

INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE ACIDOS GRASOS POLIINSATURADOS OMEGA 6 DIETETICOS, EN LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS ASOCIADAS A LA FUNCION DE LA MEMBRANA MITOCONDRIAL DE HIGADO Y PLACENTA DE RATAS¹

Julia Araya², Ana María Aguilera³, y Cleofina Bosco⁴

**Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Santiago, Chile**

RESUMEN

Ratas hembras vírgenes, cepa Wistar, se dividieron en tres grupos de 18 animales cada uno. Un grupo fue alimentado con una dieta que aportaba 45% de las calorías como grasa (45 g%), otro se alimentó con una dieta baja en grasa (15 g%), y el tercero sirvió como testigo. Para ambos niveles, alto y bajo, la relación ácidos grasos poliinsaturados a saturados (P/S) se ajustó a 2.0 sustituyendo los ácidos grasos saturados por aceite de maíz (Omega 6). A un grupo control se le ofreció una dieta preparada con 30% (30 g%) de las calorías grasas, con una relación P/S de 1.0. Cada grupo consumió sólo una de la dietas desde antes, y durante la preñez. A los 20 días de edad gestacional todas las ratas fueron sacrificadas y se les extrajeron los fetos, placentas, e hígado materno, y se aislaron las membranas mitocondriales de placenta e hígado. Luego se analizó la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos mitocondriales y la actividad de citocromo-c-oxidasa en la membrana interna, y de NADH citocromo o reductasa insensible a la rotenona en la membrana mitocondrial externa. La citocromo-c-oxidasa se vio activada por el aumento de los Omega 6 en los fosfolípidos, originado por la dieta de 45 g% P/S 2. La actividad de NADH citocromo-c- reductasa se redujo en el grupo que recibió 15 g%, P/S 2, y en ese grupo no se alteró la actividad de citocromo-c-oxidasa en relación al grupo control.

Manuscrito modificado recibido: 16-04-90.

- 1 Apoyado financieramente por el Departamento Técnico de Investigación de la Universidad de Chile, Proyecto N° 2669-8822.
- 2 Profesor Titular de la Universidad de Chile y Director del Departamento de Nutrición, Independencia 1027, 2°P, Santiago, Chile.
- 3 Tesista del citado Departamento.
- 4 Profesor Auxiliar de la Universidad de Chile.

En peso fetal del grupo de madres que consumió 45 g% P/S 2, experimentó un significativo aumento ponderal en relación a los otros dos grupos.

Este estudio indica que dietas análogas en el contenido de grasa y poliinsaturados Omega 6 a los potencialmente consumidos por humanos, pueden inducir cambios en los constituyentes estructurales de las membranas y en las funciones de las proteínas lípido-dependiente de membrana. Por lo tanto, se postula que un aumento de los poliinsaturados 6 en los fosfolípidos de la membrana mitocondrial favoreció la función celular de los órganos estudiados, reflejándose en el estímulo del crecimiento uterino fetal.

INTRODUCCION

Durante la preñez, los ácidos grasos poliinsaturados son indispensables para la síntesis de fosfolípidos de las membranas celulares de la placenta y del feto. Además, son el sustrato necesario para la síntesis de prostaglandinas mediadoras de las contracciones uterinas y maduración cervical (1). Los ácidos grasos poliinsaturados han demostrado ser esenciales, particularmente en las funciones de las membranas mitocondriales del hígado (2).

Se ha comunicado que la biogénesis de los lípidos de las membranas se ve afectada por los ácidos grasos derivados de los lípidos dietéticos (3). Un aumento del grado de insaturación de los ácidos grasos incorporados a los fosfolípidos aumentó la fluidez de la membrana (4), e inversamente, la fluidez de la membranas disminuyó cuando a sus fosfolípidos se incorporaron ácidos grasos saturado (5). Robblee y Clandinin (6), han demostrado que la actividad de la ATPasa mitocondrial del corazón de rata puede ser alterada por los cambios en la composición lipídica de estas membranas.

Con estos antecedentes en mente, se estudió el efecto de alimentar a ratas preñadas con dietas con diferentes contenidos de grasa y ácidos grasos poliinsaturados de origen vegetal Omega 6, en la actividad de enzimas asociadas a la función de membranas mitocondriales de hígado y placenta. Un segundo objetivo fue determinar si las actividades enzimáticas mitocondriales correlacionan con la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membranas y su efecto en el crecimiento fetal.

MATERIAL Y METODOS

Dietas y Animales

Dietas — Se prepararon tres dietas similares en el contenido de nutrientes no grasos expresados por 1,000 kcal, pero diferentes en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados Omega 6 según se detalla en la Tabla 1. Las dietas contenían 45%, 30% ó 15% de las calorías como grasa. Para el nivel de 45% y 15% la relación poliinsaturado a saturado (P/S) se ajustó a dos, utilizando aceite puro de maíz y sebo de vacuno. Para el nivel de 30%, el P/S fue de uno, similar a lo recomendado para consumo humano. Las dietas se prepararon diariamente, y el incremento en el contenido de poliinsaturados de la dieta se acompañó con adecuadas cantidades de vitamina E (0.4 mg de vitamina E por gramo de poliinsaturado).

TABLA 1
COMPOSICION DE LAS DIETAS*

G% ^a	45	15	30
P/S ^b	2	2	1
Aceite de maíz	175.0	45.5	57.0
Sebo de vacuno	75.0	19.5	93.0
Aporte ácido linoleico	(87.5)	(22.7)	(28.5)
Caseína	289.25	289.25	289.25
DL-metionina	0.75	0.75	0.75
Maicena	210	210	210
Glucosa	100	180	150
Almidón	50	155	100
Mezcla mineral	50	50	50
Mezcla vitamínica	50	50	50
Suplemento vitamina E	0.050	0.013	0.019
Calorías/g (kcal)	4.85	3.92	4.10

* Gramos por kg de dieta.

a Porcentaje de las calorías grasas.

b Relación poliinsaturado-saturado.

() Contenido de linoleico aportado por la mezcla de aceite de maíz-sebo de vacuno.

Animales — Ratas hembras vírgenes, cepa Wistar, con un peso promedio inicial de 80 ± 4 gramos, se dividieron en tres grupos de 18 ratas cada uno. Desde entonces y durante toda la experiencia cada grupo recibió *ad libitum* una sola dieta: alta en grasa (45% P/S 2) o baja en grasa (15% P/S 2), y al grupo control se le ofreció la dieta con 30% P/S 1. Cuando las ratas de los tres grupos lograron pesos de 150 ± 6 g, se cruzaron con machos controles, previa detección de la fase proestro en frotis vaginal. El macho permaneció solo 8 horas con la hembra, contándose como día 0, el momento en que se aisló al macho.

Las ratas preñadas volvieron a sus jaulas individuales y siguieron consumiendo la misma dieta que se les había ofrecido desde el comienzo. El agua de bebida, al igual que las dietas, se suministró diariamente, y su consumo fue voluntario. Las condiciones del vivero eran 25°C, 75% de humedad, 12 horas de luz y 12 horas de obscuridad.

A los 20 días de edad gestacional todas las ratas fueron sacrificadas por decapitación, desangrándolas de 10 a 20 segundos. Se extrajeron de inmediato los fetos, placentas e hígados, y se pesaron.

Los hígados separadamente de las placentas de cada rata se homogeneizaron en sacarosa 0.25% a 0° C al 10% peso/vol.

Preparación de Membranas Mitocondriales

Las mitocondrias fueron aisladas por centrifugación diferencial de los respectivos homogeneizados en sacarosa 0.25 M, en una Sorvall RC2-B a 0° C. Después de sedimentar la fracción nuclear a 600 g x 15 min, las mitocondrias

fueron separadas a partir del sobrenadante por centrifugación a 6,500 g por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el pellet se lavó dos veces con sacarosa 0.25 M. El pellet de mitocondrias lavado se dividió en dos fracciones, una se congeló a -80°C para analizar posteriormente la composición de los fosfolípidos de las membranas, y la otra se suspendió de inmediato en buffer tris-fosfato 10 mM a pH 7.5. Luego, la suspensión se diluyó a 1/3 de su volumen con sacarosa 1.8 M que contenía ATP 2 mM y MgSO_4 2 mM. Después de 10', las suspensiones de mitocondrias fueron sonicadas brevemente (15 s) en un sonicador Branson. Esta preparación fue entonces depositada sobre una solución de sacarosa 1.18 M y centrifugada en una Spinco a 24,000 rpm. por 3 horas, con el propósito de separar membrana mitocondrial, interna y externa.

Ensayos

Se estudió la actividad de citocromo-c-oxidasa (E.C.1.9.3.1) en membrana mitocondrial interna, y la actividad de NADH citocromo-c-reductasa (E.c.1.6.2.1.) insensible a la rotenona en membrana mitocondrial externa según Sottocassa *et al.* (7).

Las actividades enzimáticas se midieron siguiendo la oxidación (citocromo-c-oxidasa) o reducción (NADH cit.-c-reductasa) del citocromo c a 550 m μ y a 30°C . La actividad se expresó en μmoles de sustrato oxidado o reducido por mg de prot $^{-1}$ por minuto $^{-1}$. La proteína de fracción submitocondrial se determinó según Lowry y colaboradores (8).

Extracción y Separación de Lípidos

La fracción mitocondrial que fue congelada a -80°C se homogeneizó en una mezcla de cloroformo: metanol (1:2) vol/vol que contenía, además, 0.1 mM de tocoferol y 0.001% de B.H.T. Los lípidos se extrajeron de acuerdo con el método de Kates (9). Se separaron los fosfolípidos por cromatografía en capa fina sílica gel h Merck N $^{\circ}$ 5721 y 5724, según Yamaoka, Urade y Kito (10). Las placas se secaron para eliminar el solvente. Después de raspar las respectivas áreas desde las placas de sílica gel, los ácidos grasos incorporados a los fosfolípidos se metilaron con metanol: trifluoruro de boro, de acuerdo con la técnica de Morrison y Smith (11). Los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron cuantificados en un cromatógrafo gas-líquido Shimadzu GC 9 A Kyoto, Japón, con un flujo de N_2 de 60 ml/min y con una temperatura programada de 160 a 240°C . Se usaron mezclas conocidas de ésteres metílicos de ácidos grasos como estándar.

Análisis Estadístico

Todos los resultados se informan como promedios \pm una desviación estándar. Las diferencias entre los promedios se analizaron según la prueba "t" de Student.

RESULTADOS

Actividad de enzimas — En la Tabla 2 se expone la actividad de citocromo-c-oxidasa, expresada por mg de proteína⁻¹ por minuto⁻¹ en la membrana mitocondrial interna de hígado y placenta de ratas con 20 días de edad gestacional. Según se observa, la actividad de la enzima en hígado y placenta fue significativamente mayor en el grupo que consumió la dieta con el contenido más alto de lípidos (45 g%) y con una alta relación P/S de 2. No se observaron diferencias entre los grupos que consumieron las dietas con 30% y 15% de las calorías por lípidos.

TABLA 2

ACTIVIDAD DE CITOCROMO-C OXIDASA EN MITOCONDRIAS
DE HIGADO Y PLACENTA DE RATAS PREÑADAS.
EFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE GRASA Y DE
POLIINSATURADOS OMEGA 6 DIETETICOS

Grupos	*Hígado	*Placentas
G% 45 P/S 2	^o a 0.55 ± 0.2	c 0.53 ± 0.1
G% 15 P/S 2	b 0.40 ± 0.1	d 0.27 ± 0.1
G% 30 P/S 1	b 0.39 ± 0.04	d 0.29 ± 0.2

* μ moles de citocromo c oxidado a 550 λ por minuto a 30° C por miligramo de proteína de membrana interna mitocondrial.

^o Valores promedio \pm desviación estándar de 18 diferentes preparaciones para cada promedio.

a Los valores promedio con diferente letra son significativamente diferentes (P < 0.001).

La actividad de NADH citocromo-c-reductasa insensible a la rotenona en subfracción mitocondrial de hígado y placentas determinadas en los tres grupos experimentales se muestran en la Tabla 3. Puede advertirse que la actividad de esta enzima no se modificó en el grupo con 45% y P/S respecto al control (30% P/S 1), pero en ambas fue significativamente superior tanto en hígado como en placentas al ser comparadas con la actividad de la enzima del grupo que consumió dieta con 15% de las calorías grasas y con un P/S de 2.

TABLA 3

**ACTIVIDAD DE CITOCROMO-C REDUCTASA INSENSIBLE
A LA ROTENONA EN MITOCONDRIAS DE HIGADO Y PLACENTAS
DE RATAS. EFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE GRASA Y
DE POLIINSATURADOS OMEGA 6 DIETETICOS**

Grupos	*Hígado	*Placentas
45% 45 P/S 2	^o a 1.92 ± 0.8	a 0.39 ± 0.2
15% 15 P/S 2	b 1.21 ± 0.5	b 0.17 ± 0.05
30% 30 P/S 1	a 2.30 ± 0.7	a 0.39 ± 0.2

* μ moles de citocromo reducido a 550 λ por minuto a 30° C por miligramo de proteína de membrana externa mitocondrial.

^o Valores promedio \pm desviación estándar de 18 diferentes preparaciones.

Los valores promedio acompañados de diferente letras son significativamente diferentes ($P < 0.001$).

Composición de los Ácidos Grasos de los Fosfolípidos Mitocondriales de Placenta

La composición de los ácidos grasos incorporados a los fosfolípidos de mitocondrias de las placentas de ratas alimentadas con distintos niveles de lípidos y de ácidos grasos poliinsaturados Omega 6, se informa en la Tabla 4. Puede apreciarse que el contenido de Omega 6 fue significativamente superior en el grupo que consumió la dieta con 45% (P/S 2) que en el grupo con 30% (P/S 1) y, en éste, significativamente superior que en el grupo que consumió la dieta con 15% (P/S 2), demostrando así que la composición de los ácidos grasos de los fosfolípidos fue afectada por la dieta. Se indica, además en la misma Tabla 3, que el ácido linolénico y sus derivados estaban significativamente disminuidos en el grupo con alto consumo de Omega 6.

Ganancia de Peso Materno y Peso Fetal

Al final de los 20 días de preñez la ganancia ponderal de las madres preñadas fue similar en los grupos que consumieron las dietas con 45% y 30% de las calorías grasas, y en ambas la ganancia fue significativamente mayor que la del grupo alimentado con 15% (Tabla 5).

Los tres grupos consumieron diariamente cantidades similares de energía expresada como kcal/100 gramos de rata. El grupo alimentado con la dieta con bajo aporte graso (15% P/S 2) consumió más de la dieta (g/100 g rata), que los otros dos grupos. El peso de los fetos del grupo de preñadas que ingirieron la

TABLA 4

COMPOSICION DE LOS ACIDOS GRASOS INCORPORADOS A LOS FOSFOLIPIDOS DE MITOCONDRIAS DE LAS PLACENTAS DE RATAS ALIMENTADAS CON DISTINTOS NIVELES DE GRASA Y DE POLIINSATURADOS OMEGA 6

Acido graso*	45% P/S 2	30% P/S 1	15% P/S 2
Saturados	^o 2.06 ± 0.41	2.86 ± 0.41	2.03 ± 0.42
Monoinsaturados	0.90 ± 0.18	1.20 ± 0.21	1.70 ± 0.48
Linoleico	^a 2.60 ± 0.10	^b 1.02 ± 0.16	^c 0.41 ± 0.11
Araquidónico	^a 1.80 ± 0.11	^a 1.02 ± 0.16	^b 0.53 ± 0.11
Linolénico	Tr	^b 0.10 ± 0.01	^b 0.07 ± 0.02
Derivados linolénico	^a 0.01 ± 0.001	^b 0.45 ± 0.10	^a 0.06 ± 0.03
Total Omega 6	^x 4.40 ± 0.20	^y 2.04 ± 0.18	^z 0.94 ± 0.15
Fosfolípidos mcg/mg de proteína mitocondrial	217 ± 10.6	201 ± 15.0	197.7 ± 13.3

* Acidos grasos incorporados a los fosfolípidos de membrana, expresados en mg por g de grasa mitocondrial.

° Valores promedio ± desviación estándar de 6 distintas preparaciones de mitocondrias placentarias en cada grupo.

Los promedios que se acompañan de diferentes letras son estadísticamente diferentes ($P < 0.01$) a, b, c; ($P < 0.001$) x, y, z.

Tr = Trazas.

dieta con 45% de las calorías grasas, fue significativamente diferente ($P < 0.001$) si se comparan con el peso fetal de los otros dos grupos.

DISCUSION

La extensión de la modificación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana mitocondrial de hígado y placenta de rata en respuesta a la cantidad y tipo de los ácidos grasos dietéticos, concuerda con los hallazgos informados en otras investigaciones y en otros órganos de rata (12, 13, 16). En este estudio, la dieta alta en poliinsaturados (45%) Omega 6 dio como resultado un aumento de la actividad mitocondrial de citocromo-c-oxidasa, sin afectar la actividad de NADH citocromo-c-reductasa insensible a la rotenona. Aunque la dieta baja en grasa (15%), no alteró la actividad de citocromo-c-oxidasa, redujo a la mitad la actividad de NADH citocromo-c-reductasa en relación al grupo con 30% y 45% de las calorías grasas en hígado y placenta.

Cuando el efecto de la dieta con 30% y P/S 1 —que refleja el nivel recomendado para uso humano— se compara con el efecto de los otros dos

TABLA 5

**INGESTA Y GANANCIA DE PESO MATERNO Y PESO FETAL
A LOS 20 DÍAS DE EDAD GESTACIONAL, EN RATAS**

<i>Dieta</i>			
G%	45	30	15
P/S	2	1	2
<i>Ingesta</i>			
	^o a	a	b
(g/100 g)	5.1 ± 0.93	6.1 ± 0.53	6.7 ± 0.21
(kcal/100 g)	24 ± 2.0	27 ± 1.3	22 ± 2.0
<i>Δ Peso</i>			
Ganancia de peso Materno + crías (g)	a	a	b
	125 ± 25	132 ± 19	59 ± 6.8
<i>Peso fetal (g)</i>			
^{oo} 1 cría	a	b	b
	4.78 ± 0.30	3.56 ± 0.25	3.38 ± 1.09

^o Valor promedio ± desviación estándar de 18 ratas por grupo.

Los valores promedio que se acompañan de diferentes letras son significativamente diferentes (P<0.01).

^{oo} El número de crías a los 20 días de edad gestacional fue similar en las ratas preñadas de los tres grupos (9 crías por camada).

niveles (45% y 15% P/S 2), se observa que estos dos niveles alteraron de manera diferente la actividad de enzimas mitocondriales estudiadas. Como las dietas formuladas contenían los mismos nutrientes esenciales por caloría, se observó que a medida que la grasa poliinsaturada aumentaba en la dieta, la incorporación de ellos (en este caso Omega 6), a los fosfolípidos de membranas se elevó y se estimuló la actividad de la enzima asociada a la membrana interna mitocondrial. Cuando los poliinsaturados y el aporte de grasa dietética disminuyeron, sólo se afectó la enzima de membrana externa mitocondrial, asociada a una menor incorporación de los Omega 6 a los fosfolípidos y a un estímulo a la incorporación de monoinsaturados.

Las enzimas mitocondriales sometidas a ensayo respondieron de manera diferente a los tratamientos dietéticos. Esto podría atribuirse a la distinta ubicación morfológica de las dos enzimas en la misma membrana. Mientras la citocromo-c-oxidasa está localizada en la membrana interna, la NADH citocromo-c-reductasa insensible a la rotenona es una enzima de la superficie de la mitocondria. Yamaoka, Urade y Kito (10) al modificar los ácidos grasos de los fosfolípidos de las membranas mitocondriales de corazón de rata, acusaron distinta respuesta en la actividad de citocromo-c-oxidasa y F₁-F_c-

ATPasa. Haeffner y Privett (14) demostraron una disminución de la actividad de citocromo-c-oxidasa y un aumento de la ATPasa mitocondrial de corazón, al disminuir los Omega 6 a través de manipulaciones dietéticas.

Podría, pues, postularse que las funciones metabólicas de la célula asociadas a la membrana pueden ser controladas vía manipulación dietética de los lípidos. El mayor y significativo peso de los fetos a los 20 días de edad gestacional de las ratas madres que consumieron desde antes y durante la preñez dieta con alto contenido de grasa (45%) y poliinsaturados (P/S 2), permite sugerir una influencia positiva del alto contenido de poliinsaturados dietéticos en la función de las membranas celulares de órganos materno-fetales.

SUMMARY

EFFECT OF A DIETARY FAT LEVEL AND POLYUNSATURATED OMEGA 6 FATTY ACID CONTENT ON THE RAT LIVER AND PLACENTAL MITOCHONDRIAL MEMEBRANE-BOUND ENZYME ACTIVITIES

Female virgin rats, Wistar strain, divided into three groups of 18 each, were fed either a diet containing 45% of calories as fat (45 g%), the second received low-fat diet (15 g%), before and throughout pregnancy, and the third served as control. For both dietary fat levels, the polyunsaturated to saturated fatty acid (P/S) ratio was adjusted by substitution of saturated fatty acids for corn oil, to provide P/S of 2.0. The control group was fed a diet containing 30% of calories, as fat, with a P/S ratio of 1.0. Rats were sacrificed by decapitation 20 days after mating; fetuses, placenta and liver were then removed and weighed. Liver and placenta mitochondria were isolated. Phospholipids were extracted from mitochondrial membranes, and fatty acid tail composition was determined. Cytochrome c oxidase (a_3) and rotenone-insensitive-NADH cytochrome c reductase (NADH cyt c red) in mitochondria subfractions were also essayed. The high-fat diet (45 g%) resulted in an increase in both liver and placental a_3 , but NADHcyt-c-red, activity did not change. The low fat diet (15 g%) reduced th activity of insensitive rotenone-NADH cytochrome c reductase.

The fetal weight of the mothers fed the high-fat diet was higher ($p < 0.001$) than in the other groups. No difference in fetal weight was observed between the pregnant groups fed 30% or 15% of calories (fat diets).

These results suggest that changes in the fatty acid mitochondrial phospholipids which reflects the composition of dietary fat can result in changes in lipid-dependent function of integral membrane-bound enzymes. Therefore, it can be postulated that the increase of membrane fatty acid Omega 6 enhanced the a_3 enzyme activity, which correlated with an increase in fetal growth.

BIBLIOGRAFIA

1. Cardot, Ph., J. Chambaz, G. Thomas, I. Rayssiguier & G. Berezziat. Essential fatty acid deficiency during pregnancy in the rat: Influence of dietary carbohydrates. *J. Nutr.*, 117: 1504-1513, 1987.
2. Whale, K.W.J. Fatty acid modification and membrane lipids. *Proc. Soc.* 42: 273-287, 1983.

3. Innis, Sh. M. & M.T. Clandinin. Dynamic modulation of mitochondrial inner-membrane lipids in rat heart by dietary fat. *Biochem. J.*, **193**: 155-167, 1981.
4. Mc Murchie, E. J. & J. K. Raison. Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes. *Biochem, Biophys. Acta*, **554**: 364, 1979.
5. Tsao, Y. K. & W. E. M. Lands. Cell growth with trans fatty acid is affected by Adenosine 3' 5' monophosphate and membrane fluidity. *Science*, **207**: 777, 1980.
6. Robblee, N. M. & M. T. Clandinin. Effect of dietary fat level and polyunsaturated fatty acid content on the phospholipid composition of rat cardiac mitochondrial membranes and mitochondrial ATPase activity. *J. Nutr.*, **114**: 263-269, 1984.
7. Sottocasa, G. L, B. Kuylenstierna, L. Ernster & A. Bergstrand. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell. Biol.*, **32**: 415-438, 1967.
8. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr & R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
9. Kates, M. Lipid extraction procedures. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Techniques of Lipidology*. R. H. Burdun and P. H. van Knippenberg. Amsterdam. Elsevier, p. 103-104.
10. Yamaoka, S., R. Urade & M. Kito. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipid with dietary sardine oil. *J. Nutr.*: 290-296, 1988.
11. Morrison, W. R. & L. M. Smith. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, **5**: 600-608, 1964.
12. Tahin, Q. S., M. Blum & E. Carafoli. The fatty acid composition of subcellular membranes of rat liver, heart, and brain: Diet-induced modifications. *Eur. J. Biochem.*, **121**: 5-13, 1981.
13. Divakaran, P. & A. Venkataraman. Effect of dietary fats on oxidative phosphorylation and fatty acid profile of rat liver mitochondrial. *J. Nutr.*, **107**: 1621-1631, 1977.
14. Haeffner, E. W. & O. S. Privett. Influence of dietary fatty acids on membrane properties and enzyme activities of liver mitochondria of normal and hypophysectomized rats. *Lipids*, **10** (2): 75-81, Feb. 1975.