REVISTA ESPAÑOLA DE FISIOLOGIA, 27, 245-252. 1971

Influencia de los ácidos linoleico y linolénico, y de la colina sobre el metabolismo de ácidos grasos de cerebro de rata *

M.ª Encarnación Rivera **

Physiologisch-chemisches Institut
Universität Köln
Alemania

(Recibido el 29 de abril de 1971)

M.ª E. RIVERA. *Influence of Linoleic and Linolenic Acids, and Choline Upon Fatty Acid Metabolism in Rat Brain.* R. esp. Fisiol., 27, 245-252. 1971.

Equal amounts of ethyl linoleate and linolenate were fed together to rats on a fat-free diet during different periods of time. In addition choline was fed to a group of the animals. The fatty acid composition of brain-phosphatides was determined by gas-liquid chromatography. Dietary linolenate inhibits the incorporation of linoleate and its derivatives into phosphatides. Choline favours the incorporation of linoleate and of C_{22}-fatty acids. Eicosatrienoic acid appears in brain phosphatides of fat-deficient rats and is depressed by these essential fatty acids; in choline-fed rats, eicosatrienoic acid is incorporated to a lesser extent.

La composición de los ácidos grasos que forman parte de los lípidos cerebrales permanece, como es sabido, relativamente constante, y no responde tan rápidamente como otros tejidos a variaciones en la dieta. El transporte de ácidos grasos al interior del cerebro adulto parece estar restringido por la barrera que existe entre el cerebro y el torrente circulatorio (16). El acetato no puede atravesar esta barrera, a pesar de ser una molécula tan pequeña, pero en cortes de tejido (5) o tras inyección intracraneal (13) se ha demostrado su incorporación en los lípidos del cerebro a velocidad comparable con el hígado. Sin embargo, moléculas de mayor tamaño, como son los ácidos polienoicos, pueden atravesar la barrera (11), puesto que al suministrar ácidos linoleico y araquidónico durante 100 días a ratas aumentan los ácidos polienoicos de la serie ω6 (es decir, con el primer doble enlace contando a partir del grupo metilo terminal en posición 6, al igual que el ácido linoleico); un suministro de ácido linolénico hace que se incremente la proporción de ácidos derivados del mismo (serie ω3).

Se ha demostrado que los ácidos linoleico y linolénico son los precursores de los ácidos grasos polienoicos de 20 y 22 átomos de carbono (6, 9, 10).

* El presente trabajo forma parte de la tesis doctoral presentada en la Facultad de Farmacia de Madrid.

** Dirección actual: Max Planck Institut für Ernährungsphysiologie, 46 Dortmund, Rheinlanddamm 201 (Alemania).

El cerebro es un órgano muy rico en ATP:colina-fosfotransferasa, hecho que confirma la importancia de la colina libre para este órgano; esta fosforilcolina se incorpora en la lecitina en presencia de CTP. Estudios sobre la biosíntesis de lecitina en hígado y en la vesícula biliar (1) indican que el tipo de ácido polienoico determina la síntesis de lecitina o fosfatidiletanolamina; y dentro de la lecitina existe un marcaje diverso en lecitinas con ácido linoleico o con ácido araquidónico. Esto nos indujo a pensar que se podría alterar la distribución de los ácidos polienoicos de los fosfátidos al suministrar colina, cuando se estudia el efecto de los ácidos linoleico y linolénico —administrados esta vez conjuntamente, y no por separado— sobre ratas alimentadas con dieta carente de grasa.

Material y métodos

Se emplearon ratas macho Sprague Dawley, de 4 a 6 semanas de edad. La dieta carente de grasa que reciben está compuesta por caseína, azúcar y sales en diversas proporciones según el peso de los animales (2); semanalmente reciben un suplemento de vitaminas A, B_c, D y E.

Se hicieron tres lotes de 15 animales: el lote I recibió a partir de la tercera semana un suplemento diario de 75 mg de linoleato de etilo y 75 mg de linolenato de etilo (Fa. Hoffmann-La Roche, Basilea) por vía oral.

El lote II recibió el mismo suplemento de ácidos grasos esenciales, pero la dieta grasa se enriqueció con 3 mg de colina diarios (clorhidrato de colina, p.a., de la Fa. Merck, Darmstad).

El lote III recibió exclusivamente la dieta carente de grasa, y sirvió de control.

Tres animales de cada lote se sacrificaron semanalmente; los cerebros de cada lote se homogenizaron juntos con cloroformo metanol (1/1, v/v) en un homogenizador M.S.E. (Measuring Scientific Equipment Ltd., London), se agregó cloroformo para que la proporción fuera cloroformo/metanol (2:1, v/v), y los lípidos se extrajeron con la misma proporción de disolventes, según FOLCH (3). Todas las operaciones se llevan a cabo en atmósfera de nitrógeno. Los lípidos totales se disuelven en éter etílico, y se separa el insoluble (esfingolípidos) por centrifugación. Los fosfátidos se obtienen a partir de la mezcla lipídica por cromatografía en columna de ácido silícico, eluyendo con cloroformo los lípidos neutros, y los fosfátidos con cloroformo/metanol (1:9) primero, y luego con metanol (18).

Los fosfátidos se calientan a reflujo durante tres horas con 30 volúmenes de HCl en metanol al 5 %, extrayendo los ésteres metílicos de los ácidos grasos con éter de petróleo (P.E. 30-36° C). Los ésteres grasos se analizan en un cromatógrafo de gases PYE, con detector de ionización y columna de cristal de 1,32 m de longitud, que contiene 15 % de succinato de etilenglicol (EGS) adsorbido sobre tierra de infusorios (diámetro de grano: 0,16-0,2 mm). Condiciones de la cromatografía: velocidad de flujo del argón, 60 ml/min; presión, 0,9 atm.; temperatura del evaporador, 220° C; temperatura de la columna, 165° C para los ésteres grasos totales y 185° C para los ésteres grasos polienoicos. La identificación de los picos se lleva a cabo haciendo correr un test paralelo de ésteres grasos conocidos; el método del número de carbono (17) nos ayuda a hacer una identificación tentativa de algunos ésteres polienoicos; se calcula la cantidad de ésteres grasos por triangulación, dando la concentración en porcentaje del área. Dado que sólo se trata de investigar cambios en la concentración y no en la composición absoluta de los ácidos grasos, nos pareció este método apropiado.

El fraccionamiento de los ácidos grasos según el número de dobles enlaces, la cromatografía de gases preparativa, así como las ozonizaciones oxidativa y reductiva se llevaron a cabo siguiendo métodos indicados en un trabajo anterior (14).

Resultados

El tipo de dieta ejerce una influencia sobre el aumento de peso: éste es mayor en el lote I (dieta carente con suplemento de ácidos esenciales), y menor en el lote III (dieta carente). El lote control presenta síntomas acusados de deficiencia grasa; éstos desaparecen paulatinamente en los lotes I y II, pero no del todo.

La composición de los ácidos grasos que forman parte de los fosfátidos cerebrales se indica en la tabla I.

Los aldehídos de 16 y 18 átomos de carbono aumentan en el curso de la experiencia.

No se presentan cambios esenciales en los ácidos saturados, mirístico (14:0), palmítico (16:0) y esteárico (18:0), salvo en el lote I, donde disminuye el palmítico.

Los ácidos monoenoicos permanecen constantes en los lotes I y III; en el lote II, además de encontrarse en mayor proporción que en los otros dos, aumentan a lo largo de las cinco semanas. En comparación con otros órganos, se encuentra una mayor proporción de ácido eicosamonoenoico en el cerebro.

No se advierte acumulación de ácidos linoleico y linolénico en los lotes I y II, a pesar de las grandes cantidades ingeridas, y en el lote III no se encuentran prácticamente.

Debido al lento metabolismo del cerebro tarda en acumularse ácido eicosatrienoico — procedente del oleico (8) — en los animales que reciben la dieta grasa, y tampoco se altera demasiado su proporción en los que reciben el suplemento de ácidos esenciales.

El nivel de ácido araquidónico disminuye en el lote control; en los otros dos se incrementa durante las tres primeras semanas de recibir el suplemento de ácidos esenciales, disminuyendo a continuación. No se encuentra ácido eicosapentaenoico,

Tabla I. *Composición de los ácidos grasos que forman parte de los fosfátidos del cerebro (% del total de ésteres metílicos), obtenida por cromatografía de gases.*

Grupo I: con suplemento de ácidos linólico y linolénico, sin colina. Grupo II: con suplemento de ácidos linólico y linolénico, con colina. Grupo III: dieta carente de grasa, sin colina.

Ester graso	GRUPO I					GRUPO II					GRUPO III				
	Semanas					Semanas					Semanas				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
14 : 0	0,2	0,3	0,3	0,4	0,3	0,8	0,4	0,4	0,3	0,7	0,9	0,4	0,9	0,3	0,4
16 al [a]	0,9	0,9	1,0	2,4	2,5	2,4	2,5	2,5	1,3	1,7	0,6	1,9	2,0	0,8	2,0
16 : 0	20,5	19,9	13,3	9,4	11,9	19,4	18,7	17,8	19,1	16,9	19,2	13,9	15,8	17,2	24,1
16 : 1	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7	1,2	1,2	1,3	1,7	1,7	1,1	1,0	0,9	1,2	1,0
18 al [a]	2,1	1,7	2,7	3,6	3,5	2,3	1,9	2,7	1,5	2,2	0,4	2,4	2,7	1,3	1,5
18 : 0	22,9	21,3	24,6	24,5	23,5	22,5	20,5	21,1	22,4	22,2	21,8	22,9	21,3	22,1	25,9
18 : 1	22,7	26,2	26,0	21,5	23,2	28,7	23,5	25,8	30,6	30,8	31,1	25,2	25,8	26,1	32,0
18 : 2	0,9	0,5	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5	0,3	0,5	0,5	—	—	—	—	—
18 : 3	1,1	0,4	0,4	0,5	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	—	—	—	—	—	—
20 : 1	1,7	1,7	2,6	2,6	2,4	3,0	2,5	1,8	1,8	2,5	2,0	2,3	2,4	3,8	2,4
20 : 3 [b]	0,4	0,5	0,5	0,4	0,3	0,4	0,3	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,7	0,7	0,8
20 . 3 [c]	0,1	0,3	0,6	0,4	0,3	0,4	0,3	0,1	0,3	0,3	0,2	0,1	—	—	—
20 : 4	7,7	7,3	10,9	10,8	9,9	12,3	9,3	9,0	7,3	8,1	8,2	9,3	10,1	9,4	5,5
22 : 4	1,1	1,2	2,7	2,5	2,3	2,8	2,6	1,6	2,4	2,3	0,8	1,7	2,4	2,3	1,2
22 : 5	—	1,0	1,2	1,0	1,3	1,0	1,1	0,4	0,1	0,7	—	—	—	—	—
22 : 6	11,9	9,3	14,9	19,3	17,6	16,0	15,8	14,6	10,4	10,2	11,8	16,8	10,8	11,6	5,1

[a] Identificados como aldehídos saturados de 16 y 18 átomos de carbono; [b] Δ-5,8,11-$C_{20:3}$; [c] Δ-8,11,14-$C_{20:3}$.

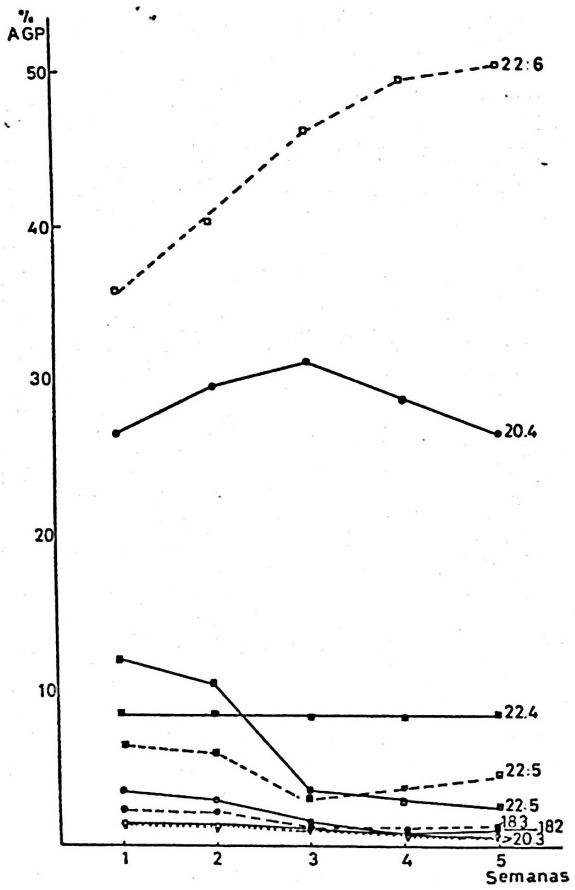

Fig. 1. *Efecto de los ácidos linoleico y linolénico de la dieta sobre la composición de los ácidos grasos polienoicos (AGP) de los fosfátidos en cerebro de ratas mantenidas a dieta carente de grasa.*

Datos obtenidos a partir de la cromatografía de gases de los ésteres polienoicos.

Tabla II. *Composición de los ácidos dicarboxílicos —ozonolisis oxidativa— y de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas (DNFH) de los aldehídos —ozonolisis reductiva— del ácido eicosamonoenoico procedente de los lotes I y II reunidos, y del lote III, expresada en tanto por ciento.*

Lote	Ac. dicarboxílicos			DFNH	
	C_9	C_{11}	C_{13}	C_7	C_9
I + II	5.9	89,2	5,1	6,2	92,7
III	9,0	78,1	12,4	16,9	82,7

pero sí algo de ácido docosapentaenoico, ambos de la serie del linolénico, si bien en menor proporción en el lote II. En el lote III no se presentan estos dos ácidos.

El nivel de ácido docosahexaenoico —de la serie del linolénico— es igual al principio en los lotes I y III, ascendiendo seguidamente en el lote I y descendiendo en el lote III. En cambio, el lote II presenta un nivel más elevado de este ácido, que disminuye ligeramente a lo largo de la experiencia.

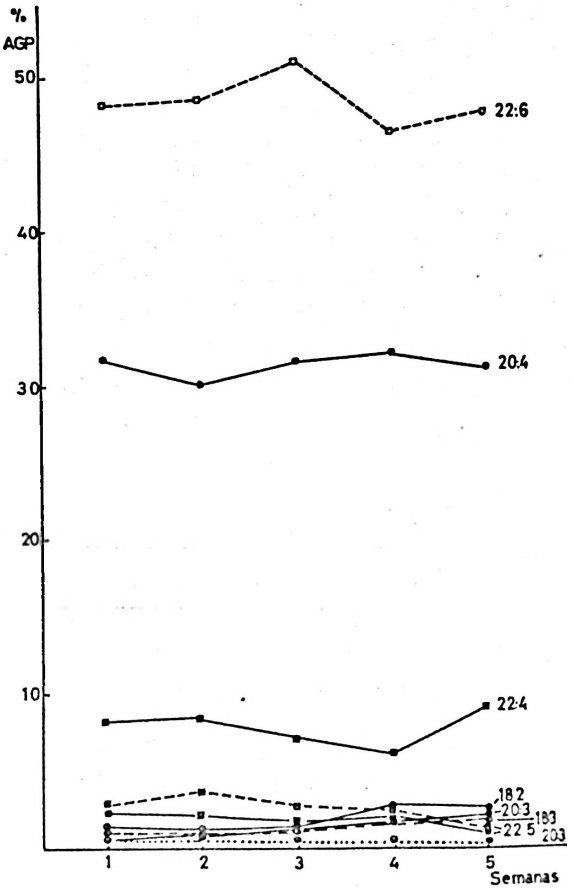

Fig. 2. *Efecto de los ácidos linoleico y linolénico de la dieta sobre la composición de los ácidos grasos polienoicos (AGP) de los fosfátidos en cerebro de ratas mantenidas a dieta carente de grasa, con un suplemento diario de colina.*

Datos obtenidos a partir de la cromatografía de gases de los ésteres polienoicos.

Los ácidos grasos se fraccionaron por medio de la cromatografía en columna de los aductos de mercurio de sus ésteres.

Los ácidos monoenoicos de los lotes I y II por una parte, y del lote III por la otra, se fraccionaron por cromatografía de gases preparativa obteniendo 93 mg de ácido oleico y 10 mg de ácido eicosamonoenoico a partir de 140 mg de ácidos de los lotes I + II, y 26 mg de ácido oleico y 5 mg de ácido eicosamonoenoico a partir de 50 mg del lote III. El ácido eicosamonoenoico de ambos lotes se sometió a ozonolisis oxidativa y reductiva, cuyos resultados se indican en la tabla II. A partir de estos datos vemos que en ambos grupos este ácido es un $\Delta 11\text{-}C_{20:1}$, con pequeñas cantidades (aproximadamente un 5 %) de $\Delta 13\text{-}C_{20:1}$, de la serie del ácido palmitoleico. En ambos grupos se encuentra una cantidad apreciable de ácido oleico, que da lugar a un incremento en el porcentaje de ácido azelaico y de la dinitrofenilhidrazona del nonanal.

Los ésteres grasos polienoicos se analizaron por cromatografía de gases (figuras 1 y 2).

Discusión

Existe una íntima relación entre la composición de ácidos grasos de los fosfátidos y la de la dieta. Cuando ésta carece de ácidos grasos esenciales, se presenta un síndrome característico, de gravedad creciente, cuyos síntomas externos son principalmente el rabo necrótico y pies escamosos; indicadores químicos de esta carencia son los cambios en la composición de los ácidos grasos polienoicos, observada hasta ahora principalmente en hígado y corazón. El ácido linoleico de la dieta se convierte en ácido araquidónico (15) y en ácido docosapentaenoico (12), no pudiendo ser sintetizado *de novo* en el organismo de mamíferos. Esta síntesis de ácidos polienoicos a partir del ácido linoleico sigue el siguiente camino:

$$18{:}2 \longrightarrow 18{:}3\omega6 \longrightarrow 20{:}3\omega6 \longrightarrow 20{:}4 \longrightarrow 22{:}4\omega6 \longrightarrow 22{:}5\omega6$$

El ácido linolénico de la dieta se convierte en ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentanoico y docosahexaenoico (8) a través del siguiente camino:

$$18{:}3\omega3 \longrightarrow 18{:}4\omega3 \longrightarrow 20{:}4\omega3 \longrightarrow 20{:}5 \longrightarrow 22{:}5\omega3 \longrightarrow 22{:}6$$

En ausencia de ácidos grasos esenciales se sintetiza ácido eicosatrienoico, a partir del ácido oleico (4), y se incorpora en cantidades apreciables en los órganos anteriormente mencionados. Sin embargo, esta sustitución no satisface plenamente las condiciones exigidas a estos ácidos grasos, y se presenta el cuadro de deficiencia.

Entre los ácidos polienoicos predominan generalmente los procedentes del ácido linólico, cuya cadena alquílica a partir del doble enlace es de 6 átomos de carbono. La distancia que media entre el primer doble enlace y el grupo carboxílico no es muy grande, de tal modo que un alargamiento de la cadena implica la introducción de uno o dos dobles enlaces, con el fin de mantener las propiedades fisicoquímicas de la membrana.

Los cambios originados en la composición de los ácidos polienoicos de los fosfátidos cerebrales a lo largo de la experiencia muestran que en este tejido se pueden detectar las transformaciones de los ácidos linoleico y linolénico ingeridos, así como el efecto de la colina, si bien con un cierto retraso con respecto a otros órganos, por ejemplo, hígado y corazón.

Si consideramos los ácidos polienoicos de un modo global, estudiando por una parte la serie a la que pertenecen (fig. 3) y la longitud de cadena por la otra (fig. 4), vemos que los ácidos linoleico y linolénico de la dieta dan lugar a una disminución de ácidos de la serie del oleico, mientras que se incrementa la proporción de sus derivados (series ω6 y ω3). En los animales que no reciben colina, esta incorporación

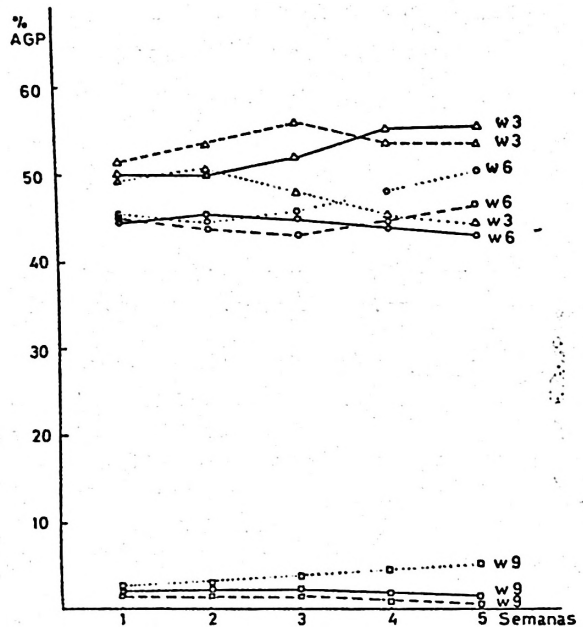

Fig. 3. *Distribución de los ácidos grasos polienoicos (AGP) según la serie a que pertenecen en los lotes I (—), II (---) y III (...).* Datos obtenidos a partir de la cromatografía de gases de los ésteres polienoicos.

de ácidos derivados del linoleico y linolénico se realiza paralelamente en las primeras semanas; a partir de la tercera semana se muestra una preferencia por ácidos ω3 (que se encuentran en este órgano en proporción superior a los del linoleico, a diferencia de otros órganos), indicando una inhibición de la síntesis o incorporación de ácidos derivados del linoleico. MOHRHAUER y HOLMAN (11) encuentran en cerebro de rata doble cantidad de ácido araquidónico a consecuencia de la administración de ácido linoleico a los animales; dado que esto no se presenta en ninguno de los dos lotes, deducimos una inhibición por parte del ácido linolénico o sus derivados.

Los ácidos derivados del oleico se encuentran en menor cantidad desde el principio de la experiencia en el lote que recibe colina (fig. 3): en este grupo son los ácidos derivados del linoleico los que inhiben la incorporación de ácidos ω3 al final de la experiencia.

Los ácidos polienoicos del cerebro pueden ser sintetizados en otros órganos y ser transportados posteriormente al cerebro, o bien los ácidos esenciales ingeridos atraviesan directamente la barrera, y una vez incorporados, se convierten en ácidos superiores. De todos modos, un miembro de cada serie tiene que poder atravesar la barrera torrente circulatorio-cerebro, que permanece infranqueable para el acetato y otras moléculas pequeñas. En la figura 4 observamos que los dos lotes presentan diferencias en la acilación de ácidos de 18 átomos de carbono; dada la preferencia de la lecitina por el ácido linoleico con respecto al araquidónico (1), suponemos que son los ácidos linoleico y linolénico los que atraviesan la barrera, con lo que se puede explicar la acumulación ligera de ácidos

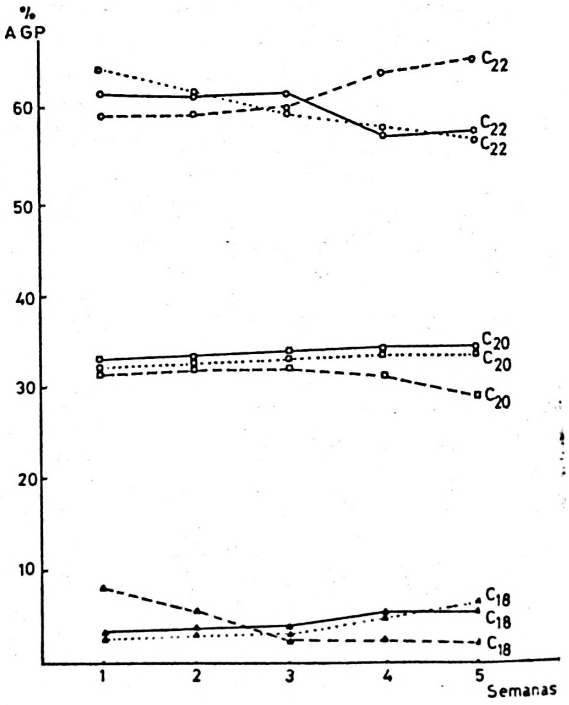

Fig. 4. *Distribución de los ácidos grasos polienoicos (AGP) según la longitud de cadena en los lotes I (—), II (---) y III (...).* Datos obtenidos a partir de la cromatografía de gases de los ésteres polienoicos.

de 18 átomos de carbono en el lote II.

Cuando la dieta contiene una cantidad de linolenato igual o mayor a la de linoleato, se inhibe la incorporación de éste y de sus derivados en los fosfátidos, y ambos impiden la incorporación de ácido eicosatrienoico. MOHRHAUER (11) sugiere la existencia de un solo sistema enzimático responsable de las conservaciones de los ácidos oleico, linoleico y linolénico en sus derivados superiores, con afinidad creciente con el número de dobles enlaces: linolénico > linoleico > oleico. En este caso tendrían que obtenerse resultados semejantes en los dos lotes, cosa que no ocurre. Por ello suponemos que esta discriminación no se realiza a la altura de dicho sistema enzimático, sino a la del sistema acilante en los fosfátidos.

Resumen

Cantidades iguales de linoleato y linolenato de etilo se administraron conjuntamente a ratas mantenidas con una dieta carente de grasa; un grupo de animales recibió un suplemento adicional de colina. Se analizó la composición de los ácidos grasos de los fosfátidos cerebrales por cromatografía en fase gaseosa. El ácido linolénico de la dieta inhibe la incorporación del ácido linoleico y sus derivados en los fosfátidos. La colina favorece la incorporación de linoleico y de ácidos de 22 átomos de carbono en dichos lípidos. En el cerebro de ratas carentes de grasa se encuentra ácido eicosatrienoico, y disminuye al suministrar los ácidos esenciales; en las ratas que reciben colina se encuentra en menor cantidad desde el principio.

Bibliografía

1. BALINT, J. A., BEELER, D. A., TREBLE, D. H. y SPITZER, H. L.: *J. Lipid Res.*, **8**, 487, 1967.
2. BURR, G. O. y BURR, M. M.: *J. Biol. Chem.*, **82**, 345, 1929.
3. FOLCH, J., LEE, M. y SLOANE, S.: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497, 1957.
4. FULCO, A. J. y MEAD, J. F.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 1411, 1959.
5. KLENK, E.: En «Metabolism of the Nervous System», editado por Richter, D. Pergamon Press, Londres, 1957, p. 296.
6. KLENK, E.: En «Drugs affecting Lipid Metabolism», editado por Garatti, S. y Paoletti, R., Elsevier, Amsterdam, 1961, p. 21.
7. KLENK, E. y KREMER, G.: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, **320**, 111, 1960.
8. KLENK, E. y PFLÜGER, H.: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.*, **335**, 53, 1963.
9. MEAD, J. F.: En «Drugs affecting Lipid Metabolism», editado por Garatti, S. y Paoletti, R., Elsevier, Amsterdam, 1961, p. 16.
10. MIYAMOTO, K., STEPHANIDES, L. M. y BERNSOHN, J.: *J. Neurochem.*, **14**, 227, 1967.
11. MOHRHAUER, H. y HOLMAN, R. T.: *J. Neurochem.*, **10**, 523, 1963.
12. MOHRHAUER, H. y HOLMAN, R. T.: *Acta Chem. Scand.*, **17**, 84, 1963.
13. NICHOLAS, H. J. y THOMAS, B. E.: *J. Neurochem.*, **4**, 42, 1959.
14. RIVERA, M.ª E.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 245, 1970.
15. STEINBERG, G., SLATON, W. H., HOWTON, D. R. y MEAD, J. F.: *J. Biol. Chem.*, **220**, 257, 1956.
16. WAELSCH, H., SPERRY, W. M. y STOYANOFF, V. A.: *J. Biol. Chem.*, **131**, 281, 1940.
17. WOODFORD, I. P. y VAN GENT, C. M.: *J. Lipid. Res.*, **1**, 188, 1960.
18. ZÖLLNER, N. y EBERHAGEN, D.: «Untersuchung und Bestimmung der Lipoide im Blut», Springer-Verlag, Berlin, 1965, p. 46.