

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS DOCTORAL

**Composición y metabolismo de especies moleculares de  
fosfatidilcolinas durante el desarrollo embrionario del  
encéfalo de aves**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**José Manuel González Ros**

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5310028002

Dp-1725

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID

T 577.125.53  
GON  
COM

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

COMPOSICION Y METABOLISMO  
DE ESPECIES MOLECULARES  
DE FOSFATIDILCOLINAS  
DURANTE EL DESARROLLO  
EMBRIONARIO DEL ENCEFALO  
DE AVES.

TESIS DOCTORAL

por

JOSE MANUEL GONZALEZ ROS



R. 26.729

El presente trabajo se ha llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica de esta Facultad, bajo la dirección del Profesor Dr. D. Antonio Ribera Blancafort, a quien expreso mi agradecimiento por todo cuanto ha aportado para mi formación, tanto en el plano científico como en el personal.

También quiero destacar la ayuda recibida de mi esposa, demás familiares y compañeros de trabajo, quienes con sus sugerencias y estímulos, han hecho posible la realización de cuanto aquí se expone.

DP 115

INDICE

	<u>Pag.</u>
1. INTRODUCCION .....	1
1.1. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS FOSFOGLICERIDOS .....	2
1.1.1. Variabilidad estructural de los fosfoglicéridos: especies moleculares .....	2
1.1.2. Función biológica: importancia de las especies moleculares .....	6
1.1.2.1. Fosfoglicéridos como constituyentes de biomembranas .....	7
1.1.2.2. Fosfoglicéridos en relación con fenómenos de transporte a través de membranas .....	9
1.1.2.3. Fosfoglicéridos en relación con fenómenos de activación de sistemas enzimáticos y/o de transporte .....	11
1.2. METABOLISMO DE FOSFOGLICERIDOS EN ANIMALES SUPERIORES: ACTIVIDAD DEL ENCEFALO EN RELACION CON LA SINTESIS DE ESPECIES MOLECULARES .....	14
1.2.1. Biosíntesis "de novo" .....	16
1.2.2. Intercambio de bases nitrogenadas .....	24
1.2.3. Ciclo de desacilación-acilación .....	27
1.2.4. Otras rutas de biosíntesis .....	32
1.2.5. Papel de la barrera hematoencefálica en la incorporación de precursores .....	35
1.3. COMPOSICION LIPIDICA DEL ENCEFALO EN ANIMALES SUPERIORES .....	42
1.3.1. Contenido lipidico del encéfalo total .....	42
1.3.1.1. Lípidos neutros .....	44
1.3.1.2. Fosfoglicéridos .....	46
1.3.1.3. Esfingolípidos .....	53

1.3.2.	Contenido lipídico en distintas fracciones subcelulares .....	55
1.3.3.	Contenido lipídico en distintos tipos celulares .....	60
1.3.4.	Influencias de la dieta .....	62
1.4.	ANÁLISIS DE ESPECIES MOLECULARES .....	67
1.4.1.	Distribución posicional de las cadenas apolares .....	67
1.4.2.	Resolución de especies moleculares .....	68
1.4.2.1.	Cromatografía de argentación .....	68
1.4.2.2.	Hidrólisis enzimáticas .....	71
1.4.2.3.	Metodologías .....	75
2.	MATERIALES Y METODOS .....	79
2.1.	REACTIVOS .....	80
2.2.	MATERIAL BIOLÓGICO .....	82
2.3.	PREPARACION DEL SISTEMA DE INCORPORACION "IN VITRO" DE PRECURSORES RADIOACTIVOS .....	84
2.3.1.	Preparación de homogeneizados .....	84
2.3.2.	Valoración de proteínas .....	84
2.3.3.	Preparación de los medios de incubación ....	85
2.4.	AISLAMIENTO DE LIPIDOS TOTALES .....	87
2.5.	METODOS CROMATOGRÁFICOS .....	89
2.5.1.	Cromatografía en capa fina de ácido silícico	89
2.5.1.1.	Preparación de las placas .....	89
2.5.1.2.	Sistemas cromatográficos utilizados	89
2.5.1.3.	Reveladores .....	90
2.5.1.4.	Análisis cuantitativo de fosfolípidos .....	91

2.5.1.5. Fraccionamiento de lípidos totales	93
2.5.2. Cromatografía de argentación	94
2.5.2.1. Fraccionamiento de fosfatidilcolinas	95
2.5.2.2. Fraccionamiento de 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol	95
2.5.3. Cromatografía de gases	97
2.6. HIDROLISIS ENZIMATICAS	98
2.6.1. Hidrólisis de fosfatidilcolinas con fosfolipasa A <sub>2</sub> (EC. 3.1.1.4)	98
2.6.2. Hidrólisis de fosfatidilcolinas con fosfolipasa C (EC. 3.1.4.3)	99
2.6.3. Hidrólisis de 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol con lipasa pancreática (EC. 3.1.1.3)	99
2.7. MEDIDA DE LA RADIOACTIVIDAD	101
2.8. OTROS METODOS ANALITICOS	102
2.8.1. Obtención de esteres metílicos de los ácidos grasos	102
2.8.2. Preparación de los 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol	102
3. RESULTADOS Y DISCUSION	104
3.1. CRITICA DE LA METODOLOGIA	105
3.1.1. Acetilación de 1,2-diacil-sn-glicerol	105
3.1.2. Fraccionamiento de los 3-acetil-1,2-diacil-sn-glicerol	106
3.1.3. Fraccionamiento de fosfatidilcolinas	107
3.2. COMPOSICION LIPIDICA GENERAL DEL ENCEFALO EMBRIONARIO Y VITULO NUTRITIVO	109
3.3. DISTRIBUCION POSICIONAL DE LOS RESTOS DE ACILO EN FOSFATIDILCOLINAS	126

3.4. ESPECIES MOLECULARES DE FOSFATIDILCOLINAS .....	134
3.5. INCORPORACION DE ACIDO PALMITICO-1- <sup>14</sup> C .....	156
3.5.1. Elección de las condiciones experimentales y estudio de la incorporación .....	156
3.5.2. Distribución posicional de la radioactividad en fosfatidilcolinas .....	165
3.5.3. Incorporación a especies moleculares de fosfatidilcolinas .....	167
3.5.4. Efecto del Ca <sup>++</sup> sobre la incorporación .....	176
3.5.5. Ciclo de desacilación-acilación .....	179
4. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	184
5. BIBLIOGRAFIA .....	189

ABREVIATURAS UTILIZADAS.-

Ac. DG	3-acetil-1,2-diacil-sn-gliceroles (acetatos de diglicéridos).
DG	Diacilgliceroles (diglicéridos).
EC	Esteres de colesterol.
FFA	Acidos grasos libres.
l-PC	Liso-fosfatidilcolinas (liso-lecitinas).
MG	Monoacilgliceroles (monoglicéridos).
PC	Fosfatidilcolinas (lecitinas).
PE	Fosfatidiletanolaminas.
PL	Fosfolípidos totales.
TG	Triacilgliceroles (triglicéridos).
14:0	Acido mirístico.
16:0	Acido palmítico.
16:1	Acido palmitoléico.
18:0	Acido esteárico.
18:1	Acido oléico.
18:2	Acido linoléico.
18:3	Acido linolénico.
20:1	Acido eicosamonoenólico.
20:4	Acido araquidónico.
22:4	Acido docosatetraenólico.
22:5	Acido docosapentaenólico.
22:6	Acido docosaheptaenólico.
24:0	Acido nervónico.

## INTRODUCCION

## 1.1. ESTRUCTURA Y FUNCION DE LOS FOSFOGLICERIDOS.

### 1.1.1. VARIABILIDAD ESTRUCTURAL DE LOS FOSFOGLICERIDOS: ESPECIES MOLECULARES.-

La totalidad de los fosfoglicéridos aislados a partir de materiales biológicos son derivados del L- $\alpha$ -glicerofosfato (Baer y Buchnea, 1.959) o sn-glicerol-3-fosfato (Hirschmann, 1.960), sin que haya en la actualidad evidencia alguna acerca de la existencia de enantiómeros que presenten el resto fosfato unido a la posición sn-2 del glicerol.

Desde un punto de vista estructural, el miembro más sencillo de la familia de los fosfoglicéridos, es el ácido fosfatídico (ácido 1,2-diacil-3-sn-glicerofosfórico) que, aunque detectado en muy pequeñas cantidades, ha demostrado ser un intermediario muy activo en la síntesis de otros fosfoglicéridos y glicéridos en general.

Sobre la base del término ácido fosfatídico, se nombran en la actualidad, de manera sencilla, el resto de los fosfoglicéridos. Así, la lecitina, fosfoglicérido mayoritario de casi todos los materiales biológicos estudiados, se nombra como fosfatidilcolina (1,2-diacil-3-sn-glicerofosforilcolina).

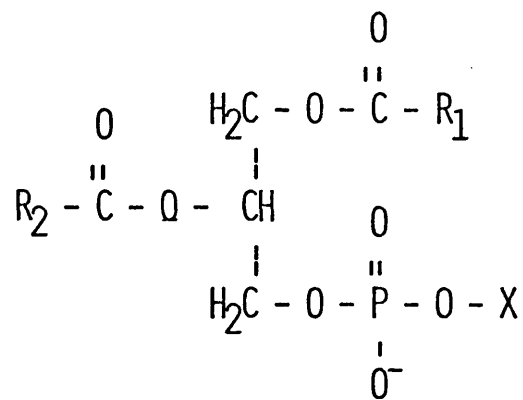
Además de estos fosfoglicéridos, que poseen colina como componente estructural, se han podido detectar otros con N-mono- y N,N-dimetiletanolamina, habiéndose demostrado que son intermediarios en la conversión de otro fosfoglicérido importante, la fosfatidiletanolamina (1,2-diacil-3-sn-glicerofosforiletanolamina), en fosfatidilcolina.

La fosfatidilserina (1,2-diacil-3-sn-glicerofosforilserina), fue el primer fosfoglicérido natural en que se pudo constatar la

presencia de aminoácidos como componentes estructurales. Posteriormente, se pudieron detectar otros hidroxiaminoácidos jugando este mismo papel en fosfoglicéridos minoritarios como fosfatidiltreonina o fosfatidilhidroxiprolina. Los aminoácidos también han podido detectarse, en células procarióticas, formando uniones ester con el grupo hidroxilo primario de otro fosfoglicérido de interés que es el fosfatidilglicerol (1,2-diacil-3-sn-glicerofosforilglicerol). Estos enlaces ester también pueden formarse entre el fosfatidilglicerol y el ácido ortofosfórico, para dar lugar a la formación de fosfatidilglicero-fosfato, intermedio en la síntesis de cardiolipina (di-fosfatidilglicerol), especialmente abundante en membranas mitocondriales.

Otros polialcoholes, además del glicerol, pueden esterificar al ácido fosfatídico. Este es el caso del inositol, polialcohol cíclico, que da lugar de este modo, a la formación de fosfatidilinositol, alguno de cuyos grupos hidroxilo libres pueden fosforilarse, para originar así una serie de derivados que se nombran como mono-, di- o tri-fosfoinosítidos, componentes lipídicos importantes del tejido nervioso en general.

La enumeración que se ha hecho de los tipos de fosfoglicéridos principales (figura 1), aunque no es exhaustiva, parece suficiente para dejar constancia de la gran variabilidad que se presenta considerando tan sólo, la naturaleza de los grupos polares constituyentes. Estas posibilidades de variación estructural, evidentemente, se multiplican por un factor considerable, cuando se toma en consideración la variabilidad que pueden presentar las cadenas apolares unidas a las posiciones sn-1 y sn-2 del glicerol. Este elemento de variabilidad, se refiere tanto a la naturaleza misma de la cadena apolar (longitud, número y posición de las insaturaciones, etc.), como a su localización sobre una u otra de las posiciones del glicerol, como al tipo de enlace que mantiene esta unión, ya que se ha podido demostrar, que el enlace ester no es el único que mantiene unidos a estos componentes estructurales, sino que, especialmente en tejidos



$\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  = RESTOS DE ACILO

$\text{X}$  = H

*ACIDO FOSFATIDICO*

=  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$

*FOSFATIDILCOLINA*

*o LECITINA*

=  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$

*FOSFATIDILETANOLAMINA*

=  $-\text{CH}_2-\underset{\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{NH}_2$

*FOSFATIDILSERINA*

= (MIO) INOSITOL

*FOSFATIDIL-MIO-INOSITOL*

*o MONOFOSFOINOSITIDO*

FIGURA 1: ESTRUCTURA DE FOSFOGLICERIDOS NATURALES

animales, se presentan también uniones éter, tanto en posición sn-1, como en sn-2, como en ambas, originando así toda una colección de alquil- y alquenil-derivados de todos los fosfoglicéridos anteriormente citados, entre los que destacan, desde un punto de vista cuantitativo, los llamados plasmalógenos, que presentan una cadena apolar unida a la posición sn-1 del glicerol por un enlace éter  $\alpha$ ,  $\beta$  -insaturado.

Por todo lo comentado anteriormente, en la actualidad no se puede considerar a cada tipo de fosfoglicérido, como por ejemplo la fosfatidilcolina, como una entidad química única, sino más bien, como una familia de especies moleculares afines entre sí, que tienen en común el grupo polar (colina o etanolamina, etc.) y que varían con respecto a la naturaleza de sus restos apolares, de modo que éstos, en función de su variabilidad, confieren propiedades fisicoquímicas distintas a cada una de las especies moleculares que forman parte de estas familias.

A la gran diversidad estructural mostrada por los fosfoglicéridos, subyace una característica general de singular trascendencia biológica que será tratada con más profundidad en el apartado correspondiente: todas estas moléculas tienen un carácter anfífilo muy acentuado, esto es, incluyen una zona polar, constituida por un grupo iónico o fuertemente polarizado, y una región apolar, más extensa, constituida por las dos cadenas hidrocarbonadas.

Las técnicas que habitualmente se utilizan para el aislamiento y purificación de los fosfoglicéridos, rinden la mezcla de especies moleculares, como un producto totalmente homogéneo. Es por ello, que la determinación de estas entidades químicas, sólo ha sido viable desde la introducción en la metodología lipídica de una técnica de elevado poder resolutivo, que es la cromatografía de argentación (Morris, 1.966). Mediante esta técnica, es posible fraccionar mezclas complejas de moléculas muy similares, en función del número y clase de enlaces múltiples que estas contengan. De esta forma, se ha podido dilucidar

la constitución en especies moleculares de fosfoglicéridos aislados de materiales biológicos diversos (Montfoort et al., 1.971) y la información así obtenida ha confirmado la idea anteriormente expuesta de que los fosfoglicéridos naturales, con independencia del tipo de estructura al que respondan, se encuentran en la naturaleza en forma de mezclas de especies moleculares.

Las variaciones en la composición de especies moleculares de un fosfoglicérido dado, no son sólo función de la especie biológica a partir de la cual se haya aislado, sino que dentro de un mismo organismo, existen diferencias según el tejido o localización subcelular considerados e incluso con el momento del desarrollo en que estudiemos el material biológico en cuestión (Montfoort et al., 1.971; Abad, 1.974; González Ros, 1.974; Abad et al., 1.976). Ello parece indicar que la constitución molecular de un fosfoglicérido dado, es reflejo de distintas capacidades biosintéticas que se ponen en juego en los diferentes niveles de organización biológica y en los diferentes estadios del desarrollo ontogénico.

Todo lo anterior, al tiempo que hace patente unas características composicionales en términos de estructura química y de localización biológica, plantea el problema de como se consigue la necesaria especificidad metabólica que conduce, para un tipo dado de fosfoglicérido, a una mezcla concreta de entidades moleculares y como a su vez, se alcanzan resultados distintos en diferentes sitios o en diferentes momentos de la vida de un mismo organismo, tejido o célula.

#### 1.1.2. FUNCION BIOLÓGICA: IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES MOLECULARES.-

La trascendencia biológica de los fosfoglicéridos, viene dada por la existencia, dentro de la misma molécula, de dos zonas bien diferenciadas, esto es, una zona polar, constituida

por un grupo de carácter iónico o al menos fuertemente polarizado, y otra zona apolar, más extensa, constituida por las cadenas hidrocarbonadas de los restos de acilo.

La coexistencia de estas dos zonas tan marcadamente distintas, capacita a estas moléculas para una amplia gama de modos de interacción con el resto de las moléculas biológicas, fundamentalmente con proteínas, por medio de interacciones iónicas o dipolares, y con otros lípidos, por medio de interacciones apolares o hidrófobas. Esta variedad de tipos de interacción se traduce en la formación de agregados supramoleculares, como son las membranas biológicas, y en la intervención de varios fosfolípidos en la activación de sistemas enzimáticos. Estas dos vertientes de importancia de los fosfolípidos, vienen a ser en realidad una misma cosa por cuanto que la disposición de los mismos en el seno de las membranas, permite la creación de una verdadera fase no-acuosa, que establece una discontinuidad en el medio acuoso general de la célula y que parece ser del todo necesario para la actividad de proteínas de membrana diversas, asociadas a fenómenos catalíticos o de transporte.

#### 1.1.2.1. Fosfoglicéridos como constituyentes de biomembranas.--

Las proteínas de membrana, incluyen una gran variedad de moléculas, para algunas de las cuales se han asignado funcionalidades concretas. Entre ellas, hay un gran número de enzimas, algunas de las cuales son comunes a todas las membranas, mientras que otras son específicas de algún tipo en particular, de modo que se puede afirmar que las diferencias exhibidas por distintos tipos de membranas son debidas en principio, a la clase y abundancia relativa de estas proteínas biológicamente activas. Aquellas proteínas de membranas para las cuales no se han asignado funciones bioquímicas concretas, suelen recibir el nombre de proteínas estructurales, siendo esta denominación equívoca, ya que en muchos casos, puede tratarse de una proteína activa que se ha desnaturalizado durante el proceso de

aislamiento (Rega et al., 1.967). En este sentido, Schatz y Saltzgaber (1.969) demostraron que aproximadamente el 35 % de las proteínas estructurales aisladas de membrana interna mitocondrial, se correspondían con una ATP-asa desnaturalizada. Estos mismos autores, dan una relación de proteínas estructurales a lípidos de 0,65.

Extrayendo los lípidos de la membrana, las proteínas estructurales forman agregados bastante inestables, que tienden a disociarse en presencia de detergentes (Zahler, 1.968), dando lugar a la aparición de pequeñas unidades protéicas de peso molecular entre 10.000 y 40.000 (Zahler, 1.968) que muestran una alta afinidad, más o menos específica, por determinados tipos lipídicos.

El análisis de los aminoácidos integrantes de una gran variedad de proteínas de membrana, muestra que los residuos polares y los apolares, se presentan aproximadamente en igual porcentaje (Vandenhoevel, 1.971). Este hecho, sumado al desconocimiento actual acerca de la estructura terciaria de estas proteínas, hace que no se pueda predecir que tipo de interacciones, hidrofílicas o hidrofóbicas, son las que, de modo mayoritario llevan a cabo la asociación con los lípidos polares de las membranas. En este sentido, se han podido detectar asociaciones de una y otra índole. Por ejemplo, la unión de la monoaminooxidasa (Oreland y Olivecrona, 1.971) o de la hexoquinasa (Wilson, 1.973) a la membrana, viene dada por enlaces de tipo iónico con fosfolípidos, quedando ambas enzimas unidas a la interfase. De otro lado, una terpeno-fosfoquinasa (C<sub>55</sub>-isoprenoide alcohol fosfoquinasa) está incluida en el interior de la bicapa, uniéndose a ésta por uniones hidrofóbicas.

En cuanto a los lípidos de membrana se refiere, podemos encontrar a todos los niveles (especies, géneros, familias, tipos celulares, orgánulos subcelulares, etc.) diferencias más o menos acusadas, tanto en clases lipídicas, como en especies moleculares dentro de una clase dada, estando relacionadas

estas diferencias en composición lipídica, con diferencias en las propiedades de las membranas. pese a esta diversidad, la inmensa mayoría de los lípidos de membrana (excluyendo al colesterol) presentan una característica en común: la de ser anfífilos, lo cual les faculta para llevar a cabo la formación de sistemas micelares o lamelares, cuando se les dispersa en un medio acuoso (Gitler, 1.971).

Aún cuando la disposición espacial recíproca de lípidos y proteínas en las membranas, diste mucho de ser conocida con precisión, parece claro que la bicapa lipídica es un ingrediente importante de las mismas (Butter et al., 1.970 a y b; Steim et al., 1.969; Singer, 1.971; Wilkins et al., 1.971; Finean et al., 1.972; Gitler, 1.972), al menos, en forma de extensas regiones discontinuas interrumpidas por moléculas protéicas (Branton, 1.969; Finean et al., 1.971; Gitler, 1.972). En este sentido, cabe destacar que los fosfolípidos, y muy especialmente los fosfoglicéridos, suponen una fracción muy apreciable del peso de las mismas y debe considerarseles pues como formadores de esa bicapa lipídica que estabiliza el agregado molecular que es la membrana y que proporciona una interfase apolar dentro del entorno acuoso de la célula. Como norma general, se puede afirmar que la bicapa lipídica da cuenta en membranas celulares o de orgánulos subcelulares, de al menos un 70 % de la superficie total (Fourcans y Jain, 1.974).

#### 1.1.2.2. Fosfoglicéridos en relación con fenómenos de transporte a través de membranas.-

El paso de sustancias diversas a través de estructuras como las biomembranas, se presenta influenciado por los fosfolípidos que las constituyen, tanto cuando consideramos mecanismos de difusión simple como mecanismos de difusión facilitada o de transporte activo (Van Deenen, 1.965; Fourcans y Jain, 1.974). En este sentido, se ha podido detectar el paso entre dos compartimentos acuosos, separados por una bicapa lipídica, tanto de

aniones como de cationes, mono y divalentes, gracias a la formación previa de sales liposolubles con los fosfolípidos de la bicapa, mostrando este fenómeno, una cierta especificidad entre el tipo de fosfolípido y el tipo de ión al que se une: fosfolípidos ácidos, en cerebro, con cationes (Folch et al., 1.957), fosfatidilserina preferentemente con  $K^+$  (Solomon et al., 1.956), lecitinas, en tiroides, con  $I^-$  (Vilkki, 1.962), ácido fosfatídico con  $Na^+$ , en la expulsión activa de dicho ion (Hokin y Hokin, 1.963), etc.

También se ha podido detectar la formación de complejos entre fosfolípidos y aminoácidos (Tria y Barnabei, 1.963), o azúcares (Benson, 1.963), a expensas de ATP en el transporte activo de estas sustancias al interior celular, habiéndose llegado a postular modelos, que adjudican el papel de transportadores a determinadas moléculas lipídicas (Benson, 1.963).

La influencia que ejerce en este sentido la constitución en cadenas apolares de un fosfoglicérido dado, ha podido estudiarse con algún detalle, utilizando sistemas modelo como monocapas, bicapas y liposomas de composición conocida, que guardan, dada la abundancia de los fosfoglicéridos en las biomembranas y su preferente disposición molecular dentro de las mismas, un cierto grado de correspondencia entre sus propiedades y las que presentan aquellas entidades citológicas (Thompson y Henn, 1.969). Así, utilizando liposomas producidos a partir de especies moleculares puras de lecitinas, ha podido demostrarse que el aumento de la longitud de la cadena, reduce la velocidad de penetración de solutos no iónicos (Demel et al., 1.968; De Gier et al., 1.968; Inohue, 1.974). Los liposomas a base de lecitinas con dos cadenas poliinsaturadas son altamente permeables, mientras que aquellos en que se combinan cadenas de, por ejemplo, palmítico y oléico, presentan una permeabilidad intermedia y los constituidos por lecitinas saturadas (dipalmitoil o diestearoil) originan estructuras excesivamente rígidas e impermeables. El efecto de la presencia o no presencia de coles-

terol, también se ha estudiado, observandose que disminuye siempre el flujo como consecuencia del mayor empaquetamiento que origina en los componentes de la bicapa.

Este tipo de información, sugiere que la difusión de sustancias a través de una bicapa lipídica, depende en gran medida, del grado de empaquetamiento y movilidad térmica de las cadenas apolares, o en otras palabras, de su naturaleza química y de la temperatura del medio. Aunque la situación en las biomembranas sea, indudablemente más compleja, resulta satisfactorio comprobar que aquellas especies moleculares que conducen a sistemas modelo con propiedades extremas de permeabilidad a temperatura fisiológica, son precisamente las que se hayan ausentes en los fosfoglicéridos naturales (por ejemplo, 18:0/18:0, 18:2/18:2, 18:2/20:4, etc.). Por otra parte, una extrapolación de las conclusiones anteriores a sistemas "in vivo" viene parcialmente avalada por la concordancia entre los resultados obtenidos con modelos y los correspondientes a sistemas naturales sencillos, como *Acheloplasma laidlawii* (Engelman, 1.972; De Kruiff et al., 1.973; McElhaney et al., 1.973).

#### 1.1.2.3. Fosfoglicéridos en relación con fenómenos de activación de sistemas enzimáticos y/o de transporte.-

El papel de los fosfoglicéridos en las biomembranas, no se reduce, tan sólo, a determinar una estructura supramolecular de orden físico, con unas propiedades de barrera relativamente sencillas, sino que, a causa de la organización molecular de este tipo de sustancias, se constituye en el seno de la membrana, una verdadera fase no acuosa en la que pueden ocurrir de manera preferente, y a veces exclusiva, determinado tipo de reacciones.

La existencia de sistemas enzimáticos y/o de transporte que requieren la presencia de lípidos para llevar a cabo su actividad, es un fenómeno cuyo conocimiento ha aumentado considerablemente, desde que Fleischer et al. (1.962) lo describieron.

ra para algunas etapas de la cadena mitocondrial transportadora de electrones. Estos autores, encontraron que la extracción de los lípidos de una preparación con actividad enzimática, daba lugar a la inactivación de varios miembros de la cadena de transporte electrónico, recuperándose la actividad normal, cuando se añadan lípidos totales mitocondriales o fosfolípidos insaturados en general.

Hasta la fecha, se han descrito requerimientos de este tipo, para varias docenas de sistemas enzimáticos, habiendo sido este tema revisado recientemente (Fourcans y Jain, 1.974). La desactivación de este tipo de sistemas catalíticos y/o de transporte se realiza por los distintos autores, bien extrayendo los lípidos de modo más o menos exhaustivo (disolventes orgánicos, detergentes, etc.), o bien, sometiendo al material biológico objeto de estudio a una acción combinada de fosfolipasas A y C. La reactivación, se consigue añadiendo lípidos totales o algún tipo lipídico en particular, según que el requerimiento sea más o menos específico. En cualquier caso, la proporción molar entre los lípidos añadidos y la porción de apoproteína que consigue recuperar el nivel de actividad inicial, es generalmente muy alta. La única excepción conocida a esta regla, es la de la málico-deshidrogenasa (Tobari, 1.964), que requiere tan solo cantidades equimoleculares para su activación. Este tipo de información, parece apuntar hacia la posibilidad de que determinados tipos lipídicos, jueguen el papel de cofactores de los sistemas enzimáticos en cuestión.

El requerimiento lipídico, en ocasiones, se muestra como muy poco específico, mientras que otras veces la especificidad es muy elevada, como sucede con el caso de la lipoproteína-lipasa (Chung et al., 1.973), que puede activarse por distintos fosfolípidos y por distintas especies moleculares de un fosfolípido dado, mostrando la actividad alcanzada en cada caso, un claro orden de gradación, tanto por lo que concierne al tipo de fosfolípido (fosfatidilcolina > fosfatidiletanolamina > fos-

fatidilserina), como a la especie molecular utilizada.

En general, se puede pensar que los fosfolípidos, ejercen su influencia en este mantenimiento de la actividad de las enzimas ligadas a membrana, bien como componentes estructurales de las mismas enzimas, o bien, como propiciadores de un medio hidrofóbico idóneo que, en ocasiones, se encargaría de estabilizar una conformación activa de las proteínas, o de favorecer la reacción, simplemente aumentando en el interior de la bicapa la concentración del sustrato por disolución en microfase, de aquellos que sean hidrofóbicos.

Todo lo anterior, viene a resaltar la importante influencia que sobre el control de las propiedades de membrana ejercen, singularmente, los fosfoglicéridos que la componen, siendo destacable en relación con el presente trabajo, el efecto que, sobre diversos funcionalismos, ejerce la naturaleza de las cadenas apolares que integran estos fosfoglicéridos, esto es, la constitución de los mismos en términos de especies moleculares.

1.2. METABOLISMO DE FOSFOGLICERIDOS EN ANIMALES SUPERIORES:  
ACTIVIDAD DEL ENCEFALO EN RELACION CON LA SINTESIS DE  
ESPECIES MOLECULARES.-

La biosíntesis de fosfoglicéridos ha sido objeto de detalladas investigaciones de las que ha surgido un esquema general de reacciones acopladas capaz de interpretar, al menos en sus rasgos generales, la génesis de los diferentes tipos de aquellos que se encuentran en los materiales biológicos. En la figura 2, se muestran las principales rutas de biosíntesis de lecitinas. El eje central de dicho esquema lo constituye la llamada ruta de Kennedy, en la que el sn-glicerol-3-fosfato, obtenido tras la actuación de la glicerol-quinasa, experimenta dos acilaciones sucesivas que conducen a la formación de ácido fosfatídico, el cual por defosforilación rinde un 1,2-sn-diacilglicerol que supone un punto en común entre la biosíntesis de triacilgliceroles por un lado y de fosfoglicéridos por otro. A éste intermediario le es transferido un resto de fosforilcolina, a partir del donador CDP-colina, con producción final de lecitina. En esta secuencia de reacciones, los "pools" de liso-fosfatídico, fosfatídico y 1,2-diacil-sn-gliceroles así obtenidos, podrían ver aumentada su diversidad por la actuación de una serie de rutas metabólicas adyacentes, como por ejemplo, la acilación de dihidroxiacetona-fosfato con posterior reducción del derivado monoacilado, la fosforilación de mono o diacilgliceroles preexistentes o la hidrólisis, por la acción de lipasas o fosfolipasas tipo C, de moléculas tales como los triacilgliceroles o los fosfoglicéridos mismos.

Otras posibilidades de síntesis, suponen la transformación en lecitinas de fosfoglicéridos estructuralmente afines, tales como la fosfatidiletanolamina o fosfatidilserina, o la operación

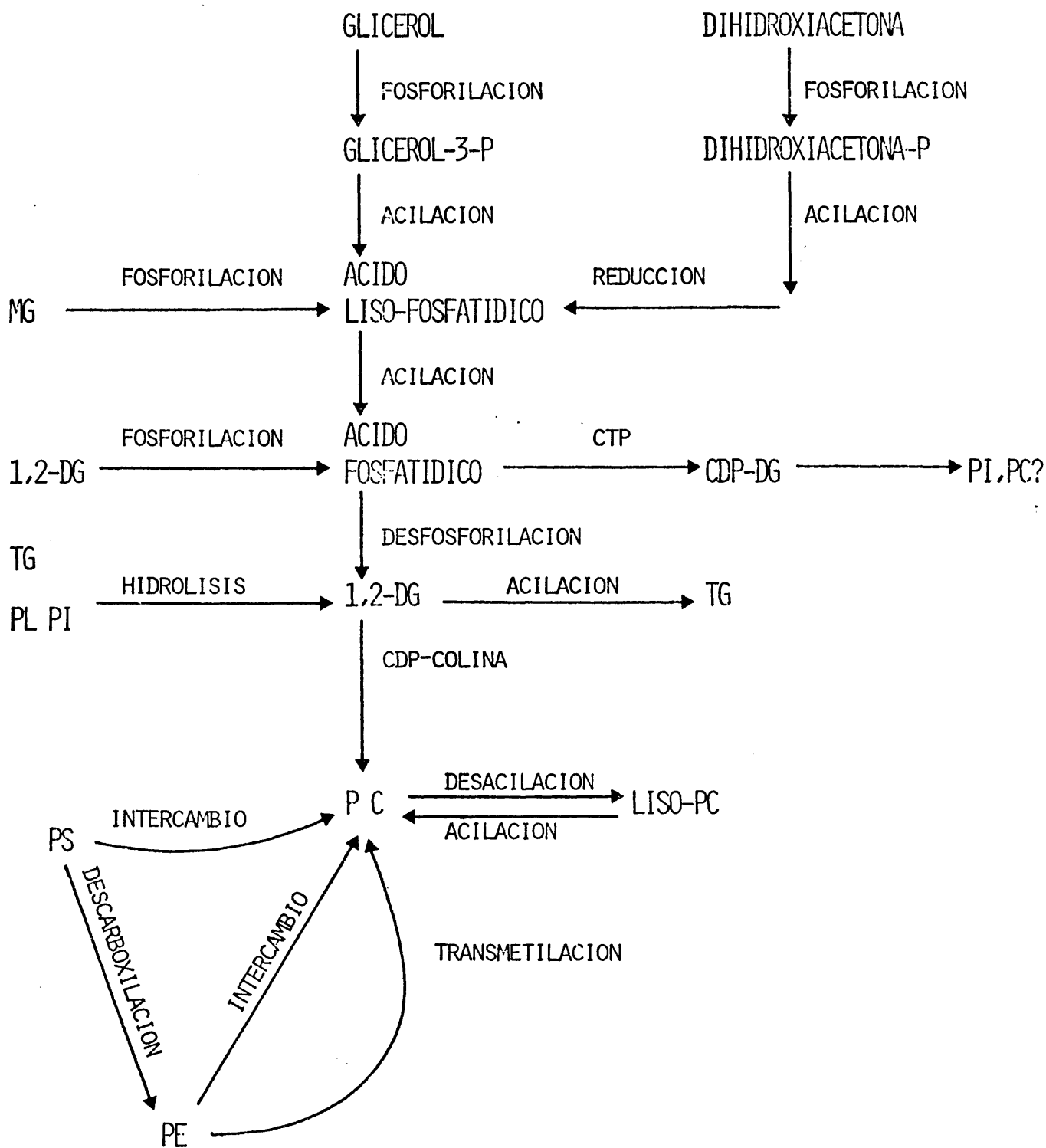


FIGURA 2: PRINCIPALES RUTAS DE BIOSINTESIS DE LECITINAS

de mecanismos que implican un intercambio de bases.

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto en muchos tejidos de animales superiores la existencia de actividades fosfolipásicas  $A_1$  y  $A_2$ , que suministran, a expensas del fosfoglicérido completo, los lisoderivados correspondientes, que a su vez pueden ser reaclilados de manera específica o pueden sufrir, entre dos de ellos, reacciones de transacilación, contribuyendo así a determinar la composición en especies moleculares del fosfoglicérido de partida.

En otras palabras, parece ser que algunas de las especies moleculares que constituyen las lecitinas, se obtienen directamente por síntesis "de novo", mientras que otras, presumiblemente las más insaturadas, se forman en gran medida por reconstrucción de moléculas preexistentes. Esta generalización, aunque quizás excesivamente amplia, viene siendo utilizada habitualmente como hipótesis inicial de trabajo, por todos los grupos de investigadores que se ocupan del tema, a falta de una confirmación más exhaustiva a todos los niveles de organización biológicos. A continuación pasaremos a describir con detalle cada una de las rutas metabólicas mencionadas anteriormente subrayando lo que se sabe de ellas en relación con la biosíntesis de especies moleculares de lecitinas, principalmente en el encéfalo de los animales superiores, objeto de nuestros estudios.

#### 1.2.1. BIOSÍNTESIS "DE NOVO".-

La primera etapa en la biosíntesis "de novo", según se ha reflejado en la figura 2, consiste en la fosforilación por ATP de la molécula de glicerol, para dar 3-sn-glicerolfosfato. La existencia de la glicerol-quinasa correspondiente (EC. 2.7.1.30) ha sido demostrada recientemente (Jenkins y Hajra, 1.976) en encéfalo de rata, siendo la fracción mitocondrial, la que exhibe

una mayor actividad, muy por encima de las que presentan la fracción soluble y la sinaptosómica. Esta glicerol-quinasa mitocondrial, cataliza además, la fosforilación por ATP de dihidroxiacetona a dihidroxiacetona-fosfato, aunque, dado que la  $K_M$  para el glicerol es muy inferior a la de la dihidroxiacetona, se supone que "in vivo", la fosforilación de ésta última, debe estar inhibida.

La existencia de esta glicerol-quinasa, puede resultar muy conveniente para el metabolismo general de los glicerolípidos en el encéfalo, por cuanto que supone una reutilización del glicerol endógeno libre procedente del catabolismo de moléculas preexistentes, habida cuenta de que el transporte del glicerol exógeno, desde el torrente circulatorio sanguíneo, no está facilitado por la barrera hematoencefálica (Crone, 1.965).

La doble acilación del 3-sn-glicerolfosfato para rendir ácido fosfatídico, es la siguiente etapa global de la ruta metabólica descrita por Kennedy (1.957) y Kennedy y Weiss (1.956) para la biosíntesis de lecitinas. En este tipo de moléculas, así como en todos los fosfoglicéridos en general, es bien conocida la especificidad estructural que presentan por lo que se refiere a la distribución asimétrica de los ácidos grasos entre las dos posiciones del resto glicerol. Ahora bien, ¿es la acilación del 3-sn-glicerolfosfato a ácido fosfatídico la etapa metabólica encargada de proporcionar esta asimetría estructural?. Varios grupos de investigadores (Possmayer et al., 1.969; Hill et al., 1.968; Akesson et al., 1.970 y 1.970 a; Akesson, 1.970) han demostrado que son las especies moleculares monoénicas y dienóicas las que se ven principalmente afectadas por esta secuencia de reacciones, no apareciendo apenas en el medio de incubación, especies de 4 ó 6 dobles enlaces. El palmitoil-Co A parece ser el donador más activo, mucho más que el estearoil-Co A, del resto de acilo a la posición sn-1 del glicerol, mientras que la posición sn-2 parece ser ocupada

preferentemente por ácidos grasos monoénicos o dienicos, aunque se ha demostrado también que la especificidad de esta acilación del 1-acil-3-sn-glicerofosfato está íntimamente relacionada con la concentración de liso-fosfatídico, de modo que a concentraciones altas, se utiliza como donador del acilo cualquier acil-Co A derivado (Okuyama y Lands, 1.972).

Utilizando fracciones subcelulares tanto de bacterias (Van den Bosch y Vagelos, 1.970), como de animales superiores (Lamb y Fallon, 1.970) se han podido detectar por separado las dos acilaciones, con la consiguiente acumulación del producto intermedio monoacilado. Nachbaur et al. (1.971) dan cuenta de que el producto final de la acilación es el ácido fosfatídico cuando se utilizan fracciones microsomales de hígado, pero resulta ser liso-fosfatídico cuando la incubación se lleva a cabo con membranas mitocondriales externas. Aunque se han hecho varios intentos para separar los sistemas enzimáticos responsables de estas dos acilaciones, solo recientemente se han podido obtener ambas actividades por separado (Monroy et al., 1.973).

En cuanto al orden en que se llevan a cabo las dos acilaciones, Okuyama et al., (1.971) midiendo la velocidad de acilación de los dos posibles liso-fosfatídicos llegan a la conclusión de que, en primer lugar se acila la posición sn-1 del glicerol, con ácidos grasos saturados, haciendolo a continuación la sn-2, con ácidos grasos mono y diinsaturados principalmente. Otros autores (Akesson et al., 1.970), utilizando ácido palmítico tritiado como precursor han estimado que en hígado de rata, el máximo de incorporación a ácido fosfatídico se alcanza al cabo de tan solo 10 - 30 segundos, necesitando 30 - 60 segundos para alcanzar este máximo en diacilgliceroles. La enzima que cataliza esta conversión de ácido fosfatídico a diacilgliceroles (fosfatidato fosfohidrolasa EC. 3.1.3.4), está localizada en la fracción soluble, y parece exhibir alguna selectividad con respecto al sustrato (Mitchell et al., 1.971) aunque en este punto, no hay un total

acuerdo, ya que la composición en ácidos grasos de diacilgliceroles o triacilgliceroles, parecen obedecer a una utilización aleatoria de todo el "pool" de ácido fosfatídico (Akesson et al., 1.970 a; Hill et al., 1.968 a).

La síntesis de fosfatidilcolinas o fosfatidiletanolaminas a partir del ácido fosfatídico, parece poder transcurrir por dos caminos alternativos: 1) por mediación de los sn-1,2-diacilgliceroles a los que se les transferiría la base nitrogenada correspondiente a partir del CDP-derivado de ésta, o 2) a través de la formación de CDP-diglicéridos a partir de ácido fosfatídico y CTP. Esta segunda posibilidad parece prevalecer en células procarióticas, aunque también se ha detectado en preparaciones "in vitro" de cerebro de rata y será discutida más adelante. En cuanto a la primera posibilidad (ácido fosfatídico citidil-transferasa mitocondrial) tampoco parece haber acuerdo unánime sobre la posible existencia de especificidad en la utilización de especies moleculares de diacilgliceroles para la síntesis de los distintos fosfoglicéridos, existiendo en la bibliografía tanto datos a favor (Van Golde et al., 1.969; Kanoh, 1.969 y 1.970; Holub et al., 1.971), como en contra (Kukis y Marai, 1.967; Mudd et al., 1.969; De Kruyff et al., 1.970; Devor y Mudd, 1.971) de esta posibilidad. Dentro de esta diversidad de datos, aparentemente contradictorios, lo que si se acepta universalmente, es la utilización estadística del "pool" de sn-1,2-diacilgliceroles, para la síntesis de triacilgliceroles (Akesson et al., 1.970), y la utilización selectiva de especies hexaenóicas de sn-1,2-diacilgliceroles, para la síntesis de especies hexaenóicas de fosfatidil-etanolaminas (Kanoh, 1.970).

Por lo que concierne al encéfalo de animales superiores, se ha demostrado ampliamente la existencia de una síntesis "de novo" de fosfoglicéridos, aunque aún no se ha aclarado suficientemente de que especies moleculares da cuenta esta ruta biosintética. La utilización de glicerol (Brauning y Gercken,

1.976; O'Brien y Geison, 1.974; Benjamins y McKhann, 1.973; Yavin y Menkes, 1.974) o 3-sn-glicerofosfato (Carey, 1.975; Lands y Hart, 1.965 a; Jenkins y Hajra, 1.976) para dar lugar a ácido fosfatídico ha sido solidamente demostrada tanto "in vivo" como "in vitro". Las enzimas responsables parecen localizarse en la fracción microsomal (Kuwahara, 1.972; Jenkins y Hajra, 1.976) y utilizan como donadores del acilo a derivados de la Co A (Jenkins y Hajra, 1.976).

Tanto las acil-Co A sintetasas como la sn-glicerol-3-fosfato acil transferasa muestran en su actividad una estrecha dependencia con el estado de desarrollo del encéfalo, aumentando principalmente en los períodos de mielinización más activa, que coincide con los 5 - 30 días de edad en el conejo (Carey, 1.975).

Al utilizar glicerol o 3-sn-glicerofosfato como precursores, la radioactividad se incorpora exclusivamente al resto glicerol de los fosfoglicéridos resultantes, mientras que utilizando otros como glucosa, se marcan también los restos de acilo (Brauning y Gercken, 1.976), debido a la degradación de ésta hasta acetato y a la posterior síntesis "de novo" de varios ácidos grasos, principalmente, palmítico, esteárico y oléico (Dhopeswarkar y Subramanian, 1.971).

Dada la elevada actividad de fosfatidato-fosfohidrolasa que presenta el encéfalo (Schacht y Agranoff, 1.973) se detecta un paso muy rápido del marcaje por ácido fosfatídico (20 - 30 seg.) y sn-1,2-diglicéridos, que llegan a alcanzar actividades específicas muy elevadas y que actúan a continuación como precursores de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, triglicéridos y fosfatidilinositol principalmente. Las enzimas responsables de éste último paso, ácido fosfatídico: citidil transferasas se han detectado en fracciones mitocondriales (Cotman et al., 1.971).

La ruta de Kennedy también ha sido estudiada mediante la incorporación de distintos tipos de ácidos grasos (Sun y Horro-

oks, 1.971; Yau y Sun, 1.973 y 1.974; Sun y Yau, 1.976) principalmente palmítico, esteárico, oléico, linoléico y araquidónico, teniendo todos ellos una vida média de aproximadamente 5 mín. y pudiendose observar, en todos los casos, un paso de la radioactividad muy rápido por ácido fosfatídico y sn-1,2-diglicéridos, con relaciones tipo precursor - producto, para rendir finalmente fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y triglicéridos, con distintas actividades específicas en cada caso. En cualquiera de los fosfoglicéridos sinsetizados, los ácidos grasos saturados se presentan sobre todo en posición sn-1, mientras que el ácido araquidónico lo hace sobre la sn-2 y el oléico y linoléico indistintamente sobre una u otra (Baker y Thompson, 1.972).

Con ácido araquidónico como precursor se registra una mayor incorporación a fosfatidilinositol y fosfatidilcolina, siendo el elevado marcaje de ésta última sorprendente, dados los bajos niveles de araquidónico que presenta (Sun y Horrocks, 1.968). La velocidad de incorporación de este ácido graso a fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, resulta ser aproximadamente la misma y distinta a su vez, a la de fosfatidilinositol o triglicéridos, lo cual sugiere la existencia de otras rutas metabólicas para éstos últimos compuestos, que deben implicar a los CDP-diglicéridos como intermediarios, en el caso del fosfatidilinositol, y a estados metabólicos muy particulares para los triglicéridos, ya que éstos parece ser que se localizan, de forma casi exclusiva, a nivel de los plexos coroides (Marinetti et al., 1.971). En estas incorporaciones de ácido araquidónico no se detectó actividad alguna en plasmalógenos de etanolamina, pese al elevado contenido que presentan de éste ácido graso.

A nivel subcelular, son los microsomas y sinaptosomas (y no la fracción soluble ni la mielina) los encargados de llevar a cabo éstas incorporaciones, siendo los sinaptosomas especialmente importantes en la incorporación de araquidónico a

fosfatidilinositol (Sun y Yau, 1.976) y de oléico a fosfatidiletanolamina.

Con ácido palmítico como precursor, plasmalógenos y fosfatidilserinas, permanecen sin marcar, obteniéndose a tiempos cortos una actividad específica en triglicéridos muy superior a la de los fosfoglicéridos en general, aunque a medida que transcurre el tiempo, la relación se va invirtiendo por lo que hay que suponer un recambio bastante efectivo de los triglicéridos que daría lugar probablemente a la existencia de varios "pools" de diglicéridos (Yau y Sun, 1.973).

Con ácido oléico, "in vivo", se obtiene una alta incorporación a triglicéridos, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas, después de registrar el paso de la radioactividad por ácido fosfatídico y sn-1,2-diglicéridos. La actividad específica del ácido fosfatídico resulta ser notablemente superior a la de los sn-1,2-diglicéridos, por lo que se piensa en la posibilidad de varios "pools" de ácido fosfatídico con una actuación selectiva de la fosfatídico-fosfohidrolasa (Sun y Horrocks, 1.971) o en la actuación de una diglicérido-quinasa que enriquecería el marcaje en fosfatídico (Hokin y Hokin, 1.959). En cuanto a la primera posibilidad, es un hecho probado, la utilización preferencial de especies moleculares de ácido fosfatídico ricas en los ácidos esteárico y araquidónico para la síntesis de fosfoinosítidos y polifosfoinosítidos, posiblemente mediada por un GDP-diglicérido intermediario (Baker y Thompson, 1.973; O'Brien y Geison, 1.974).

En cuanto al "pool" de diglicéridos (uno o varios), la situación es muy confusa, ya que, según Banschbach y Geison (1.975), habría que considerar además de a los producidos "de novo" a partir del sn-3-glicerofosfato, a aquellos procedentes de la actuación de fosfolipasas C o lipasas ligadas a membranas y aquellos que se producirían por hidrólisis de fosfoinosítidos que darían como resultados un enriquecimiento en especies moleculares de sn-1,2-diglicéridos tetraenóicas a

base de ácido esteárico en posición sn-1 y ácido araquidónico en la sn-2. (Keought et al., 1.972). En los sn-1,2-diglicéridos de cerebro de rata concretamente, esta especie molecular supone un 60% del total, mientras que en monoglicéridos o triglicéridos no está presente.

En cuanto a lo que a la toma de colina en plasma por parte del encéfalo se refiere, parece poder llevarse a cabo tanto como colina ligada a lípidos, como fosfatidilcolinas o lisofosfatidilcolinas (Ansell y Spaner, 1.971), que como colina libre (Kewitz y Pleul, 1.976). Cualquiera que sea el caso, la colina libre se utilizaría a continuación para dar lugar a la formación de fosfoglicéridos de colina o a acetilcolina. Esta doble posibilidad parece estar controlada por la distinta afinidad hacia el sustrato de los sistemas enzimáticos responsables: colina-acetil-transferasa (EC. 2.3.1.6) o colina-quinasa (EC. 2.7.1.32) de modo que a concentraciones bajas se forma exclusivamente fosforilcolina (Yavin, 1.976).

Junto con la fosforilcolina, se detectan también cantidades apreciables de CDP-colina marcada con lo que se supone que la ruta "de novo" debe representar la vía principal de acceso de colina a lecitinas (Arienti et al., 1.976; Binaglia et al., 1.973) desde un punto de vista cuantitativo, aún cuando su velocidad con relación a la de intercambio de bases nitrogenadas sea pequeña (Arienti et al., 1.976).

En cuanto a la etanolamina se ha comprobado que además de incorporarse, como CDP-etanolamina, a fosfatidiletanolamina, lo hace sobre sn-1-alquil derivados de ésta (Roberti et al., 1.975), siendo mayor la actividad de este paso en neuronas que en células de glia y presentando además una variación notable con el desarrollo del encéfalo, de modo, que dicha actividad parece relacionarse con la mielinización.

Con relación a las especies moleculares de fosfoglicéridos de que da cuenta esta biosíntesis "de novo", la información bibliográfica es muy contradictoria. Así, para Brauning

y Gercken (1.976), las especies que resultan con una actividad específica mayor tras una incorporación "in vivo" de glicerol, son las monoénicas y diénicas que presentan en combinación ácidos palmítico, esteárico y oléico, tanto en diglicéridos como en fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas. O'Brien y Geison (1.974), tras llevar a cabo incorporaciones de glicerol "in vitro" con homogeneizados totales, concluyen que no se pueden demostrar relaciones precursor - producto entre diglicéridos y fosfatidilcolinas, siendo las especies moleculares poliinsaturadas las que se sintetizan a mayor velocidad y explicando éste peculiar comportamiento sobre la base de varios hipotéticos "pools" de diglicéridos o de una actuación selectiva de la colina-fosfotransferasa. Pese a sus discrepancias, ambos autores coinciden en señalar el hecho de que las especies de sn-1,2-diglicéridos tetraénicas a base de ácido esteárico en posición sn-1 y araquidónico en la sn-2, son, pese a su abundancia en el encéfalo, las que presentan una menor actividad específica, posiblemente debida a un intenso recambio con especies tetraénicas de fosfoinosítidos (Luthra y Shelton, 1.973; Keought et al., 1.972).

### 1.2.2 INTERCAMBIO DE BASES NITROGENADAS.-

Actualmente, está demostrado que la incorporación de bases nitrogenadas a fosfoglicéridos, puede seguir, al menos dos rutas distintas en tejidos animales. La primera, ya comentada anteriormente, es la ruta de Kennedy, que supone la formación de los intermediarios, fosforilcolina y CDP-colina, para dar lugar a la formación de fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas fundamentalmente. La segunda posibilidad representa un intercambio a nivel microsomal, dependiente de iones  $Ca^{++}$ , de serina, etanolamina o colina libres con fosfolípidos endógenos no necesitándose para ello aporte energético alguno.

La existencia operacional de este intercambio de bases nitrogenadas en estructuras biológicas no relacionadas con el sistema nervioso, ha sido demostrada tanto para colina (Borkenhagen et al., 1.961; Hübscher, 1.962), como para serina (Crone, 1.967), como para etanolamina (Borkenhagen et al., 1.961; Crone, 1.967).

La rapidez del intercambio, al menos para el caso de la colina, es función de la insaturación del fosfolípido receptor (Bjerve, 1.971), pero en cualquier caso, se piensa que éste mecanismo no da lugar a una síntesis neta de lecitinas, debido a que la colina se intercambia con especies moleculares preexistentes de fosfatidilcolinas (Björnstad y Bremer, 1.966), hecho este, que justificaria en parte que la fosfatidilcolina sea uno de los fosfoglicéridos con un recambio más intenso (Ansell y Spaner, 1.971) y que daría cuenta de la superior actividad específica de las lecitinas, comparada con la fosforilcolina y CDP-colina, cuando se utiliza como precursor marcado colina libre (Björnstad y Bremer, 1.966; Treble, et al., 1.970).

El pH óptimo de actuación de los sistemas responsables del intercambio, es de 8 para la serina, 8,5 para etanolamina y 9 para colina (Kanfer, 1.972).

En hígado, ha podido demostrarse un activo intercambio de serina con fosfatidiletanolaminas, que si da lugar a una síntesis neta de fosfatidilserinas, pese a que las 2/3 partes del fosfoglicérido así sintetizado, se descarboxila para dar nuevamente fosfatidiletanolaminas (Borkenhagen et al., 1.961).

Por lo que concierne al encéfalo, se ha podido constatar en este sentido, que la fracción microsomal es mucho más activa que la mitocondrial o sinaptosómica (Porcellati et al., 1.971). El intercambio de etanolamina libre, no da lugar a una síntesis neta de fosfatidiletanolaminas, la cual se produce mayoritariamente vía CDP-base (Gaiti et al., 1.975). La serina li-

bre, por el contrario, parece poder incorporarse a fosfatidilserinas, unicamente a través de este tipo de intercambios dependientes de  $Ca^{++}$ , registrandose a continuación una descarboxilación para rendir fosfatidiletanolaminas, en tan solo un 10% de los casos (Porcellati et al., 1.971). Ambas bases nitrogenadas, serina y etanolamina, parece ser que se incorporan a los fosfoglicéridos correspondientes, debido a la acción de un único sistema enzimático, por el que exhiben un comportamiento de tipo competitivo (Porcellati et al., 1.971), que no se afecta por la presencia de colina.

La incorporación de colina libre, es mayoritaria en encéfalo por la vía CDP-base (Binaglia et al., 1.973), pero parece ser que también se lleva a cabo por intercambio de bases, tanto "in vitro" (Porcellati et al., 1.971; Gaiti et al., 1.975), como "in vivo" (Arienti et al., 1.976), aunque no faltan datos en contra de esta hipótesis (Illingworth y Portman, 1.972; Yavin, 1.976).

Las neuronas parecen ser más activas en la incorporación de colina que las células de glia (Binaglia et al., 1.977) y hay una fuerte dependencia entre la intensidad del intercambio y la concentración de colina libre. La poca importancia cuantitativa de este proceso, se relaciona de hecho con los bajos niveles de colina endógena del encéfalo (Kewitz y Pleul, 1.976).

Por lo que concierne a los fosfoglicéridos que juegan en este intercambio de bases el papel de sustratos, Gaiti et al. (1.975 y 1.976), demuestran que las fosfatidilcolinas y las fosfatidiletanolaminas participan en el intercambio con colina, etanolamina y serina, mientras que las fosfatidilserinas solo lo hacen con serina y etanolamina, siendo en cualquier caso responsable de todo ello, tan solo una pequeña parte del "pool" de fosfoglicéridos microsomales (3 - 7% del total), lo cual se interpreta como debido a la existencia de varios "pools" de fosfoglicéridos a nivel de microsomas o a la posible actua-

ción selectiva de los sistemas enzimáticos encargados del intercambio.

Pese a la relativa abundancia de datos experimentales con relación a esta ruta biosintética, se desconoce cuales sean las especies moleculares de fosfoglicéridos en general o de fosfatidilcolinas en particular que puedan verse afectadas por ella (Arienti et al., 1.976).

### 1.2.3. CICLO DE DESACILACION - ACILACION .-

Erbland y Marinetti en 1.962, dieron cuenta por vez primera, de la existencia de un ciclo de desacilación - acilación a nivel de los fosfoglicéridos, que originaba un recambio muy activo de los restos de acilo de estos. Más adelante, se pudo comprobar la existencia de una especificidad tanto por lo que concierne al sustrato de la desacilación, por parte de las fosfolipasas  $A_1$  y  $A_2$ , como por lo que se refiere a la acilación de los liso-derivados, por parte de las acil-transferasas correspondientes.

En este sentido, se ha descrito que mientras que la velocidad de acilación de 1-acil-3-sn-glicerofosfato (ruta de Kennedy) disminuye a medida que aumenta el grado de insaturación del donador de acilo correspondiente, lo contrario ocurre en la acilación de liso-lecitas (Hill y Lands, 1.968).

En hígado, la acilación de 1-acil-3-sn-glicerofosforilcolina es selectiva para el ácido araquidónico (Van den Bosch et al., 1.967; Kanoh, 1.969; Coll, 1.975), en tanto que la de 2-acil-3-sn-glicerofosforilcolina lo es para los ácidos grasos saturados, singularmente esteárico (Lands y Hart, 1.965 a; Van den Bosch et al., 1.968 y 1.969). Holub et al. (1.971) y Akesson (1.970), estiman que casi la totalidad de las especies moleculares diénicas de lecitas con ácido esteárico se pro-

ducen por una acilación directa.

Por lo que conciernen a las fosfolipasas causantes de las desacilaciones, se han descrito varios tipos, atendiendo a su procedencia biológica y al resto de acilo que separan de la molécula de fosfoglicérido inicial. Son especialmente abundantes en venenos de serpientes (*Crotalus* sp., *Naja* sp., *Vípera* sp., etc.) recibiendo el nombre de fosfolipasa  $A_2$  si hidrolizan el enlace que mantiene unido al acilo con la posición sn-2 del resto glicerol y fosfolipasa  $A_1$  si el resto de acilo afectado es el que ocupa la posición sn-1. Las fosfolipasas B son aquellas que hidrolizan de modo simultáneo las dos posiciones, aunque se ha podido comprobar en alguna ocasión (Saito y Sato, 1.968) que este tipo de actividad, responde más bien a la existencia simultánea de fosfolipasas A y liso-fosfolipasas, siendo estas últimas aquellas que utilizando como sustratos alguno de los dos posibles liso-derivados, rinden el resto de acilo y la glicerofosforil-base correspondiente.

Todas estas actividades hidrolíticas han sido detectadas en una gran variedad de tejidos de animales superiores (McMurray y Magee, 1.972; Gatz y Barenholtz, 1.973). Su especificidad, tanto frente a tipos distintos de fosfoglicéridos (McMurray y Magee, 1.972; Gatz y Barenholtz, 1.973) como frente a especies moleculares de un fosfoglicérido dado (Nutter y Privett, 1.966; Waite y Sisson, 1.971) parece ser función de la fuente biológica de origen. Recientemente, Kanoh y Akesson (1.977) demuestran la hidrólisis preferente de dipalmitoil lecitina, por parte de la fosfolipasa  $A_2$  de hepatocitos, mientras que la dilinoleoil lecitina se desacila principalmente a base de una fosfolipasa  $A_1$ .

A nivel subcelular, también se ha podido constatar una gran variabilidad. Así, la fosfolipasa  $A_2$  de mitocondrias de hígado de rata tiene una actividad dependiente de iones  $Ca^{++}$  y su pH óptimo es alcalino (Einsenberg et al., 1.968; Weglicki et al., 1.971; Waite y Sisson, 1.971) mientras que en la li-

sosomal, el pH óptimo es de aproximadamente 4, inhibiéndose ante la presencia de  $Ca^{++}$  (Stoffel y Trabert, 1.969; Fransome et al., 1.971).

En el encéfalo, se han descrito actividades simultáneas de fosfolipasas  $A_1$  y  $A_2$  en lisosomas (Cooper y Webster, 1.972; Woelk et al., 1.972) y sinaptosomas (Gullis y Rowe, 1.976), habiéndose detectado además fosfolipasa  $A_2$  en mitocondrias (Woelk et al., 1.974 y 1.976) y fosfolipasa  $A_1$  en microsomas (Woelk y Kanig, 1.974). La fosfolipasa  $A_2$  se ha descrito como una proteína termoestable, con un peso molecular aproximado de 55.000 y un pH óptimo ácido (Cooper y Webster, 1.972) mientras que la fosfolipasa  $A_1$  es termolabil, con un peso molecular de 75.000 y un pH óptimo también ácido (Woelk et al., 1.972), siendo semejantes pues a las fosfolipasas descritas en lisosomas de hígado. No obstante, se han descrito también fosfolipasas  $A_1$  y  $A_2$  con un pH óptimo de actuación ligeramente alcalino en fracción soluble (Leibovitz-Ben Gershon, 1.972).

En cualquier caso las actividades fosfolipásicas son siempre superiores en neuronas que en células de glia (Woelk y Kanig, 1.974; Woelk et al., 1.974), siendo cuantitativamente más importante la actividad de fosfolipasa  $A_1$  que la de fosfolipasa  $A_2$  (Carey, 1.975).

La fosfolipasa  $A_1$  microsomal parece tener una mayor afinidad por las fosfatidilcolinas que por fosfatidiletanolaminas o fosfatidil-serinas (Carey, 1.975; Woelk y Kanig, 1.974), siendo menos activa cuanto más insaturados son los restos de acilo en posición sn-1 (Woelk y Kanig, 1.974).

La fosfolipasa  $A_2$  mitocondrial muestra una mayor afinidad por fosfatidiletanolaminas que por fosfatidilcolinas, siendo más activa frente a moléculas que presentan ácidos oléico o linoléico en la posición sn-2 que frente a aquellas que tienen esteárico o araquidónico (Woelk et al., 1.974 y 1.976). Ambas enzimas, fosfolipasa  $A_1$  microsomal y fosfolipasa  $A_2$  mitocondrial, muestran notables incrementos de su actividad

en aquellos estados patológicos del encéfalo adulto que conllevan una activa desmielinización (Woelk y Kanig, 1.974; Woelk et al., 1.974 y 1.976).

Por lo que se refiere a la existencia de la actividad acil-transferásica, Ansell y Spaner (1.971), dieron cuenta de una acilación de liso-lecitinas plasmáticas por parte del encéfalo. Un año más tarde, en 1.972, Illingworth y Portman, demuestran que las liso-lecitinas, constituyentes normales del plasma sanguíneo, que se transporta complejada con albúmina y que debe resultar de la actividad de lecitina:colesterol acil-transferasa en plasma, es tomada por el cerebro y acilada en su mayor parte, singularmente con ácido araquidónico, estando este proceso de "captura" relacionado con la incapacidad del cerebro para sintetizar colina "de novo".

Baker y Thompson (1.972), creen más importante la entrada de ácido araquidónico a fosfatidilcolina y fosfatidilinositol, por acilación directa de los sn-1-estearoil lisoderivados que por biosíntesis "de novo", coincidiendo en sus afirmaciones con Brauning y Gercken (1.976) que demuestran además la incorporación por acilación directa, de ácido palmítico a dipalmitoil lecitina, relacionando este comportamiento metabólico distinto de las sn-1,2-dipalmitoil lecitina y 1-estearoil,2-araquidonoil lecitina, con sus distintas localizaciones subcelulares: la primera en terminaciones nerviosas y la segunda en membranas mitocondriales (Hill et al., 1.968). La acilación directa por ácido palmítico de sn-2-acil lisoderivados, demuestra ser en cerebro adulto, superior incluso a la acilación del sn-3-glicerofosfato, cuando se incuban fracciones microsomales en ausencia de sn-3-glicerofosfato exógeno (Carey, 1.975).

Natarajan y Sastry (1.974), postulan la existencia de acil-transferasas específicas que serían responsables de las diferencias composicionales de los sn-1-alquil, sn-1-alquenil y sn-1,2-diacil glicerofosforiletanolaminas, introduciendo

restos de acilo poliinsaturados y de cadena larga en posición sn-2, siendo la acilación dependiente de ATP y Co A. Estos mismos autores dan cuenta de un marcado paralelismo entre la elevación de la actividad de las acil-transferasas, el incremento en los niveles de plasmalógenos de etanolamina y la fase activa de mielinización, todo ello ocurriendo en períodos inmediatamente postnatales de la vida del animal.

Las enzimas responsables de la acilación de liso-leciti-  
nas han sido detectadas en membranas plasmáticas, mitocondrias y microsomas (Stahl y Trams, 1.968; Stein et al., 1.968; Sarszala et al., 1.970; Wright y Green, 1.971).

Gullis y Rowe (1.976) dan cuenta de una gran estimulación del ciclo de desacilación - acilación en membranas sinápticas, causada por la presencia de neurotransmisores (acetil-colina, noradrenalina, GABA, histamina, dopamina, 5-hidróxitriptamina, etc.). Dicha estimulación parece originarse a través de la alteración de los niveles de nucleosidos-monofosfato cíclicos, tales como el AMP<sub>C</sub> o el GMP<sub>C</sub> (Gullis y Rowe, 1.975).

La existencia de liso-fosfolipasas (sn-1-acil o sn-2-acil hidrolasas) también ha sido probada en encéfalo, localizándose su actividad principalmente en las fracciones microsomal y soluble (Leibovitz-Ben Gershon y Gatt, 1.968; Leibovitz-Ben Gershon et al., 1.972). Utilizan como sustratos preferentemente liso-fosfatidil-colinas o liso-fosfatidiletanolaminas y tienen un pH óptimo alcalino. Dichas enzimas, se presentan en experiencias "in vitro" como aparentemente muy activas (mucho más que las fosfolipasas A), siendo esto relacionado por algunos autores con la liberación de ácidos grasos libres que se produce en períodos de isquemia o con la producción de colina libre en el encéfalo, que se originaría a partir de la sn-3-glicerofosforilcolina, producto de la actividad liso-fosfolipásica, tras la actuación de una sn-3-glicerofosforilcolina-diestearasa (Leibovitz-Ben Gershon y Gatt, 1.968).

La existencia, probada anteriormente, de una especifici-

dad en los sistemas de acil-transferasas del encéfalo junto con la operatividad de las fosfolipasas, también selectivas, nos lleva a considerar a estas, no sólo como un conjunto de enzimas degradativas, sino como un importante eslabón metabólico para entender los procesos de regulación y biosíntesis de los fosfoglicéridos. Ahora bien, de los datos anteriormente expuestos, parece desprenderse la idea de que el ciclo de desacilación - acilación que quedaría así constituido, no presenta una actividad constante a lo largo de la vida del animal, sino que más bien, dicha actividad vendría condicionada por estados fisiológicos o patológicos perfectamente localizados en el tiempo.

#### 1.2.4. OTRAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS.-

La biosíntesis de fosfatidilcolinas a partir de moléculas preexistentes de fosfatidiletanolaminas, por transmetilación con S-adenosil metionina, ha sido comprobada en hígado (Bremer y Greenberg, 1.959; Bremer et al., 1.960; Bremer y Greenberg, 1.961) y pulmón (Morgan, 1.969), llegando a aislarse los N-metil y N,N-dimetil derivados (Bremer y Greenberg, 1.959; Morgan, 1.969) y estableciéndose que la primera metilación, constituye un paso limitante (Bremer y Greenberg, 1.961). Otros autores, han llegado a demostrar una clara relación entre esta ruta y la biosíntesis de especies moleculares de lecitinas poliinsaturadas, singularmente, de aquellas que contienen ácido docosahexenóico (Balint et al., 1.967; Lyman et al., 1.967; Arvidson, 1.968 a y b; Kanoh, 1.969; Tinoco et al., 1.970; Trehwella y Collins, 1.973). La transmetilación de fosfatidiletanolaminas, muestra además, una curiosa dependencia con el sexo de los animales de experimentación, siendo mucho más activa en las hembras (Lyman et al., 1.967). Contrariamente a lo que ocurre en los órganos anteriormente citados,

en el encéfalo ha podido comprobarse la inoperatividad de esta ruta biosintética, tanto en lo que concierne a las metilaciones sucesivas de moléculas preexistentes de fosfatidiletanolaminas (Marshall et al., 1.965; Ansell y Spanner, 1.967; Ansell y Spanner, 1.971), como por lo que se refiere a la transmetilación de etanolamina libre (Ansell y Spanner, 1.971), aunque, en este último punto, no parece existir acuerdo entre los distintos autores (Kewitz y Pleul, 1.976).

A partir de ácido fosfatídico y CTP, se ha podido detectar, en microsomas de hígado de cobaya (Carter y Kennedy, 1.966) y en mitocondrias de cerebro de pollo (Petzold y Agranoff, 1.967) y rata (Gatt y Barenholtz, 1.973), la formación de CDP-diglicéridos, reacción esta, que prevalece en células procarióticas sobre la desfosforilación de ácido fosfatídico (Gatt y Barenholtz, 1.973). Dicha conversión, es dudoso que afecte a la biosíntesis de lecitinas, pero parece estar relacionada con la de fosfatidilserinas y sobre todo, fosfatidilinositoles (Petzold y Agranoff, 1.967; Sun y Horrocks, 1.971), siendo tanto más eficaz cuanto mayor sea la insaturación del ácido fosfatídico precursor (Petzold y Agranoff, 1.967; McMurray y Magee, 1.972). La formación de CDP-diglicéridos, parece estimularse por la presencia de CTP y ácido fosfatídico e inhibirse por palmitoil-Co A.

La conversión de dihidroxiacetona-fosfato a ácido lisofosfatídico, con la consiguiente acilación y reducción del derivado monoacilado de aquella con nucleótidos de piridina, ha sido probada en hígado (Rao et al., 1.968; Lands, 1.970; Agranoff y Hajra, 1.971), mostrando una acusada especificidad por palmitoil-Co A. Este hecho, brinda una nueva alternativa posible en la biosíntesis de lecitinas en encéfalo, que parece tanto más probable, por cuanto que se ha detectado una gran actividad de dihidroxiacetona-quinasa en fracciones solubles de cerebro de rata (Jenkins y Hajra, 1.976), distinta

a la encontrada en mitocondrias (apartado 1.2.1.) y que no posee en absoluto actividad alguna de glicerol-quinasa.

Otra serie de posibles rutas alternativas en la biosíntesis de ácido liso-fosfatídico o ácido fosfatídico, son las que envuelven reacciones de fosforilación de mono o diacilgliceroles por las quinasas correspondientes (Hokin y Hokin, 1.959 y 1.965).

El "pool" de diglicéridos, también puede verse muy apreciablemente enriquecido, por la actuación de fosfolipasas C o lipasas, sobre triglicéridos o fosfoglicéridos, respectivamente, estando este hecho claramente demostrado en encéfalo, para los fosfoinosítidos (Keough et al., 1.972; Lapetina y Mitchell, 1.974; Banschbach y Geison, 1.975). En efecto, las mono-, di- y tri-fosfoinosítido hidrolasas, han sido descritas como muy activas en este órgano (Thompson, 1.967) y este hecho, considerado junto con el comportamiento de los fosfoinosítidos en condiciones de isquemia, rindiendo especies moleculares tetraenóicas de diglicéridos (ver apartado 1.2.1.), y con la semejante composición en ácidos grasos de éstos y aquellos (ver apartado 1.3.1.1.), hace que esta ruta alternativa de biosíntesis, alcance un gran relieve, aún cuando su importancia cuantitativa con relación a la síntesis de lecitinas, no se haya evaluado hasta el momento.

Con todo lo anterior, sin ser una revisión exhaustiva, se pretende destacar la idea de que la biosíntesis de lecitinas, no responde a un esquema metabólico sencillo, sino que existen muchas posibilidades de regulación, en dependencia del tejido o de la especie biológica de que se trate, que dan cuenta de la heterogeneidad estructural que dichas moléculas presentan. El que se hayan descrito para muchas de estas rutas, distintas especificidades para unas u otras especies moleculares, aumenta aún más la complejidad de estos mecanismos, siendo de destacar, la dificultad que conlleva dar

una medida de la importancia relativa de cada uno respecto de los demás, hecho por el cual no se han podido, hasta hoy día, evaluar con precisión.

#### 1.2.5. PAPEL DE LA BARRERA HEMATOENCEFALICA EN LA INCORPORACION DE PRECURSORES.-

A principio de este siglo, varios grupos de investigadores pudieron constatar el hecho de que, tras la administración intravenosa de una serie de colorantes, se conseguían teñir prácticamente todos los órganos del organismo, excepto el encéfalo. Este tipo de observaciones, confirmadas en la actualidad con una gran diversidad de sustancias y cuya explicación no es aun hoy suficientemente satisfactoria, trajo consigo la aparición del concepto de barrera hematoencefálica, como una hipotética entidad encargada de establecer restricciones al paso de compuestos desde el torrente circulatorio sanguíneo hasta el encéfalo.

Otros autores, basándose en la distinta velocidad de penetración de determinadas sustancias desde la sangre hasta el líquido cefalorraquídeo y de aquí, a la masa encefálica, llegaron incluso a postular la existencia, no de una única barrera, sino de tres, establecidas entre la sangre y el encéfalo (la barrera hematoencefálica clásica), la sangre y el líquido cefalorraquídeo y el líquido cefalorraquídeo y el encéfalo. En cualquier caso, y tras este establecimiento conceptual, el problema, que se planteó entonces y que sigue planteado en la actualidad, consiste en la identificación anatómica de dicha barrera. En este sentido, y haciendo omisión de los antecedentes bibliográficos con que cuenta este asunto, son tres las localizaciones que, preferentemente, se aceptan hoy día como lugares de asentamiento de la barrera (Ford, 1.976). Para algunos autores la barrera hematoencefálica está loca-

lizada en las mismas células endoteliales que constituyen la pared de los capilares del encéfalo; dichos capilares, son de los llamados "continuos", esto es, sin poros ni fenestraciones de ningún tipo y tienen la particularidad, frente al resto de los capilares del organismo, de presentar las células que los constituyen, encajadas unas con otras formando interdigitaciones y asociadas por uniones estrechas (zonula ocludens) que ocasionan que el espacio intercelular sea mínimo y que la salida de materiales del capilar, haya de realizarse exclusivamente a base de procesos de micropinocitosis, muy activos en estos tipos celulares, que darían cuenta de la toma selectiva del plasma de determinadas sustancias.

Para otros autores, la principal barrera la constituye la membrana basal de los capilares, rodeada por las prolongaciones perivasculares de los astrocitos. También contribuiría a la barrera, el mínimo espacio intercelular existente entre las células de glia (astrocitos) y las neuronas, de modo que las sustancias que llegan a éstas, al no poder ser transportadas por los espacios intercelulares, habrán de hacerlo a través de los mismos astrocitos, de modo que además de la membrana basal, los solutos transportados han de atravesar cinco membranas plasmáticas: la membrana interna y externa de la célula endotelial, las membranas proximal y distal del astrocito y la membrana plasmática neuronal, aunque en cualquier caso, el espacio intercelular parece poder ser utilizado para moléculas pequeñas (glucosa, iones, etc.).

En adición a lo anterior, se ha detectado en el espacio intercelular material PAS-positivo (posiblemente mucopolisacáridos), secretado por los astrocitos, que parecen poder retener con facilidad sustancias tales como colorantes básicos, cationes, etc.

El hecho de que la barrera hematoencefálica no actúe con igual intensidad en las distintas zonas del Sistema Nervioso

Central, constituye realmente una prueba indirecta de la localización anatómica comentada anteriormente, dado que en las zonas más fácilmente penetrables, se puede detectar una pared capilar con poros, junto con un notable espacio perivascular, es decir, una situación semejante a la que presentan los capilares en otros órganos. Estas zonas, donde la barrera hematoencefálica es poco efectiva, son entre otras, los plexos coroideos, la eminencia media, el lóbulo posterior de la hipófisis, la región preóptica, la cresta supraóptica, etc.

De otro lado, hay autores que contemplan la barrera hematoencefálica, como una barrera esencialmente metabólica, que evita el paso de determinadas sustancias por degradación de las mismas. Así, en las células endoteliales se han detectado distintos sistemas enzimáticos que son capaces de transaminar, con ácido  $\alpha$ -cetoglutarico, al ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), para dar ácido succínico, o de descarboxilar DOPA, para dar la monoamina correspondiente, que es degradada a continuación por MAO, haciendo pues que tanto GABA como DOPA no puedan penetrar a la masa encefálica.

En cualquier caso, la actuación de la barrera hematoencefálica viene condicionada en parte por la naturaleza del sustrato. Así, el menor tamaño molecular parece ser un factor determinante, aunque, si bien se ha demostrado el paso de agua y anhídrido carbónico con gran facilidad, hay datos contradictorios, puesto que moléculas también pequeñas como los iones sodio, cloruro o bicarbonato, no lo consiguen. El grado de ionización, que a su vez depende del pH sanguíneo, también parece ser un factor importante, ya que las sulfonamidas con carga neta negativa son impermeables, mientras que las que están menos disociadas a pH fisiológico, pasan con relativa facilidad. La mayor liposolubilidad determina en general una mayor permeabilidad de la barrera, aunque esta regla no se

cumple para el colesterol. En cualquier caso, ninguno de estos condicionantes explican satisfactoriamente la entrada de glucosa y aminoácidos y quizá aquí, sea interesante señalar la existencia demostrada de mecanismos de transporte activo, sobre todo para aminoácidos, que son acumulados en los cuerpos neuronales, y para algunas hormonas esteroidicas. Estos sistemas de transporte exhiben las clásicas cinéticas de saturación y muestran una relativa especificidad hacia varios sustratos, que por tanto compiten, y que ocasiona que la dieta tenga aquí una gran influencia sobre el tipo de sustrato transportado en cada momento de la vida del animal (Ford, 1.976).

Un hecho generalmente aceptado por todos los autores, es que el encéfalo inmaduro presenta menos restricciones al paso de sustancias que el encéfalo del individuo adulto. Esto se ha querido explicar en casi todos los casos, hablando de una supuesta "falta de maduración" de la barrera hematoencefálica del individuo joven, pero realmente no han podido constatarse en la bibliografía variaciones morfológicas que puedan explicar la menor operatividad de la barrera. Hechos tales como la mayor entrada de aminoácidos en los individuos jóvenes, pueden ser explicados en función de que en ellos, hay una mucho mayor proporción de cuerpos neuronales que acumulan este tipo de sustancias (Ham, 1.970; Ford, 1.976). En este sentido pues, la mayor o menor operatividad de la barrera hematoencefálica se explicaría simplemente, sobre la base de que en el encéfalo en desarrollo, hay una necesidad metabólica mayor del aporte de determinados compuestos.

La entrada al encéfalo de materiales lipídicos inyectados por vía intravenosa o intraperitoneal, también se ve fuertemente restringida por la barrera hematoencefálica, aunque una vez que dicha entrada ha tenido lugar, la incorporación a los lípidos del encéfalo es muy rápida. Estos hechos han podido comprobarse con acetato (Dhopeswarkar et al., 1.971 a;

Mead y Dhopeswarkar, 1.972), ácidos grasos no esenciales (Dhopeswarkar y Mead, 1.970; Dhopeswarkar et al., 1.972; Mead y Dhopeswarkar, 1.972; Dhopeswarkar, 1.973), ácidos grasos esenciales (Miyamoto et al., 1.967; Dhopeswarkar et al., 1.971 a y b; Dhopeswarkar, 1.973), colesterol (Bloch et al., 1.943; Davison y Wajda, 1.959), lecitina (Holzl y Franck, 1.969; Ansell y Spanner, 1.971; Dhopeswarkar, 1.973; Dhopeswarkar et al., 1.973), liso-lecitina (Ansell y Spanner, 1.971; Illingworth y Portman, 1.972), etc..

En general, la restricción es menor en los individuos jóvenes, como ya se comentó anteriormente, y ello puede ser debido a un funcionamiento menos restrictivo de la barrera o, simplemente, a una mayor necesidad metabólica del encéfalo en esas etapas del desarrollo. Esta última idea, que supone que en el individuo adulto habría un reciclaje de los materiales lipídicos, que daría lugar a que no fuese necesaria una fuente exógena de dicho material, fué defendida inicialmente por Sun y Horrocks (1.969).

El acetato incorporado al encéfalo, se utiliza principalmente en la síntesis "de novo" de ácidos grasos, singularmente palmítico, por la sintetasa citoplasmática (Brady, 1.960; Mead y Dhopeswarkar, 1.972; Dhopeswarkar, 1.973), o también en la elongación mitocondrial (Boone y Wakil, 1.970) o para los sistemas de elongación-desaturación microsomales (Aeberhard y Menkes, 1.968; Mead y Dhopeswarkar, 1.972; Dhopeswarkar, 1.973).

Pese a la capacidad que posee el encéfalo para llevar a cabo la síntesis de ácidos grasos, es evidente que al menos, los ácidos esenciales 18:2 (n-6) y 18:3 (n-3) han de proceder de la dieta y ser transportados por el torrente circulatorio sanguíneo hasta conseguir atravesar la barrera hematoencefálica (Miyamoto et al., 1.967; Dhopeswarkar et al., 1.971 a y b; Mead y Dhopeswarkar, 1.972; Dhopeswarkar, 1.973). Estos ácidos grasos se presentan en cantidades míni-

mas en los lípidos del encéfalo, pero no ocurre así, con sus derivados poliinsaturados 20:4 (n-6) y 22:6 (n-3), que son muy abundantes. La toma de ácido linolénico desde el plasma es más eficaz que la de linoléico y quizá en ello, radique la explicación del predominio de la serie n-3 en encéfalo, contrariamente a lo que sucede en otros órganos (Miyamoto et al., 1.967).

Además de estos ácidos grasos esenciales, otros no esenciales, que pueden ser producto del metabolismo encefálico, como el ácido palmítico, oléico, etc., se transportan también a través de la barrera hematoencefálica, aunque, como en otras ocasiones, con menor eficacia que a otros órganos como el hígado, etc. En cualquier caso, la forma de transporte preferida en el encéfalo, es la de ácido graso libre, no registrándose apenas degradación a acetato con posterior resíntesis (Dhopeswarkar et al., 1.972; Mead y Dhopeswarkar, 1.972; Dhopeswarkar, 1.973).

El paso a través de la barrera de colina, libre (Arienti et al., 1.976; Kewitz y Pleul, 1.976) o ligada a lípidos como fosfatidilcolinas o liso-fosfatidilcolinas (Ansell y Spanner, 1.971; Illingworth y Portman, 1.972; Dhopeswarkar et al., 1.973), así como la reutilización de la colina endógena (Ansell y Spanner, 1.971; Binaglia et al., 1.973; Arienti et al., 1.976; Yavin, 1.976; Kewitz y Pleul, 1.976), son también procesos fundamentales para el encéfalo, dada la incapacidad de éste para llevar a cabo la síntesis de aquella.

Con todo lo comentado anteriormente, parece claro que realmente la barrera hematoencefálica establece restricciones en el paso de precursores desde el torrente circulatorio sanguíneo. Sin embargo, Dhopeswarkar et al. (1.971 y 1.972), basándose en la experiencias de Oldendorf (1.971), demuestra que, no solo la restricción no existe, sino que incluso la incorporación al encéfalo de precursores como el acetato (Dhopeswarkar et al., 1.971 a ) y el ácido palmítico (Dho-

peshwarkar et al., 1.972), son con mucho, superiores a las que se registran en hígado, cuando la dosis del precursor se administra por vía intracarotídea. Esta misma elevada incorporación, sin aparentes restricciones por parte de la barrera hematoencefálica, se presenta al inyectar, por vía intravenosa, a animales hepatotectomizados, todo lo cual parece indicar que, al menos por lo que concierne a materiales lipídicos, el concepto de barrera hematoencefálica tal y como se venía utilizando, es realmente inapropiado, ya que no es función del encéfalo mismo, sino más bien, del modo como se suministran los precursores, quedando pues todo ello reducido a un mero problema de competencia, o a un orden de actuación determinado entre los diferentes órganos del animal (Mead y Dhopeswarkar, 1.972; Dhopeswarkar, 1.973; Ford, 1.976).

### 1.3. COMPOSICION LIPIDICA DEL ENCEFALO EN ANIMALES SUPERIORES.--

Hace ya algunos años que venimos contemplando en el ambiente científico un notable aumento del interés por los temas relacionados con los lípidos. Este fenómeno, motivado sin duda por la creciente información de que se dispone, acerca de la importancia funcional de este tipo de moléculas, ha dado lugar a la existencia de una amplia bibliografía al respecto que va proporcionando una visión cada vez más detallada acerca de cual es la situación, en términos estructurales o funcionales, a todos los niveles de organización biológica. En este sentido, parece razonable pensar que, el interés principal debiera centrarse sobre aquellas estructuras biológicas que, jugando un papel importante en el mantenimiento de la vida, tengan al mismo tiempo un elevado contenido lipídico, especialmente de aquellos, como los fosfoglicéridos, que no sólo participen como una mera reserva energética, sino que puedan, en principio, desempeñar una amplia gama de funcionalismos. Ambas circunstancias concurren en el caso del tejido nervioso, que estando encargado de regular y coordinar las funciones de los animales pluricelulares, presenta las 2/3 partes de su peso seco compuesto por materiales lipídicos, de entre los cuales destacan por su abundancia los fosfoglicéridos.

#### 1.3.1. CONTENIDO LIPIDICO DEL ENCEFALO TOTAL.--

Los datos bibliográficos a este respecto, son en ocasiones aparentemente contradictorios, tanto por lo que concierne a la presencia o no de un tipo lipídico determinado, como en lo re-

ferente al nivel que alcanza en la masa encefálica. Estas aparentes contradicciones suelen ser debidas a dos fenómenos de carácter general; de un lado, el encéfalo aparece como un órgano extremadamente sensible a situaciones de isquemia que se traducen en aumentos del "pool" de diglicéridos y ácidos grasos libres, probablemente debidos a la activación de lipasas (Bazán, 1.970; Bazán et al., 1.971; Banschbach y Geison, 1.974; Cenerella et al., 1.975; Galli y Spagnuolo, 1.976). Dado que la muerte de los animales de experimentación suele venir dada por decapitación, este fenómeno puede llegar a tener importancia, singularmente cuando se trabaja a temperatura ambiente. De otro lado, nuestro desconocimiento acerca del momento exacto en que ocurren las distintas fases del desarrollo por las que atraviesa el encéfalo conduce, en ocasiones, a comparar materiales biológicos que realmente se encuentran en momentos fisiológicos muy diferentes. El desarrollo del encéfalo, puede considerarse dividido en tres grandes etapas (Herschkowitz y Rossi, 1.972); una primera de proliferación celular intensa, a base de divisiones mitóticas sucesivas, con la consiguiente migración y organización de las neuronas y células de glia resultantes. La segunda etapa vendría caracterizada por un crecimiento de las dendritas y particularmente de los axones, con formación de las interconexiones sinápticas correspondientes, mientras que en la tercera etapa, comenzaría la llamada mielinización. La deposición de los materiales característicos de la mielina, al principio muy activa, va a acentuar intensamente las diferencias, hasta ahora casi inexistentes, en la composición lipídica de las distintas zonas del tejido nervioso. La mielinización ocurre en distintos momentos del desarrollo, cuando consideramos especies biológicas diferentes, aunque parece aceptarse con carácter general, que se trata de un fenómeno, que iniciado en una etapa perinatal o inmediatamente postnatal, se continua hasta momentos muy avanzados de la vida adulta (Yakovlev y Lecours, 1.967).

Esta secuencia de fenómenos, de los cuales el más estudiado desde un punto de vista bioquímico es la mielinización, viene determinada por la puesta en juego de diferentes partes del genoma (Baumann et al., 1.972), que presenta de modo continuo una interacción con factores medioambientales, especialmente nutricionales, que serán comentados más adelante.

#### 1.3.1.1. Lípidos neutros.-

Exceptuando el colesterol y, en ocasiones, sus acil-derivados, los niveles de lípidos neutros en el encéfalo son muy bajos (Rowe, 1.969; Bazán, 1.970; Rouser y Yamamoto, 1.972), aunque no por ello su papel carece de importancia, ya que se ha podido demostrar que desde un punto de vista metabólico son muy activos (Sun y Horrocks, 1.969). Todos ellos poseen un contenido apreciable en ácidos grasos poliinsaturados (Sun, 1.970).

El "pool" de ácidos grasos libres, compuesto principalmente por palmítico, oléico, esteárico, araquidónico y docosahe-xenóico (Miyamoto et al., 1.966; Aveldaño y Bazán, 1.974; Cenedella et al., 1.975; Galli y Spagnuolo, 1.976), representa aproximadamente un 0,1 % de los lípidos totales, aunque existe variación con la zona del encéfalo considerada (Bazán et al., 1.971; Galli y Spagnuolo, 1.976) y es, al menos en parte, un reflejo del recambio que experimentan los grupos acilo de fosfoglicéridos y triglicéridos por la acción de fosfolipasas y lipasas respectivamente. Los niveles de este "pool" de ácidos grasos libres pueden verse considerablemente aumentados (del orden de 10 a 20 veces) en situaciones de isquemia (Bazán, 1.970; Cenedella et al., 1.975) o tras un tratamiento de electroshock (Bazán y Rakowski, 1.970). Esta liberación de ácidos grasos libres afecta sobre todo al ácido esteárico y muy especialmente al araquidónico (Cenedella et al., 1.975; Galli y Spagnuolo, 1.976) que se cree, está relacionado con la síntesis de prostaglandinas en cerebro (Bazán, 1.970;

Galli y Nicosia, 1.975). Los individuos jóvenes, en los cuales la mielinización no ha tenido todavía lugar, se ven menos afectados por este tipo de situaciones (Bazán et al., 1.971).

La producción de ácidos grasos libre en períodos de isquemia, se contempla en relación con una elevación "post-mortem" de los niveles de AMP<sub>c</sub> (Galli y Spagnuolo, 1.976) que se encargaría de activar a triglicérido-lipasas y, sobre todo, fosfolipasas (Bazán et al., 1.971). Ha podido comprobarse, en favor de esta hipótesis, que en animales sacrificados por irradiación con microondas, que inhiben la producción de AMP<sub>c</sub>, se previene la liberación de ácidos grasos libres (Cenedella et al., 1.975). La noradrenalina, posiblemente a través de AMP<sub>c</sub>, tiene el efecto de imitar la producción de ácidos grasos libres propia de los períodos de isquemia (Bazán et al., 1.971).

El "pool" de triglicéridos se presenta con unos niveles ligeramente superiores al de ácidos grasos libres (Wood, 1.972), conteniendo como principales restos de acilo, por este orden, a los ácidos oléico, palmítico y docosahexenoico. Los ácidos grasos araquidónico, esteárico y linoléico, también están presentes aunque en menor proporción (Aveldaño y Bazán, 1.974).

Los diglicéridos están relacionados con la biosíntesis de fosfoglicéridos (McMurray y Magee, 1.972) y muy especialmente con el intenso recambio que experimentan los fosfatidilinositoles, que al estar compuesto sobre todo a base de ácidos esteárico y araquidónico, dan lugar tras la separación del resto fosforilinositol, a la producción de especies moleculares tetraenoicas de diglicéridos que resultan ser mayoritarias dentro del "pool" (Keough et al., 1.972; Lapetina y Mitchell, 1.973; Aveldaño y Bazán, 1.974; Banschbach y Geison, 1.974). De modo semejante a lo que ocurría con los ácidos grasos libres, también ha podido observarse un aumento "post mortem" en los niveles de diglicéridos (Banschbach y Geison, 1.974).

El colesterol es, con mucho, el esteroide mayoritario del tejido nervioso (Paoletti et al., 1.969), dando cuenta aproximadamente de una cuarta parte de los lípidos totales (Dickerson, 1.968) y de casi la totalidad de los lípidos neutros. Su biosíntesis, en las células nerviosas se efectúa en el retículo endoplásmico (Ramsey et al., 1.971), siendo los individuos adultos bastante menos activos en este sentido que los jóvenes, especialmente en la época de mielinización activa (Ramsey y Nicholas, 1.972) lo cual se interpreta en función de su participación en la composición de la vaina de mielina.

Los esteres de colesterol, se presentan en cantidades relativamente importantes, tan solo en períodos juveniles, en los que la mielinización no ha tenido lugar (Eto y Suzuki, 1.972; Sweasey et al., 1.976) presentando un máximo en sus niveles que coincide con el comienzo de la etapa de mielinización activa (Adams y Davison, 1.959) y comenzando a decrecer a continuación, hasta llegar casi a desaparecer en la vida adulta (Fumagalli y Paoletti, 1.963). Esta desaparición se interpreta como una actuación de los esteres de colesterol como portadores de ácidos grasos para la biosíntesis de lípidos de mielina, singularmente cerebrósidos (Sweasey et al., 1.976). Los ácidos grasos que esterifican al colesterol son palmítico y oléico mayoritariamente, aunque también se presentan en proporción apreciable, los ácidos esteárico y araquidónico (Alling y Svennerholm, 1.969; Eto y Suzuki, 1.972; Sweasey et al., 1.976).

#### 1.3.1.2. Fosfoglicéridos .-

El encéfalo maduro de aves y mamíferos es, probablemente, el material biológico en que se ha podido constatar una mayor concentración de fosfoglicéridos. La deposición de estos, a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal, no resulta solamente como una consecuencia del crecimiento en el tamaño y número de células, sino que viene dada muy especialmente por

una serie de cambios de tipo morfológico y fisiológico, que se traducen en la formación de las vainas de mielina, tanto a nivel del Sistema Nervioso Central como del Periférico, aunque con una serie de diferencias entre ambos tipos que se refieren tanto a su origen como a su composición, etc.. Así, en aves adultas (pollo) la relación fosfolípidos : colesterol, en encéfalo, es proxima a 2, mientras que en nervio ciático sobrepasa escasamente el valor de 1 (Schaikh y Palmer, 1.976).

Los fosfoglicéridos mayoritarios en el encéfalo total, tanto para aves como para mamíferos, son, en este orden, fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y sus plasmalógenos, fosfatidilserinas, fosfatidilinositoles y sus di- o tri-fosfoderivados (Miyamoto et al., 1.966; Wells y Dittmer, 1.967; Sheltawy y Dawson, 1.969; Kanazawa et al., 1.972; Wood, 1.974; Schaikh y Palmer, 1.976; Sweasey et al., 1.976; Vatassery et al., 1.976; Dorman et al., 1.977). Todos ellos presentan variaciones en sus niveles más o menos acusadas, a lo largo del desarrollo, existiendo siempre una variación especialmente notable en la fase del desarrollo en que da comienzo la etapa de mielinización activa. Este hecho, se pone especialmente de manifiesto para algunos tipos de fosfoglicéridos, que siendo apenas detectables en etapas de premielinización, alcanzan niveles considerables una vez transcurrido este proceso. De este tipo de fosfoglicéridos, entre los que figuran, los plasmalógenos de etanolamina, los polifosfoinosítidos y el ácido fosfátídico; se dice que son propios de "membranas de mielina", mientras que del resto, se habla como fosfolípidos de membrana en el sentido más extenso de la palabra (Wells y Dittmer, 1.967; Shaikh y Palmer, 1.976). La abundancia relativa, durante el desarrollo, de los fosfoglicéridos "de membrana", disminuye frente a la de los "de mielina" y a los esfingolípidos en general, especialmente cerebrósidos (Wells y Dittmer, 1.967; Sweasey et al., 1.976; Shaikh y Palmer, 1.976) y de forma más

acentuada a nivel del Sistema Nervioso Periférico que del Sistema Nervioso Central (Shaikh y Palmer, 1.976).

Por lo que respecta a la composición en ácidos grasos de estos fosfoglicéridos, hay que señalar la existencia de una gran especificidad para cada uno de ellos. En general, los ácidos grasos poliinsaturados están bien representados en fosfatidilserinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilinositoles (O'Brien y Sampson, 1.965; Miyamoto et al., 1.966; Wood, 1.974; Dhopeswarkar y Subramanian, 1.975), pero no en fosfatidilcolinas, pese a lo cual, la fracción de fosfolípidos totales, presenta un grado de insaturación bastante considerable. La abundancia relativa de estos ácidos poliinsaturados se mantiene relativamente constante a lo largo del desarrollo embrionario (Bernsohn y Cohen, 1.972), aunque en situaciones de mielinización completa, decrece, como consecuencia del aumento en los niveles de ácidos grasos tales como el nervónico (24:1) y el eicosamonoenoico (20:1), propios de lípidos de mielina adulta (Crawford y Sinclair, 1.972). El grado de insaturación total de los fosfoglicéridos es mayor en cerebelo, que en cerebro y bulbo raquídeo en humanos (Rao y Rao, 1.973).

Otra característica bastante singular de la fracción de ácidos grasos de los fosfoglicéridos del encéfalo, viene dada por la presencia de varios isómeros de posición de ácidos monoenoicos, además de los que habitualmente se presentan en los materiales biológicos, que han podido ser detectados en cantidades bastante apreciables en fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilserinas, en todas las etapas del desarrollo de la rata (Spence, 1.970).

Los fosfoglicéridos de etanolamina son mayoritarios en todo el tejido nervioso, junto con los de colina. A nivel encefálico, los niveles que alcanzan estos últimos, son claramente superiores a los de aquellos, acentuándose aún más esta situación en casos de tumores cerebrales (Albert y Anderson, 1.977), pero parece ser que a nivel de la médula espinal o del

Sistema Nervioso Periférico, la proporción se invierte (El-Eishi, 1.967; Shaikh y Palmer, 1.976), sobre todo en individuos adultos, debido al aumento del contenido en plasmalógenos de etanolamina durante la mielinización. La relación de sn-1-alquenil a sn-1,2-diacil glicerofosforiletanolaminas, es, durante el desarrollo embrionario, muy baja, pero a medida que la mielinización tiene lugar, y en el estado ya adulto, va aumentando llegando a alcanzar valores próximos a 2 e incluso superiores, cuando se trabaja con sustancia blanca (Wells y Dittmer, 1.967; Dorman et al., 1.977). Los niveles de los sn-1-alquil derivados son siempre mínimos (Dorman et al., 1.977). Los ácidos grasos que forman parte de los fosfoglicéridos de etanolamina, son, mayoritariamente esteárico, docosahexenóico, araquidónico y oléico (Baker y Thompson, 1.972; Miyamoto et al., 1.966; Svennerholm et al., 1.972; Wood, 1.974) que dan lugar pues a moléculas con un alto grado de insaturación aunque en individuos adultos, este debe disminuir, ya que se ha dado cuenta de un aumento con el desarrollo de los ácidos grasos de la serie n-9 (familia del oléico) y de una disminución de los n-3 y n-6 (familias del linolénico y linoléico, respectivamente) (Miyamoto et al., 1.966; Paoletti y Galli, 1.972; Wood, 1.974).

Los niveles que presenta en encéfalo de aves y mamíferos la fosfatidilserina son casi dobles que los de los fosfoinosítidos, aunque en cualquier caso, ambos son fosfoglicéridos relativamente minoritarios, por cuanto que no dan cuenta, sino del 15 - 20 % del total de estos (Miyamoto et al., 1.966; Wells y Dittmer, 1.967; Kanazawa et al., 1.972; Wood, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976; Dorman et al., 1.977). Durante el desarrollo pre- y postnatal, hay un aumento en términos absolutos de fosfatidilserinas, pero su abundancia relativa, se mantiene aproximadamente constante (Miyamoto et al., 1.966; Wells y Dittmer, 1.967; Wood, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976). No sucede igual con los fosfoinosítidos, particularmente con los di- y trifosfoinosítidos, considerados como fosfoglicéridos asociados a la

mielina, que, si bien en las etapas embrionarias no presentan apenas variación, llegada la fase de mielinización activa y a continuación, ven fuertemente incrementados sus niveles con relación a los del encéfalo no mielinizado (Miyamoto et al., 1.966; Wells y Dittmer, 1.967; Wood, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976). En el Sistema Nervioso Periférico, el aumento de los fosfoinosítidos, parece deberse únicamente a los trifosfoinosítidos (Shaikh y Palmer, 1.976).

Por lo que respecta a la composición en ácidos grasos de estos fosfoglicéridos, las fosfatidilserinas contienen principalmente ácido esteárico, palmítico, docosahexenóico y oléico, pudiendose constatar a lo largo del desarrollo de las aves, un aumento de esteárico y oléico y un descenso de palmítico y docosahexenóico, aunque para este último, no parece haber acuerdo entre los distintos autores acerca de la intensidad del fenómeno (Miyamoto et al., 1.966; Wood, 1.974).

Los fosfatidilinositoles y los fosfoinosítidos en general, contienen principalmente ácidos esteárico y araquidónico (Baker y Thompson, 1.972; Wood, 1.974), en cantidades aproximadamente equimoleculares (Baker y Thompson, 1.972). Una característica peculiar de este tipo de fosfoglicéridos, es que la composición en ácidos grasos de los mono-, di- y trifosfoinosítidos es totalmente idéntica (Baker y Thompson, 1.972) lo cual aboga en favor de la conversión directa, por fosforilación, de unos en otros. En este sentido las dos fosfoinositidóquinas, han sido descritas recientemente en cerebro y nervio ciático de pollo (Shaikh y Palmer, 1.976). La actividad de estas enzimas es baja en momentos de no mielinización y se incrementa muy considerablemente en la fase de mielinización activa, permaneciendo así en el encéfalo maduro (Shaikh y Palmer, 1.976). La variación de la composición en ácidos grasos con el desarrollo, parece tender a la consecución de un menor grado de insaturación, disminuyendo la abundancia de araquidónico e incrementándose la de esteárico (Wood, 1.974).

Las fosfatidilcolinas, como ya se comentó anteriormente, son el fosfoglicérido mayoritario en el encéfalo en desarrollo de mamíferos (Marshall et al., 1.966; Wells y Dittmer, 1.967; Dalal y Einstein, 1.969; Dekaban et al., 1.971; Kanazawa et al., 1.972; Dorman et al., 1.977) y aves (Miyamoto et al., 1.966; Wood, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976; Dorman et al., 1.977) así como en estructuras derivadas embriológicamente del Sistema Nervioso Central, tales como la retina (Jhonston y Hudson, 1.974; Dreyfus et al., 1.975). Sus niveles, en el encéfalo inmaduro, no parecen experimentar variaciones significativas (Miyamoto et al., 1.966; Wells y Dittmer, 1.967; Dekaban et al., 1.971; Wood, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976), pero llegada la fase de mielinización activa (perinatal o postnatal generalmente) sufren un claro descenso, en favor de los fosfoglicéridos de etanolamina, lo cual ocasiona que en el individuo adulto, la abundancia relativa de éstos dentro del total de fosfoglicéridos, sea ligeramente superior (Wells y Dittmer, 1.967; Dekaban et al., 1.971; Baker y Thompson, 1.972; Wood, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976; Dorman et al., 1.977).

Los plasmalógenos de colina, así como los sn-1-alquil derivados, no están presentes en el encéfalo embrionario y sólo aparecen, en cantidades muy bajas, asociados con la mielinización, aunque en ningún caso superan, dentro del total de fosfoglicéridos de colina, más allá del 5 % en encéfalo (Wells y Dittmer, 1.967; Dorman et al., 1.977) y del 3 % en retina (Dreyfus et al., 1.975; Jhonston y Hudson, 1.974). Se ha podido comprobar, que los plasmalógenos de colina suponen una fracción apreciable, únicamente en los casos de tumores cerebrales (Albert y Anderson, 1.977).

Por lo que se refiere a la composición en ácidos grasos, las fosfatidilcolinas de encéfalo de aves y mamíferos, se caracterizan por un elevado contenido en ácido palmítico (aproximadamente 50 %) y oléico (aproximadamente 25 %), seguidos,

aunque a una gran distancia, por los ácidos esteárico y araquidónico. Otros ácidos grasos como el linoléico, palmitoléico y docosahexenóico, se presentan casi a nivel de traza (Miyamoto et al., 1.966; Marshall et al., 1.966; Baker y Thompson, 1.972; Svennerholm et al., 1.972; Wood, 1.974). En fosfatidilcolinas de retina, se ha descrito una situación completamente similar (Jhonston y Hudson, 1.974).

Durante la maduración del encéfalo, se pueden detectar una serie de variaciones en la composición de ácidos grasos en fosfatidilcolinas, que si bien no afectan de modo significativo a períodos embrionarios, se ponen de manifiesto en etapas del desarrollo que han superado ya la fase activa de mielinización. Así, el encéfalo adulto, presenta una disminución en sus niveles de palmítico y palmitoléico en favor del esteárico y oléico, pese a lo cual la suma de las abundancias relativas de los ácidos grasos saturados y de los insaturados permanece aproximadamente constante (Miyamoto et al., 1.966; Marshall et al., 1.966; Wood, 1.974). Un hecho bastante singular con relación a la composición de ácidos grasos de lecitinas, lo constituye el hallazgo, en encéfalo de marsopa, de cantidades muy apreciables de isoácidos grasos de cadenas corta y media, de entre los que destaca el ácido isovalérico (Varanasi y Malins, 1.975), acerca del cual no existía evidencia previa alguna, que probara su existencia en fosfolípidos animales.

Para cerrar ya este apartado dedicado a los fosfoglicéridos, resulta obligado hacer algunos comentarios acerca de uno de ellos, que si bien es absolutamente minoritario (Wells y Dittmer, 1.967; Baker y Thompson, 1.972), desempeña un papel de intermediario metabólico sumamente interesante; se trata del ácido fosfatídico cuya composición en ácidos grasos es muy semejante a la descrita para las lecitinas, con la excepción de que presenta un porcentaje de ácido palmítico bastante inferior a la de éstas.

### 1.3.1.3. Esfingolípidos.-

El encéfalo de aves y mamíferos y, en general, todo el sistema nervioso, presenta, con distintas abundancias relativas, cuatro clases principales de esfingolípidos: esfingomielinas, gangliósidos, cerebrósidos y sulfátidos. De todos ellos, los que presentan una mayor concentración, con mucho sobre los demás, son los cerebrósidos, singularmente en individuos adultos.

Estos esfingolípidos muestran notables elevaciones de sus niveles, en momentos determinados del desarrollo, y atendiendo a este criterio, podemos dividirlos en dos grandes grupos. El primer grupo, constituido por esfingomielinas, cerebrósidos y sulfátidos, es aquel que muestra una estrecha relación con el proceso de la mielinización, esto es, utilizando nuevamente la denominación que ya usamos en el apartado anterior, serían esfingolípidos "de mielina", que presentan unos niveles apenas perceptibles en el encéfalo no mielinizado y que tras la etapa de mielinización activa, ven su concentración multiplicada por un factor muy elevado, que hace posible, en el caso de los cerebrósidos, que se constituyan en el tipo lipídico cuantitativamente más importante del encéfalo adulto, por encima incluso de las lecitinas o del colesterol.

El segundo grupo lo constituyen los gangliósidos que aparecen relacionados, no con la mielinización, sino con otros fenómenos morfológicos o fisiológicos.

Gilliland y Moscatelli (1.969), detectan un aumento en el contenido de esfingolípidos en encéfalo a medida que se asciende en la escala filogenética.

Las esfingomielinas se presentan en encéfalo de individuos adultos con unos niveles aproximadamente iguales a la mitad de los de las fosfatidilserinas (Wells y Dittmer, 1.967; Dekaban et al., 1.971; Shaikh y Palmer, 1.976) llegando a igualarse con ellas, en el Sistema Nervioso Periférico y en retina (Jhonston y Hudson, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976).

En cualquier caso, la concentración de este esfingolípido se ve muy incrementada en la fase de mielinización activa (Wells y Dittmer, 1.967; Dekaban et al., 1.971; Shaikh y Palmer, 1.976).

Se ha postulado la existencia de dos "pools" de esfingomielinas, con una composición diferente de ácidos grasos y una capacidad de recambio de todos sus componentes, también distinta; las esfingomielinas con ácidos grasos de cadena larga, principalmente localizadas en la vaina de mielina, y las esfingomielinas de cadena corta, menos abundantes y localizadas en estructuras celulares, no mielínicas (O'Brien y Sampson, 1.965; Kishimoto et al., 1.969; Freysz et al., 1.976).

En encéfalo, los ácidos grasos principales de las esfingomielinas, son el esteárico principalmente, y el palmítico, tendiendo con el desarrollo a aumentar el primero y a disminuir el segundo. Además se presentan ácidos grasos poco usuales en otros tipos lipídicos, de cadena muy larga (C-22 a C-26) (Marshall et al., 1.966; Wood, 1.974). En retina, el ácido palmítico predomina sobre el esteárico (Jhonston y Hudson, 1.974).

Los cerebrósidos son con mucho los esfingolípidos mayoritarios del encéfalo y están estrechamente relacionados con la formación de la vaina de mielina, pudiéndose observar que su abundancia relativa en los lípidos totales, se multiplica por un factor aproximadamente igual a 500, cuando comparamos el encéfalo no mielinizado con el adulto (Wells y Dittmer, 1.967; Dekaban et al., 1.971). De hecho, la concentración de cerebrósidos, se utilizan en la actualidad como un criterio bioquímico para determinar el grado de mielinización (Bass y Hess, 1.969).

Por lo que se refiere a su composición en ácidos grasos, resulta singular el hecho de que de modo casi exclusivo, contengan ácidos de cadena muy larga, C-22 y C-24 principalmente, saturados o a lo más monoénicos (Sweasey et al., 1.976), de los cuales, sobre todo los saturados, una gran mayoría son

hidroxiácidos grasos (Kanazawa et al., 1.972).

Los sulfátidos, derivados de los cerebrósidos por la acción de la cerebrósido-sulfotransferasa (Ramsey y Nicholas, 1.972), ven notablemente incrementada su abundancia relativa durante la mielinización, alcanzando niveles comparables a los de las esfingomielinas (Wells y Dittmer, 1.967; Benjamins et al., 1.974). Los oligodendrocitos parecen ser mucho más activos en la síntesis de estos compuestos, que ningún otro tipo celular (Benjamins et al., 1.974).

Los gangliósidos, aparecen en períodos muy tempranos del desarrollo embrionario (Vanier et al., 1.971; Dreyfus et al., 1.975), coincidiendo totalmente con la aparición de las actividades enzimáticas encargadas de sintetizar las cadenas de oligosacáridos que los constituyen (Basu et al., 1.973).

Atendiendo a estos oligosacáridos, se puede constatar la existencia en el encéfalo embrionario de aves y mamíferos de, al menos 5 tipos de gangliósidos distintos, cuyas abundancias relativas, varían a lo largo del desarrollo, aunque la norma de variación parece ser función de la especie biológica considerada (Vanier et al., 1.971; Dreyfus et al., 1.975). En cualquier caso, en el embrión a término y en el adulto, el tipo cuantitativamente más importante es el G<sub>D1a</sub>, según la nomenclatura de Svennerholm (1.963). Los gangliósidos en su conjunto son realmente, en encéfalo, esfingolípidos minoritarios, con unos niveles que no igualan siquiera los de los sulfátidos (Wells y Dittmer, 1.967). Generalmente, suele admitirse que están relacionados con la arborización dendrítica y la formación de sinapsis interneuronales (Vanier et al., 1.971).

### 1.3.2. CONTENIDO LIPIDICO EN DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES.--

El aislamiento de fracciones subcelulares suficientemente

puras, a partir del encéfalo total, lleva consigo una serie de dificultades adicionales a las que presentan otros materiales biológicos (Kishimoto et al., 1.969). Estas dificultades se derivan de la existencia en el encéfalo de una gran variedad de tipos celulares, que contienen además, toda una colección de estructuras citológicas especializadas que ocasionan en último término, que difícilmente se obtengan, con excepción de la mielina, fracciones particuladas homogéneas. La existencia, por tanto, de una contaminación en mayor o menor grado, sumada al hecho de que no suelen aportarse, por los distintos autores, demasiadas pruebas morfológicas (microscopía electrónica) o bioquímicas (actividades enzimáticas características) acerca de la pureza de las fracciones, ocasiona que, al menos en términos cuantitativos, las determinaciones analíticas, no sean suficientemente seguras ni comparables, con la excepción, antes mencionada, de la mielina, que debido a su baja densidad, puede ser aislada, con un elevado grado de pureza, por centrifugación en gradientes (Rouser et al., 1.972). Es por ello, que en la presente exposición, vamos a tomar como punto de referencia, la composición lipídica de la mielina, comparando con ella los datos existentes para el resto de fracciones subcelulares, aunque, así y todo, a la hora de establecer una comparación, hay que tomar en consideración la procedencia del material biológico analizado así como la edad de los animales de experimentación. En este sentido se ha descrito, que la mielina de aves, en general, tiene más glicolípidos y menos esfingomielinas que la de mamíferos (Rouser et al., 1.972; Dickerson, 1.968). También es distinta la mielina procedente de Sistema Nervioso Periférico y de Sistema Nervioso Central (O'Brien et al., 1.967), producidas respectivamente por las células de Schwann y los oligodendrocitos (Geren, 1.954; Gray, 1.964), e incluso dentro del Sistema Nervioso Central, son distintas la de cerebro y la de médula, con menos esfingomielinas y más cerebrósidos y sulfátidos esta última (O'Brien

et al., 1.967), si bien no hay un total acuerdo sobre este último punto (Dalal y Einstein, 1.969).

La edad de los animales, también es un factor a tomar en cuenta, ya que se ha comprobado que la composición lipídica de la mielina, distinta de las del resto de sistemas membranosos del tejido nervioso, se va haciendo aún más diferente, a medida que avanza el desarrollo, con una disminución progresiva en los niveles de fosfolípidos, especialmente fosfatidilcolinas, y un enriquecimiento concomitante en cerebrósidos y sulfátidos, tanto en el Sistema Nervioso Periférico (Oulton y Mezei, 1.976) como en el Sistema Nervioso Central (Horrocks, 1.968; Eng y Noble, 1.968; Dalal y Einstein, 1.969). La composición en ácidos grasos de todas las clases lipídicas de la mielina, también experimentan variaciones con el desarrollo, así, los cerebrósidos por ejemplo, van aumentando su contenido en 20:0 y 24:1 (Oulton y Mezei, 1.976).

En el resto de fracciones subcelulares también se pueden detectar variaciones con el desarrollo (Horrocks, 1.968) excepto en las terminaciones nerviosas, que mantienen una composición lipídica relativamente constante (Cuzner y Davison, 1.968). En todas las fracciones particuladas del encéfalo de pollo, se detecta, de modo semejante a lo que ocurre en el encéfalo total, una disminución en los niveles de fosfatidilcolinas, compensada por un aumento en esfingomielinas (Kreps et al., 1.966).

La mielina viene caracterizada por un bajo porcentaje de proteínas y una elevada concentración de colesterol, cerebrósidos, sulfátidos, polifosfoinosítidos y plasmalógenos de etanolamina (Smith y Eng, 1.965; Kishimoto et al., 1.969; Dickerson, 1.968; Hamberger y Svennerholm, 1.971; Ansell et al., 1.973; Sun, 1.973; Abe y Norton, 1.974; De Vries et al., 1.976), siendo muy poco abundantes los gangliósidos, las cardiolipinas y el ácido fosfatídico (Sun, 1.973; Abe y Norton, 1.974).

Los cerebrósidos, concretamente, son exclusivos de mielina y microsomas procedentes de sustancia blanca (Kishimoto et al., 1.969), que por otra parte, tiene aproximadamente doble cantidad de lípidos totales que la sustancia gris (Vatassery et al., 1.976). Los cerebrósidos y sulfátidos por un lado, y las esfingomielinas por otro, se caracterizan en mielina, por tener una mucho menor cantidad de ácidos grasos saturados, palmítico y esteárico respectivamente, siendo todos ellos mucho más ricos en 24:0 y singularmente en 24:1, comparado con los microsomas procedentes de sustancia gris, vesículas sinápticas, terminaciones axónicas, etc. (Kishimoto et al., 1.969; Abe y Norton, 1.974), mientras que los microsomas procedentes de sustancia blanca, presentan una situación intermedia (Kishimoto et al., 1.969). Este tipo de diferencias entre la sustancia blanca y la gris, dada la abundancia de mielina en la primera, y de cuerpos neuronales y células de glia en la segunda, han sido puestas de manifiesto por diversos autores; así, el fosfoglicérido mayoritario en la gris es la fosfatidilcolina, como en casi todas las biomembranas, mientras que en la blanca, lo son los fosfoglicéridos de etanolamina (Horrocks, 1.968; Vatassery et al., 1.976).

Los ácidos grasos constituyentes de los distintos lípidos de la sustancia gris, suelen ser los saturados, 16:0 y 18:0, e insaturados del tipo del 18:2, 20:4 y 22:6, mientras que en la sustancia blanca, todos ellos alcanzan niveles relativamente bajos, siendo los principales, los monoénicos 18:1, 20:1 y 24:1 y los saturados 20:0, 22:0 y 24:0 (Vatassery et al., 1.976).

Los lípidos de mielina y de sustancia blanca en general, suelen tener una capacidad de recambio menor (Smith y Eng, 1.965; Sun y Horrocks, 1.973), especialmente para esfingolípidos y colesterol.

Por lo que respecta a los fosfoglicéridos, en mielina vienen caracterizados por una gran abundancia en ácidos grasos

monoénicos, singularmente, 18:1 y 20:1 (Sun, 1.973). Así, los fosfoglicéridos de etanolamina, mayoritarios en mielina (Eng y Noble, 1.968; Horrocks, 1.973), presentan un porcentaje mucho menor en 22:6, 22:5, 20:4, 18:2 y 18:0 que los correspondientes de sinaptosomas (Hamberger y Svennerholm, 1.971; Sun, 1.973; Karl, 1.975), microsomas (Sun y Yau, 1.976), mitocondrias (Hamberger y Svennerholm, 1.971) o vesículas sinápticas (Kishimoto et al., 1.969), tanto en plasmalógenos como en los sn-1,2-diacil derivados, aunque estos últimos se presentan en todas las fracciones como menos insaturados que los primeros (Sun et al., 1.974; Sun y Yau, 1.976). La fracción mitocondrial tiene más 18:1 y 18:2 en fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas y fosfatidilinositoles, y menos 22:4, 22:5 y 22:6 que los sinaptosomas (Hamberger y Svennerholm, 1.971), donde todos estos fosfoglicéridos y, en adición las esfingomielinas, se presentan en mayor cantidad, predominando las fosfatidilcolinas y cardiolipinas en mitocondrias (Hamberger y Svennerholm, 1.971; Chapman, 1.972) y en membranas axónicas (Norton y Poduslo, 1.973; De Vries y Norton, 1.974; De Vries et al., 1.976; Chacko et al., 1.977).

Las fosfatidilserinas, esfingomielinas y colesterol, están muy escasamente representados en mitocondrias (Geison y Flangas, 1.974) mientras que los gangliósidos, presentan niveles máximos en sinaptosomas y microsomas (Hamberger y Svennerholm, 1.971; Chapman, 1.972).

Las fosfatidilcolinas, presentan toda una gama de diferentes grados de insaturación en las distintas fracciones subcelulares. Así, podríamos ordenar de menor a mayor insaturación, en primer lugar a las de mielina, con una casi total ausencia de ácidos grasos poliinsaturados (Sun y Yau, 1.976; Hamberger y Svennerholm, 1.971; Sun, 1.973), en segundo lugar a las fosfatidilcolinas de membrana nuclear (Ramsey et al., 1.972), de sinaptosomas (Hamberger y Svennerholm, 1.971) y de microsomas (Sun, 1.973) y en tercer lugar, las de terminaciones nerviosas (Kishimoto et al., 1.969), mitocondrias

(Geison y Flangas, 1.974) y membranas axónicas en general (Chacko et al., 1.977), donde el ácido docosahexenóico está muy bien representado y las especies moleculares con ácidos poliinsaturados, deben llegar a suponer un 50 % aproximado del total (O'Brien y Geison, 1.971).

### 1.3.3. CONTENIDO LIPIDICO EN DISTINTOS TIPOS CELULARES.-

Hasta hace relativamente poco tiempo, la única información que se poseía acerca de la composición lipídica de los distintos tipos celulares presentes en el tejido nervioso, se refería a estudios llevados a cabo en sustancia gris y sustancia blanca, como fracciones enriquecidas en cuerpos neuronales la primera y en células de glía (oligodendrocitos principalmente) la segunda (Eichberg et al., 1.969).

Actualmente, varios autores (Fewster y Mead, 1.968; Norton y Poduslo, 1.971; Tamai et al., 1.971; Hamberger y Svennerholm, 1.971; Kohlschütter y Herschkowitz, 1.973; Abe y Norton, 1.974; Benjamins et al., 1.974), han conseguido aislar varios tipos celulares, si bien con una contaminación apreciable, pese al escaso desarrollo experimental de este tipo de técnicas, que suelen utilizar tras un tratamiento con tripsina o productos químicos diversos que disocian a los componentes del tejido, métodos de centrifugación zonal o en gradientes (Johnson y Sellinger, 1.971). Otros autores han intentado abordar el problema, mediante las técnicas de cultivo celular (Menkes, 1.972; Robert et al., 1.976), aunque este método sólo es viable para la obtención de células de glía, astrocitos fibrosos principalmente.

Una primera conclusión de todos estos estudios es que la proporción neuronas / células de glía, varía con el desarrollo siendo elevada en individuos inmaduros y baja en adultos, pudiendo tomarse este valor como una medida del desarrollo del

animal (Johnson y Sellinger, 1.971).

Las células de glía contienen una cantidad bastante mayor de lípidos que las neuronas (Hamberger y Svennerholm, 1.971; Norton y Poduslo, 1.971; Woelk et al., 1.974), aunque la distribución de los distintos lípidos en estos tipos celulares, no presenta grandes diferencias. En general, la composición lipídica de las neuronas, es parecida a la de los astrocitos y ligeramente distinta de la de los oligodendrocitos (Rouser et al., 1.972).

La composición en ácidos grasos de los fosfolípidos, es aproximadamente la misma en neuronas que en glía (Hamberger y Svennerholm, 1.971), si bien la distribución de estos no es exactamente igual entre ambos tipos, presentando las neuronas mayores abundancias relativas de fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y fosfatidilinositoles, y las células de glía, de esfingomielinas y fosfatidilserinas ( Hamberger y Svennerholm, 1.971).

Las células de glía, presentan una mayor cantidad de colesterol (Norton y Poduslo, 1.971) y las neuronas de gangliosidos (Hamberger y Svennerholm, 1.971; Dreyfus et al., 1.975), aunque la distribución relativa de estos es la misma en todos los tipos celulares (Hamberger y Svennerholm, 1.971).

Los cerebrósidos y sulfátidos, son especialmente abundantes en los oligodendrocitos, formadores de la vaina de mielina (Norton y Poduslo, 1.971), que se caracterizan además por poseer una actividad relativa elevada de cerebrósido-sulfotransferasa (Benjamins et al., 1.974).

Las células de glía están más capacitadas que las neuronas para incorporar precursores marcados tales como ácidos grasos (Cohen y Bernshon, 1.973) o acetato (Bernshon y Cohen, 1.972), particularmente durante el desarrollo embrionario, ya que en el encéfalo adulto, la situación puede invertirse (Bernshon y Cohen, 1.972).

Las células endoteliales de los capilares del encéfalo, se

caracterizan por no presentar cerebrósidos ni sulfátidos, y por tener un mayor porcentaje de fosfolípidos que las neuronas o los astrocitos (Rouser et al., 1.972).

En otro orden de cosas, se ha podido dar cuenta de alteraciones composicionales y metabólicas, con relación a los lípidos en las células de glía, en estados patológicos diversos (Menkes, 1.972; Robert et al., 1.976).

#### 1.3.4. INFLUENCIAS DE LA DIETA .-

Es un hecho bien establecido que el encéfalo es un órgano refractario, en general, ante cualquier variación ambiental, incluida la escasez o la privación absoluta de alimentos. Así, en animales muertos por inanición puede comprobarse, que al contrario de lo que sucede en órganos, como por ejemplo el hígado, que pierde más de la mitad de su peso, el encéfalo tan solo pierde un 2 - 3 % manteniendo prácticamente constante su composición. Este hecho fué ya constatado en la bibliografía por Wright (1.945), que habló entonces de unos hipotéticos mecanismos homeostáticos que protegían al órgano frente a cualquier variación. Actualmente, dichos mecanismos homeostáticos siguen sin precisarse, pero cualquiera que sea su naturaleza, ha podido comprobarse que son funcionales tan solo en el encéfalo maduro, ya mielinizado, existiendo por tanto un "período crítico" en el que el encéfalo es muy vulnerable frente a la malnutrición, que en el caso del hombre, se corresponde con la etapa comprendida entre las dos semanas de vida fetal y los 18 meses de vida postnatal (Dobbing, 1.968 y 1.968 a), es decir, extrapolando al resto de los mamíferos, la etapa correspondiente a la gestación y a la lactancia, donde se registran un crecimiento rápido de la masa encefálica, con una intensa división de las células de glía, y la fase de mielinización activa, junto con la puesta en marcha de muchos sistemas enzi-

máticos (Dobbing, 1.972).

Los efectos de una restricción alimentaria en este período vulnerable, son múltiples, traduciéndose en una microcefalia, como consecuencia de una menor proliferación celular (Winick y Noble, 1.966), que afecta sobre todo al cerebelo, con la consiguiente reducción del cociente peso del encéfalo / peso corporal (Dobbing, 1.970; Dobbing, 1.972; Herschkowitz y Rossi, 1.972) y en una intensa reducción de la deposición de colesterol y demás tipos lipídicos en la mielina en formación (Dobbing, 1.972) que afecta sobre todo a los cerebrósidos (Svennerholm et al., 1.972). También ocurre una disminución en la síntesis de DNA y proteínas (Winick et al., 1.972), y en épocas de diferenciación celular, procesos como el alargamiento de los áxones, se ven frenados (Winick y Noble, 1.966).

En humanos, otro probable efecto de la malnutrición durante la gestación y la lactancia, es el de producir un aumento de la aparición de individuos con retraso mental, si bien las estadísticas elaboradas por los distintos países, no aportan pruebas suficientemente concluyentes al respecto (Cobos, 1.972).

Todos estos efectos de la malnutrición, y muchos otros que no hemos comentado, se explican en gran medida, pensando que el desarrollo del encéfalo, o de cualquier otro órgano, es el resultado de complejas interacciones entre el genoma y una multitud de factores exógenos, tales como la nutrición, que pueden por tanto modificar, o mejor dicho, regular la expresión del mensaje genético (Herschkowitz y Rossi, 1.972). Esta regulación genética durante el desarrollo, es particularmente interesante con relación a los llamados "genes temporales", cuya misión consiste en controlar la activación o desactivación de otros genes reguladores, estructurales, etc. en etapas muy precisas del desarrollo, haciendo posible o evitando la aparición en el sistema, en un momento dado, de diversos sistemas enzimáticos, que de hecho, caracterizan cada período ontogénico (Herschkowitz y Rossi, 1.972).

La existencia en mamíferos de estos "génes temporales" queda suficientemente probada con la existencia en ratones de las mutaciones recesivas "Jimpy" y "Quacking", ligada al cromosoma X y autosómica, respectivamente (Baumann et al., 1.972). Los machos "Jimpy" presentan un desarrollo perfectamente normal, hasta el día 11º de vida postnatal (fase de mielinización activa) en que comienza a alterarse el tono muscular, muriendo el animal antes de cumplir 30 días. Estos animales, presentan una falta de actividad casi total, en los sistemas enzimáticos relacionados con la síntesis de cerebrósidos y sulfátidos, no pudiéndose apenas detectar en ellos mielina en el Sistema Nervioso Central (Herschkowitz y Rossi, 1.972).

La incidencia de factores exógenos, sobre la puesta en juego del mensaje genético, ha podido constatarse en multitud de ocasiones, a nivel de la transcripción o de la traducción a proteínas o sobre la regulación de la actividad enzimática misma (Herschkowitz y Rossi, 1.972).

Algunos de los factores dietéticos más importantes para el buen desarrollo del encéfalo inmaduro, son los ácidos grasos esenciales (Houtsmuller, 1.972). La deficiencia o la ausencia en la dieta de la madre gestante de estos ácidos grasos insaturados de las series n-3 y n-6, provoca un aumento del 50 % en el índice de mortandad en la descendencia (Svennerholm et al., 1.972). En los individuos supervivientes se puede apreciar una reducción apreciable del peso corporal y del encéfalo, junto con una clara disminución de la capacidad de aprendizaje (White et al., 1.971; Paoletti y Galli, 1.972; Svennerholm et al., 1.972). En adición a lo anterior, también puede detectarse una mayor pérdida de agua a través de la piel, junto con un aumento en la fragilidad de capilares y eritrocitos, que bien podría afectar a la barrera hematoencefálica (Dhopeshwarkar, 1.973). En términos absolutos, los niveles de lípidos totales, fosfolípidos, etc., también disminuyen en el individuo deficien-

te, sobre todo en los machos (Ramsey y Nicholas, 1.972), aunque sus abundancias relativas, permanecen más o menos iguales a las de los individuos control, con la excepción de los cerebrosidos que sí disminuyen sensiblemente (Paoletti y Galli, 1.972; Svennerholm et al., 1.972; Alling et al., 1.974).

La composición en ácidos grasos de los fosfoglicéridos en los individuos deficientes, también presenta variaciones (Galli et al., 1.970; Paoletti y Galli, 1.972; Svennerholm et al., 1.972; Alling et al., 1.974; Sun et al., 1.974; Karlsson, 1.975), aunque cuando la dieta deficiente es administrada a individuos adultos, no se registran en absoluto (Joel et al., 1.974). Dichas variaciones, se han estudiado principalmente en fosfatidiletanolaminas y también en fosfatidilcolinas, aunque en menor medida, y se pueden resumir en una substitución de los ácidos grasos poliinsaturados pertenecientes a las series n-6 (singularmente 20:4 y 22:4), y n-3 (principalmente 22:6), por otros de la serie n-9, es decir oléico y sus derivados 20:3 y 22:3, con la característica general de que, tanto la relación insaturados / saturados, como el grado de insaturación global característico de cada fosfoglicérido, se mantienen pese al cambio habido. Este mismo tipo de reemplazamiento ha podido detectarse en fosfoglicéridos precedentes de todas las fracciones subcelulares (Paoletti y Galli, 1.972; Alling et al., 1.974; Sun et al., 1.974; Karlsson, 1.975) con la única diferencia de que en mielina, el reemplazamiento de los ácidos grasos araquidónico y docosahexenóico, suele ser más pronunciado (Paoletti y Galli, 1.972; Karlsson, 1.975). En cualquier caso, el encéfalo es menos sensible a este tipo de reemplazamiento de ácidos grasos que el hígado o el músculo (Svennerholm et al., 1.972).

La vitamina E y otros tocoferoles en la dieta, parecen ser también elementos esenciales, por cuanto que juegan el papel de antioxidantes, protegiendo así a los ácidos grasos poliinsaturados de las series n-3 y n-6 (Houtsmuller, 1.972).

Por último, sólo citar que, algunos autores, ven en la disponibilidad en ácidos grasos poliinsaturados de la dieta, un factor determinante de la evolución del encéfalo y de la complejidad de sus funciones en los mamíferos (Crawford y Sinclair, 1.972). Dicha hipótesis está basada en la distinta abundancia con que los ácidos grasos poliinsaturados, se presentan en los diferentes niveles tróficos de los ecosistemas, de modo que los vegetales, poseen tan solo ácidos linoléico y linolénico en sus lípidos, sin presentar en absoluto araquidónico y docosahexenónico, mientras que los consumidores primarios tienen ya unos niveles apreciables de estos últimos, y los carnívoros en general, alcanzan un máximo en este sentido, guardandose de hecho, lo que podríamos denominar una "especificidad de grupo" entre carnívoros y herbívoros, por lo que a la composición en ácidos grasos de sus fosfoglicéridos se refiere y correlacionandose esta distinta composición de unos y otros, con un aumento en el tamaño relativo del encéfalo y de la complejidad de funciones de éste (Crawford y Sinclair, 1.972).

Además de todo lo comentado anteriormente, existen otros factores dietéticos no lipídicos, que inciden también sobre la composición lipídica del encéfalo. En este sentido, se ha demostrado que la administración "in vivo" o "in vitro" de cantidades crecientes de fenilalanina, tiene el efecto de inhibir la síntesis de colesterol y disminuir notablemente los niveles de colesterol, cerebrósidos y sulfátidos, con la consiguiente malformación de la vaina de mielina (Ramsey y Nichollas, 1.972), dato éste, que puede brindar una explicación acerca de la aparición de retraso mental en algunos estados patológicos congénitos como la fenilcetonuria.

#### 1.4. ANÁLISIS DE ESPECIES MOLECULARES.-

Típicamente, un tipo determinado de fosfoglicérido, puede presentar en cantidad significativa, unas diez cadenas apolares distintas como componentes estructurales que, agrupadas por parejas y habida cuenta de la selectividad con que ciertos restos de acilo se ligan a las posiciones sn-1 o sn-2 del glicerol, suministran un total de especies moleculares que suele oscilar entre diez y veinte. De aquí se desprende la dificultad analítica que supone resolver y determinar la composición molecular precisa de un tipo dado de fosfoglicérido, tanto por la complejidad de la muestra en sí misma, como por la similitud de propiedades de sus componentes.

##### 1.4.1. DISTRIBUCION POSICIONAL DE LAS CADENAS APOLARES.-

El número máximo de especies moleculares que puede contener un fosfoglicérido determinado, puede estimarse a partir de la distribución de sus cadenas de acilo entre las posiciones sn-1 y sn-2 del resto glicerol. Este tipo de información se consigue haciendo uso de la especificidad con que la fosfolipasa A<sub>2</sub> (EC. 3.1.1.4), separa el resto de acilo unido a la posición sn-2 del glicerol, rindiendo así el lisoderivado y el ácido graso correspondiente. La mezcla de estos dos compuestos puede resolverse por cromatografía en capa fina de ácido silícico y la determinación cualitativa y cuantitativa de los ácidos grasos presentes en cada uno de ellos, puede lograrse, previa transformación de los mismos en esteres metílicos, por cromatografía de gases. Siguiendo este procedimiento general se ha podido determinar la distribución posicional

de los restos de acilo en numerosos fosfoglicéridos, procedentes de las más variadas fuentes biológicas (Hildebrand y Law, 1.964; Okuyama et al.; 1.967; Van Golde, 1.968; Brockerhoff y Ackman, 1.967; Haverkate y Van Deenen, 1.965; Fernández Sousa et al., 1.971 a y 1.971 b), llegándose a la conclusión general de que los ácidos grasos saturados predominan en posición sn-1, mientras que los insaturados, se hallan localizados preferentemente en posición sn-2, aunque también se han encontrado algunas excepciones a esta regla (Fernández Sousa et al., 1.971 b).

#### 1.4.2. RESOLUCION DE ESPECIES MOLECULARES.-

Investigaciones llevadas a cabo recientemente han permitido abordar el problema analítico que plantean las especies moleculares, con una serie de metodologías generales caracterizadas por un alcance y resoluntividad distintos. Estos métodos de análisis, como se comentará más adelante, combinan una serie de técnicas cromatográficas y degradaciones enzimáticas junto a ciertas transformaciones químicas mediante reactivos específicos, presentando además como denominador común, una etapa de cromatografía de argentación que ocasiona la separación de grupos de especies moleculares, bien de los fosfoglicéridos directamente, bien de derivados de éstos, más adecuados para el análisis en cada caso.

##### 1.4.2.1. Cromatografía de argentación.-

Las mezclas lipídicas como las que se ocasionan como resultado de la existencia de varias especies moleculares de un mismo tipo de fosfoglicérido, no pueden resolverse por cromatografía en capa fina de ácido silícico, pero pueden ser separadas cuando se utiliza este adsorbente impregnado con nitrato de plata.

En general, los fosfogliceridos sólo se resuelven parcial-

mente por cromatografía de argentación (Haverkate y Van Deenen, 1.965; Van Golde y Van Deenen, 1.966; Arvidson, 1.965; Balint et al., 1.967; Hopkins et al., 1.968), debido a los efectos enmascarantes de sus grupos polares; por esta razón, es aconsejable convertirlos en derivados menos polares como los 1,2-diglicéridos o sus 3-acetil derivados, en los que el riesgo de isomerización por migración de los restos de acilo, se reduce al mínimo. Los acetatos de diglicéridos así obtenidos son realmente triglicéridos y como tales pueden separarse.

La cromatografía de argentación aplicada a triglicéridos, fue introducida en 1.962 por De Vries y Barret et al. La técnica se basa en la interacción que se produce entre los electrones  $\pi$  de los dobles enlaces de las cadenas de acilo con los iones  $Ag^+$ . El complejo, posee una baja energía de formación y puede crearse y destruirse a lo largo del proceso cromatográfico, introduciendo así equilibrios de adsorción. La naturaleza del complejo olefina- $Ag^+$  ha sido muy discutida, aunque en cualquier caso se ha podido comprobar que el doble enlace no se modifica en forma irreversible (Powell y Sheppard, 1.960) de modo que las diferentes fracciones pueden eluirse inalteradas del adsorbente para análisis posteriores.

En el proceso cromatográfico se pueden utilizar indistintamente columnas o placas impregnadas con nitrato de plata, dependiendo del tipo de resolución que se desee alcanzar y de la cantidad de muestra a fraccionar, pues si bien las columnas admiten una mayor cantidad de muestra y reducen al mínimo el riesgo de oxidación atmosférica, las placas, ofrecen la ventaja de una mejor resolución y una mucho mayor rapidez y facilidad en su manejo.

La preparación de las placas se realiza por suspensión del ácido silícico en una solución acuosa de nitrato de plata, cuya concentración varía desde el 5 % (w/v), empleado por Morris (1.966) para mezclas con pocas insaturaciones, hasta el 23 - 30 % (Morris et al., 1.967) para la resolución de

isómeros posicionales. En cualquier caso, el adsorbente impregnado con nitrato de plata, debe permanecer en un sitio oscuro, ya que la luz puede llegar a inactivarlo.

Otros factores a tener en cuenta en la separación de triglicéridos por cromatografía de argentación son: a) temperatura y tiempo de activación de las placas, que varían, según los autores, desde 100 - 120°C a 190 - 195°C, durante 1-4 horas (Renkonen, 1.967; Akesson, 1.969 y Bottino, 1.971; Abad, 1.974; González Ros, 1.974); b) disolvente utilizado para el desarrollo cromatográfico (casi siempre mezclas de cloroformo/metanol o benceno/éter, en distintas proporciones); c) humedad relativa y d) cantidad de muestra aplicada en cada caso. El orden de elución no está basado tan solo en el número de dobles enlaces por molécula (Gunstone y Padley, 1.965), sino que la afinidad del ión plata por los enlaces múltiples, aumenta cuando éstos están agrupados en una sola cadena de ácido graso; así, una cadena de ácido linoleico, por ejemplo, forma con el ión  $Ag^+$  un complejo más estable que el que forman dos cadenas de ácido oleico.

De la combinación exacta de todas las variables comentadas anteriormente, determinadas siempre de forma empírica, depende el mayor o menor poder resolutivo del sistema cromatográfico, habiéndose descrito situaciones, bajo condiciones muy controladas, en que se consiguen separar mezclas de triglicéridos, conteniendo isómeros posicionales (Wessels y Rajagopal, 1.969).

En cualquier caso, las diferentes fracciones de triglicéridos así separadas, pueden ser eluidas del adsorbente con éter y, tras un tratamiento con iones cloruro, para destruir totalmente los complejos formados entre los  $Ag^+$  y los triglicéridos más insaturados (Privett y Nutter, 1.967; Hill et al., 1.968; Husbans, 1.970; Rochm y Privett, 1.970) puede procederse al análisis cualitativo y cuantitativo de las fracciones así obtenidas. Dicho análisis puede verificarse mediante una

gran variedad de métodos (Blank et al., 1.965; Gordis, 1.965) de los cuales, el más utilizado es la cromatografía en fase gaseosa de los esteres metílicos con patrón interno, ya que esta técnica permite determinar simultaneamente la composición en ácidos grasos y la proporción relativa de cada fracción del triglicérido inicial (Gunstone et al., 1.964; Blank et al., 1.965; Christie et al., 1.970).

Por lo que respecta a la separación de diglicéridos naturales, o producidos por desfosforilación de fosfoglicéridos o desacilación de triglicéridos, varios autores describen que, manipulados con la suficiente rapidez y aumentando ligeramente la polaridad del sistema de desarrollo utilizado, pueden separarse directamente por cromatografía de argentación, sin que se observe una isomerización apreciable (Van Golde y Van Deenen, 1.966 y 1.967; Akesson, 1.969; Akesson et al., 1.970; Montfoort et al., 1.971).

Otros fraccionamientos con acetatos de diglicéridos han sido descritos por Kuksis et al. (1.967 y 1.969); Kuksis y Marai (1.967); Renkonen (1.966, 1.967, 1.968 a y 1.968 b); Renkonen y Rikkinen (1.967); Abad (1.974); y González Ros (1.974).

#### 1.4.2.2. Hidrólisis enzimáticas.-

Como se ha comentado anteriormente, los métodos para la elucidación de las especies moleculares presentes en un determinado fosfoglicérido, incluyen, entre otras muchas técnicas, una serie de degradaciones enzimáticas sobre las moléculas de partida o sobre derivados de éstas. Las acciones de estas enzimas aquí utilizadas, son altamente específicas (fosfolipasas C y D) o al menos se llevan a cabo en condiciones de especificidad práctica (lipasa pancreática) y serán comentadas a continuación.

##### A) Fosfolipasa C (EC. 3.1.4.3).-

La fosfolipasa C hidroliza específicamente el enlace glicerol-fosfato de los fosfoglicéridos para producir 1,2-digli-

céridos y el fosforil-alcohol correspondiente.

Los materiales generalmente utilizados como fuente de esta enzima, son extractos de cultivos de *Clostridium welchii* o *Bacillus cereus*, liofilizados o crudos en tampones de glicerina (Chu, 1.949).

Se ha comprobado que según su procedencia biológica, exhiben una distinta especificidad de sustrato. Así, la fosfolipasa C de *Clostridium welchii* hidroliza fosfatidilcolinas y también esfingomielinas, aunque más lentamente, pero es poco activa frente a fosfatidiletanolaminas o fosfatidilserinas (Mc Farlane, 1.948). Sin embargo, en presencia de fosfatidilcolinas o esfingomielinas, se observa una mayor hidrólisis de fosfatidiletanolaminas (Takahashi y Schmid, 1.968). También hidroliza fosfatidiletanolaminas o fosfatidilserinas, cuando están incluidas en biomembranas (De Gier et al., 1.961), y plasmalógenos de etanolamina (Ansell y Spaner, 1.965). A partir del extracto crudo de fosfolipasa C de *Clostridium welchii* pueden separarse dos actividades enzimáticas, una selectiva para esfingomielinas y otra para fosfatidilcolinas (Pastón et al., 1.968).

La fosfolipasa C de *Bacillus cereus* hidroliza fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas o fosfatidilserinas (Chu, 1.949) liso-fosfatidilcolinas (Van Deenen, 1.966), fosfatidilgliceroles (Haverkate y Van Deenen, 1.964), cardiolípidinas (De Haas et al., 1.966) y 0-liso-fosfatidilgliceroles (Houtsmuller y Van Deenen, 1.965). Puede ser fraccionada en tres actividades enzimáticas distintas, una selectiva para fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas, otra para esfingomielinas y una tercera, activa frente a fosfatidilgliceroles (Slein y Logan, 1.965).

La influencia de las cadenas de acilo en la hidrólisis de lecitinas se pone de manifiesto en que la velocidad de hidrólisis decrece a medida que aumenta la insaturación (Graf y Stein, 1.966), o la longitud de la cadena de ácido graso (Van Deenen et al., 1.961) aunque este efecto podría estar relacionado con la

disminución de la solubilidad que confieren las cadenas alifáticas más largas.

La fosfolipasa C de bacterias presenta un óptimo a pH 7,0 (Chu, 1.949). Es activada por iones  $\text{Ca}^{++}$  e inactivada por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{NH}_4^+$  (Zamecnick et al., 1.947). La actividad enzimática aumenta en presencia de éter (Hanahan y Vercamer, 1.954).

b) Fosfolipasa D (EC. 3.1.4.4).-

La fosfolipasa D, cataliza la conversión de fosfoglicéridos en ácido fosfatídico, al hidrolizar el enlace que mantiene unido a este resto con la base nitrogenada correspondiente, que queda pues libre.

La enzima requiere iones  $\text{Ca}^{++}$  para llevar a cabo su actividad, viéndose ésta muy incrementada ante la presencia de dietil-éter. Su acción frente a fosfatidilcolinas ha sido demostrada ampliamente, pero con sustratos como liso-fosfatidilcolinas o plasmalógenos se ha llegado a resultados contradictorios (Long et al., 1.967; Kates, 1.953; Hack y Ferrans, 1.959; Lands y Hart, 1.965). Frente a fosfatidilglicerol o cardiolipinas no muestran actividad (De Haas et al., 1.966).

La fosfolipasa D se ha detectado en una gran cantidad de plantas (Heller et al., 1.968; Quarles y Dawson, 1.969), pero nunca en tejidos animales. Una característica singular es su actividad transferásica en presencia de alcoholes alifáticos, que origina en presencia de metanol, etanol o isopropanol y a partir de fosfatidilcolinas, los fosfatidatos de metilo, etilo e isopropilo correspondientes (Bonsen et al., 1.965).

c) Lipasa pancreática (EC. 3.1.1.3).-

La lipasa pancreática hidroliza los enlaces ester de las posiciones sn-1 y sn-3 de triglicéridos, produciendo 1,2 (2,3)-diglicéridos, 2-monoglicéridos y ácidos grasos libres.

La especificidad de esta lipasa fue puesta de manifiesto por Balls et al. (1.937). La fuente biológica de la que suele obtenerse comercialmente es el páncreas porcino.

La desacilación, ha de conducirse a pH alcalino, ya que

en caso contrario, la enzima puede favorecer una reacción inversa a la aquí descrita, con la consiguiente formación de enlaces éster primarios (Borgström, 1.964).

Por lo que se refiere a la metodología experimental, se sabe que el tiempo de reacción ha de ser corto (1-2 min.), para evitar posibles migraciones de acilo. Las condiciones de reacción han sido descritas por varios autores e incluyen: pH próximo a 8 (Schonheyder y Volquartz, 1.945; Bashys et al., 1.963), concentración de electrolito de 0,5 - 1,5 M (Mattson y Beck, 1.955), presencia de iones  $\text{Ca}^{++}$  (Schonheyder y Volquartz, 1.945; Chino y Gilbert, 1.965), relación enzima/sustrato elevada, agitación constante (Goodman y Dugan, 1.970) un agente emulsionante para aumentar al máximo la superficie de contacto (Sarda y Desnuelle, 1.958) y una temperatura de 37 - 40°C (Fritz y Melius, 1.963).

La desacilación de los sn-1,2 (2,3)-diglicéridos o sus acetil derivados se realiza mediante los mismos procedimientos que para triglicéridos (Renkonen, 1.965; Kleiman et al., 1.967).

La especificidad de esta lipasa por las posiciones sn-1 y sn-3, es superior al 97% (Borgstrom, 1.964; Mattson y Volpenhein, 1.968), habiéndose comprobado que la ocasional liberación de ácidos grasos en posición sn-2 es debida a una migración del acilo o a una contaminación por una lipasa no específica. Varios autores han observado que, a igualdad de longitud de cadena, la lipasa pancreática hidroliza con mayor rapidez a los ácidos grasos más insaturados (Coleman, 1.963). Esta cierta especificidad se ve disminuida por la adición de hexano a la mezcla de reacción (Brockerhoff, 1.965; Sampugna y Jensen, 1.967; Christie y Moore, 1.969).

Los sn-2-monoglicéridos resultantes, son representativos de la posición sn-2 del triglicérido original y se puede utilizar pues, en la determinación de distribuciones posicionales.

Ha podido demostrarse que la lipasa pancreática es activa también sobre los dimetilesteres del ácido fosfatídico, siguien-

do un esquema de actuación análogo al descrito para triglicéridos o diglicéridos, esto es, separando de la molécula al ácido graso en posición sn-1 (Renkonen, 1.968 a).

#### 1.4.2.3. Metodologías.-

La determinación de las especies moleculares que constituyen un fosfoglicérido dado, puede abordarse en la actualidad, siguiendo varias metodologías diferentes. De ante mano, no existen razones para decidir cual de ellas ha de ser utilizada en cada caso, ya que su poder de resolución depende en gran medida de la constitución en cadenas apolares del fosfoglicérido en cuestión y de la abundancia relativa con que se presentan en éste las distintas especies moleculares. Dado que esta información se alcanza, evidentemente, a posteriori, la elección de método resulta ser totalmente empírica, haciendo tanteos previos, hasta alcanzar la cromatografía de argentación, etapa crucial que nos indica en que medida es útil el método ensayado.

El método desarrollado y empleado extensamente por el grupo de Van Deenen (Monfoort et al., 1.971) consta de tres etapas: 1) hidrólisis del fosfoglicérido (casi siempre fosfatidilcolina) con fosfolipasa C, con producción de una mezcla de sn-1,2-diglicéridos, 2) resolución de esta en grupos de especies moleculares por cromatografía de argentación y 3) hidrólisis de cada uno de estos grupos de especies moleculares con lipasa pancreática para obtener así información acerca de la distribución posicional de los restos de acilo. En la primera etapa, siempre que la hidrólisis sea cuantitativa y no se produzcan isomerizaciones a sn-1,3-diglicéridos, se consigue con facilidad que la mezcla de especies moleculares de los sn-1,2-diglicéridos, sea representativa de las especies moleculares del fosfoglicérido original.

La resolución, por cromatografía de argentación, de los

sn-1,2-diglicéridos en varios grupos de especies moleculares de distinto grado de insaturación, es como ya se comentó anteriormente, el paso crucial del análisis. Esta técnica ha sido utilizada, entre otros autores, por Van Golde y Van Deenen (1.967), Van Golde et al. (1.967) y Monfoort et al. (1.971), que han dado cuenta del riesgo existente de isomerización de sn-1,2-diglicéridos a sn-1,3-diglicéridos durante el proceso cromatográfico, con la consiguiente repercusión en el análisis.

La información obtenida a base de la aplicación de este método, en sus tres etapas, acerca de la distribución posicional de cadenas de acilo dentro de un grupo poco numeroso de especies moleculares que poseen en común un grado de insaturación determinado, puede ser determinante o no de la identidad precisa y abundancia de las especies moleculares contenidas en dicho grupo. Así, una fracción de sn-1,2-diglicéridos monoénicos que contuviese cadenas de palmítico, esteárico y oléico en ambas posiciones, estaría completamente determinada en cuanto al número y clase de sus especies moleculares constituyentes, viniendo las abundancias relativas de las mismas dadas por las fracciones molares de los ácidos grasos ligados a cada una de las posiciones; en cambio, una fracción de sn-1,2-diglicéridos saturados integrada por cadenas de palmítico y esteárico, se hallaría sólo en parte determinada en cuanto a número y clase de sus especies moleculares e indeterminada en cuanto a las abundancias de las mismas, de las que sólo podría establecerse una distribución estadística. Ahora bien, esta limitación es más aparente que real, ya que con frecuencia la participación de ciertos ácidos grasos en alguna de las dos posiciones de los sn-1,2-diglicéridos con un determinado grado de insaturación, es muy baja, dando así lugar a especies moleculares minoritarias, cuya omisión es justificable, teniendo en cuenta el error que todo método experimental arrastra.

Con objeto de evitar la isomerización observada en la an-

terior metodología, de los sn-1,2-diglicéridos a sn-1,3-diglicéridos durante la cromatografía de argentación, se han desarrollado dos aproximaciones distintas cuya meta es producir un bloqueo de la posición sn-3 libre del glicerol.

Renkonen (1.965) observo que los sn-3-acetil derivados de los sn-1,2-diglicéridos podían resolverse por cromatografía de argentación de un modo similar a los triglicéridos. Para obtener el acetil derivado, se ensayo, en un primer intento, una acetolisis directa del fosfolípido con acético glacial, pero el resultado no fue satisfactorio pues, la composición en ácidos grasos del sn-3-acetil derivado obtenido, no era representativa del fosfoglicérido original. Renkonen (1.966), introdujo posteriormente una variante de este procedimiento que consiste en la hidrólisis del fosfoglicérido con fosfolipasa C para dar el sn-1,2-diglicérido correspondiente, seguida de acetilación, en condiciones muy controladas, de la posición sn-3. Los sn-3-acetil derivados así obtenidos si son representativos del fosfoglicérido de partida y su separación por cromatografía de argentación resulta satisfactoria, aún cuando en ocasiones sea menos resolutiva que cuando se emplean los sn-1,2-diglicéridos directamente. Una vez separados los distintos grupos de especies moleculares de 3-acetil-1,2-diacil-sn-glicerol según su grado de insaturación, se procede, como en el método anterior, a una hidrólisis con lipasa pancreática de cada uno de estos grupos, que nos da información acerca de la distribución posicional a partir de la cual se pueden estimar las especies moleculares constituyentes, con las mismas limitaciones, en cuanto a la posibilidad de indeterminación, que el método de Van Deenen.

Renkonen (1.968·a) ha desarrollado un tercer método de análisis de especies moleculares, en el cual tras una hidrólisis con fosfolipasa D del fosfoglicérido inicial, el ácido fosfatídico resultante pasa a convertirse en el dimetil-éster derivado por tratamiento con diazometano. La mezcla de fosfa-

tidatos puede resolverse por cromatografía de argentación, con una resolución comparable a la de los métodos anteriormente descritos y con una gran ventaja frente a éstos: la posición sn-3 del glicerol en ningún momento queda libre y el riesgo de isomerización es por tanto nulo. Las distintas fracciones de fosfatidatos de dimetilo, son subceptibles de hidrólisis con lipasa pancreática, pudiendose obtener así la información relativa a la distribución posicional de las cadenas de acilo, pudiendose calcular a continuación las especies moleculares constituyentes.

Otra posibilidad de análisis la ofrece el fraccionamiento directo, de fosfolípidos intactos, demostrado por Arvidson (1.965, 1.967 y 1.968 a y b). Esta técnica que, en principio parece el modo más directo de abordar el problema, ofrece separaciones las más de las veces incompletas, que por otro lado no son fáciles de reproducir. En la literatura se describen fraccionamientos parciales (Kyriakides y Balint, 1.968; Nakayama y Kawamura, 1.967; Tinoco et al., 1.967 y 1.970; Haverkate y Van Deenen, 1.965), existiendo una general coincidencia en señalar una separación satisfactoria de especies moleculares en tres grupos: saturadas-monoenóicas-dienóicas, tetraenóicas y hexaenóicas, aunque ello parece estar en función del tipo concreto de fosfoglicérido estudiado. A través de esta técnica se consigue, en cualquier caso, una información más incompleta e imprecisa acerca del fosfoglicérido estudiado, pero no obstante, este puede ser el procedimiento de elección en determinados estudios metabólicos.

MATERIALES

Y

METODOS

## 2.1. REACTIVOS .-

En el desarrollo de la presente investigación, se utilizaron los siguientes reactivos:

- Fosfolipasa A<sub>2</sub> (EC. 3.1.1.4) de veneno de *Crotalus adamanteus*, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A.).

- Fosfolipasa C (EC. 3.1.3.4) de extracto liofilizado de cultivos de *Clostridium welchii*, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A.).

- Lipasa pancreática (EC. 3.1.1.3) de origen porcino, Calbiochem (Los Angeles, U.S.A.).

- Trifluoruro de boro, Fluka (G.D.R.).

- Patrones de esteres metílicos de ácidos grasos, Applied Science Lab. (State College, Pa, U.S.A.) y Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A.).

- ATP, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A.).

- Coenzima A, Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo, U.S.A.).

- Tris (Tri-hidroximetil aminometano) - ClH y tris - base, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A.).

- Albúmina de bovino, Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. U.S.A.).

- PPO (2,5-difenil oxazol) y POPOP (1,4 bis-2-(5-feniloxazolil) benceno), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, U.S.A.).

- Reactivo de Folin - Ciocalteu, E. Merck A. G. (Darmstadt, G.D.R.).

- Kieselgel G, E. Merck A.G. (Darmstadt, G.D.R.).

- Acido pentadecanóico, E. Merck A.G. (Darmstadt, G.D.R.).

- Acido palmítico-1-<sup>14</sup>C (actividad específica 58 mCi/mM), The Radiochemical Center, Amersham (Buckinghamshire, G.B.).

- Acido palmítico-U-<sup>14</sup>C (actividad específica 928 mCi/mM), The Radiochemical Center, Amersham (Buckinghamshire, G.B.).

El resto de los compuestos no reseñados en este apartado y empleados según se describe de 2.3. a 2.7. fueron de grado analítico.

Todos los disolventes utilizados, fueron destilados previamente en recipientes de vidrio, rigurosamente exentos de contaminantes lipídicos.

## 2.2. MATERIAL BIOLÓGICO.--

Se utilizaron encéfalos completos de embriones de pollo doméstico, *Gallus gallus*, de raza Yaniv, y de pato doméstico, *Anas boschas*, procedentes de huevos fecundados que fueron incubados hasta puntos escogidos de su desarrollo embrionario. Dichos puntos fueron los 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 24 días de incubación para el caso del pollo, y los 17, 22, 28 y 32, para el del pato, que, dada la distinta duración de los períodos de incubación en ambas especies (21 días para el pollo y 28 días en el pato), resultan ser equivalentes a los 13, 17, 21 y 24 días del pollo, hecho que pudo comprobarse, en lo que se refiere a variaciones porcentuales de peso seco y peso húmedo en el embrión total, hígado y cerebro de ambos (Romanoff, 1.967).

Las condiciones de la incubación, llevada a cabo en una incubadora tipo Jamesway, fueron las siguientes: a) temperatura de 37°C, b) humedad relativa del 84 % y c) volteo automático cada 2 horas.

Los encéfalos obtenidos de los embriones, en número variable según la edad (de 25 a 200 aproximadamente), se reunieron y lavaron en un solución de sacarosa 0,25 M a 0 - 5°C, secándose antes de proceder a su pesada y homogeneizándose a continuación, al 30 % en agua destilada, en un homogeneizador de aspas (Omni-Mixer Sorvall) a 16.000 r.p.m. durante 3 minutos a 0°C, excepto en el caso de que el material biológico en cuestión, estuviera destinado a experiencias de incorporación de precursores radioactivos, en las cuales se procedió tal como se describe en el apartado 2.3.1.

A continuación se llevó a cabo la extracción de los lípidos totales del homogeneizado (ver apartado 2.4.).

Simultaneamente, se recojieron los vitelos nutritivos correspondientes a los embriones de pato de 17, 22 y 28 días del desarrollo, extrayéndose también de ellos los lípidos totales.

## 2.3. PREPARACION DEL SISTEMA DE INCORPORACION "IN VITRO" DE PRECURSORES RADIOACTIVOS.-

### 2.3.1. PREPARACION DE HOMOGENEIZADOS.-

En las experiencias de incorporación "in vitro" de precursores marcados, se utilizaron encéfalos completos procedentes de embriones de pollo de 13, 17 y 21 días de incubación, que una vez recolectados, se lavaron y mantuvieron en tampón Tris 0,02 M - Cl K 0,125 M a pH 7,4, donde se homogeneizaron en un homogeneizador Potter - Elvehjem de vidrio, provisto de émbolo de teflón. El homogeneizado resultante se sometió a una centrifugación a 3.000 x g durante 10 minutos, en una centrífuga Sorvall RC-2-B provista de un rotor SS-34, utilizándose el sobrenadante como fuente enzimática para la experimentación. A dicho sobrenadante se añadió el volumen necesario de tampón Tris 0,02 M - Cl K 0,125 M, pH 7,4 para conseguir, tras la valoración oportuna (apartado 2.3.2.), que la concentración de proteínas fuese exactamente de 30 mg/ml. Todas las operaciones reseñadas, se llevaron a cabo a temperaturas de 0 - 2°C.

### 2.3.2. VALORACION DE PROTEINAS.-

Las valoraciones de proteínas se realizaron según el método descrito por Lowry et al. (1.951), por duplicado, sobre soluciones diluidas 1:250 y 1:500 con agua destilada, procedentes de los sobrenadantes a que se refiere el apartado anterior. A 1,0 ml de muestra, se añadieron 5,0 ml de una solución recién preparada, compuesta de 50 volúmenes de carbonato sódico al 2 % en hidróxido sódico 0,1 N y 1 volumen de sulfato cúprico al 0,5 % en tartrato sódico-potásico al 1 % en

agua destilada, agitando a continuación y dejando que transcurra la reacción a temperatura ambiente, durante 15 minutos, al cabo de los cuales se añadieron 0,5 ml del reactivo de Folin - Ciocalteu diluido en agua destilada (1:1, v/v), agitando nuevamente y leyendo las absorvancias, transcurridos 30 minutos, a 740 nm.

La concentración proteica se determinó por interpolación de los valores de absorvancia así obtenidos con una recta patrón construida, en idénticas condiciones de reacción, con cantidades conocidas de una solución de albúmina bovina (de 20 a 160  $\mu\text{g/ml}$ ). Dicha recta patrón se construyó con ocasión de cada una de las valoraciones.

### 2.3.3. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE INCUBACION.-

Los sustratos marcados se sonicaron durante 2 minutos, en un volumen adecuado de solución de albúmina bovina en tampón Tris 0,02 M - Cl K 0,125 M, pH 7,4 (6 mg/ml), con un sonicador MSE (Medium-5) provisto de sonda MCR  $\varnothing$  16, para llevarlos a una suspensión acuosa homogénea.

Las incubaciones se realizaron en tubos de vidrio Pyrex, de un volumen total aproximado de 15 ml, donde se añadieron 0,5 ml del sobrenadante al que se refiere al apartado 2.3.1., con una concentración de proteínas de 30 mg/ml, junto con un pequeño volumen de la suspensión acuosa del sustrato radioactivo y otro, de una solución conteniendo los cofactores adecuados, completando con tampón, hasta un volumen final de 1 ml.

Las mezclas contenidas en los distintos tubos, se incubaron en baño termostaticado, a 37<sup>o</sup>C, con agitación constante durante los siguientes tiempos: 2, 5, 10, 20, 45 y 90 minutos, pasados los cuales, se detuvo la reacción por inmersión en baño de hielo y adición de 3 ml. de una mezcla cloroformo/metanol (1:2,1, v/v), que da paso directamente al proceso de

extracción de lípidos totales.

Los resultados que se desprendieron de este tipo de investigaciones, se obtuvieron para cada etapa del desarrollo, a partir de dos experiencias distintas, con distinto material biológico de partida, y tomando por duplicado los tubos correspondientes a cada una de ellas.

#### 2.4. AISLAMIENTO DE LIPIDOS TOTALES.-

Se llevó a cabo según el método dado por Bligh y Dyer (1.959). Tanto a los homogeneizados descritos en 2.2., como a los medios de incubación descritos en 2.3.3., se añadieron 3 volúmenes de cloroformo/metanol (1:2,1, v/v), agitando a continuación hasta conseguir mezclas monofásicas. Seguidamente se adicionaron 1 volumen de cloroformo y 1 volumen de agua destilada, agitando nuevamente y separando a continuación ambas fases por centrifugación (figura 3). Los extractos cloroformicos una vez reunidos, se lavaron con un volumen aproximadamente igual de Cl Na 0,73 %. La fase cloroformica se separó por decantación y después de secada a 0°C sobre  $SO_4Na_2$  anhidro y bajo nitrógeno, se filtró y llevó a sequedad, bajo presión reducida, en un rotavapor.

Los extractos lipídicos así obtenidos, quedaron guardados a  $-20^{\circ}C$ , bajo atmósfera de nitrógeno, hasta su utilización.

SISTEMA MONOFASICO

+ 1 vol. de  $\text{Cl}_3\text{CH}$

+ 1 vol. de  $\text{H}_2\text{O}$

5.000 r.p.m., 10 min.

Fase superior

Fase inferior 1

+ 2 vol. de  $\text{Cl}_3\text{CH}$

Fase superior

Fase inferior 2

+ 2 vol. de  $\text{Cl}_3\text{CH}$

Fase superior

Fase inferior 3

+ 1 vol. de  $\text{Cl}_3\text{CH}$

Fase superior  
(se desecha)

Fase inferior 4

Fase inferior 1 + 2 + 3 + 4

+ Cl Na 0,73 %

↓  
decantación

EXTRACTO DE LIPIDOS TOTALES

FIGURA 3: METODO DE EXTRACCION DE LIPIDOS TOTALES

## 2.5. METODOS CROMATOGRAFICOS.--

### 2.5.1. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE ACIDO SILICICO.--

Se ha utilizado cromatografía monodimensional para separar los lípidos polares de los neutros y las diferentes clases de ambos entre sí. La cromatografía bidimensional se usó para controlar la pureza de las diferentes fracciones de fosfoglicéridos y para el análisis cuantitativo de los mismos.

#### 2.5.1.1. Preparación de las placas.--

Se utilizaron placas de vidrio con unas dimensiones de 20 x 20 cm y la extensión del adsorbente utilizado, Kieselgel G (nach stahl), se realizó con un extendedor Shandon.

La suspensión del adsorbente en agua, se realizó inmediatamente antes de la extensión, usando, según el espesor que se desee obtener, las proporciones de: 30 g de Kieselgel G/60 ml de agua, para un espesor de 300  $\mu\text{m}$ ; 40 g de Kieselgel G/80 ml de agua, para un espesor de 500  $\mu\text{m}$  y 90 g de Kieselgel G/160 ml de agua, para un espesor de 1.000  $\mu\text{m}$ . Estas cantidades arriba expresadas, son suficientes para cubrir 5 placas de 20 x 20 cm.

Las placas ya tendidas se dejaron secar a temperatura ambiente e inmediatamente antes de su utilización, se activaron a 110°C durante 1 hora y 15 minutos, dejándolas después enfriar en estufa a 40°C.

#### 2.5.1.2. Sistemas cromatográficos utilizados.--

Los sistemas empleados para el desarrollo de los cromatogramas

togramas, fueron los siguientes:

Lípidos neutros:

- a) n-hexano/dietil-éter/ácido acético (50:50:1, v/v/v)
- b) n-hexano/dietil-éter/ácido acético/metanol (60:40:1:1, v/v/v/v)

Lípidos polares:

- a) cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v/v)
- b) n-butanol/ácido acético/agua (60:20:20, v/v/v).

En todos los casos, las placas se desarrollaron por cromatografía ascendente, en cubetas de borosilicato con tapa esmerilada y en atmósfera saturada del sistema cromatográfico utilizado.

### 2.5.1.3. Reveladores.-

En todos los procesos cromatográficos en capa fina, se utilizaron reveladores para determinar la localización de las distintas bandas en que quedan fraccionadas las muestras cromatografiadas. Estos reveladores, unas veces fueron específicos, para identificar un determinado tipo lipídico, y otras veces fueron generales.

Reveladores generales:

- a) vapores de yodo (Mangold, 1.960; Sims y Larose, 1.962): la placa de cromatografía se introduce en una cubeta saturada de vapores de yodo, con lo que aparecen los lípidos, tanto neutros como fosfolípidos, como manchas marrones sobre fondo claro. Al poco tiempo de sacar la placa de la cubeta, el yodo sublima y las manchas desaparecen.
- b) 2', 7'-diclorofluoresceína (Mangold, 1.960 y 1.961): tras rociar el cromatograma con una solución de 2', 7'-diclorofluoresceína al 0,05 % en metanol/agua (1:1, v/v), los lípidos se visualizan bajo luz ultravioleta, como manchas de color verde brillante sobre fondo amarillo-verdoso. Este revelador no destruye los lípidos y es más sensible para lípidos neutros

que para polares.

c) Rodamina-6-G al 0,1 % en metanol (Mangold, 1.961): los lípidos aparecen, sobre todo bajo luz ultravioleta, como manchas de color rosa fluorescente sobre fondo naranja. No es destructivo y resulta más sensible para lípidos neutros que para fosfolípidos.

Reveladores específicos:

a) Ninhidrina al 0,2 % en etanol (Skipski et al., 1.962): se utiliza para detectar fosfolípidos que contengan grupos amino libres (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y lisoderivados de estos). Se rocía la placa con la solución y se calienta 5 minutos a 110°C, apareciendo los lípidos como manchas púrpura sobre fondo blanco. Es un revelador destructivo.

b) reactivo de Dittmer (Dittmer y Lester, 1.964): es un revelador específico para fosfolípidos ya que detecta los esterres fosfóricos. Se prepara de la siguiente forma:

solución I: 40,11 g de Mo O<sub>3</sub> se disuelven calentando en 1 l de SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 25 N y se deja enfriar a temperatura ambiente.

solución II: 1,78 g de Mo en polvo, se disuelven calentando en 500 ml de solución I, dejando enfriar y decantar los residuos sólidos.

El revelador está formado por la mezcla de 1 volumen de solución I, 1 volumen de solución II y 2 volúmenes de agua. Resulta de un color verde-amarillento, pero si se ha usado poca agua puede ser azul y si mucha, amarillo. Puede detectar hasta 5 nmoles de fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina. Los fosfolípidos aparecen como manchas de color azul intenso sobre fondo blanco. Este reactivo es destructivo y da reacción positiva con fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, cardiolipina, esfingomielina y ácido fosfatídico.

#### 2.5.1.4. Análisis cuantitativo de fosfolípidos.-

Se utilizaron placas de Kieselgel G de 300 µm de espesor

lavadas previamente en un sistema de composición metanol/cloroformo/ácido fórmico (2:1:1, v/v/v) y secadas durante 12 horas a 40°C. Los lípidos totales (0,5 mg) se aplicaron en forma puntual, a 2 cm del borde inferior derecho de la placa, que se desarrolló en el sistema cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v/v) en primer lugar, y butanol/ácido acético/agua (60:20:20, v/v/v) en segundo lugar.

Después de desarrollada la placa y una vez evaporados los disolventes, se reveló con iodo, delimitando las manchas de fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas, y cuando el iodo hubo sublimado se rascaron y transfirieron a matraces Kjeldhal. En otros matraces de este tipo, se transfirieron por una parte, una zona de la placa libre de lípidos, para determinar el "cero" de fósforo y por otra, una cantidad conocida de lípidos totales (0,25 mg) para determinar el fósforo total contenido en la muestra. Hecho esto, se dejaron los matraces una noche en estufa a 110°C, para eliminar toda traza de disolvente orgánico. El conjunto de los matraces se sometió a las siguientes operaciones (Bartlett, 1.959): se adicionaron 0,9 ml de ácido perclórico al 70 %, introduciendo a continuación los matraces en un baño de arena mantenido a 260°C durante 25 minutos, transcurridos los cuales, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, tras lo cual, se adicionaron 7,0 ml de agua destilada, 1,0 ml de molibdato amónico al 25 % (p/v) y 1,0 ml de ácido ascórbico al 10 % (p/v) y se calentaron en baño de agua hirviendo durante 5 minutos, deteniendo después la reacción por inmersión en baño de hielo. Seguidamente se transvasó el contenido de los matraces a tubos, para eliminar, por centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos en una centrífuga de mesa Wifug, el ácido silícico contenido en cada muestra, leyendose a continuación las absorbancias a 820 nm.

A partir de los valores así obtenidos, se calculó la concentración de fósforo en cada muestra por interpolación sobre una recta patrón, que fue construida en cada experiencia,

procesando de modo análogo al descrito, varios volúmenes conocidos de una solución de fosfato amónico de concentración 2  $\mu\text{g}$  de fósforo/ml.

#### 2.5.1.5. Fraccionamiento de lípidos totales.-

Para conseguir la separación de las distintas clases de lípidos polares integrantes de los extractos lipídicos totales, en orden a su transesterificación y posterior análisis de ácidos grasos o al estudio de la distribución de la radioactividad, caso de que procedan de las experiencias de incorporación de precursores marcados, se utilizaron placas de Kieselgel G de 500  $\mu\text{m}$  de espesor. Los lípidos totales, disueltos en un pequeño volumen de cloroformo, se aplicaron en forma de banda estrecha de una longitud acorde con la cantidad de lípidos a cromatografiar (aproximadamente 1 cm de longitud por cada mg de lípidos totales). Para el desarrollo de las placas se utilizó el sistema cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v/v), localizándose a continuación las distintas bandas de fosfolípidos con vapores de yodo o por rociado con Rodamina-6-G.

Las fosfatidilcolinas necesarias para su posterior hidrólisis con fosfolipasa A<sub>2</sub> y fosfolipasa C, se obtuvieron, fraccionando 300 mg de lípidos totales en 10 placas de Kieselgel G de 1.000  $\mu\text{m}$  de espesor, con el sistema cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v/v). Las bandas de fosfolípidos resultantes del fraccionamiento, se localizaron revelando dos franjas estrechas a ambos lados de las placas con reactivo Dittmer, recojiéndose a continuación la correspondiente a fosfatidilcolinas, que se eluyeron exhaustivamente del silíceo con sucesivas porciones de cloroformo/metanol (2:1, 1:1, 1:2, 1:9, v/v) y metanol absoluto. Los extractos procedentes de estas eluciones se reunieron y llevaron a sequedad, bajo presión reducida, controlándose a continuación la pureza de la fracción por cromatografía bidimensional del mismo tipo que la que se describe en el apartado 2.5.1.4.

Para la obtención de fosfatidilcolinas marcadas, procedentes de las experiencias de incorporación de precursores radioactivos, en orden a su fraccionamiento por cromatografía de argentación y posterior análisis de la distribución de la radioactividad en los distintos grupos de especies moleculares, se procedió de igual modo al anteriormente descrito para lecitinas sin marcar, con la salvedad de que las placas utilizadas fueron de 500  $\mu\text{m}$  y de que la cantidad de lípidos totales a fraccionar fue, tan sólo, la correspondiente a las 2/3 partes del extracto lipídico procedente de cada uno de los tubos de incubación.

Para la separación de las diferentes clases de lípidos neutros presentes en los extractos lipídicos totales, sea cual fuere el origen de estos, se utilizaron placas de 500  $\mu\text{m}$  de espesor. Se aplicaron cantidades de 2 - 6 mg de lípidos, disueltos con cloroformo, en forma de banda estrecha de longitud aproximadamente igual a 1 cm y una vez evaporado el disolvente, las placas se desarrollaron en el sistema n-hexano/dietil-éter/ácido acético/metanol (60:40:1:1, v/v/v/v), visualizándose las distintas fracciones con vapores de yodo o por rociado con Rodamina-6-G y recojiéndose a continuación para su transesterificación y posterior análisis de ácidos grasos o para proceder al estudio de la distribución de la radioactividad.

#### 2.5.2. CROMATOGRAFIA DE ARGENTACION.-

Esta técnica se ha utilizado, con distintas modalidades, para el fraccionamiento de fosfatidilcolinas o de 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol en grupos de especies moleculares, atendiendo al número total de insaturaciones presentes en estas moléculas sobre los restos de acilo de las posiciones sn-1 y sn-2 del glicerol.

#### 2.5.2.1. Fraccionamiento de fosfatidilcolinas.-

Las fosfatidilcolinas presentes en los extractos lipídicos de las incubaciones con precursores radioactivos, se fraccionaron por cromatografía de argentación de acuerdo esencialmente con el método de Kiriakides y Balint (1.968) y Arvidson (1.968 a y b). Para la preparación de las placas, se suspendieron 16 g de Kieselgel G en 32 ml de una solución acuosa de nitrato de plata al 3 % (p/v), siendo estas cantidades suficientes para obtener 2 placas de 20 x 20 cm con 500  $\mu$ m de espesor. Una vez tendidas las placas, se dejan secar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos, activándose a continuación durante 35 minutos a 110°C. La aplicación de los lípidos disueltos en un pequeño volumen de cloroformo/metanol (2:1, v/v), se realizó sobre las placas recién activadas, en forma de banda estrecha de una longitud tal que mantuviera la relación de 1 mg de lecitinas por cada cm de aplicación.

El sistema cromatográfico utilizado (Arvidson, 1.967) fue cloroformo/metanol/agua (60:30:5, v/v/v). Todas estas operaciones se llevaron a cabo en la oscuridad.

Las distintas bandas en que quedaron fraccionadas las lecitinas se visualizaron, tras rociar con la solución de 2', 7'-diclorofluoresceína, bajo luz ultravioleta, tras lo cual, se recojieron para proceder a su extracción, transesterificación y posterior análisis de ácidos grasos o al estudio de la distribución de la radioactividad.

#### 2.5.2.2. Fraccionamiento de 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol.-

Los 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol obtenidos por acetilación de los 1,2-diacil-sn-glicerol, fueron fraccionados según el número de dobles enlaces (Van Golde, 1.968), en placas con 500  $\mu$ m de espesor de Kieselgel G impregnadas con nitrato de plata. Estas placas se prepararon por suspensión de 16 g de ácido silícico en 32 ml de una solución acuosa de

nitrate de plata al 10 % (p/v), cantidad suficiente para dos placas de 20 x 20 cm. Una vez tendidas, las placas se dejaron secar en la oscuridad durante 20 minutos, transcurridos los cuales se activaron a 110°C durante 35 minutos, quedando así listas para su uso.

Los 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol (1 - 10 mg) se aplicaron, disueltos en un pequeño volumen de cloroformo, en forma de banda estrecha de una longitud adecuada (ver apartado anterior) y se desarrollaron en el sistema benceno/cloroformo/metanol (90:10:1, v/v/v). Una vez desarrolladas se secaron bajo atmósfera de nitrógeno, y se desarrollaron a continuación en el sistema benceno/cloroformo/metanol (90:10:2,5, v/v/v) hasta una altura aproximada de 10 cm. Las placas se secaron bajo atmósfera de nitrógeno y las diferentes bandas fueron localizadas, tras un examen bajo luz ultravioleta, por rociado con la solución de 2', 7'-diclorofluoresceína. Todas las operaciones fueron realizadas en la oscuridad para evitar el ennegrecimiento de las placas y la oxidación del material.

Los 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol correspondientes a cada banda fueron extraídos, tres veces, con éter en un sistema bifásico éter - solución acuosa de cloruro sódico al 1 % (p/v). El extracto etéreo fue lavado con agua destilada, secado sobre sulfato sódico, filtrado y concentrado a sequedad para su posterior transesterificación (1/5 de cada fracción) e hidrólisis con lipasa pancreática (4/5 de cada fracción).

Las abundancias relativas de las distintas fracciones de 1,2-diacil-3-acetil-sn-glicerol, separados de esta forma, se determinaron añadiendo a cada una de ellas, como patrón interno, una cantidad conocida de un ácido graso que no estaba presente en la muestra de partida (en este caso se utilizó pentadecanoato de metilo, añadido a los ésteres metílicos procedentes de cada fracción).

En el estudio de la distribución de la radioactividad,

no fue necesario proceder a la extracción de las fracciones de 1,2-diacil-3-acetil-sn-gliceroles, determinándose aquella directamente sobre las mismas, todavía adsorbidas sobre el soporte Kielselgel - nitrato de plata.

### 2.5.3. CROMATOGRAFIA DE GASES.-

La cromatografía de gases se utilizó para llevar a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo de los ésteres metílicos de los ácidos grasos procedentes de cualquiera de los lípidos objeto de estudio, o de las fracciones de estos resultantes de la cromatografía de argentación.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5750-G, equipado con un detector de ionización de llama y dos columnas de acero inoxidable de 6 pies de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, rellenas de polisuccinato de etilenglicol al 20 % sobre Chromosorb W (80 - 100 mesh).

Las temperaturas a las que se mantuvieron las columnas, el inyector y el detector, fueron respectivamente de 180, 300 y 250°C, usándose como gas portador helio con un caudal de 40 ml/minuto.

Las muestras se inyectaron en solución de hexano con una microjeringa Hamilton 701 RN de 10  $\mu$ l y los picos se identificaron por comparación de los tiempos de retención con patrones conocidos de ésteres metílicos de ácidos grasos.

El análisis cuantitativo se determinó por integración automático del área de los picos con un integrador-impresor Hewlett-Packard, 3370 A. Los factores de respuesta, son sensiblemente iguales para las especies moleculares analizadas con el detector empleado.

## 2.6. HIDROLISIS ENZIMATICAS.-

### 2.6.1. HIDROLISIS DE FOSFATIDILCOLINAS CON FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> (EC. 3.1.1.4).-

Esta técnica fue utilizada, de modo analítico, para determinar la distribución de los restos de acilo en masa o la distribución de la radioactividad, entre las posiciones sn-1 y sn-2 del glicerol, y de modo preparativo, para la obtención de liso-fosfatidilcolinas marcadas utilizables como sustrato.

Para llevar a cabo la hidrólisis, se tomaron 3,0 mg de fosfolipasa A<sub>2</sub> deslipidizada dos veces con éter, junto con 0,2 ml de tampón borato 0,1 M pH 7,2, 0,2 ml de Cl<sub>2</sub>Ca 5 mM y entre 2 - 5 mg de fosfatidilcolinas disueltas en 2,0 ml de éter recién destilado. La mezcla se incubó bajo atmósfera de nitrógeno, 2 horas y 45 minutos a 29°C, agitando fuertemente en un agitador-incubador NBS Giratory. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo por inmersión en baño de hielo y adición de 4,0 ml de metanol, concentrando seguidamente a sequedad, bajo presión reducida, en un rotavapor. Posteriormente, todo el producto de reacción se cromatografió en capa fina de ácido silícico (500 µm) usando el sistema de desarrollo cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v/v) (Van Golde y Van Deenen, 1.966).

Las bandas de liso-lecitinas y ácidos grasos libres se localizaron, rociando las placas con solución de Rodamina-6-G, bajo luz ultravioleta.

La determinación de los ácidos grasos de cada una de estas fracciones, se llevó a cabo, previa transformación de los mismos en esteres metílicos, por cromatografía de gases.

### 2.6.2. HIDROLISIS DE FOSFATIDILCOLINAS CON FOSFOLIPASA C (EC. 3.1.4.3).-

Para llevar a cabo la hidrólisis, se pusieron reactivos en estas proporciones: las fosfatidilcolinas (35 mg) disueltas en 5,0 ml de éter anhidro, se añadieron a una mezcla compuesta por 25 unidades de fosfolipasa C, 10,0 ml de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  5 mM y 8,0 ml de tampón Tris-Cl H 0,05 M pH 7,2, que había sido previamente deslipidizada con éter. Todo ello, se incubó a continuación durante 2 horas, a 29°C y con agitación constante en una incubadora de aire NBS Giratory. Pasado este tiempo, se extrajeron del medio de incubación los 1,2-diacil-sn-gliceroles resultantes con éter anhidro y se controló la reacción, cromatografiando una pequeña parte del extracto etéreo en el sistema de desarrollo n-hexano/dietil-éter/ácido acético (50:50:1, v/v/v). El resto del extracto etéreo se concentró a sequedad, con metanol, en un rotavapor. Esta etapa, presentó un rendimiento en peso de un 70 %.

Los 1,2-diacil-sn-gliceroles así obtenidos, se dispusieron para su inmediata acetilación, con el fin de evitar posibles isomerizaciones.

### 2.6.3. HIDROLISIS DE 1,2-DIACIL-3-ACETIL-sn-GLICEROLES CON LIPASA PANCREATICA (EC. 3.1.1.3).-

Para llevar a cabo la reacción se pusieron los 1,2-diacil-3-acetil-sn-gliceroles totales (1 - 2 mg) o bien fraccionados por cromatografía de argentación (4/5 partes de cada fracción), junto con 1,0 ml de tampón Tris-Cl H 1 M pH 8,0, 0,25 ml de desoxicolato sódico al 2,2 % (p/v) y 0,1 ml de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,1 % (p/v), sometiendo los después a sonicación durante 15 segundos, con un sonicador MSE (Medium-1) usando la sonda 71/34041 MCR ⊕ 16, para conseguir una buena emulsión. Inmediatamente después

de la sonicación, se añadió la lipasa pancreática, en proporción de 2 mg de lipasa por cada mg de lípido y se mantuvo con agitación manual, a 40°C durante 1 minuto y 15 segundos, pasados los cuales, se detuvo la reacción por adición de 3,0 ml de Cl H 6 N e inmersión en baño de hielo.

Los productos de reacción se extrajeron repetidas veces con éter y se separaron por cromatografía en capa fina (500  $\mu$ m), usando como sistema de desarrollo n-hexano/dietil-éter/ácido acético (50:50:1, v/v/v). Las bandas de monoglicéridos y ácidos grasos libres se visualizaron bajo luz ultravioleta, tras rociar la placa con solución metanólica de Rodamina-6-G. Los ácidos grasos constituyentes de cada una de estas fracciones, se analizaron por cromatografía de gases, previa conversión en los esteres metílicos correspondientes.

La fiabilidad del método, se comprobó por comparación de las distribuciones posicionales así obtenidas, con las correspondientes a las fosfatidilcolinas de partida usando fosfolipasa A<sub>2</sub>. En todas las experiencias, existió una concordancia satisfactoria entre ambos resultados.

## 2.7. MEDIDA DE LA RADIOACTIVIDAD.-

La medida de la radioactividad en las muestras indicadas, se llevó a cabo por centelleo líquido en un espectrómetro Packard Tri-Carb 3255, con los discriminadores totalmente abiertos (de 0 a 1.000) y una ganancia del 6 %. Bajo estas condiciones la eficacia del contaje se mantuvo alrededor de un 80 - 85 % para el  $^{14}\text{C}$ , y el orden de magnitud del fondo no superó las 50 c.p.m.

El líquido de centelleo utilizado, con una gran capacidad de disolución de materiales lipídicos, estaba compuesto por 10,5 g de PPO, 0,45 g de POPOP, 150 g de naftaleno y 1.500 ml de dioxano, completando finalmente con agua destilada hasta un volumen total de 1.800 ml.

Los viales que contuvieron muestras adsorbidas en kieselgel se agitaron, con el líquido de centelleo, para asegurar que los lípidos pasasen completamente a la disolución. Ensayos previos determinaron la no interferencia del ácido silícico en la determinación correcta de la radioactividad.

## 2.8. OTROS METODOS ANALITICOS.-

### 2.8.1. OBTENCION DE ESTERES METILICOS DE LOS ACIDOS GRASOS.-

La preparación de los esteres metílicos de los ácidos grasos presentes en todas las muestras lipídicas a que nos hemos referido en apartados anteriores, se llevó a cabo por transesterificación con el reactivo  $B F_3$ - metanol al 14 % (p/p). Este reactivo se preparó (Metcalf y Schmitz, 1.961) haciendo pasar una corriente continua de  $B F_3$  seco a través de metanol reactivo a  $0^{\circ}C$ , hasta que hubo absorbido la cantidad necesaria que se controló por peso.

Los lípidos a metanolizar se introdujeron en tubos de vidrio de paredes gruesas, donde se añadieron 1,0 ml del reactivo  $B F_3$  - metanol, 1,0 ml de metanol y 1,0 ml de benceno, que actúa como disolvente. Posteriormente, se cerraron estos tubos bajo atmósfera de nitrógeno y se mantuvieron a  $110^{\circ}C$  durante 1 hora, después de lo cual se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se abrieron, extrayéndose los esteres metílicos formados, dos veces con hexano en un sistema bifásico hexano-agua. El extracto resultante se lavó con agua destilada y se secó sobre sulfato sódico, bajo atmósfera de nitrógeno, eliminando después el sulfato por filtración y concentrando hasta un volumen adecuado (aproximadamente 10  $\mu$ l) para su análisis por cromatografía de gases.

### 2.8.2. PREPARACION DE LOS 1,2-DIACIL-3-ACETIL-sn-GLICEROLES.-

Para llevar a cabo la acetilación de los 1,2-diacil-sn-

-gliceroles, se pusieron éstos con un volumen de anhídrido acético en exceso de 1:24 en moles y un volumen aproximadamente igual de piridina anhidra, que actúa como disolvente. La mezcla se mantuvo, bajo nitrógeno, en baño de agua a 40°C, con agitación manual, durante un período de tiempo de 4 minutos, pasado el cual, la reacción se detuvo por adición de 3 ml de metanol e inmersión en baño de hielo. Se añadieron a continuación 5 ml de agua destilada y se extrajeron los productos de reacción, cuatro veces, con éter anhidro. Los extractos etéreos se lavaron dos veces con  $\text{Cl H } 2 \text{ N}$ , para eliminar la piridina, tres veces con  $\text{CO}_3\text{H Na}$  al 2 % (p/v), para eliminar el exceso de  $\text{Cl H}$  y tres veces con agua destilada, siendo después secados, bajo nitrógeno, con sulfato sódico. Una vez que los extractos etéreos quedaron secos, se filtraron y concentraron, para proceder por cromatografía en capa fina (500  $\mu\text{m}$ ), a la purificación de los 1,2-diacil-3-acetil-sn-gliceroles presentes en los productos de reacción. El sistema de desarrollo utilizado fue n-hexano/dietil-éter/ácido acético (50:50:1, v/v/v). Las bandas se localizaron, bajo luz ultravioleta, previo rociado del cromatograma con Rodamina-6-G.

La banda correspondiente a los 1,2-diacil-3-acetil-sn-gliceroles se eluyó varias veces con cloroformo en una placa porosa y el eluido se concentró a sequedad, quedando dispuesto para su metanolisis y/o su fraccionamiento por cromatografía de argentación.

El rendimiento en peso de esta etapa fue aproximadamente del 75 %.

RESULTADOS

Y

DISCUSION

### 3.1. CRITICA DE LA METODOLOGIA.--

Los estudios sobre la composición o el metabolismo de fosfoglicéridos, a nivel de especies moleculares de éstos, engloban un conjunto de métodos complejos, de los que se ha dado cuenta en el apartado 2. Algunos de estos, son especialmente críticos, bien porque limitan el rendimiento de todo el proceso, o bien porque sólo en condiciones experimentales rigurosamente controladas, rinden resultados reproducibles, imponiendo de este modo unos condicionamientos muy precisos en la puesta a punto y desarrollo de la experimentación. A este tipo de técnicas complejas y a sus particulares exigencias van dedicados los comentarios que se hacen a continuación.

#### 3.1.1. ACETILACION DE 1,2-DIACIL-sn-GLICEROLES.--

Esta acetilación tiene como único fin, ocupar la posición sn-3 de los 1,2-diacil-sn-gliceroleos resultantes de la hidrólisis con fosfolipasa C, a fin de evitar una posible isomerización a 1,3-diacil-sn-gliceroleos.

La acetilación selectiva en la posición sn-3, sólo se consigue en condiciones experimentales muy controladas, pudiéndose comprobar que está en dependencia con el tiempo de reacción, con la naturaleza del sustrato biológico y con el exceso del reactivo donador del acetilo, que en este caso fue el anhídrido acético. La distinta naturaleza del material biológico, debe ser lo que ocasione que las condiciones experimentales de la acetilación descritas por otros autores (Kuksis y Marai, 1.967; Privett y Nutter, 1.967; Hunter et al.,

1.973; González Ros, 1.974), varíen considerablemente. En el presente trabajo, tras minuciosos tanteos, los tiempos de reacción utilizados fueron de 4 minutos, manteniendo la temperatura a 40°C y el exceso de anhídrido acético en 1:24 en moles, pudiéndose comprobar que a mayores valores de cualquiera de estas variables se favorece una reacción de acetólisis, conducente a la formación, en cantidad muy apreciable, de diacetatos de monoglicéridos, con la consiguiente disminución del rendimiento en acetatos de diglicéridos. En las condiciones descritas, los 3-acetil-1,2-diacil-sn-gliceróles, resultaron ser cualitativamente representativos de las fosfatidilcolinas de partida (ver apartado 3.4.).

### 3.1.2. FRACCIONAMIENTO DE LOS 3-ACETIL-1,2-DIACIL-SN-GLICERÓLES.-

La técnica utilizada para llevar a cabo el fraccionamiento, por cromatografía de argentación, de los 3-acetil-1,2-diacil-sn-gliceróles ha sido, salvo ligeras modificaciones, la descrita por Abad et al. (1.976), puesta a punto en este laboratorio. Dicha técnica, rinde una buena separación entre grupos de especies moleculares disaturadas, monoénicas, diénicas, tetraénicas y hexaénicas, si bien en el trabajo previamente citado (Abad et al., 1.976), debido a la especial abundancia de las especies tetraénicas en el hígado embrionario de pollo, la separación entre éstas y las hexaénicas no era todo lo buena que sería de desear, existiendo en cualquier caso una contaminación más o menos importante. En nuestro caso sin embargo, la proporción de especies moleculares tetraénicas es relativamente más baja y ello da lugar a que la separación entre éstas y las hexaénicas, sea virtualmente perfecta, llegándose incluso a detectar entre ambas, otra pequeña fracción de especies moleculares pentaénicas, que si bien se despreció a la hora de elaborar los resultados, por

presentar una abundancia relativa inferior al 1 - 2 %, constituye una garantía de la separación cromatográfica entre tetraenóicas y hexaenóicas, cuantitativamente más importante.

### 3.1.3. FRACCIONAMIENTO DE FOSFATIDILCOLINAS.-

El fraccionamiento directo de fosfatidilcolinas por cromatografía de argentación, se llevó a cabo según un método basado en el descrito por Coll (1.975) y modificado en el sentido de disminuir a la mitad la proporción de nitrato de plata/kieselgel G.

Esta técnica rinde una buena separación de las lecitinas de partida, en tres fracciones mayoritarias: una primera, compuesta por especies moleculares hexaenóicas, una segunda a base de especies tetraenóicas y una tercera, con el mayor  $R_f$ , a base de una mezcla sin resolver de especies disaturadas, monoenóicas y dienóicas. El hecho de obtener sin una mayor resolución esta última fracción, supone, en estudios metabólicos como los que aquí se han realizado con ayuda de esta técnica, dar por sentado un comportamiento homogéneo para todas las especies moleculares que la constituyen, principalmente, disaturadas y monoenóicas en el caso del encéfalo que nos ocupa. Como, por una parte esto no tiene que ser necesariamente cierto, y por otra, dicha fracción supone un 70 - 80 % de la fosfatidilcolina total (apartado 3.4.), hubo de ser comprobado este punto, viniendo dada dicha comprobación por la obtención a partir de lecitinas marcadas, procedentes de las mismas experiencias de incorporación, de los sn-3-acetil-1,2-diacil derivados y el fraccionamiento de estos según el método descrito en 2.5.2.2., con el consiguiente estudio de las fracciones de especies disaturadas, monoenóicas y dienóicas por separado (apartado 3.5.3.).

En el fraccionamiento directo de fosfatidilcolinas por

cromatografía de argentación, se obtiene también una fracción de especies moleculares pentaenóicas que, al igual que ocurría en masa, resultaron ser despreciables desde el punto de vista de la incorporación de precursores radioactivos, por lo que no se han incluido en los resultados aquí descritos.

### 3.2. COMPOSICION LIPIDICA GENERAL DEL ENCEFALO EMBRIONARIO Y VITELLO NUTRITIVO.-

La información existente a este respecto en la bibliografía es, además de incompleta como soporte del presente estudio, discrepante en ocasiones, lo cual debe atribuirse en principio a la utilización de distintas razas de una especie biológica determinada o a diferencias nutritivas entre las mismas. Por otra parte, la casi totalidad de datos existentes, están referidos casi en exclusiva al pollo doméstico, singularmente en etapas ya adultas, no existiendo apenas información acerca de la composición lipídica de prácticamente ningún órgano del pato, exceptuando un trabajo no publicado de este mismo laboratorio (Martínez Arias, 1.977).

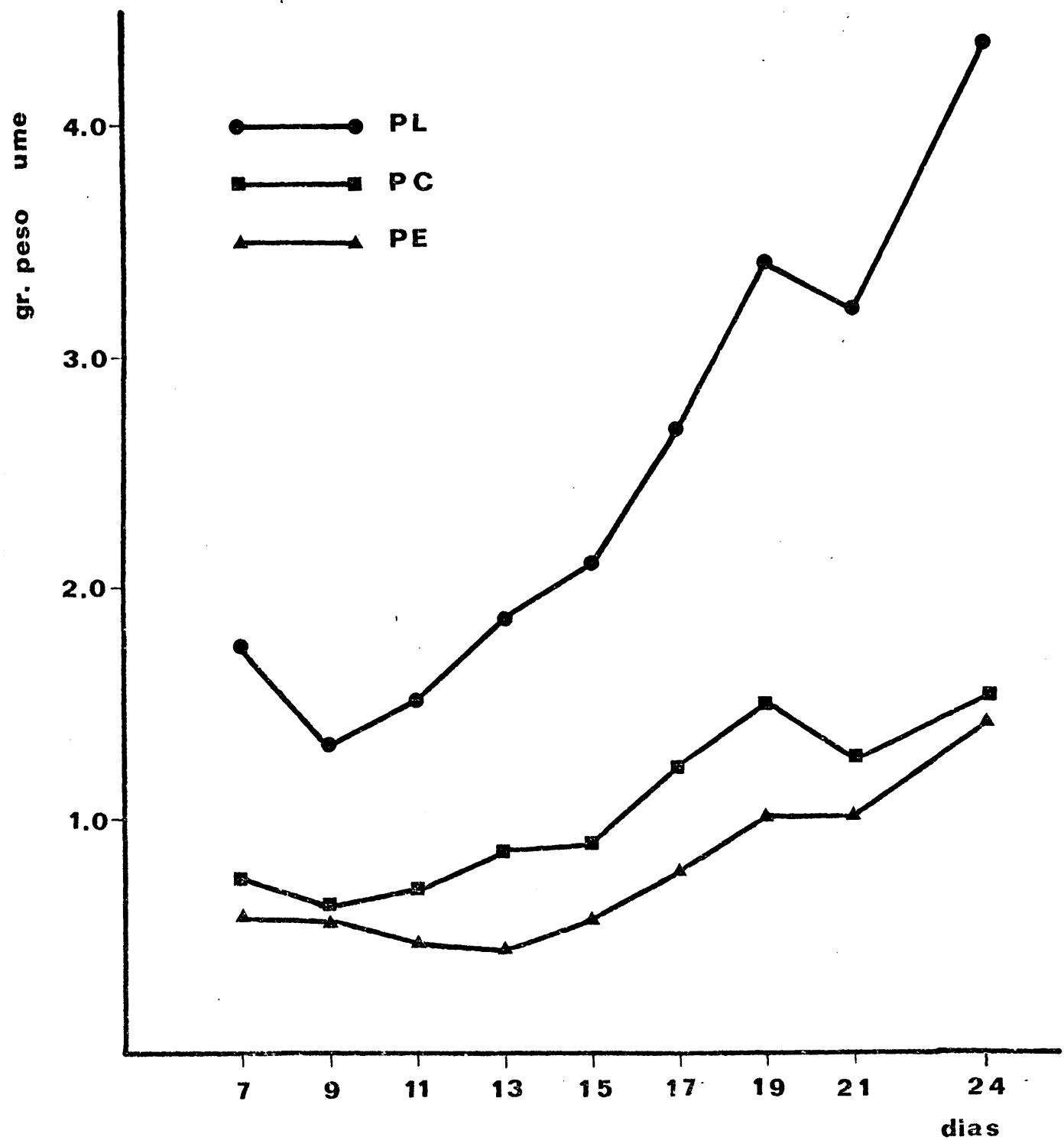
Por estas razones y con objeto de poseer un marco específico de referencia, se ha llevado a cabo un estudio general de la composición lipídica del encéfalo en ambas especies, si bien incidiendo fundamentalmente en el caso del pollo. Dicho estudio, se ha centrado en la elucidación del contenido y composición en ácidos grasos de fosfatidilcolinas.

En la tabla 1, se recojen los pesos medios de los encéfalos correspondientes a las distintas etapas del desarrollo estudiadas en ambas especies, así como las variaciones en su contenido lipídico total y las abundancias de los fosfoglicéridos mayoritarios. Como puede observarse, el aumento del contenido lipídico no resulta sólo, como una mera consecuencia del aumento de tamaño del encéfalo, sino que además, se registra un enriquecimiento paulatino del tejido a lo largo del desarrollo, que también puede detectarse en las fracciones fosfolipídicas, como se indica en la figura 3, donde se han

TABLA 1: CAMBIOS DEL ENCEFALO EMBRIONARIO CON EL DESARROLLO

Edad del embrión	Peso húmedo	Lípidos totales	Fósforo lipídico	Fosfoglicéridos
Días	mg/órgano	mg/g peso húmedo	µg P/mg líp. total	PC PE
Pollo				
7	61	17,54	99	42,8 34,5
9	123	16,17	82	46,9 44,4
11	174	17,59	86	46,7 32,4
13	367	18,04	105	46,1 24,8
15	519	20,27	104	42,6 27,4
17	594	27,78	98	44,8 28,3
19	767	32,09	106	44,2 30,6
21 (eclosión)	837	36,95	87	39,6 32,5
24	925	46,65	94	34,8 32,1
Pató				
17	648	20,00	98	43,7 25,2
22	1.255	33,36	102	42,3 27,0
28 (eclosión)	1.623	43,13	92	40,0 31,8
32	1.840	50,47	89	33,0 33,2

FIGURA 3: CAMBIOS EN EL CONTENIDO FOSFOLIPIDICO DURANTE EL DESARROLLO DEL ENCEFALO DE POLLO



representado las variaciones a lo largo del desarrollo del encéfalo de pollo, en el contenido de fósforo lipídico por gramo de peso húmedo. Este hecho, en claro contraste con la situación descrita para el hígado embrionario (Abad, 1.974), donde a partir del día 19 de incubación, se registra un claro descenso del contenido fosfolipídico total, probablemente sea debido al intenso depósito fosfolipídico y lipídico en general, que acontece a partir de la fase de mielinización

TABLA 2: ACIDOS GRASOS TOTALES DEL ENCEFALO Y VITELO NUTRITIVO DE EMBRION DE PATO

ácidos grasos (1)	ENCEFALO		VITELO	
	17 días	28 días	17 días	28 días
14:0	1,55	2,10	0,33	0,40
16:0	34,82	34,82	27,58	23,14
16:1	2,92	3,00	3,28	2,62
18:0	14,07	15,21	5,84	5,41
18:1	18,10	17,32	53,51	50,34
18:2	1,93	1,91	4,86	5,91
18:3			0,59	3,11
20:4	9,84	10,24	2,93	8,38
22:4	1,75	1,02		
22:5 (2)	3,71	4,00		
22:6	11,29	10,38	1,06	0,68

(1) En esta tabla y en todas las siguientes, la composición en ácidos grasos se expresa en fracción molar x 100.

(2) Responde a la suma de los isómeros 22:5 (n-3) y 22:5 (n-6).

activa, iniciada, en el pollo, a partir del día 18 - 19 de incubación, y que se prolonga durante una buena parte de la vida postnatal (El-Eishi, 1.967; Kurihara y Tsukada, 1.968; Mezei y Palmer, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976).

La composición en ácidos grasos del contenido lipídico total del encéfalo y vitelo nutritivo, se muestra, a modo de ejemplo, para el caso del embrión de pato de 17 y 28 días de edad, en la tabla 2. De la observación de dicha tabla, puede deducirse una gran estabilidad composicional del encéfalo a lo largo del desarrollo, que, como veremos más adelante, también se presenta a nivel de todas las clases lipídicas. Por

TABLA 3: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LAS PRINCIPALES CLASES LIPIDICAS DEL VITELLO NUTRITIVO

ácidos grasos	POLLO (1)				PATO			
	13 días		21 días		17 días		28 días	
	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
16:0	30,52	33,58	30,28	32,66	25,16	35,87	24,91	40,51
16:1	5,50	1,60	6,81	1,71	3,15	tr	3,78	0,79
18:0	5,46	16,90	4,83	15,55	5,58	12,82	3,97	13,23
18:1	41,66	23,18	43,39	29,26	58,18	27,58	56,73	27,39
18:2	16,86	15,72	14,69	15,50	5,99	7,83	8,51	6,97
18:3					0,84		1,02	
20:4		6,41		5,30	0,70	13,44	0,65	8,83
22:6		2,61		tr (2)		1,82		1,86
%	59,81	40,17	87,56	10,83	84,75	14,07	91,52	6,74

(1) Tomado de C. Abad (1.974).

(2) Representa una abundancia relativa inferior al 0,5 %.

otra parte, el encéfalo presenta como mayoritario al ácido palmítico, caracterizándose además por unos niveles relativamente altos de ácidos poliinsaturados, araquidónico y docosahexenónico.

El vitelo por su parte, tiene al ácido oléico como componente principal y presenta unos niveles mucho más bajos de ácidos poliinsaturados, si bien las abundancias relativas de ácido linoléico y ácido linolénico, precursores en la biosíntesis de los ácidos araquidónico y docosahexenónico respectivamente, son aquí mucho más elevadas.

En la tabla 3, se han reflejado las abundancias y la composición en ácidos grasos de las principales clases lipídicas presentes en el vitelo, en dos etapas del desarrollo de las dos especies estudiadas. De la observación de dichos datos, se puede concluir la mayor representación con que cuentan los triglicéridos en el vitelo de pato, y los fosfolípidos en el de pollo, junto con una mayor abundancia relativa de ácidos poliinsaturados en los lípidos de aquellos, posiblemente debida a diferencias en la dieta de ambas especies. En ambos casos, se registra a lo largo del desarrollo, un aumento del contenido en triglicéridos y una disminución de fosfolípidos.

En las tablas 4 y 5, se reflejan la composición en ácidos grasos de las principales clases de lípidos neutros y polares, en varias etapas del desarrollo del encéfalo embrionario de las dos especies estudiadas.

Los fosfolípidos (Miyamoto et al., 1.966; Wells y Dittmer, 1.967; Sheltawy y Dawson, 1.969; Kanazawa et al., 1.972; Wood, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976; Sweasey et al., 1.976; Vatassery et al., 1.976; Dorman et al., 1.977), como ya se comentó anteriormente, y el colesterol (Dickerson, 1.968; Paoletti, 1.969), resultan ser componentes absolutamente mayoritarios, quedando pues el resto de lípidos neutros: ésteres de colesterol, triglicéridos, ácidos grasos libres, etc.,

TABLA 4: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS PRINCIPALES  
LIPIDOS NEUTROS DEL ENCEFALO EMBRIONARIO DE AVES

EMBRION DE POLLO								
ácidos grasos	13 días				21 días			
	TG	FFA	DG	EC	TG	FFA	DG	EC
14:0	3,48	10,07	5,88	7,67	tr	7,36	5,94	1,52
16:0	47,96	21,68	16,49	10,30	47,75	22,07	12,70	11,12
16:1	4,20	0,92		1,32	2,73	tr	tr	1,24
18:0	7,04	29,02	31,53	2,45	8,97	32,05	36,62	3,62
18:1	29,49	11,41	8,08	65,59	32,34	12,23	5,41	67,97
18:2	1,82			5,36	2,49			6,46
20:4	5,23	24,98	33,91	4,26	4,53	25,05	26,38	5,90
22:4	tr		4,11		1,17		2,95	
22:5	tr	tr		1,46	tr			1,02
22:6	0,78	1,91		1,61	tr	1,24		1,15

TABLA 4 (continuación)

EMBRIÓN DE PATO								
ácidos grasos	17 días				28 días			
	TG	FFA	DG	EC	TG	FFA	DG	EC
14:0	2,48	9,54	6,98	9,66	1,56	7,59	3,32	2,23
16:0	40,44	28,53	17,21	11,42	46,75	28,55	17,87	10,92
16:1	6,55	3,75	tr	1,30	2,40	tr	tr	1,20
18:0	6,20	28,19	26,38	3,03	7,97	43,02	31,98	2,96
18:1	32,34	17,74	11,47	60,71	30,49	14,14	10,39	68,87
18:2	4,16	1,31		6,12	2,17			5,89
20:4	3,17	10,92	27,70	5,11	4,18	3,49	36,43	5,47
22:4	0,94		10,26					
22:5	1,69			1,27	1,72			1,43
22:6	2,02			1,37	2,74	3,20	tr	1,02

TABLA 5: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS PRINCIPALES  
LIPIDOS POLARES DEL ENCEFALO EMBRIONARIO DE AVES

EMBRION DE POLLO							
ácidos grasos	13 días			21 días			
	PL	PC	PE	PL	PC	PE	
14:0	3,02	1,51	1,23	1,61	0,78	tr	
16:0	28,82	54,07	11,82	33,10	54,66	13,45	
16:1	1,83	5,11	0,64	1,73	2,72	tr	
18:0	18,33	5,31	23,17	15,30	6,70	24,18	
18:1	15,91	24,66	8,74	15,02	25,22	8,92	
18:2	1,30	2,03	1,52	0,72	1,91	0,71	
20:4	12,11	3,34	16,38	11,44	3,80	15,29	
22:4	1,60	0,52	4,39	2,10	tr	5,20	
22:5	3,27	tr	8,27	4,51	tr	7,11	
22:6	13,81	3,44	23,85	14,47	4,20	25,14	

TABLA 5 (continuación)

EMBRIÓN DE PATO						
ácidos grasos	17 días			28 días		
	PL	PC	PE	PL	PC	PE
14:0	0,73	0,90	1,42	0,70	tr	0,93
16:0	32,15	51,43	10,71	31,50	53,39	12,68
16:1	0,95	3,65	1,26	1,16	1,68	1,42
18:0	17,65	6,10	23,97	16,15	8,69	25,86
18:1	16,22	27,83	10,02	17,69	26,21	9,17
18:2	tr	0,76	1,41	0,58	tr	1,72
20:4	10,52	5,45	17,81	10,89	5,14	15,93
22:4	1,96	tr	3,34	1,84	0,74	4,73
22:5	3,60	1,09	4,17	3,88	1,02	5,60
22:6	14,98	2,77	25,89	14,26	3,12	21,96

en franca minoría frente a éstos (Rowe, 1.969; Bazan, 1.970; Rouser y Yamamoto, 1.972). Como ejemplo, sólo citar que los triglicéridos, uno de los lípidos neutros más abundantes, excluido naturalmente el colesterol, presenta unos niveles que no llegan a suponer más que un 3 - 4 % de los alcanzados por las fosfatidilcolinas, como ha podido determinarse por cromatografía de gases con patrón interno.

Dado que un estudio comparado exhaustivo de la composición en ácidos grasos de los distintos tipos lipídicos, cae fuera del objeto primordial de esta Tesis Doctoral, y con el fin de no hacer esta memoria más extensa de lo estrictamente necesario, nos limitaremos únicamente a señalar algunas características singulares que se desprenden de lo recogido en las tablas 4 y 5. En primer lugar, es destacable la notable especificidad a nivel de órgano, que presenta la composición en ácidos grasos de cualquiera de los tipos lipídicos analizados, destacando además la constancia con que se mantiene dicha composición en las etapas del desarrollo estudiadas. Estos hechos, que serán puestos de relieve más adelante, en el estudio exhaustivo que se ha practicado sobre la composición en ácidos grasos de fosfatidilcolinas, no se presentan con igual intensidad en otros órganos embrionarios estudiados en nuestro laboratorio (Abad, 1.974; Martínez Arias, 1.977).

Igualmente destacable resulta el alto grado de insaturación que presentan los ácidos grasos de la fracción fosfolipídica total, al igual que sucede, de modo aun más acentuado, con las fosfatidiletanolaminas, ricas en ácidos araquidónico y docosahexenónico (O'Brien y Sampson, 1.965; Miyamoto et al., 1.966; Baker y Thompson, 1.972; Svennerholm et al., 1.972; Wood, 1.974; Dhopeshwarkar y Subramanian, 1.975). Las fosfatidilcolinas por el contrario, presentan unos niveles muy bajos de ácidos poliinsaturados (Marshall et al., 1.966; Miyamoto et al., 1.966; Baker y Thompson, 1.972; Svennerholm et al., 1.972; Wood, 1.974), manteniendo una composición bastan-

te semejante a la de los triglicéridos, hecho este, que bien podría tomarse como prueba, circunstancial desde luego, de un origen metabólico común para ambas clases lipídicas.

Por último, sólo señalar el hecho, ya constatado en la bibliografía, de la abundancia de ácidos esteárico y araquidónico en la fracción de diglicéridos (Keough et al., 1.972; Lapetina y Mitchell, 1.973; Aveldaño y Bazan, 1.974; Banschbach y Geison, 1.974), resultante probablemente, de un intenso recambio de éstos con los fosfoinosítidos, como ya se señaló en el apartado de introducción.

El contenido en ácido araquidónico de la fracción de ácidos grasos libres, parece ser la única variable digna de mención y posiblemente sea debida a situaciones de isquemia incontrolables que se producirían tras la muerte por decapitación de los animales de experimentación (Cenedella et al., 1.975; Galli y Spagnuolo, 1.976).

En las tablas 6 y 7, se muestra la composición global en ácidos grasos de fosfatidilcolinas, fosfoglicéridos mayoritarios del encéfalo embrionario (Miyamoto et al., 1.966; Wood, 1.974; Shaikh y Palmer, 1.976; Dorman et al., 1.977), correspondientes a los distintos estados del desarrollo estudiados en pollo y pato domésticos. Estos mismos datos, se han representado, de forma conjunta, en la figura 4, donde, para una mayor claridad, se han omitido de la representación, los ácidos grasos que resultan minoritarios, como son los mirístico, palmitoléico, linoléico, docosatetraenónico y docosa-pentaenónico.

De los resultados así expuestos, se puede concluir, en primer lugar, una gran especificidad en la composición en ácidos grasos de lecitinas de encéfalo, que resulta ser casi idéntica en las dos especies estudiadas. Junto con este hecho, cabe destacar, las elevadas abundancias relativas que presentan los ácidos grasos palmítico y oléico, cuya suma permanece

TABLA 6: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE FOSFATIDILCOLINAS DE ENCEFALO DE EMBRION DE POLLO

ácidos grasos	EDAD (días)									
	7	9	11	13	15	17	19	21	24	
14:0	1,38	1,43	1,41	1,51	0,55	1,43	0,99	0,78	1,35	
16:0	52,78	51,93	53,06	54,07	55,25	57,42	55,85	54,66	55,07	
16:1	4,36	4,94	4,83	5,11	4,58	3,03	3,00	2,72	2,19	
18:0	6,41	5,46	5,00	5,31	4,90	4,85	7,00	6,70	8,14	
18:1	20,78	21,95	22,78	24,66	24,87	23,33	23,46	25,22	26,06	
18:2	1,06	1,26	1,58	2,03	1,80	2,27	1,00	1,91	0,57	
20:4	5,95	6,47	4,73	3,34	3,90	3,71	4,71	3,80	3,71	
22:4	0,98	1,25	0,82	0,52	0,61	0,65	0,52	tr	tr	
22:5	0,74	0,67	0,70	tr	tr	tr	tr	tr	tr	
22:6	5,53	4,63	4,99	3,44	3,52	3,31	3,46	4,20	2,90	

TABLA 7: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE FOSFATIDILCOLINAS DE ENCEFALO DE EMBRION DE PATO

ácidos grasos	EDAD (días)			
	17	22	28	32
14:0	0,90	1,03	tr	tr
16:0	51,43	59,41	53,39	53,75
16:1	3,65	1,79	1,68	1,69
18:0	6,10	5,86	8,69	8,82
18:1	27,83	23,00	26,21	27,66
18:2	0,76	0,51	tr	tr
20:4	5,45	4,53	5,14	4,14
22:4	tr	tr	0,74	tr
22:5	1,09	0,92	1,02	0,74
22:6	2,77	2,99	3,12	3,20

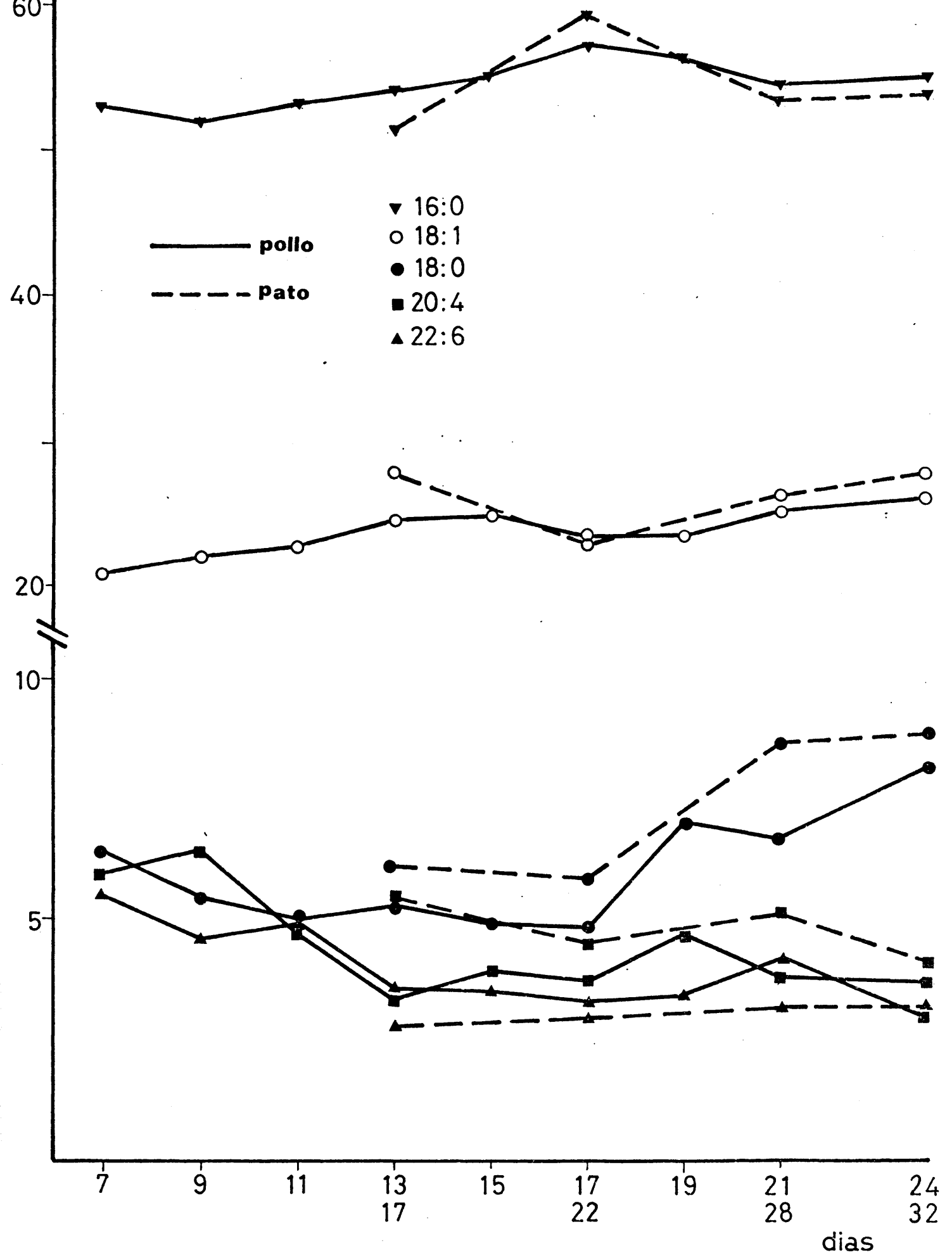


FIGURA 4: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE FOSFATIDILCOLINAS

practicamente constante, a lo largo del desarrollo, e igual al 80 % del total, dando cuenta el ácido palmítico de, aproximadamente, las 2/3 partes de dicha suma. Este elevado contenido en ácidos grasos saturados y monoénicos de las fosfatidilcolinas (Miyamoto et al., 1.966; Marshall et al., 1.966; Baker y Thompson, 1.972; Svennerholm et al ., 1.972; Wood, 1.974), contrasta grandemente, con el hecho, mencionado anteriormente, de la elevada participación de los ácidos grasos poliinsaturados en la fracción fosfolipídica total o en fosfatidiletanolaminas (O'Brien y Sampson, 1.965; Miyamoto et al., 1.966; Baker y Thompson, 1.972; Svennerholm et al., 1.972; Wood, 1.974; Dhopeswarkar y Subramanian, 1.975), lo cual nos habla, además de una heterogeneidad estructural evidente, de una posible heterogeneidad metabólica en las rutas biosintéticas encargadas de introducir los restos de acilo en los fosfoglicéridos correspondientes, que habria de ser comprobada "a posteriori".

Por último, sólo destacar que las fosfatidilcolinas presentan en su composición de ácidos grasos, una constancia con el desarrollo practicamente total, si exceptuamos un ligero incremento, al acercarse la eclosión, en los niveles de ácido esteárico y una disminución registrada en los primeros estadios del desarrollo de los ácidos grasos poliinsaturados, araquidónico y docosahexenónico, hecho este, que algunos autores (Wood, 1.974) correlacionan con una disminución en el número de mitosis que ocurren en el tejido en desarrollo, al avanzar éste.

Hay que señalar aquí, las marcadas diferencias que exhibe la composición en ácidos grasos de fosfatidilcolinas de encéfalo, en relación con las del hígado embrionario, previamente estudiado en este laboratorio (Abad, 1.974; Martinez Arias, 1.977), especialmente en lo que se refiere al bajo grado de insaturación de las de encéfalo con relación a las de hígado, y a la constancia en la composición total, lo cual pro-

blemente indica que el encéfalo alcanza, en etapas muy tempranas, un estado de desarrollo óptimo, que mantiene, pese a las variaciones registradas en los demás tejidos embrionarios, al menos hasta las primeras etapas del desarrollo postnatal aquí estudiadas. Por último, solo mencionar que en el hígado embrionario, los ácidos esteárico, linoléico y araquidónico presentan unas abundancias relativas muy elevadas, mientras que el ácido oléico se encuentra en muy baja proporción (Abad, 1.974; Martínez Arias, 1.977), situación que se presenta totalmente invertida en el caso del encéfalo, donde este ácido graso es uno de los mayoritarios, mientras que aquellos, apenas llega a suponer, en el mejor de los casos y considerando la suma de todos ellos, un 10 % del total.

### 3.3. DISTRIBUCION POSICIONAL DE LOS RESTOS DE ACILO EN FOSFATIDILCOLINAS.-

En la marcha analítica conducente a la elucidación de la composición en especies moleculares de un fosfoglicérido dado, el conocimiento de la distribución de los restos de acilo sobre las dos posiciones posibles del resto glicerol, constituye un primer paso, a partir del cual, puede estimarse de forma estadística, el número máximo de especies moleculares que puede presentar el fosfoglicérido en cuestión, aunque en cualquier caso, dicha estimación, que no tiene en cuenta la especificidad de la actuación de las acil-transferasas, rinde un número de especies moleculares muy superior al que se da en la realidad.

En otro orden de cosas, al ser un hecho probado que la composición de la parte apolar de los fosfoglicéridos, es un reflejo de las capacidades biosintéticas de cada entidad biológica, se ha acumulado en la bibliografía abundante información sobre la distribución posicional de las cadenas apolares en los mismos (Hildebrand y Law, 1.964; Haverkate y Van Deenen, 1.965; Bockerhoff y Ackman, 1.967; Okuyama et al., 1.967; Van Golde, 1.968; Fernández Sousa et al., 1.971 a y b; González Ros, 1.974; Abad, 1.974; Martínez Arias, 1.977).

Por lo que al encéfalo de aves se refiere, la distribución posicional de los ácidos grasos en fosfatidilcolinas durante el desarrollo, se muestra en las tablas 8 y 9, para el embrión de pollo y en la tabla 10, para el de pato. Estos mismos resultados, se han representado gráficamente en las figuras 5 y 6, donde se han seguido los mismos criterios utilizados en la elaboración de la figura 3, anteriormente explicados.

De igual modo a como sucedía en los estudios sobre la com-



TABLA 9: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LA POSICION sn-2 DE FOSFATIDILCOLINAS DE ENCEFALO  
DE EMBRION DE POLLO

ácidos grasos	EDAD (días)											
	7	9	11	13	15	17	19	21	24			
14:0	1,04	1,38	1,02	1,39	0,97	tr	0,81	0,94	2,05			
16:0	27,81	37,81	45,30	48,15	34,83	36,75	35,32	42,94	36,55			
16:1	4,74	5,76	4,72	4,52	6,98	4,09	4,97	3,55	3,93			
18:0	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr			
18:1	32,26	29,16	27,32	29,75	38,46	36,96	39,22	34,57	40,71			
18:2	2,55	2,28	2,23	2,75	3,06	3,92	2,00	2,88	1,18			
20:4	14,71	12,25	10,03	6,72	8,43	9,89	10,39	7,64	8,66			
22:4	2,50	1,85	1,24	1,03	1,32	1,43	1,19	0,88	1,27			
22:5	2,19	1,04	0,71	tr	tr				0,68			
22:6	12,19	8,46	7,42	5,69	5,94	6,95	6,09	6,60	4,96			

TABLA 10: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LAS POSICIONES sn-1 Y sn-2 DE FOSFATIDILCOLINAS  
DE ENCEFALO DE EMBRION DE PATO

ácidos grasos	EDAD (días)							
	17		22		28		32	
	sn-1	sn-2	sn-1	sn-2	sn-1	sn-2	sn-1	sn-2
14:0	0,63	1,30	1,76	3,67	tr	1,72	tr	1,15
16:0	59,20	40,92	68,75	45,28	67,30	43,74	68,26	44,99
16:1	3,11	4,28	0,93	2,67	1,47	2,80	1,38	2,03
18:0	10,72	tr	13,43	tr	16,28	tr	17,14	tr
18:1	26,02	36,26	15,11	31,88	14,94	35,47	13,22	36,24
18:2	0,53	1,08	tr	tr	tr	0,73	tr	1,13
20:4	tr	9,38		9,06		9,24		8,71
22:4	tr	0,94		0,66		tr		tr
22:5		1,57		1,32		1,79		1,53
22:6		4,26		5,44		4,51		4,22

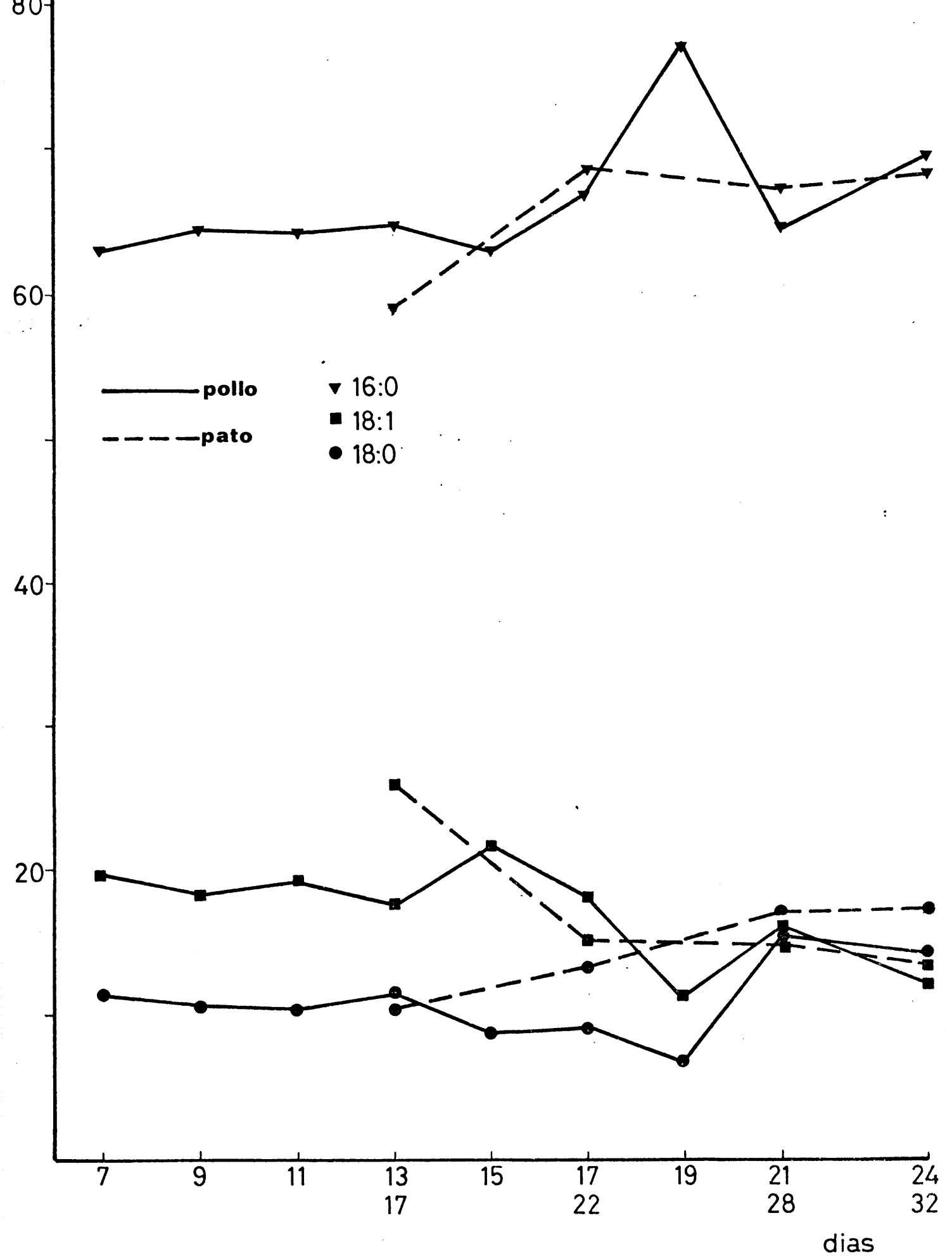


FIGURA 5: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE POSICION sn-1 DE FOSFATIDILCOLINAS

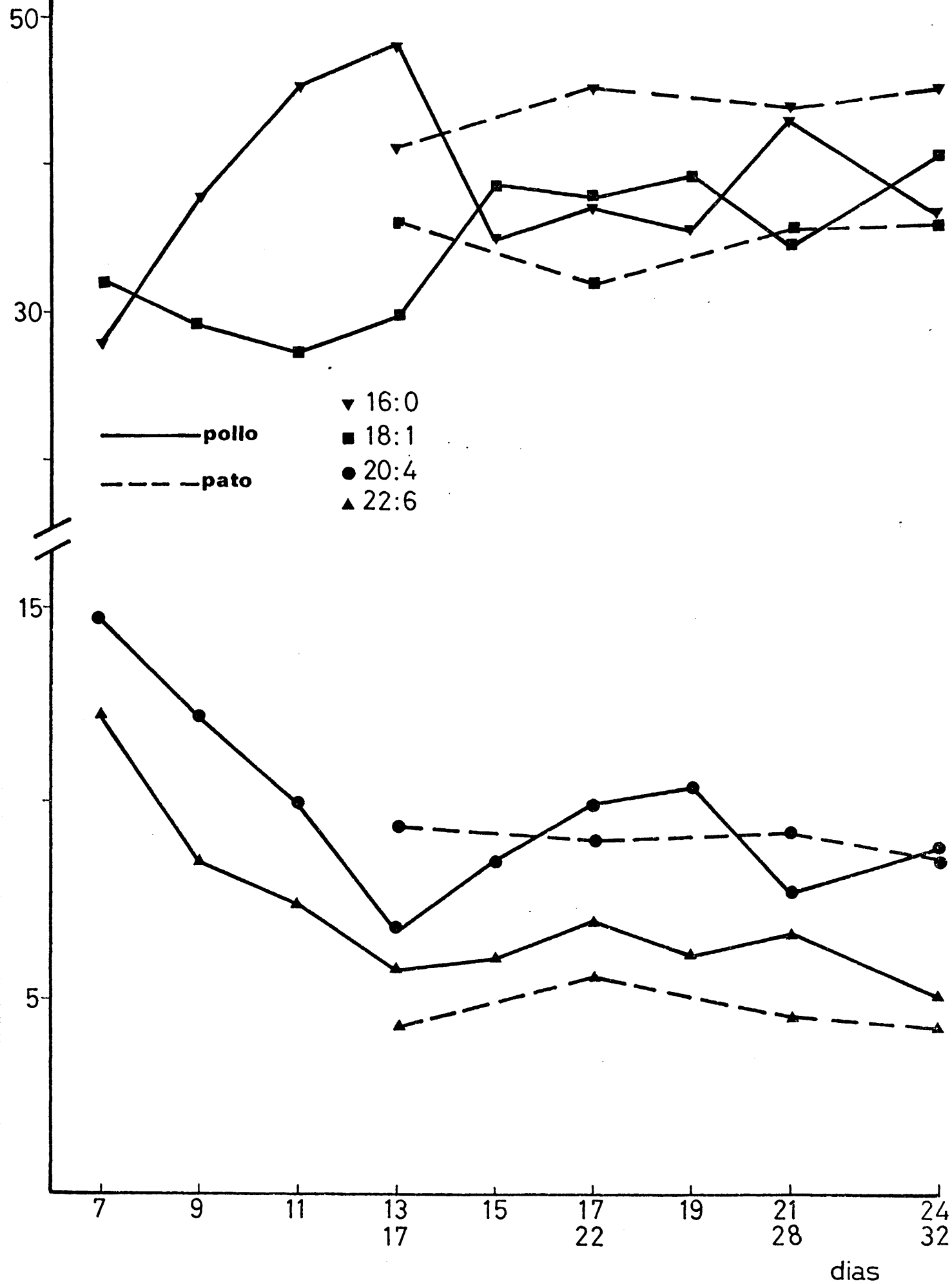


FIGURA 6: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LA POSICION sn-2 DE FOSFATIDILCOLINAS

posición global en ácidos grasos de fosfatidilcolinas, puede aquí observarse para las posiciones sn-1 y sn-2 una gran estabilidad composicional, que se pone especialmente de manifiesto en el último tercio del desarrollo embrionario. Junto con esto es también destacable, el hecho de la semejanza que presentan ambas especies, en la composición en ácidos grasos de las posiciones sn-1 y sn-2, reflejo sin duda, de la especificidad de órgano que presentan las fosfatidilcolinas, comentada con anterioridad, y que se acentúa especialmente en el día de la eclosión, como puede apreciarse en las figuras 5 y 6.

Una de las características más sobresalientes de las distribuciones posicionales representadas en dichas figuras, es que la abundancia relativa de ácido palmítico en posición sn-1, es notablemente superior a la existente en posición sn-2, mientras que a la inversa sucede con el ácido oléico. Por otra parte, se puede observar que el ácido esteárico, se localiza exclusivamente sobre la posición sn-1, de igual modo que los ácidos linoléico, araquidónico y docosahexenóico, lo hacen sobre la posición sn-2. Otros ácidos grasos, como el palmitoléico, no muestran este tipo de especificidad, sino que se presentan igualmente sobre las posiciones sn-1 ó sn-2. Estos datos vienen a confirmar una vez más la regla general de que en fosfoglicéridos animales, los ácidos grasos saturados se localizan principalmente sobre la posición sn-1, mientras que los insaturados lo hacen sobre la posición sn-2 (Hildebrand y Law, 1.964; Haverkate y Van Deenen, 1.965; Brockerhoff y Ackman, 1.967; Okuyama et al., 1.967; Van Golde, 1.968; Fernández Sousa et al., 1.971 a; González Ros, 1.974; Abad, 1.974; Martínez Arias, 1.977).

Es interesante por último destacar las "relaciones de compensación" existentes entre los ácidos palmítico y oléico, tanto para ocupar la posición sn-1, como la sn-2, de modo que aunque los niveles de uno de ellos, aumenten o disminuyan, el otro sufre una variación complementaria, de manera que la suma de las

concentraciones de uno y otro permanece prácticamente con un valor constante, que se mantiene durante el desarrollo en ambas posiciones, si bien con valores absolutos distintos en una y otra.

### 3.4. ESPECIES MOLECULARES DE FOSFATIDILCOLINAS.-

A partir del fraccionamiento por cromatografía de argenta-  
ción de los 3-acetil-1,2-diacil-sn-gliceroles derivados, tras  
el tratamiento descrito en 2.6.2. y 2.8.2., de las fosfatilco-  
linas de encéfalo embrionario de pollo (13, 17 y 21 días de  
edad) y pato (17, 22 y 28 días de edad), se llega a dos tipos  
de resultados complementarios, que son, por una parte la abun-  
dancia relativa y composición en ácidos grasos de cada fracción,  
y por otra, mediante hidrólisis con lipasa pancreática, la dis-  
tribución posicional de los mismos. A partir de esta información,  
dada en las tablas 11, 12, 13, 14, 15 y 16, se han calculado  
las especies moleculares de lecitinas correspondientes a cada  
una de las etapas del desarrollo del encéfalo estudiadas en ambas  
aves. La marcha analítica del proceso de obtención de 3-acetil-  
-1,2-diacil-sn-gliceroles a partir de fosfatidilcolinas, por  
cuanto que hay que obtener derivados representativos de éstas,  
puede seguirse, observando la concordancia existente entre la  
composición en ácidos grasos de ambos compuestos, dada en las  
tablas 17 y 18.

Las fosfatidilcolinas del encéfalo embrionario de aves,  
se hallan constituidas por 15 especies moleculares mayoritarias  
(figura 7), que vienen caracterizadas porque ni la presencia,  
ni la abundancia relativa de cada una de ellas, presenta varia-  
ciones significativas durante el período de desarrollo estudia-  
do en ambas especies biológicas. Esta situación, previsible des-  
de el momento en que describimos la gran estabilidad composicio-  
nal que, en este material biológico, caracteriza a las fosfati-  
dilcolinas, contrasta grandemente con lo que sucede en el desa-  
rrollo de otros órganos embrionarios (Abad, 1.974), descritos

TABLA 11: ABUNDANCIA RELATIVA, COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS Y DISTRIBUCION POSICIONAL DE ESTOS EN LAS FRACCIONES DE 3-ACETIL-1,2-DIACIL-sn-GLICEROLES DERIVADOS DE FOSFATIDILCOLINAS DE ENCEFALO DE EMBRION DE POLLO (13 días)

ácidos grasos	DISATURADAS		MONOENOICAS		DIENOICAS		TETRAENOICAS		HEXAENOICAS	
	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2
14:0	5,74	4,84	1,72	1,14	1,71		0,91	2,17	1,10	3,57
16:0	88,85	89,31	43,93	32,46	24,37	15,07	32,03	4,57	32,98	11,60
16:1		1,68	8,50	7,18	9,95	8,20	tr	0,51	1,69	1,52
18:0	5,41	1,64	2,73		4,94		13,82	tr	8,55	0,91
18:1		3,52	43,12	59,22	33,03	38,99	0,93	tr	6,88	3,20
18:2		1,17			25,99	37,73	tr		1,11	tr
20:4							47,17	83,25	2,59	10,53
22:4							5,13	9,48	0,57	1,33
22:5									1,62	5,00
22:6									42,91	62,33
%	32,12		44,38		8,67		7,91		6,92	

TABLA 12: ABUNDANCIA RELATIVA, COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS Y DISTRIBUCION POSICIONAL, DE ESTOS EN LAS FRACCIONES DE 3-ACETIL-1,2-DIACIL-sn-GLICEROL DERIVADOS DE FOSFATIDILCOLINAS DE ENCEFALO DE EMBRION DE POLLO (17 días)

ácidos grasos	DISATURADAS		MONOENOICAS		DIENOICAS		TETRAENOICAS		HEXAENOICAS	
	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2
14:0	3,74	5,64	1,06	1,52	1,56	2,48	1,15	2,40	0,83	5,66
16:0	91,02	93,53	45,39	31,77	26,21	16,70	35,59	5,93	31,91	9,02
16:1			5,42	7,04	8,08	8,51		0,96	1,24	1,71
18:0	5,24	0,82	3,66		5,30		15,60	tr	8,97	
18:1			44,46	59,67	32,47	32,47	1,35	1,19	7,38	2,57
18:2					26,38	39,83		tr	0,97	tr
20:4							41,91	80,03	3,03	15,62
22:4							4,39	9,49	tr	1,35
22:5									3,05	6,96
22:6									42,60	57,11
%	34,66		46,36		8,02		6,00		5,05	

TABLA 13: ABUNDANCIA RELATIVA, COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS Y DISTRIBUCION POSICIONAL DE ESTOS EN LAS FRACCIONES DE 3-ACETIL-1,2-DIACIL-sn-GLICEROL DERIVADOS DE FOSFATIDILCOLINAS DE ENCEFALO DE EMBRION DE POLLO (21 días)

ácidos grasos	DISATURADAS		MONOENOICAS		DIENOICAS		TETRAENOICAS		HEXAENOICAS	
	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2
14:0	2,13	2,95	tr	tr	1,03	1,06	tr	tr	0,99	0,99
16:0	91,19	94,78	42,90	25,92	23,18	14,65	29,84	1,82	28,69	9,46
16:1			4,30	5,77	4,27	4,83			tr	tr
18:0	6,67	2,27	4,60		6,47		18,56	tr	11,92	tr
18:1			48,19	68,30	42,37	38,08	1,13	tr	6,07	2,98
18:2					22,68	41,37			tr	
20:4							45,43	88,56	1,63	3,74
22:4							5,03	9,62	tr	tr
22:5									1,82	4,44
22:6									49,87	78,39
%	29,42	47,70	6,63	7,30	8,94					

TABLA 14: ABUNDANCIA RELATIVA, COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS Y DISTRIBUCION POSICIONAL DE ESTOS EN LAS FRACCIONES DE 3-ACETIL-1,2-DIACIL-sn-GLICEROL DERIVADOS DE FOSFATIDILCOLINAS DE ENCEFALO DE EMBRION DE PATO (17 dias)

ácidos grasos	DISATURADAS		MONOENOICAS		DIENOICAS		TETRAENOICAS		HEXAENOICAS	
	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2
14:0	2,27	3,64	0,46	1,14	tr	tr	tr	1,16	tr	tr
16:0	92,87	95,46	44,30	32,46	16,48	10,96	30,91	6,34	29,32	9,73
16:1			5,13	7,18	8,87	7,21		0,73	1,03	0,56
18:0	4,86	0,89	3,75		2,92		17,71		10,76	tr
18:1			46,36	59,22	57,10	55,84	2,50	1,25	12,88	4,61
18:2					14,63	25,99			tr	
20:4							45,38	82,81	3,55	7,58
22:4							3,50	7,69	tr	tr
22:5									10,44	16,71
22:6									32,22	60,81
%	29,42		49,21		4,84		10,65		5,87	

TABLA 15: ABUNDANCIA RELATIVA, COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS Y DISTRIBUCION POSICIONAL DE ESTOS EN LAS FRACCIONES DE 3-ACETIL-1,2-DIACIL-sn-GLICEROLES DERIVADOS DE FOSFATIDILCOLINAS DE ENCEFALO DE EMBRION DE PATO (22 dias)

ácidos grasos	DISATURADAS		MONOENOICAS		DIENOICAS		TETRAENOICAS		HEXAENOICAS	
	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2
14:0	4,23	3,07	0,50	0,95	0,47	0,68	4,01	tr	3,24	
16:0	91,34	95,72	46,07	44,47	20,46	10,23	28,35	7,27	32,47	4,36
16:1			3,00	2,22	6,46	7,32				
18:0	4,43	1,20	3,81		4,61		16,37		9,35	
18:1			46,61	52,35	57,05	62,10	1,17	1,23	8,78	3,63
18:2					11,41	19,87				
20:4							49,12	81,36	1,95	7,48
22:4							4,30	6,12		tr
22:5									7,09	15,51
22:6									40,36	65,76
%	37,12		46,65		4,52		6,81		4,91	

TABLA 16: ABUNDANCIA RELATIVA, COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS Y DISTRIBUCION POSICIONAL DE ESTOS EN LAS FRACCIONES DE 3-ACETIL-1,2-DIACIL-sn-GLICEROLES DERIVADOS DE FOSFATIDILCOLINAS DE ENCEFALO DE EMBRION DE PATO (28 dias)

ácidos grasos	DISATURADAS		MONOENOICAS		DIENOICAS		TETRAENOICAS		HEXAENOICAS	
	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2	total	sn-2
14:0	0,80	1,30	tr					2,21		3,96
16:0	89,01	92,66	47,38	39,96	15,94	10,85	36,12	9,61	33,96	10,02
16:1	tr		3,28	4,58	3,90	3,72		tr		1,71
18:0	7,25	tr	6,52	tr	3,51	tr	21,90	1,02	12,45	
18:1	2,93	6,03	42,81	55,45	66,74	68,46		1,95	9,07	2,57
18:2					9,90	16,97				
20:4							40,00	79,00	3,28	6,38
22:4							1,97	6,21	tr	tr
22:5									8,33	12,19
22:6									32,91	63,17
%	35,20		49,05		3,99		7,02		4,73	

TABLA 17: MARCHA ANALITICA (ENCEFALO DE EMBRION DE POLLO)

ácidos grasos	13 días			17 días			21 días		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
14:0	1,51	1,46	2,89	1,43	1,63	2,01	0,78	tr	0,70
16:0	54,07	57,03	54,96	57,42	56,20	58,54	54,66	52,52	53,57
16:1	5,11	4,90	4,75	3,03	2,86	3,22	2,72	2,82	2,33
18:0	5,31	4,83	5,06	4,85	4,93	5,20	6,70	6,78	6,99
18:1	24,66	23,79	22,55	23,33	24,06	23,66	25,22	26,51	26,42
18:2	2,03	1,95	2,33	2,27	2,48	2,15	1,91	1,19	1,50
20:4	3,34	3,02	3,91	3,71	3,73	2,66	3,80	4,58	3,46
22:4	0,52	tr	0,44	0,65	0,61	0,26	tr	0,63	0,37
22:5	tr	tr	0,11	tr	tr	0,15	tr	tr	0,16
22:6	3,44	3,00	2,97	3,31	3,48	2,15	4,20	4,94	4,46

(a) Composición en ácidos grasos de fosfatidilcolinas.

(b) Composición en ácidos grasos de 3-acetil-1,2-diacil-sn-glicerol.

(c) Composición en ácidos grasos de 3-acetil-1,2-diacil-sn-glicerol reconstruidos a partir de las fracciones de éstos resultantes de la cromatografía de argentación.

TABLA I : MARCHA ANALITICA ENCEFALO DE EMBRION DE PATO

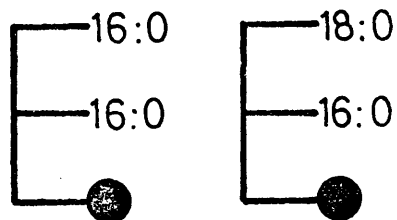
ácidos grasos	17 días			22 días			28 días		
	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
14:0	0,90	1,07	0,90	1,03	2,45	1,84	tr	tr	0,28
16:0	51,43	54,52	54,93	59,41	61,89	59,83	53,39	54,15	59,34
16:1	3,65	3,73	3,01	1,74	1,18	1,69	1,68	1,91	1,76
18:0	6,10	4,96	5,92	5,86	6,54	5,20	8,69	7,91	8,02
18:1	27,83	27,37	26,59	23,00	21,87	24,83	26,21	27,04	25,12
18:2	0,76	0,78	0,71	0,51	tr	0,51	tr	tr	0,39
20:4	5,45	4,68	5,03	4,53	3,56	3,43	5,14	4,74	2,96
22:4	tr	tr	0,37	tr	tr	0,29	0,74	0,55	0,14
22:5	1,09	0,68	0,61	0,92	tr	0,35	1,02	1,20	0,39
22:6	2,77	2,19	1,69	2,99	2,50	1,98	3,12	2,50	1,56

(a) Composición en ácidos grasos de fosfatidilcolinas.

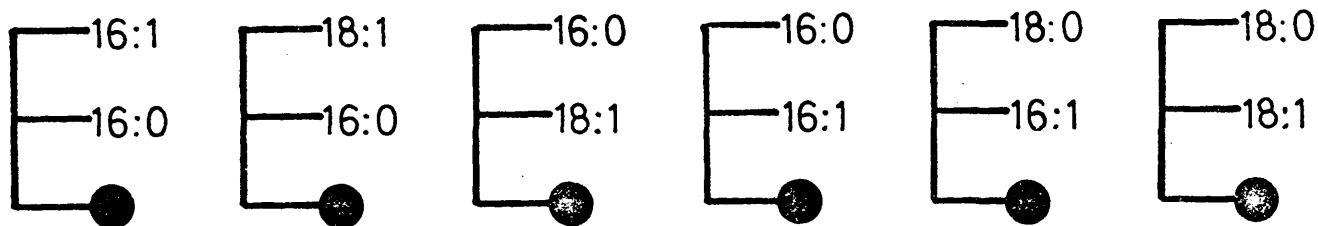
(b) Composición en ácidos grasos de 3-acetil-1,2-diacil-sn-glicerolés.

(c) Composición en ácidos grasos de 3-acetil-1,2-diacil-sn-glicerolés reconstruidos a partir de las fracciones de éstos resultantes de la cromatografía de argentación.

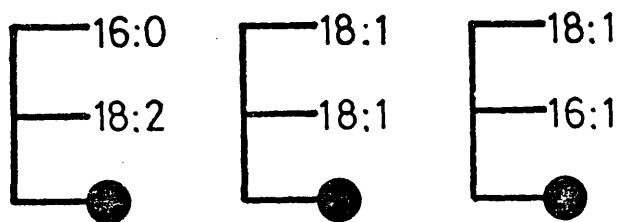
DISATURADAS



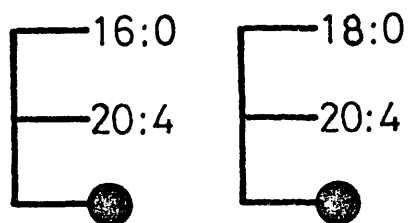
MONOENOICAS



DIENOICAS



TETRAENOICAS



HEXAENOICAS

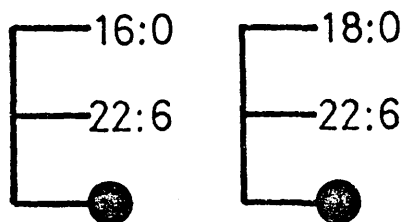


FIGURA 7: ESPECIES MOLECULARES MAYORITARIAS DE FOSFATIDILCOLINA EN EL ENCEFALO EMBRIONARIO DE AVES

anteriormente en nuestro laboratorio, y debe ser interpretada en principio, como consecuencia del mantenimiento de la capacidad biosintética del tejido encefálico en desarrollo, hipótesis esta, que posteriormente fue objeto de investigación.

Como se ha observado para la mayoría de los fosfolípidos naturales, nuestra población de fosfatidilcolinas está integrada por moléculas con una distribución selectiva de ácidos grasos, en el sentido de que la mayor parte de los restos de acilo insaturados, se hallan unidos a la posición sn-2, mientras que los saturados esterifican principalmente al grupo hidroxilo en posición sn-1 del resto glicerol. Esta distribución observada en las especies moleculares, es totalmente coherente con la información obtenida por degradación con fosfolipasa A<sub>2</sub> del "pool" de fosfatidilcolinas encefálicas.

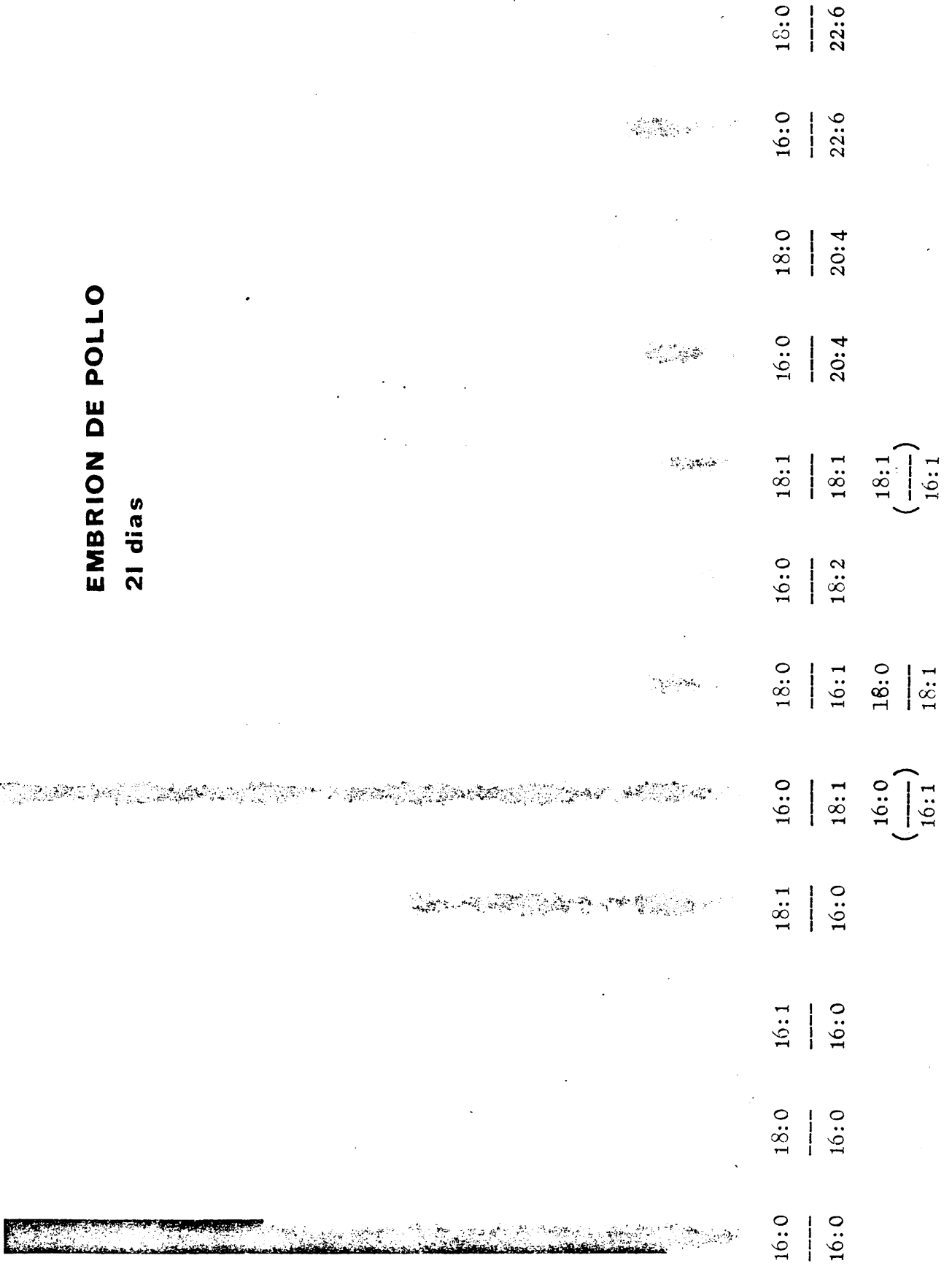
En las figuras 8, 9, 10, 11, 12 y 13, se muestra la composición molecular detallada de las fosfatidilcolinas de encefalo de embrión de pollo de 13, 17 y 21 días de edad, así como las equivalentes del embrión de pato: 17, 22 y 28 días. Asimismo, en la figura 14, aún a riesgo de perder algún detalle, se recoge toda esta información de modo conjunto, en orden a una mejor comparación de los resultados obtenidos. En cualquier caso, sólo se han representado aquellas especies moleculares que suponen, en alguno de los estadios del desarrollo estudiados, más de un 2 % del total.

Las primeras conclusiones que se desprenden de la observación de tales resultados, son, la ya comentada estabilidad composicional de las fosfatidilcolinas con el desarrollo y la gran semejanza que entre si presentan, en este aspecto, las dos especies de aves estudiadas, lo cual aboga una vez más en favor de la idea de una especificidad de órgano muy acusada para las fosfatidilcolinas encefálicas. Estos hechos, junto con la escasa variación que presentan, tanto la composición en ácidos grasos, como la distribución posicional de estos en las fosfatidilcolinas durante el desarrollo (veanse apartados 3.2. y 3.3.),

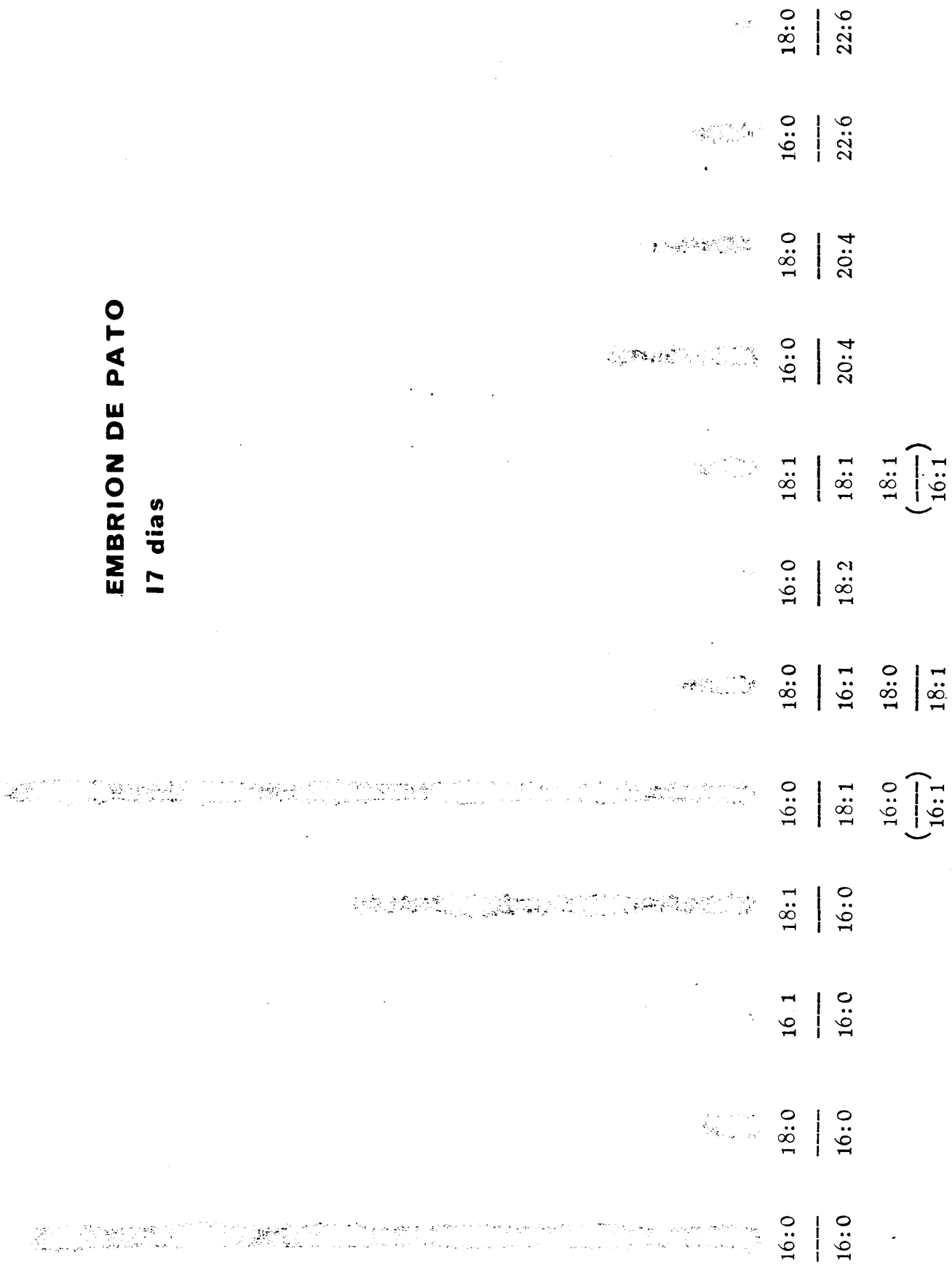




**EMBRION DE POLLO**  
21 dias



**EMBRION DE PATO**  
**17 días**





**EMBRION DE PATO**  
**28 dias**

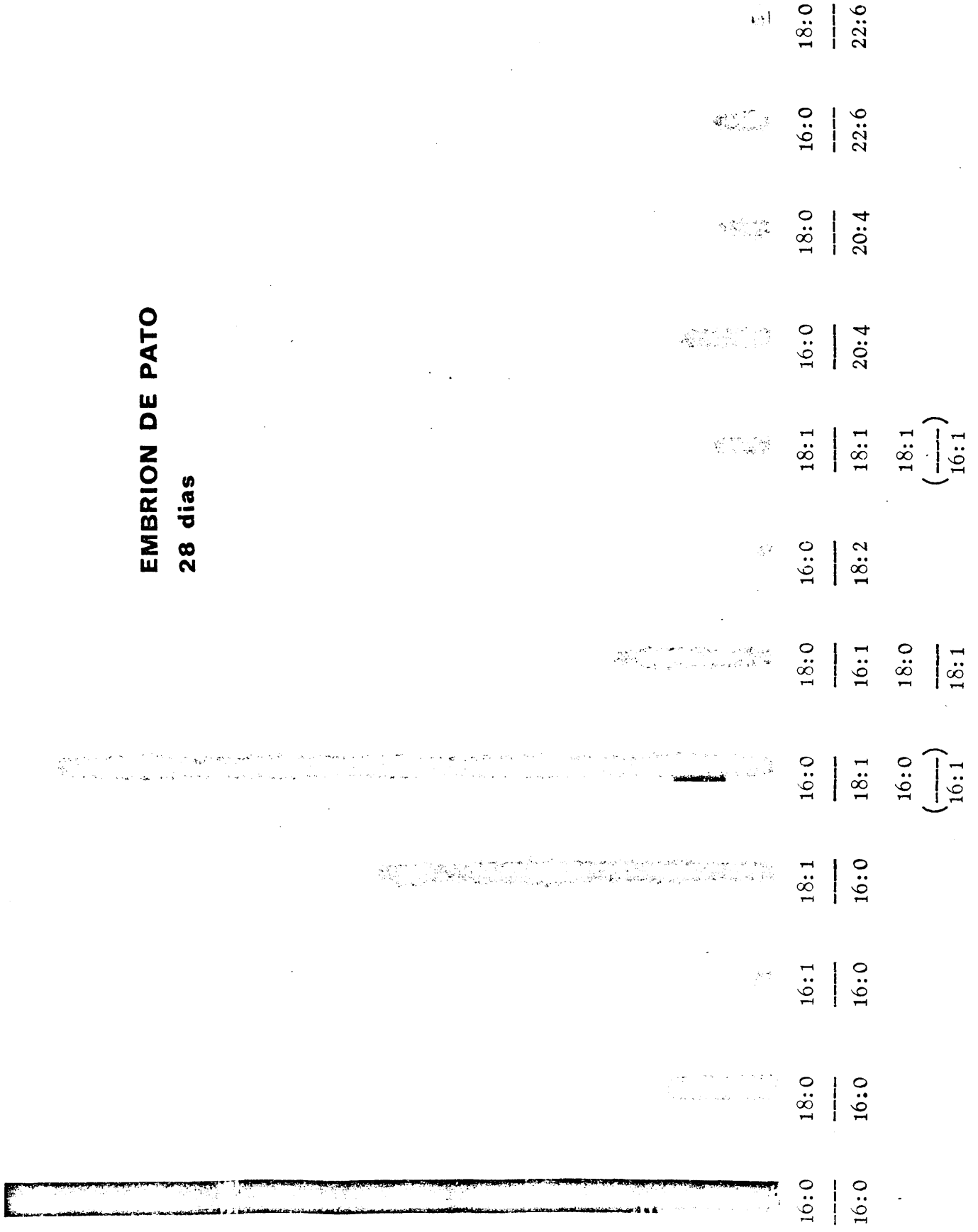
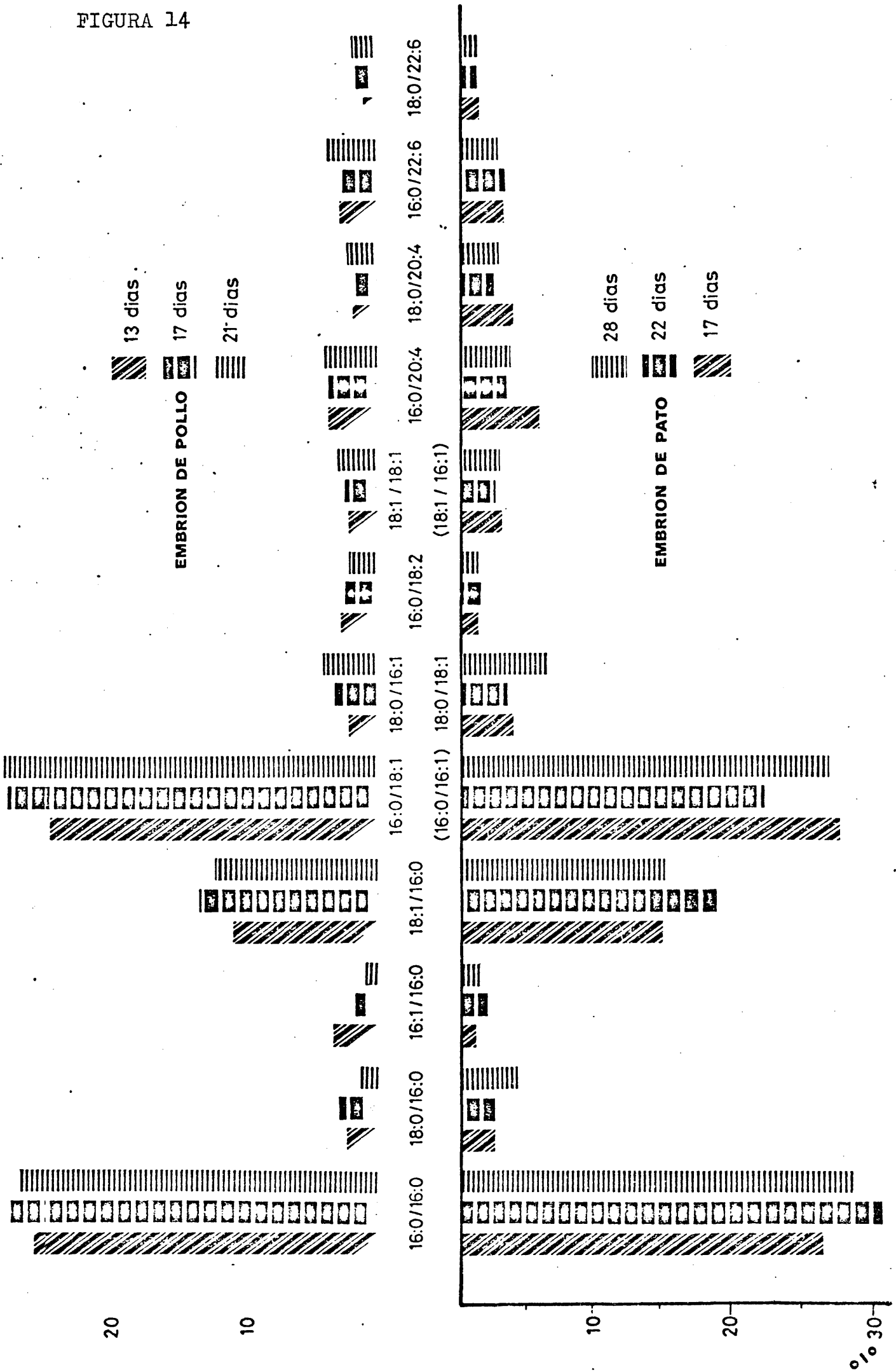


FIGURA 14



hace, en nuestra opinión que la composición en especies moleculares en los puntos del desarrollo estudiados, representen una buena aproximación, para cualquier otra etapa del desarrollo que se desee tomar en consideración, representando pues en las figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12, lo que debe ser norma general en las fosfatidilcolinas de encéfalo de aves durante todo el desarrollo embrionario.

Las especies moleculares de fosfatidilcolinas más importantes cuantitativamente en nuestro material biológico, son, por este orden, las monoénicas y las disaturadas, que representan aproximadamente un 50 y un 30 % del total.

En la fracción de especies moleculares disaturadas, la representante principal es la 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina, que presenta un ligero incremento en sus niveles en el día 17 de incubación para el embrión de pollo, y en el día 22, equivalente del anterior, en el embrión de pato, coincidiendo con el ligero aumento de la abundancia relativa de ácido palmítico que se registra en esas edades, del que se dió cuenta en el apartado 3.2. La abundancia relativa de esta especie molecular, es superior a las descritas para la misma en la mayoría de los materiales biológicos (Montfoort et al., 1.971; Klaus et al., 1.961), excepción hecha para el tejido pulmonar donde presenta niveles aun más elevados (Montfoort et al., 1.971; Soodsma et al., 1.976).

Otra representante de las especies moleculares disaturadas, aunque con mucha menor importancia cuantitativa, es la 1-estearoil, 2-palmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina, no detectándose nunca la molécula simétrica, es decir, aquella que tendría ácido palmítico en posición sn-1 y ácido esteárico en posición sn-2. Es interesante recalcar, dentro de este grupo de moléculas disaturadas, la ausencia en nuestro material biológico, de cantidades apreciables de 1-palmitoil, 2-estearoil-sn-glicero-3-fosforilcolina o de 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosforilcolina, por ser congruente con los resultados obtenidos de los estudios so-

bre permeabilidad de liposomas (Demel et al., 1.968; De Gier et al., 1.968; Inohue, 1.974), que concluyen en que la presencia de estas moléculas hace la estructura de la bicapa demasiado rígida e impermeable. Por otra parte, la ausencia de moléculas tales como dilauril- o dimiristoil-lecitina no sorprende a la vista del anómalo comportamiento que han demostrado en sistemas modelo (Reman y Van Deenen, 1.967).

Las especies moleculares monoénicas se hallan en el encéfalo embrionario aun en mayor proporción que las anteriores. En esta fracción, las moléculas principales son la 1-palmitoil, 2-oleoil-sn-glicero-3-fosforilcolina y su simétrica, 1-oleoil, 2-palmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina, como corresponde a las mayores abundancias relativas que presentan estos ácidos grasos en las fosfatidilcolinas de partida. Cabe señalar aquí, como característica peculiar del encéfalo, que la 1-oleoil, 2-palmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina, no se presenta en cantidades apreciables en otros órganos embrionarios tales como el hígado (Abad, 1.974) o el pulmón (Soodsma et al., 1.976), hecho que se achacó en su día, a una selectividad posicional del resto oleoil, que realmente fue comprobada, en hígado, con estudios de incorporación de ácidos grasos radioactivos (Lands y Hart, 1.966; Van den Bosch et al., 1.968; Coll, 1.975).

Otras especies monoénicas presentes en las fosfatidilcolinas del encéfalo embrionario, son las correspondientes a las combinaciones de los ácidos grasos saturados palmítico y esteárico, con los monoinsaturados, oléico y palmitoléico, acilando indistintamente las posiciones sn-1 ó sn-2, excepción hecha del ácido esteárico que no se detectó nunca sobre la posición sn-2.

Las especies moleculares dienóicas, presentan unos niveles relativamente bajos, alrededor del 7 %, y se encuentran bajo dos formas: por doble insaturación en la misma cadena apolar (ácido linoléico) y por concomitancia de dos cadenas monoinsaturadas dentro de la misma molécula. La primera de estas moda-

lidades, tiene como único representante a la 1-palmitoil, 2-linoleoil-sn-glicero-3-fosforilcolina, que resulta ser algo menos abundante en el embrión de pato, mientras que la segunda modalidad, cuenta casi en solitario con la 1,2-dioleoil-lecitina que en ningún caso supera el 4 - 5 % del total de fosfatidilcolinas. Ambas especies monoenoicas, han sido descritas con anterioridad en el encéfalo de animales superiores (Montfoort et al., 1.971).

Las especies moleculares poliinsaturadas, tetraenóicas y hexaenóicas principalmente, presentan tanto en uno como en otro caso, niveles de un 6 - 9 % en todos los puntos del desarrollo estudiados, es decir con una baja abundancia relativa en comparación con otros órganos embrionarios aunque es de suponer que en etapas muy tempranas (anteriores al 9º día de incubación para el caso del pollo), sean cuantitativamente más importantes, dados los mayores niveles de ácidos grasos poliinsaturados que presentan las lecitinas al comienzo del desarrollo (veanse apartados 3.2. y 3.3.). En todos los casos, es el ácido palmítico y no el esteárico, el que acompaña preferentemente, en posición sn-1, a los ácidos araquidónico y docosahexenónico, para dar lugar a las especies poliinsaturadas mayoritarias, 1-palmitoil, 2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolina y 1-palmitoil, 2-docosahexenoil-sn-glicero-3-fosforilcolina. Estos tipos de especies moleculares poliinsaturadas, son las más frecuentes en tejidos de animales superiores, si bien la situación se invierte en el caso de las especies tetraenóicas del hígado de embrión de pollo (Abad, 1.974), del hígado de conejo y cerdo (Montfoort et al., 1.971) y del cerebro de vaca (Montfoort et al., 1.971), donde es el ácido esteárico, en posición sn-1, el que acompaña al ácido araquidónico, en posición sn-2, con mayor frecuencia que el ácido palmítico.

No se han detectado especies di-poliinsaturadas, por ejemplo, a base de combinaciones araquidónico/araquidónico o araquidónico/docosahexenónico, etc., lo cual se halla de acuerdo con

la inestabilidad observada en sistemas modelo contruidos con dichas especies moleculares (De Gier et al., 1.968).

Con los resultados descritos en este apartado, hemos obtenido una descripción virtualmente completa de las distintas especies moleculares que constiruyen las fosfatidilcolinas del encéfalo embrionario de aves, así como de sus abundancias relativas durante el desarrollo, pero llegados a este punto, el tipo de experimentación seguido, puramente analítico y estructural, dejaba sin contestar una serie de cuestiones que se plantearon a continuación y que hacian referencia a la misma capacidad biosintética del tejido encefálico en desarrollo o al origen de cada una de las especies moleculares anteriormente descritas, dada la diversidad de rutas metabólicas capaces de dar lugar a lecitinas y la posibilidad de que puedan o no ser operativas en una etapa dada del desarrollo. Es por ello que, una vez superada esta primera etapa, más estática, de descripción de estructuras moleculares, fuera necesario iniciar otro tipo de experimentación, más dinámico, que en principio, pudiera permitir dar respuesta a estas cuestiones planteadas. Los resultados a que se llegó con ella, son los que se exponen en el próximo apartado.

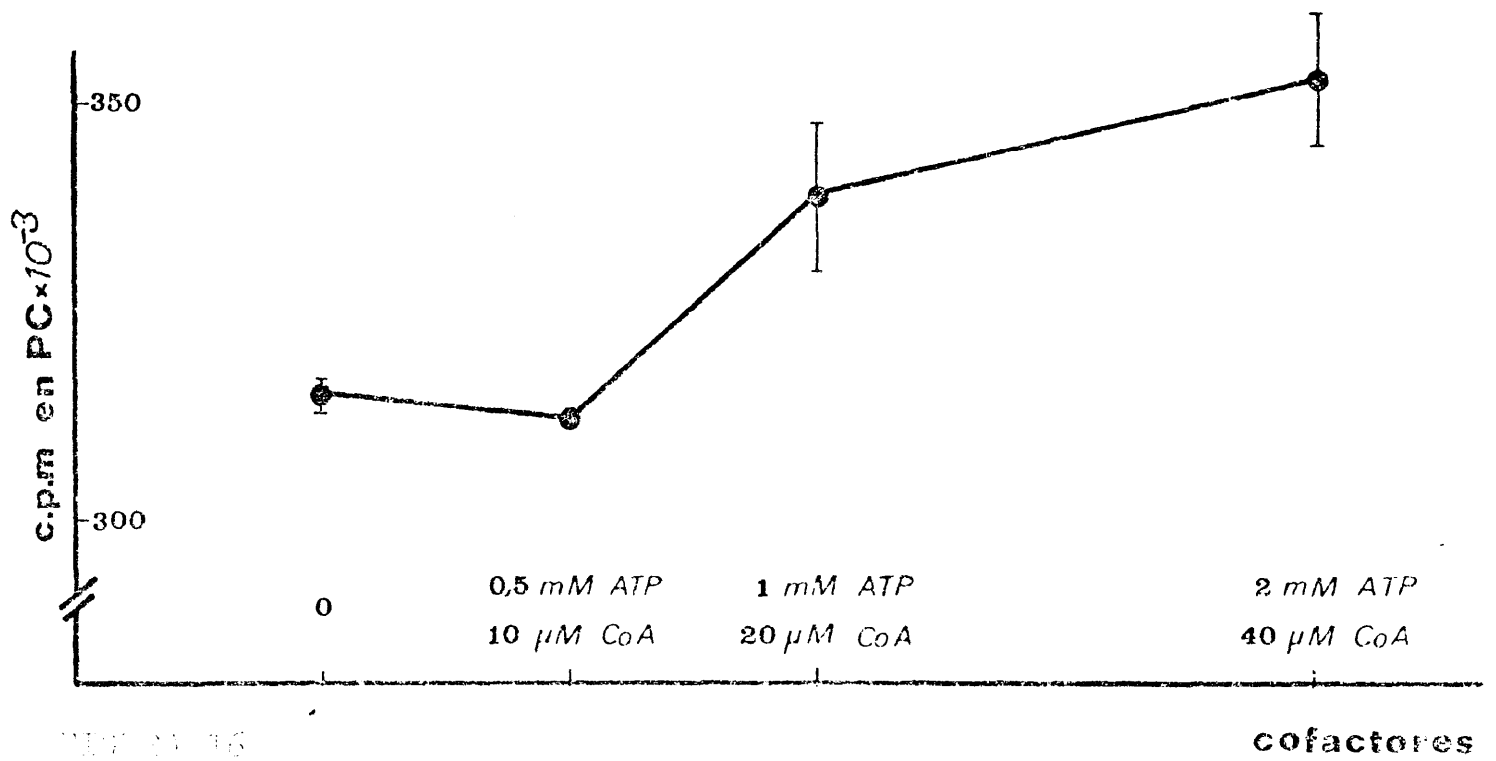
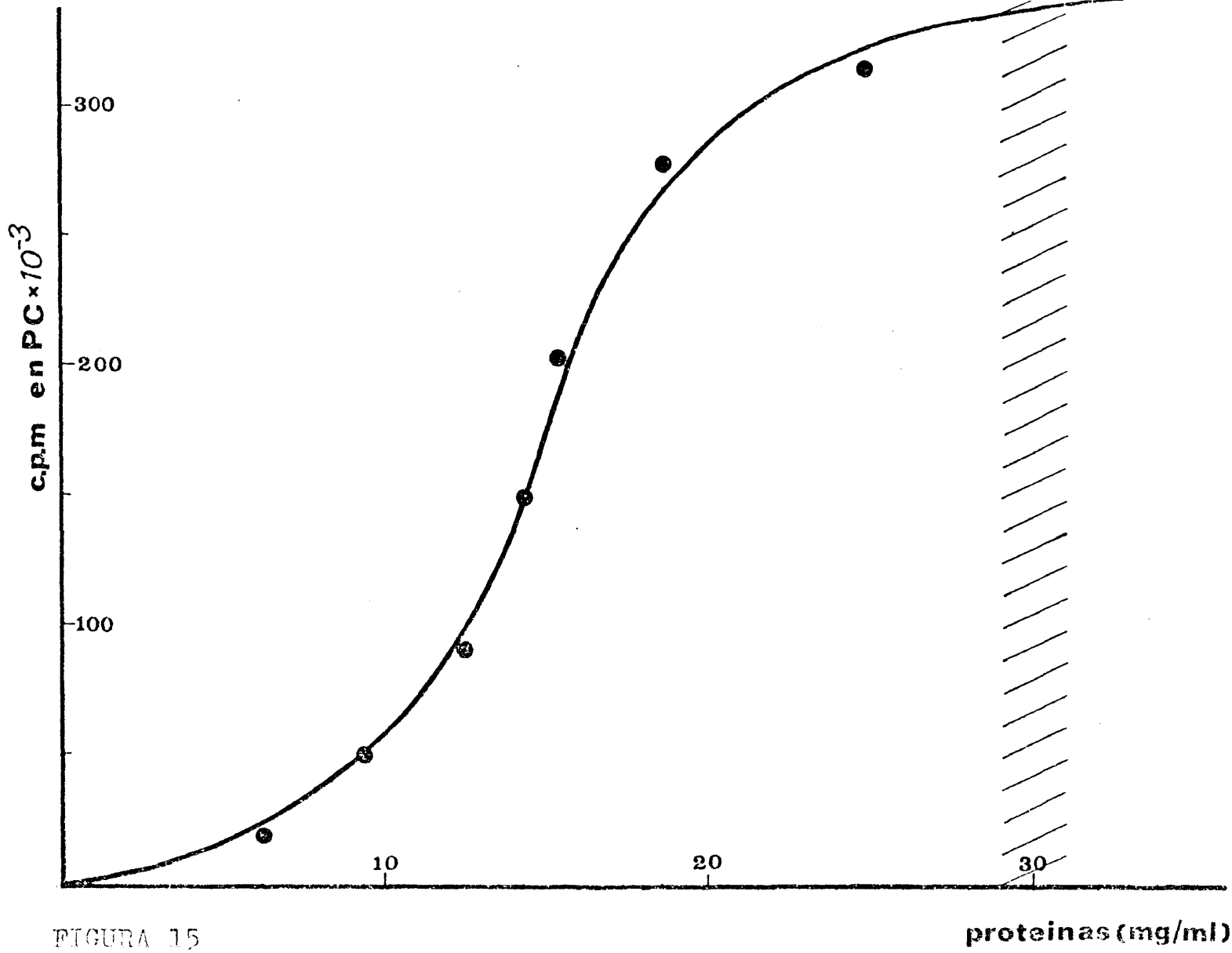
### 3.5. INCORPORACION DE ACIDO PALMITICO-1-<sup>14</sup>C.-

El primer problema que plantea una investigación que pretende elucidar el origen de varias especies moleculares distintas es el de seleccionar el precursor marcado adecuado, que para serlo, ha de cumplir una condición básica: la de ser un componente estructural común a todas las especies o grupos de especies moleculares objetos de estudios, de manera que, en principio, pueda incorporarse a todas ellas, dando así cuenta de la intensidad de su biosíntesis. En este sentido, los distintos autores han venido utilizando como precursores, distintos productos: glicerol, sn-glicerol-3-fosfato, ortofosfato, etc., marcados con <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>32</sup>P, etc., pero en nuestro caso, dado que el ácido palmítico cumple la condición de ser un componente estructural común a todos los grupos de especies disaturadas, monoénicas, dienóicas, etc., nos pareció adecuada su utilización.

En la presente investigación, se han utilizado exclusivamente embriones de pollo doméstico de 13, 17 y 21 días de edad, como proveedores del tejido encefálico a estudiar.

#### 3.5.1. ELECCION DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES Y ESTUDIO DE LA INCORPORACION.-

Para comenzar los estudios de biosíntesis de fosfatidilcolinas, fueron necesarios varios ensayos previos para la puesta a punto de un sistema "in vitro" que, estando lo menos alterado posible respecto a las condiciones originales del material biológico, respondiera a unas exigencias mínimas en lo que a la incorporación del precursor radioactivo se refiere. En este sentido, en la figura 15, se muestra la variación que experimenta



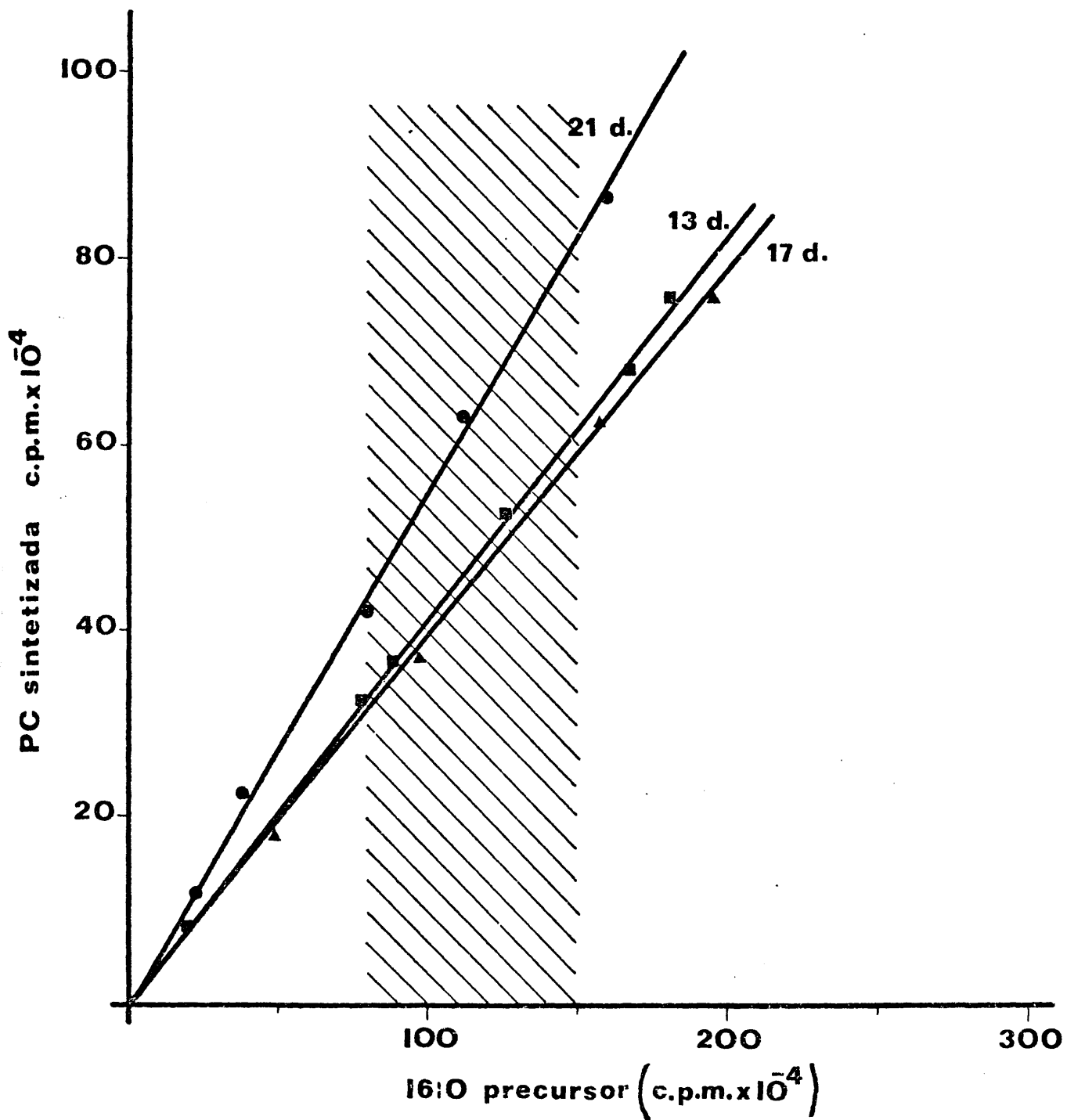


FIGURA 17

la incorporación de ácido palmítico- $l$ - $^{14}C$  a lecitinas, frente a la concentración de proteínas de encéfalo de embrión de pollo de 21 días en el medio de incubación. La incorporación sigue una curva sigmoidea que se estabiliza en una meseta a partir de los 24 - 26 mg de proteína/ml. La zona de trabajo escogida por nosotros fue la correspondiente a 30 mg de proteína/ml, que suministra una incorporación máxima e independiente de posibles errores experimentales que pudieran cometerse en la preparación de homogeneizados.

El efecto de la presencia de algunos cofactores, ATP y Coenzima A, también se ensayó con embriones de pollo de 21 días, mostrándose los resultados obtenidos en la figura 16, donde puede observarse un aumento de la incorporación a lecitinas con concentraciones crecientes de cofactores. Las concentraciones de dichos cofactores en el medio de incubación, seleccionadas para nuestra experimentación, fueron de 2 mM de ATP y 40 - 60  $\mu$ M de coenzima A, que ocasionan un aumento aproximado de un 10 % en la incorporación, que si bien no es cuantitativamente muy importante, permite trabajar con mayor holgura.

Otro punto importante a comprobar, en orden a expresar la incorporación como porcentaje de la radioactividad inicialmente contenida en el ácido graso precursor, es el efecto que pudiera tener la adición al medio de incubación de cantidades variables de dicho precursor marcado. Los resultados se muestran en la figura 17, donde puede observarse que en la zona de trabajo utilizada (entre 0,7 y  $1,5 \times 10^6$  c.p.m. de ácido palmítico- $l$ - $^{14}C$ ), el aumento de la incorporación con la cantidad de precursor, es perfectamente lineal, lo cual da total validez al sistema de expresión indicado anteriormente, que de otro modo no sería viable.

Bajo las condiciones experimentales anteriormente descritas, se obtuvo, en las tres etapas del desarrollo estudiadas, una recuperación de la radioactividad en lípidos totales que se ha representado en la figura 18 como porcentaje de la radioactividad

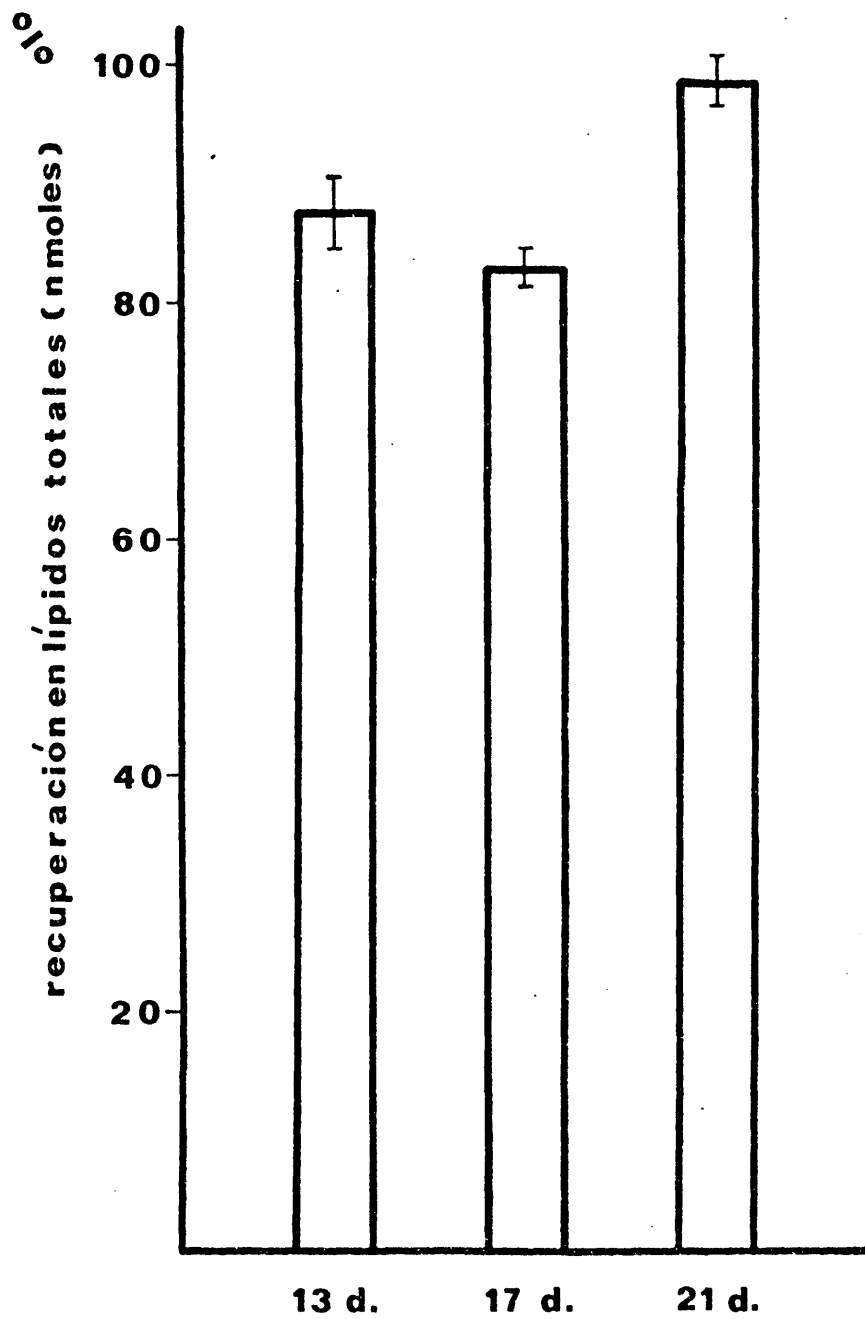


FIGURA 18

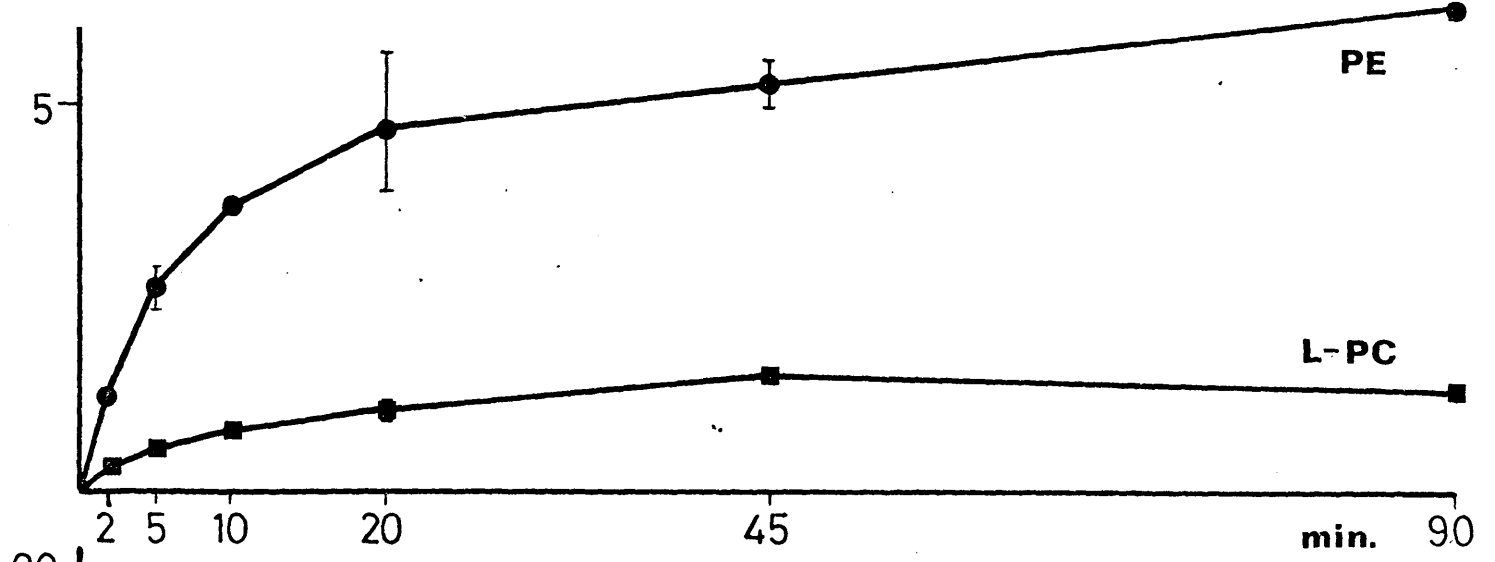
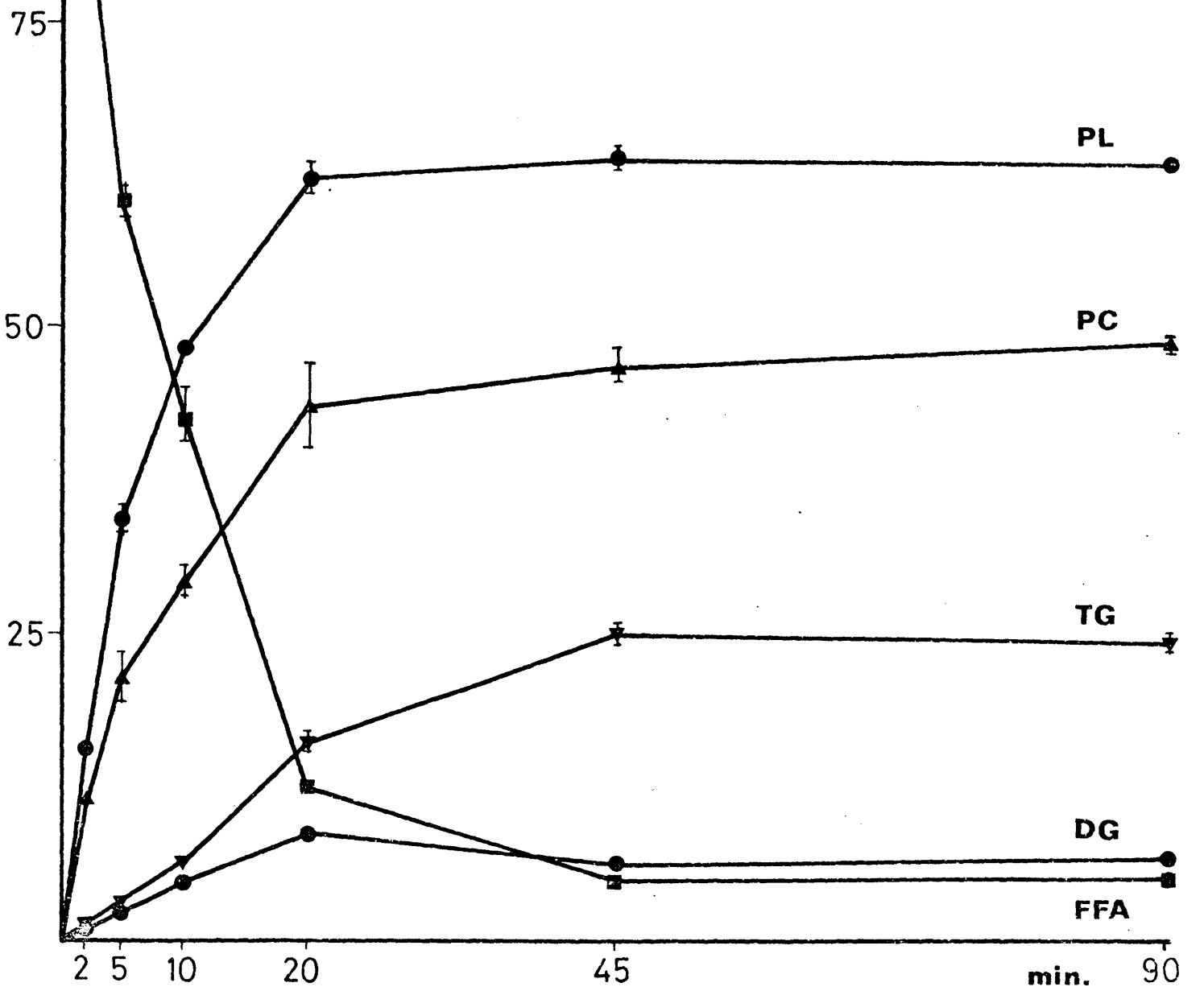


FIGURA 19

13 días



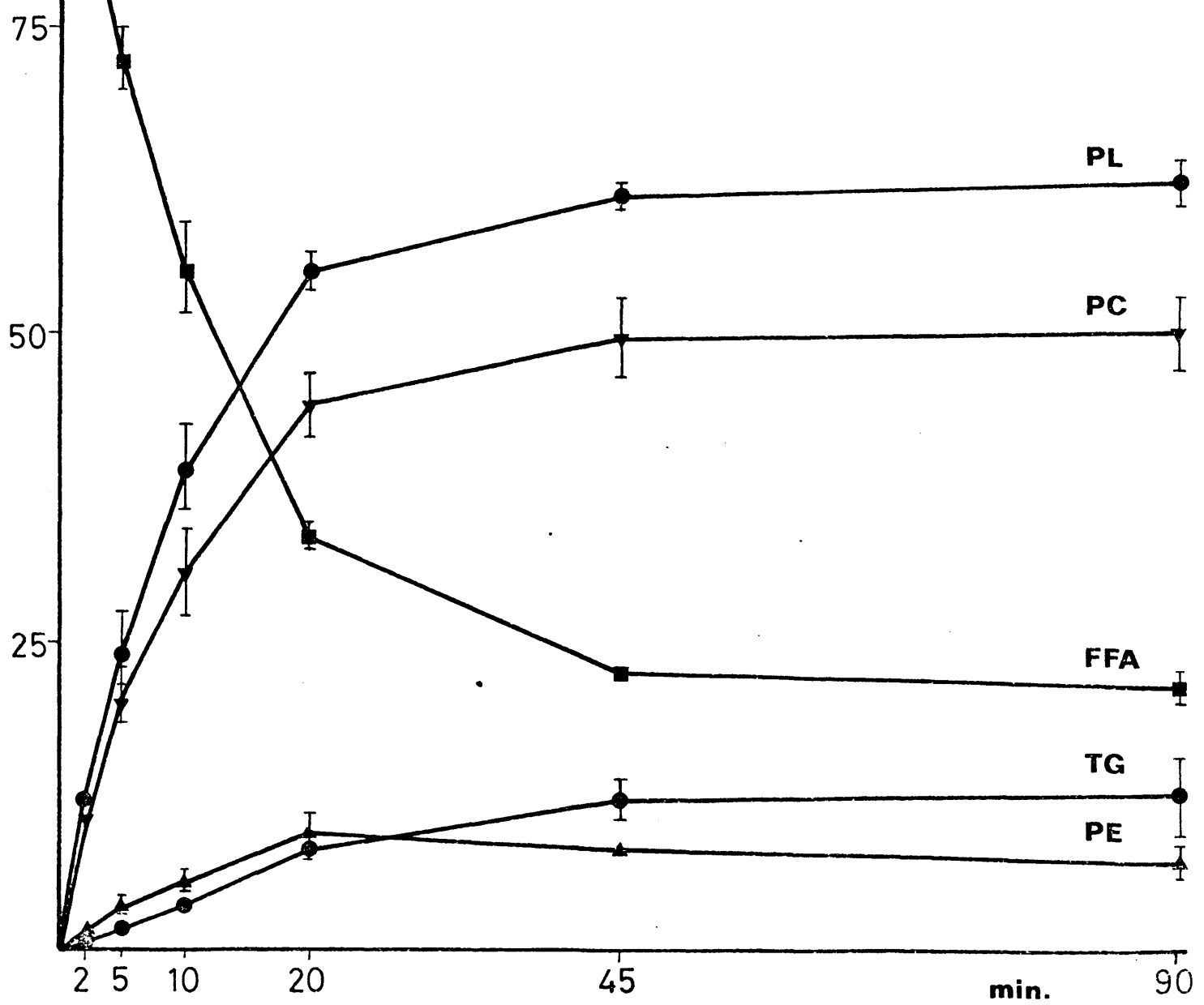
DG

L-PC

00 2 5 10 20 45 min. 90

FIGURA 20

17 días



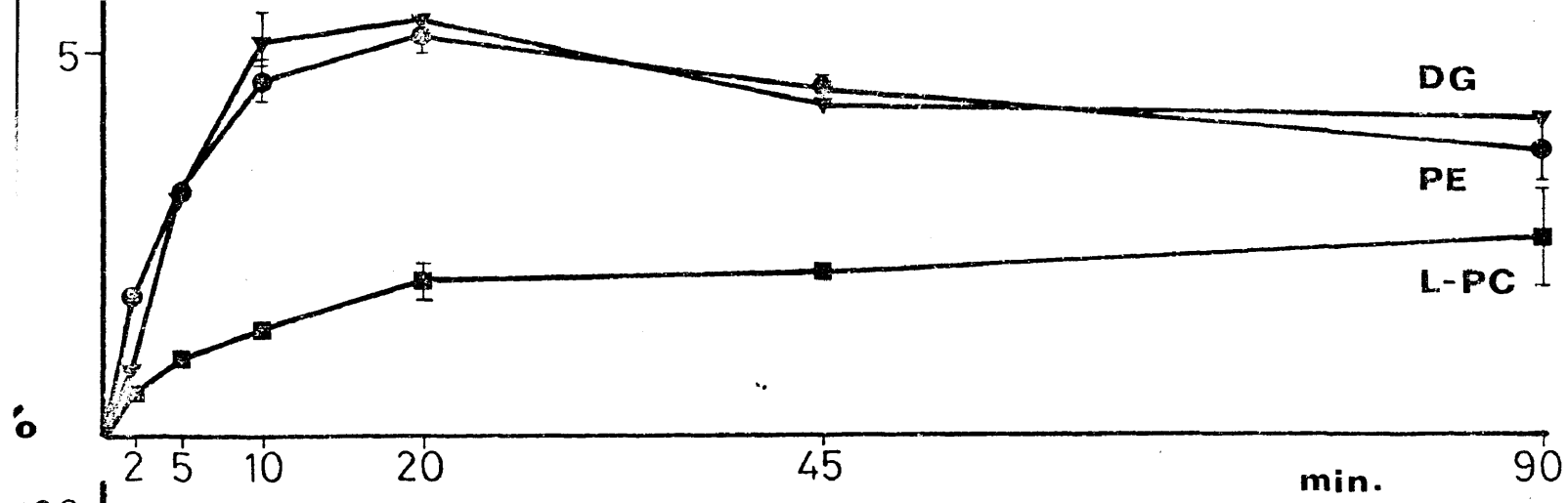
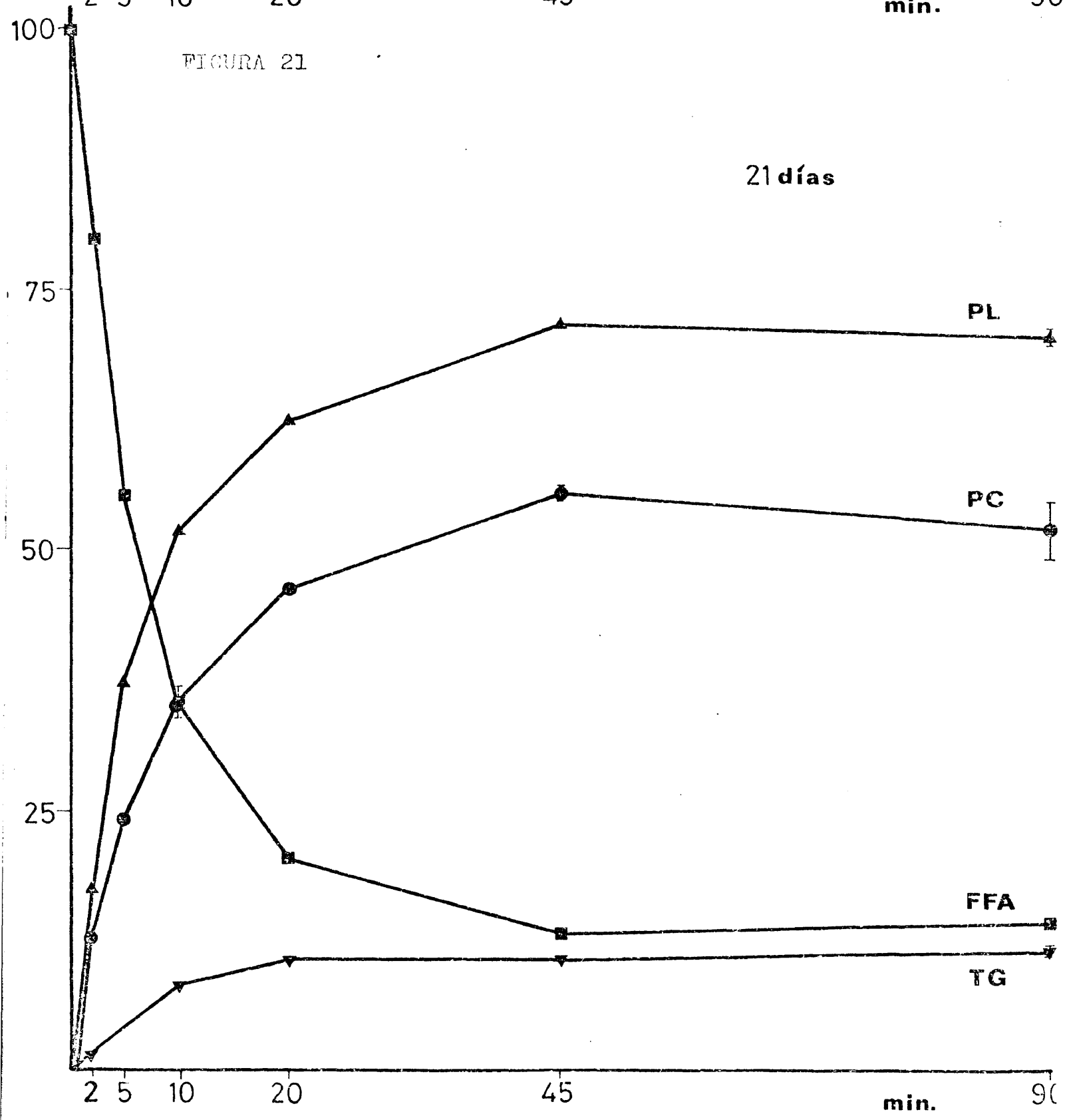


FIGURA 21

21 días



inicialmente contenida en el ácido palmítico-1-<sup>14</sup>C utilizado como precursor. La recuperación de dicha radioactividad oscila alrededor del 80 - 90 %, excepto para el embrión de 21 días, en el que resulta ser prácticamente total.

En las figuras 19, 20 y 21 se ha representado la variación con el tiempo de incubación (de 2 a 90 minutos) de la incorporación a las distintas clases lipídicas, expresada como porcentaje de la actividad recuperada en lípidos totales. Las curvas que representan tanto la aparición del marcaje en las clases lipídicas, como la desaparición del mismo en la fracción de ácidos grasos libres, se estabilizan al cabo de 30 - 45 minutos del comienzo de la incubación, para cualquiera de las tres etapas del desarrollo estudiadas. En este sentido, llama poderosamente la atención el hecho de la gran incorporación que se registra en la fracción fosfolipídica total y muy especialmente, en fosfatidilcolinas, que da cuenta aproximadamente de un 50 % de la actividad recuperada en lípidos totales, lo que es equivalente a decir un 40 - 45 % de la actividad inicialmente contenida en el ácido graso precursor (ver figura 18), no siendo frecuente en otros sistemas biológicos, "in vivo" o "in vitro", una eficacia tal en la incorporación de ácidos grasos. Esta extraordinaria capacidad biosintética resulta muy interesante porque permitiría explicar, en principio, la elevada abundancia relativa con que se presentan las fosfatidilcolinas en el tejido encefálico en desarrollo, aun cuando el posible origen endógeno de éstas, sólo puede demostrarse dando cuenta de todas las especies moleculares que las constituyen, punto este que se abordará más adelante (apartado 3.5.3.). La incorporación de ácido palmítico-1-<sup>14</sup>C a fosfatidilcolinas, aun cuando muy elevada en las tres etapas del desarrollo estudiadas, resulta ser sensiblemente superior en el embrión de 21 días (veanse figuras 18 y 21).

La siguiente clase lipídica en importancia, aunque muy distanciada de las lecitinas, por lo que a la incorporación de ácido palmítico-1-<sup>14</sup>C se refiere, son los triglicéridos, que tras

dar cuenta en el embrión de 13 días de un 25 % de la actividad de los lípidos totales, descienden hasta un 10 % a los 17 y 21 días. Pese a esa menor incorporación en relación con las lecitinas, si consideramos que la abundancia relativa en moles de los triglicéridos encefálicos es muy inferior a la de aquellas, resultaría plausible la hipótesis de que ambas clases lipídicas, tengan actividades específicas semejantes, lo cual abogaría en favor de un origen común, a partir de una misma ruta metabólica, para las mismas, hecho este, en cierta medida congruente con la semejanza que presentan en la composición de ácidos grasos (ver apartado 3.2.).

Otras clases lipídicas, tales como fosfatidiletanolaminas o liso-fosfatidilcolinas, presentan niveles muy bajos de incorporación, lo cual debe indicar probablemente una heterogeneidad metabólica, entre éstas y las fosfatidilcolinas, pese a su afinidad estructural.

En ningún caso se detectó actividad alguna en las fracciones de colesterol, esteres de colesterol o monoglicéridos, por lo que no figuran en las representaciones.

La utilización del ácido palmítico marcado, es máxima en el embrión de 13 días, en el que subsisten tan sólo unos niveles residuales de éste de alrededor de un 5 %, a partir de los 45 minutos de iniciada la incubación.

### 3.5.2. DISTRIBUCION POSICIONAL DE LA RADIOACTIVIDAD EN FOSFATIDILCOLINAS.-

En el apartado anterior se apuntó la posibilidad de que las fosfatidilcolinas del encéfalo embrionario tuvieran, dada la capacidad biosintética de aquel, un origen endógeno. Con objeto de averiguar como el ácido palmítico- $1-^{14}\text{C}$  incorporado "in vitro" se distribuyen entre las posiciones sn-1 y sn-2 del resto glicerol, se tomaron fosfatidilcolinas de encéfalos embrionarios de

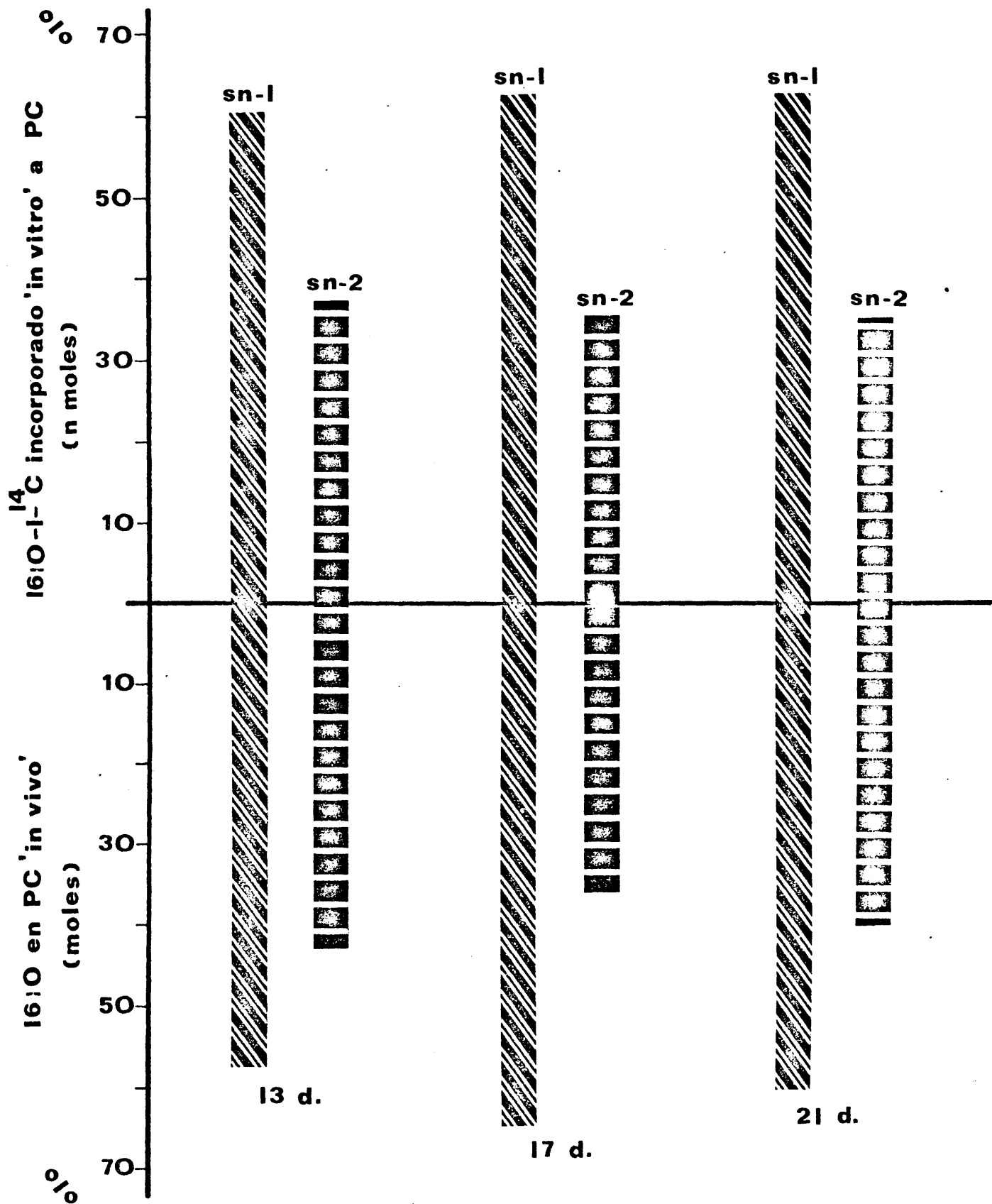


FIGURA 22

13, 17 y 21 días de edad, procedentes de incubaciones con ácido palmítico marcado, de 1 hora de duración, a las que, una vez purificadas, se añadieron lecitinas sin marcar de las mismas etapas del desarrollo, tras lo cual, se sometieron a tratamiento con fosfolipasa A<sub>2</sub>, procediéndose a continuación al contaje de la actividad en las fracciones resultantes de lisolecitinas y ácidos grasos libres. Los resultados obtenidos, se muestran en la figura 22, donde al mismo tiempo se establece una comparación con la distribución posicional "in vivo" del ácido palmítico sobre las lecitinas, calculada a partir de los datos expuestos en los apartados 3.2. y 3.3.

De la observación de los datos representados en la figura 22, puede fácilmente deducirse la extraordinaria semejanza que presentan ambos tipos de distribuciones posicionales, cuyas ligeras diferencias, posiblemente sean debidas al error experimental que se acumula en los distintos procedimientos analíticos utilizados. Las semejanzas observadas, se deben interpretar como que el ácido palmítico incorporado da cuenta de prácticamente todo el ácido palmítico presente en fosfatidilcolinas, tanto en posición sn-1, como en posición sn-2, con lo cual la idea de un origen endógeno de, substancialmente todas las fosfatidilcolinas encefálicas, que vendrían dadas por una activa biosíntesis "de novo" (que da cuenta de la introducción de restos de acilo en ambas posiciones), se ve fuertemente reforzada, aun cuando su verosimilitud no sería total sin una demostración a nivel de las distintas especies moleculares.

### 3.5.3. INCORPORACION A ESPECIES MOLECULARES DE FOSFATIDILCOLINAS.-

En los apartados 3.5.1. y 3.5.2. se han ido aportando algunas pruebas acerca del origen endógeno de las fosfatidilcolinas del encéfalo embrionario, que resultarían de la actuación de una ruta de biosíntesis "de novo", señalándose asimismo, que la prue-

ba definitiva a esta hipótesis, vendría dada por una demostración a nivel de todas las especies o grupos de especies moleculares que constituyen dicho fosfolípido. En este apartado se ha abordado este problema, haciendo para ello uso de la técnica de fraccionamiento directo de lecitinas por cromatografía de argenticación, descrita en el apartado 2, que rinde separadamente, cuatro fracciones: 1) especies moleculares disaturadas, monoenoicas y dienoicas, que aparecen en el cromatograma como una única banda, 2) especies tetraenóicas, 3) especies hexaenóicas y 4) una pequeña fracción constituida principalmente por especies pentaenóicas, que si bien resultan ser despreciables en masa, presentan unos niveles de actividad no despreciables en las incorporaciones.

Los resultados obtenidos de los fraccionamientos de lecitinas procedentes de incubaciones con ácido palmítico marcado, correspondientes a encéfalo de embriones de pollo de 13, 17 y 21 días de edad, vienen dados en las figuras 23, 24 y 25 respectivamente, donde se han representado los porcentajes de incorporación a cada fracción (como nmoles de ácido palmítico- $1-^{14}C$ ) con relación a las lecitinas totales, frente a los distintos tiempos de incubación en un intervalo de 2 a 90 minutos. Este tipo de representaciones, han resultado ser de gran utilidad por cuanto que permiten observar posibles relaciones entre los distintos grupos de especies moleculares, así como establecer el tiempo a partir del cual la incorporación a cada uno de estos grupos se estabiliza.

De la observación de estos resultados, puede concluirse que en las tres etapas del desarrollo embrionario estudiadas, la incorporación a cada uno de los grupos de especies moleculares, permanece practicamente constante desde el inicio de la incubación, aun cuando la estabilización definitiva, no se consigue sino hasta transcurridos los primeros 30 - 45 minutos.

En adición a lo anterior, puede observarse que entre los resultados que muestran las figuras 23, 24 y 25, y los expuestos en el apartado 3.4., parece existir, en principio, una gran si-

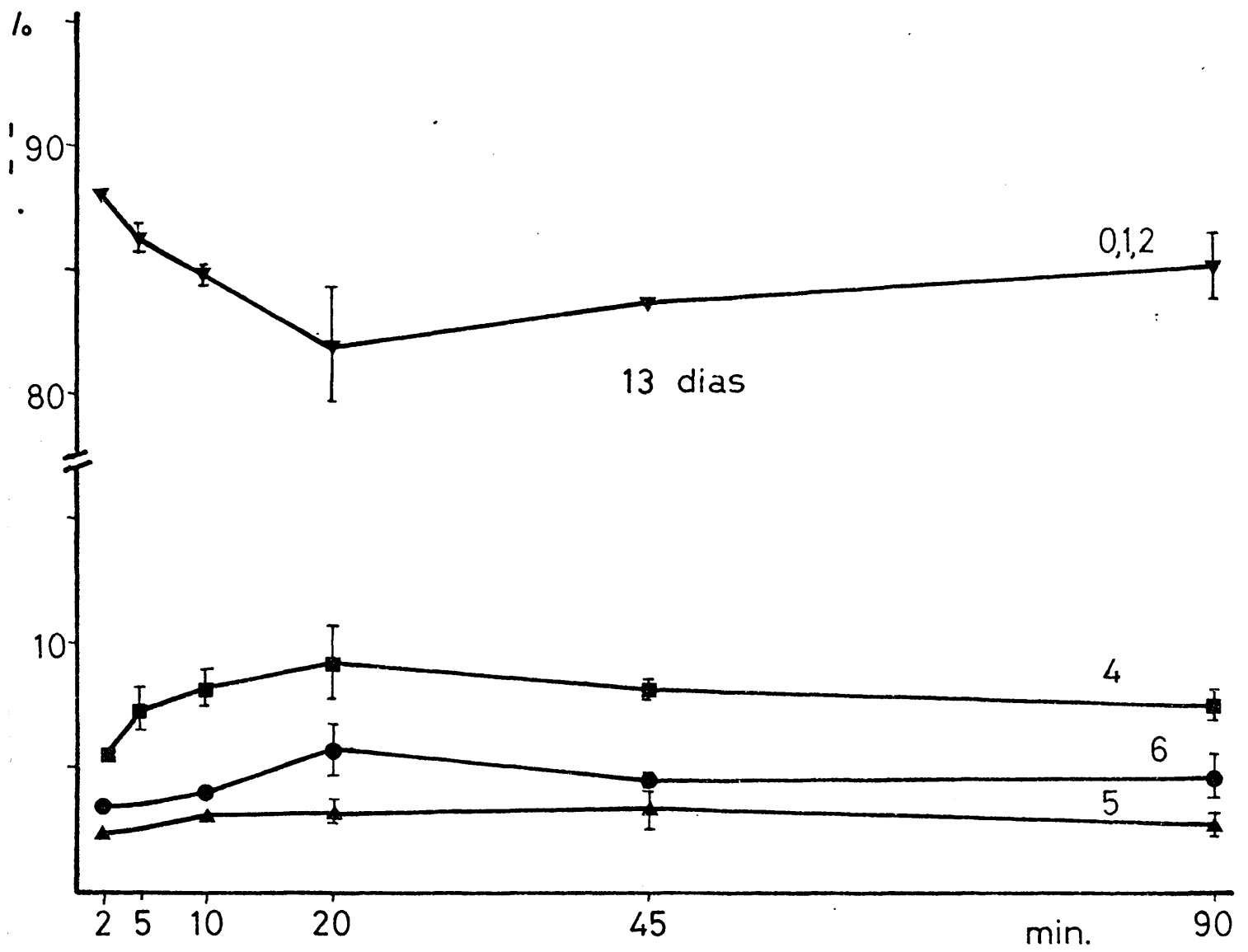


FIGURA 23

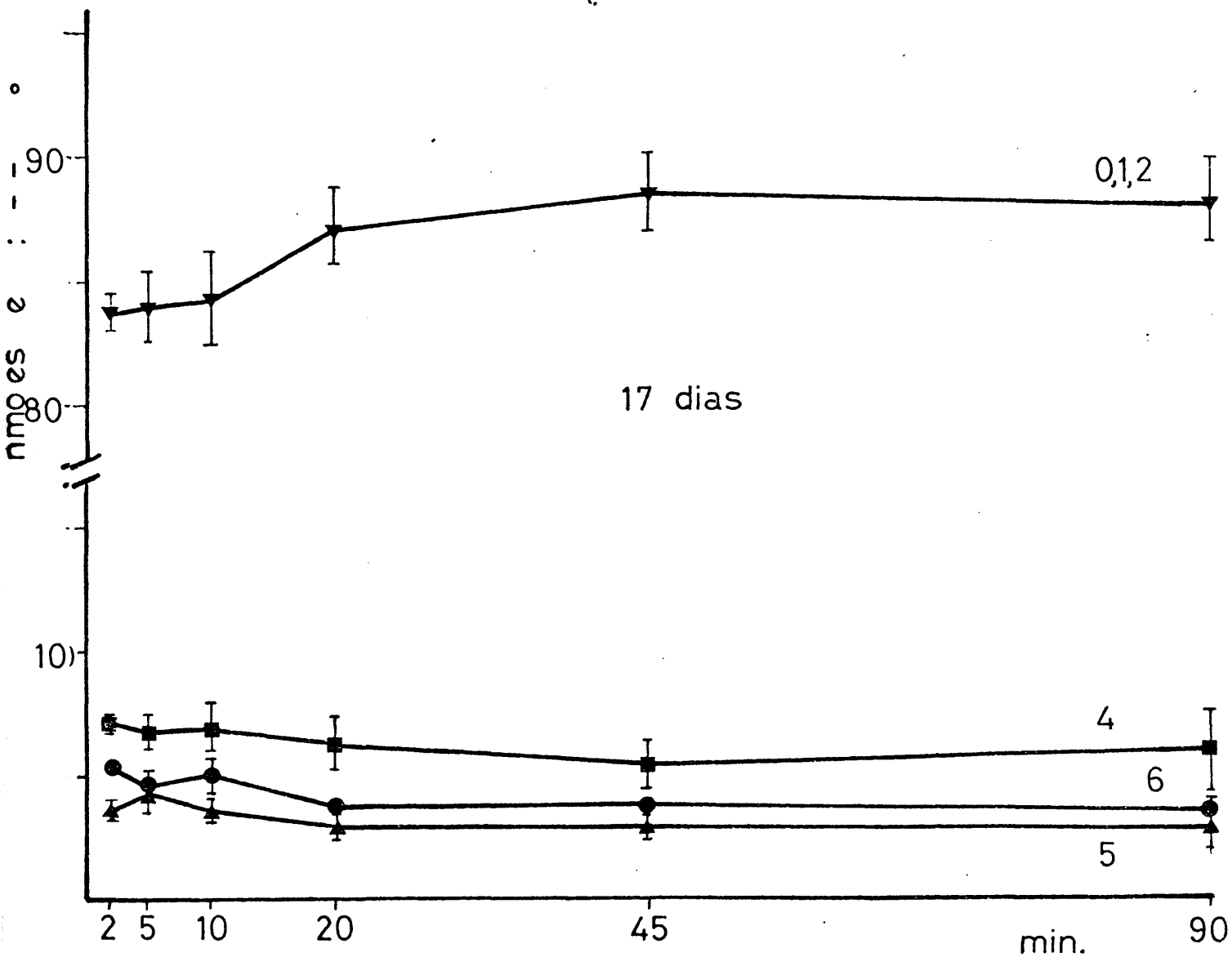


FIGURA 24

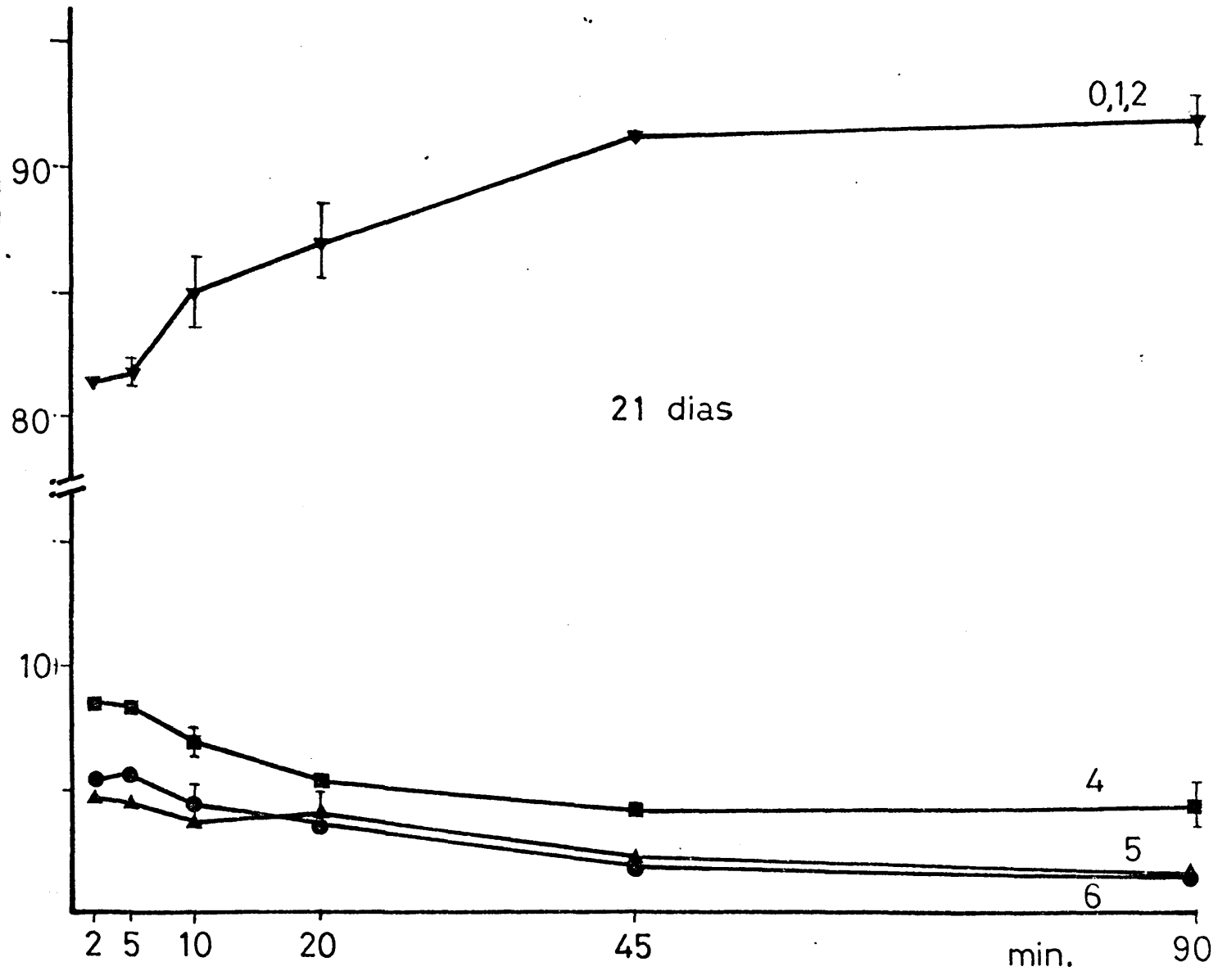


FIGURA 25

militud entre ambos, ya que los grupos de especies moleculares más marcados son precisamente aquellos que presentan una mayor abundancia relativa en moles. Ahora bien, esta comparación que, en términos cualitativos es válida, no lo es cuantitativamente, por cuanto que la variable medida en nuestra experimentación es la incorporación de ácido palmítico a los distintos grupos de especies moleculares y no la biosíntesis de cada una de estas lecitinas, distinción que viene establecida por la distinta abundancia relativa del ácido palmítico en cada una de ellas. Esta diferencia entre ambos conceptos podría salvarse únicamente en el caso de que la incorporación del ácido palmítico marcado, siguiera exactamente la misma pauta definida por la distribución que dicho ácido graso presenta en las distintas especies moleculares, hecho este que en principio, parece plausible dado que se ha demostrado ya en la distribución posicional sobre las lecitinas totales (apartado 3.5.2.). Si dicha suposición fuese válida y no operase, de modo significativo, ninguna otra ruta de biosíntesis de fosfatidilcolinas, dividiendo los porcentajes de incorporación, expuestos en la zona estabilizada de las figuras 23, 24 y 25, por el número medio de moles de ácido palmítico presente en cada grupo de especies moleculares y expresando esto en porcentajes, obtendríamos la actividad específica porcentual de cada fracción, que representaría el porcentaje de incorporación de ácido palmítico por mol de lecitinas, formalmente equivalente al porcentaje de biosíntesis de cada grupo de especies moleculares. Los resultados obtenidos de este modo, se muestran en la figura 26, donde junto con ellos, se han representado las abundancias relativas en moles con que estos mismos grupos de especies moleculares se presentan "in vivo" en el encéfalo en desarrollo.

La congruencia observada entre ambas representaciones sugiere fuertemente la idea de que la capacidad biosintética del encéfalo en desarrollo da cuenta de prácticamente todos los grupos de especies moleculares de fosfatidilcolinas, que tendrían

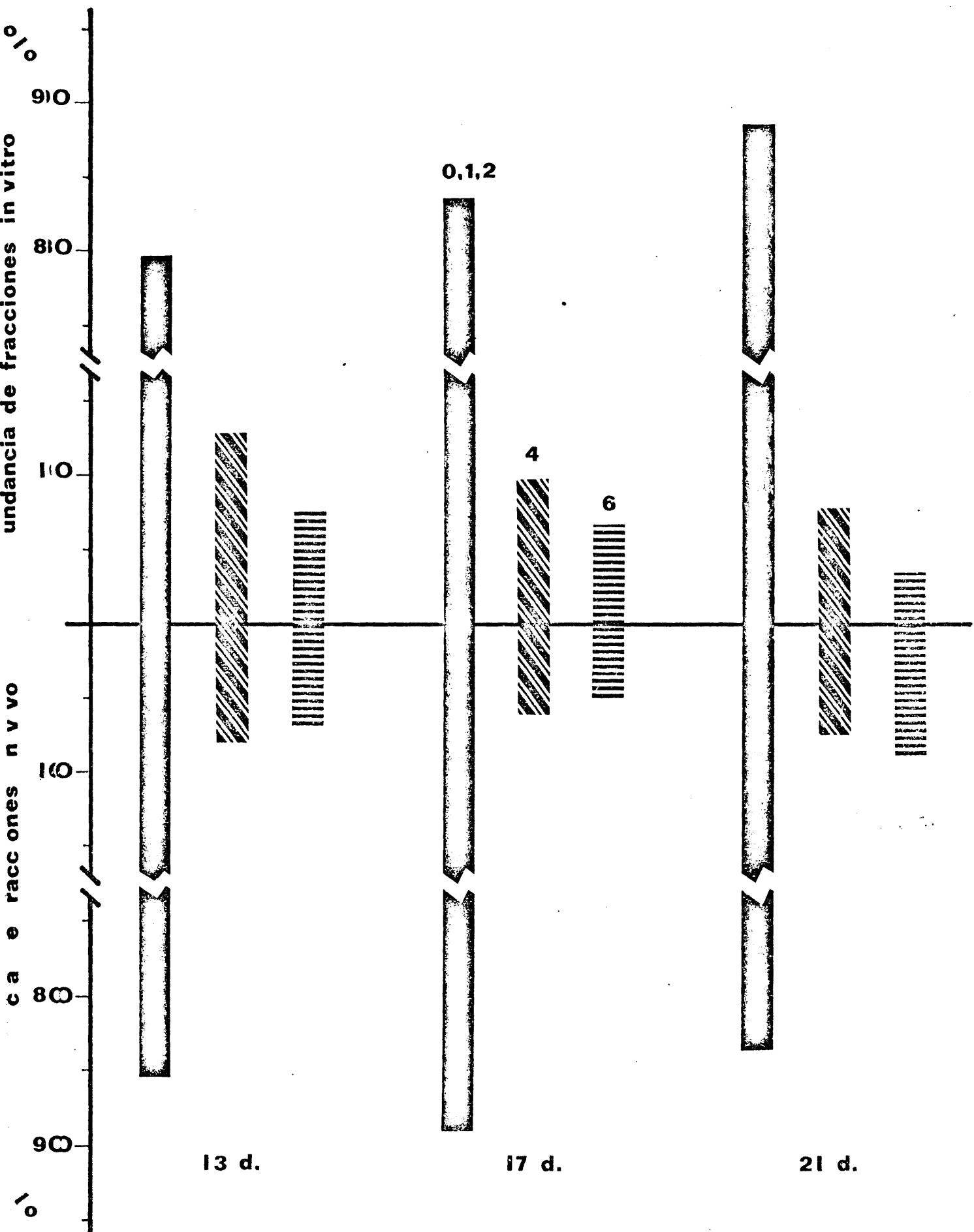
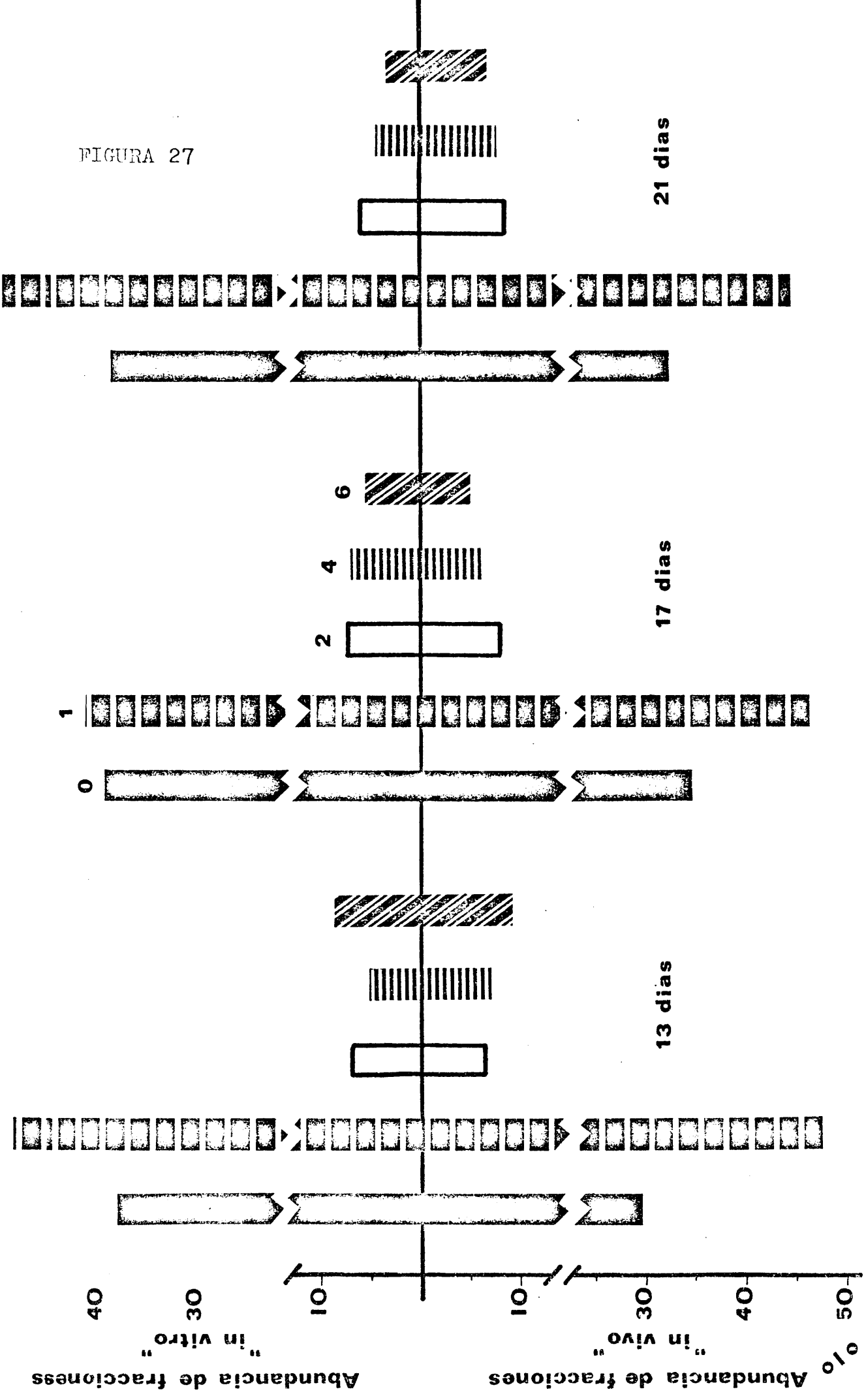


FIGURA 26

FIGURA 27



por tanto un origen endógeno, y da validez a la hipótesis de partida acerca de como se distribuye en dichas moléculas el ácido palmítico precursor, lo que constituye una prueba directa de la operatividad de una biosíntesis "de novo" muy activa que daría cuenta, quizá por sí sola, de la aparición de los distintos tipos de especies moleculares.

La proposición anterior puede, no obstante, objetarse debido al hecho de la limitación experimental que establece la técnica de fraccionamiento directo de lecitinas por cromatografía de argentación, que rinde como única, una fracción tan importante en el encéfalo como la constituida por la suma de las especies disaturadas, monoénicas y dienicas, que dan cuenta de un 80 - 90 % del total de especies moleculares y que no tienen, en principio, porque presentar un comportamiento homogéneo que aquí se les ha supuesto. La única forma de soslayar esta incertidumbre, es utilizar en la experimentación una técnica de mayor poder de resolución, como la ya descrita cromatografía de argentación de 3-acetil-1,2-diacil-sn-gliceroles derivados de las lecitinas, utilizada en la elucidación de la composición en especies moleculares de las mismas (apartado 3.4.). Para ello, se tomaron lecitinas marcadas procedentes de incubaciones a 1 hora con ácido palmítico-1, <sup>14</sup>C, a las que se añadieron 4 - 5 mg de lecitinas sin marcar, procediéndose a continuación a su transformación en acetatos de diglicéridos (ver apartado 2), fraccionándose estos por cromatografía de argentación y determinándose la actividad en cada una de las bandas del cromatograma. Los resultados obtenidos acerca de la distribución de la radioactividad, expresada como actividad específica porcentual, se han representado en la figura 27 frente a las abundancias relativas, en moles, de cada uno de los grupos de especies moleculares, pudiendo observarse una gran similitud entre ambos tipos de resultados, que no hace sino consolidar las conclusiones anteriormente expuestas acerca del origen de las fosfatidilcolinas del encéfalo en desarrollo.

### 3.5.4. EFECTO DEL $\text{Ca}^{++}$ SOBRE LA INCORPORACION.-

Kennedy, en 1.957, describió la gran sensibilidad que la ruta de biosíntesis "de novo" que lleva su nombre presenta frente al  $\text{Ca}^{++}$ , incluso a bajas concentraciones de éste. En este sentido, nos pareció oportuno llevar a cabo un estudio sobre el efecto del  $\text{Ca}^{++}$  sobre la incorporación de ácido palmítico a lecitinas en el encéfalo embrionario, con la intención de obtener alguna otra confirmación independiente acerca de la operatividad de dicha ruta metabólica en la biosíntesis de los distintos grupos de especies moleculares.

Para ello, se utilizaron encéfalos precedentes de embriones de pollo de 13 días de edad, que por presentar unos niveles relativos máximos de incorporación a los grupos minoritarios de especies tetra y hexaenóicas (ver figura 23 y 26), parecía ser el material biológico más adecuado para medir dicho efecto en todos los grupos de especies moleculares presentes.

Las incubaciones se realizaron a dos tiempos diferentes, 5 y 90 minutos, en medios cuyas concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  fueron en ambos casos, de 0, 1 y 3 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 28, donde puede constatarse una fuerte inhibición de la incorporación frente a concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  crecientes. Dicha inhibición, se manifiesta tanto en el conjunto de las fosfatidilcolinas encefálicas, como en cada uno de los grupos de especies moleculares que las constituyen, reduciendo la incorporación a un 50 % de su valor normal, entre los valores límites del rango de concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  ensayadas, hecho este, que apoya la operatividad de la biosíntesis "de novo" vía ruta de Kennedy.

El efecto de concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{++}$  sobre la incorporación de ácido palmítico a los distintos grupos de especies moleculares, puede observarse con mayor facilidad en la figura 29, donde se ha representado la distribución de la in-

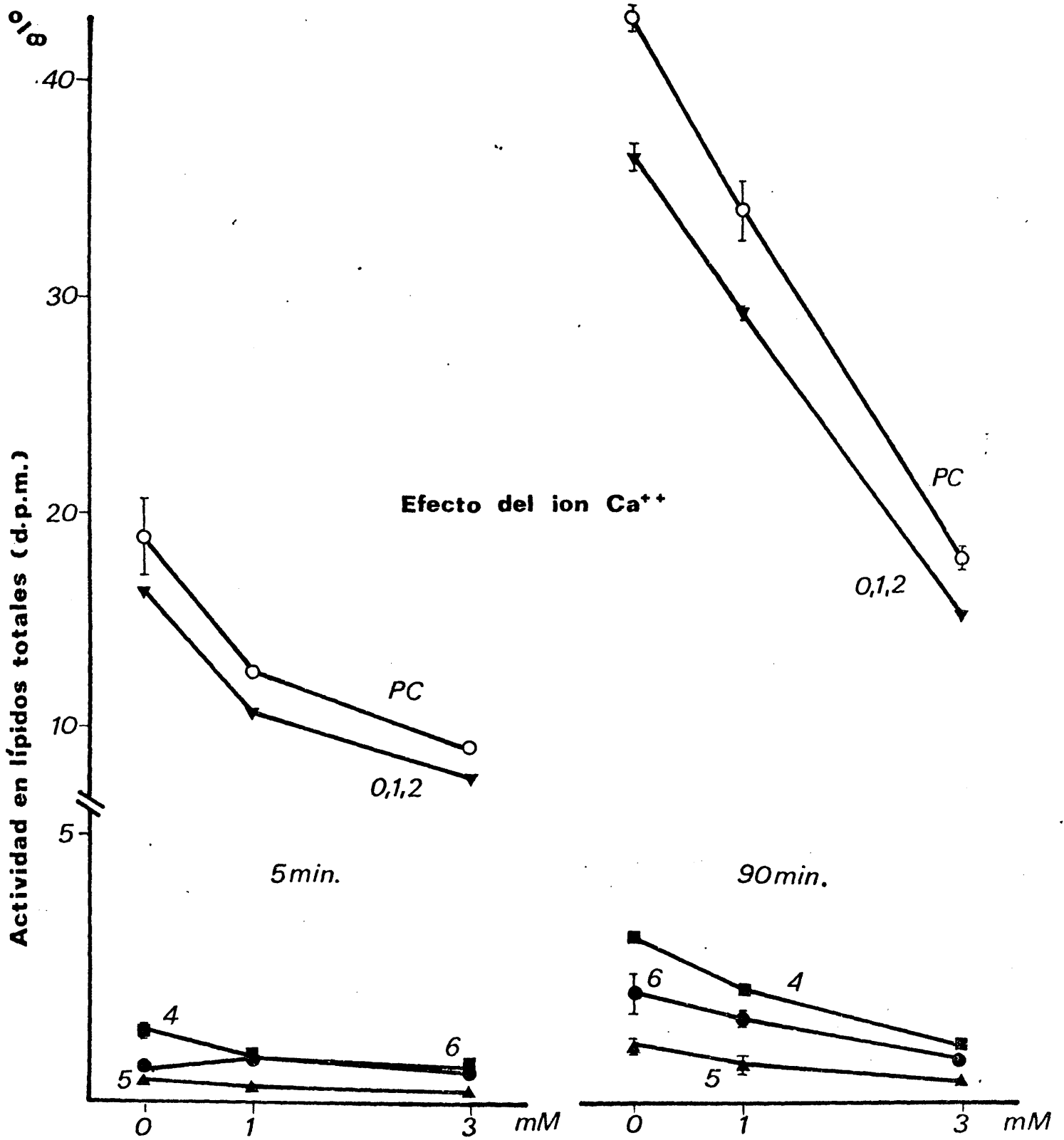


FIGURA 28

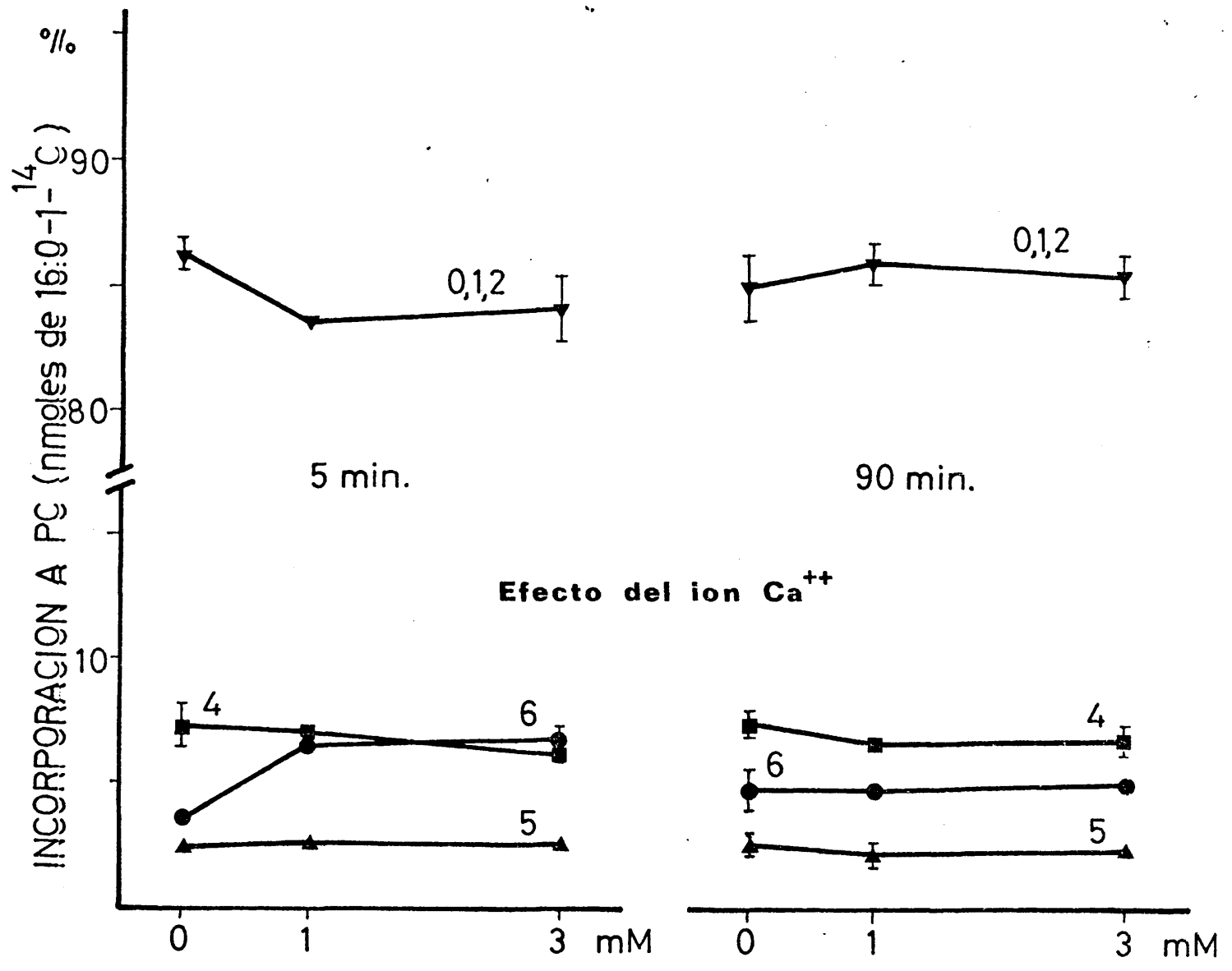


FIGURA 29

corporación en cada grupo, en nmoles de ácido palmítico-1-<sup>14</sup>C, con relación a la incorporación total en lecitinas, a los dos tiempos de incubación estudiados. Todos los grupos de especies moleculares parecen verse igualmente afectados por la presencia del Ca<sup>++</sup>, hecho este que sugiere que prácticamente todos esos grupos, deben sintetizarse por esa misma ruta sensible al Ca<sup>++</sup>, esto es, la ruta de Kennedy, excepción hecha, si acaso, de las especies hexaenóicas que, a los 5 minutos de incubación, presentan un comportamiento distinto al del resto de especies moleculares, si bien, dicha variación, además de ser poco significativa, deja de presentarse en las incubaciones a 90 minutos.

### 3.5.5. CICLO DE DESACILACION-ACILACION.-

Las experiencias descritas en los apartados 3.5.2., 3.5.3. y 3.5.4., al tiempo que ponen de manifiesto la operatividad de una biosíntesis "de novo" muy activa para las fosfatidilcolinas encefálicas, reducen la posible operación de otras rutas metabólicas a términos cuantitativamente poco importantes. A pesar de esto y debido al hecho de que la posibilidad de un ciclo de desacilación-acilación en el encéfalo ha sido postulado por diversos autores (Baker y Thompson, 1.972; Braüning y Gercken, 1.976; Gullis y Rowe, 1.975 y 1.976) y demostrada en el hígado embrionario del pollo (Coll, 1.975) nos pareció conveniente verificar la posible operatividad de dicho ciclo en nuestro sistema "in vitro". Para ello se tomaron lecitinas marcadas, procedentes de incubaciones con ácido palmítico-U-<sup>14</sup>C, que una vez purificadas, se utilizaron como sustrato radioactivo para medir la actividad fosfolipásica del tejido, o se sometieron a hidrólisis con fosfolipasa A<sub>2</sub> de *Crotalus adamanteus*, para obtener liso-fosfatidilcolinas marcadas, sustrato de las acilaciones. En este tipo de experiencias se utilizaron únicamente encéfalos procedentes de embriones de pollo de 17 días de edad.

Los resultados obtenidos de las experiencias destinadas a medir la actividad fosfolipásica del encéfalo embrionario, se muestra en la tabla 19, donde puede observarse que, en las condiciones "in vitro" ensayadas, dicha actividad desacilante es prácticamente nula y en cualquier caso inespecífica, ya que, como se muestra en la figura 30, la distribución de la radioactividad en los distintos grupos de especies moleculares de lecitinas, permanece inalterada.

TABLA 19: ABUNDANCIA RELATIVA DE ACIDO PALMITICO-U-<sup>14</sup>C (nmoles)  
EN SUSTRATOS Y PRODUCTOS FINALES EN EXPERIENCIAS DE  
DESACILACION DE LECITINAS

	% de actividad	
	t = 0 min.	t = 60 min.
PC	86,93	87,08
liso-PC	0,96	1,38
FFA	12,38	11,00

TABLA 20: ABUNDANCIA RELATIVA DE ACIDO PALMITICO-U-<sup>14</sup>C (nmoles)  
EN SUSTRATOS Y PRODUCTOS FINALES EN EXPERIENCIAS DE  
ACILACION DE 2-LISOLECITINAS

	% de actividad	
	t = 0 min.	t = 60 min.
PC	2,77	63,89
liso-PC	93,40	4,48
FFA	3,63	31,59

Por lo que se refiere a la capacidad de acilación de 2-lisolecitinas, en la tabla 20, puede observarse que es relativamen-

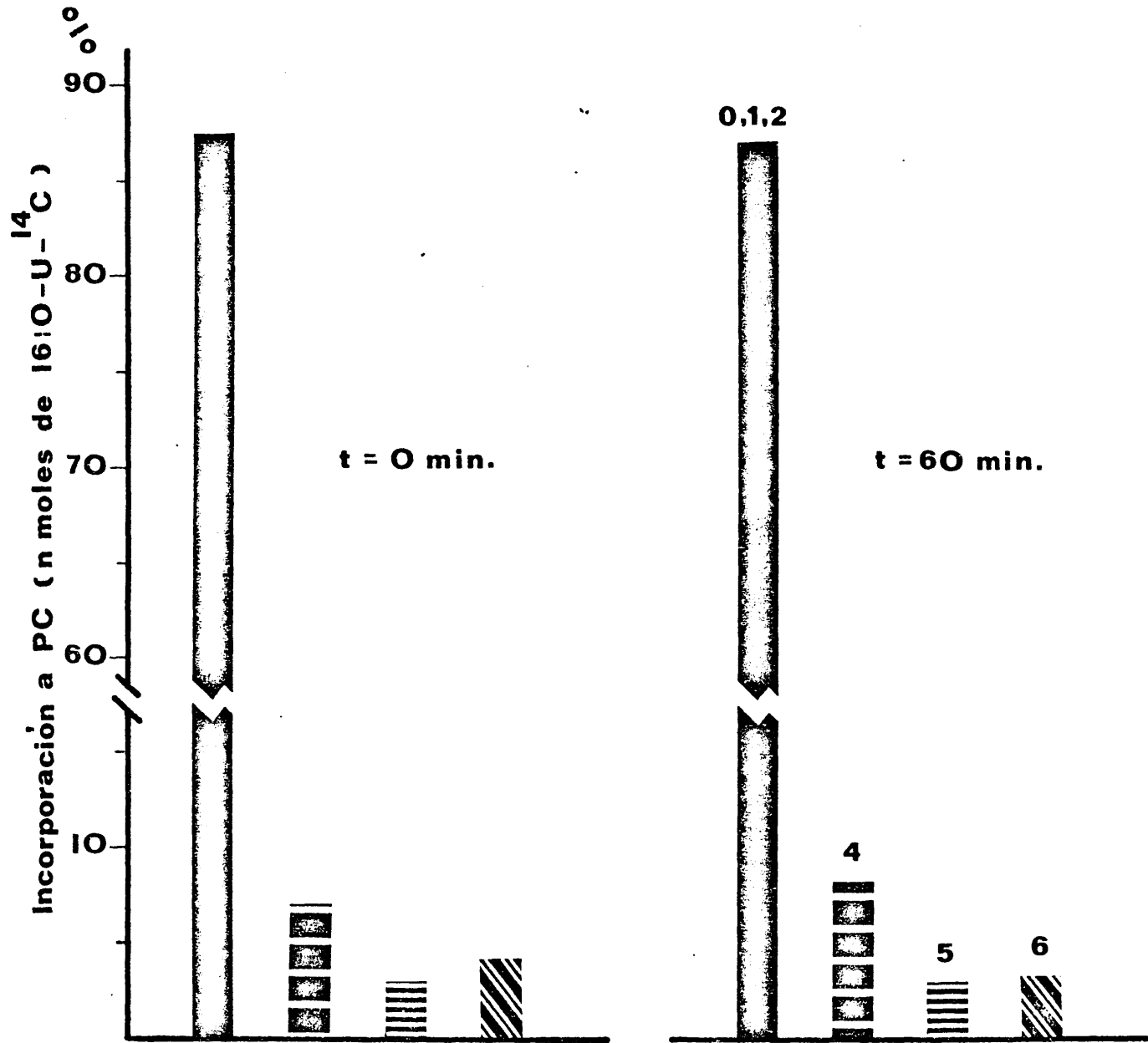


FIGURA 30

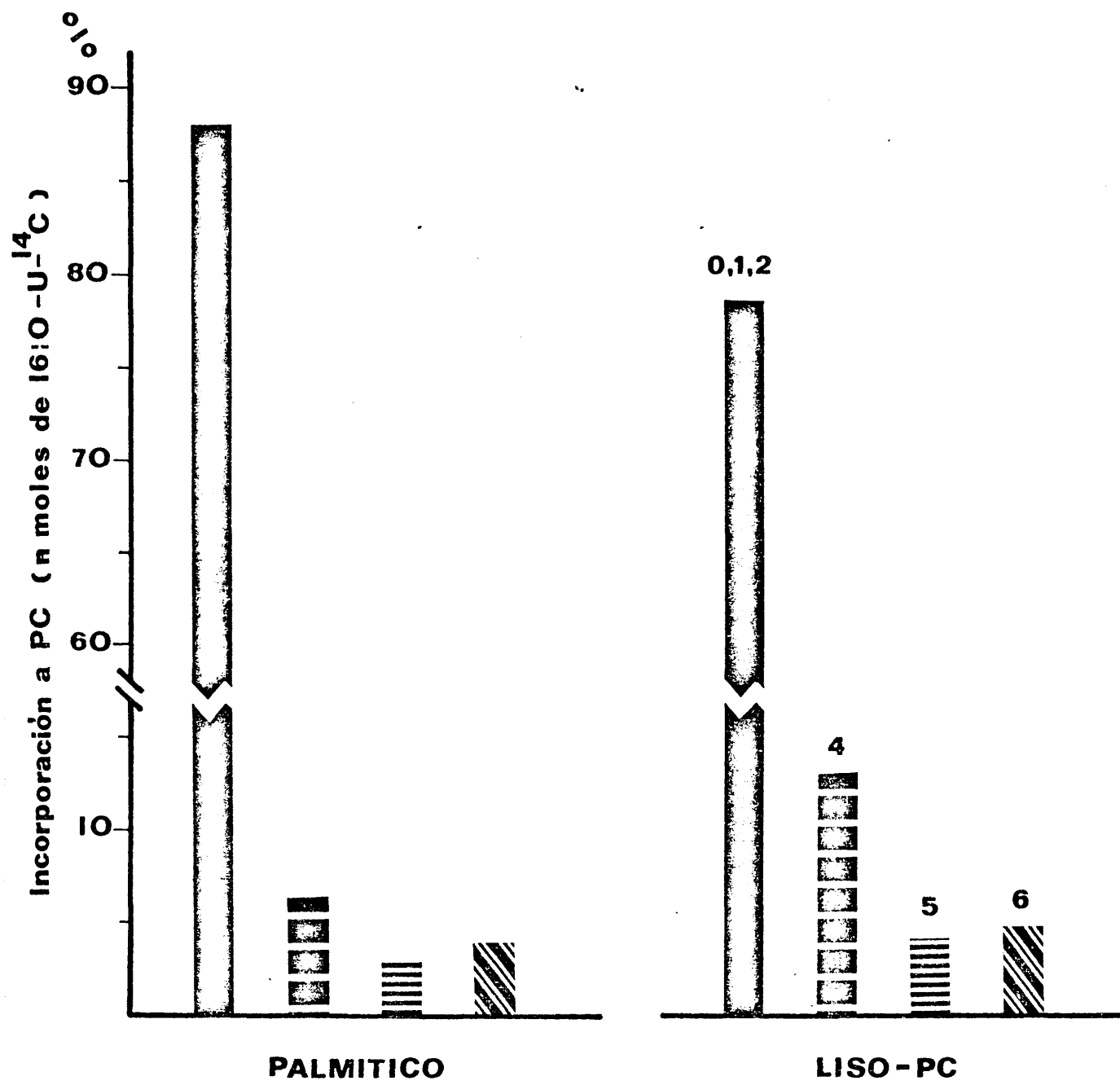


FIGURA 31

te grande, ya que tras 60 minutos de incubación, más del 60 % de las 2-lisolecitinas utilizadas como sustrato, son aciladas a fosfatidilcolinas, si bien dicha acilación es relativamente inespecífica, tal como se muestra en la figura 31, resultando marcados todos los grupos de especies moleculares de lecitinas en proporciones semejantes a las que resultan tras una incorporación de ácido palmítico (apartado 3.5.3), de modo opuesto a lo descrito para el hígado embrionario (Coll, 1.975), donde la acilación de formas liso, da lugar, específicamente, a la aparición de especies moleculares de lecitinas tetraenóicas.

Por último, es interesante destacar el elevado marcaje, aproximadamente un 30 %, con que aparece la fracción de ácidos grasos libres tras llevar a cabo la incubación (ver tabla 20), hecho este, que podría ser interpretado como una consecuencia de la actuación de liso-fosfolipasas, descritas por varios autores en el tejido encefálico (Leibovitz-Ben Gershon y Gatt, 1.968; Leibovitz-Ben Gershon et al., 1.972).

En resumen, pese a la operatividad de un sistema de acilación de formas liso, dada la ausencia de actividad fosfolipásica, no parece probable la operación eficaz de un ciclo de desacilación-acilación propiamente dicho, al menos, en las condiciones "in vitro" ensayadas.

RESUMEN

Y

CONCLUSIONES

En la presente memoria se describen los resultados de una investigación centrada en la determinación de la constitución en especies moleculares de fosfatidilcolina de encéfalo embrionario de dos especies de aves (*Gallus gallus* y *Anas boschas*) en distintas fases de su desarrollo, así como en la dilucidación de sus rutas de biosíntesis.

Asimismo, se ha establecido la composición en ácidos grasos de las distintas clases de lípidos encefálicos obteniéndose así un marco de referencia para dicha investigación.

Los resultados y conclusiones obtenidos se resumen a continuación:

1. Las dos especies de aves utilizadas, presentan pautas prácticamente idénticas en todos los aspectos estudiados, excepto por lo que se refiere al distinto peso del encéfalo, mayor en el pato, y a un relativamente superior grado de insaturación que presenta el pato, en todas las clases lipídicas, hecho este que posiblemente obedezca a diferencias en la alimentación de ambas especies.

2. A medida que progresa el desarrollo, se registra un aumento del contenido lipídico total que resulta ser, no sólo consecuencia del aumento de tamaño del encéfalo, sino además de un enriquecimiento lipídico paulatino del tejido en crecimiento. El mismo fenómeno se detecta en las fracciones de fosfolípidos totales, fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas, especialmente en etapas perinatales, pudiendo ésto obedecer al intenso depósito fosfolipídico y lipídico en general, que acontece en el inicio de la fase de mielinización activa.

3. Los lípidos totales o las diferentes clases lipídicas del encéfalo, con relación a las del vitelo nutritivo, se distinguen principalmente por un menor grado de insaturación global en las cadenas de acilo de éstos con relación al de aquellos,

lo cual debe indicar una síntesis continua por parte de los tejidos embrionarios de ácidos grasos de alta insaturación, singularmente araquidónico y docosahexenóico, prácticamente inexistentes en el vitelo.

4. Los fosfolípidos del encéfalo, y por ende las fosfatidilcolinas como fosfolípidos más abundantes, resultan ser, junto con el colesterol, componentes mayoritarios de la fracción lipídica total.

5. Las composiciones en ácidos grasos de cualquiera de las distintas clases lipídicas estudiadas, muestran, además de una elevada especificidad de órgano, diferencias muy notables entre sí, de modo que fosfolípidos estructuralmente afines, tales como fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas, exhiben abundancias relativas muy diferentes para los distintos ácidos grasos que los constituyen.

6. La composición en ácidos grasos de fosfatidilcolinas, relativamente semejante a la de los triglicéridos, muestra una especificidad de órgano muy acusada, de modo que resultan prácticamente idénticas, las correspondientes a las dos especies de aves estudiadas. Junto con ésto, destaca el hecho de que dicha composición, se mantenga prácticamente constante, a partir de etapas muy tempranas del desarrollo embrionario. En todos los casos los ácidos palmítico y oléico dan cuenta de, aproximadamente, un 80 % del total de ácidos grasos.

7. Estos ácidos grasos se distribuyen sobre las dos posiciones posibles del resto glicerol de las fosfatidilcolinas confirmando una vez más la regla general de que, en animales superiores, los ácidos grasos saturados se localizan principalmente sobre la posición sn-1, mientras que los insaturados, lo hacen sobre la sn-2. En este sentido, puede observarse que la abundancia relativa de ácido palmítico en posición sn-1 es notablemente superior a la existente en posición sn-2, mientras que lo contrario sucede para el ácido oléico. Por otra parte, el ácido esteárico se localiza exclusivamente sobre la posición sn-1, mientras

que los ácidos linoléico, araquidónico y docosahexenóico, lo hacen sólo sobre la posición sn-2, siendo ello prueba de la actuación selectiva de las acil-transferasas correspondientes.

8. Las fosfatidilcolinas del encéfalo embrionario se hallan constituidas por 15 especies moleculares mayoritarias, que no presentan variaciones cualitativas ni cuantitativas durante el período del desarrollo estudiado. Esta ausencia de variaciones se justifica por el mantenimiento observado en la capacidad biosintética del tejido en crecimiento. La gran similitud composicional observada entre las dos especies de aves, reafirma, una vez más, la idea de una acusada especificidad de órgano.

9. Las especies moleculares más importantes cuantitativamente, son las monoénicas y las disaturadas, singularmente, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina, 1-palmitoil,2-oleoil-sn-glicero-3-fosforilcolina y 1-oleoil,2-palmitoil-sn-glicero-3-fosforilcolina.

10. El sobrenadante postnuclear del encéfalo de embrión de pollo, constituye un sistema "in vitro" capaz de llevar a cabo una intensa síntesis de lípidos y muy especialmente de fosfatidilcolinas, justificándose así la elevada abundancia relativa de este fosfoglicérido en la fracción lipídica total. No se detectan variaciones apreciables, cualitativas o cuantitativas, por lo que respecta a la síntesis de las distintas clases lipídicas en las etapas del desarrollo estudiadas.

11. Las distintas especies moleculares de fosfatidilcolina son sintetizadas, de modo prácticamente exclusivo, por una ruta de biosíntesis "de novo" muy activa. Esta afirmación, viene sustentada por los siguientes hechos experimentales:

a) Elevada incorporación de ácido palmítico, componente estructural mayoritario de las lecitinas, que justifica la elevada abundancia relativa en moles de éstas.

b) La distribución posicional de ácido palmítico alcanzada por biosíntesis "in vitro" es altamente concordante

con la obtenida para las lecitinas aisladas del encéfalo, lo cual evidencia el origen endógeno de las fosfatidilcolinas encefálicas, posiblemente debido a la actuación de una biosíntesis "de novo" muy activa, que daría cuenta de los restos de acilo introducidos en las posiciones sn-1 y sn-2.

c) La capacidad de síntesis del encéfalo da cuenta de la aparición de todos los grupos de especies moleculares de lecitinas, así como de sus distintas abundancias relativas en moles, tal como se demuestra a partir de las experiencias de incorporación a especies moleculares.

d) La presencia de concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{++}$  en el medio de incubación, ocasiona una fuerte inhibición de la incorporación de ácido palmítico, afectandose por igual los distintos grupos de especies moleculares, lo cual corrobora la operatividad de una biosíntesis "de novo", vía ruta de Kennedy, que da cuenta prácticamente de todos ellos.

12. Es poco probable la existencia de un ciclo de desacilación-acilación, tal como el que opera en el hígado embrionario ya que, aunque se ha podido detectar una acilación de formas liso, un tanto inespecífica, la actividad de fosfolipasas  $A_1$  o  $A_2$  es prácticamente nula en las condiciones "in vitro" ensayadas.

## BIBLIOGRAFIA

- ABAD, C. (1.974) Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid.
- ABAD, C.; BOSCH, M.A.; MUNICIO, A.M. y RIBERA, A. (1.976) *Biochim. Biophys. Acta*, 431, 62.
- ABE, T. y NORTON, W.T. (1.974) *J. Neurochem.*, 23, 1025.
- ADAMS, C.W.M. y DAVISON, A.N. (1.959) *J. Neurochem.*, 4, 282.
- AEBERHARD, E. y MENKES, J.H. (1.968) *J. Biol. Chem.*, 243, 3834.
- AGRANOFF, B.W. y HAJRA, A.K. (1.971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68, 411.
- AKESSON, B. (1.969) *Eur. J. Biochem.*, 9, 463.
- AKESSON, B. (1.970) *Biochim. Biophys. Acta*, 218, 57.
- AKESSON, B.; ELOVSON, J. y ARVIDSON, G. (1.970 a) *Biochim. Biophys. Acta*, 210, 15.
- AKESSON, B.; ELOVSON, J. y ARVIDSON, G. (1.970) *Biochim. Biophys. Acta*, 218, 44.
- ALBERT, D.H. y ANDERSON, C.E. (1.977) *Lipids*, 12, 188.
- ALLING, C. y SVENNERHOLM, L. (1.969) *J. Neurochem.*, 16, 751.
- ALLING, C.; BRUCE, A.; KARLSSON, I. y SVENNERHOLM, L. (1.974) *J. Neurochem.*, 23, 1263.
- ANSELL, G.B. y SPANNER, S. (1.965) *Biochem. J.*, 97, 375.
- ANSELL, G.B. y SPANNER, S. (1.971) *Biochem. J.*, 122, 741.
- ANSELL, G.B.; DAWSON, R.M.C. y HAWTHORNE, J.N. (1.973) en "Form and function of phospholipids", pag. 377, Elsevier (Amsterdam).
- ANSELL, G.B. y SPANNER, S. (1.967) *J. Neurochem.*, 14, 873.
- ARIENTI, G.; GORAZZI, L.; WOELK, H. y PORCELLATI, G. (1.976) *J. Neurochem.*, 27, 203.
- ARVIDSON, G.A.E. (1.965) *J. Lipid Res.*, 6, 574.
- ARVIDSON, G.A.E. (1.967) *J. Lipid Res.*, 8, 155.
- ARVIDSON, G.A.E. (1.968 a) *Eur. J. Biochem.*, 4, 478.
- ARVIDSON, G.A.E. (1.968 b) *Eur. J. Biochem.*, 5, 415.
- AVELDAÑO, M.I. y BAZAN, N.G. (1.974) *J. Neurochem.*, 23, 1127.
- BAER, E. y BUCHNEA, D. (1.959) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 81, 1758.

BAKER, R.R. y THOMPSON, W. (1.972) *Biochim. Biophys. Acta*, 270, 489.

BALINT, J.A.; BEELER, D.A.; TREBBLE, D.H. y SPITZER, H.L. (1.967) *J. Lipid Res.* 8, 486.

BALLS, A.K.; MATLACK, M.B. y TUCKER, I.W. (1.937) *J. Biol. Chem.*, 122, 125.

BANSCHBACH, M.W. y GEISON, R.L. (1.974) *J. Neurochem.*, 23, 875.

BANSCHBACH, M.W. y GEISON, R.L. (1.975) *J. Neurochem.*, 25, 363.

BARTLETT, G.R. (1.959) *J. Biol. Chem.*, 234, 466.

BARRET, C.B.; DALLAS, M.S.J. y PADLEY, F.B. (1.962) *Chem. Ind. (London)* pag. 1050.

BASHYS, B.; KLEIN, E. y LEVER, V.F. (1.963) *Arch. Biochem. Biophys.*, 102, 201.

BASS, N.H. y HESS, H.H. (1.969) *J. Neurochem.*, 16, 731.

BASU, S.; KAUFMAN, B. y ROSEMAN, S. (1.973) *J. Biol. Chem.*, 248, 1388.

BAUMANN, N.A.; BOURRE, J.M.; JACQUE, C. y POLLET, S. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) A Ciba Symposium, pag. 91, A.S.P. (Amsterdam).

BAZAN, N.G. (1.970) *Biochim. Biophys. Acta*, 218, 1.

BAZAN, N.C.; HAYDEE, E.P.; de BAZAN, W.G.; KENNEDY, J. y JOEL, C.D. (1.971) *J. Neurochem.*, 18, 1387.

BAZAN, N.G. y RAKOWSKI, H. (1.970) *Life Sci.*, 9, 501.

BENJAMINS, J.A. y MCKHANN, G.M. (1.973) *J. Neurochem.*, 20, 1111.

BENJAMINS, J.A.; GUARNIERI, M.; MILLER, K.; SONNEBORN, M. y MCKHANN, G.M. (1.974) *J. Neurochem.*, 23, 751.

BENSON, A.A. (1.963) *Proc. Fifth Int. Congress Biochem.*, vol. 8, pag. 340, Pergamon Press, N. Y.

BERNSOHN, J. y COHEN, S.R. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) A Ciba Symposium, pag. 159, A.S.P. (Amsterdam).

BINAGLIA, L.; GORACCI, G.; PORCELLATI, G.; ROBERTI, R. y WOELK, H. (1.973) *J. Neurochem.*, 21, 597.

BINAGLIA, L.; PORCELLATI, G.; ROBERTI, R.; GORACCI, G. y WOELK, H. (1.977) *J. Neurochem.*, 21, 1067.

- BJERVE, K.S. (1.971) FEBS Lett., 17, 14.
- BJØRNSTAD, P. y BREMER, J. (1.966) J. Lipid Res., 7, 38.
- BLANK, M.L.; VERDINO, B. y PRIVETT, O.S. (1.965) J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 87.
- BLIGH, E.G. y DYER, W.J. (1.959) Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911.
- BLOCH, K.; BERG, B.H. y RITTENBERG, D. (1.943) J. Biol. Chem., 149, 511.
- BONSEN, P.P.M.; DE HAAS, G.H. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.965) Biochim. Biophys. Acta, 106, 93.
- BOONE, S.C. y WAKIL, S.J. (1.970) Biochemistry, 9, 1470.
- BORKENHAGEN, L.F.; KENNEDY, E.P. y FIELDING, L. (1.961) J. Biol. Chem., 263, PC 28.
- BORGSTRÖM, B. (1.964) J. Lipid Res., 5, 522.
- BOTTINO, N.R. (1.971) J. Lipid Res., 12, 24.
- BRADY, R.O. (1.960) J. Biol. Chem., 235, 3099.
- BRANTON, D. (1.969) Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 209.
- BRAUNING, C. y GERCKEN, G. (1.976) J. Neurochem., 26, 1257.
- BREMER, J. y GREENBERG, D.M. (1.959) Biochim. Biophys. Acta, 35, 287.
- BREMER, J.; FIGARD, P.H. y GREENBERG, D.M. (1.960) Biochim. Biophys. Acta, 43, 477.
- BREMER, J. y GREENBERG, D.M. (1.961) Biochim. Biophys. Acta, 46, 205.
- BROCKERHOFF, H. y ACKMAN, R.G. (1.967) J. Lipid Res., 8, 661.
- BROCKERHOFF, H. (1.965) Arch. Biochem. Biophys., 110, 586.
- BUTLER, K.W.; DUGAS, H. y SMITH, I.C.P. (1.970 a) Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 770.
- BUTLER, K.W.; SMITH, I.C.P. y SCHNEIDER, H. (1.970 b) Biochim. Biophys. Acta, 219, 514.
- CAREY, E.M. (1.975) Biochim. Biophys. Acta, 398, 231.
- CARTER, J.R. y KENNEDY, E.P. (1.966) J. Lipid Res., 7, 678.
- CENEDELLA, R.J.; GALLI, G. y PAOLETTI, R. (1.975) Lipids, 10, 290.

- CHACKO, G.K.; BARNOLA, F.V. y VILLEGAS, R. (1.977) *J. Neurochem.*, 28, 445.
- CHAPMAN, D. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) *A Ciba Symposium*, pag. 31, A.S.P. (Amsterdam).
- CHINO, H. y GILBERT, L.I. (1.965) *Anal. Biochem.*, 10, 395.
- CHRISTIE, W.W. y MOORE, J.H. (1.969) *Lipids*, 4, 345.
- CHRISTIE, W.W.; NOBLE, R.D. y MOORE, J.H. (1.970) *Analyst.*, 95, 940.
- CHU, H.P. (1.949) *J. Gen. Microbiol.*, 2, 255.
- CHUNG, J.; SCANU, A.M. y REMAN, F. (1.973) *Biochim. Biophys. Acta*, 296, 116.
- COBOS, F. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) *A Ciba Symposium*, pag. 227, A.S.P. (Amsterdam).
- COHEN, S.R. y BERNSHON, J. (1.973) *Brain Res.*, 60, 521.
- COLEMAN, M.H. (1.963) *Advan. Lipid Res.*, 1, 1.
- COLL, J. (1.975) Tesis Doctoral, Universidad Complutense, Madrid.
- COOPER, M.F. y WEBSTER, G.R. (1.972) *J. Neurochem.*, 19, 333.
- COTMAN, C.W.; McCAMAN, R.E. y DEWHURST, S.A. (1.971) *Biochim. Biophys. Acta*, 249, 395.
- CRAWFORD, M.A. y SINCLAIR, A.J. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) *A Ciba Symposium*, pag. 267, A.S.P. (Amsterdam).
- CRONE, C. (1.965) *Acta Physiol. Scand.*, 64, 407.
- CRONE, H.D. (1.967) *Biochem. J.*, 104, 695.
- CUZNER, M.L. y DAVISON, A.N. (1.968) *Biochem. J.*, 106, 29.
- DALAL, K.B. y EINSTEIN, E.R. (1.969) *Brain Res.*, 16, 441.
- DAVISON, A.N. y WAJDA, P. (1.959) *Nature*, 183, 1606.
- DE GIER, H.; DE HAAS, G.H. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.961) *Biochem. J.*, 81, 33 P.
- DE GIER, J.; MANDERLOOT, H.G. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.968) *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 666.

- DE HAAS, G.H.; BRONSEN, P.P.M. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.966) Biochim. Biophys. Acta, 116, 114.
- DE KRUYFF, B.; DE GREEF, W.J.; VAN EYK, R.V.W.; DEMEL, R.A. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.973) Biochim. Biophys. Acta, 298, 479.
- DE KRUIFF, B.; VAN GOLDE, L.M.G. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.970) Biochim. Biophys. Acta, 210, 425.
- DE VRIES, B. (1.962) Chem. Ind. (London) pag. 1049.
- DE VRIES, B. y NORTON, W.T. (1.974) J. Neurochem., 22, 259.
- DE VRIES, G.H.; HADFIELD, M.G. y CORNBROOKS, C. (1.976) J. Neurochem., 26, 725.
- DEKABAN, A.S.; PATTON, V.M. y CAIN, D.F. (1.971) J. Neurochem., 18, 2451.
- DEMEL, R.A.; KINSKY, S.C.; KINSKY, C.D. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.968) Biochim. Biophys. Acta, 150, 655.
- DEVOR, K.A. y MUDD, J.B. (1.971) J. Lipid Res., 12, 403.
- DHOPEHWARKAR, G.A. (1.973) Advan. Lipid Res., 11, 109.
- DHOPEHWARKAR, G.A. y MEAD, J.F. (1.970) Biochim. Biophys. Acta, 210, 250.
- DHOPEHWARKAR, G.A. y SUBRAMANIAN, C. (1.971) Biochim. Biophys. Acta, 239, 162.
- DHOPEHWARKAR, G.A.; SUBRAMANIAN, C. y MEAD, J.F. (1.971 a) Biochim. Biophys. Acta, 248, 41.
- DHOPEHWARKAR, G.A.; SUBRAMANIAN, C. y MEAD, J.F. (1.971 b) Biochim. Biophys. Acta, 239, 162.
- DHOPEHWARKAR, G.A.; SUBRAMANIAN, C.; McCONNEL, D.H. y MEAD, J.F. (1.972) Biochim. Biophys. Acta, 255, 572.
- DHOPEHWARKAR, G.A.; SUBRAMANIAN, C. y MEAD, J.F. (1.973) Lipids, 8, 753.
- DHOPEHWARKAR, G.A. y SUBRAMANIAN, C. (1.975) Lipids, 10, 242.
- DICKERSON, J.W.T. (1.968) en "Applied Neurochemistry" (A.N. Davison y J. Dobbing ed.) pag. 48, Blackwell, Oxford.
- DITTMER, J.C. y LESTER, R.L. (1.964) J. Lipid Res., 5, 126.
- DOBBING, J. (1.968) en "Malnutrition, Learning and Behavior" (N.S. Scrimshaw y J.E. Gordon ed.) pag. 181, M.I.T. Press, Cambridge (Mass.).

DOBBING, J. (1.968a) en "Applied Neurochemistry" (A.N. Davison y J. Dobbing ed.) pag. 287, Blackwell, Oxford.

DOBBING, J. (1.970) en "Developmental Neurobiology" (W.A. Himwich ed.) pag. 241, Thomas, Springfield (Ill.).

DOBBING, J. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) A Ciba Symposium, pag. 9, A.S.P. (Amsterdam).

DORMAN, R.V.; DREYFUS, H. y FREYSZ, L. (1.977) Biochim. Biophys. Acta, 486, 55.

DREYFUS, H.; URBAN, P.F.; EDEL-HARTH, S. y MANDEL, P. (1.975) J. Neurochem., 25, 245.

EICHBERG, J.; HAUSER, G. y KARNOVSKY, M.L. (1.969) en "the Structure and Function of Nervous Tissue" (G.H. Bourne ed.) vol. 3, pag. 185, Academic Press, N.Y.

EISENBERG, S.; STEIN, Y. y STEIN, O. (1.968) Biochim. Biophys. Acta, 164, 205.

EL-EISHI, M., (1.967) J. Neurochem., 14, 405.

ENG, L.F. y NOBLE, E.P. (1.968) Lipids, 3, 157.

ENGELMAN, D.M. (1.972) Chem. Phys. Lipids, 8, 298.

ERBLAND, J.F. y MARINETTI, G.V. (1.962) Fed. Proc., 21, 295.

ETO, Y. y SUZUKI, K. (1.972) J. Neurochem., 19, 109.

FERNANDEZ SOUSA, J.M.; MUNICIO, A.M.M. y RIBERA, A. (1.971 a) Biochim. Biophys. Acta, 231, 527.

FERNANDEZ SOUSA, J.M.; MUNICIO, A.M. y RIBERA, A. (1.971 b) Biochim. Biophys. Acta, 248, 226.

FEWSTER, M. y MEAD, J.F. (1.968) J. Neurochem., 15, 1041.

FINEAN, J.B.; BARMLEY, T.A. y COLEMAN, R. (1.971) Nature, 229, 114.

FINEAN, J.B. (1.972) Subcell. Biol., 1, 37.

FLEISCHER, S.; BRIERLEY, G.; KLOUWEN, H. y SLAUTERBACK, D.B. (1.962) J. Biol. Chem., 237, 3264.

FOLCH, J.; LEES, M. y SLOANE-STANLEY, G.H. (1.957) en "Metabo-

- lism of the Nervous Sistem" ( D. Richter ed.) pag. 174, Pergamon Press, London.
- FORD, D.H. (1.976) en "Blood-Brain Barrier: A Regulatory Mechanism" Reviews of Neuroscience vol. 2 (S.Ehrenpreis y I.J. Kopin ed.), Raven Press, N.Y.
- FOURCANS, B. y JAIN, M.K. (1.974) Advan. Lipid Res., 12, 147.
- FRANSOME, R.; WAITE, M. y LA VIA, M. (1.971) Biochemistry, 10, 1942.
- FREYSZ, L.; LASTENNET, A. y MANDEL, P. (1.976) J. Neurochem., 27, 355.
- FRITZ, P.J. y MELIUS, P. (1.963) Can. J. Biochem. Physiol., 41, 719.
- FUMAGALLI, R. y PAOLETTI, R. (1.963) Life Sci., 5, 291.
- GAITI, A.; BRUNETTI, M. y PORCELLATI, G. (1.975) FEBS Lett., 49, 361.
- GAITI, A.; BRUNETTI, M.; WOELK, H. y PORCELLATI, G. (1.976) Lipids, 11, 823.
- GALLI, C.; WHITE, H.B. y PAOLETTI, R. (1.970) J. Neurochem., 17, 347.
- GALLI, C. y NICOSIA, S. (1.975) Prostaglandins, 9, 397.
- GALLI, C. y SPAGNUOLO, C. (1.976) J. Neurochem., 26, 401.
- GATT, S. y BARENHOLZ, Y. (1.973) Ann. Rev. Biochem., 42, 61.
- GEISON, R.L. y FLANGAS, A.L. (1.974) Lipids, 9, 756.
- GEREN, B.B. (1.954) Exp. Cell Res., 7, 558.
- GILLILANG, K.M. y MOSCATELLI, E.A. (1.969) Biochim. Biophys. Acta, 187, 221.
- GITLER, C. (1.971) en "Biomembranes" (L.Manson ed.) vol. 2, pag. 41, Plenum Press, N.Y.
- GITLER, C. (1.972) Ann. Rev. Biophys. and Bioengineering, 1, 51.
- GONZALEZ ROS, J.M. (1.974) Tesina de Licenciatura, Universidad Complutense, Madrid.
- GOODMAN, L.P. y DUGAN, L.R. (1.970) Lipids, 5, 362.

- GORDIS, E. (1.965) J.Clin. Invest., 44, 1451.
- GRAF, E. y STEIN, Y. (1.966) Biochim. Biophys. Acta, 116, 166.
- GRAY, E.G. (1.964) en "Electron Microscopic Anatomy" (S.M. Kurtz ed.) pag. 369, Academic Press, N.Y.
- GULLIS, R.J. y ROWE, C.E. (1.975) Biochem. J., 148, 567.
- GULLIS, R.J. y ROWE, C.E. (1.976) J. Neurochem., 26, 1217.
- GUNSTONE, F.D. y PADLEY, F.B. (1.965) J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 957.
- GUNSTONE, F.D.; PADLEY, F.B. y QUERSHI, M.I. (1.964) Chem. Ind. (London) pag. 483.
- HACK, M.H. y FERRANS, V.J. (1.959) Z. Physiol. Chem., 315, 157.
- HAM, A.W. (1.970) Tratado de Histologia (sexta ed.) Interamericana.
- HAMBERGER, A. y SVENNERHOLM, L. (1.971) J. Neurochem., 18, 1821.
- HANAHAN, D.J. y VERCAMER, R. (1.954) J. Amer. Chem. Soc., 76, 1804.
- HAVERKATE, F. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.964) Biochim. Biophys. Acta, 84, 106.
- HAVERKATE, F. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.965) Biochim. Biophys. Acta, 106, 78.
- HELLER, M.; ALADJIM, E. y SHAPIRO, B. (1.968) Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1395.
- HERSCHKOWITZ, N. y ROSSI, E. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) A Ciba Symposium, pag. 107, A.S.P. (Amsterdam).
- HILDEBRAND, J.G. y LAW, J.H. (1.964) Biochemistry, 3, 1304.
- HILL, E.E.; HUSBANDS, D.R. y LANDS, W.E.M. (1.968) J. Biol. Chem., 243, 4440.
- HILL, E.E.; LANDS, W.E.M. y SLAKEY, P.M. (1.968 a) Lipids, 3, 411.
- HILL, E.E. y LANDS, W.E.M. (1.968) Biochim. Biophys. Acta, 152, 645.

- HIRSCHMANN, H. (1.960) J. Biol. Chem., 235, 2762.
- HOKIN, M.R. y HOKIN, L.E. (1.959) J. Biol. Chem., 234, 1381.
- HOKIN, L.E. y HOKIN, M.R. (1.963) Ann. Rev. Biochem., 32, 553.
- HOKIN, L.E. y HOKIN, M.R. (1.965) J. Histochem. Citochem., 13, 113.
- HOLUB, B.J.; BRECKENRIDGE, W.C. y KUKSIS, A. (1.971) Lipids, 6, 307.
- HOLZL, J. y FRANCK, H.P. (1.969) Proc. Int. Meet. Int. Soc. Neurochem., 2nd, pag. 219.
- HOPKINS, S.M.; SHEENAN, G. y LYMAN, R.L. (1.968) Biochim. Biophys. Acta, 164, 272.
- HORROCKS, L.A. (1.968) J. Neurochem., 15, 483.
- HOUTSMULLER, U.M.T. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.965) Biochim. Biophys. Acta, 106, 564.
- HOUTSMULLER, U.M.T. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K.Elliott y J. Knight ed.) A Ciba Symposium, pag. 213, A.S.P. (Amsterdam).
- HÜBSCHER, G. (1.962) Biochim. Biophys. Acta, 57, 555.
- HUNTER, M.L.; CHRISTIE, W.W. y MOORE, J.H. (1.973) Lipids, 8, 65.
- HUSBANDS, D.R. (1.970) Biochem. J., 120, 365.
- ILLINGWORTH, D.R. y PORTMAN, O.W. (1.972) Biochem. J., 130, 557.
- INOHUE, K. (1.974) Biochim. Biophys. Acta, 339, 390.
- JENKINS, B.T. y HAJRA, A.K. (1.976) J. Neurochem., 26, 377.
- JOEL, C.D.; ELLIS, C.A.; LACE, J.K.; JOEL, P.B.; SWANSON, M.R. y STROEMER, J.R. (1.974) J. Neurochem., 23, 23.
- JOHNSON, D.E. y SELLINGER, O.Z. (1.971) J. Neurochem., 18, 1445.
- JOHNSTON, D. y HUDSON, R.A. (1.974) Biochim. Biophys. Acta, 369, 269.
- KANAZAWA, I.; UETA, N. y YAMAKAWA, T. (1.972) J. Neurochem., 19, 1483.
- KANFER, J.N. (1.972) J. Lipid Res., 13, 468.

- KANOH, H. (1.969) *Biochim. Biophys. Acta*, 176, 756.
- KANOH, H. (1.970) *Biochim. Biophys. Acta*, 218, 249.
- KANOH, H. y ÅKESSON, B. (1.977) *Biochim. Biophys. Acta*, 486, 511.
- KARLSSON, I. (1.975) *J. Neurochem.*, 25, 101.
- KATES, M. (1.953) *Nature*, 172, 814.
- KENNEDY, E.P. (1.957) *Ann. Rev. Biochem.*, 26, 119.
- KENNEDY, E.P. y WEISS, S.B. (1.956) *J. Biol. Chem.*, 222, 193.
- KEOUGHT, K.M.W.; McDONALD, G. y THOMPSON, W. (1.972) *Biochim. Biophys. Acta*, 270, 337.
- KEWITZ, H. y PLEUL, O. (1.976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 2181.
- KIRIAKIDES, E.C. y BALINT, J.A. (1.968) *J. Lipid Res.*, 9, 142.
- KISHIMOTO, Y.; AGRANOFF, B.W.; RADIN, N.S. y BURTON, R.M. (1.969) *J. Neurochem.*, 16, 397.
- KLEIMAN, R.; MILLER, R.V.; EARLE, F.R. y WOLFF, J.A. (1.967) *Lipids*, 2, 473.
- KLAUS, M.H.; CLEMENTS, J.A. y HAVEL, R.J. (1.961) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 47, 1858.
- KOHLSCHÜTTER, A. y HERSCHKOWITZ, N.N. (1.973) *Brain Res.*, 50, 379.
- KREPS, E.M.; MANUKIAN, K.G.; PATRIKKEVA, M.V.; SMIRNOV, A.A.; CHENKAEVA, N.Y. y CHIRKOVSKAYA, E.V. (1.966) *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.*, 25, T 277.
- KUKSIS, A. y MARAI, L. (1.967) *Lipids*, 2, 217.
- KUKSIS, A.; BREKENRIDGE, W.C.; MARAI, L. y STACHNYK, O. (1.969) *J. Lipid Res.*, 10, 25.
- KURIHARA, T. y TSUKADA, Y. (1.968) *J. Neurochem.*, 15, 827.
- KUWAHARA, S.S. (1.972) *J. Neurochem.*, 19, 641.
- LAMB, R.G. y FALLON, H.J. (1.970) *J. Biol. Chem.*, 245, 3075.
- LANDS, W.E.M. (1.970) *Biochim. Biophys. Acta*, 218, 376.
- LANDS, W.E.M. y HART, P. (1.965) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 290.
- LANDS, W.E.M. y HART, P. (1.965 a) *J. Biol. Chem.*, 240, 1905.
- LANDS, W.E.M. y HART, P. (1.966) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43, 290.

LAPETINA, E.G. y MITCHELL, R.H. (1.973) FEBS Lett., 31, 1.

LAPETINA, E.G. y MITCHELL, R.H. (1.974) J. Neurochem., 23, 283.

LEIBOVITZ-BEN GERSHON, Z. y GATT, S. (1.968) Biochim. Biophys. Acta, 164, 439.

LEIBOVITZ-BEN GERSHON, Z.; KOBILER, I. y GATT, S. (1.972) J. Biol. Chem., 247, 6840.

LONG, C.; ODAVIC, R. y SARGENT, E.J. (1.967) Biochem. J., 102, 216.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.I.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1.951) J. Biol. Chem., 193, 265.

LUTHRA, M.G. y SHELTAWY, A. (1.973) Biochem. Soc. Transaction, 1, 461.

LYMAN, R.L. ; TINOCO, J.; BOUCHARD, P.; SHEENAN, G.; OSTWALD, R. y MILJANICH, P. (1.967) Biochim. Biophys. Acta, 137, 107.

MANGOLD, H.K. (1.961) J. Am. Oil Chem. Soc., 38, 708.

MANGOLD, H.K. y MALINS, D.C. (1.960) J. Am. Oil Chem. Soc., 37, 383.

MARSHALL, E.F.; CHOJNACKI, T. y ANSELL, G.B. (1.965) Biochem. J., 95, 30 P.

MARSHALL, E.F.; FUMAGALLI, R; NIEMIRO, R. y PAOLETTI, R. (1.966) J. Neurochem., 13, 857.

MARINETTI, G.V.; WEINDL, A. y KELLY, J. (1.971) J. Neurochem., 18, 2003.

MARTINEZ ARIAS, A. (1.977) Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense, Madrid.

MATTSON, F.H. y BECK, L.W. (1.955) J. Biol. Chem., 214, 115.

MATTSON, F.H. y VOLPENHEIN, R.A. (1.968) J. Lipid Res., 9, 79.

McELHANEY, R.N.; DE GIER, J. y VAN DER NEUT-KOK, E.C.M. (1.973) Biochim. Biophys. Acta, 298, 500.

McFARLANE, M.G. (1.948) Biochem. J., 42, 587.

McMURRAY, W.C. y MAGEE, W.L. (1.972) Ann. Rev. Biochem., 41, 129.

MEAD, J.F. y DHOPEHWARKAR, G.A. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) A Ciba Symposium, pág. 59, A.S.P. (Amsterdam).

- MENKES, J.H. (1.972) en "Lipids Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) A Ciba Symposium, pag. 179, A.S.P. (Amsterdam).
- METCALFE, L.E. y SCHMITZ, A.A. (1.961) Anal. Chem., 33, 363.
- MEZEI, C. y PALMER, F.B.St.C. (1.974) J. Neurochem., 23, 1087.
- MITCHELL, M.P.; BRINDLEY, D.N. y HÜBSCHER, G. (1.971) Eur. J. Biochem., 18, 214.
- MIYAMOTO, K.; STEPHANIDES, L.M. y BERNSOHN, J. (1.966) J. Lipid Res., 7, 661.
- MIYAMOTO, K.; STEPHANIDES, L.M. y BERNSOHN, J. (1.967) J. Neurochem., 14, 227.
- MONROY, G.; KELKER, H.C. y PULLMAN, M.E. (1.973) J. Biol. Chem., 248, 2845.
- MONTFORT, A.; VAN GOLDE, L.M.G. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.971) Biochim. Biophys. Acta, 231, 335.
- MORGAN, T.E. (1.969) Biochim. Biophys. Acta, 178, 21.
- MORRIS, L.J. (1.966) J. Lipid Res., 7, 717.
- MORRIS, L.J.; WHARRY, D.M. y HAMMOND, E.W. (1.967) J. Chromatogr., 31, 69.
- MUDD, J.B.; VAN GOLDE, L.M.G. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.969) Biochim. Biophys. Acta, 176, 547.
- NACHBAUR, M.J.; COLBEAU, A. y VIGNAIS, P.M. (1.971) C.R. Acad. Sci., 272, 1015.
- NAKAYAMA, F. y KAWAMURA, S. (1.967) Clin. Chim. Acta, 17, 53.
- NATARAJAN, V. y SASTRY, P.S. (1.974) J. Neurochem., 23, 187.
- NORTON, W.T. y PODUSLO, S.E. (1.971) J. Lipid Res., 12, 84.
- NORTON, W.T. y PODUSLO, S.E. (1.973) J. Neurochem., 21, 759.
- NUTTER, L.J. y PRIVETT, O.S. (1.966) Lipids, 1, 258.
- O'BRIEN, J.S. y SAMPSON, E.L. (1.965) J. Lipid Res., 6, 545.
- O'BRIEN, J.S.; SAMPSON, E.L. y STERN, M.B. (1.967) J. Neurochem., 14, 357.
- O'BRIEN, J.F. y GEISON, R.L. (1.971) J. Neurochem., 18, 1615.

- O'BRIEN, J.F. y GEISON, R.L. (1.974) J. Lipid Res., 15, 44.
- OKUYAMA, H.; KANDURA, T. y NOJIMA, S.N. (1.967) J. Biochem. Tokyo, 61, 732.
- OKUYAMA, H.; EIBL, M. y LANDS, W.E.M. (1.971) Biochim. Biophys. Acta, 248, 263.
- OKUYAMA, H. y LANDS, W.E.M. (1.972) J. Biol. Chem., 247, 1414.
- OLDENDORF, W. H. (1.971) Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 136, 385.
- ORELAND, L. y OLIVECRONA, T. (1.971) Arch. Biochem. Biophys., 142, 710.
- OULTON, M.R. y MEZEI, C. (1.976) J. Lipid Res., 17, 167.
- PAOLETTI, R.; PAOLETTI, E.G. y FUMAGALLI, R. (1.969) en "Handbook of Neurochemistry" (A. Lajtha ed.) Vol. 1, pag. 195, Plenum Press, N.Y.
- PAOLETTI, R. y GALLI, C. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knighth ed.) A Ciba Symposium, pag. 121, A.S.P. (Amsterdam).
- PASTON, J.; MACCHIA, V. y KATZEN, R. (1.968) J. Biol. Chem., 243, 3750.
- PETZOLD, G.L. y AGRANOFF, B.W. (1.967) J. Biol. Chem., 212, 1187.
- PORCELLATI, G.; ARIENTI, G.; PIROTTA, M. y GIORGINI, D. (1.971) J. Neurochem., 18, 1395.
- POSSMAYER, F.; SCHERPHOF, G.L.; DUBBELMAN, T.M.A.R., VAN GOLDE, L.M.G. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.969) Biochim. Biophys. Acta, 176, 95.
- POWELL, D.B. y SHEPPARD, N. (1.960) J. Chem. Soc., 2159.
- PRIVETT, O.S. y NUTTER, L. (1.967) Lipids, 2, 149.
- QUARLES, R.H. y DAWSON, R.M.C. (1.969) Biochem. J., 112, 787.
- RAMSEY, R.B.; JONES, J.P.; NAQVI, S.H.M. y NICHOLAS, H.J. (1.971) Lipids, 6, 154.
- RAMSEY, R.B. y NICHOLAS, H.J. (1.972) Advan. Lipid Res., 10, 143.
- RAO, G.A.; SORRELS, M.F. y REISER, R. (1.968) Biochem. Biophys. Res. Commun., 31, 252.

- RAO, P.S. y RAO, K.S. (1.973) *Lipids*, 8, 374.
- REGA, A.F.; WEED, R.J.; REED, C.F.; BERG, G.G. y ROTHSTEIN, A. (1.967) *Biochim. Biophys. Acta*, 147, 297.
- REMAN, F.C. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.967) *Biochim. Biophys. Acta*, 137, 592.
- RENKONEN, O. (1.965) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42, 298.
- RENKONEN, O. (1.966) *Biochim. Biophys. Acta*, 125, 288.
- RENKONEN, O. (1.967) *Advan. Lipid Res.*, 5, 329.
- RENKONEN, O. (1.968 a) *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 114.
- RENKONEN, O. (1.968 b) *Lipids*, 3, 191.
- RENKONEN, O. y RIKKINEN, L. (1.967) *Acta Chem. Scand.*, 21, 2282.
- ROBERT, J.; MANDEL, P. y REBEL, G. (1.976) *J. Neurochem.*, 26, 771.
- ROBERTI, R.; BINAGLIA, L.; FRANCESCANGELI, E.; GORACCI, G. y PORCELLATI, G. (1.975) *Lipids*, 10, 121.
- ROCHM, J.N. y PRIVETT, O.S. (1.970) *Lipids*, 5, 353.
- ROMANOFF, A.L. (1.967) en "Biochemistry of the Avian Embryo", J. Wiley & Sons, N.Y.
- ROUSER, G. y YAMAMOTO, A. (1.972) *Lipids*, 7, 561.
- ROUSER, G.; KRITCHEVSKY, G.; YAMAMOTO, A. y BAXTER, C.F. (1.972) *Advan. Lipid Res.*, 10, 261.
- ROWE, C.E. (1.969) *J. Neurochem.*, 16, 205.
- SAITO, K. y SATO, K. (1.968) *Biochim. Biophys. Acta*, 151, 706.
- SAMPUGNA, J. y JENSEN, R.G. (1.967) *J. Dairy Sci.*, 50, 386.
- SARDA, L. y DESNUELLE, P. (1.958) *Biochim. Biophys. Acta*, 30, 513.
- SARZALA, M.G.; VAN GOLDE, L.M.G.; DE KRUIFF, B. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.970) *Biochim. Biophys. Acta*, 202, 106.
- SCHATZ, G. y SALTZGABER, J. (1.969) *Biochim. Biophys. Acta*, 180, 186.
- SHACHT, J. y AGRANOFF, B.W. (1.973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 50, 934.
- SHAIKH, N.A. y PALMER, F.B.St.C. (1.976) *J. Neurochem.*, 26, 597.
- SHELTAWY, A. y DAWSON, R.M.C. (1.969) *Biochem. J.*, 111, 157.
- SHONHEYDER, F. y VOLQUARTZ, K. (1.945) *Acta Physiol. Scand.*, 10, 62.
- SIMS, R.P.A. y LAROSE, J.A.G. (1.962) *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 39, 232.

- SINGER, S.J. (1.971) en "Membrane Structure and Function" (L. I. Rothfield ed.) Academic Press, N.Y.
- SKIPSKI, V.P.; PETERSON, R.F. y BARCLAY, M. (1.962) J. Lipid Res., 3, 467.
- SLEIN, M.W. y LOGAN, G.F. (1.965) J. Bacteriol., 90, 69.
- SMITH, M.E. y ENG, L.F. (1.965) J. Am. Oil Chem. Soc., 42, 1013.
- SOLOMON, A.K.; LIONETTI, F. y CURRAN, P.F. (1.956) Nature, 178, 582.
- SOODSMA, J.F.; MIMS, L.C. y HARLOW, R.D. (1.976) Biochim. Biophys. Acta, 424, 159.
- SPENCE, M.W. (1.970) Biochim. Biophys. Acta, 218, 347.
- STAHL, W.L. y TRAMS, E.G. (1.968) Biochim. Biophys. Acta, 163, 459.
- STEIN, Y.; WIDNELL, C. y STEIN, O. (1.968) J. Cell Biol., 39, 185.
- STEIM, J.M.; TOURTELLOTTE, M.E.; REINERT, J.C.; McELHANEY, R.N. y RADER, R.L. (1.969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 63, 104.
- STOFFEL, W. y TRABERT, U. (1.969) Z. Physiol. Chem., 350, 836.
- SUN, G.Y. (1.970) J. Neurochem., 16, 445.
- SUN, G.Y. (1.973) J. Lipid Res., 14, 656.
- SUN, G.Y. y HORROCKS, L.A. (1.968) Lipids, 3, 91.
- SUN, G.Y. y HORROCKS, L.A. (1.969) J. Neurochem. 16, 181.
- SUN, G.Y. y HORROCKS, L.A. (1.971) J. Neurochem., 18, 1963.
- SUN, G.Y. y HORROCKS, L.A. (1.973) J. Lipid Res., 14, 206.
- SUN, G.Y.; GO, J. y SUN, A.Y. (1.974) Lipids, 9, 450.
- SUN, G.Y. y YAU, T.M. (1.976) J. Neurochem., 26, 291.
- SUN, G.Y. y YAU, T.M. (1.976) J. Neurochem., 27, 87.
- SVENNERHOLM, L. (1.963) J. Neurochem., 10, 613.
- SVENNERHOLM, L.; ALLING, C.; BRUCE, A.; KARLSSON, I. y SAPIA, O. (1.972) en "Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) A Ciba Symposium, pag. 141, A.S.P. (Amsterdam).
- SWEASEY, D.; PATTERSON, D.S.P. y GLANCY, E.M. (1.976) J. Neurochem., 27, 375.
- TAKAHASHI, T. y SCHMID, H.H.O. (1.968) Chem. Phys. Lipids, 2, 220.

- TAMAI, Y; MATSUKAWA, S. y SATAKE, M. (1.971) Brain Res., 26, 149.
- THOMPSON, R.S.H. (1967) Can. J. Biochem., 45, 853.
- TINOCO, J.; HOPKINS, S.M.; McINTOSH, D.J.; SHECHAN, G. y LYMAN, R.L. (1.967) Lipids, 2, 479.
- TINOCO, J.; SHECHAN, G.; HOPKINS, S.M. y LYMAN, R.L. (1.970) Lipids, 5, 412.
- TOBARI, J. (1.964) Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 50.
- TREBLE, D.H.; FRUMKIN, S.; BALINT, J.A. y BEELER, D.A. (1.970) Biochim. Biophys. Acta, 202, 163.
- TREWHELLA, M.A. y COLLINS, F.D. (1.973) Biochim. Biophys. Acta, 296, 51.
- TRIA, E. y BARNABEI, O. (1.963) Nature, 197, 598.
- VAN DEENEN, L.L.M. (1.965) en "Progress in the Chemistry of Fats and others Lipids" (R.T. Holman ed.) vol. 8, pag. 1, Pergamon Press, N.Y.
- VAN DEENEN, L.L.M. (1.966) J. Am. Oil Chem. Soc., 43, 296.
- VAN DEENEN, L.L.M.; DE HAAS, G.H.; HEEMSHERK, C.H. y MEDUSKI, J. (1.961) Biochem. Biophys. Res. Commun., 4, 183.
- VAN DEN BOSCH, H.; VAN GOLDE, L.M.G. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.967) Biochim. Biophys. Acta, 144, 613.
- VAN DEN BOSCH, H.; VAN GOLDE, L.M.G.; SLOTBOOM, A.J. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.968) Biochim. Biophys. Acta, 152, 694.
- VAN DEN BOSCH, H.; SLOTBOOM, A.J. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.969) Biochim. Biophys. Acta, 176, 632.
- VAN DEN BOSCH, H. y VAGELOS, P.R. (1.970) Biochim. Biophys. Acta, 218, 233.
- VANDENHEUVEL, F.A. (1.971) Advan. Lipid Res., 9, 161.
- VAN GOLDE, L.M.G. (1.968) Tesis Doctoral, Universidad de Utrech.
- VAN GOLDE, L.M.G. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.966) Biochim. Biophys. Acta, 125, 496.
- VAN GOLDE, L.M.G.; TOMASI, V. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.967) Chem. Phys. Lipids, 1, 282.
- VAN GOLDE, L.M.G. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.967) Chem. Phys. Lipids,

1, 157.

VAN GOLDE, L.M.G.; SCHERPHOF, G.L. y VAN DEENEN, L.L.M. (1.969) Biochim. Biophys. Acta, 176, 635.

VANIER, M.T.; HOLM, M.; OHMAN, R. y SVENNERHOLM, L. (1.971) J. Neurochem., 18, 581.

VARANASI, U. y MALINS, D.C. (1.975) Biochim. Biophys. Acta, 409, 304.

VATASSERY, G.T.; BERRY, J.F.; YOUNOZAI, R. y LAM BERGAD, P. (1.976), Lipids, 11, 317.

VILKKI, P. (1.962) Arch. Biochem. Biophys., 97, 425.

WAITE, M. y SISSON, P. (1.971) Biochemistry, 10, 2377.

WEGLIICKI, W.B.; WAITE, M.; SISSON, P. y SHOHET, S.B. (1.971) Biochim. Biophys. Acta, 231, 512.

WELLS, M.A. y DITMER, J.C. (1.967) Biochemistry, 6, 3169.

WESSELS, H. y RAJAGOPAL, N.S. (1.969) Fette Seifen, Anstrichm, 71, 543.

WHITE, H.B.; GALLI, C. y PAOLETTI, R. (1.971) J. Neurochem., 18, 869.

WILKINS, M.H.F.; BLAUROCK, A.E. y ENGELMAN, D.M. (1.971) Nature New Biol., 230, 72.

WILSON, J.E. (1.973) Arch. Biochem. Biophys., 154, 332

WINICK, M. y NOBLE, A. (1.966) J. Nutr., 89, 300.

WINICK, M.; ROSSO, P. y BRASEL, J.A. (1.972) en " Lipids, Malnutrition & the Developing Brain" (K. Elliott y J. Knight ed.) A Ciba Symposium, pag. 199, A.S.P. (Amsterdam).

WOELK, H.; FURNISS, H. y DEBUCH, H. (1.972) Z. Phys. Chem. Berlin, 353, 1111.

WOELK, H. y KANIG, K. (1.974) J. Neurochem., 23, 739.

WOELK, H.; KANIG, K. y PEILER-ICHIKAWA, K. (1.974) J. Neurochem., 23, 745.

WOELK, H.; KANIG, K. y PEILER-ICHIKAWA, K. (1.974) J. Neurochem., 23, 1057.

WOELK, H.; JAKUBELT-MORGOTT, U. y SCHENCK, K. (1.976) J. Neuro-

chem., 26, 275.

WOOD, R. (1.972) Lipids, 7, 596.

WOOD, R. (1.974) Lipids, 9, 429.

WRIGHT, S. (1.945) Applied Physiology, pag. 808, Oxford University Press, London.

WRIGHT, J.D. y GREEN, C. (1.971) Biochem. J., 123, 837.

YAKOVLEV, P.I. y LECOURS, A.R. (1.967) en " Regional Development of the Brain in Early Life" (A. Minkowski, ed.) pag. 3, Blackwell, Oxford.

YAU, T.M. y SUN, G.Y. (1.973) Lipids, 8, 410.

YAU, T.M. y SUN, G.Y. (1.974) J. Neurochem., 23, 99.

YAVIN, E. (1.976) J. Biol. Chem., 251, 1392.

YAVIN, E. y MENKES, J.H. (1.974) Lipids, 9, 248.

ZAHLER, P.H. (1.968) Vox Sang., 15, 81.

ZAMENICK, P.C.; BREWSTER, L.E. y LIPPMANN, F. (1.947) J. Exptl. Med., 85, 355.