



**“PARTICIPACIÓN DE LAS CELULAS EPITELIALES MAMARIAS EN
LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 Y 6 DE LA LECHE
HUMANA: EXPRESIÓN GÉNICA DE DESATURASAS Y
ELONGASAS”**

P R E S E N T A

Lic. Nutr. Elizabeth Sosa Castillo

Comité:

Co-tutor interno: Dr. Edmundo Bonilla González

Co-tutor externo: Dra. Maricela Rodríguez Cruz

Asesor interno: Dr. Pablo G. Damián Matsumura

Asesor(a) externo: Dra. Mariela Bernabe García

Agradecimiento CONACYT

El programa de la **Maestría en Biología Experimental** de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I 309-1) pertenece al **Padrón de Posgrados de Excelencia CONACYT (PNPC) registro 001481** y cuenta con apoyo del mismo consejo **Clave DAFCyT 2003IMPTNNN0020**.

Esta investigación fue financiada por la Coordinación de Investigación Médica en Salud, IMSS, México **(FIS/IMSS/PROT/G09/769)** y por el **CONACYT (FIS/IMSS/PROT/G09/7811)**.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, aprobó la tesis titulada **“Participación de las células epiteliales mamarias en la síntesis de ácidos grasos omega 3 y 6 de la leche humana: expresión genica de desaturasas y elongasas”** que presentó:

M. en B. E. Elizabeth Sosa Castillo

el día

3 de Mayo del 2012



Dr. Pablo G. Damián Matzumura.



Dra. Mariela Bernabe García.



M en C. Raúl Sánchez González.



Dra. Elena Zambrano González.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer a Dios por la oportunidad que se me brindo al poder llevar a cabo con éxito este trabajo,

También quiero agradecer a mis padres por confiar en mis sueños y darme el apoyo y consejos necesarios para continuar en este camino, el cual, en ocasiones no es sencillo, pero alguien alguna vez me dijo; "Si las cosas fuesen fáciles, todo el mundo las haría" y eso me quedo bastante claro.

Agradezco a mis hermanas y familia por todo el amor, paciencia y comprensión que me brindaron durante este camino.

Agradezco a mis co-directores, asesores (as), profesores y coordinador por el tiempo, apoyo y enseñanzas que me brindaron desde el inicio hasta el final de esta Maestría.

Agradezco a mis amigos con quienes compartí conocimientos y disfrute muchos momentos de diversión y alegría.

Agradezco a todas aquellas personas que siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo, tiempo, conocimientos, amor y amistad. Compartiendo conmigo este sueño que inicio hace un tiempo y que continuara hasta que Dios me lo permita.

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.

Albert Einstein

Resumen

Introducción: Durante la lactancia el organismo materno desencadena diversas adaptaciones metabólicas para hacer frente a la demanda de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs por sus siglas en inglés) requerida para el recién nacido. Estos LC-PUFAs como el ácido araquidónico (AA), ácido eicosapentaenoico (AEP) y ácido docosahexaenoico (ADH), son componentes estructurales de las membranas celulares, además, intervienen en el crecimiento y desarrollo del cerebro y de la retina en los períodos prenatal y posnatal. Estos son sintetizados a partir de los PUFAs (ácido linoleico y ácido α -linolénico) a través de diversas etapas de desaturación por las desaturasas delta 5 y 6 ($\Delta 5D$ y $\Delta 6D$) y elongación por las elongasas 2 y 5 (Elovl-2 y Elovl-5). En la actualidad, poco se sabe sobre los procesos de regulación metabólica de la leche en los humanos debido a las limitaciones en la obtención de tejido mamario. Debido a esto, es necesario conocer si en la glándula mamaria se expresan los genes que participan en la síntesis de estos ácidos grasos y si dicha expresión se modifica en el transcurso de la lactancia. **Objetivo:** Determinar los cambios en la expresión de las enzimas que participan en la síntesis de ácidos grasos omega 3 y 6 en las células epiteliales mamarias de la leche materna y su correlación con la concentración de LC-PUFAs en el calostro, la leche de transición y en leche madura. **Metodología:** El tipo de estudio fue observacional, prospectivo y longitudinal. Se determinó la expresión del ARNm de los genes blanco $\Delta 5D$, $\Delta 6D$, Elovl-2, Elovl-5 y los genes de referencia ARP y β -actina de células epiteliales mamarias durante la secreción de calostro, leche de transición y leche madura de 6 mujeres, por PCR en tiempo real. Además, se analizó la composición de ácidos grasos en el calostro, leche de transición y leche madura por cromatografía de gases. **Resultados:** Durante la secreción de leche madura incrementó la expresión de la $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y Elovl-5 con respecto al calostro. Las proporciones de AL y ALN permanecieron estables durante el transcurso de la lactancia, mientras que la proporción de AA y ADH disminuyeron durante la secreción de leche madura en relación al calostro. **Conclusión:** En los glóbulos de grasa de leche humana, se encuentran los transcritos provenientes de las células epiteliales mamarias y que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de los LC-PUFAs. Durante la secreción de la leche madura se incrementa la expresión de estas enzimas para cubrir las necesidades de estos ácidos grasos impuestas por el recién nacido. Estos resultados sugieren que probablemente la glándula mamaria, en conjunto con el hígado participa en la síntesis de los ácidos grasos poliinsaturados; AA, AEP Y ADH en respuesta a su alta demanda para el desarrollo del neonato.

Abstract

Background. Breastfeeding is a physiological stage with high metabolic demand. During this period; breast milk provides the newborn the nutrients needed for growth and development. The long chain-polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) like araquidonic (AA) eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) are essential fatty acids for the infant. LC-PUFAs are part of cell membranes, are involved in the developing brain and retina in the prenatal and postnatal periods. They are synthesized from PUFAs (linoleic acid and alfa-linolenic acid) through various stages of desaturation and elongation by desaturases delta 5 (D5D) y 6 (D6D) and elongases 2 (Elovl-2) and 5 (Elovl-5). To date little is known about the regulation of metabolic pathways of milk in humans due to limitations in obtaining mammary tissue. Therefore, it is necessary to study whether mammary gland can synthesize LC-PUFAs through the expression of desaturasas and elongases and whether this expression is modified during lactation. **Objective.** Determine changes in the expression of enzymes involved in the synthesis of omega 3 and 6 in mammary epithelial cells in breast milk and its correlation with the concentration of LC-PUFA in colostrum, transitional milk and mature milk. **Methods.** Total RNA was extracted from milk fat globules through lactation in six women by Trizol method. The transcripts D5D, D6D, Elovl-2 and Elovl-5 were identified and quantified by real-time RT-PCR using two reference genes ARP and β -actin for normalization. Also, the fatty acid composition of breast milk was determined by gas chromatography. **Results.** Human mammary epithelial cells express transcripts of D5D, D6D and Elovl-5. This expression increased during the secretion of mature milk with respect to colostrum. The proportion of AL and ALN remained stable during the course of lactation, while the proportion of AA and DHA decreased during secretion of mature milk compared to colostrum. **Conclusions.** Human mammary gland expresses genes involved in the synthesis of LC-PUFAs, suggesting that probably the breast tissue, together with the liver (the main organ that synthesizes LC-PUFAs) participates in the synthesis of AA, EPA and DHA in response to high demand for the development of the newborn.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN. IMPORTANCIA DE LA GLÁNDULA MAMARIA	1
ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA	2
FISIOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA	3
Periodo Mamotrófico	3
Periodo lactogénico	4
Periodo lactopoyético	6
COMPOSICIÓN DE LA LECHE HUMANA	8
Calostro	9
Leche de transición	9
Leche madura	9
COMPOSICIÓN DE LOS LIPIDOS EN LA LECHE	10
IMPORTANCIA DE LOS ACIDOS GRASOS POLI-INSATURADOS EN EL LACTANTE	12
FUENTES DE PUFAS Y LC-PUFAS	14
Dieta	15
Movilización de reservas maternas	16
Síntesis de novo de LC-PUFAS	16
EXPRESION GENICA DE LAS ENZIMAS QUE SINTETIZAN LC-PUFAS	19
FACTORES QUE REGULAN LA EXPRESION GENICA DE LAS DESATURASAS Y ELONGASAS	20
Factores dietarios.....	21
Génico (Polimorfismos)	24
Hormonal.....	25
ANTECEDENTES	26
Participación de la glándula mamaria en la síntesis de LC-PUFAS	27
JUSTIFICACIÓN	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
OBJETIVO GENERAL Y ESPECIFICOS	32
HIPOTESIS	33
METODOLOGÍA	34

DIAGRAMA EXPERIMENTAL	35
DESARROLLO EXPERIMENTAL	36
Obtención de muestras de leche.....	36
Separación de los glóbulos de grasa y extracción de ARN.....	37
Cuantificación del ARN total.....	38
Electroforesis en gel de agarosa	38
Síntesis de cDNA y PCR punto final	39
PCR en tiempo real	40
Análisis de composición de los ácidos grasos de la leche materna	42
Extracción de lípidos de leche humana	42
Metilación de ácidos grasos (ácido-básica).....	43
Análisis estadístico.....	44
RESULTADOS.....	45
Características demográficas de los sujetos de estudio.....	45
Cuantificación y pureza del ARN total	46
Integridad del ARN	47
Amplificación por PCR punto final	48
Análisis cuantitativo de la expresión génica por PCR en tiempo real.....	50
Expresión génica de la desaturasa $\Delta 5$	50
Expresión génica de la desaturasa $\Delta 6$	52
Expresión génica de la elongasa 5 (Elovl-5)	53
Análisis de composición de ácidos grasos	54
Ácidos grasos poli-insaturados.....	54
Asociación entre la expresión génica y la composición de LC-PUFAS en la leche..	56
Ácidos grasos mono-insaturados	58
Ácidos grasos saturados	59
Expresión génica de α -lactoalbúmina (α -LA) y caseína 3 (CAS-3)	61
DISCUSIÓN	63
CONCLUSIÓN	69
PERSPECTIVAS.....	70
BIBLIOGRAFIA	71

INTRODUCCIÓN

IMPORTANCIA DE LA LACTANCIA MATERNA

La lactancia materna es un proceso fisiológico en el cual la madre, a través de la leche, le provee al recién nacido los nutrientes, los factores de crecimiento y componentes inmunológicos necesarios para un adecuado crecimiento y desarrollo durante el primer año de vida. Otras ventajas de la lactancia materna incluyen la reducción de la incidencia y la severidad de infecciones, disminución de la tasa de retinopatía grave y la prevención de alergias (Leung A y cols., 2005).

Algunos reportes sugieren que los grupos de infantes alimentados al seno materno tienen mejores resultados en pruebas psicométricas que los infantes que son alimentados con fórmula láctea (Innis SM y cols., 1997). Por otro lado, estudios con niños nacidos a término indican que los niveles de ADH en la corteza cerebral son más altos cuando son alimentados con leche materna, en comparación con los alimentados con fórmula láctea, lo cual, puede estar relacionado a cantidades elevadas de este ácido graso en la leche humana (Farquharson J y cols., 1992).

ANATOMÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La glándula mamaria tiene como función principal la producción y secreción de leche durante la lactancia y esta glándula mamaria está formada por tejido glandular, conjuntivo, adiposo y estroma. El tejido conjuntivo permite mantener agrupados los diferentes lóbulos en una estructura glandular, mientras que el tejido adiposo se dispone entre los distintos lóbulos. El tejido glandular secretor está formado por 15-20 lóbulos que se disponen radialmente hacia el pezón. El estroma vascular provee de los nutrientes necesarios presentes en la circulación al tejido glandular para la síntesis de la leche ((Fig. 1) (González., 2006, Lawrence y Lawrence., 2007).

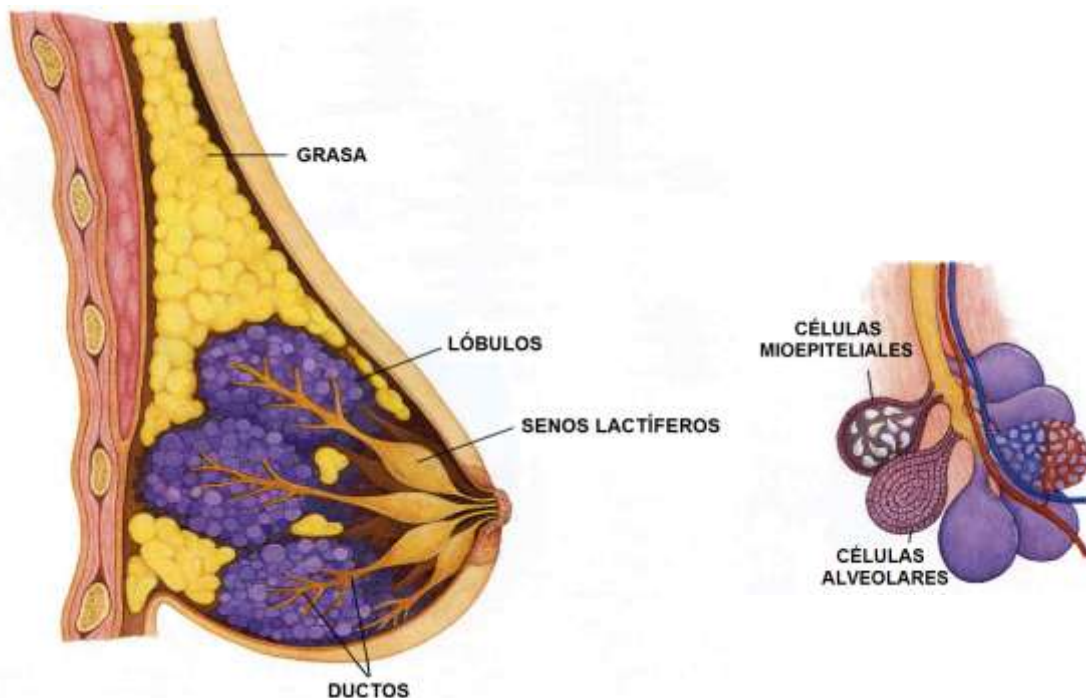


Fig. 1. Estructura anatómica de la glándula mamaria humana (Lawrence y Lawrence., 2007).

Cada lóbulo está formado por una serie de lobulillos (entre 20 y 40); a su vez cada lobulillo está constituido por numerosos alvéolos (González., 2006). Los alvéolos son unidades que corresponden a pequeñas vesículas o sacos formados por una lámina simple de células epiteliales secretoras, en disposición cúbica o columnar, que rodean la luz alveolar, en la cual se va recolectando la leche formada (Fig. 2).

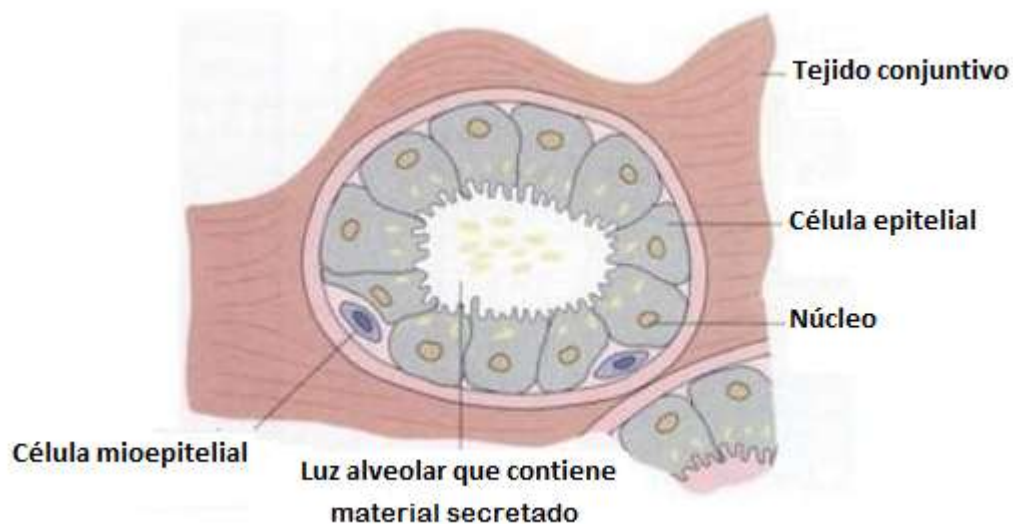


Fig 2. Corte transversal de un alvéolo maduro o galactóforo (Pocock y col; 2005).

Las células epiteliales también llamadas lactocitos son las que sintetizan y secretan los componentes de la leche; y muestran todas las características clásicas de las células secretoras, ya que poseen microvellosidades en las superficies lumbales y su citoplasma es rico en mitocondrias, en membranas de Golgi, retículo endoplásmico rugoso, gránulos de secreción y en gotas de lípidos (Pocock y col., 2005). La división y diferenciación de estas células tienen lugar durante el tercer

trimestre de la gestación. Los alvéolos están rodeados por células mioepiteliales formando una red laxa con numerosas ramificaciones cuya configuración es estrellada y que al contraerse, en respuesta a la oxitocina, expulsan la leche hacia los conductos galactóforos para que salga por el pezón durante la succión (Lawrence y Lawrence., 2007).

FISIOLOGÍA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

Desde el punto de vista funcional, el desarrollo de la glándula mamaria pasa por cuatro períodos que son: el mamotrófico, durante el cual se llevan a cabo los cambios estructurales de la glándula mamaria. El lactogénico, que corresponde a la reorganización estructural y fisiológica que da lugar a la producción de leche. El lactopoyético, que corresponde al mantenimiento de la producción de leche. Finalmente, en el climaterio, se inicia el período de la involución de la mayor parte de las estructuras glandulares y de otros tejidos de la glándula mamaria (Arrieta y Cravioto, 1985).

Período Mamotrófico

La glándula mamaria evoluciona a lo largo de tres periodos: embriogénico, puberal-adulto y gestacional. En el primero, la glándula no es más que una excrescencia de la piel y sólo aparecen pequeñas arborizaciones o conductos primitivos que se propagan dentro del tejido subyacente.

Durante la infancia, estos conductos van desarrollándose, aunque el proceso queda inhibido por la presencia de la testosterona. Ya en la pubertad o madurez sexual se produce una rápida extensión de los conductos por acción de los estrógenos ováricos (Cordova, 2003). Durante la pubertad y la vida adulta, la mamogénesis se presenta de forma cíclica en las dos fases del ciclo menstrual: folicular y lútea. Durante la primera, se incrementan las concentraciones de estrógenos produciendo pigmentación de la areola, aumento en el depósito de los tejidos adiposo y conjuntivo, así como, incremento ductal. En la fase luteínica, se incrementa la concentración de progesterona, promoviendo el crecimiento lóbulo-alveolar. La acción de los estrógenos y la progesterona la acción sinérgica de otras hormonas como la prolactina, hormona del crecimiento, insulina, cortisol y tiroxina. Las dos fases de la mamogénesis puberal preparan, durante cada ciclo a la glándula mamaria para la gestación (Cordova, 2003).

Período lactogénico

Durante el embarazo tiene lugar el crecimiento de las glándulas mamarias y la maduración funcional de las células secretoras de los alvéolos. En este proceso intervienen la progesterona, los estrógenos, la prolactina y el lactógeno placentario, entre otros. La placenta tiene un papel importante en el inicio del periodo lactogénico ya que produce **progesterona** que se incrementa a lo largo del embarazo, dando como resultado el aumento en la proliferación y la maduración de los alvéolos y de las células secretoras del tejido mamario (Lawrence y Lawrence; 2007).

Además, los **estrógenos** también producidos por la placenta y la estimulación del pezón incrementan los valores plasmáticos de prolactina, la cual es fundamental en el proceso de la lactogénesis, ya que incrementa el crecimiento y la maduración de los alvéolos. También regula la síntesis de proteínas, de lactosa y el metabolismo de los lípidos de la leche. Al término del parto y después de la expulsión de la placenta, la producción de estrógenos y progesterona disminuye rápidamente, mientras que se mantiene la producción de prolactina (Lawrence y Lawrence; 2007). Otra hormona que tiene un papel importante en la lactogénesis es el **lactógeno placentario humano** (HPL) ya que tiene acción mamotrófica y lactogénica. Además, el HPL estimula el desarrollo fetal y ejerce otros efectos metabólicos importantes que se relacionan principalmente con el ajuste de los niveles maternos de ciertos metabolitos, moviliza las grasas y las hace disponibles como fuente de energía, lo que disminuye el consumo de glucosa por parte de la madre y aumenta su disponibilidad para el feto. (Guillot, 2003).

Período lactopoyético

En este periodo la secreción láctea se mantiene mediante un mecanismo neurohormonal en el que intervienen fundamentalmente la prolactina y la oxitocina. (Fig 3). Durante los primeros 5-7 días después del parto, la concentración de prolactina disminuye incluso en niveles inferiores a los existentes durante el embarazo (González, 2006). Su producción se mantiene por el estímulo local que se produce con la succión del pezón, que por vía nerviosa origina la disminución de

dopamina, y con ello se incrementa temporalmente la liberación de prolactina y, quizá también, por estímulo de la TRH. La oxitocina producida en el lóbulo posterior de la hipófisis, tiene un papel importante en la lactancia, esta actúa sobre las células mioepiteliales, cuya contracción es responsable del vaciamiento de los alvéolos y de los pequeños conductos (González, 2006). La liberación de la oxitocina hipofisaria se produce por un reflejo que se inicia en la mama, fundamentalmente por el estímulo que produce la succión en el pezón, pero el reflejo puede ponerse en marcha por el llanto del lactante y puede ser inhibido por alteraciones emocionales o estrés (González, 2006).

Estos procesos fisiológicos, regulados por hormonas, que ocurren durante el embarazo y lactancia son mecanismos de adaptación para preparar al organismo materno a procesos metabólicos de alta demanda, en los cuales tiene que proporcionarle al recién nacido los nutrimentos necesarios para su crecimiento y desarrollo a través de la leche materna.

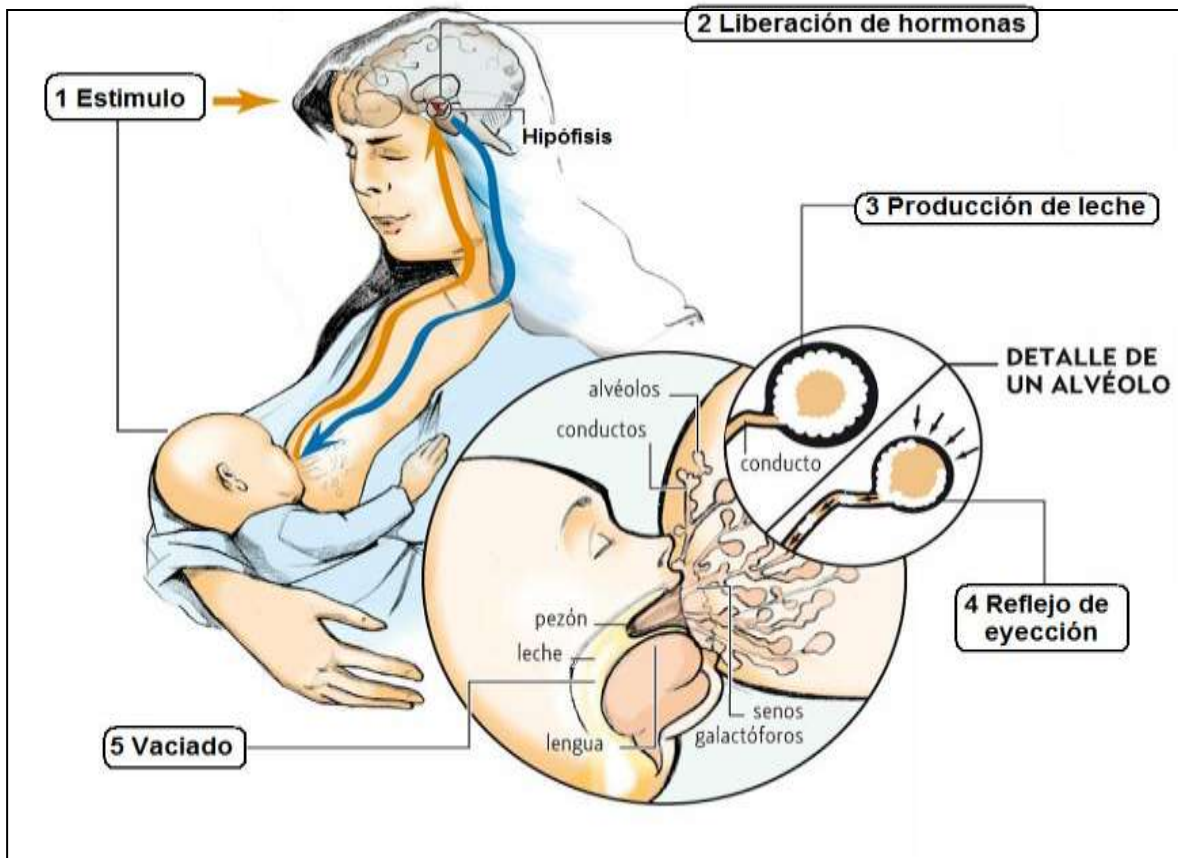


Fig. 3. Etapas fisiológicas para la secreción de leche. 1) En el momento que el recién nacido succiona el pezón, los receptores sensoriales envían la información al cerebro indicando que es necesario producir leche. 2) En el hipotálamo, la glándula hipófisis segrega prolactina y oxitocina, estas hormonas viajan por el torrente sanguíneo hasta llegar a las glándulas mamarias. 3) Posteriormente, la prolactina llega a los alvéolos y estimula las células secretoras responsables de producir leche (células epiteliales). 4) Finalmente, la oxitocina, al contraer a las células mioepiteliales que rodean a las células epiteliales, provocan la liberación de la leche, la cual viaja a través de los conductos hasta los senos galactóforos. Los senos galactóforos que almacenan la leche se vacían por la succión del recién nacido. La producción láctea está determinada por la frecuencia de la succión y el vaciado. (Modificada de: www.pediatríaaldia.com).

COMPOSICIÓN DE LA LECHE HUMANA

En general, la leche humana es una solución acuosa de hidratos de carbono, lípidos, proteínas, lactosa, minerales y vitaminas hidrosolubles. La proporción de estos componentes cambia durante la lactancia, teniéndose como resultado tres diferentes tipos de leche: calostro, leche de transición y leche madura. (Lawrence y Lawrence; 2007)

Tabla 1. Composición de la leche humana

Componente	Calostro	Transición	Madura
	g/100mL		
Hidratos de carbono (Lactosa)	5.3	6.6	7.0
*Lípidos	2.9	3.6	3.8
Proteínas (caseína)	4.1	1.6	0.9
(Alfa-lactoalbúmina)	1.6	0.5	0.25
	1.1	0.4	0.26
	mg/100mL		
Calcio	39	40	31
Fósforo	14	18	15
Potasio	74	64	53
Sodio	48	29	16
Hierro	70	40	80
	$\mu\text{g}/100\text{mL}^1$ - $\text{mg}/100\text{mL}^2$		
Vitamina A¹	151	88	54
Vitamina C²	5.9	5.5	4.4
Calorías (Kcal)	64.5	65.2	65.8

Modificada de Casanueva; 2009 y *Pombo; 1992.

Calostro

El calostro es la leche que se produce entre el día 5 al 7 postparto, su volumen varía entre 2-20mL/día, tiene un contenido más elevado de proteínas incluyendo inmunoglobulina A (IgA) y lactoferrina. Además, contiene oligosacáridos complejos como la lacto-N-tetraosa, lacto-N-fucopentaosa monofucosilada I y II (Aranceta, 2005) diversos minerales como sodio, zinc, hierro, manganeso y potasio, menor contenido en hidratos de carbono y lípidos (como colesterol).

Leche de Transición

La leche de transición está presente entre el 8° y el 14° día postparto. Este tipo de leche contiene menor cantidad de proteínas y vitaminas que el calostro, sin embargo, el contenido de lactosa y lípidos (principalmente triacilgliceroles) es mayor que la del calostro (Hernández, 2010).

Leche Madura

La leche madura se produce desde el 15° día hasta el final de la lactancia, tiene mayor porcentaje de lípidos (triacilgliceroles y colesterol) e hidratos de carbono en comparación con el calostro (Hernández, 2010). La proporción proteínas totales/caseína del suero es de 60/40 e incluso 50/50 en la lactancia prolongada (Majem y cols., 2006).

La composición de la leche materna contiene los nutrimentos necesarios para el crecimiento del recién nacido; entre éstos los lípidos son componentes importantes para que se lleve a cabo dicho proceso.

Composición de los lípidos de la leche

Los lípidos presentes en la leche materna representan una importante fuente de energía para el recién nacido y aportan aproximadamente el 50% de las calorías. Además, son indispensables para el crecimiento y desarrollo del neonato, especialmente durante el primer año de vida. Los principales compuestos lipídicos de la leche humana están en forma de triacilgliceroles (98%), diacilgliceroles, monoacilgliceroles, glicolípidos, esteroides, fosfolípidos y fracciones lipídicas de las vitaminas A, D y K. (Fernández y cols., 2008), (Aguilar, 2005). Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas (de 4 a 24 átomos de carbono) no ramificadas (Koolman y cols; 2005). Dependiendo de su grado de saturación, los ácidos grasos se clasifican: saturados, mono-insaturados y poli-insaturados, estos últimos conocidos como PUFAs por sus siglas en inglés (PolyUnsaturated Fatty Acids). Con base en la posición del primer doble enlace o insaturación (contando desde el extremo metilo al grupo funcional carboxílico), los PUFAs pueden clasificarse en las tres principales series: ácidos grasos omega (ω)-9 (primer doble enlace en el carbono 9), ácidos grasos ω -6 (primer doble enlace en el carbono 6) y ácidos grasos ω -3 (primer doble enlace en el carbono 3; (Fig 4).

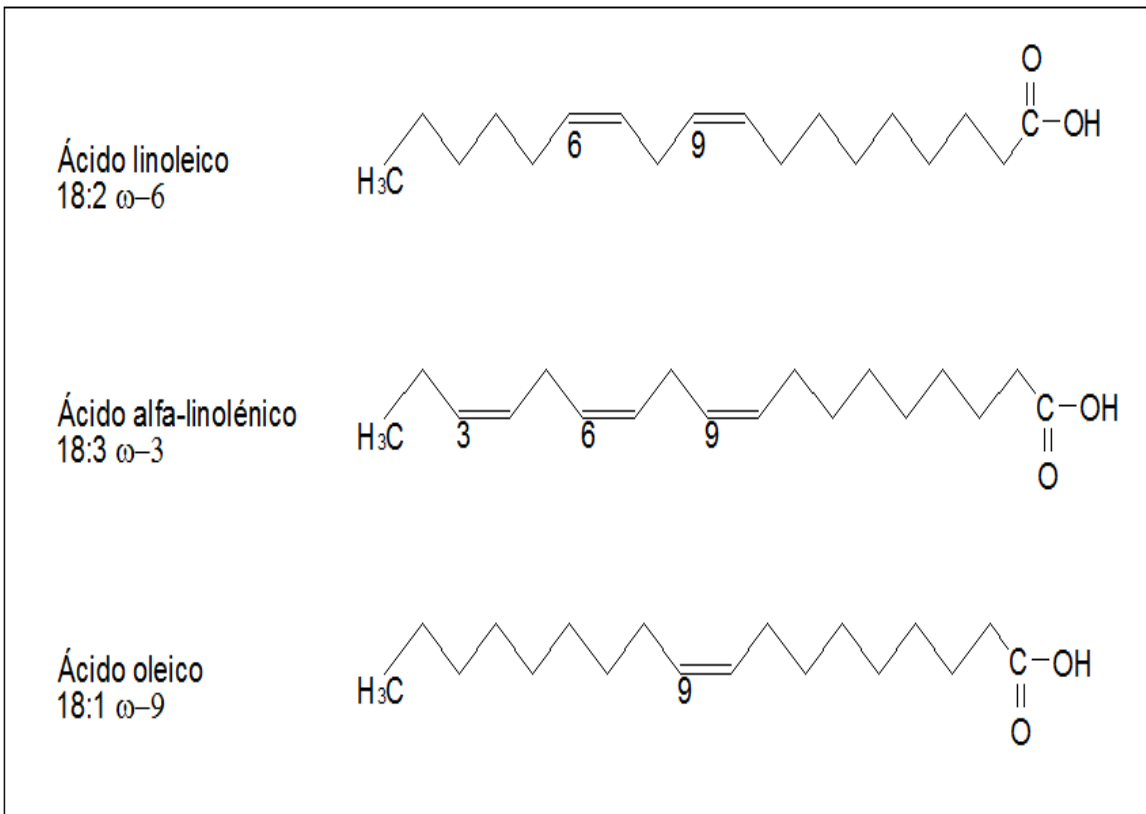


Fig. 4. Estructura química de los ácidos grasos; omega (ω)-9 (ácido oleico), ω -6 (ácido linoleico; AL) y ω -3 (ácido alfa linolénico; α -ALN).

Los ácidos grasos omega-9 no son indispensables, ya que los mamíferos pueden introducir una insaturación a un ácido graso saturado en el carbono 9 y por lo tanto se pueden sintetizar a partir de sus precursores. No ocurre lo mismo con los ácidos grasos ω -6 y ω -3, ya que los mamíferos no pueden introducir insaturaciones en los carbonos 6 y 3. De esta forma, los ácidos grasos como el ácido linoleico (C18:2, omega-6, AL) y el ácido alfa linolénico (C18:3, ω -3, α -ALN) son indispensables.

Éstos son precursores de PUFAs de cadena larga (LC-PUFAs; del idioma inglés) - PUFAs como el ácido araquidónico (AA), el ácido eicosapentaenoico (AEP) y el ácido docosahexaenoico (ADH). Debido a esto, se requiere obtenerlos con la dieta en proporciones bien determinadas (Valenzuela y cols; 2003), ya que su carencia o desequilibrio en la ingesta está asociada a procesos inflamatorios diversos y al desarrollo precario de neuronas en pacientes con depresión (Herrera y cols., 2006).

Importancia de los ácidos grasos poli-insaturados en el lactante

Los LC-PUFAs como el AA y el ADH ejercen sus funciones metabólicas formando parte de la estructura de los fosfolípidos de las membranas celulares, particularmente de la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina. Por su alto grado de poliinsaturación, estos ácidos grasos le aportan gran fluidez a las membranas. Esta fluidez es esencial para que las proteínas de la membrana (canales iónicos, receptores, uniones comunicantes, receptores catalíticos, enzimas, estructuras formadoras de vesículas, etc) puedan tener la movilidad que requieren sus funciones, ya sea en la superficie de las membranas o en el interior de la bicapa lipídica (Valenzuela y cols; 2003). Además, la fluidez de las membranas es particularmente importante en la función del sistema nervioso, especialmente del cerebro.

Las etapas más críticas en la formación de la estructura del encéfalo ocurren durante el último trimestre gestacional en el humano y continúan hasta los dos años después del nacimiento. Estos procesos morfogénicos, que se inician en la cresta neural, se caracterizan por sucesivas etapas de neurogénesis, migración neuronal, apoptosis selectiva, sinaptogénesis y mielinización, etapas que en forma relativamente

secuencial dan forma y funcionalidad al tejido cerebral. Y los procesos celulares requieren, a su vez, de la participación activa de las células gliales, específicamente de los astrocitos, quienes proveen a las neuronas de los metabolitos y del soporte físico que requiere su movilización dentro del encéfalo. Esta morfogénesis, íntimamente asociada a la función del cerebro, requiere de un extraordinario aporte de LC-PUFAs, particularmente de AA y de ADH (Valenzuela y cols., 2003). Por otra parte, la retina está formada por miles de células fotorreceptoras, que contienen cantidad elevada de ADH que desempeñan un papel importante para el envío de las señales en las transmisiones nerviosas correspondientes a los estímulos luminosos. Además, la concentración de ADH, tanto en el cerebro como en la retina, aumenta durante el tercer trimestre de la vida y durante la infancia temprana, cuando estos tejidos experimentan un período de mayor crecimiento (Aranceta y cols., 2005). Durante la etapa gestacional e incluso después del nacimiento, el aporte de LC-PUFAs es realizado por la madre, ya que si bien el feto y el recién nacido tienen la capacidad para formar LC-PUFAs a partir de los precursores AL y α -ALN, ésta es muy limitada y no es suficiente para proveer la cantidad de LC-PUFAs requerida (Valenzuela y cols., 2003), debido a que la actividad biosintética del hígado fetal es muy incipiente por la inmadurez fisiológica de este órgano, por lo que a menor edad gestacional su capacidad es menor. Se desconoce si la placenta humana tiene la capacidad para sintetizar LC-PUFAs, sin embargo, es selectivamente permeable a estos ácidos grasos.

Fuentes de PUFAs y LC-PUFAs

Este tipo de ácidos grasos en la leche materna pueden tener su origen de la dieta, de los ácidos grasos liberados por la movilización del tejido adiposo materno o de la síntesis *de novo* en el hígado y en la glándula mamaria a partir de los precursores provenientes de la dieta (Fig 5; Rodríguez y cols; 2006; Sheila, 2007).

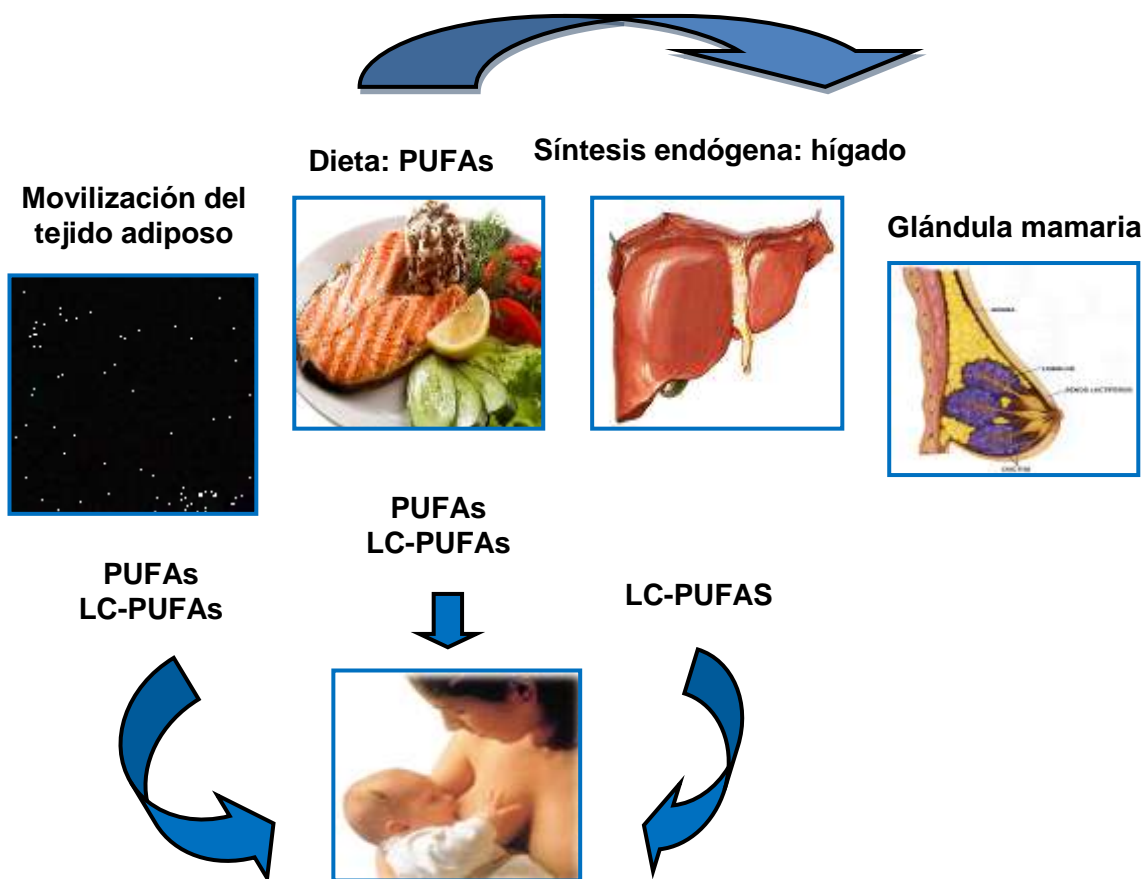


Fig 5. Fuentes de los PUFAs y LC-PUFAs presentes en la leche.

Dieta

La composición de los ácidos grasos de la leche materna se modifica con la dieta materna, de tal modo que la composición de la grasa ingerida se refleja en la grasa láctea. Tanto la dieta previa al embarazo, que determina la composición de los ácidos grasos del tejido adiposo acumulado durante este periodo, como la dieta durante la lactancia, son los principales determinantes de la composición de ácidos grasos que forman parte de los triacilgliceroles de la leche (Macias y cols., 2006). Una dieta rica en PUFAs determina mayor contenido de éstos en la leche, mientras que una dieta con predominio de hidratos de carbono sobre lípidos determinará la síntesis *de novo* de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en la glándula, con mayor concentración de ácidos grasos saturados de cadena media (Macias y cols., 2006). El AL y α -ALN están presentes principalmente en los aceites de semillas. Los LC-PUFAs como el AA se encuentra en la yema de huevo y la carne magra, mientras que el ADH se encuentra principalmente en pescados grasos.

El contenido de estos ácidos grasos en la leche depende de la disponibilidad en los tejidos maternos, por lo tanto, en mujeres gestantes y durante la lactancia se recomienda la ingestión de al menos 200-300 mg/día de ADH que se consiguen con dos raciones de pescado (45 gramos cada uno) a la semana (Campos y cols., 2010).

Movilización de reservas maternas

Si durante la lactancia el consumo de PUFAs es bajo, las reservas corporales pueden ser usadas como un suplemento adicional para satisfacer los requerimientos fisiológicos de la madre y el feto. Cantidades considerables de AL se almacenan en el tejido adiposo y son fáciles de movilizar, sin embargo, el tejido adiposo contiene bajas cantidades de AEP y ADH (Arterburn y cols., 2006), lo cual sugiere una capacidad limitada para almacenar estos LC-PUFAs y la necesidad de ser suplementados a través de la dieta o sintetizarlos a partir de sus precursores. Aunque, se ha observado que en adipocitos humanos aislados e incubados con agentes lipolíticos los ácidos grasos AEP y ADH se movilizan preferentemente en comparación con otros ácidos grasos. (Zhou y cols., 2001).

Síntesis de *nov*o de LC-PUFAS

Las enzimas microsomales delta 5 y 6 desaturasas ($\Delta 5D$ y $\Delta 6D$) forman parte de un complejo enzimático, el cual incluye a la citocromo NADH b5 reductasa, citocromo b5 y la desaturasa respectiva ($\Delta 6D$ o $\Delta 5D$) (Hyekyung y cols., 1999a). Estas enzimas se encuentran en la cara citosólica de la membrana del retículo endoplásmico de los hepatocitos, su función es introducir dobles enlaces en las moléculas de ácidos grasos de cadena larga esterificados con la coenzima A (acil-CoA) mediante una reacción de óxido-reducción. Mientras que el proceso de elongación es catalizado por las elongasas 5 y 2 (Elovl-5 y Elovl-2), empleando malonil-CoA como donador de grupos acetilos y NADPH como agente reductor.

Los sustratos de Elovl-2 incluyen a los LC-PUFAs de 20 y 22 carbonos, mientras que la Elovl-5 puede usar una serie más amplia de sustratos, de 16 a 22 carbonos (Wang y cols., 2005). Dentro del hígado, el AL y el α -ALN son elongados y desaturados para formar los LC-PUFAs (Anderson y cols., 2009). La biosíntesis de LC-PUFAs se lleva a cabo en los microsomas del retículo endoplásmico de los hepatocitos. El primer paso en la biosíntesis de los LC-PUFAs es la formación de un doble enlace *cis* entre los carbonos 6 y 7 del C18:3 ω -3 (α -ALN) y C18:2 ω -6 (AL) provenientes de la dieta, para producir el C18:4 ω -3 y C18:3 ω -3, respectivamente. Esta reacción es catalizada por la enzima Δ 6 desaturasa. El siguiente paso, catalizado por la elongasa 5 es la adición de un par de carbonos empleando malonil-CoA como donador del grupo acetilo y NADPH como agente reductor, para formar el C20:3 ω -6 y C20:4 ω -3. Posteriormente, la Δ 5 desaturasa forma un doble enlace en los ácidos grasos C20:3 ω -6 y C20:4 ω -3 para formar C20:4 ω -6 (AA) y C20:5 ω -3 (AEP) respectivamente. A continuación, el AEP es elongado a través de las elongasas 2 y 5 para formar C22:5 ω -3, el cual es elongado (Elovl-2) y desaturado (Δ 6D) para formar 24:6 ω -3. Finalmente, este ácido graso intermediario es ingresado al peroxisoma y mediante β -oxidación limitada, se remueven dos átomos de carbono para formar el ADH (C22:6 ω -3), proceso conocido como retro-conversión (Bradbury, 2011; Fig 6).

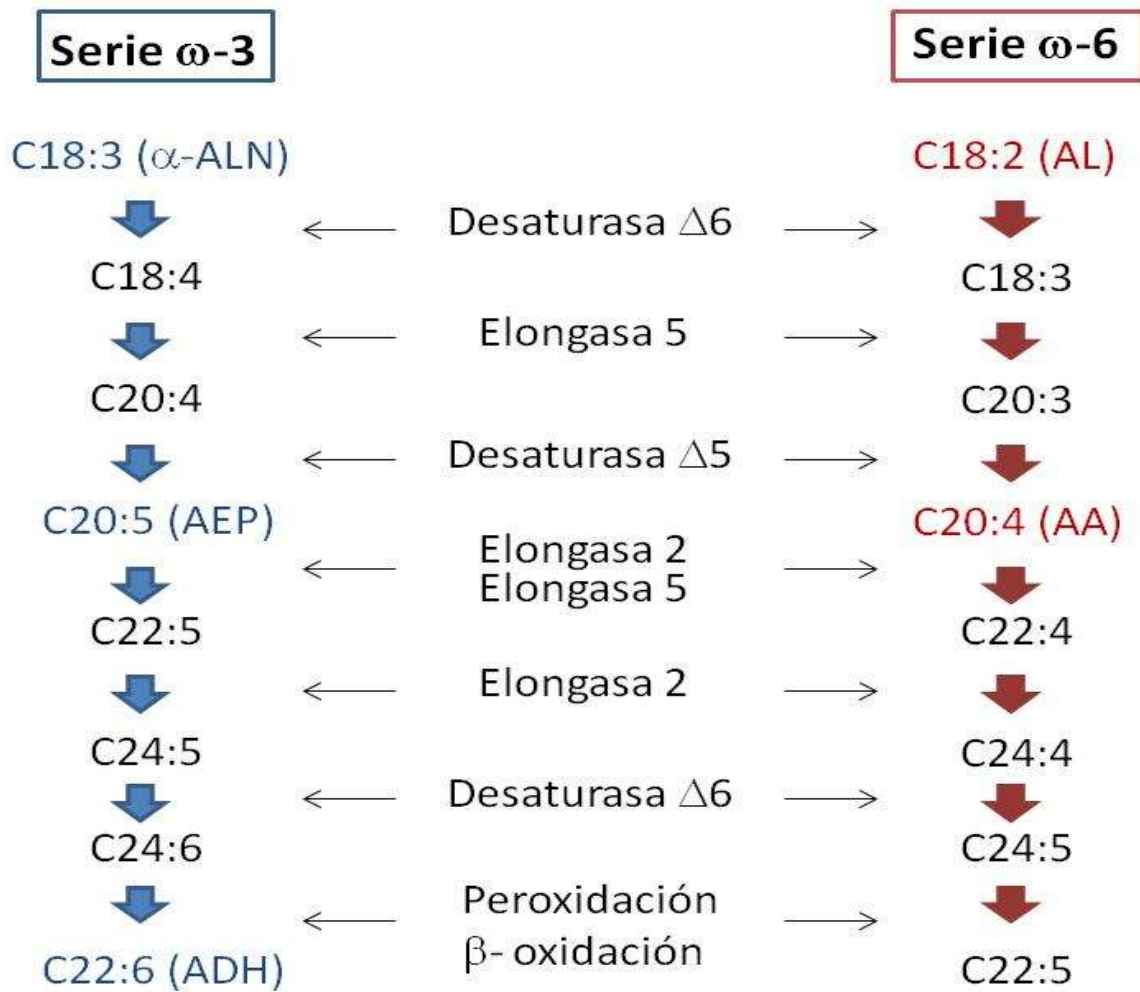


Fig 6. Vías metabólicas para la síntesis de novo de LC-PUFAs en hígado. Ácido alfa linolénico (α-ALN), ácido eicosapentaenoico (AEP), ácido docosahexaenoico (ADH), ácido linoleico (AL), ácido araquidónico (AA). (Qin y cols., 2009).

EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ENZIMAS QUE SINTETIZAN LC-PUFAS

En el humano, los genes que codifican para las enzimas $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ se localizan en el cromosoma 11 en la región 11q12-q13.1, con orientación cabeza-cabeza en el promotor. Cada uno de los genes contienen 12 exones y 11 intrones (Xie y cols., 2008). Por otro lado, los genes que codifican para las enzimas Elovl-2 y Elovl-5 se localizan en el cromosoma 6 en las regiones 6p24.2 y 6p21.1-p12.1 respectivamente. Cada gen contiene 8 exones y 7 intrones (www.ensembl.org). Es sabido que tanto el ARNm de la $\Delta 5D$ como de la $\Delta 6D$ se expresan en varios tejidos de roedores y del humano, incluyendo músculo esquelético, pulmón, placenta, riñón, corazón, glándula adrenal, tejido adiposo blanco, cerebro, glándula mamaria y páncreas, entre otros, sin embargo, se ha demostrado que se expresan de forma más abundante en hígado, cerebro, corazón (Hyekyung y cols., 1999b) y glándula mamaria lactante (Rodríguez y cols., 2006).

Los genes de las elongasas se han identificado en el genoma humano, de rata y ratón. A la fecha se han identificado siete subtipos de elongasas de ácidos grasos (Elovl 1-7;(Jakobsson y cols., 2006; Jump., 2009). De los cuales se ha demostrado que los ARNm de Elovl-2 y Elovl-5 se expresan en testículo, glándula adrenal, hígado, cerebro, tejido adiposo, cerebro, riñón (Tvrdik y cols., 2000) y glándula mamaria lactante. (Rodríguez y cols, 2011).

FACTORES QUE REGULAN LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS DESATURASAS Y ELONGASAS

La expresión génica de las enzimas que sintetizan LC-PUFAs es regulada por diversos factores, dentro de estos se encuentran los dietéticos, genéticos y hormonales (Fig 7).

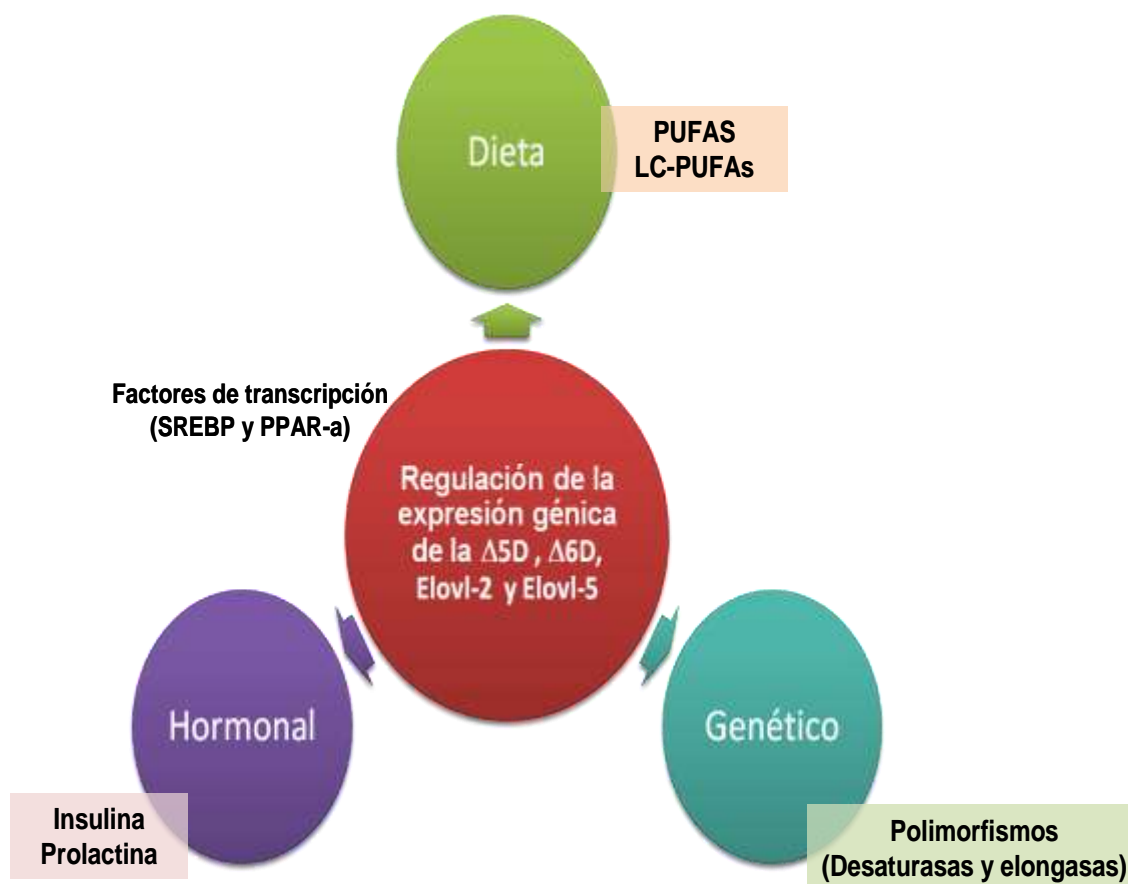


Fig 7. Factores asociados a la regulación de la expresión génica de las enzimas que sintetizan los LC-PUFAs.

Factores dietarios

La actividad enzimática, tanto de las desaturasas ($\Delta 5$ y $\Delta 6$) como de las elongasas (Elovl-2 y Elovl-5), es altamente dependiente de la composición de los lípidos de la dieta. Uno de los mecanismos de inhibición de estas enzimas es por medio de retroalimentación negativa debido al exceso de los productos finales LC-PUFAs, ya que estos pueden actuar, directa o indirectamente, como reguladores de la homeostasis lipídica mediante su interacción con factores de transcripción (Matais y cols., 2004). En estudios previos se ha observado que estos ácidos grasos pueden actuar como supresores de las proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP), particularmente SREBP-1c y como inductor de los receptores activados por proliferadores de los peroxisomas (PPAR) (Harnack y cols., 2009).

La familia de SREBP's presenta 3 isoformas (SREBP-1a, SREBP-1c y SREBP-2). La proteína SREBP-1a activa genes que regulan la síntesis de colesterol, ácidos grasos y triacilglicerol, mientras que SREBP-1c induce genes asociados a la síntesis de ácidos grasos y finalmente SREBP-2 activa genes implicados en la síntesis del colesterol (Horton y cols., 2002). SREBP-1a y SREBP-2 son regulados mediante retroalimentación negativa por el colesterol (Chatterje y cols., 2009), mientras que en el hígado SREBP-1c es regulado, en el nivel transcripcional por la ingestión de hidratos de carbono, insulina y glucosa (Matsumoto y cols., 2010). Además, tanto SREBP-1a como SREBP-1c son suprimidos por niveles elevados de LC-PUFAs (Takeuchi y cols., 2010).

Se han propuesto diversos mecanismos por los cuales los LC-PUFAs regulan la lipogénesis a través de SREBP-1; 1) los LC-PUFAs reducen la forma nuclear activa de SREBP-1, 2) los LC-PUFAs disminuyen la estabilidad del ARN mensajero de SREBP-1, y 3) los LC-PUFAs suprimen la expresión del ARNm de SREBP-1. Por lo cual, dietas con alto contenido en LC-PUFAs favorecerán la disminución de SREBP-1 y, como consecuencia, disminuirán la lipogénesis (Rodríguez y cols., 2005).

Diversos estudios han demostrado que la expresión génica de la $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ se induce en ratones transgénicos que sobre

expresan el ARNm de SREBP-1c. Esto se debe a que la región promotora del gen $\Delta 6D$ contiene un elemento de respuesta para SREBP-1c (Nara y cols., 2002). Además, existen algunos estudios, incluyendo el realizado por nuestro grupo, que muestran el efecto positivo del ARNm de SREBP-1c sobre la expresión génica de las desaturasas en el hígado y en la glándula mamaria lactante. Aunado a esto, Matsuzaka y colaboradores, reportaron que en el hígado, tanto la expresión como la actividad enzimática de la $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ son inducidas por dietas bajas tanto en PUFAs como LC-PUFAs y reprimida por dietas con alto contenido en estos ácidos grasos (Matsuzaka y cols., 2002). Un ejemplo de esto es la supresión del los ARNm de Elovl-5, $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ en el hígado de ratas alimentadas con una dieta a base de aceite de pescado. Sin embargo, no se encontró efecto cuando los animales fueron alimentadas con aceite de oliva (Qin y cols., 2009). Los cambios en la expresión de estos genes responden a cambios en la composición de los PUFAs de la dieta y de los requerimientos de éstos por los tejidos (Wang y cols. 2005).

Por otra parte, los PPARs presentan 3 isoformas (α , δ y γ) y se activan por concentraciones micromolares de LC-PUFAs, por eicosanoides derivados del ácido araquidónico y también por medicamentos hipolipemiantes, como los fibratos y por proliferadores de peroxisomas (Kliwer y cols., 1997). PPAR- α induce genes involucrados en la oxidación de ácidos grasos de la mitocondria y de los peroxisomas. PPAR- δ activa genes implicados en la regulación del metabolismo y la inflamación (Pollock y cols., 2011), mientras que PPAR- γ induce la activación de genes asociados a la diferenciación de adipocitos y metabolismo de la glucosa (Jurkowski y cols., 2011, Schmidt y cols., 2010). Clark y colaboradores han reportado que los LC-PUFAs ω -3 son más potentes que los LC-PUFAs ω -6 como activadores de PPARs *in vivo* (Clark y cols., 2000). Sin embargo, los metabolitos de los LC-PUFAs como son los eicosanoides o ácidos grasos oxidados tienen mayor afinidad por PPAR- α y por lo tanto, son activadores transcripcionales más potentes de los genes dependientes de PPAR- α , entre los cuales se encuentran Δ 5D y Δ 6D. Estudios previos, realizados en un modelo murino con una dieta deficiente en lípidos, muestran que PPAR- α es necesario para la inducción de la expresión de la Δ 5D y Δ 6D (Li y cols., 2005). Estos resultados son consistentes con datos que muestran que el promotor de la Δ 6D tiene elementos de respuesta para PPAR- α (PPRE) (Nakamura y cols., 2002).

Factores Genéticos

Polimorfismos

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Se ha estimado que hay una variante en cada 1000 pares de bases de los 3000 millones que configuran el genoma humano (Iniasta y cols., 2005). Debido a esto es muy factible encontrar variantes en todos los genes, incluyendo los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de LC-PUFAS. Algunos estudios han reportado polimorfismos en las desaturasas $\Delta 5$ y $\Delta 6$, en donde la presencia de estos polimorfismos se asocia indirectamente con la concentración de LC-PUFAs en los fosfolípidos del suero o plasma, en fosfolípidos de la membrana de eritrocitos y adipocitos (Puigmarti., 2010). De manera que polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en los genes $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ contribuyen a la variabilidad del AA en los fosfolípidos del plasma y en los lípidos totales en eritrocitos (Xie y cols., 2008). Aunado a esto, Morales y colaboradores observaron que diversas variantes alélicas en los genes $\Delta 5D$, $\Delta 6D$, Elov1-2 y Elov1-5 están asociados con la concentración de LC-PUFAs en el calostro de mujeres españolas; en donde la presencia de las variantes alélicas rs174537-T, rs174570-T, rs2072114-G, rs174602-G, rs526126-G, rs174626-C, rs174464-T y rs174468-G de los genes de la $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ están asociados con bajos niveles de AA. Mientras que rs174602-G y 174464-T en estos mismos genes se asociaron con niveles bajos de ADH. Con respecto a las elongasas, las variantes rs953413-A y rs3798719-T en el

gen Elov1-2 se asociaron con niveles elevados de AEP. Por lo contrario, ninguno de los SNPs identificados en el gen Elov1-5 se asoció con los niveles altos de AA, AEP o ADH, aunque se observó una tendencia entre la presencia del polimorfismo rs12207094 y los niveles de AEP (Morales y cols., 2011).

Factores Hormonales

De los factores hormonales, se conoce que la insulina tiene un papel importante en el control de la lipogénesis. Diversos estudios han demostrado que esta hormona promueve la expresión de la $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ a través de la inducción de la abundancia de SREBP-1c (Wang y cols., 2005). De acuerdo con esto, Rimoldi y colaboradores reportaron que la abundancia del ARNm de $\Delta 6D$ en hígado de ratas diabéticas fue menor en comparación con el grupo control (Rimoldi y cols., 2001). Estos resultados indican que la actividad de esta desaturasa, en respuesta a la insulina, podría estar regulada al menos en parte, por eventos post-transcripcionales que requieren la síntesis de una o varias proteínas aún desconocidas.

Por otra parte, estudios previos reportan que la actividad de la $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$ puede tener una función importante en la expresión y regulación del receptor GLUT-4, a través de la modulación en la síntesis de LC-PUFAS y, por tanto, en su concentración en diversos tejidos. Esto se debe a que los LC-PUFAs incrementan la fluidez de la membrana celular y con ello elevan el número de receptores de GLUT-4 y su afinidad por la insulina en adipocitos. (Peyron y cols., 2002, Das y cols., 2005).

Otra hormona que al parecer también modula la expresión de las desaturasas es la prolactina. Esta propuesta está basada en estudios previos realizados en un modelo murino, en donde ratas que presentan hiperprolactinemia disminuye la concentración de AA, así como también el índice de insaturación, por lo tanto, sugiere que disminuye la actividad de la Δ -5D y Δ -6D (Bellini y cols., 2007). Apoyando estos hallazgos, también se ha observado que la prolactina estimula la transcripción de moléculas clave para la síntesis de ácidos grasos; tal como SREBP-1c durante el embarazo (Naylor y cols., 2005).

ANTECEDENTES

Estudios realizados en nuestro país han mostrado que los niveles de AA en la leche de mujeres con nutrición deficiente (cuando el aporte de nutrientes no es suficiente para cubrir las necesidades fisiológicas del organismo) son similares al mostrado en mujeres con un estado de nutrición adecuado (aquel que permite un funcionamiento óptimo de todas las funciones celulares) (Martínez y cols., 2005). Esto sugiere que durante la lactancia que es un estado fisiológico de mayor demanda de LC-PUFAs, el organismo materno promueve diversas adaptaciones metabólicas para sintetizar cantidades adecuadas de estos ácidos grasos.

Participación de la glándula mamaria en la síntesis de LC-PUFAs

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación en ratas lactantes alimentadas con una dieta con diferente concentración de lípidos (2, 5 y 10% de lípidos totales), demostraron que en el día 12 de lactancia aproximadamente el 35% del ácido linoléico (precursor de los LC-PUFAs ω -6) de la dieta es incorporado a la glándula mamaria. Es importante señalar que, en este estudio también se observó que la Δ 5D y Δ 6D se expresaron en este tejido y que su expresión está regulada por los lípidos de la dieta, ya que a mayor concentración de lípidos de la dieta disminuyó la expresión de SREBP-1 y con ello también la expresión de la Δ 5D y Δ 6D en glándula mamaria. Por lo anterior, el incremento en la concentración de lípidos en la dieta es una señal para que el organismo no sintetice más LC-PUFAs. Por lo contrario, se observó que cuando la cantidad de PUFAs en la dieta fue baja, se activan mecanismos adaptativos para sintetizar LC-PUFAs a través del incremento en la expresión de SREBP-1 en la glándula mamaria y en el hígado, el cual a su vez incrementa la expresión de las enzimas Δ 5D y Δ 6D. Al mismo tiempo, hay reducción en la expresión de PPAR- α hepático, disminuyendo la oxidación de ácidos grasos. Estos resultados indicaron que la glándula mamaria tiene la capacidad de sintetizar LC-PUFAs y que esta síntesis puede ser regulada por el contenido de lípidos en la dieta (Rodríguez y cols., 2006). Además, nuestro grupo de investigación observó que tanto en la glándula mamaria como en el hígado la síntesis endógena de AA, a partir del AL que proveniente de la dieta es regulada por la concentración de AL. En el mismo estudio, la síntesis endógena de AA fue mayor en el grupo de ratas

alimentadas con una dieta baja en lípidos en comparación con el grupo de animales alimentados con una dieta alta en lípidos. No obstante, la síntesis endógena fue insuficiente para alcanzar las concentraciones de AA semejantes a las encontradas en la leche de ratas alimentadas con una dieta adecuada o alta en lípidos. La síntesis limitada probablemente se explica por la baja cantidad del precursor AL en el grupo con una dieta baja en lípidos. Sin embargo, se observó mayor incorporación de AL en la glándula mamaria de ratas alimentadas con la dieta baja en lípidos, indicando que cuando la suplementación de AL de la dieta es limitado, éste deberá ser captado de manera preferencial por el tejido mamario para ser secretado en la leche o metabolizado para formar AA (Rodríguez y cols., 2009). Estos resultados sugieren que algunas de las adaptaciones maternas que se generan para compensar deficiencias en LC-PUFAs en la dieta es a través de mayor transferencia de los precursores de LC-PUFAs a la glándula mamaria y su posible incremento en la síntesis de AA. Los requerimientos de los LC-PUFAs inician desde etapas tempranas del embarazo y aumentan durante la lactancia, debido a que el consumo de estos ácidos grasos en el recién nacido a través de la leche está relacionado con el óptimo desarrollo cerebral fetal y cognoscitivo. Por esto, Rodríguez y colaboradores (2011) determinaron en qué etapa del embarazo inicia la expresión de las enzimas involucradas en la síntesis de LC-PUFAs, en los principales tejidos que aportan estos ácidos grasos. Los resultados de este estudio demostraron que la expresión génica de la $\Delta 6D$ y $\Delta 5D$, así como también de la Elovl-5, en la glándula mamaria es mayor al final del embarazo y al inicio de la lactancia hasta alcanzar

valores entre 32 y 67 veces más, respectivamente, en comparación a la glándula mamaria de ratas vírgenes. En contraste, con lo observado, en el hígado, donde la expresión aumentó en la segunda mitad del embarazo y la primera de la lactancia, sólo hasta valores máximos de ~2.7 veces más con respecto al hígado de ratas vírgenes, para ambas desaturasas. Por otro lado, en el tejido adiposo se observaron incrementos de la expresión de $\Delta 5D$ en los días 14 del embarazo y 5 de lactancia, la expresión de $\Delta 6D$ no varió durante el embarazo y la lactancia. La expresión de Elovl-2 incrementó únicamente en el día 5 del embarazo y disminuyó gradualmente durante la lactancia, mientras que la expresión de Elovl-5 fue más alta durante el embarazo y la lactancia, en comparación con el grupo de ratas vírgenes. Cabe señalar que en el tejido adiposo se expresan estos genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de los LC-PUFAs; sin embargo, su síntesis pudiera no estar activa, ya que estos ácidos grasos se presentan en concentraciones muy bajas. Estos hallazgos sugieren que el tejido mamario es más importante que el hígado y el tejido adiposo con respecto a la expresión de dichas enzimas durante el embarazo y la lactancia; lo anterior, dio como resultado mayor contenido de AA y DHA en la glándula mamaria durante la primera mitad de la lactancia (Rodríguez y cols., 2011). Con base en los resultados anteriores, se propone que la glándula mamaria y el hígado actúan de forma sinérgica en la síntesis de LC-PUFAs durante el periodo de embarazo y lactancia. Durante estas etapas existe alta demanda metabólica en el organismo materno para proveerle las concentraciones adecuadas de estos ácidos grasos, tanto al feto como al recién nacido.

PROBLEMA DE INVESTIGACION

La nutrición materna es de crucial importancia durante el embarazo y la lactancia. Los nutrimentos indispensables para el feto y el recién nacido incluyen los PUFAs y LC-PUFAs, los cuales son muy importantes para el desarrollo cerebral fetal y cognoscitivo del recién nacido; estos ácidos grasos los adquiere el feto a través de la placenta y el recién nacido por medio de la leche humana. Estudios previos reportan variabilidad en la concentración de estos ácidos grasos en la leche humana, la cual puede estar dada por diversos factores que regulan su síntesis (genéticos, dietéticos y hormonales). En la actualidad poco se sabe sobre los mecanismos de regulación metabólica involucrados en la síntesis de estos ácidos grasos en la leche humana, principalmente debido a las limitaciones en la obtención de tejido mamario. Debido a esto la mayoría de las investigaciones se han realizado en modelos murinos. En estudios recientes se ha demostrado la factibilidad de obtener ARN total de células epiteliales presentes en los glóbulos de grasa de la leche materna humana. Esto genera la posibilidad de realizar estudios encaminados a identificar dichos mecanismos.

Esta información nos plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Las células epiteliales mamarias participan en la síntesis de ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga omega 3 y 6?

HIPÓTESIS

La expresión de las enzimas que participan en la síntesis de LC-PUFAs omega 3 y 6, en células epiteliales mamarias humanas, aumentará en la leche de transición y madura con respecto al calostro, lo que se correlacionará con el contenido de LC-PUFAs presentes en ellas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios en la expresión de las enzimas que participan en la síntesis de ácidos grasos omega 3 y 6 en las células epiteliales mamarias de la leche materna y su correlación con la concentración de LC-PUFAs en el calostro, la leche de transición y en leche madura.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si las células epiteliales expresan el transcrito de la $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y Elovl-5 en leche de mujeres.
- Identificar el patrón de expresión de la $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y Elovl-5 durante la secreción de calostro, leche de transición y leche madura en mujeres.
- Identificar la composición de ácidos grasos en el calostro, en la leche de transición y en la leche madura en mujeres.
- Determinar si existe asociación entre la expresión de los genes que participan en la síntesis de ácidos grasos omega 3 y 6 con la composición de éstos presentes en la leche humana.

DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de estudio: observacional, prospectivo y longitudinal.

Criterios de inclusión

Mujeres primigestas que cursaron embarazo normo evolutivo, a término (≥ 37 semanas de gestación) con producto único cuyo peso al nacimiento fue mayor a 2.5 Kg, atendidas en la Unidad de Medicina Familiar No.1 del IMSS. Edades entre 18 y 35 años, que no consumieron alimentos enriquecidos o suplementos con PUFAs y/o LC-PUFAs durante el embarazo y que otorgaron su consentimiento informado por escrito.

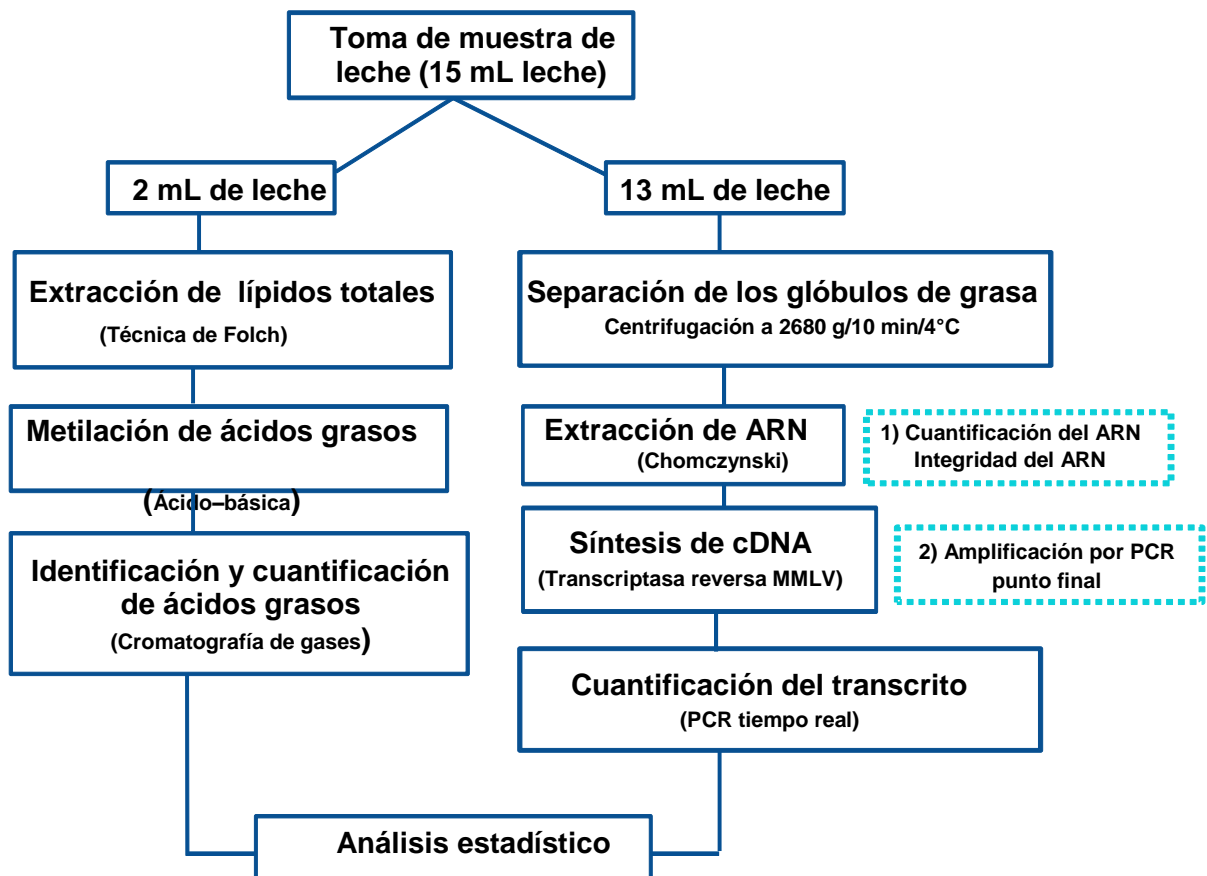
Criterios de eliminación

Se eliminaron del estudio a las mujeres que consumieron alimentos enriquecidos o suplementos con PUFAs y/o LC-PUFAs durante el estudio, que utilizaron algún método anticonceptivo hormonal, que desarrollaron alguna enfermedad y aquellas que decidieron abandonar el estudio.

Tamaño de muestra

El tamaño de la muestra fue de 6 mujeres por factibilidad, la cual está determinada por la complejidad de los procedimientos y por el **elevado** costo de los estudios. Además, existen reportes recientes que demuestran que con 6 a 10 mujeres lactantes es suficiente para observar cambios importantes en el perfil de expresión de diversos genes en células epiteliales presentes en glóbulos de grasa de leche humana (Maningat y cols., 2007).

DIAGRAMA EXPERIMENTAL



DESARROLLO EXPERIMENTAL

1.- Obtención de muestras de leche.

Reportes previos realizados en mujeres mexicanas lactantes indican que las muestras de leche colectadas a las 12:00, 20:00 y 24:00 h son las más representativas de la producción de lípidos durante 24h (Stafford y cols., 1994). Así que por factibilidad las muestras de leche que se utilizaron para este estudio se extrajeron a las 12:00 h. Las muestras fueron colectadas entre el día 5 y 7 post-parto (calostro), en el día 14 (leche de transición) y los días 21 y 28 (leche madura) del mes 1, posteriormente se tomó otra muestra en los días 28 del mes 2, 3 y 4. Para facilitar la extracción de leche y estimular el reflejo de bajada o de eyección láctea, se debe preparar el pecho a través de un masaje previo. El masaje se realizó con los pechos descubiertos, oprimiendo firmemente el pecho hacia la caja torácica (costillas), usando un movimiento circular con los dedos en un mismo punto, sin deslizar los dedos sobre la piel. Este movimiento circular se cambió, después de unos segundos, hacia otra zona del pecho. Posteriormente, el pecho se frotó cuidadosamente desde la parte superior hacia el pezón, por todo alrededor (Aguayo y cols, 2001). Una vez que se han reblandecido los lobulillos periféricos, la expresión areolar que se acaba de describir es útil para facilitar un vaciamiento completo de los conductos colectores de la propia areola, este vaciamiento permite extraer tanto la leche frontal o inicial como la leche escondida o final. La leche inicial no requiere succión del recién nacido ya que es liberada por acción de la oxitocina y se caracteriza por tener un bajo contenido en lípidos, mientras que la leche final

requiere una extracción más prolongada y se caracteriza por tener un alto contenido lipídico y calórico (Aguilar y cols, 2005). Posterior al masaje, le leche se colectó en recipientes estériles (sumergidos en hielo) vaciando simultáneamente ambos pechos utilizando una bomba eléctrica grado hospitalario. De la leche obtenida de ambos pechos se tomaron aproximadamente 13 ml para la separación de glóbulos de grasa para la posterior extracción del ARN. Además, se tomó una alícuota de 2 ml de leche para el análisis de composición de ácidos grasos, el resto de la leche se le entregó a la madre para la alimentación del recién nacido.

2. Separación de los glóbulos de grasa y extracción de ARN

Los 13 ml de leche se centrifugaron a 2680 g durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente la capa de grasa del sobrenadante se transfirió a otro tubo estéril y se realizó la extracción de ARN (Maningat y cols, 2007). A esta grasa se le agregó 1 mL de Trizol, se mezcló con el vórtex y se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, una vez centrifugado se obtuvieron tres fases, de las cuales se tomó la fase media y se pasó a otro tubo estéril. Seguido de este paso se le agregaron 200 µl de cloroformo y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se obtuvieron dos fases: una acuosa y otra orgánica, la fase acuosa se pasó a otro tubo estéril y se le agregaron 600 µl de isopropanol para precipitar el ARN, se mezcló con el vórtex y se dejó a -72°C durante toda la noche. Finalmente la muestra se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desechó el

sobrenadante y al precipitado se agregaron 1 mL de etanol. Después, se centrifugo a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el botón durante aproximadamente 5 minutos a temperatura ambiente. El botón de ARN se resuspendió con aproximadamente 30 µL de agua grado biología molecular (Chomczynski y cols, 1987).

2. Cuantificación del ARN total

Para conocer la concentración del ARN total (ARN_t) obtenido, se tomó un 1 µL de ARN y se cuantificó a una longitud de onda de 260nm y 280nm en el espectrómetro Nanodrop ND-1000 u. v.vis marca Termo Scientific. Dado que el espectrofotómetro da valores en nanogramos, se realizó una conversión a µg para tener concentraciones de ARN en esta unidad. La relación de absorbancia 260/280 indica la pureza del ARN y se considera que las relaciones en un rango de 1.8- 2.0 son óptimas.

3. Electroforesis en gel de agarosa

Para determinar la integridad del ARN total extraído, se llevó a cabo la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10 mg/dL). Esta técnica se basa en el desplazamiento en este caso del ARN a través de una matriz porosa formada por la agarosa polimerizada, donde el tamaño del poro esta determinado por la concentración de ésta en una solución de sales. Al aplicarse una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleicos que poseen una carga negativa conferida por los grupos fosfato, migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro.

El procedimiento de esta técnica se llevó a cabo de la siguiente manera: se mezcló 1 µg/µL de ARN con 2µl de buffer TBE 1X y 2µL de solución de arrastre (azul de bromofenol-xilencianol y glicerol 40%). La electroforesis se llevó a cabo a 90 voltios durante 60 minutos. Finalmente el ARN se observó en un transiluminador con luz ultravioleta a 260nm y se tomó una fotografía de las muestras de ARN.

4. Síntesis de cDNA y PCR punto final

A partir de 2 µg de ARN total se sintetizó el cDNA utilizando la transcriptasa reversa MMLV. El ARN total se pre-incubó con oligo dT y dNTPs (100 mM) a 65°C por 5 minutos. Posteriormente el producto se incubó con un amortiguador de reacción (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, y 15 mM MgCl₂) y DTT (0.1 M) a 37°C durante 2 minutos. Finalmente, la síntesis de cDNA se realizó con la transcriptasa reversa MMLV, ajustando a un volumen final de 20 µl con agua grado biología molecular libre de ARNasas. La síntesis se realizó a 25°C por 10 minutos seguida de una incubación a 37°C durante 50 minutos y finalmente a 70°C por 15 minutos (Hernández y cols; 1994). Para determinar que el cDNA se haya sintetizado de manera adecuada, se realizó PCR punto final utilizando el gen constitutivo β-actina y el producto amplificado se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

5. PCR en tiempo real

La cuantificación del ARNm de los genes de estudio se realizó mediante PCR en tiempo real y se utilizó β -actina y ARP como genes de referencia. El cDNA sintetizado se amplificó mediante la enzima ADN polimerasa del kit LightCycler Fast Start DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche, Indianapolis, IN) utilizando “primers” para los genes $\Delta 6D$, $\Delta 5D$, Elov15, α -lactoalbúmina y caseína-3 (Tabla 2). Los primers de α -lactoalbumina y caseína-3 se utilizaron para confirmar que el ARN proviene de células epiteliales, ya que estas proteínas se expresan abundantemente sólo en este tipo celular. La reacción se llevó a cabo en el equipo LightCycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals Mannheim Germany), que mide continuamente la amplificación de productos de PCR en cada ciclo, usando “primers” comunes para PCR y el fluorocromo SYBR Green que se intercala en el surco menor de las hebras de doble cadena de DNA, emitiendo fluorescencia. La amplificación se realizó en un volumen total de 20 μ l conteniendo 2 μ l de cDNA, 40 pmol de cada “primer” y 4 μ l de MasterPLUS SYBR Green que contiene la enzima polimerasa Fast Start, amortiguador para PCR, SYBR Green y $MgCl_2$ 3.5 mM en capilares de borosilicato de 20 μ l. Durante la reacción, la polimerasa se activa y el cDNA se desnaturaliza pre-incubando a 95°C durante 10 minutos. La amplificación se desarrolló durante 35 ciclos a 95°C por 10 segundos y un alineamiento 60°C por 7 segundos. La adquisición de la fluorescencia se realizó al terminar cada ciclo de PCR. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Para el análisis de la expresión se determinó el ciclo donde inicia el aumento de la fluorescencia, denominado punto de corte (C_p

de crossing point) o ciclo de umbral (Ct de threshold cycle). Se identificó el Ct del gen de normalización, y se calculó el valor de $\Delta\Delta C_t$ en unidades relativas y el resultado se reportó como $2^{-\Delta\Delta C_t}$, para lo cual se usó el software del instrumento LightCycler (Roche) (Hernández y cols; 1994).

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de las regiones génicas.

Gen	Sentido	Antisentido
Genes de estudio		
$\Delta 5D$	5'- TTGGCCTGGATGATTACCTT-3'	5'-CTGTGTCACCCACACAAACC-3'
$\Delta 6D$	5'- ATCCCTTTCTACGGCATCCT-3'	5'-TAGGCCTCCTGGTCAATCTC-3'
Elovl-5	5'-GTGCACATTCCCTCTTGTT-3'	5'-TGGTCCTTCAGGTCCTCTTT-3'
Genes tejido específico		
α-LA	5'-CATAATGTGCCAAGAAGATCCT-3'	5'-GCCACTGTTCCAGCTTCTCAGT-3'
CAS-3	5'-CAACGGTGGACAGTGTAGTCA-3'	5'-AGGCAGACAAATGGCTGAAG-3'
Genes de referencia		
β-actina	5'-TGAATCCTGTGGCATCCATG-3'	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAG-3'
ARP	5'-GGCACCATTGAAATCCTGAGTGAT-3'	5'-TTGCGGACACCCTCCAGGAAGC-3'

*Wang Y y cols, 2006, ** Maningat y col, 2007, ***Diseñados con el programa [www.http://Primer3INPUT4.com.mx](http://Primer3INPUT4.com.mx). Desaturasa $\Delta 5$ ($\Delta 5D$), desaturasas $\Delta 6$ ($\Delta 6D$), elongasa 5 (Elovl-5), alfa lactoalbúmina (α -LA), caseína-3 (CAS-3) y proteína ácida ribosomal (ARP).

6. Análisis de composición de ácidos grasos de la leche materna.

Extracción de lípidos a partir de leche humana

Las muestras de leche se descongelaron a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron en baño maría a 37° C durante 15-20 minutos y se agitaron en vórtex hasta homogenizar la muestra. Seguido de este paso se agregó 1 ml de leche a un tubo cónico de vidrio de 50 ml (este paso se hizo por duplicado), posteriormente se agregaron 18 mL de la mezcla cloroformo-metanol (2:1) y se mezcló en vórtex durante 5 minutos. A continuación se le adicionaron 6 ml de solución NaCl al 0.7% y se mezcló nuevamente en vórtex. La muestra se centrifugó a 2600 rpm durante 20 minutos a 4°C, después se aspiró con vacío la capa superior (fase acuosa y remanente de proteínas que forman un anillo en la interfase). A continuación se transfirió una alícuota de 8 mL de la fase de cloroformo (capa inferior) a un tubo cónico de 15 ml previamente puesto a peso constante. Después, se evaporó el solvente a sequedad con corriente de gas nitrógeno en una campana de extracción (Modificado de Folch y cols, 1956). Finalmente, la cantidad de grasa extraída se calculó restando al valor del peso del tubo con los lípidos extraídos menos el peso del tubo vacío.

Metilación de ácidos grasos (ácido-básica)

El procedimiento que se desarrolló en este trabajo consiste básicamente en una reacción de transesterificación en medio alcalino seguida de una esterificación por catálisis ácida, al cual denominamos método combinado de metilación (Kramer y cols, 1997).

A partir de 0.5 gr de grasa obtenida en el paso anterior, se añadió 0.5 ml de tolueno seco (5M) y 1ml de una solución 0.5 N de metóxido de sodio disuelto en metanol. Posteriormente se agregaron 250 μ l de solución de ácido margárico como estándar interno en metanol (MetOH) 1mg/ml, se agitó durante 30 segundos y se incubó en un módulo de calentamiento (Pierce) a 55°C durante 20 minutos. Terminado el calentamiento, los viales se enfriaron a temperatura ambiente. Después de este paso, se agregó 1ml de una solución de trifluoruro de boro disuelto en metanol a una concentración de 14%. Se agitó durante 30 segundos y se colocó en el modulo de calentamiento en las mismas condiciones del punto anterior. Se dejó enfriar y se añadió 1ml de iso-octano y 4ml de solución saturada de NaCl (130 g en 500 mL de H₂O destilada). Posteriormente, se agitó durante 2 minutos y se centrifugó a 2500 rpm a 4°C durante 10 minutos. Finalmente, la fase superior se transfirió a viales color ámbar previamente pesados con tapón de rosca y septo de PTFE/silicón. Se dejó evaporar el solvente a sequedad con corriente de nitrógeno y se volvieron a pesar los viales para calcular el peso de los ésteres metílicos obtenidos. Con este peso se ajustó la concentración de grasa metilada a una concentración deseada de 2 mg/ml, para obtener picos de forma simétrica y bien definidos.

Las alícuotas de esta solución se usaron para la cuantificación de los ácidos grasos individuales por cromatografía de gases (Hewlett Packard 5890) equipado con un detector de ionización de flama. La separación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó en una columna BPX 70 (SGE Germany) de 100 m de longitud. La identificación de los ácidos grasos se llevó a cabo comparando con los tiempos de retención de estándares de ácidos grasos comerciales (Harris C; 2006).

Análisis estadístico

Los resultados se describieron con medidas de tendencia central y de dispersión. La expresión de las desaturadas y elongadas se compararon a lo largo del tiempo con ANOVA para mediciones repetidas. La asociación entre la expresión de las desaturadas y elongadas con la composición de LC-PUFAs se llevo a cabo con el coeficiente de correlación de Pearson.

La correlación de Pearson permite medir la fuerza de la relación lineal entre dos variables. El valor de correlación de -1 (sentido negativo) o $+1$ (sentido positivo) indica una correlación perfecta. Cuanto más cercanos al 0 sean los valores, indican una mayor debilidad de la relación o incluso ausencia de correlación entre las dos variables.

Resultados

Características demográficas de los sujetos de estudio

En este estudio participaron seis mujeres primigestas que cursaron embarazo normo evolutivo a término, con producto único. Las variables clínicas se muestran como promedios \pm desviación estándar. (Tabla 3). La duración del embarazo fue alrededor de las 39.8 semanas, la edad y estatura promedio fue de 28.4 años y 1.52 metros, respectivamente. El peso previo al embarazo fue de 58.8 kilogramos y el peso al final del mes 4 post-parto fue de 54.6 kilogramos. Los suplementos reportados por las mujeres de estudio durante la lactancia fueron el ácido fólico y el hierro (Tabla 3).

Tabla 3. Características demográficas de los sujetos de estudio

Variable	Promedio
Edad (años)	28.4 \pm 4.8
Talla (m)	1.52 \pm 0.1
Peso previo al embarazo (Kg)	58.8 \pm 9.2
Peso mes 4 post parto (Kg)	54.6 \pm 12.1
Gestación (semanas)	39.8 \pm 0.3
Suplementos	Acido fólico y sulfato ferroso

Cuantificación y pureza del ARN total

Uno de los pasos críticos para el éxito de los análisis realizados mediante PCR en tiempo real es la cantidad y calidad de las muestras del ARN total. La calidad del ARN total se mide en base a tres parámetros básicos: pureza (se considera que el cociente debe estar en un rango de 1.8-2.0 para ser consideradas óptimas), integridad (en el gel se deben observar dos bandas bien definidas que son características de los ARN ribosomales) y contaminación por ADN genómico (no se debe observar una banda arriba de las banda que corresponde al ARN ribosomal 28S).

Con la finalidad de determinar la concentración y pureza del ARN total obtenido de las muestras de glóbulos de grasa de la leche de mujeres, se llevó a cabo la cuantificación del ARN total en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 a una longitud de onda de 260nm.

La pureza del ARN total, con respecto a contaminación por proteínas, se determinó estableciendo la relación de absorbancia 260/280, lo que indica que el ARN total obtenido de las células epiteliales mamarias secretadas en los glóbulos de grasa cumplió con los requisitos necesarios para la posterior cuantificación de los transcritos de estudio. Los datos presentados en la tabla 4 son un ejemplo de la concentración y pureza de las muestras del ARN total.

Tabla 4. Concentración y pureza del ARN total obtenido de células epiteliales mamarias secretadas en glóbulos de grasa

Etapa de lactancia	ng/μl	260/280
Semana 1	379.0	1.94
Semana 2	919.9	1.92
Semana 3	621.4	1.90
Semana 4	555.8	1.88
Mes 2	506.5	1.88
Mes 3	474.7	1.89
Mes 4	243.2	1.84

Integridad del ARN

Como se mencionó anteriormente, es importante determinar la integridad del ARN total obtenido de los glóbulos de grasa ya que una integridad inadecuada puede afectar la eficiencia de la técnica de retrotranscripción y del PCR. Por lo tanto, la integridad de este ARN, fue analizada por electroforesis en gel de agarosa, visualizándose dos bandas bien definidas que son características de los ARN ribosomal (ARNr) 28S y 18S (Fig 8) (Schroeder y cols., 2006), lo cual nos indicó una adecuada integridad del ARN.

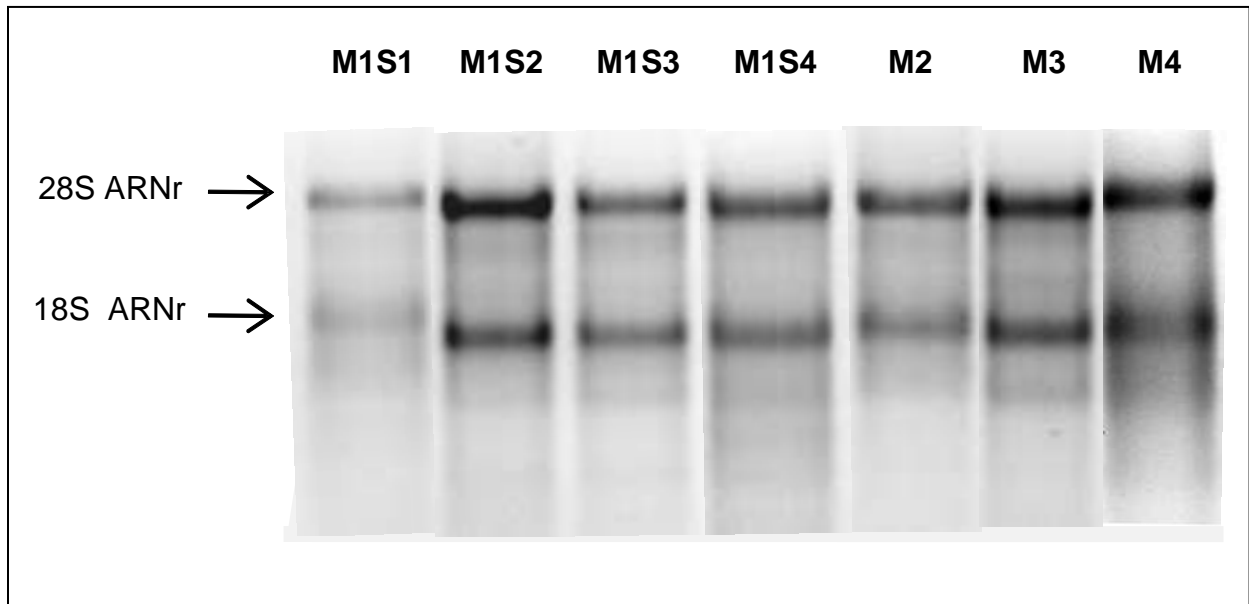


Fig 8. ARN total obtenido de glóbulos de grasa de células epiteliales mamarias. Gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio (10 mg/dL). M = mes, S = semanas.

Amplificación por PCR punto final

Para verificar la síntesis de cDNA de todas las muestras se realizó PCR punto final del gen endógeno β -actina. La figura 9 es un ejemplo de la amplificación del cDNA de una sola mujer durante los primeros cuatro meses de lactancia. Lo que se puede observar es un solo producto de PCR indicado por una sola banda intensa y bien definida que corresponde al tamaño esperado del amplicon de β -actina (320 pb). En ninguna corrida de electroforesis se observó contaminación del control negativo, lo que demostró la eficiencia de la reacción de PCR punto final.

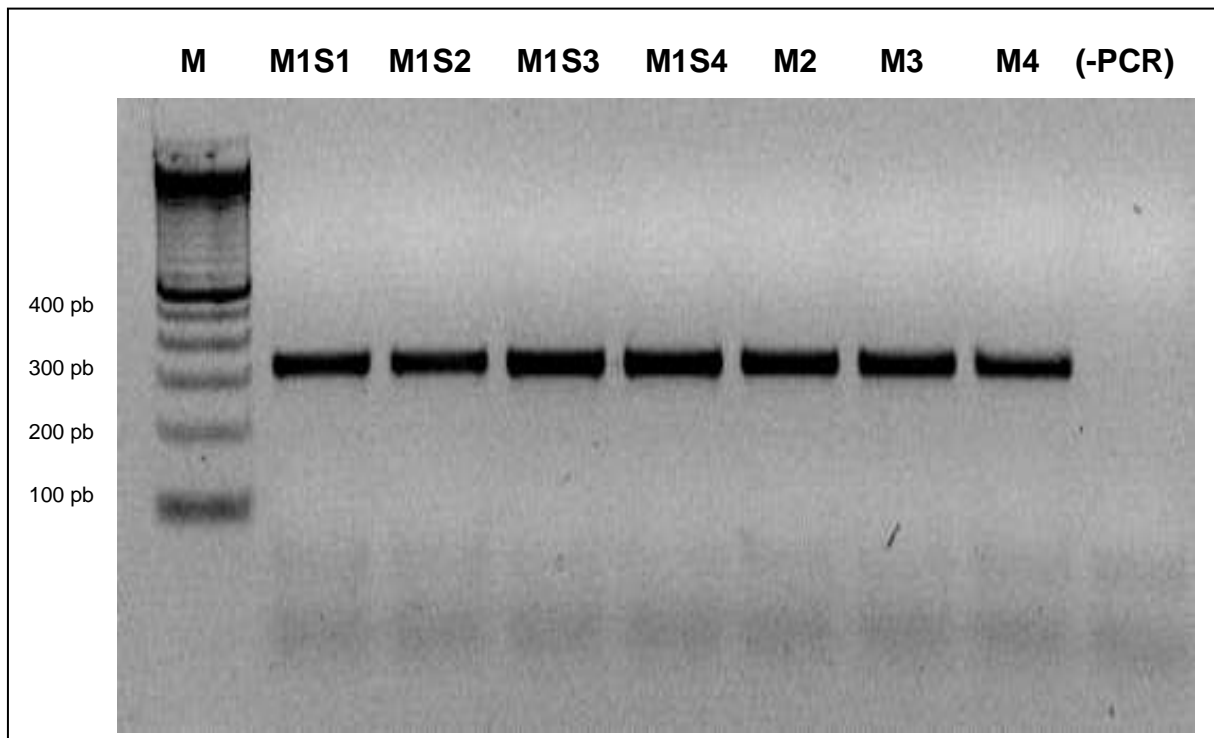


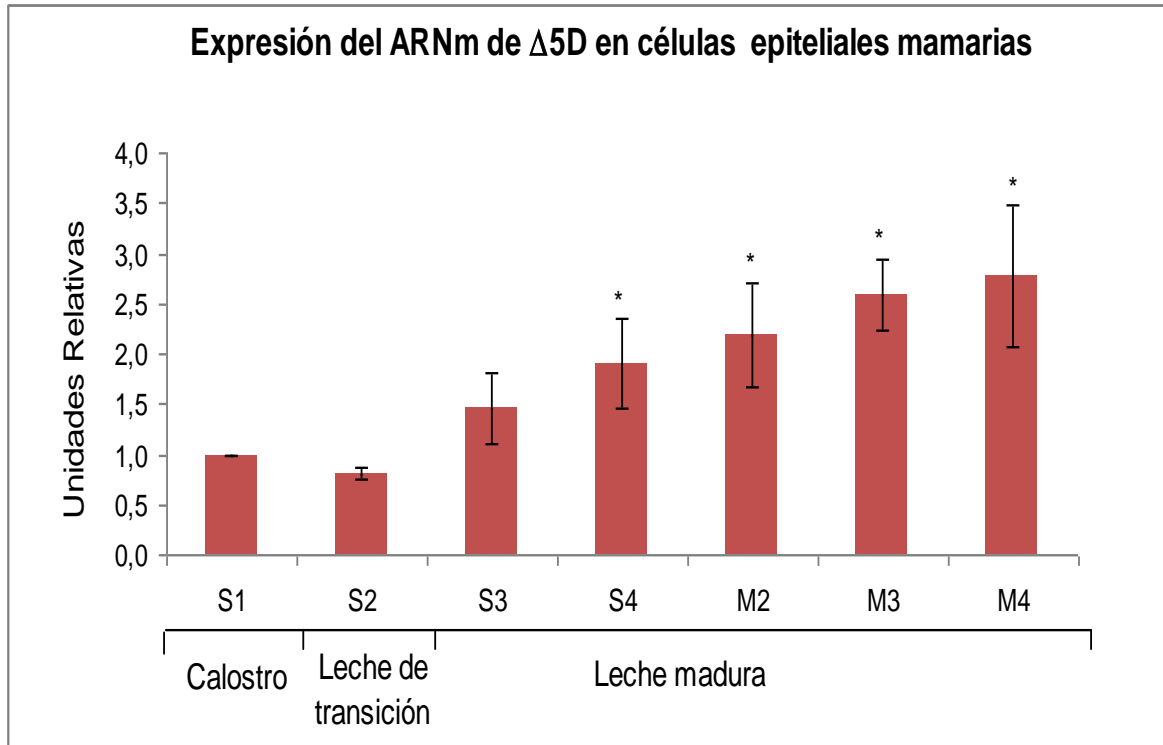
Fig 9. Producto de PCR del gen β -actina sometido a electroforesis a 90V durante 30 minutos. Gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (10mg/dL), se utilizó un marcador de 100 pares de bases (pb). S = semanas, M= mes, control negativo de PCR (PCR-).

Análisis cuantitativo de la expresión génica por PCR en tiempo real

Con la finalidad de cuantificar los transcritos $\Delta 5D$, $\Delta 6D$, *Elovl-5*, α -LA y *Cas-3* se llevó a cabo su amplificación por PCR en tiempo real. La cuantificación relativa nos indica el número de veces que el transcrito se expresa en relación a la muestra de referencia utilizada como control, que en este estudio es el calostro. Se utilizó el nivel de expresión del gen β -actina como gen referencial endógeno para normalizar el nivel de expresión de los genes de interés.

Expresión génica de la desaturasa $\Delta 5$

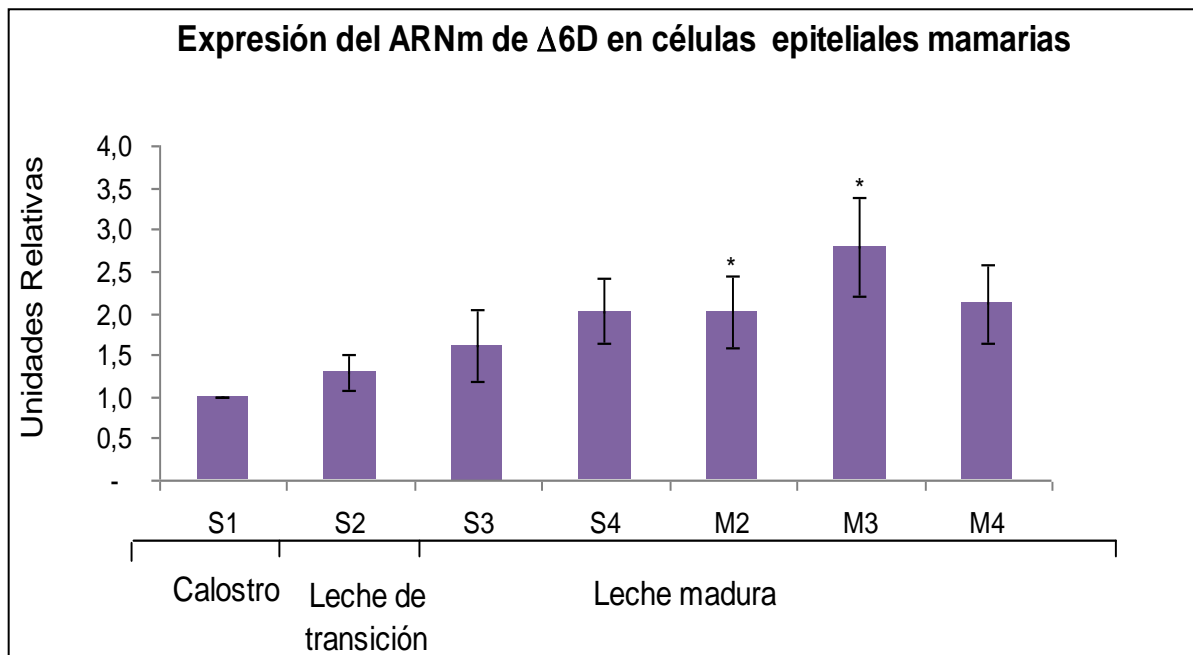
En la gráfica 1 se observó que el perfil de expresión de la $\Delta 5D$ incrementó de manera gradual durante los primeros cuatro meses de lactancia materna. A partir de la semana 4 de lactancia (leche madura) la expresión del transcrito fue de 1.9 veces más significativamente en comparación con el calostro (semana 1). Mientras que durante el mes 2 y 3 el incremento en la expresión fue 2.3 veces más en la leche madura en relación al calostro, identificándose una máxima expresión del ARNm de $\Delta 5D$ de 2.77 veces mayor en el mes 4 (leche madura) con respecto al calostro.



Gráfica 1. Expresión del ARNm de la $\Delta 5D$ en células epiteliales presentes en glóbulos de grasa de leche materna humana. Los niveles de expresión del ARNm de la $\Delta 5D$ en la leche de transición y leche madura se compararon con el calostro. Los datos son mostrados como promedio (\pm error estándar), S = semanas, M = mes. Prueba de ANOVA para mediciones repetidas, con post-prueba de Dunnet. *P < 0.05.

Expresión génica de la desaturasa $\Delta 6$

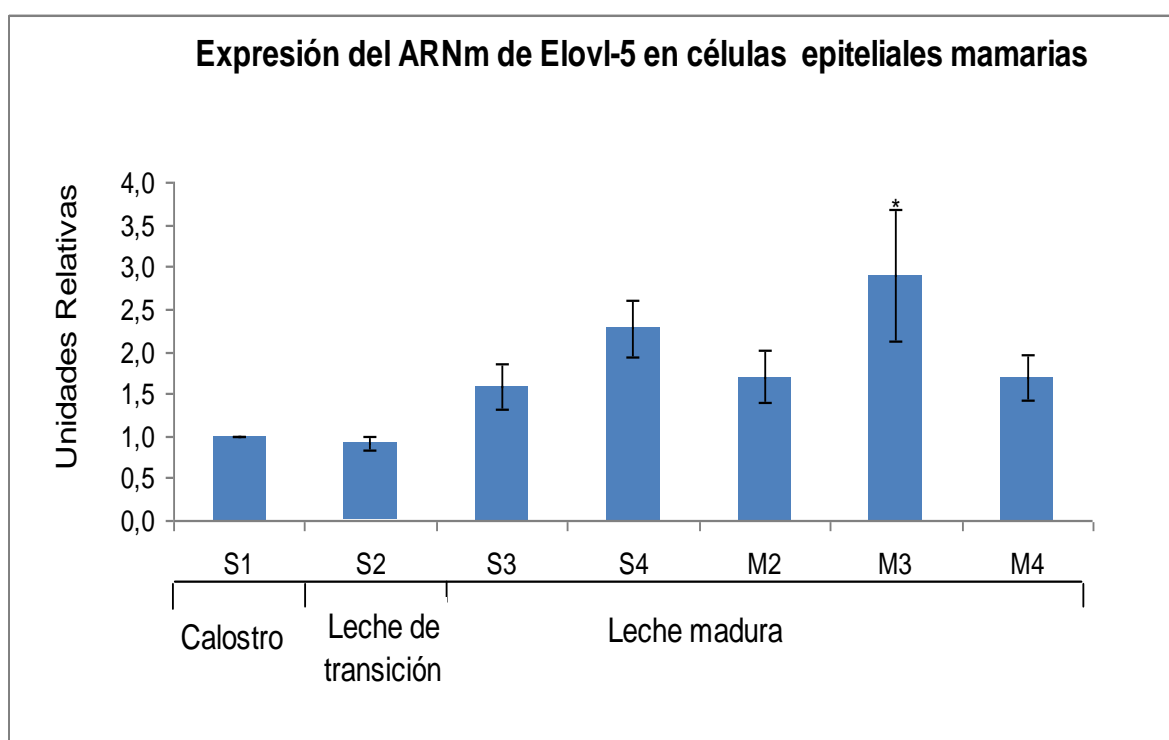
Aunque la expresión del ARNm de $\Delta 6D$ en células epiteliales mamarias incrementó a partir de la semana 2 de lactancia, etapa que también corresponde a la leche de transición este incremento fue significativo a partir del mes 2 (grafica 2). La máxima expresión del ARNm de la $\Delta 6D$ fue en promedio 2.7 veces mayor en el mes 3 de lactancia en la leche madura con respecto al calostro.



Gráfica 2. Expresión del ARNm de la $\Delta 6D$ en células epiteliales presentes en glóbulos de grasa de leche materna humana. Los niveles de expresión del ARNm de la $\Delta 6D$ en la leche de transición y leche madura se compararon con el calostro. Los datos son mostrados como promedio (\pm error estándar). S = semanas, M = mes. Prueba de ANOVA para mediciones repetidas, con post-prueba de Dunnet. *P < 0.05.

Expresión génica de la elongasa 5 (Elovl-5)

Aunque en la gráfica 3 se observa que la expresión del ARNm de la Elovl-5 incrementó a partir de la semana 3 (leche madura), éste fue significativo hasta el mes 3 de lactancia. Observándose que la máxima expresión fue en promedio 2.9 veces más con respecto al calostro.



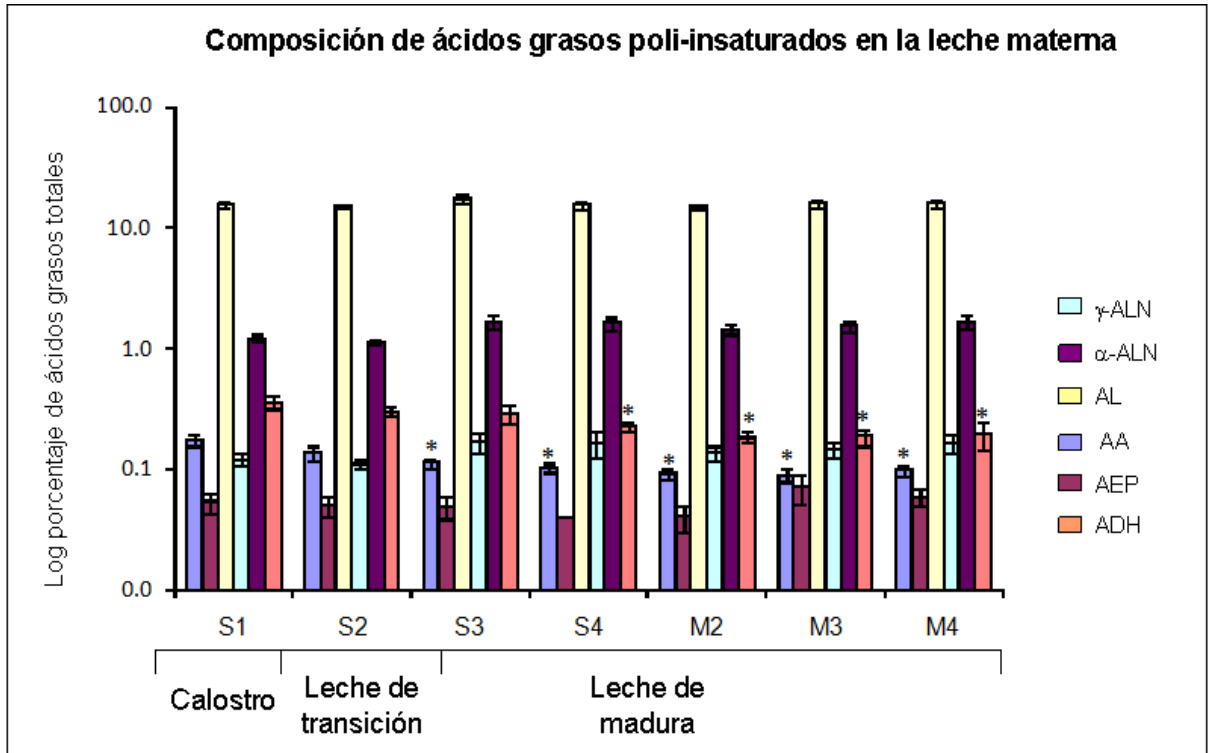
Gráfica 3. Expresión del ARNm de la Elovl-5 en células epiteliales presentes en glóbulos de grasa de leche materna humana. Los niveles de expresión del ARNm de la Elovl-5 en la leche de transición y leche madura se compararon con el calostro. Los datos son mostrados como promedio (\pm error estándar). S = semanas, M = mes. Prueba de ANOVA para mediciones repetidas, con post-prueba de Dunnet. *P < 0.05.

Análisis de composición de ácidos grasos

En este estudio, se determinó la composición de ácidos grasos totales en los distintos tipos de leche: calostro, la leche de transición y la leche madura durante los primeros cuatro meses de lactancia. Para esto, primero se extrajeron los lípidos mediante la técnica de Folch modificada, posteriormente los ácidos grasos fueron esterificados y finalmente el análisis de los mismos se hizo mediante cromatografía de gases.

Ácidos grasos poli-insaturados

En la gráfica 4 se observó que la proporción de los PUFAs como son el AL y α -ALN, precursores de los LC-PUFAs no cambiaron durante el transcurso de la lactancia. Sin embargo, la proporción de sus metabolitos como el ADH y AA disminuyeron de manera significativa durante el transcurso de la lactancia. La proporción de AA disminuyó 3% en la leche de transición y 8% en la leche madura con respecto al calostro, mientras que la proporción de ADH disminuyó 6% en la leche de transición y 14% en la leche madura en relación al calostro. Lo cual nos indicó que en el calostro hay una proporción más alta de LC-PUFAs y mientras transcurre el periodo de lactancia esta proporción disminuye en la leche madura. Por lo contrario, podemos observar que la proporción de AEP se mantiene constante durante los primeros cuatro meses de lactancia.



Gráfica 4. Composición de PUFAs y LC-PUFAs en la leche materna humana durante la secreción de calostro, leche de transición y leche madura. Con motivo de una mejor presentación de los datos, éstos se presentan en logaritmo y son mostrados como promedio (\pm error estándar) del total de ácidos grasos durante los diferentes tiempos de lactancia materna. Los datos de leche de transición y de leche madura se compararon con los de calostro. S = semanas, M = mes. Prueba de ANOVA para mediciones repetidas, con post-prueba de Dunnet. El símbolo * muestra diferencias significativas con una $p < 0.05$. Ácido linoléico (AL), ácido araquidónico (AA), ácido alfa-linolénico (α -ALN), ácido eicosapentaenoico (AEP) y ácido docosahexaenoico (ADH).

Asociación entre la expresión génica y la composición de LC-PUFAs en la leche

Para determinar si existe asociación entre la expresión de los transcritos que codifican para las enzimas que sintetizan los LC-PUFAs con la proporción de éstos en la leche materna, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson.

En la tabla 5 se observó que en la semana 2 de lactancia hay una asociación positiva entre la expresión de la $\Delta 5D$ con la proporción de AA, lo cual indica que cuando se secreta la leche de transición aumentó tanto la proporción de AA como la expresión del transcrito de la $\Delta 5D$. También en la semana 4 de lactancia se observó una asociación positiva entre la expresión la $\Delta 6D$ y AA, indicando que cuando se secreta leche madura, aumenta la expresión de la $\Delta 6D$ y como consecuencia también incrementa la proporción de AA. Estos resultados mostraron que en el mes 3 de lactancia existe una asociación positiva entre la expresión de la $\Delta 6D$ con la proporción de AEP. Esto sugiere que cuando incrementa la expresión de la $\Delta 6D$ también aumenta la proporción de AEP cuando se secreta la leche madura. Sin embargo, durante el mes 2 de lactancia se observó una asociación negativa entre la expresión del ARNm de Elovl-5 con la proporción de AEP, indicando que cuando se secreta la leche madura existe un incremento en la expresión del transcrito de Elovl-5 pero disminuye la proporción de AEP. También en el mes 3 de lactancia se observó una asociación negativa entre la expresión de la $\Delta 6D$ y Elovl-5 con la cantidad de ADH en la leche madura.

Tabla 5. Asociación entre la expresión de $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y Elovl-5 con la proporción de LC-PUFAs presentes en la leche.

	LoM1S2 AA	LoM1S4 AA	LoM2 AEP	LoM3 AEP	LoM3 ADH
LoM1S2 $\Delta 5D$ Correlación de Pearson Sig. (bilateral) (P)	0.869 ≤ 0.05				
LoM1S4 $\Delta 6D$ Correlación de Pearson Sig. (bilateral) (P)		0.933 ≤ 0.05			
LoM3 $\Delta 6D$ Correlación de Pearson Sig. (bilateral) (P)				0.928 ≤ 0.05	-1.000 ≤ 0.05
LoM2 Elovl-5 Correlación de Pearson Sig. (bilateral) (P)			-0.890 ≤ 0.05		
LoM3 Elovl-5 Correlación de Pearson Sig. (bilateral) (P)					-0.983 ≤ 0.05

Los datos se convirtieron a logaritmo y son mostrados como promedio (\pm error estándar) del total de ácidos grasos durante los diferentes tiempos de lactancia materna. N = 6 mujeres. Los resultados se analizaron con Coeficiente de correlación de Pearson (*) P < 0.05. S = semanas, M = mes. Logaritmo (Lo), Delta 5 desaturasa ($\Delta 5D$), Delta 6 desaturasa ($\Delta 6D$), Elongasa 5 (Elovl-5), Acido araquidónico (AA), Acido eicosapentaenoico (AEP), Acido docosahexaenoico (ADH).

Ácidos grasos mono-insaturados

En la tabla 6 se observó que el ácido graso mono-insaturado más abundante en los tres tipos de leche fue el ácido oleico (C18:1n9c). Del mismo modo, le sigue el ácido palmitoleico (C16:1) y el menos abundante fue el ácido eláidico isómero trans del ácido oleico (C18:1n9t).

Tabla 6. Composición de ácidos grasos mono-insaturados en la leche materna humana durante la secreción de calostro, leche de transición y leche madura

Ácido Graso	Calostro	Leche de transición		Leche madura			
	M1S1	M1S2	M1S3	M1S4	M2S4	M3S4	M4S4
	% de ácidos grasos totales						
C14:1	0.20 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.05	0.26 ± 0.06	0.28 ±0.05	0.29 ± 0.10	0.27 ± 0.03
C16:1	2.67 ± 0.79	2.85 ± 0.73	3.00 ± 0.70	2.76 ± 0.53	3.08 ± 1.02	3.18 ± 1.35	2.91 ± 0.87
C18:1n9t	1.83 ± 0.76	2.33 ± 1.94	1.65 ± 0.47	2.11 ± 0.87	2.17 ± 0.82	1.73 ± 0.49	1.80 ± 0.61
C18:1n9c	34.28 ± 4.19	34.66 ± 3.21	35.69 ± 5.41	36.49 ± 2.87	34.15 ± 2.14	34.78 ± 3.65	33.69 ± 3.56
C20:1n9	0.26 ± 0.05	0.30 ± 0.06	0.30 ± 0.04	0.32 ± 0.06	0.34 ± 0.07	0.33 ± 0.09	0.28 ± 0.04
C24:1n9	0.30 ± 0.12	0.20 ± 0.05	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.008
SUMA	39.54 ± 5.94	40.56 ± 6.03	41.01 ± 6.69	42.07 ± 4.42	40.14 ± 4.11	40.43 ± 5.72	39.07 ± 5.11

Los ácidos grasos mono-insaturados son mostrados como promedio (± D.E) del total de ácidos grasos durante los diferentes tiempos de lactancia materna. n = 6 mujeres. S = semanas, M = mes.

Ácidos grasos saturados

De los ácidos grasos saturados presentes en los tres tipos de leche se encontró que el ácido palmítico (C16:0) fue el más abundante, después el ácido esteárico (C:18) y el menos abundante el ácido araquídico (C20:0) (tabla 7 y 8).

Tabla 7. Composición de ácidos grasos mono-insaturados en la leche materna humana durante la secreción de calostro, leche de transición y leche madura

Ácido Graso	Calostro	Leche de transición		Leche madura			
	M1S1	M1S2	M1S3	M1S4	M2S4	M3S4	M4S4
% de ácidos grasos totales							
C8:0	0.14 ± 0.08	0.16 ± 0.07	0.16 ± 0.13	0.14 ± 0.07	0.20 ± 0.11	0.15 ± 0.08	0.18 ± 0.06
C10:0	0.67 ± 0.56	1.0 ± 0.36	1.11 ± 0.26	1.16 ± 0.23	1.12 ± 0.16	1.09 ± 0.27	1.12 ± 0.15
C12:0	4.0 ± 2.38	4.9 ± 1.81	4.79 ± 2.08	4.97 ± 1.66	4.64 ± 0.94	4.57 ± 1.49	5.08 ± 1.24
C14:0	5.48 ± 1.90	5.1 ± 1.61	4.74 ± 1.80	5.25 ± 1.22	5.13 ± 0.93	5.24 ± 1.43	5.56 ± 1.28
C15:0	0.35 ± 0.08	0.33 ± 0.06	0.31 ± 0.06	0.36 ± 0.07	0.39 ± 0.06	0.38 ± 0.11	0.34 ± 0.05
C16:0	24.37 ± 1.46	23.63 ± 1.98	21.23 ± 1.72	21.21 ± 1.23	23.62 ± 1.93	22.59 ± 2.34	22.95 ± 2.55
C18:0	5.93 ± 1.08	6.21 ± 1.41	5.37 ± 0.67	5.93 ± 0.27	6.71 ± 1.23	6.43 ± 0.51	6.40 ± 0.84

Los ácidos grasos saturados son mostrados como promedio (± D.E) del total de ácidos grasos durante los diferentes tiempos de lactancia materna. n = 6 mujeres. S = semanas, M = mes

Ácidos grasos saturados

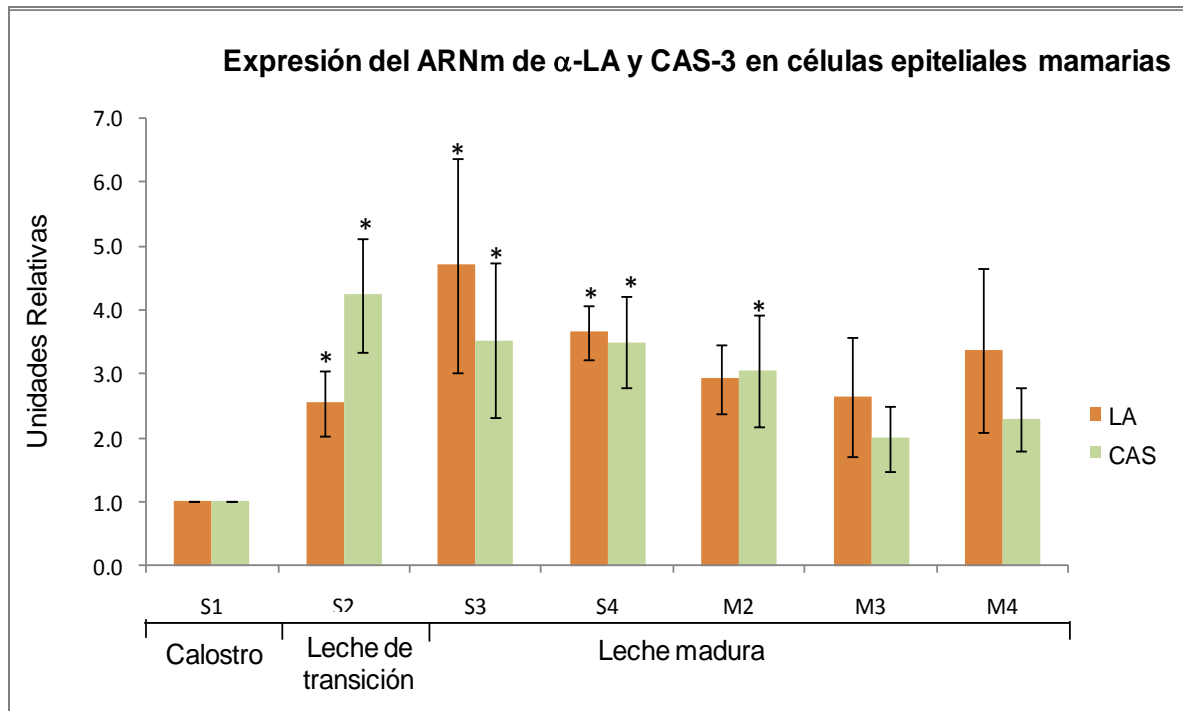
Tabla 8. Composición de ácidos grasos saturados en la leche materna humana durante la secreción de calostro, leche de transición y leche madura

Ácido Graso	Calostro	Leche de transición		Leche madura			
	M1S1	M1S2	M1S3	M1S4	M2S4	M3S4	M4S4
% de ácidos grasos totales							
C20:0	0.10 ± 0.01	0.13 ± 0.04	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.02
C21:0	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
C22:0	0.67 ± 0.10	0.54 ± 0.07	0.49 ± 0.06	0.45 ± 0.08	0.39 ± 0.05	0.37 ± 0.06	0.38 ± 0.06
C23:0	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.01
C24:0	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.08 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02
SUMA	42 ± 7.7	42.28 ± 7.48	38.71 ± 6.88	39.93 ± 4.89	42.66 ± 5.49	41.27 ± 6.38	42.46 ± 6.29

Los ácidos grasos saturados son mostrados como promedio (± D.E) del total de ácidos grasos durante los diferentes tiempos de lactancia materna. n = 6 mujeres. S = semanas, M = mes.

Expresión génica de α -lactoalbúmina (α -LA) y Caseína 3 (CAS-3)

En la gráfica 5 se observó que a partir de la semana 2 incrementó significativamente la expresión del ARNm de la α -LA y su máxima expresión fue de 4.7 veces más en la leche madura (semana 3) con respecto al calostro. También la expresión del ARNm de la CAS-3 incrementó significativamente a partir de la semana 2, presentando en este periodo su máxima expresión, la cual fue de 4.2 veces más en relación al calostro. Estos resultados indicaron que ambos genes se activan cuando se secretó la leche de transición y la expresión se mantuvo elevada durante el transcurso de la lactancia, cuando se secretó la leche madura. Estos hallazgos confirmaron que el ARN total extraído de los glóbulos de grasa proviene de células epiteliales (lactocitos) de la glándula mamaria.



Gráfica 5. Expresión del ARNm de la α -LA y CAS-3 en células epiteliales presentes en glóbulos de grasa de leche materna humana. Los niveles de expresión del α -LA y CAS-3 en la leche de transición y leche madura se compararon con los niveles de expresión en el calostro. Los datos son mostrados como promedio (\pm error estándar). S = semanas, M = mes. Prueba de ANOVA para mediciones repetidas, con post-prueba de Dunnet. *P < 0.05.

DISCUSIÓN

La lactancia es un proceso fisiológico de alta demanda metabólica, etapa en la cual la madre a través de la leche le provee al recién nacido los nutrimentos necesarios para un adecuado crecimiento y desarrollo durante el primer año de vida. Dentro de estos nutrimentos indispensables se encuentran los LC-PUFAs, entre ellos el AA y el ADH se encuentran en más del 30% de los ácidos grasos que forman los fosfolípidos de las membranas del sistema nervioso central, mientras que el 50% del ADH forma parte de la estructura de los bastones de la retina (Martínez y cols., 1992).

En el hígado tanto el AL (C18:2 ω -6) como el α -ALN (C18:3 ω -3) son desaturados y elongados a través de las desaturasas (Δ 5 y Δ 6) y elongasas (Elovl-2 y Elovl-5), para finalmente formar los LC-PUFAs (Anderson y cols; 2009). Estudios previos realizados en modelos tanto murino como humano han reportado que el hígado es el órgano principal de síntesis y actividad enzimática de las desaturasas y elongasas; sin embargo, Cho y colaboradores (1999 a y b) identificaron el transcrito que codifica para la Δ 5D y Δ 6D en tejidos extrahepáticos en humanos y rata. Los autores observaron que la cantidad del ARNm para ambas desaturasas tanto en el pulmón como en el corazón es comparable al que se presenta en el hígado. Con respecto a las elongasas, Wang y colaboradores (2005) reportaron que los transcritos de estas enzimas también se expresan en el hígado, pulmón, cerebro, tejido adiposo café, riñón, piel y corazón de rata. La identificación del transcrito de las desaturasas y elongasas en tejidos extrahepáticos sugiere que además del hígado, probablemente otros órganos tienen la capacidad de sintetizar LC-PUFAs n3 y n6.

En este contexto, Rodríguez y colaboradores (2006 y 2011) reportaron que el tejido mamario de ratas lactantes se expresan los transcritos de las enzimas que participan en la síntesis de los LC-PUFAs. Estos resultados indicaron que la glándula mamaria de rata tiene la capacidad de sintetizar LC-PUFAs. La mayoría de estas investigaciones se han realizado en modelos murinos debido a las limitaciones en la obtención de tejido mamario humano, en el presente estudio se reporta por primera vez la expresión de los transcritos de las enzimas que participan en la síntesis de los LC-PUFAs, en células epiteliales humanas obtenidas de los glóbulos de grasa de leche materna humana. Interesantemente, se observó que el perfil de expresión de estos transcritos varía dependiendo de la etapa de secreción de la leche materna, ya que a partir de la semana 4 de lactancia se incrementó significativamente la expresión del ARNm de $\Delta 5D$ (gráfica 1), lo cual sugiere que este gen se activa cuando se secreta la leche madura, mientras que la expresión de Elov1-5 incrementó en la semana 4, aunque de manera significativa hasta el mes 3 de lactancia (gráfica 3), lo cual está asociado con la secreción de la leche madura. Se sabe que la $\Delta 5D$, $\Delta 6D$ y Elov1-5 son enzimas clave para la síntesis de AA (20:4 n-3) y AEP (20:5 n-3) a partir de AL y α -ALN, respectivamente. En relación a la $\Delta 6D$, el transcrito incrementó su expresión a partir del mes 2 de lactancia, etapa en la cual también se secreta la leche madura. Cabe mencionar, que tanto la Elov1-2 como la $\Delta 6D$ son enzimas clave para la síntesis de ADH (22:6 n-3) a partir de AEP (20:5 n-3). Estos resultados son similares por lo reportado por Rodríguez y colaboradores (2011) donde observaron un incremento gradual en la expresión de ambas desaturasas ($\Delta 5$ y $\Delta 6$) y la Elov1-5

durante el transcurso de la lactancia en tejido mamario de rata. Cabe señalar que el ARNm de Elov-2 no fue detectable en las células epiteliales mamarias de la leche humana, estos resultados concuerdan por lo reportado por Rodríguez y colaboradores, donde observaron que la expresión de este gen fue mínima en tejido mamario de rata, por lo cual resta investigar los mecanismos de regulación de este gen durante el transcurso de la lactancia materna. Estudios previos realizados por Rodríguez y colaboradores., (2011) reportan que en cultivo de células epiteliales mamarias (lactocitos) de ratón, se expresa el ARNm de $\Delta 5D$, $\Delta 6D$, Elov1-2 y Elov1-5, tanto en lactocitos no secretores como en los secretores. Interesantemente se reportó que la expresión de estos genes incrementa cuando los lactocitos no secretores en la etapa de embarazo tardío se diferenciaron a lactocitos secretores durante el inicio de la lactancia (Rodríguez y cols., 2011).

De acuerdo con Lemay y colaboradores (2007) durante la lactancia hay un incremento de la lipogénesis, el cual está dado por una alta demanda de lípidos durante este periodo, Sauerwald y cols., (2001) han reportado que conforme avanza la lactancia, este incremento aumenta del 2% en el calostro hasta el 4% en la leche madura. En este estudio se observó que la proporción de ácidos grasos saturados y mono-insaturados permanecieron estables durante el transcurso de la lactancia, lo cual sugiere que estos no varían ya que aportan preferencialmente la fuente de energía para el recién nacido. Respecto a los resultados obtenidos al cuantificar los PUFAs, tanto el AL y α -ALN, permanecieron sin cambio durante el transcurso de la lactancia (gráfica 4 y tabla 6), lo cual sugiere que estos ácidos grasos permanecen

estables debido a la importancia que tienen en la síntesis de prostaglandinas, hormonas del crecimiento y la biosíntesis de los componentes de la membrana (Gurr 1992; Root 1992). La única fuente por la cual el recién nacido puede adquirir tanto los PUFAs como los LC-PUFAs es mediante la leche materna, ya que el recién nacido aún no es capaz de sintetizar la cantidad suficiente de LC-PUFAs. Con respecto a la proporción de los LC-PUFAs, se observó que la proporción de AA y ADH fue significativamente menor en la leche madura con respecto al calostro y la leche de transición. Estos resultados son similares a lo reportado en mujeres alemanas (Genzel y cols., 1997), australianas (Makrides y cols., 1995) y españolas (Puigmartí y cols., 2011) donde se reportó que durante los primeros 30 días postparto (leche madura), disminuye significativamente el porcentaje de ácidos grasos 20:4(n-3) y 22:6(n-3). Estos resultados, pueden ser explicados por diversos factores como son: la disminución de la biosíntesis de fosfolípidos en la glándula mamaria en etapas tardías de la lactancia, cambios en las necesidades fisiológicas del recién nacido durante la lactancia (Bitman y cols., 1983) y la variabilidad en el consumo de PUFAs por parte de la madre (Makrides y cols., 1995). En el presente estudio se sugiere que el incremento en la expresión ambas desaturasas estudiadas durante la secreción de leche madura, es un mecanismo de adaptación del organismo materno para incrementar la síntesis de LC-PUFAs en la leche, ya que estos tienen una función muy importante en el desarrollo neurológico y visual del recién nacido. Sin embargo, este mecanismo parece no ser suficiente para mantener la proporción adecuada de LC-PUFAs, ya que las cantidades de AA y ADH

detectadas en este estudio fueron aun menores que los reportados por Sauerwald y colaboradores (2001), estudio realizado en mujeres de diferentes países. Probablemente, conforme avanza la lactancia estos LC-PUFAs podrían estar regulando la expresión de las desaturasas y elongasas a través de un mecanismo de retroalimentación, donde la baja concentración del producto (LC-PUFAs) promueve la activación de las enzimas que los sintetizan y este mecanismo podría estar modulado por la expresión de SREBP-1c, el cual se ha reportado incrementa la expresión de la $\Delta 5D$ y $\Delta 6D$.

Además, estudios previos han reportado que mujeres que consumen una dieta deficiente en PUFAs durante la lactancia, la movilización de las reservas corporales de la madre pueden ser usadas como un suplemento adicional de PUFAs y LC-PUFAs. Sin embargo, Martin y colaboradores (Martin y cols., 1991), reportaron que en ratas lactantes el contenido de LC-PUFAs totales fue mayor en el calostro en comparación con el tejido adiposo, lo cual sugiere una capacidad limitada para almacenar estos LC-PUFAs y la necesidad de ser suplementados a través de la dieta o sintetizarlos a partir de sus precursores. También se ha reportado que la paridad es un factor que puede modificar la movilización de las reservas corporales y como consecuencia, la composición lipídica de la leche. Nommsen y colaboradores, reportaron que mujeres primigestas tenían niveles de lípidos mas altos que las mujeres multíparas (Nommsen y cols., 1991), ya que en cada embarazo se van agotando las reservas corporales, por tal motivo, en nuestro estudio se incluyeron

únicamente mujeres primigestas, para evitar variables de confusión en el análisis de composición de lípidos en la leche materna.

Con la finalidad de validar el estudio, se midió la presencia del transcrito que codifica a las proteínas α -LA y CAS-3 obtenido a partir de los glóbulos de grasa de la leche, lo que permitió demostrar que el ARN total que se purificó provino de células epiteliales mamarias (gráfica 5). En la actualidad no hay estudios que reporten el perfil de expresión de ambos transcritos durante el transcurso de la lactancia en el humano, sin embargo, se sabe que la α -LA, es una de las proteínas de la leche que se encuentra en mayor porcentaje (20-25% del total de proteínas) (Lönnerdal y cols., 2003) y se ha descrito que tiene diversas funciones fisiológicas en el periodo neonatal. Interesantemente, en este estudio se observó que a partir de la semana 2 de lactancia, incrementó la expresión del ARNm que codifica para la síntesis de α -LA, alcanzando su máximo en la semana 3 y permanece significativamente alta, con respecto a lo observado en el calostro, durante todo el estudio, lo cual sugiere que este gen se activa cuando se secreta la leche de transición, observándose la máxima expresión de α -LA durante la secreción de la leche madura. Estos resultados correlacionaron con la importancia de esta proteína en la síntesis de lactosa, ya que forma parte del complejo enzimático de la lactosa sintetasa, facilitando así la producción y secreción de leche durante el transcurso de la lactancia, etapa en la cual incrementan los requerimientos del recién nacido. Además, estudios previos han reportado la importancia que tiene la α -LA en la nutrición del recién nacido, facilitando la absorción de minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento

infantil. De manera similar la CAS-3 incrementó su expresión a partir de la semana 2 de lactancia y su máxima expresión fue en este periodo, lo cual indica que este gen se activa a partir de la secreción de la leche de transición y permanece elevada hasta la secreción de leche madura. Estudios previos han reportado la importancia de la CAS-3 también conocida como caseína *kappa* en diversos procesos fisiológicos. Ward y colaboradores, reportaron que en el intestino la proteína CAS-3 ingerida es dividida en dos péptidos: uno insoluble (caseína kappa) y un glicopéptido hidrofílico soluble (caseinomacropéptido), el cual incrementa la eficiencia del proceso de digestión, previene al neonato de hipersensibilidad a las proteínas que ingiere, y participa en la inhibición de patógenos gástricos (Ward y cols., 1997).

Conclusión

En los glóbulos de grasa de leche humana, se encuentran los transcritos provenientes de las células epiteliales mamarias y que codifican para las enzimas que participan en la síntesis de los LC-PUFAS. Durante la secreción de la leche madura se incrementa la expresión de estas enzimas para cubrir las necesidades de estos ácidos grasos impuestas por el recién nacido. Estos resultados sugieren que probablemente la glándula mamaria humana, en conjunto con el hígado participa en la síntesis de los ácidos grasos poli-insaturados; araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico en respuesta a su alta demanda para el desarrollo del neonato.

Perspectivas

A partir de los estudios y discusiones presentados en este estudio, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones.

En un primer plano estarían los trabajos destinados a determinar la participación de algunos factores de transcripción como SREBP-1c y PPAR- α , en la regulación de la expresión de las desaturasas ($\Delta 5$ y $\Delta 6$) y las elongasas (Elovl-2 y Elovl-5) durante el transcurso de la lactancia.

También es necesario identificar en población mexicana la presencia de SNP's en los genes que codifican para las enzimas $\Delta 5D$, $\Delta 6D$, Elovl-2 y Elovl-5, que podrían estar influyendo en la concentración de LC-PUFAs en la leche materna.

BIBLIOGRAFIA

Aguayo, J y Pitz P. 2001. La Lactancia Materna. En: Extracción y conservación de la leche materna. Ed. Sevilla. Pp. 342.

Aguilar, M.J. 2005. Lactancia Materna. En: Composición, Propiedades y Bioquímica de la leche humana. 1era edición. Ed. Elsevier España, Pp: 53-55.

Anderson B y WL D. 2009. Are all n-3 polyunsaturated fatty acids created equal? *Lipids in Health and Disease*, 8:33.1-20.

Aranceta, J y Serra, L. 2005. Leche, lácteos y salud. En: Aspectos saludables de los lácteos enriquecidos con ácidos grasos omega-3 y oleico. 1^{era} edición. Ed. Panamericana. Pp. 58.

Arrieta R, Cravioto J. 1985. Lactancia materna: Análisis crítico. DIF. México. Pp. 9-41.

Arterburn L M, Hall Bailey Eileen y Oken H. 2006. Distribution, interconversion, and dose response of n3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*, 83(suppl):1467S–76S.

Bellini MJ, Carino MH, Tacconi-Gómez Dumm N, Goya RG. 2007. Fatty acid profiles in hepatic membranes of rats with different levels of circulating estrogen and prolactin. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 146(4):470-4.

Bitman J, Wood L, Hamosh M, Hamosh P, Mehta NR. 1983. Comparison of the lipid composition of breast milk from mothers of term and preterm infants. *Am J Clin Nutr*. 38(2):300-12.

Bradbury J. 2011. Docosahexaenoic Acid (DHA): An Ancient Nutrient for the Modern Human Brain. *Nutrients*, 3, 529-554.

Campos G y Serra, J. 2010. Importancia del ácido docosahexaenoico (DHA): funciones y recomendaciones para su ingesta en la infancia. *An Pediatr.* 73(3):142.e1–142.

Casanueva E, Kaufer M, Bertha A. 2009. Nutriología Médica. En: Nutrición en el primer año de la vida. 3era edición. Ed. Panamericana. Pp.63.

Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-59.

Clarke SD. 2000. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Brit J Nutr.* 83: 59S–66S.

Consultado en: www.ensembl.org Fecha: 12/06/2011

Consultado en: www.pediatríaaldía.cl Fecha: 18/11/2011

Cordova, A. 2003. Fisiología dinámica. En: Embarazo, parto y lactancia. 1era edición. Ed. Masson. Pp. 660-63.

Chatterjee S, Szustakowski JD, Nanguneri NR, Mickanin C, Labow MA, Nohturfft A, Dev KK, Sivasankaran R. 2009. Identification of Novel Genes and Pathways Regulating SREBP Transcriptional Activity. *PLoS ONE* 4(4): e5197.

Cho HP, Nakamura M, Clarke SD. 1999a. Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase. *J Biol Chem.* 274(52):37335-9.

Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD. 1999b. Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase. *J Biol Chem.* 274(1):471-7.

Das UN. 2005. A defect in the activity of Delta6 and Delta5 desaturases may be a factor predisposing to the development of insulin resistance syndrome. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 72(5):343-50.

Farquharson J, Cockburn F, Patrick WA, Jamieson EC, Logan RW. Infant cerebral cortex phospholipid fatty-acid composition and diet. *Lancet* 1993; 430: 810–3.

Fernández-Cuesta V, Osman-Asmar A y Gómez J. 2008. Las 50 principales consultas en pediatría de atención primaria. En: Lactancia Materna. Pp.326.

Folch, J, Lees M y Stanley G. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226(1):497-509.

Genzel-Boroviczény O, Wahle J, Koletzko B. 1997. Fatty acid composition of human milk during the 1st month after term and preterm delivery. *Eur J Pediatr.*156(2):142-7.

Gonzalez M. 2006. Obstetricia. En: Parto Normal. 5ta edición. Ed. Masson. Pp. 350-53.

Guillot G. 2003. Enfermería maternal. En: Desarrollo prenatal humano. 1era ed. Ed. Masson. Pp. 105.

Harnack K, Andersen G, Somoza V. 2009. Quantitation of alpha-linolenic acid elongation to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid as affected by the ratio of n6/n3 fatty acids. *Nutr Metab (Lond).* 19; 6:8.

Harris, D. 2006. Análisis Químico Cuantitativo. En: Cromatografía de gases. 3a edición. Editorial Reverté. Pp. 599.

Hernández A, Vasallo P, Martín, Torres A, Salido E. 1994. Análisis del RNA: Estudio de la expresión génica. *Rev. Nefr,* 2:145-162.

Hernández, G. 2010. Tratado de Nutrición: Nutrición Humana en el estado de Salud. En: Nutrición del lactante. 2da edición. Ed. Rustica. Pp. 214-215.

Herrera CM, y León VS, Tolentino GR, Fernández GB y González DG. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. *REB* 25(3): 72-79

Horton, JD., Goldstein JL y Brown, MS. 2002. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J.Clin.Invest.* 109:1125–1131.

Hyekyung P, Cho, Manabu T. Nakamura, Steven D. Clark. 1999a. Cloning, Expression, and Nutritional Regulation of the Mammalian D-6 Desaturase. *JBC*, 1: 471–477.

Hyekyung P. Cho, Manabu Nakamura, Steven D. Clarke 1999b. Cloning, Expression, and Fatty Acid Regulation of the Human D-5 Desaturase. *JBC*, 52:37335–7339.

Iniesta R, GuinóE y Moreno V. 2005. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit.* 19(4):333-4.

Innis SM. Polyunsaturated fatty acid nutrition term gestation infants. In: Developing brain and behaviour; the role of lipids in infant formula. Dobbing J (Ed). London: Academic Press; 1997, p. 103–67.

Jakobsson A, Westerberg R y Jacobsson A. 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research*, 45: 237–49.

Jump, D. 2009. Mammalian fatty acid elongases. *Methods Mol Biol.* 579:375-89.

Jurkowski W, Roomp K, Crespo I , Schneider JG y and Del Sol A. 2011. PPARc population shift produces disease-related changes in molecular networks associated with metabolic syndrome. *Cell Death and Disease.*2, e192.

Kliewer S, Sundseth S, Jones S, Brown P, Wisely G, Koble C, Wahli P, Willson T, Lenhard J y Lehmann J. 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator– activated receptors α and γ . *Proc Nati Acad Sci*; 94: 4318–23.

Koolman J. 2005. Bioquímica: texto y atlas. 3era edición. Ed. Médica panamericana. Pp.48

Kramer JK, Fellner V, Dugan ME, Sauer FD, Mossoba MM, Yurawecz MP. 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. *Lipids*; 32(11):1219-28.

Lawrence R, Lawrence R M. 2007. Lactancia Materna. Una guía para la profesión médica. En: Anatomía de la mama humana. 6ta edición. Ed. Elsevier España, pp: 64-66.

Lemay DG, Neville MC, Rudolph MC, Pollard KS, German JB. 2007. Gene regulatory networks in lactation: identification of global principles using bioinformatics. *BMC Syst Biol*. 27; 1:56.

Leung AK, Sauve RS. 2005. Breast is best for babies. *J Natl Med Assoc*. 97(7):1010-9.

Li Y, Nara T y Nakamura M. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor α is required for feedback regulation of highly unsaturated fatty acid synthesis. *J Lipid Res*. 46(11):2432-40.

Lönnerdal B, Lien EL. 2003. Nutritional and physiologic significance of alpha-lactalbumin in infants. *Nutr Rev*. 61(9):295-305.

Macias M, Rodríguez S y Ronayne de F. 2006. Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Arch Argent Pediatr*, 104(5):423-430.

Majem L y Bartrina J. 2006. Nutrición y salud pública: métodos, bases científicas y aplicaciones. En: Lactancia materna y salud pública. 2da edición. Ed. Masson. Pp. 753-54.

Makrides M, Simmer K, Neumann M, Gibson R. 1995. Changes in the polyunsaturated fatty acids of breast milk from mothers of full-term infants over 30 wk of lactation. *Am J Clin Nutr*. 61(6):1231-3.

Maningat PD, Sen P, Snehag AL, Hadsell DL, Haymond MW. 2007. Regulation of gene expression in human mammary epithelium: effect of breast pumping. *J Endocrin*, 195:503-511.

Martinez M. 1992. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr*; 120: 129S-138S.

Martin JC, Niyongabo T, Moreau L, Antoine JM, Lanson M, Berger C, Lamisse F, Bougnoux P, Couet C. 1991. Essential fatty acid composition of human colostrum triglycerides: its relationship with adipose tissue composition. *Am J Clin Nutr*. 54(5):829-35.

Matais J y Gil A. 2004. Libro blanco de los omega-3: Los ácidos grasos poli-insaturados omega 3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud. En: *Metabolismo de los ácidos grasos*. 1^{era} edición. Ed. Panamericana. Pp. 44-47.

Matsumoto E, Ishihara A, Tamai S, Nemoto A, Iwase K, Hiwasa T, Shibata S y Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Yoshikawa T, Hasty AH, Tamura Y, Osuga J, Okazaki H, Iizuka Y, Takahashi A, Sone H, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. 2002. Dual regulation of mouse Delta (5) - and Delta(6)-desaturase gene expression by SREBP-1 and PPARalpha. *J Lipid Res*. 43(1):107-14.

Morales E, Bustamante M, Gonzalez J, Guxens M, Torrent M, Mendez M, Esteban R, Julvez J, Forn J, Vrijheid M, Puigmarti C, Sabater C, Estivill X y Sunyer J. 2011. Genetic Variants of the FADS Gene Cluster and ELOVL Gene Family, Colostrums LC-PUFA Levels, Breastfeeding, and Child Cognition. *PLoS ONE* 6(2): e17181.

Nakamura M, Nara T. 2002. Gene regulation of mammalian desaturases. *Biochem Soc Trans*, 30:1076-79.

Nara, T. Y., W. S. He, C. Tang, S. D. Clark, and M. T. Nakamura. 2002. The E-box like sterol regulatory element mediates the suppression of human delta-6 desaturase gene by highly unsaturated fatty acids. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 296: 111–17.

Naylor MJ, Oakes SR, Gardiner-Garden M, Harris J, Blazek K, Ho TW, Li FC, Wynick D, Walker AM, Ormandy CJ. 2005. Transcriptional changes underlying the secretory activation phase of mammary gland development. *Mol Endocrinol.* 19(7):1868-83.

Nommsen LA, Lovelady CA, Heinig MJ, Lönnerdal B, Dewey KG. 1991. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. *Am J Clin Nutr.* 53(2):457-65.

Peyron-Caso E, Fluteau-Nadler S, Kabir M, Guerre-Millo M, Quignard-Boulangé A, Slama G, Rizkalla SW. 2002. Regulation of glucose transport and transporter 4 (GLUT-4) in muscle and adipocytes of sucrose-fed rats: effects of N-3 poly- and monounsaturated fatty acids. *Horm Metab Res.* 34(7):360-6.

Pocock, Guillian y Richards, C.D. 2005. Fisiología Humana: La base de la Medicina. En: fecundación, embarazo y lactancia. 2da edición. Ed. Masson. Pp- 525-27.

Pollock CB, Yin Y, Yuan H, Zeng X, King S, Li X, Kopelovich L, Albanese C, Glazer RI. 2011. PPAR δ Activation Acts Cooperatively with 3-Phosphoinositide- Dependent Protein Kinase-1 to Enhance Mammary Tumorigenesis. *PLoS ONE* 6(1): e16215.

Pombo A, M. 1992. Manual de Pediatría Práctica. En: Alimentación durante los dos primeros años de vida. 4ta edición. Ed. Diaz de Santos, Pp. 187-88.

Puigmarti C, Plat J, Mensink R, Müller A, Jansen E, Zeegers M y Thijs C. 2010. FADS1 FADS2 gene variants modify the association between fish intake and the docosahexaenoic acid proportions in human milk. *Am J Clin Nutr,* 91:1368–76.

Qin Y, Dalen K, Gustafsson J y Nebb H. 2009. Regulation of hepatic fatty acid elongase 5 by LXR α –SREBP-1c. *Biochimica et Biophysica Acta,* 1791:140–47.

Rimoldi O, Finarelli G, Brenner R. 2001. Effects of diabetes and insulin on hepatic delta6 desaturase gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 283(2):323-6.

Rodríguez M, Tovar A, Del Prado M, Torres N. 2005. Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud. *Rev Invest Clin.* 57:457-72.

Rodríguez M, Tovar A, Palacios B, Del Prado M y Torres N. 2006. Synthesis of long-chain polyunsaturated lactating mammary gland: role of SREBP-1, PPAR α , and PGC-1. *J. Lipid Res.* 47: 553–60.

Rodríguez M, Sánchez R, Bernabé. M, Maldonado J, Del Prado M, López M. 2009. Effect of dietary levels of corn oil on maternal arachidonic acid synthesis and fatty acid composition in lacting rats. *Nutrition*, 25:209-15.

Rodríguez M, Sánchez R, Sánchez A, Kelleher S-L, Sánchez F, Maldonado J, López M. 2011. Participation of mammary gland in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis during pregnancy and lactation: Role of SREBP-1c, desaturases and elongases. *Nutrition*, 45:145-53.

Sauerwald TU, Demmelmair H, Fidler N, Koletzko B. 2001. Polyunsaturated fatty acid supply with human milk. *Lipids*. 36(9):991-6.

Stafford J, Villalpando S, Urquieta-Aguilar B. 1994. Circadian variation and changes alter a meal in volume and lipid production of human milk from rural Mexican women. *Ann Nutr Metab*, 38:232-37.

Schmidt VM, Brüne B y Knethen VA. 2010. The Nuclear Hormone Receptor PPAR γ as a Therapeutic Target in Major Diseases. *The Scientific World Journal* 10, 2181–97.

Sheila M. Innis. 2007. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66, 397–404.

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 31;7:3.

Takeuchi Y, Yahagi N, Izumida Y, Nishi M, Kubota M, Teraoka Y, Yamamoto T, Matsuzaka T, Nakagawa Y, Sekiya M, Iizuka Y, Ohashi K, Osuga J, Gotoda T, Ishibashi S, Itaka K, Kataoka K, Nagai R, Yamada N, Kadowaki T y Shimano H. 2010. Polyunsaturated Fatty Acids Selectively Suppress Sterol Regulatory Element-

binding Protein-1 through Proteolytic Processing and Autoloop Regulatory Circuit. *JBC*, 285 (15):11681–91.

Tvrđik P, Rolf W, Silve S, Asadi A, Jakobsson A, Cannon B, Loison G y and Jacobsson A. 2000. Role of a New Mammalian Gene Family in the Biosynthesis of Very Long Chain Fatty Acids and Sphingolipids. *The Journal of Cell Biology*, 149 (3): 707–17.

Valenzuela A., Nieto S. 2003. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Rev. chil. Pediatr*, 74(2): 149-57.

Ward TJ, Honeycutt RL, Derr JN. 1997. Nucleotide sequence evolution at the kappa-casein locus: evidence for positive selection within the family Bovidae. *Genetics*. 147(4):1863-72.

Wang Y, Botolin D, Christian B, Busik J, Xu J, Jump D-B. 2005. Tissue-specific, nutritional and development regulation of rat fatty acid elongases J. *Lipid Res*, 46:706-715.

Wang Y, Botolin D, Xu J, Christian B, Mitchell E, Jayaprakasam B, Nair MG, Peters JM, Busik JV, Olson LK, Jump DB. 2006. Regulation of hepatic fatty acid elongase and desaturase expression in diabetes and obesity. *J Lipid Res*. 47(9):2028-41.

Xie L e Innis S. 2008. Genetic Variants of the FADS1 FADS2 Gene Cluster Are Associated with Altered (n-6) and (n-3) Essential Fatty Acids in Plasma and Erythrocyte Phospholipids in Women during Pregnancy and in Breast Milk during Lactation. *J. Nutr.* 138: 2222–228.

Zhou L y Nilsson A. 2001. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J Lipid Res*. 42(10):1521-42.