

Participación del hígado en el suministro de ácidos grasos esenciales poliinsaturados de cadena larga durante el desarrollo postnatal del cerebro de rata

Venezuela Azavache, Carmen Cuevas, Virgilio Bosch

Sección de Lipidología del Instituto de Medicina Experimental. Facultad de Medicina U.C.V. Caracas, Venezuela

RESUMEN. El presente trabajo tuvo por objeto estudiar el origen de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPI-CL) necesarios para el desarrollo postnatal del cerebro. Ratas normales recién nacidas de 1,5,10 y 20 días de edad fueron decapitadas, inmediatamente después los hígados fueron procesados para obtener la fracción microsomal y determinar la composición de ácidos grasos y la actividad de la enzima $\Delta 6$ desaturasa. También se analizaron: la composición de ácidos grasos en plasma, homogenizado de hemisferios cerebrales y en la leche tomada del estómago de las ratas recién nacidas. Nosotros encontramos que la actividad de la enzima $\Delta 6$ desaturasa en el hígado fue muy baja en comparación a la observada en ratas adultas. Durante el desarrollo postnatal se observaron cantidades apreciables de DHA y AA en la leche, microsomas hepáticos, lípidos de plasma y hemisferios cerebrales. En conclusión proponemos que durante el desarrollo postnatal, la síntesis hepática contribuye poco en el aporte de DHA y AA para el crecimiento del cerebro, pero tiene la capacidad de concentrar estos ácidos grasos provenientes de la leche, en los microsomas hepáticos y secretarlos hacia el plasma para finalmente llegar al cerebro.

Palabras clave: Ácidos grasos poliinsaturados, desarrollo postnatal del cerebro, ratas.

SUMMARY. The liver as a source of LC-PUFA for postnatal brain development in the rat. We address here the issue concerning the origin of essential long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) needed for early postnatal brain development. Normal newborn rats 1, 5, 10 and 20 day-old were decapitated. immediately after, the livers were processed to obtain the microsomal fraction and its $\Delta 6$ fatty acid desaturase activity and fatty acid composition were determined. Samples of plasma, whole homogenized brain hemispheres and milk contained in the gastric cavity of the suckling rats, were analyzed to obtain their fatty acid composition. We found that the rat neonate has a very low $\Delta 6$ desaturase activity in liver microsomes as compared with the adult. In contrast, there is a considerable quantity of DHA and AA in the milk, liver microsomes, plasma lipids and brain. In conclusion, we propose that brain DHA and AA cannot be derived substantially through liver synthesis, but through the availability of these preformed fatty acids in the milk. These fatty acids are concentrated in liver microsomes and then secreted into plasma lipid pool to reach finally to brain structures. **Key words:** Polyunsaturated fatty acids, postnatal brain development, rats.

INTRODUCCION

El cerebro se caracteriza por contener una elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga con 20 ó más átomos de carbono (AGPI-CL), como son el araquidónico (AA) y el docosahexaenoico (DHA) (1). Se ha demostrado que estos ácidos son fundamentales para el desarrollo y la función normal del cerebro (2-6), y se sintetizan a partir de los ácidos grasos esenciales de 18 átomos de carbono provenientes de la dieta: linoleico (LA) y α linolénico (α LNA). En la compleja secuencia de reacciones que conducen a la síntesis de AGPI-CL interviene la manera fundamental de $\Delta 6$ desaturasa de ácidos grasos, que es la enzima más influyente en la regulación de esa vía metabólica (7). Esta enzima se ha detectado en el cerebro (8,9), y en cultivos de astrocitos se ha observado la conversión de LA y α LNA en AGPI-CL (10). Sin embargo es más importante la capacidad que tiene el cerebro para captar AA y DHA del compartimiento plasmático

(1,11,12). En el animal adulto se sabe que el hígado es responsable de la mayor parte de la síntesis de DHA y AA que se requieren en el organismo, pero poco conocemos sobre este proceso en las ratas recién nacidas, en donde existe una gran demanda por parte del sistema nervioso central en rápido crecimiento. En experimentos con animales, Cook ha mostrado que la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa del hígado de rata es menor que el cerebro (8), mientras que Bourré y Picotini en ratones han encontrado lo contrario (13). Li y col. han observado que la incorporación de [$1-^{14}$ C] DHA en la retina de las ratas lactantes, ocurre después que el ácido marcado se ha incorporado a los fosfolípidos hepáticos (14). Estos y otros trabajos (15,16) permiten pensar que la mayor parte de los AGPI-CL que requiere el cerebro de los animales recién nacidos provienen de la leche materna.

La información sobre la influencia de la síntesis hepática de AGPI-CL y el desarrollo del cerebro en el humano ha sido más difícil de obtener, se encuentran en la literatura pocos

trabajos como el de Martínez, quien ha mostrado que el porcentaje de AA y DHA en la fosfatidiletanolamina obtenido del hígado y del cerebro de humanos varían en el mismo sentido durante el período prenatal (17).

Sin embargo hay ya un extenso consenso sobre la necesidad de suplementar las fórmulas lácteas para prematuros y recién nacidos con AA y DHA (18). Es por tanto muy pertinente cualquier esfuerzo para aumentar el conocimiento de los detalles metabólicos de esta relación hígado-cerebro durante el desarrollo postnatal.

En este sentido, nuestro trabajo trata sobre el metabolismo de los ácidos grasos en el hígado de ratas normales durante el período de rápido crecimiento del cerebro, en la vida postnatal. Para ello determinamos la actividad de la enzima $\Delta 6$ desaturasa en el hígado, la concentraciones de AA y DHA en el plasma y en los microsomas hepáticos, durante los primeros 20 días de edad. El estudio se completó con el análisis de los ácidos grasos en los hemisferios cerebrales y en la leche extraída del estómago de las ratas.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

El ácido linoleico, ácido α linolénico, albúmina bovina libre de ácidos grasos, NADH, Coenzima A, ATP, PPO y POPOP fueron adquiridos de Sigma Chemical Co (St Louis MO, USA) el $1\text{-}^{14}\text{C}$ ácido linoleico, 50 mCi/mmol a New England Nuclear (Boston, MA, USA) todos los demás reactivos empleados fueron de grado analítico.

Animales

Ratas hembras y machos, normales de la cepa Sprague Dawley de 1, 5, 10 y 20 días de edad, provenientes de madres alimentadas con una dieta estándar comercial, Protinal (Valencia, Venezuela).

Métodos

Actividad de la enzima $\Delta 6$ desaturasa

Las ratas fueron pesadas y sacrificadas por decapitación entre las 10 y 11 de la mañana para evitar variaciones de la actividad enzimática debidas al ritmo circadiano. La sangre fue recogida en tubos con EDTA y rápidamente se extrajo el hígado, los hemisferios cerebrales y el estómago para tomar de éste la leche. El hígado se pesaba y se lavaba en sacarosa 0,25 M. Luego se homogenizaba en buffer fosfato 50 mM pH 7.4; NaCl 250 mM; EDTA 5 mM y glutatona 1 mM, en la proporción 1:3 (p/v). La primera centrifugación se hizo a 15.000 durante 15 min. para sedimentar las células no rotas, núcleos y mitocondrias. El sobrenadante posteriormente se centrifugaba a 105.000 g por 1 hora para obtener la fracción microsomal. Todo el procedimiento se realizó a 4°C.

La determinación de proteínas se hizo por el método de

Markwell y col. (20). Las determinaciones enzimáticas se realizaban el mismo día en que se aislaban los microsomas. El medio de incubación contenía: buffer fosfato 100 mM pH 7.4, MgCl_2 5 mM; Coenzima A 50 mM; ATP 2 mM; NADH 1 mM, y 100 mM de LA, el cual se preparó en una solución de albúmina libre de ácidos grasos al 0.2%, al que se le agregó [$1\text{-}^{14}\text{C}$] LA como trazador. La concentración de proteína microsomal fue 2 mg/ml. Las incubaciones se realizaban en un baño a 37°C con agitación constante durante 10 min. La reacción se detenía por la adición de 4 ml de cloroformo/metanol (1:1 v/v), posteriormente se agregaban 2 ml de cloroformo y los lípidos se extraían de acuerdo al método de Folch y col (21).

Los metil ésteres de los ácidos grasos se obtenían por transesterificación en una mezcla que contenía metanol/ácido sulfúrico/tolueno (86:10:4 v/v) a 70°C durante 1 hora. Los metil ésteres de los ácidos grasos fueron separados por cromatografía de capa fina, sobre sílica gel G-60 impregnada en AgNO_3 al 10% y sumergidas en una mezcla de hexano/dietil éter (85:15 v/v).

Se emplearon patrones de LA y α -LNA para ubicar las zonas correspondientes al sustrato y producto, los cuales se visualizaban bajo luz u.v. rociando previamente la placa con 2', 7' dibromofluoresceína al 0.2% en etanol. Las zonas se raspaban y colocaban en viales con 10 ml de una solución de PPO-POPOP en tolueno y el contaje de la radioactividad se llevaba a cabo en un contador 1219 Rack Beta, LKB (Suecia).

La actividad enzimática se expresa como pmoles de ácido convertido en el producto por min y por mg de proteína microsomal.

Separación de fosfolípidos y ácidos grasos

La composición de ácidos grasos en plasma, leche, microsomas y fosfolípidos de los hemisferios cerebrales, se hizo aislando previamente los lípidos totales según Folch y col. (21). Los fosfolípidos se aislaron por cromatografía de capa fina, en sílica gel G-60, el análisis cromatográfico se hizo con una fase móvil de éter de petróleo:dietil éter:ácido acético (90/10/1 v/v). Los metil ésteres se prepararon como se explicó en la determinación de la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa y la separación se hizo por cromatografía gas-líquido en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5880-A (USA). Se empleó una columna de vidrio de 4mm x 183 cm empacada con polietileno glicol adipato al 4% en peso sobre cromosorb AW de 80 mesh. Las condiciones para la separación fueron: temperatura del horno 200°C, temperatura del detector de llama 250°C; N_2 como gas transportador, velocidad del flujo 60 cc/min.

En los procedimientos de extracción de lípidos y metilación se empleó 2,6-di-ter-butyl-p-cresol (BHT) al 0.1% (p/v) como antioxidante.

Análisis estadístico

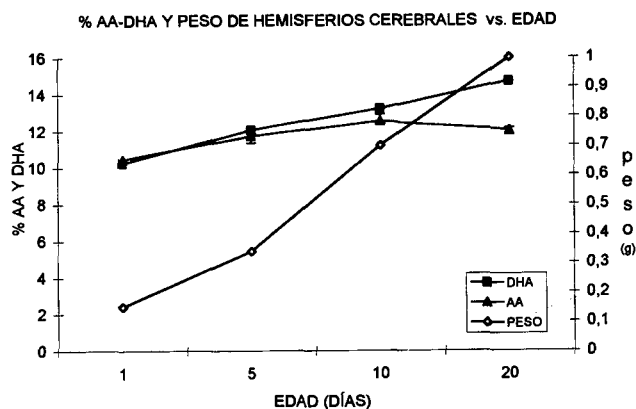
Las diferencias entre los valores obtenidos a diferentes edades fueron determinadas usando el método de ANOVA de una vía, cuando se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) se emplearon las pruebas de Tukey. Para los resultados mostrados en la Tabla 4 se empleó la prueba "t" de Student.

RESULTADOS

En el Gráfico 1 se observa que el crecimiento de los hemisferios cerebrales durante los primeros 20 días de la vida postnatal va acompañado de un aumento significativo de DHA, mientras que el AA aumenta significativamente hacia el día 5 y luego se mantiene constante.

GRAFICO 1

Porcentaje de AA y DHA en los fosfolípidos totales de los hemisferios cerebrales, y peso de estos en ratas de diferentes edades. Los valores representan el promedio \pm error estándar ($n=10$)



En la Tabla 1 se presenta la composición de la leche materna extraída del estómago de las ratas lactantes. La leche del primer día presenta 4.68% de AA y 1.68% de DHA, estos valores son significativamente más altos en comparación a las del día 5 ($p < 0.001$). En los días siguientes continúa disminuyendo el AA, y el DHA se mantiene constante. Hacia el día 20 los porcentajes son cercanos al 1% para los dos ácidos grasos.

En la Tabla 2 se presenta la composición de ácidos grasos en los lípidos totales de los microsomas hepáticos. El porcentaje de DHA aumenta significativamente entre el primer y quinto día de la vida postnatal de un 8% a un 17% ($p < 0.001$), y luego se mantiene constante en los días siguientes. El porcentaje de AA es más alto (13%) que el de DHA en el primer día y esta proporción no varía significativamente a lo largo de los primeros 20 días.

TABLA 1

Porcentaje de ácidos grasos de lípidos totales en la leche tomada del estómago de ratas a diferentes edades

Acidos graso	1 día n=9	5 días n=7	10 días n=9	20 días n=9
10:0	2.80 \pm 0.63	7.21 \pm 0.54	4.98 \pm 2.37	7.57 \pm 1.30
12:0	2.20 \pm 0.32	12.43 \pm 0.39	9.88 \pm 1.39	10.29 \pm 0.63
14:0	2.10 \pm 0.07	13.49 \pm 0.35	14.94 \pm 0.63	12.43 \pm 0.84
16:0	22.04 \pm 0.31	23.85 \pm 0.29	31.53 \pm 3.26	25.34 \pm 1.09
16:1	4.89 \pm 0.82	1.87 \pm 0.09	1.28 \pm 0.48	2.11 \pm 0.11
18:0	4.39 \pm 0.26	3.59 \pm 0.07	3.35 \pm 2.55	3.28 \pm 0.19
18:1	28.85 \pm 1.05	17.74 \pm 0.64	12.86 \pm 0.96	16.48 \pm 1.33
18:2	14.86 \pm 0.43	13.93 \pm 0.18	13.06 \pm 1.09	14.28 \pm 1.00
18:3 (n-6)	1.15 \pm 0.05	0.30 \pm 0.02	0.41 \pm 0.11	0.38 \pm 0.03
18:3 (n-3)	0.66 \pm 0.04	0.35 \pm 0.01	0.71 \pm 0.21	0.93 \pm 0.04
20:3 (n-6)	1.22 \pm 0.08	0.61 \pm 0.04	0.74 \pm 0.24	0.61 \pm 0.05
20:4 (n-6)	4.68 \pm 0.15*	1.23 \pm 0.04**	0.92 \pm 0.16	0.65 \pm 0.04
22:6 (n-3)	1.68 \pm 0.22***	0.80 \pm 0.02	0.71 \pm 0.15	0.81 \pm 0.01

Los valores representan la media \pm el error estándar.

*El porcentaje de ácido araquidónico (20:4n-6) es significativamente más alto en la leche del primer día en comparación a los demás ($p < 0.001$).

** El porcentaje del día 5 es también más alto que el de los días 10 y 20 ($p < 0.01$).

***El porcentaje de ácido docosahexaenoico (22:6 n-3) es significativamente más alto en la leche del primer día en comparación a todas las demás.

TABLA 2

Porcentaje de ácidos grasos en los lípidos totales de microsomas de hígados de ratas de diferentes edades

Acidos graso	1 día n=3	5 días n=3	10 días n=3	20 días n=7
16:0	21.97 \pm 0.63	25.35 \pm 0.16	27.21 \pm 0.27	25.03 \pm 0.48
16:1	3.04 \pm 0.15	1.26 \pm 0.68	0.65 \pm 0.04	tz
18:0	9.91 \pm 0.79	14.55 \pm 1.19	13.82 \pm 0.49	14.88 \pm 0.30
18:1	19.44 \pm 1.34	7.89 \pm 2.11	13.86 \pm 0.13	5.39 \pm 0.28
18:2	9.05 \pm 0.25	7.63 \pm 1.64	9.26 \pm 0.20	11.17 \pm 0.68
20:3 (n-6)	1.47 \pm 0.18	1.36 \pm 0.40	2.57 \pm 0.17	tz
20:4 (n-6)	13.76 \pm 0.89	17.05 \pm 1.20*	14.45 \pm 0.17	13.05 \pm 0.64
22:5 (n-3)	0.09 \pm 0.04	1.72 \pm 0.54	2.59 \pm 0.07	3.19 \pm 0.14
22:6 (n-3)	7.99 \pm 0.49**	19.50 \pm 2.78	17.94 \pm 0.32	18.24 \pm 0.44

Estos valores corresponden al promedio \pm el error estándar, y cada uno se obtuvo de un pool de 3-5 hígados. (tz = trazas).

*El porcentaje de AA a los 5 días es significativamente más alto que a los 20 días ($p < 0.05$) según ANOVA de una vía.

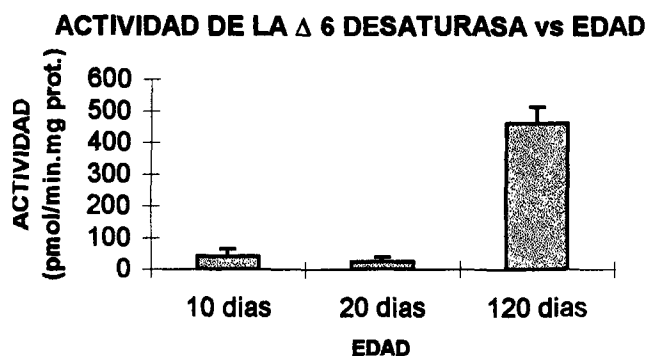
**Existe una diferencia significativa entre el porcentaje de DHA correspondiente al primer día respecto a los demás, ($p < 0.01$) según ANOVA de una vía.

En el Gráfico 2 se observa que la actividad de la enzima $\Delta 6$ desaturasa del hígado es muy baja a los 10 y 20 días de la

vida postnatal en comparación a los observados en la rata adulta.

GRAFICO 2

Las columnas representan el valor de las medias \pm el error estándar de tres determinaciones independientes. Los valores correspondientes a los 10 y 20 días se obtuvieron de un pool de 4-5 hígados de ratas. Las actividades enzimáticas a los 10 y 20 días fueron significativamente menor que a los 120 días ($p < 0.01$).



En la Tabla 2 se presenta la composición de ácidos grasos en los lípidos totales del plasma obtenido durante el período de no-ayuno. Se observa que las concentraciones de AA y DHA se mantienen a concentraciones elevadas entre los 5 y 20 días de edad.

En la Tabla 4 se presentan los porcentajes de AA y DHA en plasma y microsomas obtenidos de ratas de 20 días de edad, bajo las condiciones de ayuno y no-ayuno. Se puede observar que las concentraciones de AA y DHA en el plasma aumentan significativamente en la condición de ayuno ($p < 0.0001$), y son mas cercanas a los porcentajes obtenidos en la fracción microsomal. También se observa en esta fracción que el porcentaje de AA aumenta significativamente ($p < 0.0001$) con la condición de ayuno.

DISCUSION

Nuestros resultados muestran que la actividad de la enzima $\Delta 6$ desaturasa en los microsomas hepáticos es muy baja a los 10 días de edad, período en el cual hay un crecimiento acelerado del cerebro y se mantiene aún baja a los 20 días (Gráfico 1), lo cual indica que la biosíntesis hepática de AA y DHA en este período no aporta cantidades importantes de estos ácidos grasos para el desarrollo del cerebro. Estos resultados son iguales a los obtenidos por Cook (10), y conducen a reforzar la idea de que la fuente principal de AA y DHA para el crecimiento del cerebro es la leche materna. En relación a este aspecto nuestros resultados sobre la composición de ácidos grasos en leche materna de ratas, muestran que

los porcentajes de AA y DHA representan cerca de un 7% en el primer día, luego descienden bruscamente hacia el quinto día y luego más lentamente. Cambios similares se han observado en la composición de la leche humana, en la que el calostro tiene mayor proporción de AGPI-CL que la leche madura (19).

TABLE 3

Porcentaje de ácidos grasos en los lípidos totales en plasma de ratas de diferentes edades

Acidos graso	5 día n=3	10 días n=3	20 días n=3
12:0	tz	2.12 \pm 0.11	2.86 \pm 0.37
14:0	1.63 \pm 0.36	4.67 \pm 0.05	5.63 \pm 0.41
16:0	8.36 \pm 2.05	23.23 \pm 0.91	23.69 \pm 0.53
16:1	5.50 \pm 0.47	1.47 \pm 0.21	1.35 \pm 0.07
18:0	2.94 \pm 0.51	7.10 \pm 0.13	7.07 \pm 0.14
18:1	17.63 \pm 2.46	7.94 \pm 0.02	10.79 \pm 0.75
18:2	9.21 \pm 1.33	19.69 \pm 0.62	22.52 \pm 0.53
18:3 (n-6)	tz	0.75 \pm 0.06	0.63 \pm 0.15
18:3 (n-3)	tz	0.60 \pm 0.09	0.60 \pm 0.06
20:3 (n-6)	tz	2.15 \pm 0.19	0.89 \pm 0.06
20:4 (n-6)	10.63 \pm 1.17	13.47 \pm 0.73	8.89 \pm 0.61
22:6 (n-3)	4.73 \pm 1.68	6.75 \pm 0.34	6.97 \pm 0.08

Los porcentajes representan las medias \pm el error estándar, cada valor corresponde a un pool obtenido de 3-5 ratas en condición de no-ayuno.

No hubo diferencias estadísticamente significativas, para los ácidos AA y DHA.

TABLE 4

Porcentaje de AA y DHA en lípidos totales de plasma y microsomas hepáticos de ratas

%	Plasma		Microsomas	
	No ayuno n=3	Ayuno n=9	No ayuno n=6	Ayuno n=3
AA	9.11 \pm 0.58*	21.57 \pm 1.27	14.58 \pm 0.24**	18.04 \pm 0.88
DHA	6.43 \pm 0.63*	9.82 \pm 0.13	19.08 \pm 0.79	19.51 \pm 0.82

Los porcentajes de ácido araquidónico (AA) y docosahexaenoico (DHA) en microsomas y plasmas corresponden a la media (el error estándar obtenido cada valor de un pool proveniente de 3-9 ratas de 20 días de edad).

* Existe una diferencia altamente significativa entre las condiciones de no-ayuno vs. ayuno para los porcentajes del AA y DHA en el plasma ($p < 0.0001$).

**Existe una diferencia altamente significativa entre las condiciones de no-ayuno vs. ayuno para los porcentajes de AA en microsomas ($p < 0.0001$).

Por otra parte, la acumulación significativa de AA y DHA en la fracción microsomal del hígado de rata después del

primer día de nacidas, refleja que el hígado de las ratas lactantes presumiblemente posee enzimas aciltransferasas con alta especificidad para estos ácidos grasos, lo cual garantiza el ensamblaje de lipoproteínas con concentraciones adecuadas de AA y DHA, para sustentar el desarrollo normal del cerebro. En efecto, el análisis de los ácidos grasos en el plasma de las ratas lactantes de 5, 10 y 20 días de edad en condición de no-ayuno, muestra concentraciones altas de estos ácidos grasos (Tabla 3). En el plasma con bajos niveles de lipoproteínas de origen intestinal (condición de ayuno), las concentraciones de AA y DHA aumentan significativamente y son más cercanas a las observadas en la fracción microsomal (Tabla 4: determinación realizada en ratas de 20 días de edad). Son escasos los trabajos que presentan la composición de ácidos grasos del plasma durante este período, al respecto Nouvelot observó que las fracciones de VLDL-LDL y HDL obtenidas en ratas de 17 días contienen concentraciones significativamente altas de AA y DHA, las cuales son sensibles a la composición de la dieta (22), sin embargo no observó una relación clara entre la composición plasmática y la composición de ácidos grasos en el hígado, probablemente esto se debió a que él hizo el análisis en los lípidos totales de este órgano. Sinclair (23) también le da importancia al metabolismo de los ácidos grasos por el hígado durante el desarrollo del cerebro. El observa que durante los primeros días de la vida postnatal se produce un aumento en el contenido total de lípidos y que las concentraciones de AA y DHA disminuyen en los triglicéridos y aumentan en los fosfolípidos hepáticos. Al comparar nuestros resultados con lo de estos autores, sugerimos que el análisis de los ácidos grasos en la fracción microsomal de hígado reflejan más cercanamente los cambios observados en el plasma, lo cual es de esperarse ya que en esta fracción sedimentan las organelas que ensamblan las lipoproteínas plasmáticas.

Nuestros resultados obtenidos en el período de crecimiento rápido del cerebro, permiten concluir que el hígado, aunque no está lo suficientemente desarrollado para sintetizar AA y DHA, juega un papel clave en el suministro de cantidades adecuadas de estos ácidos grasos para el crecimiento de ese órgano, dado que desde el nacimiento tiene la capacidad de seleccionar específicamente AA y DHA provenientes de la leche, y ensamblar lipoproteínas enriquecidas en ellos. Esto unido a la alta especificidad que también tiene el cerebro para la captación de AA y DHA, garantiza que el rápido crecimiento de este órgano vaya acompañado de una alta incorporación de estos ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga.

REFERENCIAS

- Hassam G, Sinclair AJ, Crawford MA. The incorporation of orally fed radioactive g linoleic acid and linoleic acid into the liver and brain lipids of suckling rats. *Lipids*, 1975; 10:417-420.
- Bourre JM, Youyou A, Dumont O, Picciotti M, Pascal G, Durand G. The effects of dietary a linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J Nutr* 1989;119:1880-1892.
- Holman RT, Jhonson SB, Hatch TF. A case of human linolenic acid deficiency involving neurological abnormalities. *Am J Clin Nutr*, 1982; 35:617-623.
- Neuringer M, Connor WE, Van Petten C, Bastard L. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys. *J Clin Invest*. 1984; 73:272-276.
- Uauy RE, Birch DG, Birch EE, Peirano P. Visual and Brain function measurements in studies of n-3 fatty acids requirements of infants. *J Pediatr*. 1992; 120:S168-180.
- Uauy R, Peirano P, Hoffman D, Mena P, Birch D, Birch E. Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. *Lipids*, 1996; 31:167-176.
- Voss A, Reinhart M, Sankarappa S, Sprecher H. The metabolism of 7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid to 4,7,11,13,16,19-docosahexaenoic acid in rat liver is independent of $\Delta 4$ desaturase. *J Biol Chem* 1991; 266:19995-20000.
- Cook HW. *In vitro* formation of polyunsaturated fatty acids by desaturation in rat brain some properties of the enzymes in developing brain and comparisons with liver. *J Neurochem*, 1978; 30:1327-1334.
- Pawlosky RJ, Ward G, Salem N. Essential fatty acid uptake and metabolism in the developing rodent brain. *Lipids*, 1996; 31:103-107.
- Moore SA, Yoder E, Murphy S, Dutton GR, Spector AA. Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6 w-3) and arachidonic acid (20:4 w-6). *J Neurochem* 1991; 56(2): 518-524.
- Crawford MA, Hassam AG, Williams G, Whitehouse WL. Essential fatty acids and fetal brain growth. *The Lancet*, 1976; 28:452-453.
- Sinclair AJ. Incorporation of radioactive polyunsaturated fatty acid into liver and brain of developing rat. *Lipids*, 1975; 10:175-184.
- Bourre JM, Picciotti M. Delta 6 desaturation of alpha-linolenic acid in brain and liver during development and aging in the mouse. *Neurosci Lett* 1992;141:65-68.
- Li J, Wetzel M, O'Brien P. Transport of n-3 fatty acids from the intestine to the retina in rats. *J Lipid Res*. 1992; 33:539-548.
- Naughton JM. Supply of polyenoic fatty acids to the mammalian brain. *Int J Biochem*. 1981;13:21-32.
- Inns S. Fatty acid requirements of the newborn. *Can J Physiol Pharmacol*. 1994; 72:1483-1492.
- Martínez M. Dietary polyunsaturated fatty acids in relation to neural development in humans, in Dietary w-3 and w-6 fatty acids. Biological effects and nutritional essentiality. Ed. C. Galli and A.P. Simopoulos. Plenum Press N.Y. and London, 1989; p. 123.
- PUFA in Infant Nutrition. Consensus and controversies. (1996, Barcelona-España). Ed. American Oil Chemist's Society (AOCS), 1996.
- Markwell MAK, Hass SM, Bieber LL, Tolber NE. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem*. 1978; 87:206-210.
- Folch J, Lees M, Sloane SH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 228:497-509.
- Nouvelot A, Delbart C, Bourre JM. Hepatic metabolism of dietary alpha-linolenic acid in suckling rats, and its possible importance in polyunsaturated fatty acid uptake by the brain. *Ann Nutr Metab*. 1986; 30:316-323.
- Sinclair AJ. Fatty Acid Composition of liver lipids during development of rat. *Lipids*. 1974; 9:809-817.

Recibido: 08-04-1997

Aceptado: 13-07-1998