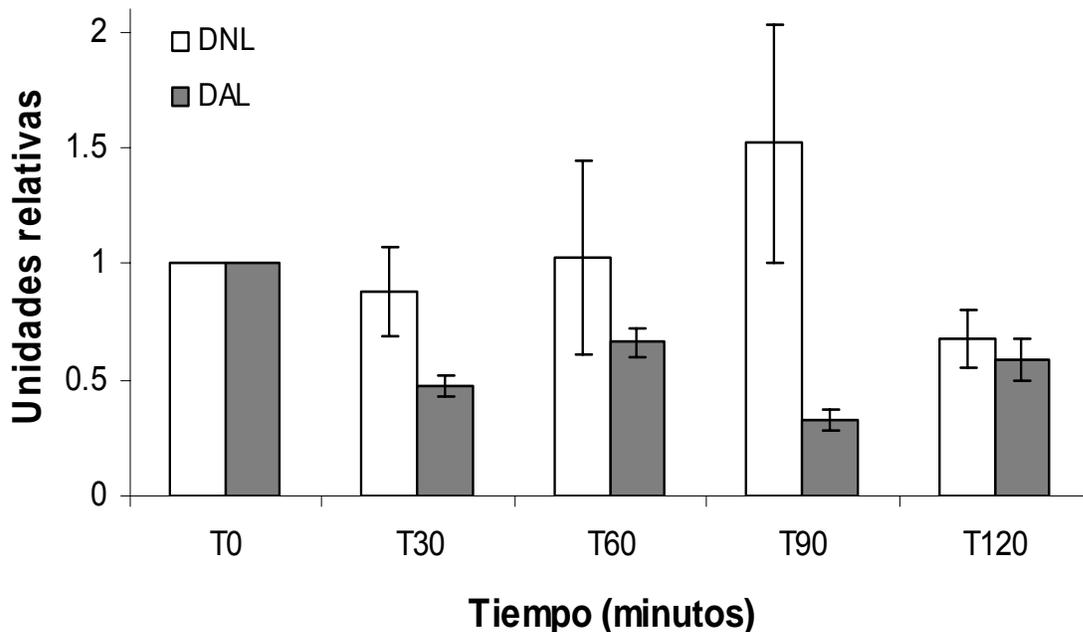


Figura 18. Expresión génica del RNAm de la Elovl-1 a diferentes tiempos después del consumo de alimento en el hígado de ratas pertenecientes al grupo DAL comparada con el grupo DNL. Los valores están representados como promedio \pm ES (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta para los dos grupos experimentales DNL y DAL respectivamente. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

De la misma manera, se observó una tendencia al aumento en la expresión de la elongasa Elovl-6 a los tiempos 90 y 120 minutos después del consumo de alimento, en comparación con el grupo control o alimentado con una dieta normal en lípidos (Figura 19).

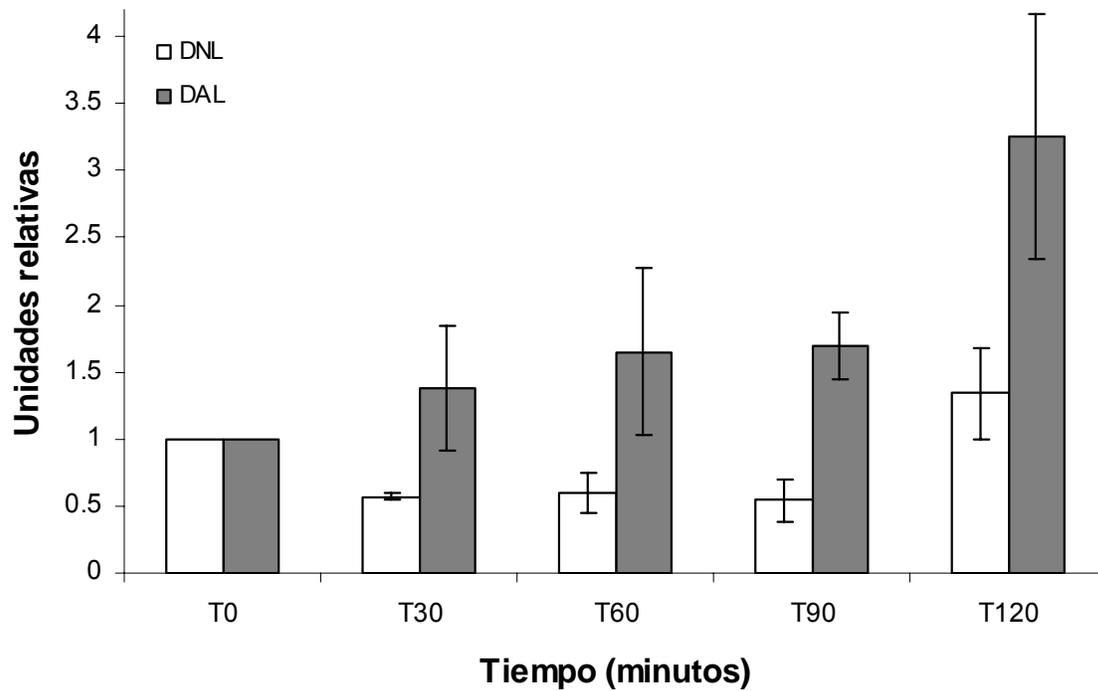


Figura 19. Expresión génica del RNAm de la Elovl-6 a diferentes tiempos después del consumo de alimento en el hígado de ratas pertenecientes al grupo DAL comparada con el grupo DNL. Los valores están representados como promedio \pm ES (n = 3 ratas). Las dietas contienen 50 y 100 g de aceite de maíz por cada Kg de dieta para los dos grupos experimentales DNL y DAL respectivamente. * = $P < 0.05$ cuando se comparó con el ayuno.

DISCUSION

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto que tiene la insulina posprandial y los lípidos de la dieta sobre la expresión génica de las enzimas que sintetizan ácidos grasos. Primeramente, en esta investigación se evaluó el peso corporal de los animales, el cual aumentó progresivamente independientemente del tipo de la dieta que consumieron. Esto demuestra que la absorción de nutrientes se realizó de manera adecuada y constante durante el desarrollo del estudio, dando como resultado el aumento en el peso corporal ya que eran animales jóvenes que se encontraban en la etapa de crecimiento (Krinke et al., 2000). Respecto al consumo de alimento en ambos grupos experimentales, éste fue similar durante el periodo de adaptación a la ingesta del mismo, sugiriendo que la dieta alta en lípidos no tiene efecto en el consumo. Sin embargo, la ingesta disminuyó en el primer día de adaptación al alimento con horario restringido. Esto se debe a que los animales ya no tienen libre acceso a la dieta y aún no están adaptados consumirla en un horario restringido. No obstante, los animales iniciaron esta adaptación, la cual se reflejó en un aumento progresivo en el consumo de alimento, tal y como se ha observado en otros estudios (Ascensio et al., 2004).

La información anterior nos permitió asegurar que los animales comieron en el horario que les establecimos, de manera que la elevación de la glucosa se debió a una respuesta al consumo de alimento, tal y como se muestra en nuestro estudio. Además, es bien sabido que la secreción de insulina es controlada totalmente por la concentración de glucosa en sangre (Guyton, 1996). Esto se observó claramente en nuestro estudio, ya que la insulina sérica aumentó después del consumo de alimento, es decir durante el periodo posprandial, indicando que la secreción de esta hormona es controlada por la concentración de glucosa en sangre. Tal y como se ha observado en el estudio de Higuchi y colaboradores, en donde encontraron una concentración mayor de insulina a los 15 minutos después de haber administrado glucosa intraperitoneal, lo cual indica una liberación de insulina dependiente de la concentración de glucosa circulante (Higuchi et al., 2008).

Diversos estudios han mostrado que la insulina regula de manera positiva la expresión de las desaturasas y de la elongasa Elovl-6 (Cho et al., 1999, Wang et al., 2005). Sin embargo, la expresión de las desaturasas también es regulada por otros factores como los lípidos de la dieta. No obstante, a pesar de que existe información acerca del efecto que tiene la insulina y los lípidos de la dieta, hasta donde sabemos no existe información que demuestre de manera conjunta el efecto de la insulina y de los lípidos de la dieta sobre la expresión de las enzimas que sintetizan a los LC-PUFAs, en condiciones fisiológicas normales cuando se secreta insulina en respuesta a la ingestión de alimento. Los resultados de este estudio muestran que la $\Delta 6D$ se sobre-expresa en el hígado de ratas alimentadas con una dieta adecuada en lípidos después del consumo de alimento. Lo cual sugiere que la insulina que se secreta en respuesta al consumo de alimento podría tener un efecto positivo sobre la expresión de esta desaturasa tal y como ya se ha demostrado en otros estudios en ratas diabéticas (Rimoldi et al., 2001). En contraste, cuando los animales fueron alimentados habitualmente con una dieta alta en lípidos y rica en PUFAs la expresión de la $\Delta 6D$ se reprimió después del consumo de alimento. Tal efecto se conservó cuando la expresión de esta desaturasa se comparó con la expresión del hígado de ratas alimentadas con una dieta adecuada en lípidos, indicando el efecto negativo de los lípidos de la dieta sobre la expresión de esta desaturasa. Es sabido que la actividad enzimática de la $\Delta 6D$ en hígado de ratas se reduce después de la suplementación con una dieta alta en lípidos (40%) y abundante en ácidos grasos poli-insaturados (Gasperíková et al., 2002). Esta reducción se debe a que los PUFAs no sólo son ligandos para PPAR sino que también son reguladores negativos de la lipogénesis hepática, la cual es mediada por la represión de SREBP-1. Se ha demostrado que los PUFAs reprimen marcadamente la forma nuclear de SREBP-1, además de reducir la expresión de genes lipogénicos tales como FAS y $\Delta 9D$ en el hígado de rata (Sekiya et al., 2003). Además, es importante enfatizar que aunque la concentración máxima de insulina se alcanzó treinta minutos después del consumo de alimento, está no fue suficiente para

bloquear el efecto inhibitorio de los PUFAs dietarios teniendo éstos un efecto predominante con respecto a la insulina en la expresión de la $\Delta 6D$ (Figura 20). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis para la $\Delta 6D$ desaturasa en donde se observa que la expresión de esta enzima en una dieta alta en lípidos es menor aún cuando se secrete insulina en respuesta a la alimentación.

Sin embargo, de manera sorprendente cuando comparamos la expresión de la desaturasa $\Delta 5D$ y de las elongasas Elov1-5 y Elov1-2 alimentadas con una dieta alta y con una dieta normal, se observa que la expresión aumentó después del consumo de alimento en el hígado de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa y rica en PUFAs (AL). Esto podría explicarse parcialmente considerando lo siguiente; el consumo de dietas ricas en PUFAs reduce inicialmente la concentración de glucosa plasmática debido a una mayor captación de glucosa y de síntesis de glicerol en el hígado (Higuchi et al., 2008). Esto se debe a que la sustitución de LC-PUFAs en la dieta alta en grasa conduce a mejorar la acción de la insulina *in vivo* (Simončíkova et al., 2002), de manera que podría tener un mayor efecto positivo sobre la expresión de la $\Delta 5D$, Elov15 y Elov12 que sobre la $\Delta 6D$. Por otra parte, es sabido que los PUFAs suprimen la expresión de SREBP-1c, $\Delta 5D$ y Elov15, pero hay reportes de que estos ácidos grasos podrían combinarse con el ligando que estimula al receptor X del hígado (LXR por sus siglas en inglés Liver X Receptor), y de esta manera se podría incrementar los niveles de expresión del RNAm y la forma nuclear de SREBP1-c, Elov15 y probablemente de la $\Delta 5D$ (Qin et al., 2009). Es posible que algunos ligandos (colesterol, oxisteroles) presentes en el hígado sean activados por los PUFAs de la dieta.

Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones al respecto para determinar el mecanismo que conlleva al aumento en la expresión de la $\Delta 5D$ y las elongasa Elov1-5. Es importante enfatizar que respecto a la Elov12, sólo existe un reporte acerca de su regulación en el que se sugiere que la expresión de esta elongasa probablemente no es regulada por la insulina (Wang et al., 2005). Este hallazgo es apoyado por nuestros resultados ya que no se observó ningún cambio en la expresión de esta elongasa cuando los animales se alimentaron con una dieta adecuada en lípidos, con la que la

concentración máxima de insulina sérica se alcanzó 30 min. después del consumo de alimento. Respecto a la Elovl5, es importante resaltar que a nuestro conocimiento sólo existe un reporte acerca del efecto negativo que tienen los PUFAs sobre la expresión de la Elovl5 (Wang et al., 2005). Sin embargo este estudio se realizó en una línea celular en donde no se controló la concentración de insulina y por lo consiguiente no se determinó si ésta tenía un efecto sobre la expresión de la Elovl5. No obstante, debido a que, al igual que para la $\Delta 5D$, la expresión de las elongasas Elovl2 y Elovl5 también aumentó durante las dos primeras horas post-alimentación cuando las ratas fueron alimentadas con una dieta alta en lípidos, lo que sugiere que tanto Elovl-2 como Elovl-5 tienen un mecanismo de regulación similar al de la desaturasa $\Delta 5D$. También es importante enfatizar que el paso de la $\Delta 5D$ desaturación es más afectado que el paso de la $\Delta 6D$ desaturación después de diferentes tratamientos como la presencia de estatinas y oxisteroles en diferentes tipos celulares (Rise et al., 2007), lo cual conduciría a una respuesta diferente de la $\Delta 5D$ en ciertas condiciones fisiológicas como lo es el estado posprandial. Estos resultados sugieren que la regulación de la $\Delta 6D$ y de la $\Delta 5D$ así como de las elongasas (Elovl2 y 5) es diferente bajo condiciones específicas en el organismo. Es la primera ocasión en que se observa el efecto positivo por los lípidos de la dieta sobre la expresión génica de estas enzimas $\Delta 5D$, Elovl-2 y Elovl-5 en estado posprandial y por lo tanto la hipótesis propuesta en este proyecto de un efecto negativo por los lípidos sobre la expresión de estas enzimas aun cuando se secreta insulina en respuesta a la alimentación no se comprueba. No obstante tenemos que aclarar que los resultados de los estudios no especificaban condiciones después de la alimentación, por lo que se puede proponer que en el estado posprandial podrían estar actuando otros factores aun desconocidos en la expresión de estas enzimas y por lo tanto el estado posprandial podría afectar de manera positiva la expresión de la $\Delta 5D$, Elovl-2 y Elovl5.

Se ha demostrado que la insulina también tiene un efecto positivo sobre las enzimas que sintetizan ácidos grasos saturados. Estudios realizados en hepatocitos primarios tratados con insulina han propuesto que el transcrito de

la $\Delta 9D$ desaturasa presenta una inducción mayor a tres veces con respecto al control sin insulina (Wang et al., 2006). De manera similar, en nuestro estudio se demostró que el aumento en la concentración fisiológica de la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento está asociado a una mayor expresión de la $\Delta 9D$ en el hígado de ratas alimentadas con una dieta adecuada en lípidos. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la insulina no tiene el mismo efecto positivo cuando los animales fueron alimentados con una dieta alta en lípidos, por el contrario la expresión de la $\Delta 9D$ disminuyó, sugiriendo que el efecto negativo de los PUFAs dietarios no es inhibido por la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento. Esto sugiere que los lípidos de la dieta tienen un mayor efecto sobre la expresión génica de la $\Delta 9D$ desaturasa que en respuesta a la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento, verificando nuestra hipótesis (Figura 20). Diversos estudios han indicado claramente el efecto negativo que tienen los lípidos de la dieta sobre la expresión génica, principalmente sobre aquellos genes clave que participan en la lipogénesis de ácidos grasos saturados. Tal es el caso de la $\Delta 9D$, que presenta una disminución en su expresión en el hígado de animales alimentados con una dieta alta en lípidos en comparación con una dieta adecuada en los mismos (Ntambi, 1999).

Respecto a las elongasas Elovl-1 y Elovl-6, que también participan en la síntesis de ácidos grasos saturados, se ha reportado que existe una inducción de su transcrito dada por la insulina de aproximadamente de 1.5 veces con respecto al control (Wang et al., 2006). Sin embargo, nosotros no detectamos cambios en la expresión del transcrito de la elongasa Elovl-6 asociados al incremento de la insulina posprandial aun cuando los animales se alimentaron con una dieta alta en lípidos. Previamente Wang y col., proponen que la insulina tiene un efecto positivo sobre la expresión de esta elongasa (Wang et al., 2006). El hecho de no observar cambios en la expresión en nuestro modelo de estudio podría deberse a que probablemente la cantidad de insulina secretada en respuesta al consumo de alimento no es suficiente para producir un efecto sobre la expresión de la Elovl-6. Además, de manera similar

a lo reportado para la Elovl-1 nosotros no detectamos cambios en la expresión de esta elongasa, cuando las ratas fueron alimentadas con una dieta normal en lípidos. Sin embargo, interesantemente, nuestros resultados sugieren que la dieta alta en lípidos y rica en PUFAs tiene un efecto negativo sobre la expresión de la Elovl-1 comparado con el ayuno, ya que se observó una subexpresión durante las dos horas posprandiales. Es importante resaltar que hasta donde sabemos no existe información que demuestre el efecto que los PUFAs tienen sobre la expresión de las elongasas Elovl-1 y 6. En este estudio estamos reportando por primera vez que los PUFAs tienen un efecto regulador negativo sobre la expresión de la Elovl-1 aún cuando se secrete insulina en respuesta a la alimentación, resultado que apoya la hipótesis de esta investigación (Figura 20).

Los resultados obtenidos son verdaderamente interesantes. Sin embargo, es necesario realizar más investigaciones que explore los mecanismos que regulan la expresión de las elongasas dada por los lípidos de la dieta.

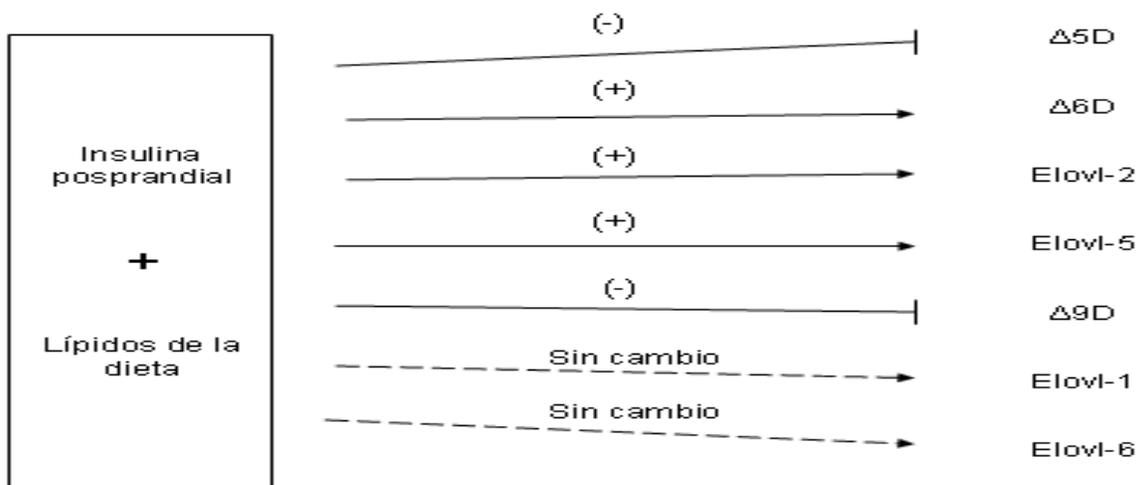


Figura 20. Efecto de la insulina posprandial y de los lípidos de la dieta sobre la expresión del RNAm de las enzimas que sintetizan ácidos grasos.

CONCLUSIONES

1. Nuestros resultados demuestran que los PUFAs dietarios tienen un mayor efecto que la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento en la regulación de la expresión de la $\Delta 6D$ en el hígado rata.
2. Se observó un efecto positivo de los lípidos de la dieta en la expresión de la $\Delta 5D$ y de las elongasas Elovl-2 y Elovl-5.
3. La expresión de la $\Delta 9D$ en el hígado de ratas incrementó a los 30 minutos, tiempo en que se secretó la mayor cantidad de insulina en respuesta al consumo de alimento. Dicha expresión se reprimió cuando los animales se alimentaron con una dieta alta en lípidos.
4. La expresión de la Elovl-6 no se afectó por la insulina posprandial ni por los lípidos de la dieta.
5. La cantidad del transcrito de la Elovl-1 no mostró cambios asociados a la cantidad de insulina secretada en respuesta al consumo de alimento; sin embargo, disminuyó por efecto de los lípidos dieta con respecto al ayuno.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos de esa investigación muestran el efecto de los lípidos de la dieta y de la insulina secretada en respuesta al consumo de alimento. Los hallazgos sugieren que la expresión génica del RNAm de la desaturasa $\Delta 5D$, y de las elongasas Elovl-1, Elovl-2 y Elovl-5 podría ser regulada mediante diferentes mecanismos a los que controlan a la D6D y que han sido ampliamente propuestos en la literatura. Mecanismos que en un futuro pueden ser estudiados y así conocer los factores que regulan las enzimas que sintetizan ácidos grasos en el estado posprandial. Esta información nos permitiría manipular a través de la dieta la síntesis de ácidos grasos cuya participación en las diversas funciones celulares es primordial.

Abreviaturas

MUFAs.....	Ácidos grasos mono-insaturados
PUFAs.....	Ácidos grasos poli-insaturados
LC-PUFAs.....	Ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga
AGSCL.....	Ácidos grasos saturados de cadena larga
AA.....	Ácido araquidónico
EPA.....	Ácido eicosapentaenoico
DHA.....	Ácido docosahexaenoico
ETA.....	Ácido eicotrienoico
Elovl-1, 2, 5, 6.....	Elongasa de ácidos grasos de cadena larga 1, 2, 5, 6
$\Delta 5, \Delta 6, \Delta 9D$	Delta 5, 6, 9 desaturasas
AL.....	Ácido linoléico
ALN.....	Ácido linolénico
NADH.....	Dinucleótido de nicotiamida y adenina reducido
NADPH.....	Dinucleótido de nicotiamida y adenina fosfato reducido
Acil CoA.....	Acetil coenzima A
FAS.....	Síntasa de ácidos grasos
ACC.....	Acetil coenzima A carboxilasa
AMPc.....	Adenosina 3'5'-monofosfato
SREBP.....	Proteína de unión a elementos regulatorios de esteroides
SER.....	Elemento de respuesta para SREBP
PPAR.....	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PPER.....	Elemento de respuesta para PPAR
RXR.....	Receptor nuclear para el ácido retinoico
KCl.....	Cloruro de potasio
NaCl.....	Cloruro de sodio
MgCl.....	Cloruro de magnesio
dNTP.....	Dinucleótido trifosfato
DTT.....	Ditiotreitol
DEPC.....	Dietilpirocarbonato
RIA.....	Radioinmunoanálisis
PCR.....	Reacción en cadena de la polimerasa

REFERENCIAS

Akoh C., Min D., Foods Lipids Chemistry, Nutrition, and Biothecnology, Segunda Edición, Ed. Marcel Dekker, New York, 2002, pp. 20-26.

Ascencio, C., Torres, N., Isoard-Acosta, F., Gómez-Pérez, F., Hernández-Pando, R., Tovar, A., Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J. Nutr.* 2004;134:522-529.

Brenner R., Hormonal modulation of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases: case of diabetes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2003;68:151-162.

Calder P., Dietary fatty acids and the immune system. *Nutr. Rev.* 1998;56:70-S83.

Chapkin R., Reappraisal of the essential fatty acids In: *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications* (C. K. Chow, ed.), Ed. Marcel Dekker, New York, 1992, pp. 429–436.

Cho. H., Nakamura M., Clarke S., Cloning, expression and fatty acid regulation of the human Δ -5 desaturase. *J. Biol. Chem.* 1999;274:37335-37339.

Cho, H., Nakamura M., Clarke S., Cloning, expression and nutrition of mammalian Δ -6 desaturase. *J. Biol. Chem.* 1999;274: 471-477.

Gasperíková D, Demčáková E, Ukropec J, Klimes I, Seböková, Insulin resistance in the hereditary hypertriglyceridemic rat is associated with an impairment of delta-6 desaturase expression in liver, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002;967:446-53.

Gurr, M., Harwood, J., Frayn, K., *Lipid Biochemistry: An Introduction*, 5th ed, Blackwell, Oxford, UK. 2002 pp 135-137.

Guyton, A., Hall, J., *Textbook of Medical Physiology*, 9th Edition, Saunders Co. 1996, pp 971-977.

Higuchi, T., Shirai, N., Saito, M., Suzuki, H., Kagawa, Y., Levels of plasma insulin, leptin and adiponectin, and activities of key enzymes in carbohydrate metabolism in skeletal muscle and liver in fasted ICR mice fed dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Biochem.* 2008;19:577–586.

Horton, J., Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis, *Biochem. Soc. Trans.* 2002;30:1094-1095.

Igal R, Mandon E, Gómez D. Abnormal metabolism of polyunsaturated fatty acids in adrenal gland of diabetic rats. *Mol. Cel. Endocrin.* 1991;77:217-227.

Inagaki K, Aki T, Fukuda Y, Kawamoto S, Shigena S, Ono K, Suzuki O, Identification and expression of a rat fatty acid elongase involved in the biosynthesis of C18 fatty acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2002;66:613-21.

Jakobsson, A., Westerberg, R., Jacobsson, A., Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lip. Res.* 2006;45: 237–249.

Kim, H., 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.

Krinke Georg. J. *The laboratory rat*, Ed. Academic Press Switzerland, Escocia, 2000, pp 57-66.

Leonard, A., Bobik, E., Dorado, J., Kroeger, P., Chuang, L., Thurmond, J., Parker-Barnes, J., Das, T., Huang, Y., Mukerji P., Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J. Biochem.* 2000;350;765-70.

Leonard, A., Kelder, B., Bobik, E., Chuang, L., Lewis, C., Kopchick, J., Mukerji P., Huang, Y., Identification and expression of mammalian long-chain PUFA elongation enzymes. *Lipids.* 2002;37:733–740.

Leonard, A., Pereira, S., Sprecher, H., Huang, Y., Elongation of long-chain fatty acids. *Prog. Lip. Res.* 2004;43:36–54.

Mathews C., Van Holde K., Ahern K., *Bioquímica*, Tercera edición, Ed. Person Addison Wesley, Madrid, 2002, pp. 353-356.

Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hasty AH, Tamura Y, Osuga J, Okazaki H, Lizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Dual regulation of mouse D5- and D6-desaturase gene expression by SREPB-1 and PPAR α . *J. Lip. Res.* 2002;43:107-114.

Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Yoshikawa, T., Amemiya-Kubo, M., Hasty, A., Okaaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ishibashi, S. and Yamada, N., Cloning and characterization of a mammalian fatty acyl-CoA elongase as a lipogenic enzyme regulated by SREBPs. *J. Lip. Res.* 2002;43:911–920.

Moon YA, Sha h NA, Mohapatra S, Warrington JA, Horton JD, Identification of a mammalian long chain fatty acyl elongase regulated by sterol regulatory element-binding proteins, *J. Biol. Chem.* 2001;276:45358-45366.

McMurry J., *Química orgánica*, Quinta edición, Ed. Internacional Thompson Editores, México, 2001, pp. 1119-1121.

Ntambi J., Regulation of stearyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lip. Res.* 1999;40:1549-1558.

Qin, Y., Dalen, K., Gustafsson, J., Nebb, H., Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXR α –SREBP-1c. *Biochim. Biophys. Acta.* 2008; doi:10.1016/j.bbalip

Reza Z, Christopher J. C., Melanie D. B., Cathari A., Fatty Acid d5-Desaturase mRNA is regulated by dietary Vitamin A and Exogenous Retinoic Acid in Liver of Adult Rats. *Arch. Biochem. Bioph.* 2001;391:8-15.

Rimoldi, O., Finarelli, G., Brenner, R., Effects of diabetes and insulin on hepatic $\Delta 6$ desaturase gene expression, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;283:323-326.

Risé, P., Ghezzi, S., Carissimi, R., Mastromauro, F., Petroni, A., Galli, C., $\Delta 5$ desaturase mRNA levels are increased by simvastatin via SREBP-1 at early stages, not via PPAR α , in THP-1 cells. *Eur. J. Pharm.* 2007;571:97–105.

Rodríguez-Cruz M, Tovar A., Palacios B., Del Prado M, Torres N., Synthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in lactating mammary gland: role of $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases, SREBP-1, PPAR γ , and PGC-1. *J. Lip. Res.* 2006;47:3:553-560.

Sekiya M, Yahagi N, Matsuzaka T, Najima Y, Nakakuki M, Nagai R, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N, Shimano H. Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression. *Hepatology.* 2003;38:1529-39.

Seo, J., Switzer, K., Fan, Y., McMurray, D., Lupton, J., Chapkin, R., n-3 PUFA and membrane microdomains: a new frontier in bioactive lipid research. *J. Nutr. Biochem.* 2004;15:700–706.

Simončíkova P, Wein S, Gasperikova D, Ukropec J, Certik M, Klimes I, Sebokova E, Comparison of the extrapancreatic action of gamma-linolenic acid and n-3 PUFAs in the high fat diet-induced insulin resistance. *Endocr. Regul.* 2003;37:20.

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.

Wang, Y., Botolin, D., Christian, B., Busik, C., Xu, J., Jump, D., Tissue-specific, nutritional and developmental regulation of rat fatty acid elongases. *J. Lip. Res.* 2005;46:706–715. *J. Biol. Chem.* 1999;274:37335-37339.

Wang, Y., Botolin, D., Xu, J., Christian, B., Mitchell, E., Jayaprakasam, B., Nair, M., Peters, J., Busik, Olson, L., Jump, D., Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J. Lip. Res.* 2006;47:2028-2041.

Westerberg, R., Tvrdik, P., Undén, A., Månsson, J., Norlén, L., Jakobsson, A., Holleran, W., Elias, P., Asadi, A., Flodby, P., Toftgård, R., Capecchi, M., Jacobsson, A., Role for ELOVL3 and fatty acid chain length in development of hair and skin function. *J. Biol. Chem.* 2004;279:5621–5629.

Yahagi, N., Shimano, H., Hasty, A., Amemiya-Kudo, M., Okazaki, H., Tamura, Y., 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;274:35840-35844.