



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE ÁCIDOS GRASOS PRESENTES EN
LECHE MATERNA HUMANA EN LA
INDUCCIÓN DE DIFERENCIACIÓN DE
CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES DE
ORIGEN HUMANO.
PAPEL DE RECEPTOR NUCLEAR PPAR γ .**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Br. Angela Del R. Madrid C. Como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dra. Luz E. Thomas (IVIC).

Asesor Académico: Dra. Guillermina Alonso (UCV).

**CARACAS, VENEZUELA
Diciembre, 2012.**

DEDICATORIA.

A mi maravillosa Madre, por su incansable fuerza e infinito amor, porque sin ella nada en mi vida hubiese tenido sentido. A ti mi Dios, porque me levantas cada día frente a cualquier adversidad, porque pusiste en mi vida a personas maravillosas que me ayudaron a continuar viva, fuerte y feliz, porque nunca permitiste que renunciara, este es mi sueño y te lo debo entero.

A mi Papa por su gran amor. A mis hermanas que son un regalo y mi sonrisa día tras día.

A la UCV y a mi facultad de sueños. A todos aquellos que acompañaron en este logro.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios, gracias por llevarme de la mano en cada etapa, por hacerme fuerte, por levantarme, por enseñarme cada día que lo más importante es VIVIR, vivir con amor, lealtad y seguridad. Por brindarme la oportunidad de cumplir mis sueños, de ser quien quiero y por quien lucho. Gracias Dios.

A mi Mami Charito Castillo, porque su infinito apoyo no se compara con nada, no solo le debo mi existencia sino la vida más allá de la pequeña celulita que un día fui. Le agradezco cada uno de los días en los que ha sido todo para mí, te amo Monenina. A mi Papi Ángel Madrid, por darme una vida de Reina, por perdonar mis caprichos y por hacerlos realidad. Por cuidarme tanto, por cada uno de sus sacrificios. Por permitirme aconsejarme, por enseñarme a perdonar, por exigirme más, por siempre decirme que tuviera FUERZA y VALOR porque soy la MEJOR. Hoy lo siento así. Gracias PAPA. A mi familia entera, hermanitas, tíos, tías, primas, abuelitos, por sentirse siempre orgullosos de mí, por darme fuerza, por apoyarme en todo, por consentirme y quererme tanto. Por siempre tenerme en lo alto, por confiar incondicionalmente en mí. De la mano de Diosito no voy a defraudarlos.

A mis Hcitos, Yanka, Zammy, Gleinson, Manuel y Yezuan, por ser mis mejores amigos, mis hermanos, mi familia. Junto con mis mami, me regalaron muchos años de apoyo y AMOR sincero. Por creer en mí, por cuidarme, por sus lindas palabras siempre. Por crecer junto a mí y regalarme gran parte de los mejores momentos en mi vida, gracias. A mi Boub, Ángela Siem, porque no existe nada que pueda separar o quebrar tanto cariño e incondicionalidad. Jamás puedo decir que me hiciste falta, jamás podré decir que hay algo en lo que no nos apoyamos, o en lo que no estuvimos juntas. Tanto así que en la mayoría de las cosas somos idénticas, así que podemos seguir diciendo q somos hermanitas, jeje! Te amo mi Bobina. Gracias de verdad.

A las chicues, Mayelí Moreno, Emily Bazdikian y Xochilt Sucre, por acompañarme en momentos difíciles, por regalarme muchas alegrías, por compartir conmigo tramos, estudios infinitos, resúmenes, informes y exámenes, así como comidas, películas, libros y aventuras. Las quiero y las tendré en mi corazón siempre. A la Sra. Yuni y al Sr. Efraín Moreno, por tanto cariño, tanto apoyo, por abrirnos las puertas de su casa, por brindarnos momentos hermosos, les agradezco con el corazón.

A Nelson Acevedo, Luis Hernández, Argenis Lira, por ser mis amigos incondicionales. Por escucharme, por compartir conmigo momentos maravillosos en mi carrera. A Vanessa Rivero, porque sus palabras fueron en algún momento muy valiosas para mí. Gracias por escucharme en momentos de dificultad.

A mis compañeros y grandes amigos; Daniela Gómez, Carlos González, Paola Casanova, Farilyn Vivas, Victoria Navas, Marianny Pernía y Ruth Rojas porque compartimos momentos inigualables, entre los que se cuentan dolores de cabeza, ayunos, entre otros, pero lo más importante es que con ustedes viví muchas alegrías. Hicieron de estos 5 años una experiencia hermosa y vale la pena agradecer.

Entre los mayores aprendizajes de mi vida se encuentra el VIVIR minuto a minuto, confiar en quien se debe confiar, y dar lo mejor de sí a quienes tienen también mucho que dar. Agradezco a Dios el colocar en mi vida personas maravillosas, únicas en todo sentido, todos ellos grandemente inteligentes y valiosos, que me brindaron ciegamente su amistad, su apoyo, su comprensión. Personas cuyas vidas realmente no son perfectas, pero que saben hacer de ellas la mejor posible, arañando siempre la felicidad y por eso son capaces de regalarte una sonrisa, sin juzgar nada de ti, simplemente reconociendo tu lealtad, tu cariño y tu amistad. Por eso gracias a mi negrura Oryza López, a mis peques Maryant Paredes y Daznia Bompert, a Eduardo Rodríguez (Eduuuu), David Guerrero (Ridis) y Rubén Ramírez, por todo lo que en tan poquito tiempo me han hecho vivir. Les agradezco inmensamente.

A mi Ridis gracias por tu apoyo, por escucharme, por aconsejarme, por quererme y ayudarme tanto. Porque has sido en este tiempo mi más grande compañía y apoyo. Por lo que feliz que soy a tu lado. Te amo Ridis.

A mi Tutora, Dra. Luz Thomas, infinitas gracias por la oportunidad que me brindó, por sus consejos y por todo lo que me enseñó. Por escucharme y dispensar cada fallita, por siempre creer en mí y poner en mis manos este proyecto que me enamoró desde un inicio. Gracias por todo.

Al Dr. Jesús del Castillo, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, y junto con el Dr. Miguel Rocafull, gracias por brindarme su ayuda y sus valiosos consejos. Por haber estado siempre dispuestos a enseñarme y corregirme. Por buscar siempre la excelencia en quienes forman, por tanto apoyo, muchísimas gracias.

A Joanna Baricelli por regalarme su amistad, su compañerismo, por sus consejos, sus correcciones y por su ayuda incondicional. Por haber estado en cada paso de esta gran meta, muchísimas gracias Joa.

A mi cotutora y profesora preferida; Guillermina Alonso. Gracias por escucharme, por ayudarme, gracias por siempre darme fuerzas y alentarme, por contribuir con nuestro proyecto y

defender a su tutorada. Gracias de verdad por lo excelente profesional que es cada día. Fue y siempre será un placer para mi haber aprendido tanto a su lado.

Al IVIC, institución insigne, prestigiosa e inigualable. Gracias por permitirme desarrollarme en su nombre. Será siempre mi segunda casa, mi lugar preferido, el lugar donde solo personas brillantes y enamoradas de la ciencia podemos estar. Gracias al centro de Biofísica y Bioquímica, investigadores, secretarias, obreros y técnicos, por su excelente trabajo, su maravilloso trato y disposición.

A mi Laboratorio de Fisiología Molecular, del que siempre estaré orgullosa. A la Dra Luz, DrJesus, Dr. Miguel, Marisa, Jesús, Joa, Huascar, María, Frederit, Estalina, Lusliani, gracias por ser mi día a día, porque juntos somos un ejemplo de trabajo incansable, perseverancia y amor por lo que se hace. Gracias por brindarme su cariño, su ayuda en todo. Les debo muchísimo y les agradezco demasiado.

Al Laboratorio de Fisiología de Parásitos y al Dr. Alfredo por siempre estar dispuesto a brindar su mano amiga, sus consejos y buena compañía. Gracias por los inmensos favores, por enseñarme tanto, por su ayuda incondicional, por regalarme su amistad y contribuir con el éxito de este trabajo, los quiero muchísimo: Ariadna Rangel, Meyerling Betancourt, Evangelina Sánchez, Adriana Silva, Romel Rosales.

A mis queridas amigas Yoli y Lorena, por su trabajo incansable y tan bien realizado, de igual manera al Sr. William Romero, por contribuir con la realización de este trabajo especial de grado. Estoy inmensamente agradecida.

Finalmente y de manera especial, agradezco a mi amada e ilustre Universidad, sin duda la mejor que existe. Mi Universidad Central de Venezuela construyó quien soy como profesional y gran parte de lo que soy como persona. A mi facultad hermosa, la más bella y mágica del campus de la UCV; mi Facultad de Ciencias, hacer vida en tus pasillos y salones fue lo más maravilloso que he podido experimentar, además que, gracias a ti conocí a las mejores personas de mi vida. Me regalaste luz, conocimientos, alegría. En resumen, Facultad de Ciencias TU me regalaste felicidad.

Todos ustedes son parte de este sueño hecho realidad. Muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

Pág.	
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDO.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	17
I.1. Lactancia Materna.....	17
I.2. Tipos de Leche Materna.....	18
I.3. Ácidos grasos en Leche Materna Humana (LMH) y sus funciones.....	20
I.4. Control de la expresión génica por ácidos grasos.....	23
I.5. Receptor de proliferación peroxisomal gamma. (PPAR γ).....	26
I.6. Isoforma 4 de la proteína transportadora de ácidos grasos en células epiteliales intestinales humanas (<i>hsFATP4</i>).....	30
I.7. Estructura, fisiología y maduración del epitelio intestinal.....	32
I.7.1. Desarrollo Embrionario.....	32
I.7.2. Epitelio Maduro.....	34
I.8. Cambios en la expresión de genes durante el desarrollo y maduración del epitelio intestinal.....	38
II. ANTECEDENTES.....	41
III.JUSTIFICACIÓN.....	49
IV. OBJETIVOS.....	51
IV.1 OBJETIVO GENERAL.....	51
IV.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	51
V. METODOLOGÍA.....	52
V.1. Diagrama de Trabajo.....	52
V.2. Materiales.....	53
V.2.1. Muestras de leche materna humana.....	53

V.2.2. Línea Celular.....	53
V.2.3. Reactivos y Equipos.....	53
V.3. Métodos.....	55
V.3.1. Análisis e identificación de la composición de Ácidos Grasos en LMH por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG- EM).....	55
V.3.1.1. Extracción de lípidos polares (LP).....	55
V.3.1.2 Equipo.....	55
V.3.1.3. Condiciones cromatográficas.....	55
V.3.1.4. Análisis de la composición de ácidos grasos.....	56
V.3.2. Separación de la fracción lipídica de LMH.....	56
V.3.3. Preparación de fracciones lipídicas (FL) de LMH.....	56
V.3.4. Cultivo celular, ensayo de diferenciación de células HT-29.....	56
V.3.4.1. Condiciones del cultivo celular.....	56
V.3.4.2. Condiciones de estimulación del cultivo celular.....	57
V.3.5. Preparación de suspensión enriquecida en membranas.....	58
V.3.6. Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	58
V.3.7. Determinación de la actividad enzimática de ALP.....	59
V.3.8. Ensayo de activación del receptor de proliferación peroxisomal PPAR γ . KIT “TransAM [®] PPAR γ assay.....	61
V.3.9. Extracción de ARN total mediante el método de TRIZOL.....	62
V.3.10. Cuantificación de ARN total aislado.	63
V.3.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Transcriptasa Reversa (RT-PCR).....	64
V.3.12. Análisis de los productos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa.....	67
V.3.12.1. Siembra de las muestras y corrida electroforética.....	68
V.3.12.2. Análisis densitométricos.....	68
V.3.13. Análisis Estadístico.....	68
VI. RESULTADOS.....	70
VI. 1. Análisis e identificación de la composición de ácidos grasos en LMH.	70
VI.2. Ensayo de diferenciación. Actividad de ALP como marcador de diferenciación	

en cultivos de células HT-29.....	78
VI.3. Activación del receptor de proliferación peroxisomal PPAR γ con fracciones lipídicas provenientes de LMH.....	81
VI.4. Determinación de los niveles de ARNm de genes implicados en el proceso de transporte lipídico.....	84
VI.4.1. Estandarización de las condiciones de amplificación del gen de FATP4.....	84
VI.4.2. Amplificación del gen de FATP4 en cultivos de HT-29 estimuladas con FL de LMH.....	88
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	90
VIII. CONCLUSIONES.....	101
IX. RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES.....	103
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	104
X.1. Recursos electrónicos.....	116
XI. ANEXOS.....	117
XI.1 Anexo 1. Aprobación de proyecto por comité de bioética del IVIC.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1. Esquema de las proteínas sensoras de ácidos grasos en la célula.....	24
Figura 2. Isoformas de PPAR.....	27
Figura 3. Representación esquemática del reclutamiento ligando dependiente de coactivadores para la transcripción regulada por PPAR.....	30
Figura 4. Desarrollo embrionario del epitelio intestinal en las diferentes etapas de gestación.....	33
Figura 5. Estructura de la capas del intestino delgado.....	34
Figura 6. Proyecciones dactilares de la mucosa del epitelio intestinal.....	35
Figura 7. Estructura funcional de la mucosa intestinal.....	36
Figura 8. Dinámica de renovación del epitelio intestinal.....	37
Figura 9. Ruta de señalización de PPAR en adipocitos.....	45
Figura 10. AG derivados de la fuente de alimentación, capaces de activar la ruta de señalización del receptor PPAR γ	46
Figura 11. Diagrama del protocolo desarrollado en el ensayo de activación de receptor por el KIT TransAM [®] PPAR γ assay.....	62
Figura 12. Cromatograma resultante del análisis de una muestra de LP proveniente de LMH.....	71
Figura 13. Ácidos Grasos (AG) identificados en 15 muestras de LMH en etapa de calostro pretérmino (13A), 12 muestras de calostro a término (13B) y 3 muestras de LMH madura (13C).....	75-76
Figura 14. Ácidos Grasos (AG) identificados en 30 muestras de LMH.....	77
Figura 15. Efecto de un conjunto de FL de LMH (15A) y FL individuales de LMH (15B) sobre la expresión de Fosfatasa Alcalina como marcador de diferenciación en células epiteliales intestinales.....	80
Figura 16. Efecto de un conjunto de FL de LMH sobre la activación del receptor de proliferación peroxisomal PPAR γ	83
Figura 17. Gradiente de temperaturas de hibridación para los cebadores sentido y antisentido de FATP4 a concentraciones crecientes de MgCl ₂	86

Figura 18. Amplificación a 38 ciclos del gen de FATP4 empleando condiciones de temperatura y concentración de $MgCl_2$ estandarizadas.....88

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
Tabla 1. Composición de calostro y leche madura.....	19
Tabla 2. Reactivos a empleados en la determinación de proteínas.....	59
Tabla 3. Reactivos empleados en la determinación de la actividad de ALP.....	60
Tabla 4. Reactivos empleados para la curva de calibración de K_2HPO_4	60
Tabla 5. Componentes de la mezcla para la síntesis de ADN complementario (cDNA).....	65
Tabla 6. Componentes de la mezcla de amplificación.....	66
Tabla 7. Secuencias nucleotídicas de los cebadores o iniciadores empleados en las reacciones de PCR.....	67
Tabla 8. AG identificados en 30 muestras de LMH a diferentes etapas de producción.....	72
Tabla 9. Actividad relativa de ALP en cultivos HT-29 incubados bajo distintos tratamientos	79
Tabla 10. Niveles de activación de $PPAR\gamma$ en cultivos de células HT-29 incubadas bajo distintos tratamientos.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS.

- OMS: Organización Mundial para la Salud.
- AAP: Asociación Americana de Pediatría.
- LC-PUFAs: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.
- LMH: Leche Materna Humana/s
- IgA: Inmunoglobulina A.
- AG: Ácidos Grasos.
- TGs: Triacilgliceroles.
- PLs: Fosfolípidos.
- AL: Acido Linoleico o C18:2 ω 6.
- AA: Acido Araquidónico o C20:4 ω -6
- ALA: Acido α -Linolénico o C18:3 ω 3
- EPA: Ácido Eicosapentaenoico o C20:5 ω 3
- DHA: Ácido Docosahexaenoico o C22:6 ω -3
- PUFAs: Ácidos Grasos Poliinsaturados.
- C4:0: Ácido Butírico.
- C16:0: Ácido Palmítico.
- C6:0: Ácido Caproico.
- C8:0: Ácido Caprílico.
- C10:0: Ácido Cáprico.
- C12:0: Ácido Laurico.
- C14:0: Ácido Mirístico.
- C20:0: Ácido Eicosanoico.
- C18:0: Ácido Esteárico.
- C7:0: Ácido Heptanoico
- C18:1 ω 9: Ácido Oleico
- C16:1 ω 7: Ácido Palmitoleico
- LCFA: Ácidos Grasos de Cadena larga.
- CoA: Coenzima A.
- PPAR: Receptor de proliferación peroxisomal.

- LXR: Receptor hepático X.
- HNF-4 α : Factor nuclear hepático 4
- SREBP: Elemento esterol-regulatorio de unión a proteína.
- NEFA: Ácidos grasos libres en su forma no esterificada
- LXRE: Elementos hepático regulatorios.
- RXR: Receptor de ácidos retinoicos.
- LCFA-coA: Ácidos grasos de cadena larga y derivados coenzima A.
- SCFA: Ácidos grasos de cadena corta.
- NaBt: Butirato de Sodio.
- NHR: Receptores hormonales nucleares
- NR1C1: PPAR α
- NR1C2: PPAR δ .
- NR1C3: PPAR γ
- TZD: Tiazolidinedionas.
- PPRE: Elementos de respuesta de proliferación peroxisomal.
- SYRT: Silenciador de hormonas retinoides y tiroides.
- *hsFATP4*: Proteína transportadora de ácidos grasos en células epiteliales intestinales humanas.
- FAT/CD36: Transportadores asociados a moléculas CD36.
- ACS: Acil-coAsintetasas.
- FABP: Proteínas de unión a ácidos grasos.
- ω 3: Omega 3.
- ω 6: Omega 6.
- CHO: Colesterol.
- CDC: Ciclinas
- CDK: Quinasas dependientes de ciclinas.
- PCNA: Antígeno nuclear de células en proliferación.
- PYY: Péptido regulatorio.
- RT-PCR: Reacción en cadena de Polimerasa-Transcripción reversa.
- 9Z, 11E-CLA: 9 cis-trans 11-linoleico conjugado.

- CLA: Acido Linoleico conjugado.
- NEC: enterocolitis necrotizante.
- ADNc: ADN complementario.
- ALP: Fosfatasa Alcalina.
- ATCC: American type culture collection.
- DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco.
- HUC: Hospital universitario de Caracas.
- LP: Lípidos Polares.
- CG-EM: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
- FL: Fracción/es Lipídica/s.
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- SFB: Suero Fetal Bovino.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- PMSF: Inhibidor de proteasas de Serina.
- BSA: Albúmina Sérica Bovina.
- K_2HPO_4 : Fosfato ácido de potasio.
- SDS: Dodecil Sulfato.
- DEPC: Dietilpirocarbonato.
- EtOH: Etanol.
- BDIF: Bidestilada, ionizada y filtrada.
- PCR: Reacción en cadena de polimerasa.
- OligodT₂₀: Oligonucleótidos de Timina.
- dNTP: desoxinucleotidostrifosfato.
- DTT: Dithiothreitol.
- TA: Temperatura hibridación.
- TR: Tiempo de retención.
- ATRA: Ácido Transretinoico.
- CEA: Antígeno carcinoembriónico.
- PP: Proliferadores Peroxisomales.

RESUMEN:

Efecto de ácidos grasos presentes en leche materna humana en la inducción de diferenciación de células epiteliales intestinales de origen humano. Papel de receptor nuclear PPAR γ .

Madrid, C. Angela Del R.¹

1. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela

La leche materna humana (LMH) es un fluido altamente complejo y variable en su composición, característica que contribuye a la supervivencia y al desarrollo del lactante. Los AG son los componentes más abundantes aportados por esta fuente alimenticia y actúan como reguladores de diversas rutas de señalización pudiendo inducir la activación de factores de transcripción implicados en procesos de diferenciación y metabolismo celular, especialmente en las células intestinales sometidas continuamente a la acción de los elementos de la dieta. Uno de los factores de transcripción denominado receptor de proliferación peroxisomal (PPAR γ) ha sido descrito como regulador de la diferenciación celular en enterocitos, así como de la captación y transporte de AG a través de proteínas de transporte como FATP4.

Debido a la diversidad estructural de los ligandos de PPAR γ , este proyecto propone explorar si componentes lipídicos de la LMH proveen ligandos naturales para PPAR γ y que esta interacción regule otros procesos celulares como son el transporte de AG y la diferenciación. Pudiendo este último, ser monitoreado a través de la comparación de los niveles de actividad de enzimas marcadoras del estado diferenciado, como la fosfatasa alcalina (ALP).

En este trabajo se determinó la composición de AG en un grupo de muestras de LMH. Del análisis se obtuvo una alta variabilidad en la composición de AG en las 3 etapas de producción muestreadas. Además, se describió un predominio notable de AG saturados, ácido Linoléico y Oleico sobre otras especies de AG. Por otro lado, se demostró que los componentes lipídicos de LMH, están involucrados en el proceso de maduración intestinal. Esto se desprende del incremento significativo obtenido en la actividad del marcador ALP en células HT-29 estimuladas con un conjunto de FL de LMH y una tendencia de incremento en cultivos estimulados con FL de muestras individuales. Hemos determinado también, que la acción de dichos componentes en cultivos de células resulta en la activación significativa del factor transcripcional PPAR γ lo que sugiere un posible mecanismo de acción para los AG

ingeridos durante la lactancia. Sin embargo, no se observó ninguna tendencia reproducible en los niveles del transcrito de FATP4 por lo que no se pudo asociar en este trabajo al receptor de proliferación, ni a las FL con la regulación de dicha proteína de transporte.

Finalmente, se propone un mecanismo de acción para los AG de la dieta sobre la expresión genética y por ende, sobre la modulación de actividades fisiológicas implicadas en el desarrollo y maduración intestinal.

Palabras clave: Leche Materna humana, ácidos grasos, PPAR γ , diferenciación, transporte de AG.

I. INTRODUCCION

I.1. Lactancia Materna.

El período de lactancia, constituye el paso final en el ciclo reproductivo de los mamíferos. Se reconoce que la lactancia provee la prolongación extrauterina de la protección materna durante la gestación. El fluido secretado por las células glandulares de la mama constituye una fuente alimenticia única pues su composición es especie-específica y se adapta perfectamente a las necesidades particulares de la cría, permitiendo así su maduración definitiva (Hayssen, 1993).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda su consumo exclusivo durante los primeros meses de vida (Asociación Americana de Pediatría o AAP, 1997) porque la práctica de la lactancia, además de los numerosos beneficios que ofrece al lactante (Castro y Porras, 2003; AAP, 2005) también resulta provechosa en el ámbito socio-económico y ambiental (AAP, 2005; Arendt, 2008).

La leche materna posee componentes nutricionales y factores protectores activos tales como ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs), ácidos grasos saturados, azúcares, fructo-oligosacáridos, lisozimas, IgA, lactoferrina, lipasas, prostaglandinas, macrófagos, citoquinas, factor de crecimiento epidérmico, nucleótidos, hormonas, entre otros (Pronczuk, y col. 2004).

Estos factores bioactivos, son capaces de activar vías de señalización que promueven la maduración gastrointestinal (Arendt, 2008), la maduración neural y cognitiva, a la vez que refuerzan el sistema inmunitario y participan en la respuesta inmune. Así mismo, son ampliamente reconocidas las propiedades antivirales, antibacterianas y antiparasitarias de la leche humana (AAP, 2005; German, 2010). La

acción sinérgica de sus componentes, reduce en el lactante, el riesgo de desarrollar enfermedades respiratorias, alergias (triada atópica), diarrea, enterocolitis necrotizante (Thompson y col., 2008), otitis media, infecciones del tracto urinario. Entre los beneficios de la lactancia a largo plazo han sido descritos una menor propensión a desarrollar diabetes de tipo 1, 2 y obesidad (Arendt, 2008). En general, la regulación que ejercen tales factores bioactivos sobre múltiples procesos biológicos contribuye a la supervivencia, a la salud y al desarrollo del infante lactante (Jarocka, 1999; Johnson, 1988).

I.2. Tipos de Leche Materna.

La secreción mamaria se divide en distintos tipos, de acuerdo a su etapa de producción: leche pretérmino y a término. La leche prétermino solo es producida en condiciones de parto prematuro (Maldonado y col., 2004) y es una leche con un mayor contenido graso, proteico y calórico que se adapta a las características especiales del lactante en estado de prematuridad.

La leche a término es producida tras un parto normal y a su vez se divide en calostro y leche madura. El calostro se produce a los primeros 4 días del parto y constituye un fluido amarillento espeso de alta densidad y escaso volumen. Posee un menor contenido energético. En comparación con la leche madura, contiene más proteínas, vitaminas liposolubles E, A y K, carotenos, un contenido elevado de inmunoglobulina A (IgA), citoquinas y otros factores inmunomoduladores, además de la presencia de factores de crecimiento que favorecen la diferenciación y maduración del epitelio intestinal y del sistema inmunitario en los primeros días de vida. Su alta densidad, el alto contenido proteico en tan escaso volumen y el menor contenido en grasas totales

en comparación con la leche madura, favorecen el manejo renal e intestinal por parte de los neonatos, que en etapas tempranas de crecimiento no poseen órganos lo suficientemente maduros que les permitan manejar grandes cantidades de líquidos y componentes nutricionales tan complejos como las grasas (Temboury y col., 2004).

El porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados de cadena media se incrementa en leche madura, reflejando un aumento en la síntesis de novo, mientras que el contenido de fosfolípidos es similar (Temboury y col., 2004) y el contenido de AG poliinsaturados de cadena larga disminuye. En la tabla 1 se resume la composición del calostro y de la leche materna madura, en donde se comparan en porcentajes, los niveles de algunos nutrientes y componentes lipídicos asociados a cada tipo de leche.

Tabla 1. Composición del Calostro y leche madura. Tomado y modificado de Temboury y col., 2004.

Componente	Calostro/100 mL	Leche Madura/100mL
Energía (Kcal)	58	70-75
Agua (%)	87.2	88
Lactosa (gr)	5.3	7.3
Nitrógeno total (mg)	360	171
Proteínas totales (gr)	2.3	0.9
Caseína (mg)	140	187
Alfa lactoalbumina (mg)	218	161
Lactoferrina (mg)	330	167
IgA (mg)	364	142
Grasas totales (gr)	2.9	4.2
Ácido Linoleico (AL) (% del total)	6.8	7.2
Ácido Linolénico (ALA) (% del total)	0	1
AG C20 y C22: poliinsaturados (%)	10.2	2.9
Colesterol (% del total)	27	16

I.3. Ácidos grasos en Leche Materna Humana (LMH) y sus funciones.

Los ácidos grasos (AG) son los elementos estructurales más simples de los lípidos. Estos compuestos se asocian espontáneamente a estructuras multimoleculares que proveen dominios estructurales únicos, tales como vesículas, glóbulos y lipoproteínas, las cuales solubilizan una gran variedad de constituyentes celulares y extracelulares no polares y muy poco solubles, a la vez que contribuyen con el transporte de dichas moléculas al interior celular y al sistema linfático (German y Dillard, 2010).

Estos elementos constituyen la fuente de energía más concentrada en la dieta y la principal fuente de energía para lactantes estrictos (German y Dillard, 2010). La LMH específicamente, proporciona el 40-50% de las calorías en esta forma, además de aportar los LC-PUFAs esenciales y vitaminas liposolubles bajo una composición relativamente variable (Temboury y col., 2004). Dicha variabilidad es dependiente de múltiples factores, entre ellos; el estado nutricional de la madre, el tipo de alimentación que recibe antes y durante la lactancia, de la intensidad, duración y frecuencia de las tomas (Maldonado y col., 2004) e incluso de factores psicológicos y/o ambientales que pueden afectar su disposición a lactar adecuadamente (Castro y Porras, 2003).

Los ácidos grasos constituyentes y derivados de la dieta, son esterificados principalmente en la forma de triacilgliceroles (TGs) que representan el 98% de la grasa de la leche (Giovannini y col. 1995) y una menor proporción de estos, son esterificados en la forma de fosfolípidos (PLs). Los PLs, además de ser los principales constituyentes de las membranas celulares, llevan a cabo funciones nutricionales como proveedores de LC-PUFAs, ácidos nervónicos (C24:1 ω -9) y colina, necesarios en el óptimo desarrollo del neonato (Sala-Vila y col. 2005). Además, contribuyen con la maduración del tejido

nervioso (Heird, 2001) y con el fortalecimiento del sistema inmunitario, esto último, a través de la interacción con células en el tracto gastrointestinal (Maldonado y col., 2004; Castro y Porras, 2003; Schanler, 2007).

Aun cuando la variabilidad en la composición es significativa, ha sido posible establecer una data de la composición promedio en donde predominan LC-PUFAs tales como linolécicos y linolénicos. El ácido linoléico (C18:2 ω 6), es el componente graso principal en LMH y es precursor del ácido araquidónico [AA], que a su vez da lugar a prostaglandinas, leucotrienos y prostaciclina. El ácido linolénico (C18:3 ω 3), es precursor del ácido eicosapentaenoico [EPA] (C20:5 ω 3) que tras un proceso de elongación forma el ácido docosahexaenoico [DHA] (C22:6 ω -3) (Temboury y col., 2004; Sala-Vila y col., 2005). Algunos de estos componentes están ausentes o modificados en leche de vaca, principalmente por diferencias estereoquímicas en sus triglicéridos, corroborándose así la importancia nutricional de la secreción humana (Maldonado y col., 2004).

El ácido araquidónico [AA], (C20:4 ω -6) y el ácido docosahexaenoico [DHA], (C22:6 ω -3) son esenciales. La esencialidad está dada porque los mamíferos carecen de enzimas capaces de insertar dobles enlaces en los átomos de carbono que están más allá del carbono 9. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga como AA (C20:4 ω -6), eicosapentaenoico (EPA o C20:5 ω 3) y docosahexaenoico (DHA o C22:6 ω -3), son sintetizados a partir de Ac. Linoléico o del Ac. Linolénico, los cuales deben ser incorporados en la fuente de alimentación (Temboury y col., 2004). Se conoce que la serie del Ac. Linoleico (serie ω -6) y la del Ac. Linolénico (serie ω -3) contribuyen con el desarrollo y diferenciación de complejos celulares en retina, sistema nervioso y tracto

gastrointestinal, a través de la activación de múltiples vías de señalización (Green y col., 1999; Pegorier, 2004; Innis, 2007).

En cuanto a los AG saturados, se conoce que representan el 50% de la composición grasa de la LMH, (German y Dillard, 2010). Estos componentes, específicamente los de cadena corta, son hidrolizados a partir de TGs y entre otras funciones, contribuyen con la diversidad estructural de las membranas celulares, por lo que constituyen un elemento clave en las propiedades de la misma. Seguidamente remarcaremos algunas características de este grupo de AG:

El ácido butírico (C4:0) está presente en bajo porcentaje en leche humana, (German y Dillard, 2010) pero constituye un importante modulador de la regulación genética. Este compuesto, constituye uno de los principales promotores de la diferenciación celular (Smith y col., 1998) y también se ha descrito que reduce los procesos de inflamación en el intestino actuando a través de receptores de unión de AG de cadena corta en el interior celular (Maslowsky y col., 2009).

En relación al ácido palmítico (C16:0), ha sido reportado que está presente en LMH a una concentración mucho mayor a la encontrada para otros AG saturados, presentando valores por arriba del 25%. Recientemente ha sido demostrado que el C16:0 estimula la expresión y actividad transcripcional de coactivadores de sistemas de control genético en el tracto gastrointestinal (German y Dillard, 2010).

El ácido caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) y láurico (C12:0) están presentes en LMH en concentraciones por debajo del 2% y se les reconoce que ejercen

efectos similares, asociadas principalmente a actividades antimicrobianas y antivirales (German y Dillard, 2010).

En síntesis, los componentes lipídicos en LMH comprenden factores bioactivos muy relevantes para el óptimo desarrollo neonatal. Su interacción durante la lactancia ha sido descrita principalmente a nivel del epitelio gastrointestinal y tejido neural. Tales componentes lipídicos desempeñan muy variadas funciones como elementos estructurales, promotores del desarrollo, combustible celular y agentes antiinflamatorios, antivirales y antimicrobianos (Batovska y col., 2009).

I.4.- Control de la expresión génica por ácidos grasos.

Durante la última década se han ampliado los estudios acerca del papel de ciertos constituyentes dietéticos en la regulación de la expresión de genes (Pegorier, 2004). Cabe destacar entre ellos a los ácidos grasos de cadena larga (LCFA) y sus derivados Coenzima A (CoA), pues afectan un gran número de sistemas celulares y funciones, incluyendo la regulación de la expresión génica y el metabolismo energético.

Se reconoce que la regulación de la transcripción génica, se debe a cambios en la actividad o abundancia de al menos 4 familias de factores de transcripción: PPAR (receptor de proliferación peroxisomal), LXR (receptor hepático X), HNF-4 α (factor nuclear hepático 4) y SREBP (elemento esterol-regulatorio de unión a proteína), como se muestra en figura 1 (Pegorier, 2004). Ahora bien, la naturaleza de la señal responsable de la regulación transcripcional por parte de los LCFA se mantiene incierta. Se ha sugerido que las moléculas activas en la regulación de la transcripción génica, podrían ser los mismos ácidos grasos libres en su forma no esterificada (NEFA) o sus derivados CoA

(conversión que evita el eflujo hacia el exterior celular), todo ello, de acuerdo con la especificidad de la célula y sus respectivos genes diana (Pegorier, 2004).

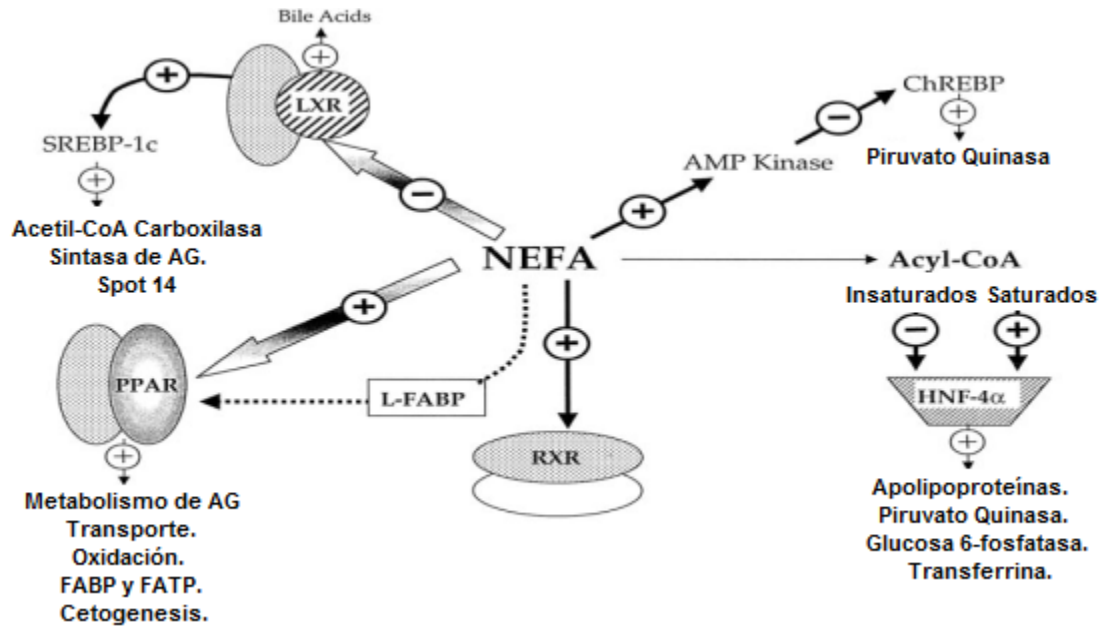


Figura 1. Esquema de las proteínas sensoras de ácidos grasos en la célula. Ácidos grasos no esterificados o sus respectivos CoA tioésteres regulan la transcripción de genes diana a través de la activación directa de algunos receptores nucleares como PPAR, LXR y HNF-4 α . Tomado de Pegorier, 2004.

Los mecanismos a través de los cuales estos factores de transcripción modifican los niveles de expresión y los eventos metabólicos a nivel celular se resumen a continuación.

- a) PPAR o receptores de proliferación peroxisomal: que será discutido en detalle más adelante.
- b) Receptor Hepático X (LXR); Oxiesteroles como el 22R-hidrocolesterol, 24,25 epoxicolesterol, regulan la expresión de genes envueltos en la síntesis biliar (gen que codifica para la enzima 7 α -hidroxilasa), subsecuentemente a su unión con

elementos hepáticos regulatorios (LXRE) formando heterodímeros con receptores de ácidos retinoicos (RXR) (Pegorier, 2004).

c) Factor nuclear hepático 4 (HNF-4 α); Mientras la unión a LCFA-CoA saturados estimula la actividad del HNF-4 α , la unión a LCFA-CoA poliinsaturados causa una inhibición de los efectos de HNF-4 α en la transcripción de genes. Este mecanismo controla directa e indirectamente la expresión de múltiples genes asociados al sistema hepático, entre ellos, los que codifican para proteínas del metabolismo lipoproteico, metabolismo de hierro, metabolismo de carbohidratos y de la síntesis de ácidos biliares. En este caso, su actividad se promueve a través de la unión a otros elementos regulatorios (RXR) en la forma de un homodímero, que compite con el heterodímero establecido por PPAR (PPAR/RXR) para la unión con motivos de ADN (Pegorier, 2004).

d) Elementos esteroles regulatorios de unión a proteína (SREBP); Los AG no se unen a SREBP. El incremento del colesterol en el retículo endoplasmático induce la inhibición de procesos proteolíticos que dan lugar a la disminución de SREBP en el núcleo. De igual manera, la competencia entre los PUFAs y los oxisteroles por la unión a receptores LXR, (regulador positivo de la expresión de SREBP) causan la reducción de la abundancia de este factor en el núcleo celular. Dado que SREBP regula la transcripción de genes que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de AG, su reducción podría representar el mecanismo principal por el cual los PUFAs suprimen la expresión de genes de la ruta de síntesis de AG (Pegorier, 2004).

Los AG de cadena corta (SCFA), también han demostrado ser efectores naturales de la diferenciación de células epiteliales intestinales (Scheppach, 1994). El butirato de sodio (NaBt), ha sido determinado como un fuerte agente antiproliferativo y de diferenciación de líneas celulares cancerígenas in vitro, actuando a través de promotor del gen *WAF1/cip1* que codifica para una proteína que inhibe la actividad de las deacetilasas de histona implicadas en la fase G1 del ciclo celular (Smith y col., 1998; Sanderson y Naik, 2000).

I.5. Receptor de Proliferación Peroxisomal Gamma (PPAR γ).

El descubrimiento y designación de la subfamilia de receptores nucleares PPAR se realizó en el año 1990 tras 25 años de acumulación de estudios acerca de este grupo estructuralmente diverso de receptores hormonales nucleares (NHR). Se ha determinado que inducen respuestas características, predeciblemente pleiotrópicas, que incluyen la activación de la transcripción de genes implicados en el metabolismo, oxidación, transporte de AG (Issemann y Green, 1990) y control de eventos de proliferación/diferenciación y apoptosis celular, además de aquellos que modulan los eventos antiinflamatorios (Rosen y Spiegelman, 2001).

Los PPARs poseen el dominio estructural típico de un NHR, lo cual incluye una región N-terminal pobremente caracterizada asociada a una potente función de transactivación denominada AF1, seguida por un dominio de unión de ADN o dos motivos de Zinc (Zinc-fingers). En el extremo carboxílico se encuentra el dominio de dimerización y de unión a ligando, cuyo modelado molecular reveló un largo bolsillo hidrofóbico que contiene una región clave también con una función de transactivación conocida como AF2 (Rosen y Spiegelman, 2001).

La subfamilia PPAR consiste de 3 isotipos denominados PPAR α , PPAR δ y PPAR γ (alfa, delta y gamma) como se muestra en la figura 2, también conocidos como, NR1C1, NR1C2 y NR1C3. Estas isoformas poseen secuencias muy conservadas entre especies, todas ellas codificadas por genes separados en distintas cromosomas. Los roles de cada isoforma en enfermedades crónicas tales como diabetes, obesidad, arterosclerosis y cáncer han sido ampliamente investigados (Rosen y Spiegelman, 2001; Bookout y col., 2006).

PPAR γ es la isoforma del receptor más estudiada hasta los momentos, es expresada en niveles relativamente altos en tejido adiposo y significativamente altos en colon (Lefebvre, 1999). Posee dos isoformas: PPAR γ 1 y una forma PPAR γ 2 “extendida”, pues posee en su porción N-terminal un segmento añadido de 30 aminoácidos. Ambas son codificadas por el mismo gen, empleando promotores distintos y *splicing* alternativo. Se conoce que ambas isoformas funcionan como reguladores esenciales de la diferenciación de adipocitos y participan en procesos de captación y almacenamiento lipídico, regulando su metabolismo e incrementando la expresión de una gran cantidad de genes clave asociados a estos procesos (Rosen y Spiegelman, 2001).

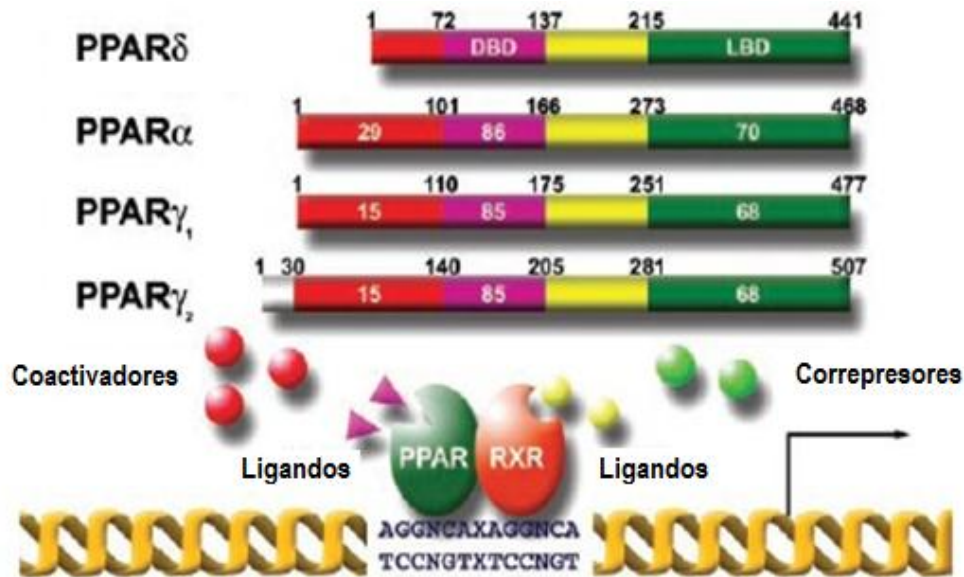


Figura. 2. Isoformas de PPAR, comparten dominios estructurales comunes y mecanismos de acción molecular. Tomado de Rosen y Spiegelman. 2001.

Estos NHR son activados con una alta afinidad, por ácidos grasos y sus derivados, así como por ciertos eicosanoides (Reginato y col., 1998), tal como la 15-Deoxy- Δ 12-14-prostaglandin J₂, que se une y activa a PPAR γ a concentraciones reducidas. Además, se han reportado activadores sintéticos que se unen con una alta afinidad en los dominios de unión a ligando en el terminal carboxílico del receptor. Este es el caso de tiazolidinedionas (TZD), drogas ampliamente empleadas como sensibilizadoras de insulina en pacientes con diabetes tipo 2 (Lehmann y col., 1995; Rosen y Spiegelman, 2001).

Los PPARs como todos los NHR, forman interacciones proteína-proteína con una variedad de complejos nucleares conocidos como coactivadores y correpresores. Estas interacciones median la formación de los respectivos heterodímeros, la reorganización de la cromatina, la maquinaria basal de transcripción y por ende la activación o la represión de la expresión génica.

En el núcleo de las células blanco, PPAR γ se encuentra enlazado al receptor del ácido retinoico 9cis- RXR α formando un dímero. Sólo cuando ambos receptores se encuentran unidos a sus respectivos ligandos, se potencia la unión a los elementos de respuesta de proliferación peroxisomal (PPRE), los cuales se encuentran flanqueando a la secuencia de los genes diana, promoviendo de esta manera su transcripción (Rosen y Spiegelman, 2001). Los PPRE consisten en una repetición directa de una secuencia de 6 nucleótidos tales como AGGTCA o TCACCT, en donde el número de nucleótidos que espacia las repeticiones de estos motivos hexaméricos varían de receptor a receptor y de gen a gen (Viswakarma y col., 2010). En resumen, la transactivación de PPAR resulta de la combinación PPAR-RXR unido a PPRE y a su respectivo ligando. El cambio conformacional disparado por la unión del ligando o por otros procesos de activación tales como fosforilación (Viswakarma y col., 2010) promueven la liberación de complejos correpresores y el reclutamiento de complejos coactivadores como PGC-1 α (coactivador 1 de PPAR γ , como se muestra en la figura 3) en la región promotora de los genes diana, resultando en la iniciación de diversos procesos asociados a la maquinaria transcripcional (Puigserver y Spiegelman, 2003, Viswakarma y col., 2010).

En ausencia de ligando, el heterodímero PPAR-RXR se mantiene unido a un receptor nuclear correpresor denominado NCoR, y al silenciador de hormonas retinoides y tiroideas (SMRT). Ambos correpresores interactúan con complejos proteicos que facilitan el reclutamiento de deacetilasas de histonas asociadas a factores de transcripción, reprimiendo de esta manera su actividad en el núcleo celular. Las proteínas y complejos coactivadores, por su parte, incrementan la transcripción de los genes blanco vía acetilación de histonas y a través del reclutamiento y estabilización de complejos

transcripcionales y del empaquetamiento de la cromatina. Todo ello favorece la interacción de la enzima polimerasa II y por ende la iniciación del evento transcripcional.

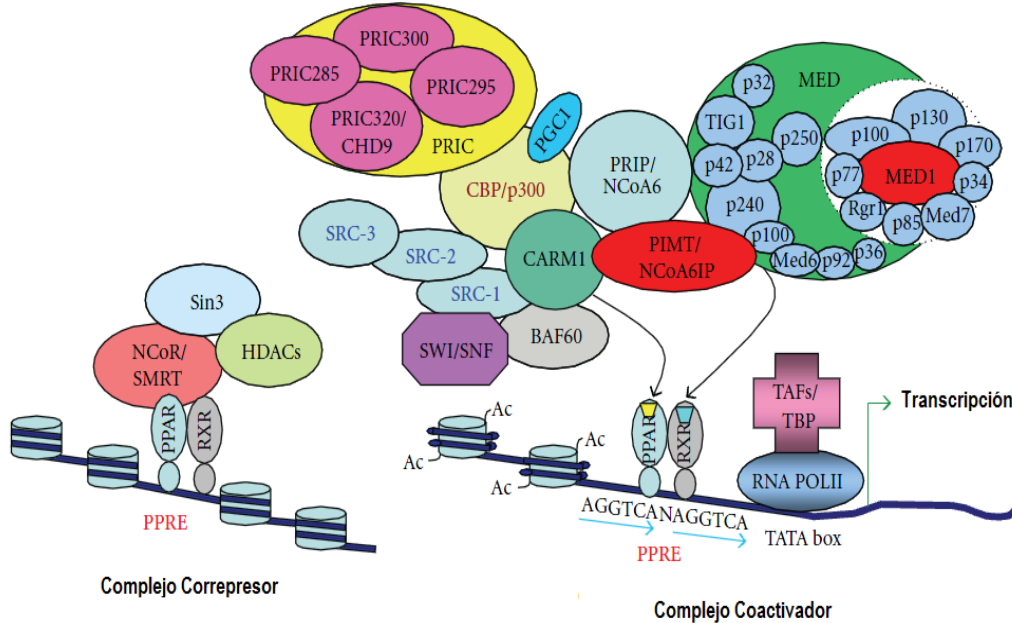


Figura 3. Representación esquemática del reclutamiento ligando dependiente de coactivadores para la transcripción regulada por PPAR. En ausencia de sus respectivos ligandos, el heterodímero PPAR-RXR recluta correpresores, los cuales unen componentes adicionales al complejo, incluyendo deacetilasas de histona. Cuando se unen los ligandos de cada receptor (trapezoido amarillo y azul), se promueven cambios conformacionales en el heterodímero que promueven la disociación del complejo correpresor. El complejo activado se une a PPRE y a coactivadores que acetilan (SRCs, p300) o metilan (CARM1) a los nucleosomas, y así remodelan la cromatina. Componentes mediadores también hacen contacto con PPAR y facilitan el reclutamiento de la maquinaria basal de transcripción (TATA box) que se une a la ARN polimerasa II para la transcripción de los genes blanco. Tomado de Viswakarma y col., 2010.

I.6. Isoforma 4 de la proteína transportadora de ácidos grasos en células epiteliales intestinales humanas (*hsFATP4*).

En el proceso de absorción, los AG de cadena larga (LCFA), son captados por células epiteliales de las vellosidades del intestino delgado, denominadas enterocitos, y luego son re-esterificados e incorporados en quilomicrones como TGs. Los quilomicrones se forman en el retículo endoplasmático de los enterocitos y sufren un

proceso de exocitosis en el lado basal de la célula, en donde subsecuentemente son enviados al sistema linfático a través de la circulación portal (Stahl y col., 1999).

En 1999 se reveló que adicionalmente a los mecanismos de transporte por difusión, el intestino expresa un competitivo sistema de transporte de AG en el lado apical o borde en cepillo de estas células epiteliales (Stahl y col. 1999). Dicho sistema de transporte ha sido caracterizado y se sabe que está constituido por: transportadores de ácidos grasos acoplados a moléculas CD36 (FAT/CD36) (Nassir y Abumrad, 2009), Acil co-A sintetas (ACS), proteínas transportadoras (FATP) y de unión a AG (FABP) (Stahl y col. 1999).

Hasta la fecha ninguno de estos candidatos ha sido probado como indispensable en el transporte fisiológico intestinal de AG, a excepción de la proteína transportadora de ácidos grasos en células epiteliales intestinales humanas (*hsFATP4*) (Stahl y col., 2001). Esta proteína ha sido caracterizada como un complejo multifuncional que media la captación de ácidos grasos y cataliza la formación de derivados de CoA a través de un acoplamiento con enzimas de tipo ACS usando AG de cadena larga y cadena muy larga, así como ácidos biliares y sus precursores como sustrato (Gimeno, 2003).

Específicamente la FATP4, está localizada en la zona apical, o borde en cepillo de las células epiteliales intestinales (Stahl y col., 2001). Basándose en que el silenciamiento del gen que codifica para la proteína en cultivos aislados de enterocitos producen la correspondiente reducción de la captación de LCFA, se ha propuesto que la FATP4 sea la principal proteína encargada del transporte de AG en el intestino y que por ello, la modulación de sus funciones resulte, en una alteración de la homeostasis energética y en

la sensibilidad a insulina a este nivel y posteriormente en todo el organismo (Shim y Moulson, 2009).

Tal como se ha mencionado anteriormente, numerosos genes están sujetos al control transcripcional de los receptores de la familia de PPAR, incluyendo los asociados al transporte como FATP4 y ACS. Se ha demostrado que ambas proteínas se encuentran bajo un control transcripcional positivo mediado por PPAR γ , es decir, la activación del receptor se ha visto asociada con un incremento en la captación y transporte de ácidos grasos, a través de un incremento en los niveles de transcripción de estos transportadores (Geneviere y col., 1997).

I.7. Estructura, fisiología y maduración del epitelio intestinal.

I.7.1. Desarrollo embrionario.

El tracto digestivo se forma a partir de un primordio embrionario heterogéneo cuya capa germinal endodérmica da lugar al tubo epitelial intestinal, mientras que la capa mesenquimal que la rodea produce el tejido conectivo y la musculatura subyacentes (De la Torre, 2006). En las diferentes especies de mamíferos se han reportado procesos de morfogénesis y diferenciación celular intestinal similares. El intestino delgado de los humanos adquiere los principales rasgos morfológicos, durante el desarrollo fetal, (Drozdowski y col., 2010) siendo marcadores de dicho desarrollo los siguientes procesos:

- (1) Se pliega el endodermo embrionario formándose vellosidades primitivas.
- (2) Las células del endodermo se diferencian progresivamente en los diferentes tipos celulares intestinales especializados.

(3) Se forman las criptas en la base de las vellosidades con células de Paneth residentes.

Las paredes intestinales del intestino humano consisten en un epitelio estratificado de aproximadamente cuatro capas celulares rodeadas de mesenquima. A las 7 semanas de gestación, estas células epiteliales se encuentran poco diferenciadas con microvellosidades cortas e irregulares y una gran actividad mitótica (ver figura 4). A la novena semana, se inicia la formación de vellosidades y el paso a un intestino en monocapa, lo cual ocurre a nivel del intestino proximal y se extiende posteriormente hacia la zona más distal y hacia el colon, culminándose el proceso en las semanas 11-12 (Teller y Beaulieu, 2001). Las criptas intestinales comienzan a formarse en la semana 16 y contienen un grupo de células madre proliferantes indiferenciadas.

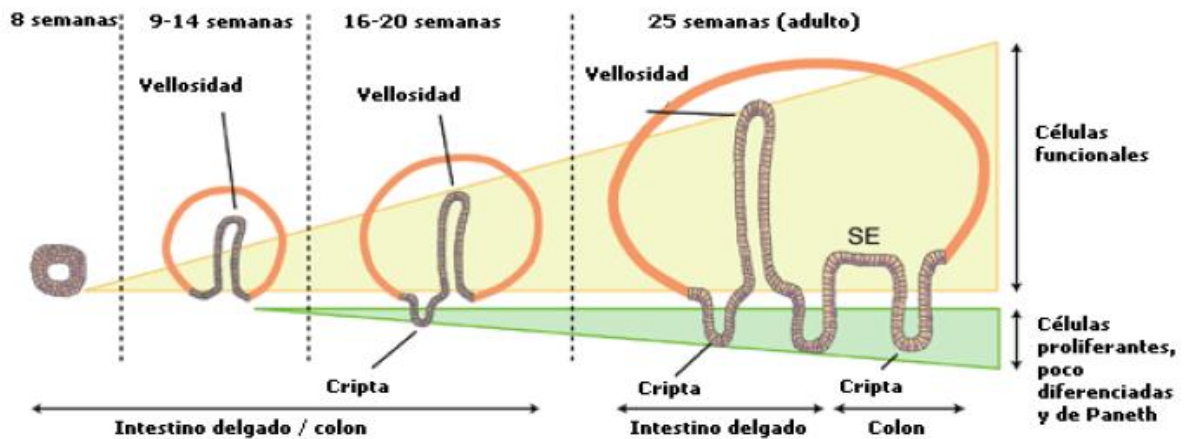


Figura 4. Desarrollo embrionario del epitelio intestinal en las diferentes semanas de gestación. (Teller y Beaulieu, 2001)

La expresión de las enzimas marcadoras de diferenciación tales como fosfatasa alcalina, leucinaminopeptidasa, disacaridasas, dipeptidasas y tripeptidasas, se produce paralelamente a los cambios morfológicos y al paso de un epitelio multiestratificado a uno en monocapa o maduro (De la torre, 2006). Alcanzadas las semanas 18-22 de

gestación, la mucosa intestinal humana presenta mayores semejanzas con la del adulto en cuanto a morfología y capacidades absortivas (Beaulieu, 1997).

I.7.2. Epitelio Maduro.

El epitelio intestinal constituye la principal superficie de absorción de nutrientes incluyendo agua y electrolitos. La pared intestinal, al igual que otros segmentos del tracto digestivo está compuesta por 5 capas; del exterior al interior: serosa, muscular, submucosa, muscularis mucosae y mucosa. En la mucosa intestinal, ocurren los procesos de absorción y regulación del transporte de moléculas. Esta se encuentra formada por un epitelio de una sola capa que recubre la lamina propia, como se observa en la figura 5 (Corteguera, 1999).

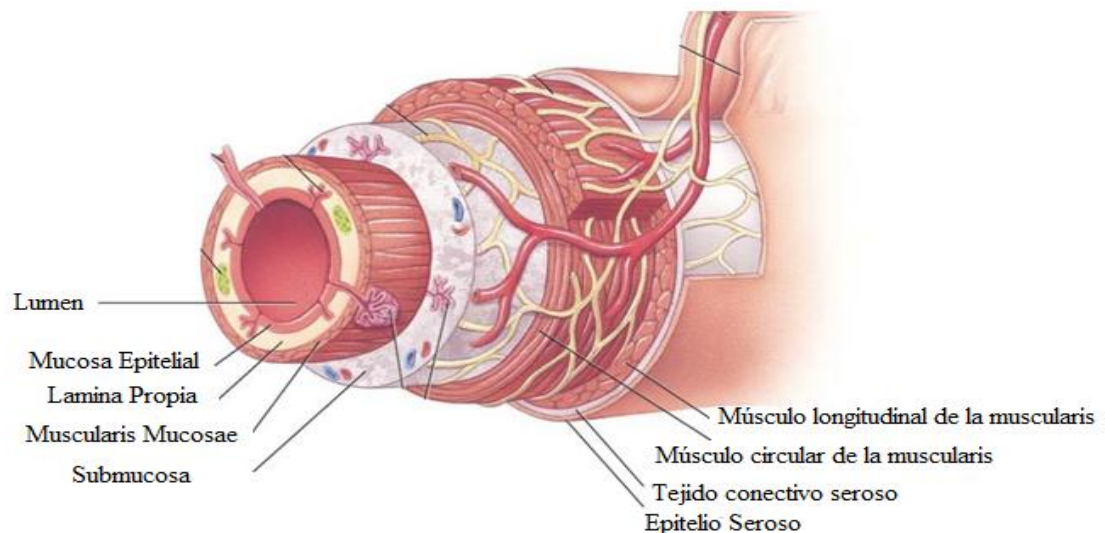


Figura 5. Estructura de las capas del intestino delgado.

Fuente: <http://nutricionhuesca.blogspot.com/2011/05/tema-29.html>

[Consulta: 3/05/2012].

La superficie intestinal absorptiva, principalmente el duodeno y la región proximal del yeyuno, se pliega para dar lugar a válvulas conniventes, a vellosidades y a las microvellosidades. Las válvulas conniventes son repliegues transversales de la submucosa, que incrementan unas 600 veces el área de la superficie luminal (Van Beers y col., 1995). Las vellosidades son proyecciones dactilares de la mucosa, como indica la figura 6, recubiertas por una capa de células epiteliales columnares denominadas enterocitos y por otros tipos celulares. En la base de las vellosidades se encuentran las criptas intestinales (Corteguera, 1999).

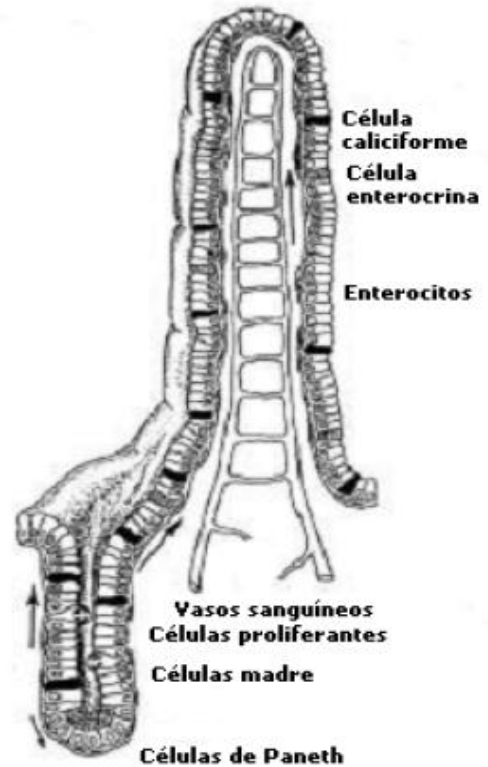


Figura 6. Representación de una proyección dactilar de la mucosa del epitelio intestinal. Se presentan 4 tipos de células intestinales. Tomado de Van Beers y col. 1995.

Los enterocitos constituyen el 90% de las células dirigidas hacia el lumen. Consisten en células polarizadas con una membrana apical en borde cepillo (con pequeñas proyecciones denominadas microvellosidades) claramente separada del polo o dominio laterobasal. Los enterocitos se unen entre sí mediante uniones estrechas y por desmosomas de banda, como se observa en la figura 7. Se ha determinado, que ciertas líneas celulares establecidas a partir de cultivos transformados, son capaces de adquirir el fenotipo de célula diferenciada similar al expresado por tejidos no cancerígenos. Todo

ello, dependiendo de las condiciones del cultivo, este es el caso de células HT-29 y células HTC-116 (Zweibaum y col., 1985; Freshney, 2010).

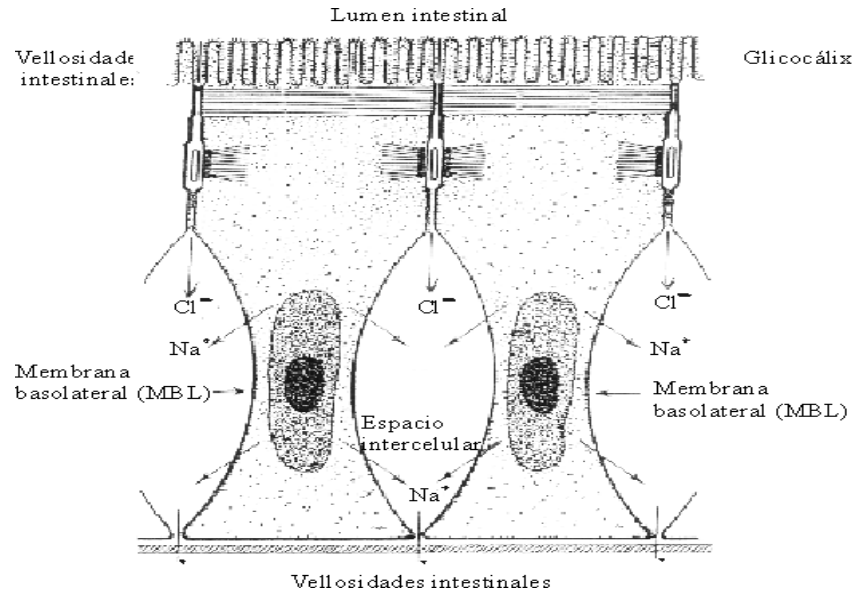
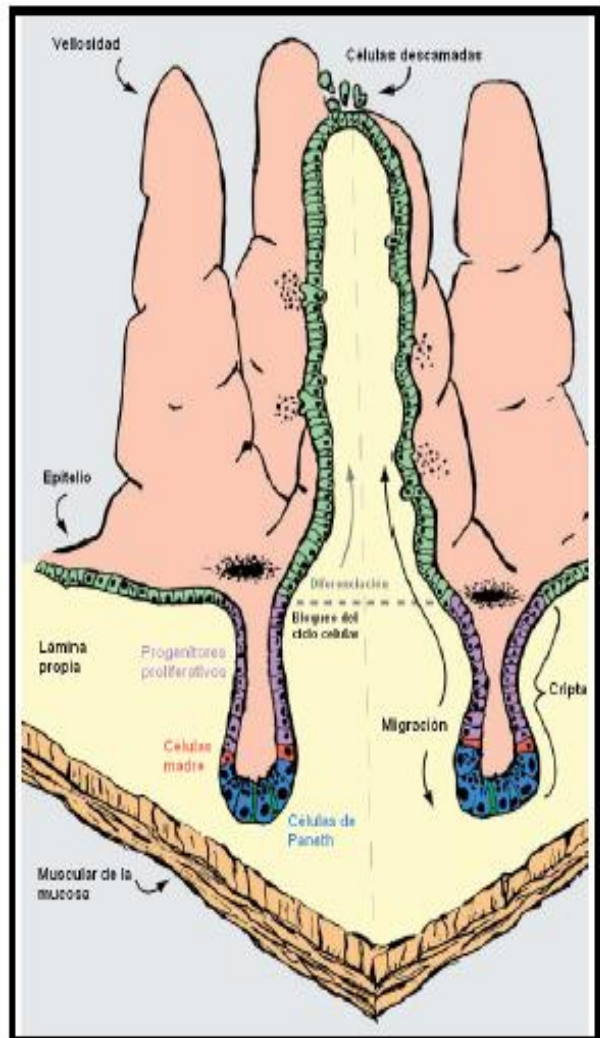


Figura 7. Estructura funcional de la mucosa intestinal (enterocitos). Tomado de Corteguera y col. 1999.

Los enterocitos, tienen como función la absorción e hidrólisis de las moléculas que a través de ellas se transportan, evento que es promovido por la presencia de una capa superficial de glicoproteínas denominada glicocáliz, que contiene a los transportadores y las enzimas específicas para cada sustrato (figura 7) (Gardner, 1975; Organización Panamericana de la Salud (OPS),1987; Corteguera y col. 1999).

En las criptas intestinales se lleva a cabo un proceso dinámico que promueve la renovación del epitelio intestinal (ver figura 8). En la base de cada cripta se presentan de 1 a 6 células madre multipotentes localizadas en nichos específicos, capaces de proliferar para dar origen a los cuatro tipos celulares de dicho epitelio. Las células progenitoras proliferativas migran a lo largo del eje cripta-vellosidad, y en el caso de las células de Paneth, migran hacia el fondo de la cripta (Clatworthy y Subramanian, 2001). Dicha migración



converge con la diferenciación tanto **Figura 8. Dinámica de renovación del epitelio intestinal.** Tomado de Sancho y col. 2004. funcional como morfológica de las células epiteliales y tal evento, adquiere su grado máximo cuando estas alcanzan la región apical de la vellosidad. En esta etapa se produce un bloqueo del ciclo celular, por consiguiente cesa la actividad proliferativa y la célula diferenciada es finalmente descamada (Sancho y col. 2004). Se cree que la eliminación en lo alto de la vellosidad, se debe a un proceso especial de apoptosis por pérdida de sustrato (Wang y col., 1995; Beaulieu, 1997). Este proceso de recambio celular permite la renovación constante de la mucosa intestinal en un proceso rápido, de una duración de 3-5 días para los humanos.

I.8. Cambios en la expresión de genes durante el desarrollo y diferenciación del epitelio intestinal.

Se ha determinado que los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en el epitelio intestinal pueden estar asociados tanto a cambios genéticos como a la adaptación ante la dieta y el estrés (Drozdowski y col., 2010). Por esta razón, el proceso de diferenciación intestinal puede monitorearse a través del cambio en la expresión de genes y en la actividad de enzimas o proteínas específicas que determinan la capacidad de ejecución de transporte, de la secreción de moléculas y de los cambios morfológicos propios de la célula madura (Ametani y col., 1996).

El período de programación durante el proceso de diferenciación epitelial intestinal a lo largo del eje cripta-vellosidad puede ser modificado incluso por sutiles diferencias en el tipo y en la proporción de ciertos elementos contenidos en la dieta. (Drozdowski y col., 2010).

Se ha puesto en manifiesto, que la reprogramación genética que se da durante el proceso de la diferenciación del enterocito implica a una gran cantidad de genes, algunos de los cuales pueden ser empleados como marcadores de diferenciación y otros se relacionan con el control del ciclo celular y sus fases, con modificaciones postranscripcionales y citoesqueléticas y con la captación de nutrientes (Mariadason y col., 2005).

Uno de los genes asociados a indicadores de diferenciación, es el que codifica para fosfatasa alcalina (ALP). La ALP es una enzima dimérica presente en la mayoría de los organismos y ha sido determinada como un marcador de aparición precoz en la maduración epitelial. Su función es catalizar la hidrólisis de ésteres de monofosfato a pH

alcalino liberando fosfato inorgánico (Calhau y col., 2000). En el intestino, su localización específica es la membrana apical, encontrándose fija en la superficie a través de un anclaje fosfatilinositol-glicosilado (Wong y col., 1992), lo cual favorece el procesamiento de distintos compuestos, entre ellos grasas (Lalles, 2010).

En suma, los eventos de diferenciación del enterocito traen consigo cambios en la expresión de diversos factores, entre los que pueden citarse:

- a) Incremento de la expresión de genes implicados en el metabolismo de AG (lipasas, deshidrogenasas, ALP, PPAR y apolipo-proteínas), absorción de agua, lípidos, iones, así como una disminución en la expresión de los genes implicados en la síntesis de AG y colesterol (Mariadason y col., 2002; German y Dillard, 2010).
- b) Disminución en la expresión de genes relacionados con el ciclo celular. Disminuye la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en la progresión del ciclo, como ciclinas (CDC) y quinasas dependientes de ciclinas (CDK), así como la disminución en la expresión de factores de transcripción implicados en la transición de la fase G1 a S y un aumento en la expresión de los genes que codifican para proteínas de detención del ciclo celular como p21 y TOB (Mariadason y col., 2002).
- c) Incremento en la expresión de genes relacionados con la replicación y reparación de ADN, así como otras tareas de la división celular. Disminución de los genes que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de nucleótidos, como la timidilato sintasa, dihidrofolato reductasa, UMP quinasa, adenosin quinasa, topoisomerasas y ADN

polimerasas, así como diferentes genes implicados en el ensamblaje de cromatina y síntesis de ADN, como el gen que codifica para el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA), entre otros (Mariadason y col. 2002).

II. ANTECEDENTES.

Ha habido un amplio interés en las funciones de la leche materna y sus componentes desde que Klagsbrun encontró que la LMH estimulaba la proliferación de fibroblastos en cultivo, a través de la inducción de la síntesis de ADN y la división celular (Klagsbrun, 1978). Dicha observación conllevó a que se concentraran los esfuerzos en el aislamiento y caracterización de los factores mitogénicos presentes en leche (Burrin, 1997). A partir de estos descubrimientos, se han realizado numerosos estudios en diferentes modelos animales como ratones, cerdos y euterios, en los cuales se ha evaluado el posible efecto de la leche humana y sus componentes en el desarrollo y maduración de un epitelio en monocapa (Berseth, 1987; Widdowson y col., 1976, Langer, 2003). En todos los casos se reportó que aquellos individuos que consumieron únicamente leche materna durante sus primeros días de vida, obtuvieron un mejor desarrollo de su sistema gastrointestinal. A través de estos resultados se postuló, que factores presentes en la fuente de alimentación, en este caso en la leche materna, podrían activar la expresión de genes específicos implicados en el desarrollo y maduración del epitelio intestinal (Berseth, 1987).

También se ha venido estudiando el papel de los AG como componentes bioactivos principales de la LMH, específicamente el del Acido Araquidónico (AA) y del Docosahexanoico (DHA) (Hamosh, 1997), corroborándose en cada caso su esencialidad en el desarrollo neural, visual y cognitivo (Sala-Vila y col., 2005) así como en el fortalecimiento del sistema gastrointestinal e inmunitario de los infantes lactantes (Schanler, 2007; AAP., 2004).

Cabe destacar que del análisis previo de la composición de AG presentes en LMH se desprende, que esta difiere dependiendo de su etapa de producción, de la distribución geográfica de los sujetos de estudio, así como de su dieta y sus culturas (Su y col., 2010)

Entre los estudios más resaltantes se encuentra el de Bosch y colaboradores en el 2009, donde se analizó la composición de AG presentes en muestras de LMH de pacientes venezolanas de bajos recursos, denotando una mayor proporción de Acido Linoleico con respecto al α -Linolénico, y en general una proporción equitativa entre PUFAs y AG saturados. En el 2010, Lu y colaboradores analizaron la influencia de los grupos étnicos en Asia, sobre la composición de AG en LMH, encontrando una mayor proporción de derivados de α -Linolénico como DHA y EPA con respecto a Acido Linoleico y AG saturados, resaltándose en este caso la importancia del tipo de dieta en la composición grasa de la secreción humana (Su y col., 2010). En el 2011, grupos de investigadores en Francia (García y col., 2011); España (Puigmartí y col., 2011) y Reino Unido (Novak e Innis. 2011), detectaron niveles similares de Acido Linoleico y α -Linolenico en la composición de AG en LMH de pacientes de cada región, además de comprobar la variación que se presenta en la composición según la etapa de producción. En estos estudios se determinó, que los niveles de PUFAs como DHA y EPA eran mayores en la etapa pretérmino en comparación con la secreción láctea a término, lo cual ha demostrado ser ventajoso para el desarrollo y maduración de órganos en los infantes prematuros.

En cuanto a los efectos de los AG a nivel celular, previamente se reportó que PUFAs ω -3 actuaban como inhibidores de la proliferación de la mucosa colorectal (Anti y col., 1992; Pell y col., 1994). En esta investigación se detectó una disminución en la

tasa de producción de células epiteliales en la cripta en los enterocitos tras la captación de AG. Por ello comenzó a proponerse el papel de estos compuestos como inductores de la diferenciación de células epiteliales.

Posteriormente, otros estudios catalogaron a los AG como modelos de proliferadores peroxisomales. Principalmente los LCFA fueron denotados como segundos mensajeros y reguladores de rutas de señalización intracelular, similares en estructura e idénticos en mecanismo de acción a otros xenobióticos; como prostaglandinas, leucotrienos y drogas hipolipidémicas (Ledwith y col., 1996; Brown y col., 1997). Dicho mecanismo de acción para AG y tales xenobióticos se relacionaba con la activación de un factor de transcripción conocido como PPAR (Issemann y Green, 1990). Se encontró que la activación de PPAR conllevaba a la regulación de la expresión de una batería de genes asociados a proliferación, diferenciación, apoptosis y metabolismo lipídico y que su localización en el tejido determinaba el destino celular. PPAR γ específicamente, fue descrito como el máximo regulador de los eventos antiproliferativos en células intestinales, altamente expresado en células derivadas de colon en estado diferenciado, capaz de inducir cambios fenotípicos y de inducir la detención del ciclo celular en las primeras fases del mismo (Sarraf y col., 1998; Brockman, 1998; Tsujie y col., 2003; Lampen y col., 2005).

Por otro lado, numerosos estudios han reportado el papel de PPAR en la regulación de la expresión de transportadores de membrana.

En 1997 Geneviere y Lefebvre analizaron el patrón de expresión de FATP4 y de otra proteína clave en el transporte de AG al interior celular y de su respectiva esterificación; la Acil coA sintetasa (ACS). Los autores evaluaron si su expresión se

alteraba a través de la activación de PPAR. Para esto, emplearon activadores específicos del receptor como Tiazolidinedionas y fibras, y demostraron que la regulación de la expresión de FATP4 y Acil coA sintetasa por ligandos de PPAR se daba a nivel transcripcional. La maquinaria transcripcional de estos genes se activaba a través de la unión a motivos PPRE localizados río arriba de las secuencias de ambos transcritos, además de promover la expresión de otros genes asociados a la vía de señalización del receptor. Adicionalmente, comprobaron que la activación de las distintas isoformas de PPAR se asociaba con un concomitante incremento de la captación de los ácidos grasos de la dieta a través de FATP4 (Geneviere, y col., 1997).

El posible acoplamiento entre las funciones de FATP4 y otras proteínas de transporte transepitelial con el mecanismo de activación de PPAR, ha conllevado a la investigación de las posibles rutas de señalización de este receptor. Por esta razón en el 2011, el grupo de laboratorio Kanehisa, reportó por primera vez la ruta de señalización de PPAR y su acción sobre múltiples genes en adipocitos humanos (ver figura 9).

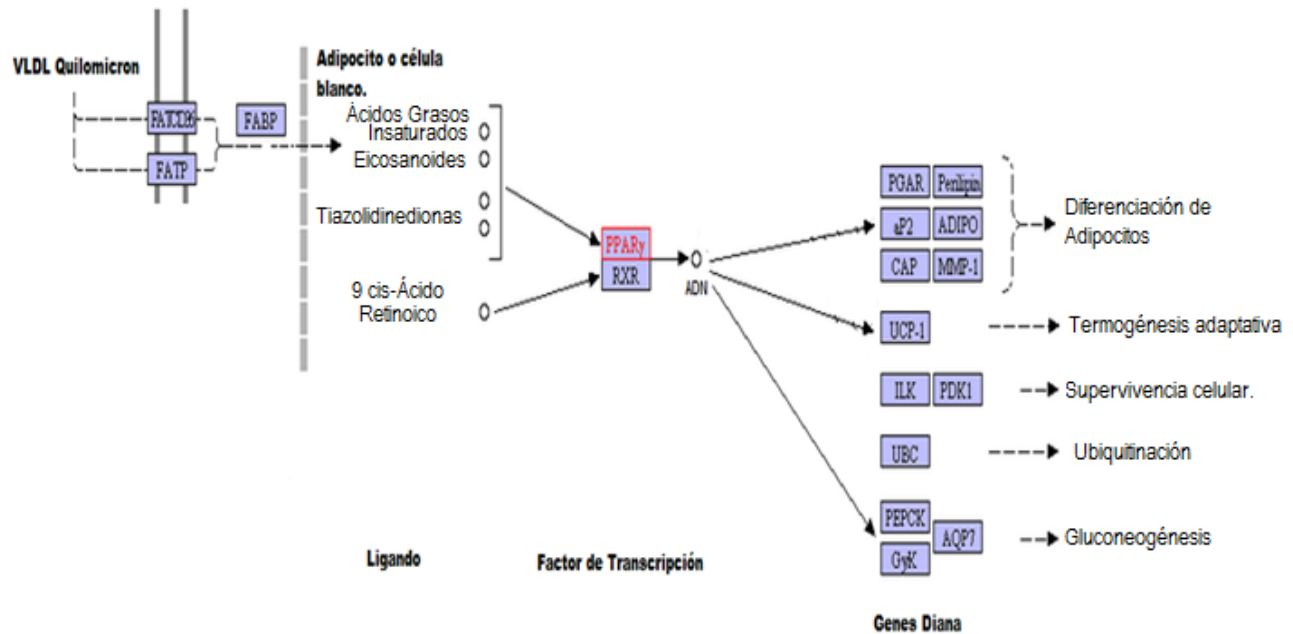


Figura. 9. Ruta de señalización de PPAR en adipocitos. Tomado de KEGG Pathway Database.
Fuente: <http://www.genome.jp/kegg>. [Consulta 02/05/2012]

En cuanto a esta ruta, lo más relevante es que PPAR γ induce la expresión del gen α P2, que codifica para una FABP de tejido adiposo a través de su unión a un potenciador o *enhancer* que rodea la región 5' de dicho gen, al igual que lo hace con la gran batería de genes que regula. Adicionalmente a FATP4, ACS y FABP, se reveló que otros genes asociados al transporte contenían motivos PPRE río arriba en sus secuencias, tal es el caso de la acyl CoA oxidasa y la citocromo p450 hidroxilasa de AG. Todos estos descubrimientos realzaron el papel crucial de estos receptores en la función de muchos o de la mayoría de los genes asociados al procesamiento de grasas.

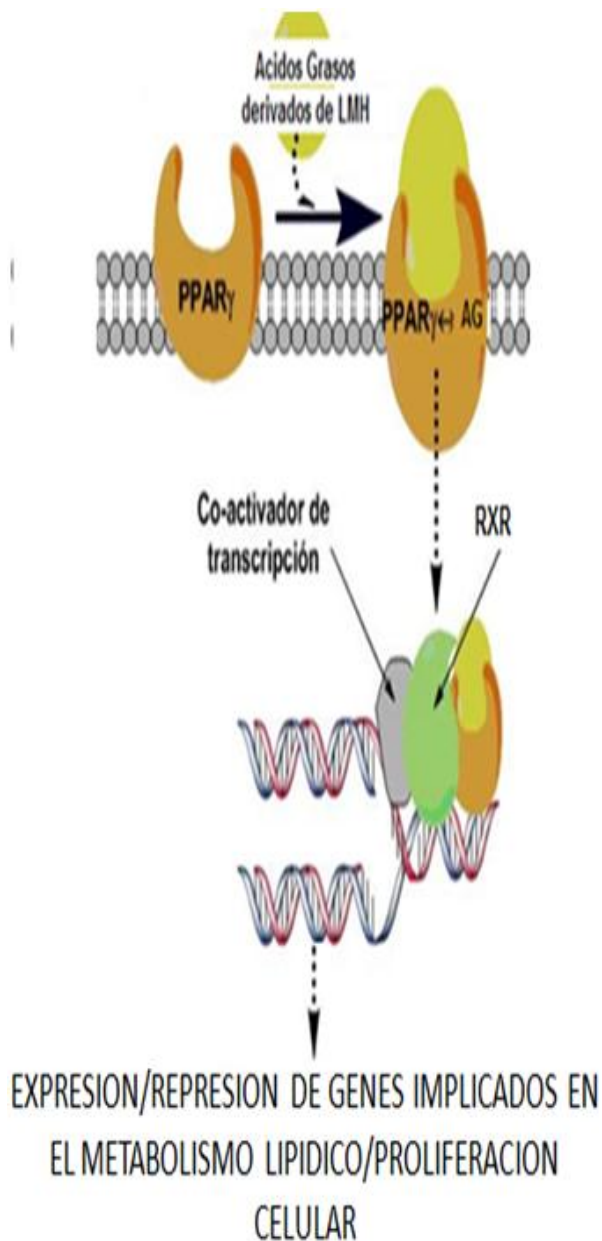


Figura 10. AG derivados de la fuente de alimentación, capaces de activar la ruta de señalización del receptor PPAR γ . Tomado y modificado de <http://www.info-farmacia.com>.

De esta manera y en lo sucesivo, numerosos estudios han corroborado y reafirmado los patrones de proliferación, diferenciación, apoptosis y metabolismo mediado por lípidos de la dieta, especialmente por PUFAs, sobre múltiples poblaciones celulares (Pedrosa, 1999; Actis, 2002; Pegorier y col 2004; Rodríguez Cruz, 2005). Finalmente, y a manera de acoplar la ruta que conlleva al control de la expresión de genes asociados con el transporte e inhibición de la proliferación una vez que los AG activan a estos receptores celulares, se muestra la figura 10. A continuación se resumen algunos trabajos asociados al estudio de dicho acoplamiento:

Lampen y colaboradores en el 2005, evaluaron los efectos moleculares del ácido 9-cis, trans-11 linoleico conjugado (9Z, 11E-CLA) sobre la diferenciación, proliferación, interacción con PPAR y expresión de genes relevantes en las vías señalización de la isoforma δ , en células HT-29 y Caco-2. De este estudio concluyeron que 9Z, 11E-CLA posee un efecto

antiproliferativo e inductor de diferenciación en células neoplásicas colónicas, lo cual fue evidenciado al observar un incremento en la actividad enzimática de la ALP en ambas líneas celulares, así como los niveles de expresión del ARNm de esta enzima. De igual manera, Lampen y colaboradores, encontraron que los genes de proliferación tales como c-myc, D1 cyclin y c-jun asociados a la ruta de señalización de PPAR δ se hallaban reprimidos de manera dependiente de la concentración de 9Z, 11E-CLA. Esto último se relacionó con la disminución de los niveles de ARNm de dicho receptor nuclear y con la activación de una vía alterna asociada a PPAR γ a su vez relacionada con eventos antiproliferativos y de diferenciación (Lampen, y col., 2005).

Otro factor que puede cambiar el estado de diferenciación de células intestinales es el ácido butírico (Hague y col., 1996). Su mecanismo de acción se asocia con modificaciones post-traduccionales tales como acetilación y fosforilación de histonas nucleares, favoreciendo la unión de factores de transcripción que promueven la expresión de múltiples genes implicados en la detención del ciclo celular (Smith y col., 1998).

Recientemente Hofmanová y colaboradores (2009; 2012a; 2012b) compararon las respuestas de líneas epiteliales de colon humano fetales diferenciadas (FHC), derivadas de carcinoma diferenciadas (HT-29) y no diferenciadas (HCT-116), frente a tratamientos combinados con butirato de sodio (NaBt) y LC-PUFAs tales como Acido Araquidónico y Docosahexaenoico, detectando diferencias significativas en cuanto proliferación, diferenciación y respuesta apoptótica se refiere, dependiendo de la línea celular. En síntesis, encontraron que células FHC y HT-29 inducidas con NaBt detuvieron el ciclo celular en las primeras fases, conduciendo a su diferenciación y por tanto a un incremento en la actividad del marcador de diferenciación. En combinación con PUFAs, las células

FHC suprimieron significativamente la respuesta a diferenciación y dirigieron el ciclo hacia apoptosis. Las células HT-29, no mostraron una potenciación significativa en la respuesta apoptótica, ni en los niveles del marcador de diferenciación, mientras que HTC-116 no mostró efecto alguno luego del tratamiento combinado. Sus resultados finalmente apoyan el concepto de modulación por parte de NaBt y PUFAs, especialmente de aquellos de la familia ω 3, sobre la proliferación/ diferenciación y apoptosis en células colónicas derivadas de epitelios normales o neoplásicos.

De todo esto, podemos afirmar que el estudio del efecto de los ácidos grasos derivados de la dieta, en especial de los provenientes de LMH, sobre la diferenciación celular y más específicamente, sobre las rutas que gobiernan los procesos de proliferación, apoptosis y transporte celular constituye un área de vigencia y de vital relevancia en el campo de la investigación.

III. JUSTIFICACION

Basándose en la fuerte evidencia científica acerca de los beneficios asociados al consumo de leche materna humana durante los primeros años de vida, la Academia Americana de Pediatría, la Organización Mundial para la Salud, y otras organizaciones implementan campañas para promover e incrementar el éxito de la lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida, pues constituye un elemento clave en el crecimiento y desarrollo óptimo de los neonatos.

Todas las ventajas asociadas a su consumo, se deben a la presencia de factores bioactivos que poseen capacidad mitogénica e inmunomoduladora, y que no se encuentran en otra fuente de alimentación. Por esta razón, tales factores han sido ampliamente estudiados y caracterizados en los últimos años, revelándose que la mayoría de ellos trabajan como potentes agentes efectores de la maduración neural, de la construcción de un sistema inmunitario eficiente, de la maduración y fortalecimiento gastrointestinal, entre otros.

Como se acotó anteriormente, a nivel celular uno de los principales moduladores de la diferenciación y maduración es PPAR γ . Este receptor es expresado a altos niveles en el epitelio gastrointestinal y muchas de sus funciones en las células epiteliales intestinales han sido elucidadas en años recientes. Uno de los rasgos más interesantes de este receptor es la diversidad estructural de sus ligandos, entre los cuales se cuentan: compuestos de la dieta y drogas sintéticas. Hasta la fecha se conoce que entre los ligandos de PPAR γ se hallan varios compuestos derivados de ácidos grasos esenciales que poseen diferentes afinidades de interacción, todavía queda por establecer la relevancia fisiológica de tales interacciones. En este contexto, salta a la vista que la

característica más notable de la composición lipídica de la leche humana es su alta complejidad y variabilidad dependiente de diversos factores, incluyendo la dieta. En base a esto, este proyecto propone explorar si componentes lipídicos de la leche materna proveen ligandos para PPAR γ y que esta interacción regule otros procesos celulares como son el transporte de AG y la diferenciación.

Los resultados aportados por este estudio, reafirmarían la importancia de esta fuente de alimentación y su composición como estrategia principal en cuidados postnatales. El escaso conocimiento por parte de las madres sobre las consecuencias de la trasgresión alimentaria en sus infantes ha dado lugar a la aparición de cuadros intensos de diarrea y al desarrollo de enfermedades multifactoriales como la Enterocolitis Necrotizante (NEC) en infantes recién nacidos y especialmente prematuros. De esta manera se resaltaría aun más, la importancia del suministro de factores bioactivos tales como los AG que promuevan la maduración del epitelio absortivo, principal blanco de tales eventos. Este trabajo además de aportar nuevos conocimientos acerca del tema, podría incentivar a profesionales de la salud a continuar biomonitoreando y promoviendo la práctica de la lactancia en lugar del suministro inadecuado de fórmulas infantiles u otras fuentes alimenticias que carecen de la mayoría de estos factores, contribuyendo así con la reducción en los índices de mortalidad y morbilidad infantil, asociado a una mejor nutrición implementada en los primeros años de vida (AAP. 2005).

IV. OBJETIVOS.

IV.1. OBJETIVO GENERAL.

- Determinar el efecto de ácidos grasos presentes en leche materna humana sobre la inducción de la diferenciación de células epiteliales intestinales de origen humano, así como la posible participación del receptor nuclear, PPAR γ .

IV.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Determinar la composición de ácidos grasos presentes en leche materna humana, proveniente de donantes sanas del Hospital Universitario de Caracas.

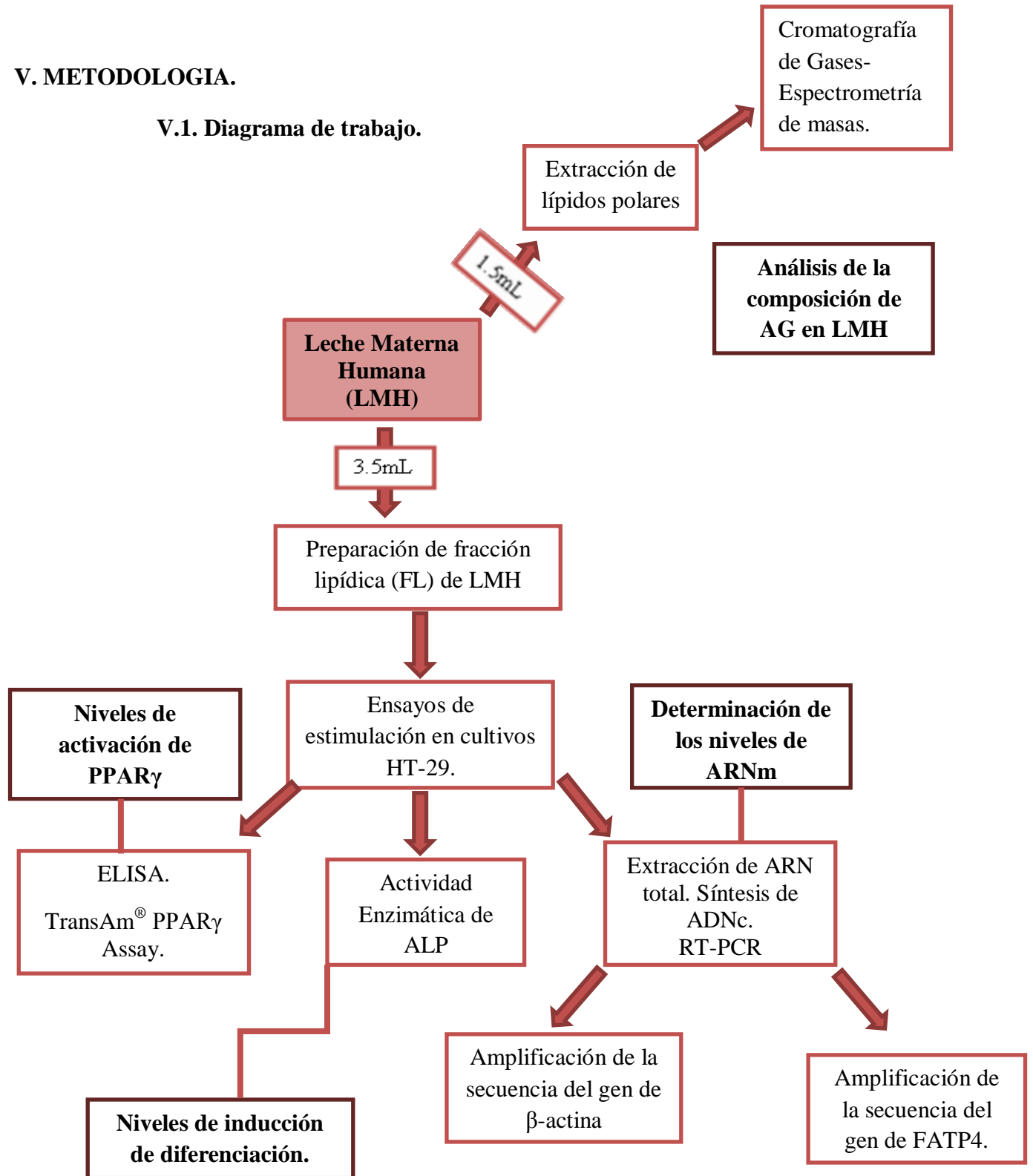
- Determinar el efecto de las fracciones lipídicas de leche materna humana sobre la inducción de la diferenciación de células epiteliales intestinales de origen humano.

- Determinar los niveles de activación del receptor nuclear PPAR γ en cultivos celulares tratados con fracciones lipídicas de leche materna humana.

- Determinar los niveles de ARNm de la isoforma 4 de la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP4) en células epiteliales tratadas con fracciones lipídicas de leche materna humana.

V. METODOLOGIA.

V.1. Diagrama de trabajo.



V.2. Materiales.

V.2.1. Muestras: Se emplearon 30 muestras de leche materna provenientes de madres donantes sanas entre la primera y quinta semana post-parto. Se excluyeron del estudio a todas aquellas con algún tipo de patología autoinmune, reumática, respiratoria, cardiovascular, gastrointestinal o reproductiva conocida. Las muestras fueron suministradas por el banco de leche del Hospital Universitario de Caracas-Venezuela con aprobación del comité de bioética del IVIC y de la Facultad de Ciencias UCV (ver anexos).

V.2.2. Línea Celular: Se empleó la línea celular HT-29, adquirida de ATCC, número de catálogo HTB-38 (San Diego-California) propagada en medio DMEM catálogo #11965-092 (Gibco San Diego-California). En este trabajo se usaron células entre los pasajes 19 y 35. Las células HT-29 son derivadas de adenocarcinoma de colon humano y bajo condiciones específicas de cultivo (concentraciones de glucosa estándar) asemejan un fenotipo de célula indiferenciada, mientras que en presencia de factores solubles inductores de diferenciación o a concentraciones bajas de glucosa, los cultivos se diferencian morfológicamente, distinguiéndose una célula polarizada y expresando enzimas propias de la membrana apical de la célula madura.

V.2.3 Reactivos y equipos. Todos los solventes y reactivos utilizados en este trabajo fueron de grado analítico y molecular. A continuación se listan algunos de los más empleados:

De la casa comercial Invitrogen (California- Estados Unidos) se adquirió TRIZOL™, sistema de RT-PCR Thermoscript, taq ADN polimerasa Platino, agarosa ultrapura.

De la compañía Axygen Biosciences el marcador de peso molecular 1 Kb Ladder DNA marker escalera desde 300 pb-10000 pb.

De laboratorios Bio Rad se adquirió el Termociclador Gene cycler, cámaras de electroforesis horizontales: Wide Mini Sub-cell GT y Mini-cell Primo EC320-Thermo EC. Y bomba de vacío UN810.3 FTP.

De la casa comercial BIONEER (California-USA) se adquirieron todos los cebadores empleados en este trabajo.

De laboratorios ABBOT, se adquirió ACTOS-Pioglitazona, presentación de 30 tabletas de 15mg.

De la casa comercial Active Motif, se adquirió el KIT de activación del factor de transcripción PPAR γ “TransAM[®] PPAR γ assay”.

Se empleo el evaporador centrifugo “Vacufuge Eppendorf” modelo AG 22331. Hamburg, cromatógrafo de gases de la compañía Agilent 6890, acoplado a Detector Selectivo de Masas modelo 5973N, incubadora para cultivo celular 5200-Narco, microscopio invertido Eclipse TS100-Nikon, espectrofotómetro Spectronic 1201 Milton Roy, microcentrífuga 5417R-Eppendorf, lector multiplaca “Synergy HT” de BIOTEK, termociclador en gradiente Mastercycler egradient S marca Eppendorf, transiluminador TransUV Fotodyne inc. Acoplado a un filtro para bromuro de Etidio y la cámara CostarTM. Se empleo el hardware Foto Analysis investigator y el programa PC image.

V.3. Métodos.

V.3.1. Análisis e identificación de la composición de ácidos grasos en LMH por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

- **V.3.1.1. Extracción de lípidos polares (LP).** Se añadieron 6 mL de n-Hexano y 1mL de Isopropanol a un volumen de 1,5 mL de leche materna humana. Se centrifugó a 1 500g por 2 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el volumen restante se dejó secar en evaporador centrífugo “Vacufuge Eppendorf” (modelo AG 22331. Hamburg) a 60°C. Se resuspendió la fracción obtenida en 2 mL de metanol y se centrifugó a 1 500g por 2 minutos a temperatura ambiente. Se filtró el sobrenadante bajo un sistema de vacío y se almacenó el filtrado a -20°C hasta su respectiva inyección en el cromatógrafo (Sala-Vila y col., 2003).
- **V.3.1.2. Equipo.** Se empleó el cromatógrafo de gases de la compañía Agilent 6890, acoplado a Detector Selectivo de Masas modelo 5973N. La columna capilar empleada es de Ultra 2 Phenyl Methyl Siloxane al 5%, mide 25m x 200µm x 0.33µm, posee resistencia a temperaturas aproximadamente entre 60°C y 325°C, y corresponde al modelo HP 19091B-102.
- **V.3.1.3. Condiciones Cromatográficas.** Se usó Helio como gas de arrastre a un flujo de 1 mL/min, presión de 18,92 mmHg y velocidad promedio de 40 cm/seg en modo Splitless. La temperatura inicial del horno fue de 70°C e incrementó en dos etapas, a una tasa de 9°C/min hasta 180°C durante 5 minutos y a 6°C/min hasta 275°C durante 10 minutos. El tiempo total de corrida fue de 43,06 min/muestra y el volumen de inyección fue 200 µL (Sala-Vila y col. 2003).

- **V.3.1.4. Análisis de la composición de ácidos grasos** La identificación de los AG se realizó por comparación de los tiempos de retención con estándares de muestras puras, registradas en el equipo.

V.3.2. Separación de la fracción lipídica de LMH. Las muestras de LMH, fueron centrifugadas a 3 500g x 10 minutos a temperatura ambiente, con el fin de separar la fase lipídica del suero. Los extractos lipídicos fueron almacenados a -20°C. Adicionalmente, se mezclaron 10 y 5 muestras de LMH, elaborando una mezcla de LMH para el ensayo de actividad enzimática y activación del receptor PPAR γ respectivamente. Las FL de dicho conjunto de LMH fueron obtenidas como se describe anteriormente.

V.3.3. Preparación de la fracción lipídica (FL) de LMH. Se pesaron 0,02gr de lípido seco (proveniente de la fracción lipídica aislada en el paso V.3.2). Se resuspendió esta fracción a concentración final de 5 mg/mL en DMSO (dimetil sulfóxido) como vehículo a una concentración final de 2.5%. Se almacenaron las FL a -80°C.

V.3.4. Cultivo celular, ensayo de diferenciación de células HT-29.

- **V.3.4.1 Condiciones del cultivo celular.** Se sembraron dos millones de células por mililitro (2×10^6 cel/mL) de la línea celular HT-29 derivada de células epiteliales intestinales, en frascos de Roux de 25cm². Los cultivos fueron suplementados con suero fetal bovino (SFB) al 10%, e incubados a 37°C en atmosfera humidificada y 5% de CO₂ por 72 horas. Transcurrido este tiempo y bajo estas condiciones, los cultivos alcanzaron un 80% de confluencia, porcentaje estimado mediante la observación de los frascos en un microscopio de contraste de fases invertido Eclipse TS100-Nikon.

Una vez que los cultivos alcanzaron el grado de confluencia esperado, se incubaron libres de SFB por 16 horas posterior a lo cual se inició un tratamiento por 48 horas para estimulación de diferenciación en presencia de FL de LMH y de un agonista de PPAR γ .

- **V.3.4.2 Condiciones de estimulación del cultivo celular.** Se establecieron en primer lugar las condiciones de inducción de diferenciación del control positivo. Para ello se empleo el conocido inductor de diferenciación Butirato de Sodio (NaBt) a una concentración final de 1mM (Smith y col., 1998). Las condiciones basales de los cultivos se determinaron en células incubadas únicamente en presencia del vehículo (DMSO al 0.1%).

- Para determinar el efecto inductor de diferenciación por FL de LMH, los cultivos celulares fueron incubados en presencia de las FL preparadas en el paso V.3.3. Se probaron concentraciones finales de 100 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$, 1000 $\mu\text{g/mL}$ para el conjunto de LMH y únicamente 1000 $\mu\text{g/mL}$ para las FL de leches individuales.
- Para evaluar si el factor de transcripción PPAR γ representa un posible mecanismo para los efectos observados con las FL, se ensayó la respuesta del cultivo celular frente a un agonista específico de PPAR γ como una TZD (Rosen y Spiegelman, 2001) sobre el cambio en la expresión de un marcador de diferenciación. El compuesto empleado fue Pioglitazona (de laboratorios ABBOT, presentación de 15mg) a una concentración final de 20 μM siendo la concentración final del vehículo en el cultivo de 0.1%.

Todos los tratamientos se realizaron, durante 48 horas a 37°C en una atmósfera al 95% O₂ y 5% de CO₂. Finalizado el tiempo de incubación, se procedió a realizar la metodología que se describe a continuación.

V.3.5. Preparación de suspensión enriquecida en membranas. Transcurridas las 48 horas de tratamiento se colectaron los sobrenadantes de los cultivos celulares. La monocapa celular se lavó con 1mL de una solución constituida por: Sacarosa (250mM)/Imidazol (25mM)/Acido etilendiaminotetraacético (EDTA) (5mM)/Inhibidor de Proteasas de Serina (PMSF) (0,2mM) y se descartó el lavado.

Posteriormente se agregó dicha solución en 2 rondas de 0,5mL cada una, y se procedió al raspado y rompimiento mecánico de la monocapa de células empleando un rastrillo estéril o scrapping.

Se juntaron los raspados celulares en un vial estéril de 1.5mL y se colocaron inmediatamente en hielo. Posteriormente, la preparación fue sometida a 3 golpes de sonicación durante 10 minutos y se procedió a macerar por pipeteo empleando agujas de insulina. Finalmente se centrifugó el homogenato a 3000g por 15 minutos a 4°C, obteniendo en el sobrenadante una suspensión enriquecida en membranas plasmáticas. Este se recolectó sin sedimento y se almacenó a -80°C.

V.3.6. Determinación de proteínas por el método de Bradford. La concentración de proteínas se determinó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), usando una curva de calibración de albumina sérica bovina (BSA) al 0.1 % o 1mg/mL (0, 10, 20, 50, 100µg). Las mediciones se realizaron por triplicado a 595nm en espectrofotómetro marca “Spectronic 1201 MILTON ROY”, agregando los reactivos en el orden representado en la Tabla 2.

TABLA 2. Reactivos a empleados en la determinación de proteínas. Se indican las cantidades de cada uno de ellos en unidades de volumen.

	H ₂ O (μL)	BSA 0,1% (μL)	Suspensión enriquecida en membranas (μL)	Reactivo de Bradford (μL)
Curva de calibración	1000	-	-	2000
	990	10	-	
	980	20	-	
	950	50	-	
	900	100	-	
Ensayo	980	-	20	

V.3.7. Determinación de la actividad enzimática de ALP. Para evaluar la presencia de fosfatasa alcalina (ALP) como marcador de diferenciación en las preparaciones de membrana del paso V.3.5, se aplicó el protocolo previamente reportado por Cariani y colaboradores en el 2004. Este método se basa en la sensibilidad a hidrólisis del β-Glicerofosfato por la fosfatasa alcalina en ausencia de su inhibidor. Este ensayo colorimétrico detecta la liberación de fosfato inorgánico (Pi) a partir del sustrato por acción de la actividad enzimática. La actividad específica de la fosfatasa alcalina se determinó por diferencia en los valores de Pi, obtenidos en presencia y ausencia de EDTA como inhibidor y fueron ensayadas por triplicado. Para la elaboración de una curva de calibración, se empleo K₂HPO₄ 1mM como fosfato libre, en donde 100μL de este reactivo contenían 0, 10, 20, 50, 100nM de fosfato inorgánico o Pi.

La absorbancia de las muestras se determinó a 710nm empleándose como blanco mezclas en las que las membranas fueron añadidas luego de la solución de parada o solución II (Cariani y col., 2004).

El orden de los reactivos empleados se representa en la Tabla 3.

TABLA 3. Reactivos empleados en la determinación de la actividad de ALP. Se indican las cantidades en unidades de volumen y los tiempos de incubación.

Reactivo/Condición-Volumen	+ EDTA (μL)	- EDTA (μL)
Tampón Glicina 1 N. pH 10.	350	350
EDTA 80mM	25	-
H ₂ O	Cantidad suficiente para 475 μL	
Preparación enriquecida en membranas.	Aproximadamente 10 μg	
β -glicerofosfato 2mM.	Pre-incubar por 5 min a 37°C.	
Solución II. (4°C)	25	
	Incubar por 10 min. A 37°C.	
	1000	
	Incubar por 10 min. A 4°C.	
Solución III. ATPasas.	1500	
	Incubar por 10 min. A 37°C.	
	Lectura a 710nm	

Para la elaboración de la curva de calibración se agregaron los siguientes reactivos, en el orden que se muestra en la tabla 4.

TABLA 4. Reactivos empleados para la curva de calibración de K₂HPO₄. Se indican las cantidades en unidades de volumen y los tiempos de incubación.

H ₂ O (μL)	K ₂ HPO ₄ 1mM (μL)	Solución II a 4°C (μL)	Solución III (μL)
500	-		
490	10	1000	1500
480	20	Incubar por 10 minutos a	Incubar por 10
450	50	4°C	minutos a 37°C
400	100		

Donde:

Solución II: Acido ascórbico 0.03g/mL, HCl 0.5M (frio), Molibdato de Amonio 0.5%, Dodecil Sulfato (SDS) 0.5%. La solución debe ser amarilla, no verde-azul. Puede almacenarse en frio por varias horas (Cariani y col., 2004).

Solución III: Citrato de Bismuto 3.5% en HCl 1M, Citrato de Sodio 3.5%. Se mantiene a temperatura ambiente, protegida de la luz (Cariani y col., 2004).

V.3.8. Ensayo de activación del receptor de proliferación peroxisomal PPAR γ . KIT TransAM[®] PPAR γ assay. El KIT de TransAM[®] (No. catálogo 40196) combina un formato de ELISA rápido y reproducible con un método sensible y específico de detección de factores de transcripción. El KIT contiene platos de 96 pozos previamente inmovilizados con un oligonucleótido que contiene una secuencia PPRE (5' -AACTAGGTCAAAGGTCA- 3'). Al añadir el extracto nuclear de las muestras ensayadas, el factor transcripcional en su estado de heterodímero, reconocerá la secuencia anclada a la microplaca. La interacción PPAR γ / secuencia PPRE, se detectó por el anticuerpo primario, que reconoce un epítipo accesible en la proteína. La adición del anticuerpo secundario- conjugado a peroxidasa- provee una lectura colorimétrica cuantificable por espectrofotometría (TransAM[®] PPAR γ Assay).

A partir del paso V.3.4.2, se extrajeron los extractos nucleares siguiendo instrucciones del fabricante (TransAM[®] PPAR γ Assay).

Para el análisis de las muestras, se añadió en cada pozo 10 μ g del extracto nuclear previamente diluido en tampón de lisis completo (según instrucciones del fabricante). Para el control positivo de activación de PPAR γ se emplearon 2 μ L del extracto nuclear suministrado por el KIT (células cos-7) en 8 μ L de tampón de lisis completo. Como control negativo de activación, se emplearon únicamente 10 μ L de tampón de lisis completo. Se dejó incubar los extractos o las preparaciones por 1 hora a temperatura ambiente en la placa previamente inmovilizada. Transcurrido este tiempo se lavó 3 veces empleando 200 μ L de solución de lavado (según instrucciones del fabricante). Se añadieron 100 μ L del anticuerpo primario previamente diluido a razón 1/250 en tampón de unión a anticuerpo (según instrucciones del fabricante) y se dejó actuar por 1 hora a temperatura ambiente sin agitación. Se lavó 3 veces con 200 μ L de solución de lavado y se añadieron 100 μ L del anticuerpo secundario -conjugado a peroxidasa-,

previamente diluido a 1/1000 en tampón de unión a anticuerpo. Se dejó incubar por 1 hora a temperatura ambiente sin agitación. Se lavó 4 veces en solución de lavado y se añadieron 100µL de solución de desarrollo (según instrucciones del fabricante) y se incubó la preparación por 10 minutos protegida de la luz. Finalmente se añadieron 100µL de la solución de parada (según instrucciones del fabricante), que promovió la formación de un complejo coloreado amarillo cuya absorbancia fue medida a 450nm (TransAM[®] PPAR γ Assay) en lector multiplaca “Synergy HT” de BIOTEK. Se elaboraron los blancos respectivos según instrucciones del fabricante. En la figura 11 se observa un diagrama del protocolo desarrollado en este ensayo.

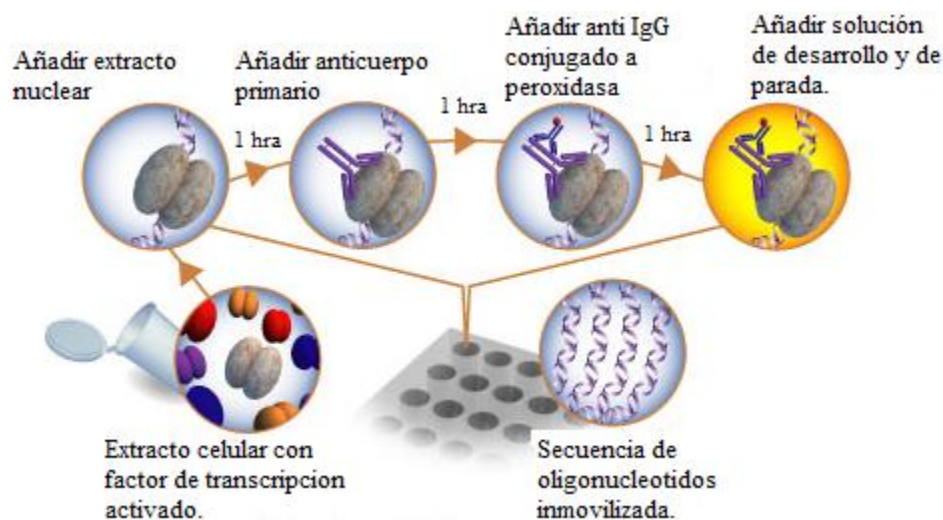


Figura 11. Diagrama del protocolo desarrollado en el ensayo de activación de receptor por el KIT TransAM[®] PPAR γ assay. Tomado y modificado del catálogo de Active Motif. Fuente: <http://www.activemotif.com/catalog/228/transam-ppar%CE%B3> [Consulta 02/09/2012].

V.3.9. Extracción de ARN total mediante el método de TRIZOL. La extracción de ARN total se realizó empleando el reactivo de Trizol[™] siguiendo las recomendaciones del fabricante, a partir de cultivos celulares de HT-29 tratadas como se indicó en V.3.4.2 (Chomczynski y Sacchi, 1993). Brevemente; las células previamente cultivadas aproximadamente a una concentración de 5×10^6 cel/mL, fueron tratadas con 1mL de Trizol[™] arrastrando la monocapa celular con un rastrillo estéril. Se homogeneizó por pipeteo repetitivo y

se maceraron las preparaciones con jeringas de agujas de insulina. El homogeneizado se colocó en un vial estéril de 1.5mL y se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente con el fin de extraer los ácidos nucleicos. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó esta mezcla a 12 000g por 15 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf, modelo 5417R). De las 3 fases obtenidas, se recuperó la fase acuosa sin arrastrar la interfase de la solución y se colocó en un nuevo vial estéril de 1.5mL. Posteriormente se añadieron 500 μ L de Isopropanol al 100% y se mezcló por inversión 5 veces, incubándose luego a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 12 000g por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se recuperó y lavó el sedimento con 1mL de agua Dietilpirocarbonato (DEPC) al 75% de Etanol (EtOH). Se centrifugó nuevamente a 7 400g por 5 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento en bomba de vacío por 15 minutos a una presión de aproximadamente 18 mmHg (desecador Bio-Rad, modelo 810.3FT). Finalmente el sedimento seco se resuspendió en 20 μ L agua DEPC y se sometió a un choque térmico en baño de maría precalentado a 55°C por 3 minutos. Posteriormente se incubó en hielo a 4°C por 10 minutos y se almacenó a -80°C hasta su cuantificación y uso posterior.

V.3.10 Cuantificación de ARN total aislado. Para estimar la concentración del ARN extraído, se realizaron diluciones 1/35 en agua bidestilada, ionizada y filtrada (H₂O BDIF) preparando blancos con H₂O DEPC en lugar de ARN. Todas las muestras fueron leídas a una absorbancia de 260 y 280 nm en una placa de 96 pozos resistente a luz UV, utilizando el lector multiplaca “Synergy HT” de BIOTEK.

Para calcular la concentración, se tomó como referencia que una unidad de absorbancia a 260 nm (Abs₂₆₀) es equivalente a 44.19 ng de ARN por microlitro (ng/ μ L), considerando esta

constante y el factor de dilución empleado, se determinó la concentración de acuerdo a la siguiente relación

$$[\text{ARN}] = \frac{\text{Abs}_{260\text{nm}} \times 40\text{ng}/\mu\text{L} \times \text{FD}}{1000}$$

Donde:

Abs_{260nm}: Absorbancia a 260nm

FD: Factor de Dilución.

El cociente Abs₂₆₀/Abs₂₈₀, es utilizado comúnmente como criterio de pureza de ácidos nucleicos. Para posteriores procedimientos se emplearon extracciones de ARN en las que la tasa Abs₂₆₀/Abs₂₈₀ resultara mayor a 1,7 (Sambrook y Russel, 2001).

V.3.11. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Transcriptasa Reversa (RT-PCR). La técnica de RT-PCR consiste en transcribir ARNm en una simple cadena de ADN complementario (ADNc). El cebador empleado en esta reacción es una mezcla de oligonucleótidos de timina (OligodT₂₀) (Invitrogen ThermoScript™ RT-PCR System) el cual se une a la cola poli adenilada (poliA) en el extremo terminal de ARNm de mamíferos, comenzando así la síntesis de la primera cadena de ADNc. La enzima que dirige la reacción de transcripción reversa, es una ADN polimerasa dependiente de ARN, que transcribe en dirección 5'→3' por lo que requiere de un extremo 3'-OH libre al igual que otras polimerasas (Sambrook y Russel, 2001).

Para la obtención del ADN complementario, el ARN total extraído se colocó en una mezcla de síntesis en un volumen de reacción de 20µl (1X). Esta mezcla se preparó en viales estériles de 200 µL, siguiendo la composición descrita en la tabla 5 y como se indica a continuación. Adicionalmente se utilizó como control negativo H₂O DEPC en lugar del ARN de

las muestras. Se mezcló 1 μL de Oligo (dT)₂₀ como cebador, 2 μL de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 10mM, 3 μg de ARN total y se llevo a un volumen final de 14 μL con H₂O DEPC.

Para desnaturalizar el ARN se calentó a 65°C por 5 min y se colocó inmediatamente en hielo. Posteriormente se le añadió 4 μL del tampón de síntesis de ADNc 5X (Tris Acetato 250mM pH 8,4, Acetato de Potasio 375mM, Acetato de Magnesio 40mM y estabilizadores, Invitrogen ThermoScript™ RT-PCR System), 1 μL de Dithiothreitol (DTT, 0.1mM) que es el coactivador de la enzima y 1 μL de la Thermoscript™ RT (15 U/ μl). La mezcla resultante se incubó a 55°C por 1 hora en el termociclador Gene cyler de Bio Rad precalentado a dicha temperatura y fue detenida mediante la desnaturalización de la enzima a 85°C durante 5 minutos (ver tabla 5).

TABLA 5. Componentes de la mezcla para la síntesis de ADN complementario (ADNc).

Componentes de la Mezcla	Concentración final.
H ₂ O DEPC. Vf=14 μl	-----
Muestra de ARN	3 μg
Oligo (dT) ₂₀ (50 μM)	2,5 μM
dNTP's (10 mM)	1mM
Agitación y centrifugación. Se calentara a 65°C por 5 min. Se colocó inmediatamente en hielo	
Tampón de síntesis de ADNc –MgCl ₂ 5X*	1X
DTT 0.1mM	5 μM
Thermoscript (15 U/ μl)	0,75 U/ μl
Agitación y centrifugación. Se incubó la mezcla de reacción por 1 hora a 55°C Culminando con 5 min a 85°C	
Volúmen Final.	20 μL

El ADNc sintetizado es el sustrato inicial en la reacción de PCR. La técnica de PCR convencional permite la amplificación enzimática de determinadas secuencias de ADN a través del reconocimiento específico por parte de los cebadores sentido y antisentido que flanquean la región de interés. En primer lugar, se amplificó la secuencia de un gen constitutivo que codifica para β -actina de células epiteliales, evaluándose de esta manera la integridad del templado además de que este amplímero sirve como factor normalizador en estos ensayos de PCR.

Adicionalmente, se amplificó la secuencia del transcrito de la proteína transportadora de ácidos grasos, asociada al transporte de estos al interior celular.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se desarrolló en un volumen final de 25 μL en un Termociclador marca Eppendorf Mastercycler S, usando 0.2 μL (β -actina), 0.5 μL (FATP4) de la enzima TaqPlatinum ADN polimerasa (Invitrogen. Número de Catálogo 10966303). La mezcla de reacción contenía 2.5 μL de tampón para PCR 10X-MgCl₂, 0.75 μL de MgCl₂ (50mM), 0.5 μL de dNTP (10mM) y 0.5 μL de los cebadores correspondientes para β -actina (10 μM) y 0.25 μL de los cebadores correspondientes para FATP4 (10 μM), añadiendo finalmente 1 μL del ADNc sintetizado. En el caso de β -actina, el templado de ADNc se diluyó razón 1:10 con H₂O DEPC. Se completó con H₂O BDIF hasta un volumen de 25 μL .

Las concentraciones empleadas para cada cebador fueron experimentalmente estandarizadas y verificadas como se describe en Hecker y Roux (1996). Siendo 0.2 μM para los cebadores de β -actina y 0.1 μM para los cebadores de FATP4.

Los componentes de la mezcla de reacción se encuentran resumidos en la tabla 6.

TABLA 6. Componentes de la mezcla de amplificación.

Componentes de la Mezcla	Concentración final
Buffer de reacción 10X	1X
MgCl ₂ (50mM)**	1.5mM
dNTPs (10mM)	0,2mM
Cebador Sentido o S*** (10 μM)	0.2 μM -0.1 μM
Cebador Antisentido o AS*** (10 μM)	0.2 μM -0.1 μM
H ₂ O BDIF Vf 25 μl	-----
TaqPlatinum ADN polimerasa 5 U/ μL	0.1 U/ μL -0.04U/ μL
Muestra de ADNc obtenido por RT-PCR	1 μL
Volumen final	25 μL

Las reacciones se incubaron como sigue:

94°C-----	2 minutos	} 28-38 ciclos.
94°C-----	1 minuto	
TA-----	1 minuto.	
72°C-----	1 minuto.	
72°C-----	10 minutos	

Las temperaturas de hibridación (TA) para cada juego de cebadores, sus secuencias y condiciones de amplificación se refieren en la tabla 7.

TABLA 7. Secuencias nucleotídicas de los cebadores o iniciadores empleados en las reacciones de PCR.

Cebador	Secuencia 5'→3'	Temperatura Hibridación (°C)	N° de Ciclos	Tamaño Esperado (pb)
B-Actina S	5'-TGGCAATGAGCGGTTCCGCTGC-3'	55	28	558.
B-Actina AS	5'-CCAGCAGATGTGGATCAGCAA-3'			
FATP4 S	5'-CTTGGGATCTGGCGGCTGGC-3'	61,9	38	420.
FATP4 AS	5'-CGCGAGTGGTGAGGCAGTG-3'			

V.3.12. Análisis de los productos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis se basa en la migración de los fragmentos de ADN a través de una matriz que permite su separación por tamaños, desde el polo negativo a positivo cuando se somete a una diferencia de potencial. La velocidad de migración será inversamente proporcional al logaritmo de la masa molecular de los fragmentos de ADN y dichos tamaños serán comparados con un patrón conocido de peso molecular (Sambrook y Russel, 2001).

Alícuotas de los productos de amplificación por PCR (6µL) fueron evaluados en geles de agarosa al 2%, para la visualización de los fragmentos entre 0.1-2 Kb. Se tomó como resultado positivo, la presencia de bandas correspondientes a secuencias de ADN del tamaño esperado (Sambrook y Russel, 2001).

V.3.12.1 Siembra de las muestras y corrida electroforética. Para la siembra de las muestras se mezclaron 6µL de la misma con 2,4 µL de tampón de carga diluido (0.25% Azul de Bromofenol, 0.25% de Xilene Cyanol, y 30% de Glicerol en H₂O). Para la siembra del patrón o marcador de peso molecular; “1 Kb Ladder DNA marker escalera desde 300 pb-10000 pb”; se mezclaron 2,4 µL del marcador con 2,4µL de tampón de carga concentrado y 7,4 µL de H₂O BDIF. Se sembraron 12 µL de cada mezcla en los pozos destinados para ello. Se le suministró un voltaje de 65mV por 1 hora y 30 minutos. Finalmente, se coloreó el gel de agarosa utilizando “SYBR Gold nucleic acid stain” (Invitrogen; Molecular Probes, USA). Los registros fueron fotodocumentados empleando un transiluminador UV FotoDyne inc. acoplado a cámara CostarTM con filtro para Bromuro de Etidio y el programa PC Image.

V.3.12.2. Análisis Densitométricos. Se empleó el Software de análisis de imágenes “Quantity One” (Bio-Rad USA), con el cual se determinó la intensidad del pixelaje de cada banda de amplímeros, eliminando previamente el fondo de la imagen (tomándose por fondo los pixels contenidos en un carril sin muestra de la electroforesis). La determinación semicuantitativa de la expresión del gen de interés se realizó a través de la normalización con las bandas obtenidas para el gen constitutivo β-actina. La expresión del gen de interés se reportó como la tasa de expresión de β-actina/gen de interés.

V.3.13. Análisis Estadístico. Toda la data fue representada en la forma de media +/- desviación estándar (DE), calculada con Microsoft[®] Excel 2007. El tamaño de la muestra se indica en cada uno de los resultados. Los resultados fueron normalizados en base al control basal en los ensayos enzimáticos y pruebas T-student fueron desarrolladas entre tratamientos para lo

cual se uso el programa Microsoft[®] Excel 2007. El coeficiente estadístico para asumir diferencia significativa fue $p < 0.05$ (*) y $p < 0.01$ (**).

VI. RESULTADOS

VI.1. Análisis e identificación de la composición de AG presentes en LMH.

Los lípidos constituyen la principal fuente de energía presente en LMH (Carnielli y col., 1995) y su composición varía con la etapa de producción, entre otros aspectos (Temboury y col., 2004). Con el objeto de analizar la composición lipídica, específicamente de los elementos estructurales más simples y con numerosos efectos a nivel molecular; los AG, se colectaron muestras de LMH entre la primera y quinta semana postparto a diferentes estados de maduración. En varias ocasiones se tomaron muestras entre el tercer y quinto día postparto (calostro), tanto pre término como a término, y en algunos casos muestras de LMH madura.

La separación de los lípidos polares (LP) presentes en LMH, fue desarrollada por un método simple de extracción empleando isopropanol:metanol (1:2). La fracción de TGs así como una pequeña fracción de Colesterol fue recuperada mediante una extracción previa con n-Hexano (4:1). (Sala Vila y col., 2002)

A partir de un análisis cromatográfico, se identificaron 17 AG. Esto se realizó a través de la comparación entre los tiempos de retención (TR) y espectros de masa de las muestras problema con los TR y espectros de muestras estándar, cuyos valores están contenidos en la base de datos del equipo. Finalmente quedó cierta cantidad de compuestos por identificar. A continuación se presenta un cromatograma representativo de los obtenidos en este trabajo, correspondiente a una (1) muestra de LMH en etapa madura (figura 12), procesada de acuerdo a lo descrito previamente (Sala Vila y col., 2002).

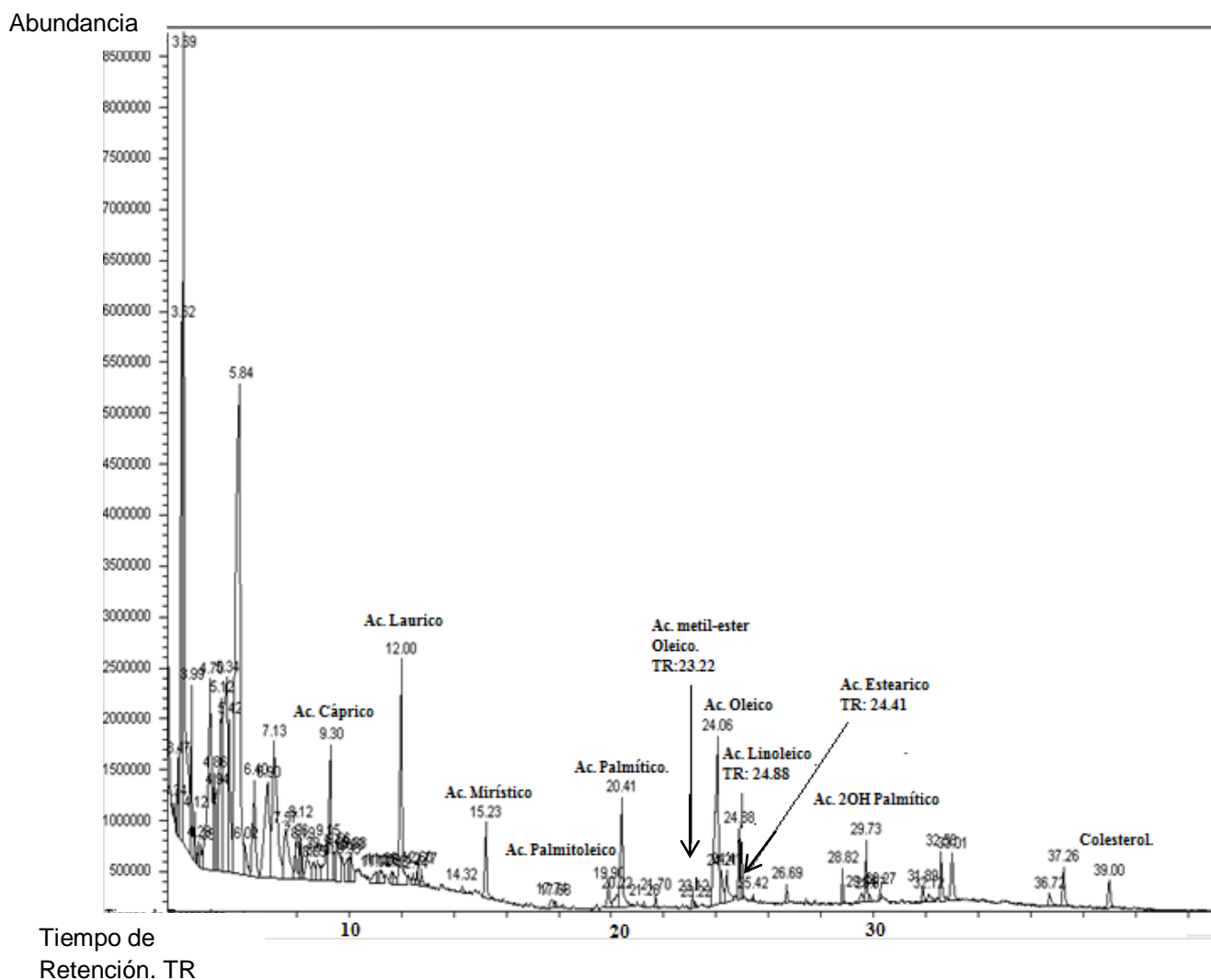


Figura 12. Cromatograma resultante del análisis de una muestra de LP proveniente de LMH. Los LP fueron obtenidos mediante una extracción simple con una mezcla Isopropanol: Metanol 1:2, con previa extracción y descarte de la fase de lípidos neutros empleando una mezcla n-Hexano/LMH 4:1. El volumen de inyección en el cromatógrafo fue de 200µL. Los picos fueron identificados a través de su tiempo de retención comparando con estándares registrados en el software del equipo. Se muestran los picos correspondientes a 10 AG y Colesterol, identificados en una muestra de LMH.

A través de repetidos análisis sobre las diferentes muestras de LMH, se determinó la composición de AG presentes en diferentes etapas de lactancia, datos que se presentan en la tabla 8.

TABLA 8. AG identificados en 30 muestras de LMH a diferentes etapas de producción. Se indica la frecuencia relativa de aparición de los AG identificados en base al total de muestras analizadas.

AG identificados.	Pretérmino		A término				Frecuencia en el total de muestras analizadas (n=30)
	Pretérmino (n=15) Frecuencia	Frecuencia Relativa (fr)	Calostro (n=12) Frecuencia	fr	Leche Madura (n=3) Frecuencia	fr	
Ac. Mirístico. (C14:0)	11/15	0.73	12/12	1	3/3	1	26/30
Ac. Palmítico. (C16:0)	15/15	1	12/12	1	3/3	1	30/30
Ac. Palmítico-metil ester	1/15	0.06	0/12	0	1/3	0.33	2/30
Ac. 2-OH-1- Palmítico-	3/15	0.2	6/12	0.5	2/3	0.66	11/30
Ac. Eicosanoico. (C20:0)	0/15	0	1/12	0.08	0/3	0	1/30
Ac. Esteárico (C18:0)	11/15	0.73	11/12	0.916	2/3	0.66	24/30
Ac. Láurico (C12:0)	9/15	0.6	10/12	0.83	3/3	1	22/30
Ac. Butírico. (C4:0)	0/15	0	2/12	0.16	0/3	0	2/30
Ac. Caproico (C6:0)	1/15	0.06	1/12	0.08	0/3	0	2/30
Ac. Caprílico (C8:0)	0/15	0	0/12	0	1/3	0.33	1/30
Ac. Cáprico (C10:0)	4/15	0.26	2/12	0.16	2/3	0.66	8/30
Ac. Heptanoico (C7:0)	1/15	0.06	0/12	0	0/3	0	1/30
Ac. Oleico (C18:1 ω 9)	8/15	0.53	8/12	0.66	3/3	1	19/30
Ac. Oleico-metil ester	1/15	0.06	0/12	0	1/3	0.33	2/30
Ac. Palmitoleico (C16:1 ω 7)	1/15	0.06	1/12	0,08	1/3	0.33	3/30
Ac. Linoleico. (C18:2 ω 6)	5/15	0.33	8/12	0.66	2/3	0.66	15/30
Colesterol	13/15	0.86	8/12	0.66	3/3	1	24/30

En el grupo de leches pre-término (figura 13A) fueron identificados 14 AG para un total de 15 muestras, siendo el más predominante el Acido Palmítico (C16:0) con el máximo valor de frecuencia (15/15=1), seguido del Acido Mirístico (C14:0), Esteárico (C18:0) y por último Láurico (C12:0), todos ellos representando al grupo de AG saturados y con una frecuencia de aparición de 0.73 para los dos primeros y 0.6 para el último. Como

representantes de los AG mono y poliinsaturados, el ácido oleico (C18:1 ω 9) y el Linoleico (C18:2 ω 6) fueron identificados a una frecuencia de 0.53 y 0.3 respectivamente.

Una pequeña parte de las muestras correspondientes a ésta etapa de producción presentaron ácido cáprico (C10:0) a frecuencia de 0.26, ácido Palmítico (C16:0) doble carboxilado a 0.2, ácido Heptanoico (C7:0) y ácido Palmitoleico (C16:1 ω 7) a frecuencia de 0.06. Como se observa todos estos compuestos presentaron una baja frecuencia de aparición en comparación con los mencionados en el párrafo anterior. En esta etapa no se detectaron ácido Eicosanoico (C20:0), Caprílico (C8:0) o Butírico (C4:0) (Figura 13A).

Es importante mencionar que en esta y en el resto de las etapas, se identificó Colesterol y AG saturados e insaturados esterificados correspondientes a TGs. En el caso del Colesterol, éste se identificó en gran parte de las muestras, alcanzando una frecuencia de 0.86. Por parte de los compuestos esterificados, estos se encontraron a baja frecuencia (alrededor de 0.06), lo que indica que la extracción previa de estos lípidos neutros con n-Hexano no fue eficiente.

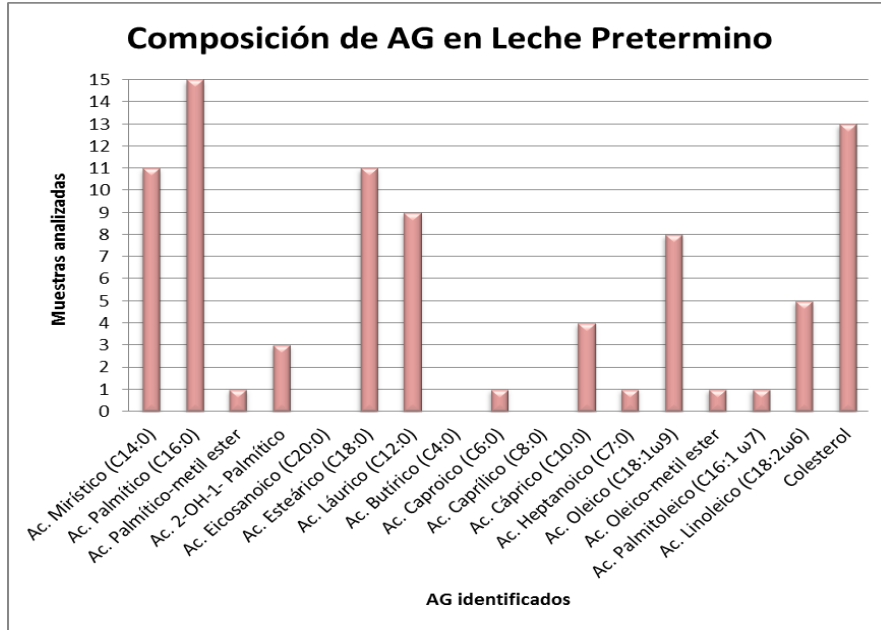
En el grupo de calostro a término (figura 13B) se identificaron 14 AG para un total de 12 muestras, algunos de ellos no detectados en la etapa anterior. En esta etapa de producción, el Ac. Mirístico y Palmítico se presentaron en mayor frecuencia, alcanzando el máximo valor (12/12=1). Adicionalmente, el Ac Esteárico se detectó en 11 de las 12 muestras de LMH a una frecuencia de 0.91, el Ac. Láurico por su parte se encontró en 10 de 12 a 0.83 de frecuencia y el Ac. Palmítico doble carboxilado en 6 de las 12 muestras analizadas, reportando una frecuencia de aparición de 0.5.

Como característica resaltante, se encontró Ac. Butírico y Eicosanoico a muy baja frecuencia, de 0.16 y 0.08 respectivamente. En cuanto a los AG mono y poliinsaturados, se obtuvo una frecuencia de 0.66 para el Ac. Oleico, Ac Oleico metil-esterificado y Ac. Linoleico, frecuencia que resultó mayor a la obtenida en la etapa anterior para estos mismos compuestos.

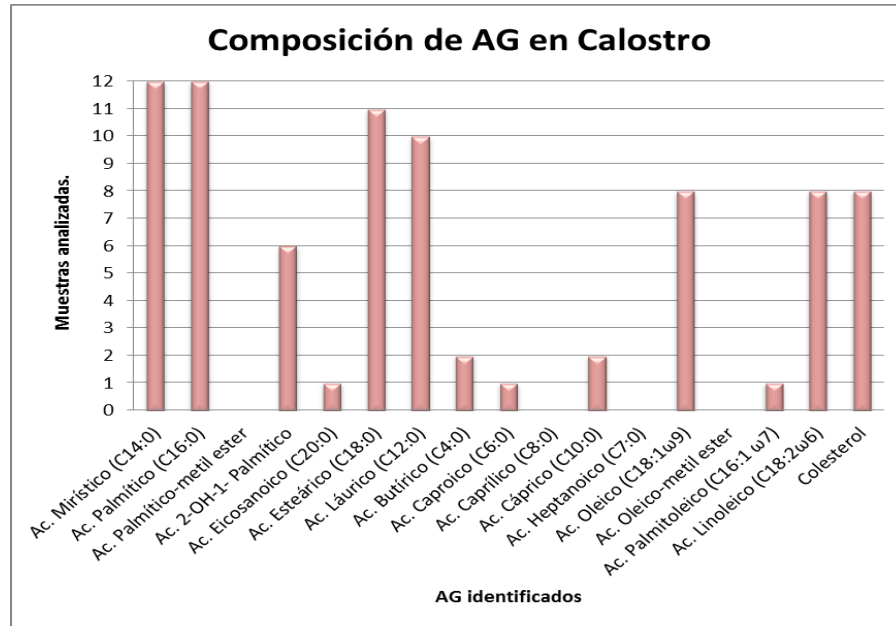
Finalmente, en el grupo de LMH madura a término (n=3) se reportaron 13 AG (figura 13C), siendo los más representativos el Ac. Láurico, Mirístico, Palmítico y Oleico, presentándose a frecuencia máxima en las muestras analizadas (3/3). Con respecto a los AG restantes, estos se detectaron a medianas y bajas frecuencias, similares a las obtenidas en las etapas anteriores. Podría inferirse que su concentración no varía mucho entre etapas, dado que su presencia no se hizo más notable en el transcurso del análisis a diferencia de los otros AG.

Con el fin de establecer la data de la composición general de AG presentes en LMH, se calculó la frecuencia de aparición de estos 17 AG en el total de muestras analizadas, incluyendo las 3 etapas de producción. Estos resultados se encuentran representados en la figura 14. De los 17 AG, el Ac. Palmítico mostró una mayor prevalencia, mostrando la máxima frecuencia de aparición en el conjunto de muestras analizadas (30/30). El Ac. Mirístico también fue reportado a una alta frecuencia, alcanzando un 0.86. A este AG lo sigue en frecuencia el Ac. Esteárico, como representante de los AG saturados de cadena larga con un valor significativo de 0.8, y finalmente el Ac. Oleico y el Linoleico por parte de los mono y poliinsaturados se encontró a una frecuencia 0,63 y de 0.5 respectivamente (figura 14).

13A.



13B.



13C.

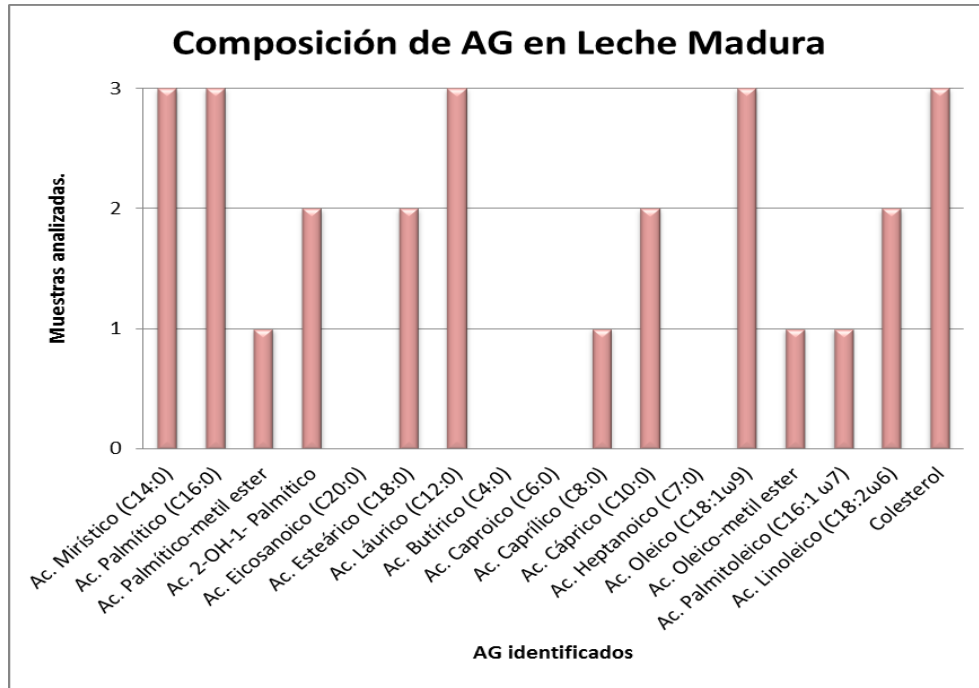


Figura 13. Ácidos Grasos (AG) identificados en 15 muestras de LMH en etapa pretérmino (13A), 12 muestras de calostro a término (13B) y 3 muestras de LMH madura (13C). Los lípidos polares (LP) o ácidos grasos de interés, fueron extraídos a partir de muestras aleatorias e independientes de LMH, empleando una mezcla 1:2 de Isopropanol: Metanol, donde los lípidos neutros fueron previamente descartados empleando n-Hexano a razón 4:1 del volumen inicial. La identificación de los AG presentes en las muestras de LMH se realizó a través de la comparación de los picos obtenidos en cada muestra con estándares conocidos y registrados como patrón en el software del Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas. Se muestran las frecuencias de aparición sobre el total de muestras analizadas por grupo.

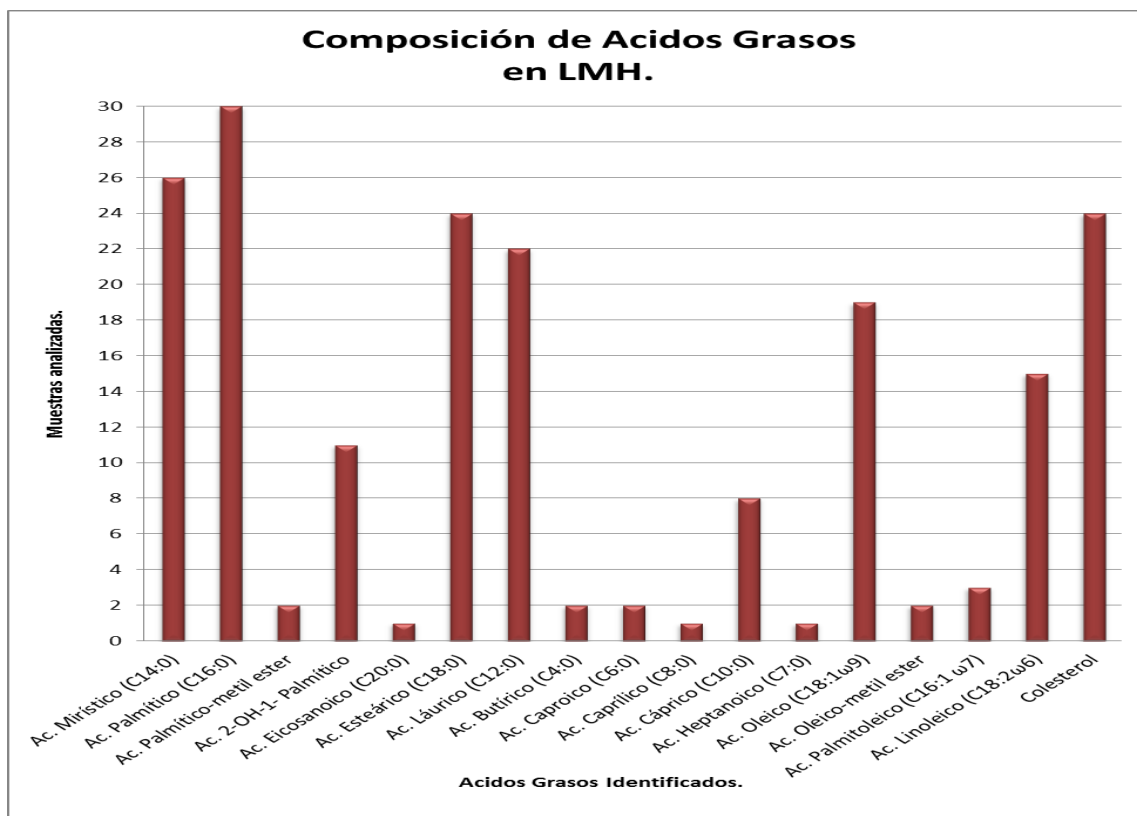


Figura 14. Ácidos Grasos (AG) identificados en 30 muestras de LMH. Los lípidos polares (LP) o ácidos grasos de interés, fueron extraídos a partir de muestras aleatorias e independientes de LMH, empleando una mezcla 1:2 de Isopropanol: Metanol, donde los lípidos neutros fueron previamente descartados empleando n-Hexano a razón 4:1 del volumen inicial. La identificación de los AG presentes en las muestras de LMH se realizó a través de la comparación de los picos obtenidos en cada muestra con estándares conocidos y registrados como patrón en el software del Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas. Se muestran las frecuencias de aparición sobre el total de muestras analizadas.

VI.2 Ensayo de diferenciación. Actividad de ALP como marcador de diferenciación en cultivos de células HT-29.

La fosfatasa alcalina (ALP) es una enzima dimérica, conocida por encontrarse principalmente anclada mediante un enlace fosfatidil inositol glicosilado a la membrana apical o borde estriado de células intestinales epiteliales (Hubscher y col., 1965, Calhau y col., 2000) y es considerada un marcador de “aparición precoz” en el proceso de maduración intestinal (Jumarie y col., 1994). La línea celular HT-29 puede expresar un fenotipo de célula diferenciada bajo condiciones definidas de cultivo. Se ha determinado que la acción de factores externos sobre estas células induce cambios en los niveles de expresión de genes que determinan el progreso de la línea celular, entre ellos la expresión de un fenotipo de célula polarizada y morfología típica de una célula epitelial derivada de tejido diferenciado (Zweibaum y col., 1985; Freshney, 2010).

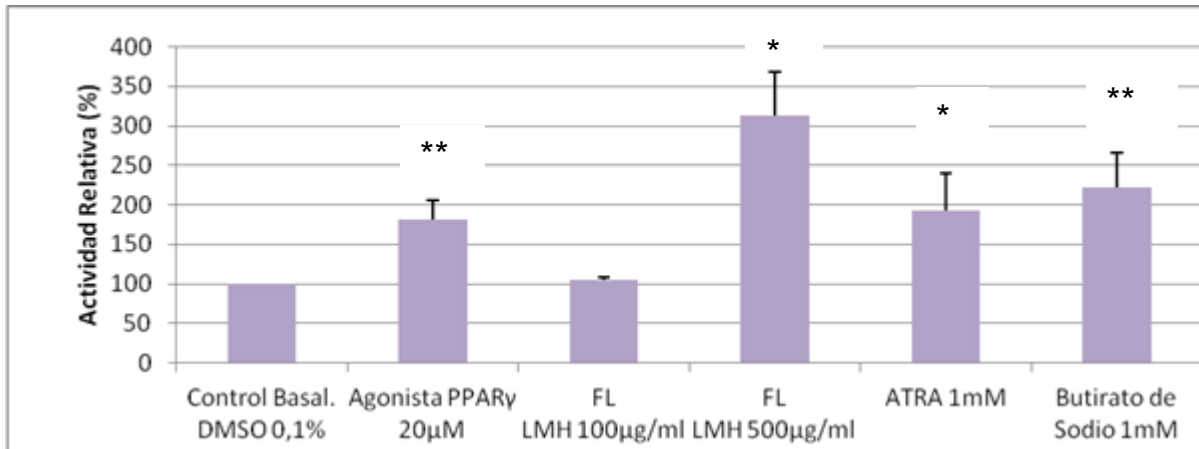
Para evaluar si la FL de LMH induce la diferenciación de células epiteliales intestinales, se evaluó la expresión del marcador de diferenciación ALP en cultivos de células HT-29 estimuladas con fracciones lipídicas (FL) de LMH y con un conjunto de LMHs. La tabla 9 y la figura 15 muestran la variación de este marcador luego del tratamiento de los cultivos celulares con medio incompleto (condición basal), Butirato de Sodio (NaBt) 1mM, el cual es un conocido inductor de la diferenciación de células epiteliales intestinales (Smith y col., 1998), con un agonista del receptor PPAR γ como Pioglitazona a concentración final 20 μ M (Rosen y Spiegelman, 2001), con ácido transretinoico o ATRA (1mM) conocido coactivador de PPAR γ (Martin, y col., 2000) y con fracciones lipídicas obtenidas a partir de 10 LMH (15A) y 1 LMH (15B). El tratamiento se realizó durante 48 horas a 37°C en una atmosfera al 5% de CO₂.

TABLA 9. Actividad relativa de ALP en cultivos de HT-29 incubados bajo diferentes tratamientos. Se expresan como veces de incremento en relación a la actividad determinada en condición basal.

	Control Basal. DMSO 0,1%	Agonista PPAR γ 20 μ M	FL LMH 100 μ g/mL	FL LMH 500 μ g/mL	FL LMH 1000 μ g/mL	ATRA 1mM	Butirato de Sodio 1mM
	1	1,8	1,1	3,9	4,04	2,6	2,82
	1	2,12	1,03	2,56	1,73	1,5	2,05
	1	1,53	1,04	2,91	1,88	1,66	1,78
	1	1,64			3,87	2,7	2,16
	1						1,52
Promedio +/- DE	1	1,7725 +/- 0,22	1,056 +/- 0,03	3,12 +/- 0,56	2,88 +/- 1,22	2,115 +/- 0,539	2,066 +/- 0,437
% de Inducción	100	177,25	105,66	312,33	288	211,5	206,6
Coficiente estadístico (p) vs el control Basal		0,009(**)	0,12	0,03(*)	0,056	0,037(*)	0,008(**)

Donde *=p<0.05 y **=p<0.01. Dimetil sulfóxido (DMSO). Agonista PPAR γ : Pioglitazona. Fracciones Lipídicas (FL). Ácido Transretinoico (ATRA). Desviación estándar (DE)

15A



15B

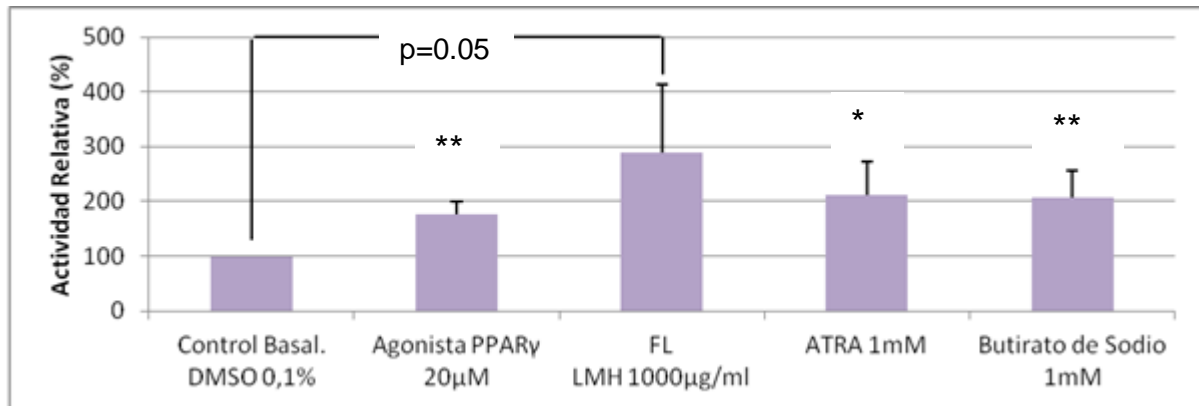


Figura 15. Efecto de un conjunto de FL de LMH (15A) y FL individuales de LMH (15B) sobre la expresión de Fosfatasa Alcalina como marcador de diferenciación en células epiteliales intestinales Cultivos de células HT-29 fueron estimulados con: NaBt 1mM, Acido Transretinoico (ATRA) 1mM, Pioglitazona como agonista de PPAR γ a 20 μ M y a concentraciones crecientes (100 y 500 μ g/mL) de un conjunto de FL de 10 LMH (15A) así como con FL individuales de LMH a 1000 μ g/ml (15B) durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se determinó la actividad de fosfatasa alcalina en preparaciones enriquecidas en membranas plasmáticas. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de las actividades relativas en base a resultados normalizados con los niveles actividad basal del marcador en 5 experimentos independientes (**=p<0.01 y *=p<0.05).

En esta línea celular se observa que los tratamientos con el agonista del receptor de proliferación peroxisomal, FL a 500 µg/mL, ATRA y NaBt indujeron el aumento significativo de la actividad de ALP en comparación con el nivel de actividad basal de esta enzima (figura 15A), mientras que el tratamiento con FL a 100 µg/mL no indujo una variación significativa.

Una vez comprobado el incremento significativo de la actividad de la enzima marcadora a concentraciones crecientes de un grupo de 10 muestras de FL de LMH, ensayadas como mezcla, se procedió a estimular los cultivos celulares a una concentración máxima de FL, equivalente a 1000µg/mL esta vez aislada de leches individuales (figura 15B). En estos cultivos, se observa que el tratamiento con FL de LMH a dicha concentración no indujo el aumento de la actividad de ALP de manera significativa. Sin embargo si se observa una tendencia en aumento y la cercanía del resultado al coeficiente estadístico ($p < 0.05$), indica que para la obtención de resultados significativos con muestras ensayadas individualmente, habría sido necesario un ensayar un mayor número de muestras. Este resultado sugiere que el o los componentes en la FL de las leches responsables de la inducción del incremento en la actividad enzimática esta(n) presente(s) en cada muestra con una alta variabilidad.

VI.3. Activación de PPAR γ con fracciones lipídicas provenientes de LMH

Con el objeto de identificar el posible mecanismo a través de cual los AG ejercen un efecto sobre la diferenciación de estas células epiteliales, se procedió a evaluar la activación de PPAR γ en cultivos de células HT-29. Estas células fueron tratadas con un

conjunto de fracciones lipídicas provenientes de 5 muestras de LMH, a través de un KIT de activación denominado TransAm PPAR γ assay.

Este KIT permite determinar los niveles de activación de dicho receptor en extractos nucleares provenientes de un cultivo celular a través de una reacción colorimétrica. Se empleó como control negativo y positivo; células Cos7 silvestres y transfectadas con el receptor, respectivamente (según instrucciones del fabricante). Se compararon los resultados con los niveles de activación obtenidos por la estimulación con un ligando sintético conocido de dicho receptor y con los niveles basales de activación correspondientes al control-vehículo (tabla 10 y figura 16). Como activador conocido, se empleó Pioglitazona 15mg (Laboratorios ABBOT) a una concentración final de 20 μ M siendo la concentración final del vehículo en el cultivo de 0.1%.

TABLA 10. Niveles de activación del receptor PPAR γ en cultivos de HT-29 incubados bajo distintos tratamientos. Se expresan los niveles de activación en unidades de absorbancia de acuerdo a instrucciones de fabricante.

	Control Basal- Vehículo. DMSO 0,1%	Agonista PPAR γ 20 μ M	FL LMH 100 μ g/ml	FL LMH 500 μ g/ml	FL LMH 1000 μ g/ml
	0,068	0,1325	0,188	0,213	0,221
	0,0805	0,18	0,12	0,144	0,1845
	0,09	0,195	0,124	0,1935	0,2205
	0,1055	0,1625	0,1165	0,14	0,1645
	0,1035	0,1885	0,171	0,205	0,1685
Promedio +/- DE	0,0895 +/- 0,015	0,1717 +/- 0,025	0,1439 +/- 0,033	0,1791 +/- 0,034	0,1918 +/- 0,027
Coefficiente estadístico (p) vs el control Basal		0,0005(**)	0,017 (*)	0,0023(**)	0,0002(**)

Donde *=p<0.05 y **=p<0.01. Dimetil sulfóxido (DMSO). Agonista PPAR γ : Pioglitazona. Fracciones Lipídicas (FL). Desviación estándar (DE)

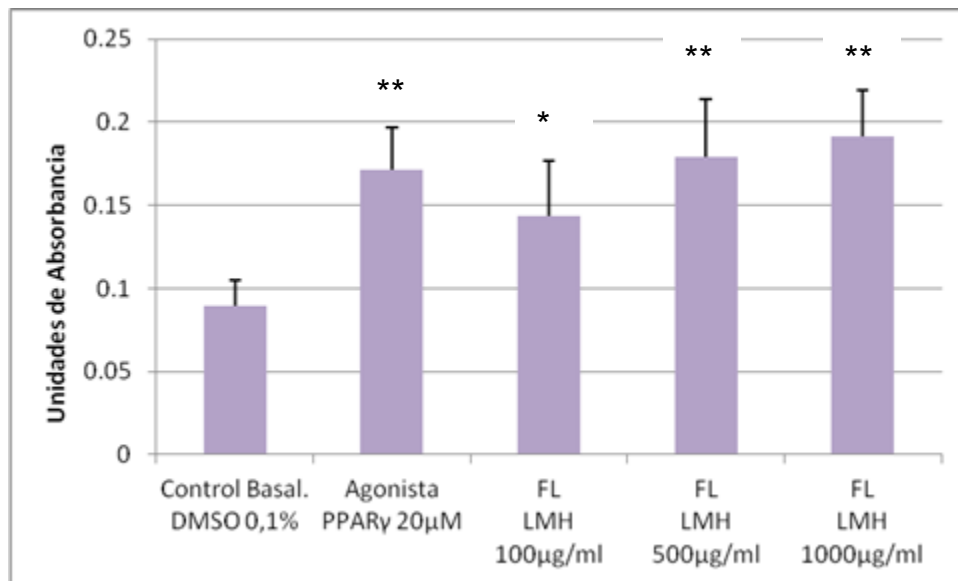


Figura 16. Efecto del conjunto de FL de LMH sobre la activación del receptor de proliferación peroxisomal PPAR γ . Cultivos de células HT-29 fueron estimulados con Pioglitazona 20 μ M y concentraciones crecientes de un conjunto de FL provenientes de 5 LMH a 100, 500 y 1000 μ g/mL durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se determinó a través de reacciones colorimétricas en base a su unión a PPRE inmovilizados en placas de 96 pozos y en unidades de absorbancia, el nivel de activación del receptor de proliferación peroxisomal PPAR γ , en extractos nucleares preparados con el KIT TransAM PPAR γ assay. Se muestran los promedios y las desviaciones estándar de 5 experimentos independientes (**= p <0.01 y *= p <0.05).

En esta línea celular se observa, que los tratamientos con el agonista del receptor de proliferación peroxisomal y el conjunto de fracciones lipídicas a todas las concentraciones evaluadas, indujeron el aumento significativo de los niveles de activación del receptor PPAR γ en comparación con los niveles de expresión basal o en los cultivos control-vehículo (figura 16).

A través de estos resultados se propone, que FL provenientes de un conjunto de LMH (superando la variabilidad en su composición a través de la combinación de distintas muestras de leche) ejercen un efecto positivo sobre la diferenciación de células epiteliales intestinales, a través de la activación del principal sensor nuclear de estos compuestos, como lo es el receptor de proliferación peroxisomal.

VI.4. Determinación de los niveles de ARNm de genes implicados en el proceso de transporte lipídico.

VI.4.1. Estandarización de las condiciones de amplificación para el transcrito de FATP4.

La estandarización de la técnica de PCR requiere de la optimización de toda una serie de parámetros como la verificación de la integridad del templado, la concentración de la enzima, la temperatura de hibridación y la concentración de cebadores, dNTPs y cloruro de magnesio (Innis y col., 1990) factores que intervienen en el desarrollo de la reacción. Por esta razón es necesario determinar las condiciones adecuadas que permitan la amplificación específica. De los parámetros descritos fueron abordados en la estrategia experimental la temperatura de hibridación (TA) y la concentración de MgCl₂ (Innis y col., 1990)

El $MgCl_2$ es un factor esencial en la reacción pues afecta el funcionamiento de la enzima TaqPlatinum ADN polimerasa. La ausencia o exceso de este compuesto en cierto grado, reduce la fidelidad de la enzima y puede incrementar las uniones inespecíficas (Eckert, 1990) por lo que resultó vital determinar la concentración óptima de este coactivador.

La temperatura de hibridación (TA), es otro factor que influye en la especificidad de la reacción, dicha temperatura debe ser lo suficientemente baja para permitir una hibridación específica entre el cebador y su secuencia complementaria y lo suficientemente alta para impedir hibridaciones inespecíficas (Innis y col., 1990).

Por estas razones, y basándose en las temperaturas de fusión o melting reportadas para los cebadores previamente diseñados, se procedió a probar la amplificación de FATP4 variando las concentraciones de $MgCl_2$ y las TA entre $58^{\circ}C$ hasta $61.9^{\circ}C$ (figura 17). En este caso el templado fue ADNc de células HT-29 tratadas con Butirato de sodio 1mM inductor de diferenciación de células epiteliales de intestino (Smith y col., 1998).

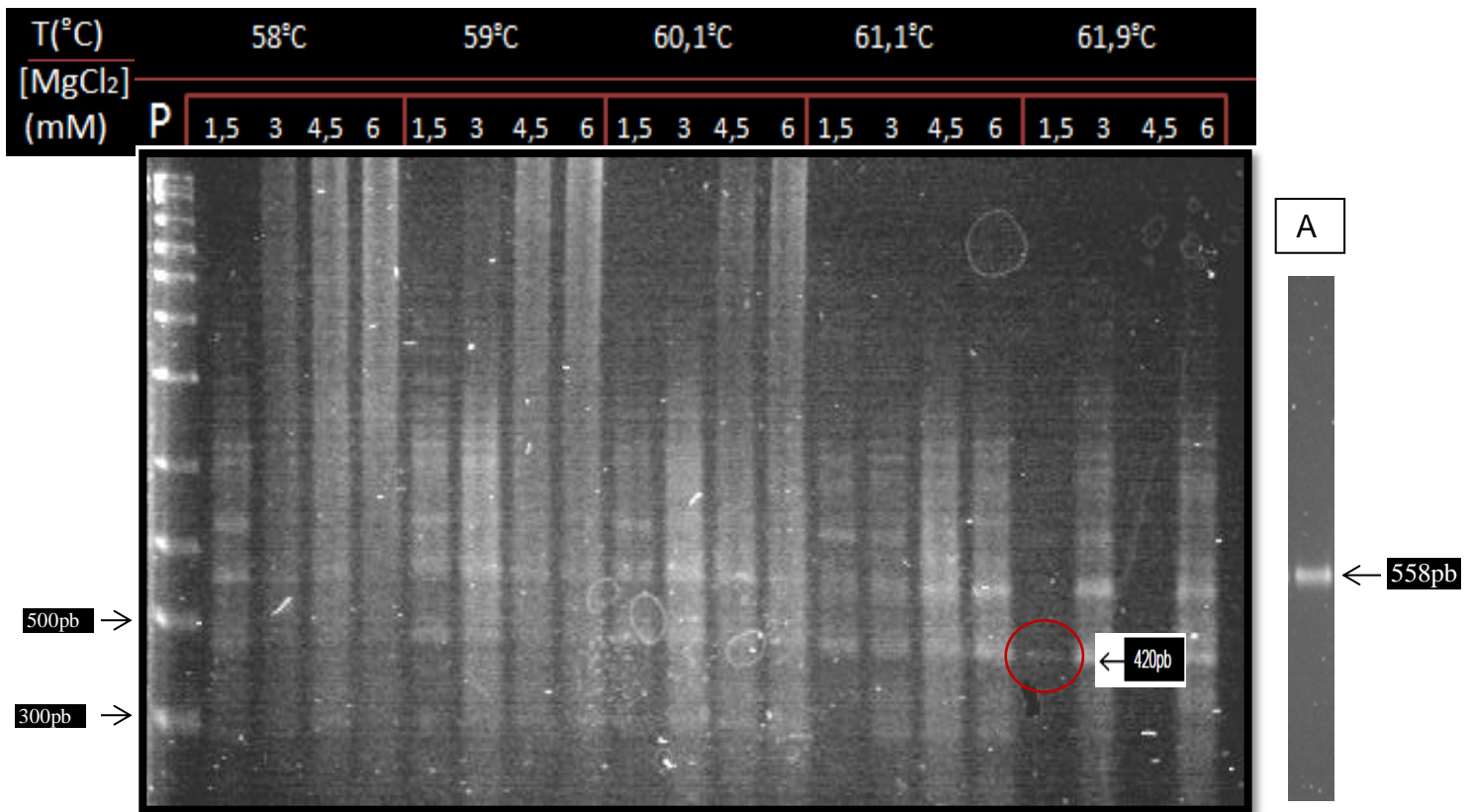


Figura 17. Gradiente de temperaturas de hibridación para los cebadores sentido y antisentido del gen de FATP4 a concentraciones crecientes de MgCl₂. A partir de cultivos de células HT29 tratadas con NaBt 1mM, se extrajo ARN total mediante el método de TrizolTM. El ARN total fue transcrito a una hebra de ADNc. Este ADNc se usó como templado en la reacción de PCR empleando cebadores específicos para la secuencia del transcrito que codifica para FATP4. La reacción se incubó a diferentes temperaturas (58°C, 59°C, 60,1°C, 61,1°C y 61,9°C) y la mezcla contenía concentraciones crecientes de MgCl₂ (1.5, 3; 4.5, 6 mM) empleando 35 ciclos de amplificación. Se muestran los productos analizados en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Gold nucleic acid stain, según la leyenda de los carriles. Se empleó como patrón de pesos moleculares, (carril P) “1 Kb Ladder DNA marker” escalera desde 300 pb-10000 pb. En el panel derecho (carril A) se muestra el amplicón del gen constitutivo β-actina en la muestra de HT-29 empleada en la estandarización.

La figura 17 muestra la amplificación de la secuencia del transcrito de FATP4 a diferentes temperaturas de hibridación en una muestra de ADNc proveniente de un cultivo de células HT-29 tratada con NaBt 1 mM. El panel izquierdo muestra en el primer carril el marcador de peso molecular (1 Kb Ladder DNA marker, escalera desde 300 pb-10000 pb), en los carriles siguientes se muestran los productos de amplificación de reacciones incubadas a 58°C, 59°C, 60.1°C, 61.1°C y 61.9°C empleando concentraciones crecientes MgCl₂, y el panel derecho corresponde al amplicón del gen constitutivo β-actina para la misma muestra. En las primeras temperaturas ensayadas, 58, 59, 60.1 y 61.1°C se observa la presencia de numerosas bandas, incluso en todas las concentraciones de MgCl₂ evaluadas. Por su parte, se evidenció que a 61.9°C y 1.5mM de MgCl₂ se presenta una única banda de masa molecular de 420pb aproximadamente, la cual se corresponde con el tamaño esperado para el amplicón específico de FATP4.

De manera de optimizar la reacción de amplificación se realizó una PCR empleando 38 ciclos de reacción bajo las condiciones estandarizadas previamente. Como resultado se tiene la figura 18, en donde se observa una única banda del peso molecular correspondiente al transcrito de FATP4.

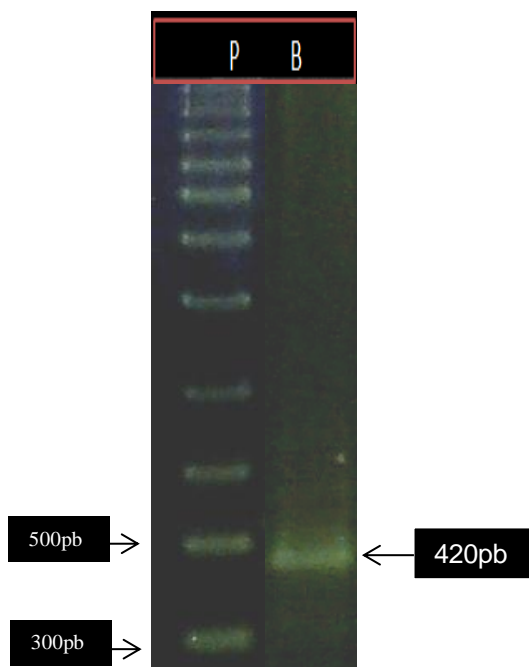


Figura 18. Amplificación a 38 ciclos del gen de FATP4 empleando condiciones de temperaturas y concentración de $MgCl_2$ estandarizadas. A partir de cultivos de células HT29 tratadas con NaBt 1mM, se extrajo ARN total mediante el método de TrizolTM. El ARN total fue retro transcrito a una hebra de ADNc. Este ADNc se usó como templado en la reacción de PCR empleando cebadores específicos para la secuencia del transcrito que codifica para FATP4. La reacción se incubó a una temperatura de hibridación de 61,9°C a 1.5mM de concentración de $MgCl_2$ empleando 38 ciclos de reacción. Se muestra el producto obtenido en un gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Gold nucleic acid stain, en donde el carril P indica la corrida del patrón de pesos moleculares “1 Kb Ladder DNA marker” escalera desde 300 pb-10000 pb y el carril B corresponde al producto amplificado de 420pb asociado al gen de FATP4.

A partir de estos resultados se establecieron las condiciones para la amplificación de de FATP4 que fueron: 1.5mM de $MgCl_2$, 61.9°C de TA para los cebadores y 38 ciclos de reacción, como se indicó en la tabla 6.

VI.4.2. Amplificación del transcrito de FATP4 en cultivos de células HT-29 estimuladas con FL de LMH.

Para la amplificación del transcrito cuya secuencia codifica para esta proteína de transporte se emplearon cebadores específicos previamente estandarizados de acuerdo a Hecker y Roux., 1996 y como se describió previamente. Adicionalmente, se determinó la

expresión de, un gen constitutivo que codifica para un componente proteico de los microfilamentos citoesqueléticos altamente conservado (β -actina) y envuelto en la movilidad, estructura e integridad de las células epiteliales. La amplificación del ADNc para esta proteína fue observada en todas las condiciones ensayadas, como se dijo anteriormente con este resultado se verificó la integridad del producto sintetizado para cada condición y se empleó su expresión como parámetro para la normalización de los niveles del gen de interés FATP4 (no se muestran resultados).

Tras estimular los cultivos celulares de HT-29 con: A) medio solo (condición basal), B) NaBt (1mM), C) Pioglitazona (20 μ M) y D) FL provenientes de LMH individuales a una concentración final de 1000 μ g/mL durante 48 horas a 37°C y 5% CO₂ y proceder a la amplificación del transcrito de FATP4 y al análisis densitométrico o semicuantitativo de los productos amplificados, no se pudo observar una tendencia reproducible (aun en los controles) en los niveles de ARNm amplificados (no se muestran resultados).

Las réplicas desarrolladas para cada experimento no aportaron resultados consistentes, por lo que no se pudo determinar ninguna tendencia al aumento o disminución en los niveles de ARNm. Estos últimos resultados no nos permiten corroborar el posible efecto de las FL de LMH sobre la activación de la ruta del receptor PPAR γ .

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Tanto la lactancia como el destete son eventos fisiológicamente significativos que influyen en el desarrollo y la maduración del intestino delgado en humanos. Se conoce que factores solubles contenidos en LMH, proveen un repertorio de ligandos específicos para ciertos receptores en el epitelio, lo cual conduce a la activación de eventos de reprogramación genética y rutas de señalización que contribuyen con la regulación del proceso de maduración del epitelio intestinal (Cummings y Thompson. 2002).

Este trabajo se inserta al conjunto de nuevas aproximaciones de investigación en el campo de la Nutrigenómica, la cual une la aplicación de tecnologías de la genómica funcional, la bioinformática y la biología molecular con técnicas bioquímicas y analíticas. Todo ello se acopla, con el objeto de evaluar los efectos y mecanismos a través de los cuales los componentes individuales de la alimentación o combinaciones de ellos modulan los procesos metabólicos en las células y tejidos en el organismo (Palou y col., 2004). En este sentido, hemos identificado los AG presentes en muestras de LMH de un grupo de madres venezolanas a diferentes etapas de producción y se determinó la frecuencia en la cual se presentan dichos AG en el conjunto de muestras procesadas. Adicionalmente, determinamos que la acción de los componentes lipídicos de LMH sobre el enterocito resultan en la activación del factor transcripcional PPAR γ y que induce, en este tipo celular, el proceso de maduración intestinal.

En concordancia con estudios previos de la composición lipídica de LMH y sus variaciones en las diferentes etapas de lactancia, se empleó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (López y col., 2001; 2002; Bosch y col., 2009;

Su y col., 2010). Nuestro análisis reveló una prevalencia de ácidos grasos saturados en las 3 etapas muestreadas (70% del total de los AG identificados), además de encontrarse una alta proporción de ácido Oleico y Linoleico (figura 14). En cuanto a la variedad y contenido de los AG saturados encontrados, se tiene que el resultado es consistente con la literatura, en donde se afirma que debido a las fuertes presiones selectivas y principalmente a los hábitos alimenticios, la síntesis lipídica en la glándula mamaria se ha visto sesgada hacia una mayor producción y liberación de AG saturados en comparación con PUFAs (Sauerwald y col., 2001). Dado que este evento ha resultado evolutivamente estable en la población, es de esperarse que dichos compuestos conduzcan a numerosos o bien a significativos efectos en el organismo durante las primeras etapas de vida.

De manera general, se ha reportado que cerca del 80% de los AG de la LMH está representado por la suma de ácido Palmítico (C16:0), ácido Esteárico (C18:0), ácido Oleico (C18:1 ω 9) y Linoleico (C18:2 ω 6) (Bosch y col., 2009) resultados similares a nuestro estudio. En este último también resalta la prevalencia del ácido Palmítico (C16:0), Esteárico (C18:0) y adicionalmente el ácido Mirístico (C14:0), cuyas frecuencias se mantienen cercanas al valor máximo (proporcional al tamaño de la muestra) en todas las etapas analizadas.

Solo un pequeño grupo de las muestras reportó AG saturados de cadena corta y monoinsaturados tales como ácido Butírico, Caproico, Caprílico, Cáprico y Palmitoleico, estando algunos de ellos ausentes en etapas de producción analizadas (figura 13A), lo cual puede explicarse por el bajo contenido reportado para ellos en LMH. Además, en algunas fases o etapas de producción se ha descrito un menor contenido graso saturado y un mayor contenido proteico y de PUFAs (Temboury y col., 2004).

La literatura sostiene que las diferencias en la composición lipídica de la leche producida, se debe principalmente a la dieta de la madre durante el embarazo y la lactancia, asociado a su estilo de vida, ubicación geográfica y estrato social (Sala-Vila y col., 2005; Su y col., 2010; Novak e Innis. 2011). En todo caso ha sido comprobado que la ingesta de una dieta rica en carbohidratos, propia de la dieta occidental, aumenta la síntesis de AG saturados, viéndose significativamente disminuida la secreción de PUFAs por parte de la glándula mamaria.

A diferencia de los ácidos monoinsaturados y saturados que se derivan de síntesis endógena, los PUFAs son esenciales y se ha reconocido su participación en procesos de maduración neural, cognitiva y en el fortalecimiento del sistema inmunitario. Por esta razón resulta indispensable incluirlos en la dieta de las madres y en la de los lactantes.

En nuestro estudio, se identificaron en todas las etapas y con una alta frecuencia el ácido Oleico (C18:1 ω 9) y el Linoleico (C18:2 ω 6).

El ácido Linoleico (C18:2 ω 6) es el LC-PUFA más abundante en LMH, y su contenido parece haberse incrementado al doble en las últimas décadas, principalmente bajo la influencia de las dietas occidentales. Es importante mencionar que un desbalance en el contenido de ácido Linoleico y en la relación ácido Linoleico o AL y ácido Linolénico o ALA (AL/ALA) en la ingesta, ocasiona un desbalance adicional en la producción de AG derivados de la serie ω 6 y ω 3.

En este sentido, se han realizado numerosos reportes, en los que los niveles de secreción de DHA, uno de los principales AG de la serie ω 3 son insuficientes para cubrir los requerimientos nutricionales del lactante (García y col., 2011). Su producción está

directamente relacionada con la dieta proporcionada, incrementando sus concentraciones en poblaciones con un alto consumo de alimentos ricos en $\omega 3$, como por ejemplo China (Su y col., 2010) y disminuyendo en aquellas en las que se consumen dietas ricas en ácido Linoleico ($\omega 6$), alterando por tanto la relación AL/ALA descrita anteriormente (García y col., 2011).

Estudios previos han demostrado que los niveles de AL y ALA se mantienen constantes en el transcurso de la lactancia, mientras que los metabolitos intermediarios y los derivados finales de ambos precursores, mostraron una disminución significativa entre leche prétermino y calostro a término, lo cual podría explicar la ausencia de ácido Linoléico en las muestras analizadas (Marosvolgyi y col., 2006).

Basándonos en la variabilidad de la composición de acuerdo a la distribución geográfica y hábitos alimenticios, resulta conveniente comparar nuestros resultados con estudios en Latinoamérica y específicamente en nuestro país, en donde el ácido palmítico o C16:0 se encontró en mayor proporción en comparación con otros AG saturados identificados (Bosch, y col., 2009). En el 2009, Bosch y colaboradores encontraron que aproximadamente un 6% de la grasa total de la LMH provenía de Ac. Mirístico o C14:0, Esteárico o C18:0 y Ac. Laurico o C12:0. En cuanto a compuestos insaturados, los autores encontraron que el Ac. Linoleico o C18:2 $\omega 6$ y Oleico o C18:1 $\omega 9$ están presentes en altas proporciones alrededor del 18% y 30% respectivamente. Adicionalmente, encontraron bajos niveles de secreción de AG saturados de cadena corta y PUFAs de la serie $\omega 3$ en LMH, en comparación con otras regiones y países occidentales desarrollados, comprobándose así que la composición de esta fuente de alimentación también depende de los niveles socioeconómicos y de la cultura de una localidad (Bosch y col., 2009).

Gracias a estos resultados se complementa nuestro estudio, corroborándose que además de que estos AG son los más frecuentes en nuestra población también representan los compuestos más abundantes en la secreción mamaria.

En lo que se refiere al efecto de las fracciones lipídicas (FL) de LMH sobre la maduración intestinal, es importante mencionar la existencia de varios enfoques experimentales para evaluar el grado de diferenciación de dicho epitelio y de sus células constituyentes. En uno de ellos se evalúan los cambios morfológicos que acompañan al proceso de diferenciación celular, y en otros, se aplica un criterio bioquímico o molecular, en donde se analizan y cuantifican a ciertas proteínas, comúnmente marcadores asociados a la fisiología intestinal.

La ALP es una enzima dimérica, capaz de hidrolizar grupos fosfatos de diferentes familias de sustratos, incluyendo de los nutrientes suministrados en la dieta. La enzima se encuentra estratégicamente localizada y anclada en la membrana apical de los enterocitos a través de un enlace fosfatidil-inositol-glicosilado propio de proteínas periféricas, y se ha determinado que su actividad incrementa en relación al grado de diferenciación epitelial intestinal desde el eje cripta-vellosidad, por lo que es usado como un marcador estándar de tal evento (Lallés 2010).

Es importante acotar que en líneas células derivadas de carcinoma tales como HT-29, la expresión de genes asociados a diferenciación se encuentra aparentemente reducida. Sin embargo, se ha determinado que en este tipo celular puede inducirse la expresión de un fenotipo diferenciado o de célula polarizada, con un borde estriado y proteínas periféricas marcadoras de diferenciación como fosfatasa alcalina, por la acción

de diversos tratamientos, entre ellos factores solubles presentes en la fuente metabólica (Freshney y col., 2010).

En nuestro estudio, se encontró un incremento de 3 veces la actividad de fosfatasa alcalina en células HT-29 estimuladas con un conjunto de FL de LMH (figura 15A). Por otro lado, se obtuvo un incremento poco significativo de la actividad de la enzima marcadora en cultivos estimulados con FL de muestras individuales de LMH (figura 15B). El resultado obtenido permite sugerir que la composición heterogénea de las muestras en estudio, específicamente en relación a la reconocida variabilidad lipídica asociada a la secreción láctea humana (Bosch, 2009; Su y col., 2010) pudo soslayarse por la combinación de varias muestras de leche. Resultando que las FL fueron capaces de promover efectivamente los eventos de maduración intestinal. Así pues, en conjunto las FL son capaces de inducir el incremento significativo de los niveles de expresión o actividad enzimática de marcadores como la fosfatasa alcalina (ALP), en comparación a lo obtenido por la estimulación con FL individuales, que parecen carecer o variar en la proporción de los componentes grasos responsables de la inducción del marcador.

Nuestra hipótesis y los resultados obtenidos se apoyan en reportes previos (Kaur y col., 1996, Lallés, 2010) en los que se determinó que la dieta, parecía ser la principal moduladora de la actividad de ALP, específicamente debido a la incorporación de grasas, entre las que se incluyen AG saturados aislados de cadena media y larga y AG poliinsaturados de la familia $\omega 3$, todos ellos encontrados en altas proporciones en LMH. Adicionalmente, se determinó, que un conjugado de ácido linoleico (9-cis, trans 11-CLA) incrementaba los niveles de expresión y actividad de enzimas indicadoras del estado diferenciado en células intestinales, debido principalmente a un bloqueo del ciclo celular

en las primeras etapas (G0-G1) y por ende a la reducción de los niveles de expresión de los genes asociados a la proliferación, tales como c-myc, c-jun y cyclin D1 (Lampen y col., 2005, Hofmanová y col., 2009; 2012a; 2012b).

Otros estudios in-vitro han indicado que CLA (Miller y col., 2001), así como algunos compuestos grasos no esenciales como NaBt, son capaces de inhibir la proliferación celular. El mecanismo que ha sido descrito para PUFAs está asociado a la activación de PPAR γ . Una vez unido a ligandos específicos y en la forma de un heterodímero, este receptor promueve la liberación de complejos correpresores y la unión de coactivadores induciendo la activación de la maquinaria transcripcional de los genes que controla. Esto conlleva a un bloqueo del ciclo celular y a la regulación de la captación y el transporte de AG. Por su parte, el mecanismo asociado a NaBt consiste en una regulación epigenética. La presencia de este compuesto induce la acetilación de histonas en sitios específicos de la región promotora del gen de ALP y de otros genes asociados al ciclo, favoreciendo de esta manera su transcripción (Smith y col., 1998).

A modo de complementar la discusión de los efectos observados, es importante mencionar que el transporte, absorción y acumulación al interior celular de compuestos grasos, especialmente de PUFAs, es capaz de promover la formación y estabilización de microdominios enriquecidos en ALP intestinal, contribuyendo con el mejoramiento u optimización de las funciones de la enzima, específicamente, en lo que se refiere a homeostasis en el metabolismo lipídico (Hansen, 2011).

Una vez conocido el efecto de la FL de LMH sobre estas células epiteliales, se procedió a examinar el posible mecanismo asociado a la promoción de eventos antiproliferativos y de prodiferenciación.

La primera evidencia experimental que sugería la participación de PPAR γ en el proceso de maduración intestinal, se dió al momento de estimular los cultivos con Pioglitazona, un ligando conocido del receptor (Tsuje y col., 2003). Se observó un aumento significativo de la actividad del marcador de diferenciación ($p < 0.01$) en comparación con sus niveles basales de expresión (figura 15). Resultado similar al obtenido con las FL a concentraciones crecientes.

Nuestro reporte coincide con estudios previos, en los que la activación del receptor por ligandos sintéticos (Tsuje y col., 2003; Lampen y col., 2005) y por AG poliinsaturados (Vandel Heuven, 1999; Lampen y col., 2005) resultó en la inhibición del crecimiento en líneas celulares derivadas de adenocarcinoma. Además, se determinó que en dichas líneas celulares el receptor se encontraba altamente expresado y sus patrones de expresión se relacionaban directamente con la aparición de un fenotipo cada vez más diferenciado (Sarraf y col., 1998; Levefbre y col., 1999).

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a ensayar la activación de PPAR γ empleando un formato de ELISA indirecto práctico y sensible, siguiendo en cada paso las recomendaciones del fabricante (TransAM[®] PPAR γ assay).

En este estudio se evidencia por primera vez el papel de AG contenidos en FL de un conjunto de LMH como ligandos específicos de PPAR γ , pues se obtuvo un incremento significativo en los niveles de activación del receptor en cultivos celulares

tratados con concentraciones crecientes de FL provenientes de 5 LMH, en comparación con los niveles basales de activación (ver figura 16).

Como bases para corroborar nuestro hallazgo, se tiene lo reportado por Vanden Heuvel en 1999, en donde este indica que AG endógenos y principalmente AG esenciales ejercen un papel importante en la activación de receptores de proliferación como PPAR, denotándolos como proliferadores peroxisomales (Vanden Heuvel, 1999). El autor expone que de esta manera son capaces de regular la maquinaria transcripcional de genes implicados en el progreso del ciclo celular. Nuestro estudio resulta innovador dado que en ninguno de los trabajos anteriores, se ha hecho énfasis en la fuente de alimentación que contiene la mayor parte de estos AG, como es el caso de la LMH, cuando es bien sabido que el proceso de diferenciación epitelial puede ser modificado fácilmente por pequeños cambios en la proporción de los nutrientes suministrados en la alimentación (Drozdowski y col., 2010)

De todo esto se puede concluir, que el incremento en los niveles de activación del factor de transcripción PPAR γ por AG sugiere un posible mecanismo de acción para los estos compuestos mientras son ingeridos durante la lactancia, principalmente porque la mayoría de los que se reportan en la literatura como proliferadores peroxisomales (Vanden Heuvel, 1999) se encontraron a una alta frecuencia en la población analizada (figura 13 y 14).

En vista de la conocida asociación entre la activación de PPAR γ y los procesos de diferenciación, metabolismo y transporte lipídico, se procedió a emplear técnicas de biología molecular como PCR para la amplificación del transcrito que codifica para la

proteína de transporte de AG en células intestinales humanas (*hsFATP4*) y así ligar la participación de PPAR γ a uno de los numerosos efectos metabólicos de la célula en diferenciación como es la regulación del transporte de AG

Tras la comprobación de la integridad de los templados a través de la amplificación del gen de β -actina y a la estandarización de los cebadores específicos para FATP4, se procedió a evaluar el patrón de inducción de los niveles de ARNm de esta proteína por acción de agonista de PPAR γ , butirato de sodio y FL de LMH. El análisis densitométrico de los tratamientos y sus replicas no aportaron resultados consistentes y por tanto ninguna tendencia de respuesta.

Podemos discutir que se esperaba un incremento significativo en los niveles del transcrito de FATP4 en cultivos estimulados con FL de LMH. Esto último debido a que previamente demostramos que AG derivados de LMH son capaces de inducir efectivamente los niveles de activación de PPAR. Así pues, el receptor podría acoplarse a los PPRE contenidos en la secuencia del gen de la proteína de transporte y de esta manera podría inducir su transcripción (Geneviere y col., 1999)

Aunque se ha reportado un incremento notable en los niveles de ARNm de la proteína de transporte como consecuencia funcional de la activación de PPAR por ligandos sintéticos, nuestros resultados no permiten corroborarlo.

Finalmente, se propone un mecanismo de acción para los AG de la dieta sobre la expresión genética y por ende, sobre la modulación de actividades fisiológicas implicadas en el desarrollo y maduración intestinal. Aún queda por determinar cuál sería el mecanismo por el cual los AG modulan el transporte mediado por proteínas de membrana en la mucosa intestinal. Nuestros resultados nos permiten inferir que los AG presentes en la LMH e ingeridos durante el periodo de lactancia podrían inducir la diferenciación de células intestinales a través de la activación de PPAR γ .

VIII. CONCLUSIONES.

1. Se determinó la composición de AG en un grupo de muestras de LMH provenientes de donantes sanas del HUC. Del análisis se observó un predominio notable de AG saturados, ácido Linoléico y Oleico sobre otras especies de AG.
2. Se determinó una alta variabilidad en la composición de AG en las 3 etapas de producción de LMH analizadas.
3. AG saturados de cadena corta y algunos AG monoinsaturados se presentaron a muy bajas frecuencias o ausentes en las etapas de producción analizadas. Esto resulta consistente con la pequeña proporción reportada para estos compuestos en LMH.
4. El Ac. Linoleico se presenta en nuestro estudio como el principal y único AG poliinsaturado. Una mayor proporción de la serie $\omega 6$ sobre la serie $\omega 3$ de PUFAs en la secreción mamaria ha mostrado ser común en poblaciones cuyo consumo de AG esenciales es desbalanceado.
5. En base a reportes previos se concluye, que los AG identificados no solo son los más abundantes en cada etapa de producción, sino también los más frecuentes en la población analizada.
6. La estimulación de cultivos de células HT-29 con FL de LMH durante 48 horas, arrojó un incremento significativo de la actividad del marcador de diferenciación Fosfatasa Alcalina, en comparación a los niveles basales de actividad de la enzima. Por esta razón, se sugiere un posible papel promotor de la diferenciación celular para los AG contenidos en la FL de LMH.
7. Se corrobora el papel de ciertos elementos de la dieta entre los que se incluyen AG saturados y Poliinsaturados contenidos en LMH sobre la modulación del

proceso de diferenciación celular y por ende sobre la actividad de marcadores intestinales del proceso.

8. La estimulación de cultivos de células HT-29 con un ligando específico de PPAR γ durante 48 horas, arrojó un incremento significativo de la actividad de Fosfatasa Alcalina, lo que sugiere la posible participación de PPAR γ en el proceso de maduración intestinal.
9. En cultivos de células HT-29 tratados con FL de LMH se observa un incremento significativo de los niveles de activación del receptor PPAR γ . Se sugiere de esta manera, que los AG contenidos en las FL de LMH juegan un papel como ligandos naturales del receptor y por lo tanto como inductores de la vía del receptor asociada al proceso de maduración intestinal.
10. Se lograron estandarizar las condiciones para la amplificación específica del transcrito que codifica para el principal transportador de AG en células intestinales como la FATP4 por la técnica de RT-PCR.
11. Al no observarse ninguna tendencia reproducible en los resultados de amplificación por PCR a través del análisis densitométrico y semicuantitativo, no se pudo asociar al receptor de proliferación, ni a las FL con la regulación de dicha proteína de transporte. Queda sujeta a investigación el mecanismo por el cual las FL de LMH inducen la sobrerregulación de este transcrito.

IX. RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES.

De manera de continuar con el estudio de los mecanismos moleculares que determinan los efectos beneficiosos de los componentes alimenticios presentes en la LMH, se pueden considerar las siguientes recomendaciones.

- Sondar datos clínicos y socioeconómicos de las donantes, los cuales podrían influenciar la composición de la secreción en estudio.
- Para el análisis químico se recomienda emplear equipos de presión reducida como un rotavapor para la eliminación suave y eficiente de disolventes que podrían afectar la calidad de la detección en la sustancia de interés.
- Para la identificación de los compuestos de interés se recomienda el uso de una base de datos más amplia, así como de patrones para curvas de calibración que permitan desarrollar la cuantificación de los compuestos identificados.
- Debido a la alta variabilidad en la composición láctea y lo que esto implicó en la obtención de nuestros resultados, es recomendable trabajar con AG individuales, de manera de definir cual o cuales de los componentes lipídicos ejercen la activación del receptor.
- Se podría complementar este estudio con el desarrollo de microarreglos o amplificaciones en tiempo real. Con ello se obtendrían resultados con mayor resolución y significancia. Además supondría un gran avance en el desarrollo de la Nutrigenómica asociada a los componentes lipídicos que aporta la LMH.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Actis, A., Joekes, S., Cremonezzi, D., Morales, G., Eynard, A. 2002. Effects of dietary lipids on cell proliferation of murine oral mucosa. *Lipids Health Dis.* **1**(3).
- Ametani, A., Hachimura, S., Yamamoto, Y., Shimizu, M., Imaoka, A., Yi, H.K., Hashimoto, K. 1996. Consecutive events of growth, differentiation and death of the small intestinal epithelial cell line, IEC-6. *In Vitro Cell Dev Biol Anim;* **32**(3): 127-30.
- American Academy of Pediatrics (AAP). Work group on Breastfeeding. 1997. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* **100**:1035-1039.
- American Academy of Pediatrics (AAP). Work group on Breastfeeding. 2005. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.***115**:496-506.
- Anti, M., Marra, G., Armelao, F., Bartoli, G., Ficarelli, R., Percesepe, A., De Vetis, M. y colaboradores. 1992. Effect of omega-3 fatty on rectal mucosal cell proliferation in subjects at risk for colon cancer. *Gastroenterology.* **103**(3):883-91.
- Aponte G. 2002. PYY-mediated fatty acids induced intestinal differentiation. *Peptides.* **23**(2): 367-376.
- Arendt. M. 2008. Communicating human biomonitoring results to ensure policy coherence with public health recommendations: analyzing breastmilk whilst protecting, promoting and supporting breastfeeding. *Environ Health Gob.* **7**(1):1-6.
- Baricelli, J. 2009. Estudio de la beta defensina humana expresada en células epiteliales de adenocarcinoma de glándula mamaria. Tesis de Maestría. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Miranda-Venezuela.
- Barrera, G. 2009. Estudio de la maduración y proliferación de células intestinales HT-29 por una fracción de anticuerpos proteolíticos presentes en leche materna humana. Tesis doctoral. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Miranda-Venezuela.

- Batovska, D., Todorova, I., Tsvetkova, I., Najdenski, H. 2009. Antibacterial study of the medium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. *Pol J Microbiol.* **58**:43–47.
- Beaulieu, J. 1997. Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem.* **31**:1-78.
- Belury, M., Vanden Heuvel, J. 1997. Protection against cancer and heart disease by the dietary fat, conjugated linoleic acid: potencial mechanism of action. *Nutr Dis Update J.1*: 58-63.
- Berseth, C. 1983. Comparison of the gastrointestinal growth promoting effects of rat colostrum and mature milk in newborn rats in vivo. *Am J Clin Nutr.* **37**:52-60.
- Bookout, A., Jeong, Y., Downes, M. Yu, R., Evans, R., Mangelsdorf, D. 2006. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a transcriptional network. *Cell.* **126**(4):789–799.
- Bosch, V., Golfetto, I., Alonso, H., Laurentin, Z., Materan, M., García, N. 2009. Ácidos grasos de la leche materna madura de mujeres venezolanas de estratos socioeconómicos bajos: Influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento. *ALAN.* **59**(1): 61-65.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* **72**:248-254.
- Brockman, J., Gupta, R., Dubois, R. 1998. Activation of PPAR gamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology.* **115** (5): 1049-55.
- Brown, P., Smith-Oliver, T., Charifson, P., Tomkinson, N., Fivush, A., Sternbach, L., Wade, L., y colaboradores. 1997. Identification of peroxisome proliferator-activated receptor ligands from a biased chemical library. *Chem Biol.* **4**: 909-918.
- Burrin D. 1997. Is milk-borne insulin-like growth factor-I essential for neonatal development? *J Nutr.* **127**: 975–979.
- Calhau, C., Martel, F., Hipolito-Reis, C., Azevedo, I. 2000. Differences between duodenal and jejunal rat alkaline phosphatase. *Clin Biochem.* **33**(7):571.

- Cariani, L., Thomas, L., Brito, J., Del Castillo, J. 2004. Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases. *Anal Biochem.* **324**(1):79-83.
- Carnielli, V., Luijendijk, I., Van Boerlage, J., Degenhart, H., Sauer, P. 1995. Feeding premature newborn infants palmitic acid in amounts and stereoisomeric position similar to that of human milk: effects on fat and mineral balance. *Am J Clin Nutr.* **61**: 1037-42.
- Castro, A., Porras, M. 2003. La protección de leche materna a los recién nacidos. Una visión actualizada. *Rev Mex Pediatr.* **70**(1):27-31.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* **162**:156-9.
- Clatworthy, J. Subramanian, V. 2001. Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Develop.* **101**:3-9.
- Corteguera, R. 1999. Fisiopatología de la diarrea aguda. *Rev Cubana Pediatr.* **71**(2):86-115.
- Cummins A., Thompson, F. 2002. Effect of breast milk and weaning on epithelial growth of the small intestine in humans. *Gut.* **51**: 748-54.
- De la Torre Medina, R. 2006. Estudio de la regulación y expresión de genes en células epiteliales intestinales en respuesta a los fenómenos de diferenciación y apoptosis. Tesis Doctoral Universidad de Granada. España.
- Drozdowski, L., Clandinin, T., Thompson, A. 2010. Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World J Gastroenterology.* **16**(7):787-99.
- Eckert, K., Kunkel, T. 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucl Acid Res.* **18**(13):3739-44.
- Freshney, R. 2010. Culture of animal cells: A manual of basic technique and specialized applications. Sexta Edición. Editorial Wiley Blackwell. New Jersey. E.U.A.

- Garcia, C., Millet, V., Coste, T.C., Mimoun, M., Ridet, A., Antona, C., Simeoni, U. y Armand, M. 2011. French mother's milk deficient in DHA contains phospholipids species of potencial interest for infant development. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **53**(2):206-12.
- Gardner E. 1975. Esophagus, stomach and intestine. Cuarta edición. Editorial Anatomy: regional study of human structure. W.B. Philadelphia Saunders. E.U.A.
- Geneviere, M., Schoojans, K., Lefebvre, A., Staels, B., Auwerx, J. 1997. Coordinate Regulation of the Expression of the Fatty Acid Transport Protein and Acyl-CoA Synthetase Genes by PPAR α y PPAR γ Activators. *J Biol Chem.* **272**(45):28210-17.
- German, J.B., Dillard, C.J. 2010. Saturated Fats: A perspective from lactation and milk composition. *Lipids.* 45:915-23.
- Gimeno, R. Hirsch, D., Punreddy, S., Sun, Y., Ortegon, A., Wu, H., Daniels, T. y colaboradores. 2003. Targeted deletion of Fatty Acid Transport Protein-4. Results in early embryonic lethality. *J Biol Chem.* **278**(49):49512-16.
- Giovannini, M., Riva, E., Agostoni, C. 1998. The role of dietary polyunsaturated fatty acids during the first 2 years of life. *Early Hum Dev.* 53:99-107.
- Granneman, J., Skoff, R., Yang, X. 1998. Member of the peroxisome proliferator-activated receptor family of transcription factors is differentially expressed by oligodendrocytes. *Neurosci J Res.* **51**(5):563-73.
- Green, P., Glozman, S., Kamensky, B., Yavin, E. 1999. Developmental changes in rat brain membrane lipids and fatty acids. The preferential prenatal accumulation of docosahexaenoic acid. *J Lipid Res.* **40**: 960-6.
- Grimaldi, P. Teboul, L., Inadera, H., Gaillard, D., Amri, E. 1997. Trans-differentiation of myoblasts to adipoblasts: triggering effects of fatty acids and thiazolidinediones. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* **57**(1):71-5.
- Gutierrez, M., Droguet, M. 2002. Identificación de compuestos volátiles por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Boletín Intexter, U.P.C.* **122**: 35-41.

- Hague, A., Butt, A., Paraskeva, Ch. 1996. The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy source or inducer of differentiation and apoptosis? *Proc Nutr Soc.* **55**:937-943.
- Hallden, G., Aponte G. 1997. Evidence for a role of the gut hormone PYY in the regulation of intestinal Fatty Acid-Binding Protein transcripts in differentiated subpopulations of intestinal epithelial cell hybrids. *J Biol Chem.* **272**(19):12591–600.
- Hamosh, M. 1997. Should infant formulas be supplemented with bioactive components and conditionally essential nutrients present in human milk? *J Nutr.* **127**:971–4.
- Hansen, G., Rasmussen K., Christiansen, L., Danielsen, M. 2011. Dietary free fatty acids from alkaline phosphatase-enriched microdomains in the intestinal brush border membrane. *Mol Mem Biol.* **28**(1-2):136-144.
- Hayssen, V. 1993. Empirical and theoretical constraints on the evolution of lactation. *J Dairy Sci.* **76**:3213-3233.
- Hecker, K., Roux, K.. 1996. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques.* **20**:478-485.
- Heikkinen, S., Auwerx, J., Argmann, C.A. 2007. PPAR γ in human and mouse physiology. Review. *Biochim Biophys Acta.* **1771**: 999–1013.
- Heird, W. 2001. The role of polyunsaturated fatty acids in term and preterm infants and breastfeeding mothers. *Pediatr Clin North Am.* **48**(1):173-88.
- Hofmanová, J., Vaculová, A., Koubková, Z., Hýžd'alová, M., Kozubík, A. 2009. Human fetal colon cells and colon cancer cells respond differently to butyrate and PUFAs. *Mol Nutr Food Res.* **53**:102-13.
- Hofmanová, J., Ciganek, M., Slavík, J., Kozubík, A., Stixová, L., Vaculová, A., Dušek, L. y colaboradores. 2012a. Lipid alterations in human colon epithelial cells induced to differentiation and/or apoptosis by butyrate and polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* **23**(6):539-48.

- Hofmanová, J. Vaculová, A. Kozubík, A. 2012b. Regulation of the metabolism of polyunsaturated fatty acids and butyrate in colon cancer cells. *Curr Pharm Biotechnol.* **1**
- Hurley, M., Flux, C., Salter, A., Brameld, J. 2006, Effects of fatty acids on skeletal muscle cell differentiation in vitro. *Brit J Nutr.* **95**:623–30.
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. San Diego.
- Innis, S. 2007. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *P Nutr Soc.* **66**:397–404.
- Issemann, I., Green, S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* **347**(6294): 645–50.
- Jarocka-Cyrta, E., Perin, N. Keelan, M., Clandinin, T., Thomson, A. 1999. Dietary lipid composition modifies intestinal morphology and nutrient transport in young rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **28**(1):46-53.
- Jumarie, C., Malo, C. 1994. Alkaline phosphatase and peptidase activities in Caco-2 cells: differential response to triiodothyronine. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **30**(11): 753-60.
- Kaur, M., Kaur, J., Ojha S., Mahmood, A. 1996. Dietary fat effects on brush border membrane composition and enzyme activities in rat intestine. *Ann Nutr Metab.* **40**:269-76.
- Klagsburn, M. 1978. Human milk stimulates DNA synthesis and cellular proliferation in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* **75**(10):5057-5061.
- Kliewer, S., Sundseth, S., Jones, S., Browns, P., Wisely, G., Kobles, C., Devchandi, P., y colaboradores. 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors a and g. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94**:4318–23.
- Lallés, J.P. 2010. Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr Rev.* **68**(6):323-32.

- Lampen, A., Leifheit, M., Voss, J., Nau, H. 2005. Molecular and cellular effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes: effects on proliferation, differentiation, and gene expression. *Biochim Biophys Acta*. **1735**(1):30-40.
- Langer, P. 2003. Lactation, Weaning Period, Food Quality and Digestive tract differentiations in Eutheria. *Evolution*. **57**(5):1196–215.
- Ledwith, B., Johnson, T., Wagner, L., Pauley, C., Manam, S., Galloway, S., Nichols, W. 1996. Growth regulation by peroxisome proliferators: opposing activities in early and late G1. *Cancer Res*. **56**: 3257-64.
- Lefebvre, A., Paulweber, B., Fajas, L., Woods, J., McCrary, C., Colombel, J., Najib, J. y colaboradores. 1999. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol*. **162**:331–40.
- Lehmann, J., Moore, L., Smith-Oliver, T., Wilkison, W., Willson, T., Kliewer, S. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. **270**:12953-6.
- López-López, A., Castellote-Bargallo, A., López-Sabater, M. 2001. Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in human milk. *Chromatographia*. **54**:743-747.
- López-López, A., López-Sabater, M., Campoy, C., Rivero, M., Castellote, A. 2002. Fatty acid and sn-2 fatty acid composition in human milk from Granada –Spain and in infant formulas. *Eur J Clin Nutr*. **56**:1242–54.
- Luque, J., Herráez, Á. 2006. Biología molecular e ingeniería genética conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencia de la salud. Primera edición. Editorial ELSEVIER. Madrid, España.
- Maldonado, J. 2004. Lactancia Materna en Infantes pretermino. *A.E.P. Lactancia Materna, guía para profesionales*. 95-105.
- Malowski, K.M., Vieira, A.T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H.C., y col. 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. **461**:1282–86.
- Mariadason, J., Nicholas, C., L'Italien, K., Zhuang, M., Smartt, H., Heerdt, B., Yang, W., Corner, G., Wilson, A., Klampfer, L., Arango, D., Augenlicht, L. 2005.

Gene expression profiling of intestinal epithelial cell maturation along the crypt-villus axis. *Gastroenterol.* **128**(4): 1081-8.

- Marosvolgyi, T., Kovács, A., Lohner, S., Funke, S., Burus, I., Decsi, T. 2006 Fatty acid composition of human milk in mothers of preterm and full-term infants in the first three weeks of lactation. *Orv Hetil.* **147**(31): 1459-63.
- Martin, G., Poirier, H., Hennuyer, N., Crombiei, D., Fruchart, J., Heymani, R., Besnard, P y colaboradores. 2000. Induction of the Fatty Acid Transport Protein 1 and Acyl-CoA Synthase genes by dimer-selective retinoids suggests that the peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target. *J Biol Chem.* **275**(17):12612-18.
- Miller, A., Stanton, C., Devery, R. 2001. Modulation of Arachidonic acid distribution by conjugated linoleic acid isomers and linoleic acid in MCF-7 and SW480 cancer cells. *Lipids.* **36**(10): 1161-8.
- Nassir, F., Abumrad, N. 2009. CD36 and Intestinal Fatty Acid Absorption. *Immun. Endoc & Metab. Agents in Med Chem.* **9**:3-10.
- Novak, E., Innis, S. 2011. Impact of dietary n-3 and n-6 fatty acids on milk medium chain fatty acids and the implications for neonatal liver metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **301**(5):807-817.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 1987. Fisiología de la absorción intestinal de agua, electrolitos y macronutrientes. *Manual de Tratamiento de la Diarrea.* Serie Paltex. **(13)**:4-20.
- Palou, A., Bonet A., Picó C., Rodríguez, A. 2004. Nutrigenómica y obesidad. *Rev Med Univ Navarra.* **48**(2): 36-48
- Pegorier, J.P., Lemay, C. y Girard, J. 2004. Control of Gene Expression by Fatty Acids. *J Nutr.* 2444-9.
- Pell, J.D., Brown, J.C., Johnson, I.T. 1994. Polyunsaturated fatty acids of the n-3 series influence intestinal crypt cell production in rats. *Carcinogenesis*, **15**:1115-1119.

- Pineau, T., Hudgins, W., Liu, L., Chen L., Sher, T., Gonzalez, F., Samid, D. 1996. Activation of a human peroxisome proliferator-activated receptor by the antitumor agent phenylacetate and its analogs. *Biochem Pharmacol.* **52**: 659-67.
- Poirier, H., Niot, I., Monnot, M., Braissant, O., Meunier-Durmort, C., Costet, P., Pineau, T., y colaboradores. 2001. Differential involvement of peroxisome-proliferator-activated receptors α and δ in fibrate and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine. *J Biol Chem.* **355**:481-88.
- Potter, J.D. 1992. Reconciling the epidemiology, physiology, and molecular biology of colon cancer. *JAMA.* **268**:1573-77.
- Pronczuk, J., Moy, G., Vallenas, C. 2004. Breast Milk: An Optimal Food. *Environ Health Persp.* **112**(13):722-723.
- Puigserver, P., Spiegelman, B.M. 2003. Peroxisome proliferator activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* **24**:78-90.
- Puigmartí, M., Castellote, A., Carbonell, X, López-Sabater, M. 2011. Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, and term infants. *Clin Nutr.* **30**(1):116-23.
- Reginato, M.J., Krakow, S.L., Bailey, S.T., Lazar, M.A. 1998. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* **273**:1855-1858.
- Rodríguez, C., Tovar, A., Del Prado, M., Torres, N., 2005. Molecular mechanisms of action and health benefits of polyunsaturated fatty acids. *Rev Bras Cienc Farm.* São Paulo. **41**(2).
- Rosen, E.V., Spiegelman, B.M. 2001. PPAR γ : a Nuclear Regulator of Metabolism, Differentiation, and Cell Growth. *J Biol Chem.* **276**(41):37731-37734.

- Saez, P., Tontonoz, M., Nelson, J., Alvarez, U., Ming, S., Baird, V., Thomazy, R. 1998. Activators of the nuclear receptor PPAR gamma enhance colon polyp formation. *Nat Med.* **4**: 1058–1061.
- Sala-Vila A., Castellote, A., Rodriguez, M., Lopez, M. 2003. High-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection for the determination of phospholipid classes in human milk, infant formulas and phospholipid sources of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Chromatogr A.* **1008**: 73–80.
- Sala-Vila, A., Castellote I., Rodriguez-Palmero M., Campoy, M., López-Sabater M. 2005. Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): Changes during lactation. *Nutrition.* **21**:467-473.
- Sambrook, J., Fritsch, F., Maniatis, T. Russell, D. 2001. Molecular Cloning. A laboratory manual. Tercera Edición. Editorial Cold Spring Harbor. New York-E.U.A
- Sancho, E., Batlle, E., Clevers, H. 2004. Signalling pathways in intestinal cancer and development. *Annual Rev. Cell Dev. Biol.* 20:695-723.
- Sanderson, I., Naik, S. 2000. Dietary regulation of intestinal gene expression. *Annual Rev Nutr.*20:311-38.
- Sarraf, P., Mueller, E., Jones D., King, F., De Angelo, S., Partridge, J., Holden S., y colaboradores. 1998. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nat Med.* **4**(9): 1046-52.
- Sauerwald, U., Demmelmair, H., Koletzko, B. 2001. Polyunsaturated Fatty Acid Supply with Human Milk. *Lipids.* **36**(9):991-996.
- Schanler, R. 2007. Evaluation of the evidence to support current recommendations to meet the needs of premature infants: the role of human milk. *Am J Clin Nutr.* **85**:625–8.
- Scheppach, W. 1994. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut supplement.* **1**: 35-8.

- Shim, J., Moulson, C., Newberry, E., Lin, M., Xie, Y., Kennedy, S., Miner, J., Davidson, N. 2009. Fatty acid transport protein 4 is dispensable for intestinal lipid absorption in mice. *Lipid Res.* **50**(3):491-500.
- Smith, J.G., Yokoyama, W.H., German J.B. 1998 Butyric acid from the diet: actions at the level of gene expression. *Crit Rev Food Sci Nutr* **38**(4): 259–97.
- Southgate, J., Pitt, E., Trejdosiewicz, L. 1996. The effects of dietary fatty acids on the proliferation of normal human urothelial cells in vitro. *Brit J Cancer.* **74**:728-34.
- Stahl, A., Hirsch, D.J. Gimeno, R.E., Punreddy, S., Ge, P., Watson, S., Patel, S., Kotler, M., Raimondi, A., Tartaglia, L.A., Lodish, H.F. 1999. Identification of the Major Intestinal Fatty Acid Transport Protein. *Mol Cell*, **4**: 299–308.
- Stahl, A., Gimeno, R.E., Tartaglia, L.A., Lodish, H.F. 2001. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. Review. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* **12**(6):266-73.
- Stuart-Macadam P., Dettwyler, K. 1995. Breastfeeding: Biocultural Perspectives. Primera Edición. Editorial Walter De Gruyter, Inc. New York. E.U.A.
- Su, L., SK, T., Lim, S., Chen, Y., Tan, E., Pai, N., Gong, Y., y colaboradores. 2010. The influence of maternal ethnic group and diet on breast milk fatty acid composition. *Ann. Acad. Med. Singapore.* **39**(9):675-679.
- Teller, I., Beaulieu, J. 2001. Interaction between laminil and epithelial cells in intestinal health and disease. *Exp. Rev. Mol. Med.* 1-18.
- Temboury, M.C. 2004. Composición de la leche humana. *Monografías de la A.E.P. Lactancia Materna, guía para profesionales.* **5**: 59-76.
- Tontonoz, P., Hu, E., Spiegelman, B. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* **79**(7): 1147-56.
- Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J., Thomazy, V., Evans, R. 1998. PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* **93**: 241–252

- Thompson, A., Bizarro, M. 2008. Necrotizing Enterocolitis in Newborns: Pathogenesis, Prevention and Management. *Drugs*. **68**(9):1227-38.
- Tsujie, M., Nakamori, S., Okami, J., Hayashi, N., Hiraoka, N., Nagano, H., Dono, K., colaboradores. 2003. Thiazolidinediones inhibit growth of gastrointestinal, biliary, and pancreatic adenocarcinoma cells through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha pathway. *Exp Cell Res*. **289**(1): 143-51.
- Van Beers, E., Buller, H., Grand, R., Einerdhand, A., Dekker, J. 1995 Intestinal brush border glucohydrolases: structure, function and development. *Crit. Rev. Biochem. Mol.Biol.*197-262.
- Vandel Heuvel, J. 1999. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: A critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J Nutr*. **129**: 575-80.
- Wang, C., Eshleman, J., Wilson, J., Markowitz S. 1995. Both transformers growth factor-beta and substrate release are inducers of apoptosis in a human colon adenoma cell line. *Cancer Res*. **55**:5101-05.
- Widdowson, E., Colombo, V., Artavanis C. 1976. Changes in the organs of pigs in response to feeding for the first 24 hours after birth. The digestive tract. *Biol Neonate*. **28**:272-81.
- Wong, Y., Low, M. 1992. Phospholipase resistance of the glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor on human alkaline phosphatase. *Clin Chem*. **38**(12): 2517-25.
- Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G., Dussuault, E., Triadou, N., Lacroix, B., Haffen, K., y colaboradores.1985. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *J. Cell. Physiol*. **122**(1):21-9.

X.1. Recursos Electrónicos.

- Estructura de las capas del epitelio intestinal. <http://nutricionhuesca.blogspot.com/2011/05/tema-29.html>. [Consulta: 3/05/2012].
- PPAR AND FATP in human adypocite. KEGG Pathway Database. <http://www.genome.jp/kegg>. [Consulta: 3/03/2012].
- TransAM PPAR γ Assay. <http://www.activemotif.com/catalog/228/transam-ppar%CE%B3>. [Consulta: 23/04/2012].

XI. ANEXOS.

XI.1. Anexo 1. Aprobación del proyecto por el comité de bioética del IVIC.



Gobierno Bolivariano
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular
para la **Ciencia y Tecnología**

Instituto Venezolano de
Investigaciones Científicas



**Centro de Microbiología y Biología Celular
Laboratorio de Genética Molecular**

Apdo. 21827, Caracas, 1020A Venezuela
Tel. 58.212.504.1439 Fax: 58.212.504.1382

Email: htakiff@ivic.ve

Altos de Pipe, 27 de mayo de 2008

Dr. Angel Viloría,
Director, IVIC

Estimado Dr. Viloría,

Tengo el agrado de informarle que la Comisión de Bioética del IVIC, en su reunión del pasado 15 de mayo, revisó el proyecto, "**Efecto de componentes lipídicos de leche materna humana en células epiteliales de intestino HT-29 a través de receptores PPARs.**", presentado por la Dra. Luz Thomas. La comisión no presentó objeciones al proyecto en su forma actual, (anexo), por lo cual queda aprobado.

Sin otro particular, me despido,

Atentamente,

Howard Takiff
Coordinador, Comisión de Bioética del IVIC

I. V. I. C.
DIRECCION
27 MAY 2008
RECIBIDO

Anexo: lo indicado