

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

Estudio experimental del metabolismo del tejido adiposo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Alfonso Carlos Martínez-Conde Ibáñez

Madrid, 2015



TP
1983

157

x-53-011957-8

Alfonso Carlos Martínez-Conde Ibañez

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSO

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1983



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

157/83

© Alfonso Carlos Martínez-Conde Ibañez
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1983
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M- 21431-1983

ALFONSO MARTINEZ-CONDE IBANEZ

ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSEO

**DIRECTOR: PROF. J. TAMARIT TORRES
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

AÑO 1981

CATEDRA 2.ª DE FISILOGIA

Prof. Dr. J. Tamarit
Facultad de Medicina
(Ciudad Universitaria)
MADRID.3

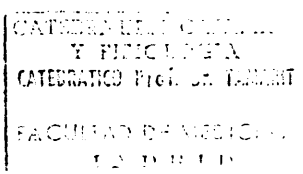
**JORGE TAMARIT TORRES, CATEDRATICO DE FISILOGIA GENERAL,
QUIMICA BIOLOGICA Y FISILOGIA ESPECIAL DE LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.-**

**HACE CONSTAR: Que el trabajo titulado "ESTUDIO EXPERIMENTAL
DEL METABOLISMO DEL TEJIDO ADIPOSEO", ha sido
realizado por D. Alfonso Martínez-Conde Ibañez
bajo su dirección y que es APTO para ser pre
sentado como Tesis Doctoral.**

Madrid, 29 de Mayo de 1981

J. Tamarit

Fdo.: Prof. J. Tamarit



A PILAR Y CARLOS

A MIS PADRES

II

Expreso mi agradecimiento:

Al Profesor D. Jorge Tamarit Torres, bajo cuya dirección ha sido realizado éste trabajo en la Cátedra de Fisiología General, Química Biológica y Fisiología Especial de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense.

Al Profesor D. Arsenio Fraile, catedrático de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense, por su amabilidad al aceptar la ponencia de mi tesis.

Al Profesor D. Emilio Herrera, catedrático de Fisiología General de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Barcelona, por sus valiosos consejos y sugerencias.

A la Dra. Julia Bujan, profesora de la Cátedra de Biología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense por su desinteresada colaboración y aportaciones.

A todos los compañeros del Departamento de Bioquímica por las facilidades dispensadas para la realización de éste trabajo.

IV

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	1
I.1.- Citología e Histología	2
I.2.- Digestión de los triacilglicéridos de la dieta	13
I.2.1.- Composición de los TAG de la dieta	13
I.2.2.- Lipasas	17
I.3.- Absorción intestinal y resíntesis de triacilglicéridos	26
I.4.- Metabolismo de los triacilglicéridos plasmáticos	31
I.4.1.- Catabolismo de los quilomicrones	31
I.4.2.- Lipoprotein lipasas	32
I.4.3.- Lipasas tisulares	35
I.5.- Síntesis de triacilglicéridos en tejido adiposo	37
I.5.1.- Vía monoglicérido	37
I.5.2.- Biosíntesis de novo	39
I.6.- Degradación de triacilglicéridos en tejido adiposo	42
I.7.- Especificidad de posición, cadena y grado de insaturación en el proceso de lipólisis-esterificación	45
I.8.- Estructura de la HSL y regulación de su actividad	50
I.9.- Regulación neuroendocrina del proceso lipólisis-esterificación	51
I.9.1.- Significado	51
I.9.2.- Mecanismos de regulación hormonal de la lipólisis	57

V

I.9.3.- Acción lipolítica de las catecolaminas.	59
I.9.4.- Acción lipolítica de la serotonina	61
I.9.5.- Hormonas que actúan activando la síntesis proteica	65
I.9.6.- Sustancias que inhiben la síntesis proteica	66
I.9.7.- Sustancias que actúan a nivel de la adenil-ciclase	66
I.9.8.- Inhibidores del catabolismo del AMPc	67
I.9.9.- Agentes desacoplantes de la fosforilación oxidativa	67
I.9.10.- Hormonas peptídicas que actúan a nivel de receptor de membrana plasmática	68
I.9.11.- Acción de la insulina	69
II.- MATERIAL Y METODOS	72
II.1.- Experimentos "in vivo"	73
II.1.1.- Obtención de tejidos y sueros	73
II.1.2.- Análisis de la composición de los ácidos grasos del suero	73
II.1.2.a.- Extracción de los lípidos del suero	74
II.1.2.b.- Obtención de los ésteres metílicos de lo AG del suero	76
II.1.2.c.- Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los AG	77

VI

	Página
II.1.3.- Análisis de la composición de AG de tejido adiposo epididimal	82
II.1.3.a.- Homogeneización del tejido y extracción de los lípidos tota- les	83
II.1.3.b.- Obtención de los TAG del tejido	84
II.1.3.c.- Obtención de los ésteres metílicos de los AG de la fracc ción TAG de tejido adiposo	86
II.1.3.d.- Cromatografías gas- líquido de los éste res metílicos	87
II.2.- Experimentos "in vitro" con incubación de adipocitos	89
II.2.1.- Procedimiento de obtención de adipocitos	89
II.2.2.- Incubación de los adipocitos	92
II.2.3.- Extracción y análisis de los ácidos grasos libres (AGL) liberados al medio	95
II.2.4.- Extracción y análisis de los AGL y ácidos grasos de los DAG del interior de los adipo citos	97
II.2.5.- Método de separación de lípi- dos neutros por cromatografía en placa fina	99
II.2.6.- Análisis directo por CGL de ácidos grasos	103
II.2.7.- Características de la cromato grafía gas-líquido (método di- recto de inyección de ácidos grasos)	106

VII

	Página
II.3.- Experimentos enzimológicos sobre posicionalidad de los ácidos grasos en los TAG de tejido	110
II.4.- Separación de $\alpha \alpha'$ -DAG y $\alpha \beta + \alpha' \beta$ -DAG a partir de los DAG de tejido adiposo, y análisis de las composiciones en ácidos grasos	112
III.- RESULTADOS Y DISCUSION	114
III.1.- Efecto del ayuno prolongado sobre la composición en ácidos grasos del tejido adiposo epididimal de rata	115
III.2.- Efecto del ayuno prolongado mas 5-HT sobre la composición en ácidos grasos del tejido adiposo epididimal en rata	121
III.3.- Efecto del ayuno prolongado sobre la composición en ácidos graso del suero de rata	128
III.4.- Efecto del ayuno prolongado más 5-HT sobre la composición en ácidos grasos del suero de rata	133
III.5.- Composición en ácidos grasos de las fracciones acil-glicéridas y AGL de tejido adiposo epididimal de rata	142
III.6.- Distribución posicional de los ácidos grasos en los TAG del tejido adiposo epididimal	148
III.7.- Composición en ácidos grasos de $\alpha \beta + \alpha' \beta$ -DAG y $\alpha \alpha'$ -DAG del tejido adiposo epididimal de rata durante el ayuno	161
III.8.- Acción de la serotonina sobre el proceso lipólisis-esterificación en adipocitos aislados	173
IV.- CONCLUSIONES	194
V.- BIBLIOGRAFIA	202

I.1.- CITOLOGIA E HISTOLOGIA

El tejido adiposo fué durante mucho tiempo considerado como un tejido inerte destinado al depósito pasivo de grasa y a funciones de índole mecánica o aislante; sin embargo, actualmente se conocen datos relevantes acerca de su grado de actividad y notable participación en el desarrollo y regulación del metabolismo lipídico.

En la escala filogenética animal, el tejido adiposo aparece ya en invertebrados portadores de hepatopáncreas, siendo las reservas de triacilglicéridos histológicamente visibles en este órgano. En insectos alcanza un considerable desarrollo el tejido graso en los denominados "cuerpos grasos". En vertebrados poiquilotermos se observa un comportamiento similar al primer grupo de invertebrados: poseen un voluminoso hígado rico en triacilglicéridos. En homeotermos, el hígado disminuye su contenido lipídico al 1% de triacilglicéridos que se distribuyen en forma difusa invisible a microscopía óptica y los triacilglicéridos se acumulan en el tejido adiposo. (Bujan 1981)

En los mamíferos, sobre todo en los hibernantes, se encuentran dos variedades de tejido adiposo con estructuras y funciones diferentes; el tejido adiposo blanco o unilocular al cual nos referiremos en este trabajo, y el tejido adiposo pardo o mul

tilocular que es un órgano altamente específico, con una importante función calorigénica en cada despertar del sueño invernal y en la adaptación de los recién nacidos al medio ambiente.

El tejido adiposo blanco, común en aves y mamíferos, aparece por primera vez en el embrión en el curso de la segunda a tercera semana, pero no se desarrolla hasta poco antes del nacimiento, distribuyéndose principalmente en dos sectores:

- superficial o pániculo adiposo, de distribución más o menos generalizada.
- profundo, con localizaciones más delimitadas.

El desarrollo del pániculo adiposo no es total, sino que parte de él va a quedar en forma potencial y cuando sobreviene una sobrecarga grasa puede acumular lípidos, así ocurre en las denominadas "obesidades fisiológicas" o que son intermitentes como ocurre en aves migratorias, mamíferos hibernantes y mamíferos marinos que en determinados momentos pueden incrementar su reserva lipídica hasta un 40% de su peso. La distribución de este pániculo adiposo varía según las especies, pero en general se encuentra por toda la superficie corporal, excepto en el pabellón auricular, cuero cabelludo, regiones de palmas y plantas; sin embargo, predomina en la región interescapular, pectoral, lumbar y sacra, aunque con numerosas oscilaciones según la edad, sexo y es-

tado nutricional (Monesi, 1965).

Por el contrario, el sector profundo tiene su distribución en la región inguinal, retroperitoneo, mesenterio, mediastino y podemos hallar cierta cantidad entre los fascículos de los músculos profundos.

El tejido adiposo se presenta con aspecto homogéneo, dispuesto en lóbulos más o menos delimitados por septos conjuntivos que a medida que penetran en el interior van ramificándose y afinándose hasta rodear finamente a cada elemento celular. Dichos tabiques son ricos en fibras colágenas que van perdiéndose conforme se aproximan a las células, momento en el cual el principal componente será la reticulina.

Acompañando a los septos conjuntivos se encuentran pedículos vasculares; por cada lóbulo adiposo existe una arteriola de 5 a 9 capas de células musculares lisas y gradualmente va ramificándose quedando a modo de una fina red capilar que termina en la vecindad de los adipocitos. Estos capilares ultraestructuralmente están compuestos por células endoteliales ricas en vesículas de micropinocitosis y desprovistas de inclusiones lipídicas, no poseen pericilios y están rodeadas de membrana basal.

Asimismo en estos pedículos vasculares existen nervios visibles en la adventicia de la arteriola, que son amielínicos aun

que ocasionalmente pueden rodearse de prolongaciones de células de SCHWANN. Este componente nervioso está formado principalmente de fibras de tipo adrenérgico. Aunque se han descrito axones o sinapsis en los espacios de OBERLING o zonas de confluencia de los adipocitos, la inervación de este tejido es todavía mal conocida.

El parénquima del tejido adiposo está compuesto por los adipocitos, de igual estructura, cualquiera que sea su topografía. Son células redondeadas, aunque en conjunto presenten una imagen poligonal de diámetro oscilante entre 10 y 200 μ dependiente del plano de corte, aunque en general su diámetro medio es más o menos constante entre 40 y 80 μ . Su peso medio es aproximadamente 200 ng.

A microscopía óptica aparecen como células vacías (por efecto de las técnicas de inclusión) rodeadas de una pequeña banda citoplasmática y núcleo periférico, descritos con aspecto de "anillo de sello"; si por el contrario se usan técnicas de contraste lipídico, se observa toda la célula intensamente teñida dado que su principal componente es una gran vacuola central rica en componentes lipídicos, fundamentalmente lípidos neutros (HAN, 1970).

Ultraestructuralmente los adipocitos muestran la unidad de membrana de 75 Å de contorno discretamente sinuoso separada de

la membrana basal por un espacio claro de 50-100 Å; esta membrana basal tiene de 100 a 300 Å de espesor, aspecto gránulo-filamentoso y densidad electrónica media.

El núcleo se halla desplazado por la gran inclusión lipídica hacia la membrana plasmática, y tiene forma ovoide o en semiluna y presenta cromatina laxa o discretamente condensada en torno a la carioteca. El nucleolo suele ser único, aunque excepcionalmente pueden existir dos. El citoplasma en forma de banda entre la membrana y la gota lipídica presenta un fino carácter granular de espesor aproximado de 0,2-0,3 μ por término medio. Entre los organelos inmersos en el citoplasma se encuentran las mitocondrias, de forma ovoidea o redondeada, de diámetro 0,25-0,5 μ , de matriz densa y pequeño número de crestas, siendo su distribución algo más preponderante en las inmediaciones del núcleo.

En cuanto al sistema vacuolar está poco desarrollado, puede observarse ocasionalmente alguna cisterna con ribosomas adosados o algún dictiosoma. Un poco más abundante es el componente del retículo liso, sobre todo en torno a la gota lipídica. Igualmente es muy escaso el componente de glucógeno, ribosomas libres y lisosomas.

Por el contrario se observan gran número de vesículas pequeñas llamadas lipomicrones, WASSERMANN (1964), en todo el cito-

plasma, regularmente repartidos sobre la membrana plasmática hasta la cercanía de la gran vacuola lipídica, y que serían claros signos de intercambio activo entre la célula y el medio externo.

Por último el componente mayor y más característico del adipocito es la gran vacuola lipídica de aspecto homogéneo y no rodeada de membrana, de situación central, y que le confiere el nombre de tejido adiposo unilocular.

Junto a los adipocitos podemos hallar otros elementos celulares como fibroblastos y células cebadas, cuyo factor heparínico juega un papel importante en el metabolismo lipídico, así como algún histiocito de clara función macrofágica y elementos indiferenciados o lipoblastos. Así como los primeros no muestran carácter diferencial con los hallados en otras localizaciones conjuntivas, los últimos son todavía elementos en discusión. Para autores como BERGMAN (1968), este tipo celular sería como un posible linfocitos; para UMAHARA (1968), sería un fibroblasto de naturaleza desconocida, y SUTTER (1969) y BARNARD (1970) lo describen como precursores de los adipocitos tanto desde el punto de vista morfológico como por su topografía.

Histogénesis

Desde el punto de vista embriológico parece establecido que el tejido adiposo en sus variantes blanco y pardo procede de la hoja embrionaria mesodérmica, a través del mesénquima, con diferenciación subsiguiente de éste; aunque no existe acuerdo entre los diferentes autores respecto a si el tejido blanco y pardo tienen una misma procedencia del mesénquima con vías lipogénicas independientes, o si por el contrario el tejido adiposo pardo no es más que un estadio embrionario o inmaduro del tejido blanco.

El primero en plantearse su origen fué FLEMMING en 1870, sugiriendo que el tejido graso deriva directamente del conjuntivo a través de los fibroblastos alargados que progresivamente irían cargándose de gotas lipídicas. Apoyan esta hipótesis autores como BELL (1909), FOOT (1912), KOLLIKER (1886) y ROBIN L.R. VAN y cols. que en 1978 realizaron cultivos de fibroblastos humanos y de rata, observando que los que procedían del estroma graso se transformaban en adipocitos, mientras que los procedentes del conjuntivo dérmico no acumulaban grasa ni se diferenciaban.

TOLDT (1870-1888) demostró la presencia de células mesenquimatosas específicas en algunas áreas del tejido mesenquimal, suponiendo que serían los precursores del órgano graso a través de un estadio intermedio que definió como adipoblasto o célula es-

trellada, con acúmulos lipídicos distribuidos en pequeñas gotas, pero en ningún caso vió una transición directa del fibrocito al adipoblasto; él opinaba que los fibrocitos serían diferenciaciones distintas de la célula mesenquimal que jamás acumularían lípidos y que solamente acompañarían estructuralmente a la grasa.

HAMMER (1895) emitió una tercera hipótesis que por primera vez distingue dos caminos lipogénicos independientes para el tejido adiposo pardo y blanco. Supone la formación de los "órganos grasos primitivos" que son formaciones reticuladas más o menos densas constituidas por células mesenquimatosas que van siendo invadidas por yemas vasculares que gradualmente irían ramificándose y capilarizándose. Acompañando a las yemas vasculares llegarían las células madres que se liberarían en el primitivo centro adiposo que si está muy organizado originará el tejido adiposo pardo y si está poco organizado originará el tejido adiposo blanco. Estas células madre, para él, serían elementos endoteliales, tendrían un aspecto alargado con cortas y groseras prolongaciones, y tienen como característica significativa algunas vesículas de contenido graso.

Esta teoría ha sido apoyada múltiples veces en la literatura, así LEVI (1954), WASSERMAN (1965), HULL (1966), HULL y SEGALL (1966).

Por tanto es evidente que en el momento actual, aunque las

diferentes experiencias vengan a confirmar una u otra postura, el problema de si la célula madre adipogénica es el fibroblasto, célula mesenquimal o células del S.R.E. todavía sigue vigente. No obstante la existencia de un estadio adipoblástico en el curso del desarrollo embrionario, es universalmente admitida. Así NAPOLITANO (1963) observó adipoblastos en trabajos ultraestructurales en la grasa inguinal de rata de siete días, y en fetos humanos de 20 y 26 semanas y los describe como "células adiposas jóvenes".

En el desarrollo del adipocito blanco se pasa por un estadio multilocular que ha llevado a toda la problemática sobre las dos variedades de tejido adiposo. Así desde AUERBACH (1902) a AHERNE y HULL (1966) se entiende que el tejido adiposo pardo no es más que un estadio inmaduro del blanco, aunque tenga funciones propias; un análisis profundo, ultraestructural, de NAPOLITANO (1963) muestra que existen diferencias ultraestructurales entre el adipoblasto y el adipocito pardo, de ellas hay tres fundamentales:

- Mitocondrias en el adipocito pardo muy numerosas, pleomórficas y de gran complejidad en sus crestas.
- Mayor desarrollo del sistema vacuolar, sobre todo del retículo liso.
- Carga glucogénica más acusada.

Todo ello nos lleva a pensar que aunque tengan un origen común parece ser que sus caminos de diferenciación son distintos.

Por último podemos resumir la diferenciación del adipocito blanco en tres etapas:

- 1) Célula indiferenciada alargada.
- 2) Adipoblasto, que adquiere capacidad de reserva lipídica en forma de pequeñas gotas citoplásmicas (estadio multilocular).
- 3) Confluencia de las gotas lipídicas en una sola gota central, con desplazamiento del núcleo a la periferia (estadio unilocular).

Crecimiento y regeneración

Fué SIMON (1965) el primero en observar que en el momento en que aparecen los primeros depósitos grasos en el adipoblasto éste pierde su capacidad mitótica y apoyándose en esta observación se ha venido admitiendo que el tejido adiposo adulto no tiene capacidad de división celular por lo que su crecimiento sería exclusivamente por hipertrofia de un número de adipocitos predeterminados.

Posteriormente se vió que durante el primer año de vida en el

hombre puede seguir la diferenciación de los adipoblastos, y que en este tiempo conservan su capacidad mitótica y sería a partir de entonces cuando se producirían sólo los mecanismos de hipertrofia.

Existen aportaciones recientes, fundamentalmente de tipo autoradiográfico, bioquímico y funcional a través de reguladores e inhibidores que nos dan una nueva base para el conocimiento de los fenómenos de crecimiento y regeneración grasa. Así LEWIS y HAYER (1974) utilizando timidina tritiada han demostrado mitosis en los adipocitos, en rata, en edades adultas de 6 a 22 semanas.

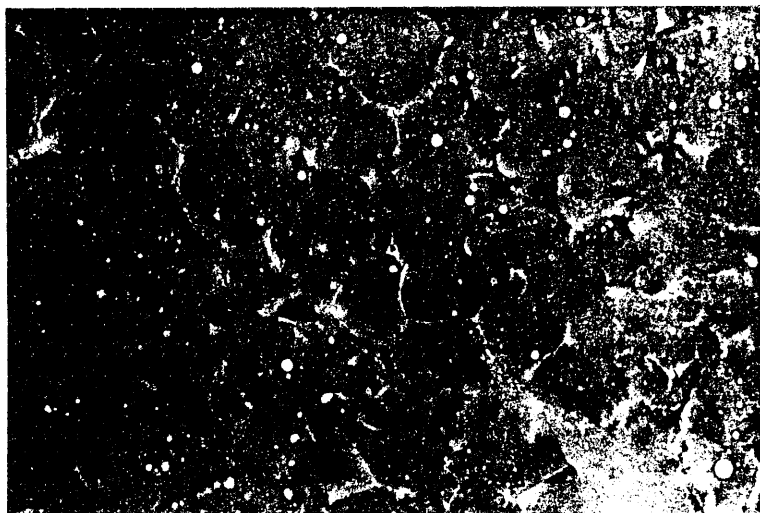


FIG. 1: CORTE DE TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL OBSERVADO AL MICROSCOPIO OPTICO.

12673



FIG. 1BIS: ACCION DE LA LIPASA TISULAR EN EL BORDE DE
LA PERIGOTA VISTO AL MICROSCOPIO ELECTRONICO.

Fig. 1 y 1 bis: Fotografías cedidas por la Dra. J. Bujan
del Departamento de Histología de la Fa-
cultad de Medicina de la Universidad Com-
plutense de Madrid.

I.2.- DIGESTION DE LOS TRIACILGLICEROS DE LA DIETA

I.2.1.- COMPOSICION DE LOS TRIACILGLICERIDOS DE LA DIETA

La mayor parte de los ácidos grasos ingeridos en la dieta lo son en forma de triacilglicéridos, y su procedencia es animal (grasas, leche, mantequilla ...) y vegetal (aceites).

En las siguientes tablas podremos observar la diferente composición en ácidos grasos de los TAG de leche (Tabla I), aceites vegetales (Tabla II) y tejido adiposo (Tabla III), así como la distribución posicional de los mismos en el seno de la molécula de triacilglicérido (KUKSIS, 1972).

En cuanto a la composición podemos constatar como los TAG de leche poseen una mayor riqueza en ácidos grasos de cadena corta (hasta 12 C) mientras en los que proceden de tejido adiposo predominan los ácidos grasos de más de 14 C, siendo en los aceites vegetales donde alcanzan mayor proporción los ácidos grasos de cadena más larga (18 C) y concretamente los esenciales (no sintetizables en mamíferos a partir de ácidos grasos más cortos), como son el ácido linoleico (18:2) y linolénico (18:3).

TABLA I.- DISTRIBUCION POSICIONAL DE LOS ACIDOS GRASOS EN TRIACILGLICERIDOS DE LA LECHE DE DISTINTAS ESPECIES

Animal	Posición	Acidos grasos moles (%)															
		4:0	6:0	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3	20:1	20:4		
Vacas	1	5.0	3.0	0.9	2.5	3.1	10.5	35.9	2.9	14.7	20.6	1.2					
	2	2.9	4.8	2.3	6.1	6.0	20.4	32.8	2.1	6.4	13.7	2.5					
	3	43.3	10.8	2.2	3.6	3.5	7.1	10.1	0.9	4.0	14.9	-0.5					
Gatas	1	--	--	1.8	3.6	4.3	8.5	43.3	3.1	14.8	15.8	0.4	--	0.9			
	2	--	--	1.4	7.5	4.8	20.5	33.2	2.0	6.1	15.9	2.6	--	1.7			
	3	15.9	12.8	5.5	11.9	0.9	2.2	3.2	1.3	6.8	28.1	4.6	--	3.1			
Ovejas	1	--	--	0.7	1.3	2.0	7.9	38.0	2.2	19.6	19.0	2.7	2.0	tr			
	2	--	--	1.9	4.9	4.5	17.5	24.0	2.2	12.8	20.0	4.1	1.7	0.2			
	3	9.6	9.5	4.3	10.0	3.7	5.3	2.1	1.3	9.6	30.3	5.9	4.7	0.4			
Humanos	1				0.2	1.3	3.2	16.1	3.6	15.0	46.1	11.0	0.4	1.5	tr		
	2				0.2	2.1	7.3	58.2	4.7	3.3	12.7	7.3	0.6	0.7	0.9		
	3				1.8	6.1	7.1	6.2	7.3	2.0	49.7	2.0	1.6	0.5	0.3		

* Tomadas de KUKSIS, A. en Progress in the Chem. of Fats and other Lipids. v. 12 Ed. Pergamon Press., Oxford (1972).

TABLA II.- DISTRIBUCION POSICIONAL DE AC. GRASOS EN TRIGLICERIDOS DE DIVERSOS ACEITES

ACEITE	POSICION	Ac. Grasos (%)					
		16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Linaza	1	10,1	0,2	5,6	15,3	15,6	53,2
	2	1,6	0,1	0,7	16,3	21,3	59,8
	3	6,0	0,3	4,0	17,0	13,2	59,4
Soja	1	13,8		5,9	22,9	48,4	9,1
	2	0,9		0,3	21,5	69,7	7,1
	3	13,1		5,6	28,0	45,2	8,4
Maíz	1	17,9	0,3	3,2	27,5	49,8	1,2
	2	2,3	0,1	0,2	26,5	70,3	0,7
	3	13,5	0,1	2,8	30,6	51,6	1,0
Oliva	1	13,1	0,9	2,6	71,8	9,8	0,6
	2	1,4	0,7		82,9	14,0	0,8
	3	16,9	0,8	4,2	73,9	5,1	1,3
Manteca de cacao	1	34,0	0,6	50,4	12,3	1,3	
	2	1,7	0,2	2,1	87,4	8,6	
	3	36,5	0,3	52,8	8,6	0,4	

* Tomadas de KUKSIS, A. en Progress in the Chem. of Fats and other Lipids. v. 12. Ed. Pergamon Press. Oxford (1972)

TABLA III.- DISTRIBUCION POSICIONAL DE AC. GRASOS EN TRIGLICERIDOS DEL TEJIDO ADIPOSEO EN ALGUNOS ANIMALES

Animal	Posición	Ac. Grasos (%)						
		14:0	16:0	16:1	18:0	18:1	18:2	18:3
Hombre	1	4	39	5	10	33	3	1
	2	11	10	11	2	50	9	1
	3	1	25	4	9	51	5	1
Gato	1	3	27	4	20	36	5	1
	2	5	20	5	5	49	11	1
	3	2	20	3	14	46	8	1
Perro	1	2	26	4	22	36	5	1
	2	9	27	7	4	35	12	1
	3	1	16	4	14	57	7	1
Rata	1	2	32	5	9	32	15	2
	2	1	10	4	1	37	45	2
	3	2	27	5	7	37	17	2
Conejo	1	3	34	9	6	25	14	2
	2	6	25	12	1	26	23	5
	3	1	24	7	3	35	22	5
Buey	1	4	41	6	17	20	4	1
	2	9	17	6	9	41	5	1
	3	1	22	6	24	37	5	1
Caballo	1	3	39	7	6	27	5	11
	2	7	9	10	1	29	17	25
	3	3	30	6	7	37	5	11
Cerdo	1	2	16	3	21	44	12	1
	2	4	59	4	3	17	8	1
	3	1	2	3	10	65	24	1

* Tomadas de KUKSIS, A. en Progress in the Chem. of Fats and other Lipids. v. 12. Ed. Pergamon Press. Oxford (1972)

I.2.2.- LIPASAS

LIPASA GASTRICA

La digestión de los TAG se inicia en el estómago mediante la acción de la lipasa gástrica, cuya existencia como un enzima distinto de la lipasa pancreática ha sido puesto en duda durante mucho tiempo. Por filtración de un preparado de jugo duodenal a través de Sephadex G-100 se pueden separar ambas enzimas, poseyendo la lipasa gástrica un peso molecular de 50.000 Daltons, algo mayor que el que corresponde a la lipasa pancreática (COHEN y cols., 1968).

Además los extractos de jugo gástrico poseen una distinta actividad lipásica para distintos triglicéridos, que expresada en forma de velocidad relativa de hidrólisis es (SCHONHEYDER y VOL - GRARTZ, 1946): tributirina, 100; tricaproína, 39; tripopionina, 27; tricaprina, 13; trilaurina, 2 y trioleína, trazas.

En cuanto a su localización, su máxima actividad se encuentra en la fracción microsomal de la mucosa (CLARK y HOLT, 1968). A su papel fisiológico no se le concede mayor importancia puesto que tanto en rata (HERTING y AMES, 1955) como en humano (BORGSTROM y cols., 1957) la producción de ácidos grasos es inferior al 10% utilizando dietas ricas en aceite de algodón y grasa de

cerdo. Sin embargo, en ratas alimentadas con grasa de cerdo previamente saturada por hidrogenación (HERTING y AMES, 1955) se encontraron altos niveles (50%) de ácidos grasos en el estómago.

Todo ello hace pensar que la lipasa gástrica puede jugar un importante papel en la digestión de la grasa láctea en lactantes, así como en animales con dieta rica en TAG compuestos por ácidos grasos de cadena corta o saturados.

LIPASA PANCREÁTICA

La digestión cuantitativamente más importante se realiza en el intestino delgado por acción de la lipasa pancreática; que hidroliza los Triglicéridos para originar una mezcla de diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres (FRAZER y cols., 1944; DESNUELLE y cols., 1948).

En el curso del proceso de hidrolisis las grasas son finalmente emulsionadas en el intestino delgado por la acción de las sales biliares, glicéridos y ácidos grasos libres, lo cual incrementa la concentración de "sustrato accesible" a la acción del enzima.

La lipasa pancreática nos merece una especial atención puesto que no sólo tiene interés por su papel fisiológico, sino que se

ha convertido en un instrumento, sistemáticamente utilizado desde su descubrimiento, para el estudio de la distribución posicional de los ácidos grasos en el seno de la molécula de los TAG naturales.

Características

Se han aislado y purificado parcialmente dos lipasas pancreáticas de cerdo distintas y que se conocen como L_A y L_B (VERGER y cols., 1969). Su peso molecular, obtenido por distintos métodos, es inferior a 50.000 daltons, siendo la composición en aminoácidos de ambos tipos de lipasa muy parecida excepto en cuanto a su contenido en isoleucina.

La lipasa pancreática de rata, con un peso molecular inferior a 32.000 daltons también tiene una composición similar, así como coeficiente de extinción ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ a 280 nm) muy parecido para la lipasa porcina (13.4) y para la lipasa de rata (12.0).

En cuanto a su estructura se sabe que la lipasa pancreática posee 6 puentes disulfuro, y dos grupos sulfhidrilos libres por molécula.

VERGER, SARDA y DESNUELLE (1971) postularon que el grupo -SH libre es el responsable del ataque específico del enzima a las

interfases hidrofóbicas, no siendo indispensable para la acción catalítica del enzima. El candidato idóneo para ocupar el sitio de acilación, implicado en la formación del intermediario acil-lipasa es un residuo de serina o treonina.

Diversos experimentos (MAYLIE, CHARLES y DESNUELLE, 1969, 1972; SEMERIVA y cols., 1971) permiten concluir que en el centro activo del enzima participan los aminoácidos Ser e His. Los estudios realizados con p-nitrofenil-fosfato apuntan en el sentido de que la secuencia Leu-Ser-Gly-His participa en el centro activo del enzima. Esto muestra una gran similitud con las secuencias de los centros activos de muchas esterases y proteasas (OOSTERBAAN y COHEN, 1964).

Se conoce la existencia de un factor de activación (colipasa), de naturaleza proteica, cuyo peso molecular es de 8.000 daltons, que se une a la lipasa en una relación molar 1:1 tanto de cerdo como de rata (MORGAN y cols., 1969; MAYLIE y cols., 1971). La unión lipasa-colipasa parece realizarse a través de un grupo sulfidrilo.

Naturaleza del sustrato

Para cualquier tipo de triglicérido el enzima utiliza como sustrato una emulsión; el enzima actúa en la interfase triglicérido-agua de la emulsión. La lipólisis se produce conforme a una ci-

nética de MICHAELIS, pero considerando que dada su forma de acción no se debe hablar de concentración de sustrato en los términos que usualmente se utiliza en enzimología, puesto que en este caso la concentración de sustrato es aparente; la concentración real de sustrato viene dada por la concentración de TAG accesible a la acción del enzima, que a su vez depende de la concentración de interfase, y por lo tanto está en función del tamaño de las partículas que constituyen la emulsión y de la concentración de dichas partículas; en definitiva de la superficie accesible a la acción del enzima.

En el caso de triglicéridos solubles en agua (SARDA y DESNUELLE, 1958) la cinética es algo más compleja; existe una pequeña actividad lipolítica para aquellas concentraciones de triglicérido en que éste se encuentra en disolución; para aquellas concentraciones en las cuales el sustrato está emulsionado la cinética es también de MICHAELIS como en el caso de los triglicéridos insolubles en agua.

Especificidad posicional

Diversos experimentos demostraron la aparición de MAG en intestino durante la ingestión de grasas, y la presencia de mono y diglicéridos tras la ingestión de trioleina; de estos MAG, más del 50% resultaron ser el isómero de posición 2-MAG (KHURT y

cols., 1952; BLANKEHORN y AHRENS, 1955; HARRIS y cols., 1955). Asimismo se conoció que la hidrólisis de los TAG origina la producción preferencial de 1,2-diglicéridos (MATTSON y cols., 1952; BORGSTROM, 1953, 1954).

MATTSON y BECK (1955) encontraron que los 2-MAG predominaron entre los productos de hidrólisis, pero que los 1-MAG también están presentes en considerables cantidades; siendo ésto debido a un proceso de isomerización desplazado hacia la forma 1-MAG.

En definitiva se puede concluir que la Lipasa-pancreática hidroliza específicamente los enlaces éster en posición α y α' , obteniéndose como resultado de su acción sobre los TAG diacilglicéridos $\alpha\beta$ y $\alpha'\beta$ y monoglicéridos β , que por isomerización no enzimática pueden transformarse en α -MAG.

SINTESIS DE ENLACES ESTER CATALIZADOS POR LIPASA

Diversos experimentos realizados tanto "in vitro" como "in vivo" han permitido conocer que la lipasa pancreática cataliza al mismo tiempo el proceso de hidrólisis y de esterificación de ácidos grasos.

Cuando se alimentaron ratas con una mono-oleina conteniendo ácidos grasos libres marcados, se aislaron en intestino gran can-

tividad de glicéridos marcados (BORGSTROM, 1954).

AHRENS y BORGSTROM (1956) estudiaron el proceso de intercambio de ácidos grasos durante la digestión en intestino humano utilizando ácidos oleico y palmítico marcados, que se suministraron con la dieta; encontrando que la radioactividad aparecía en las tres fracciones de acil-glicéridos en el siguiente orden cuantitativo DAG > TAG > MAG.

MATTSON y BECK (1955) obtuvieron trioleína marcada por incubación de 1,2-dioleína y ácido oleico radioactivo con lipasa pancreática.

BORGSTROM (1954) observó la existencia de un intercambio de ácidos grasos radioactivos con los existentes en posiciones 1 y 3 de los TAG sometidos a hidrólisis por lipasa pancreática.

REISER y cols. (1952) llegaron a la conclusión de que es posible la síntesis de TAG a partir de DAG o MAG, pero no así a partir de glicerol y ácidos grasos libres.

MATTSON y VOLPENHEIN en 1972 encontraron que a partir de 2 moléculas de monoéster de hexano-1,6-diol, se puede obtener una molécula de diéster por transesterificación, y el alcohol libre.

ESPECIFICIDAD DE LA CADENA

Hay varios experimentos que contribuyen a esclarecer el problema de si la lipasa pancreática tiene una acción selectiva, en su hidrólisis de acil-glicéridos, en función de la longitud de la cadena de los ácidos grasos constituyentes de los mismos.

Cuando se valora la actividad lipásica, en ausencia de un emulsionante, sobre triglicéridos puros (DESNUELLE y SAVARY, 1964) la tasa de valores obtenidos es: Triacetina (C₂) 24; Tripropionina (C₃) 100; Tributirina (C₄) 77; Tricaprina (C₆) 15; Tricaprina (C₈) 27; Trilaurina (C₁₂) 2; Tripalmitina y Triestearina (C₁₈) muy baja.

Cuando se utilizan emulsiones de triglicéridos en goma arábiga en presencia de sales biliares se observa que la actividad lipásica es mínima para la Triacetina y aumenta en Tripropionina, alcanzando el máximo valor para la Tributirina. Desde Tributirina C₄ hasta Tricaprina (C₁₀) decrece. Este método no ha sido válido para los TAG de ácidos grasos de cadena larga puesto que la desviación ha sido muy grande y no permite discernir la posible existencia de diferentes actividades para TAG de ácidos grasos entre 14 y 20 átomos de carbono (DESMUELLE y SAVARY, 1964).

Trabajando con TAG mixtos que difieren en las posiciones 1 y 3 se obtienen importantes datos acerca de los ácidos grasos de

cadena larga. La hidrólisis de 1-butiril, 3-palmitil-glicerol origina 72% de ácido butírico y 28% de ácido palmítico.

Por otro lado, la hidrólisis de 1-oleil-dipalmitina origina igual tasa de hidrólisis de ambos ácidos grasos.

MONOGLICERIDO LIPASA INTESTINAL

Otra lipasa del tracto gastro-intestinal fué aislada tras el fraccionamiento subcelular de la mucosa de intestino de rata y se ha encontrado la mayor actividad en la fracción microsómica (POPE y Mc PHERSON, 1966).

Hidroliza no sólo emulsiones de 1 y 2-MAG sino también emulsiones de TAG y DAG de cadenas cortas. Su función puede ser la de liberar ácidos grasos de cadena corta, los cuales pueden llegar directamente al hígado a través de la sangre portal.

I.3.- ABSORCION INTESTINAL Y RESINTESIS DE TAG

Los estudios hechos por BORGSTROM y cols. (1957) en humanos, permitieron conocer que la principal absorción de lípidos tiene lugar en la última porción del duodeno y en la proximal del yeyuno de forma que a nivel del ileon proximal ya han sido absorbidos todos los lípidos.

La mezcla de ácidos grasos y glicéridos entra en la célula epitelial por difusión o pinocitosis o por ambos procesos simultáneamente. En el retículo endoplasmático tiene lugar la conversión de ácidos grasos y monoglicéridos en TAG (SENIOR e ISSELBACHER, 1960).

La biosíntesis de novo de TAG a partir de glicerol y ácidos grasos tiene lugar mediante el siguiente mecanismo, propuesto por KENNEDY en 1957 (Figura 2).

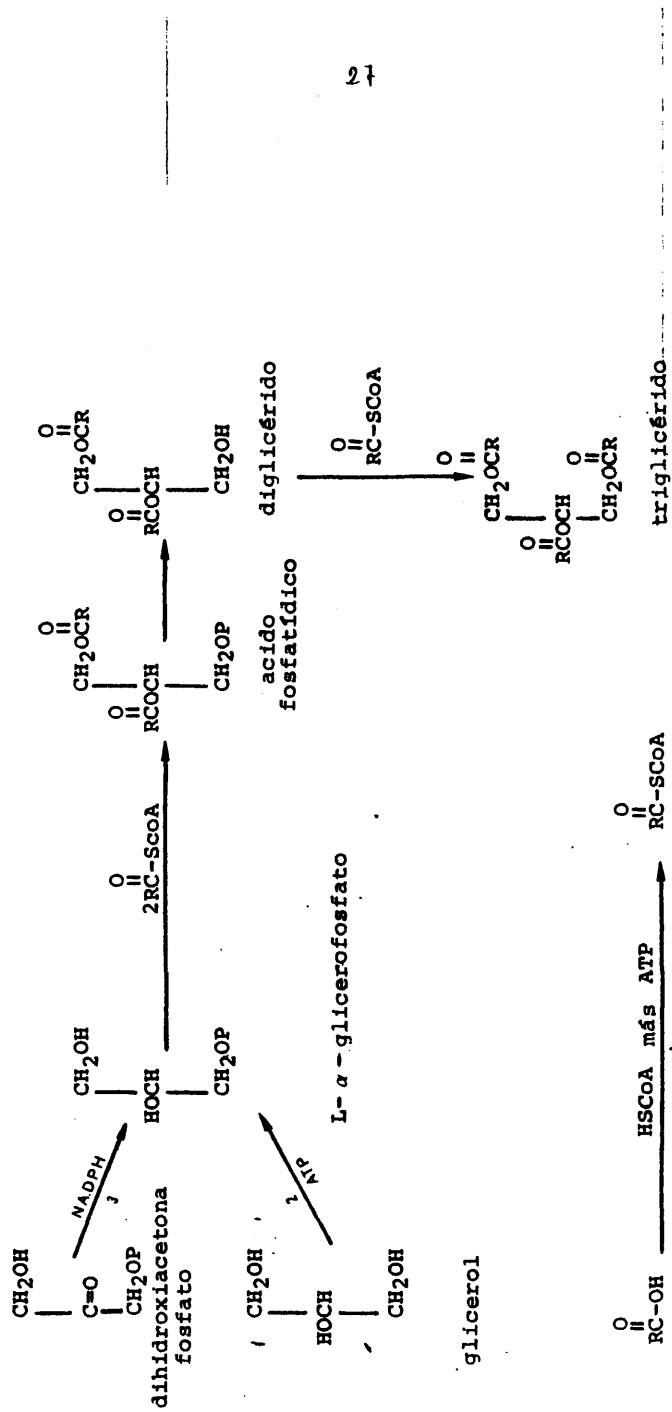


FIGURA 2.- Síntesis de triacilglicéridos en mucosa intestinal. El paso 2 tiene lugar en hígado pero no en epitelio intestinal (KENNEDY, 1957).

Además de la biosíntesis "de novo", en la mucosa intestinal tiene lugar otro mecanismo que pudiera tener gran importancia en la posterior distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de los TAG; se trata de la biosíntesis de DAG y TAG a partir de 2-MAG.

Como se puede observar en la Tabla II los TAG de la dieta, de origen vegetal, poseen una marcada asimetría en la disposición de los ácidos grasos en el seno de la molécula. Efectivamente los ácidos grasos de mayor longitud de cadena e insaturados (oleico y linoleico) tienden a disponerse en posición β , de forma que se condicionan las distribuciones SIS y SII, como las más frecuentes; ello conduce a que por acción de la lipasa pancreática los 2-MAG que ingresan en la mucosa intestinal sean portadores de un ácido graso de cadena larga e insaturado (oleico o linoleico) principalmente.

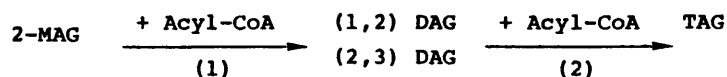
Este fenómeno de desigual distribución ocurre también en los TAG de grasas animales siguiendo la misma tónica, a excepción de la grasa de cerdo, donde se invierte el orden (Tabla III).

¿En qué medida puede esto afectar a la posterior distribución de los ácidos grasos en la molécula de TAG de los quilomicrones circulantes?. REISER y cols. (1952) encontraron que administrando a ratas TAG marcados en el glicerol aparecía éste en los TAG de los quilomicrones; además vieron que del 25-45% de la grasa es hidrolizada totalmente en el lumen intestinal, y que el resto es absorbida

como monoglicérido.

Un experimento que nos dá idea del extraordinario acoplamiento dieta-lipasa logrado en mamíferos en el curso del proceso evolutivo es el de SAVARY, CONSTANTIN y DESNUELLE (1961), los cuales estudiaron la distribución posicional de los ácidos grasos en los TAG de quilomicrones de ratas alimentadas con triglicéridos o con los ácidos grasos obtenidos de la saponificación de los mismos. En las primeras se encontró que los TAG de los quilomicrones conservan el 70% de los ácidos grasos en la misma posición que los de la dieta, mientras que en las segundas se encontró una distribución al azar de los ácidos grasos, a excepción del ácido esteárico que apareció predominantemente en las posiciones α y α' .

Los estudios de CLARK y HUBSCHER (1960, 1961) y de ROGERS y BOCHENEK (1970), permiten concluir que se produce una biosíntesis de TAG, de gran importancia cuantitativa, a partir de los 2-MAG en el intestino delgado que se realiza de acuerdo con el siguiente esquema:



Ambas formas de síntesis de TAG ("de novo" y "vía monoglicérido") se llevan a cabo en el retículo endoplasmático liso (CARDELL y cols., 1967; CLARK y HUBSCHER, 1961) mientras que la biosínte-

sis de apo B y otras apoproteínas de los quilomicrones debe ocurrir en los ribosomas del retículo endoplasmático rugoso.

REDGRAVE en 1971 sugirió dos posibles mecanismos de descarga de los quilomicrones:

- 1.- Por fusión de las vesículas del retículo endoplásmico liso con la membrana plasmática y subsiguiente descarga en el espacio extracelular por un proceso de exocitosis.
- 2.- Por descarga a través de canales de membrana.

FRIEDMAN (1972) y OLEDZKA (1971) constataron que la membrana de Golgi, envolvente del pre-quilomicron, se fusiona con la membrana plasmática en la superficie lateral de la célula y descarga el quilomicron. Los estudios de REDGRAVE (1973), SUBBAIAH (1970) y GLICKMAN (1972) corroboran estos hechos, al mismo tiempo que demuestran la participación de fosfolipasas A y B y de TAG lipasa en la secreción de quilomicrones. Durante su trayecto intracelular las gotas de glicéridos adquieren una cubierta de fosfolípidos.

Desde el líquido extracelular de la submucosa siguen su camino hacia los quilíferos centrales de las vellosidades y desde allí, impulsados por la bomba linfática a través del conducto linfático, se vacían en las venas del cuello. Este camino lo sigue

del 80-90% de la grasa absorbida; únicamente de un 10 a un 20% son absorbidos directamente por la sangre portal siendo de esta cantidad el porcentaje de absorción para cada ácido graso inversamente proporcional a la longitud de su cadena. Los quilomicrones llegan a lo largo del conducto torácico hasta la unión de las venas subclavia y yugular y son vertidos a la sangre.

I.4.- METABOLISMO DE LOS TRIACILGLICERIDOS PLASMATICOS

I.4.1.- CATABOLISMO DE LOS QUILOMICRONES

Los conocimientos sobre el catabolismo de los quilomicrones han sido revisados por JAKSON y cols. en 1976. El catabolismo se realiza en dos etapas:

- 1.- Una primera etapa comprende la hidrólisis de triglicéridos catalizada por TAG-lipasa en el endotelio capilar de tejidos extrahepáticos.
- 2.- En una segunda etapa los quilomicrones pobres en triacilglíceridos son captados desde la sangre por el hígado.

Los productos de la primera reacción son AGL y DAG; los AGL son liberados al torrente circulatorio y transportados por la albúmina. Los AGL van a seguir dos vías posibles: su captación por tejido adiposo para su almacenamiento en forma de TAG, y su captación por otros tejidos para su utilización en la biosíntesis de otras moléculas o su degradación total para obtener energía.

I.4.2.- LIPOPROTEIN-LIPASAS

Se han encontrado gran variedad de tejidos que poseen actividad LPL: corazón, tejido adiposo, bazo, pulmón, médula renal, hígado, pared aórtica, diafragma y glándula mamaria (KORN, 1954; KORNE y QUIGLEY, 1955, 1957; HOLLENBERG y HOROWITZ, 1962; ROBINSON, 1963; Mc BRIDE y KORN, 1963; LA ROSA y cols., 1972).

Cabe distinguir dos tipos de actividades lipoprotein-lipásicas como son las que se llevan a cabo en el endotelio capilar de los tejidos extra-hepáticos y la que tiene lugar en sangre, que conviene analizar tanto en lo que se refiere a su procedencia como a su especificidad posicional.

La administración intravenosa de heparina provoca un incremento de la actividad TAG-lipásica en sangre (HAHN, 1943). Esta actividad lipásica post-heparina (PHLA) procede al menos de dos sitios distintos: tejido adiposo e hígado (HUTTUNEN, 1973; KRAUSS, 1973; LA ROSA, 1972; GUDER, 1969).

Especificidad posicional

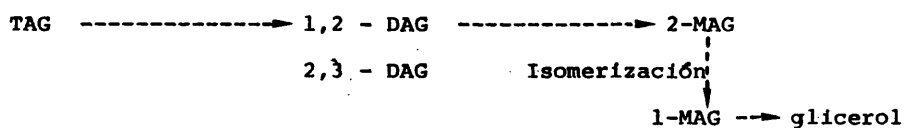
Si bien KORN (1961) afirmó que la lipoprotein lipasa no tiene especificidad posicional, numerosos trabajos desarrollados posteriormente permiten concluir la existencia de una ruptura especí-

fica dependiente de la posición en la acción hidrolítica de las lipasas que actúan sobre las lipoproteínas.

BJORNTORP y FURMAN (1962) encontraron hidrólisis específica sobre las posiciones 1 y 3 por parte de la LPL procedente de tejido adiposo. NILSSON-EHLE en 1971, reafirma el resultado de los trabajos de BJORNTORP y FURMAN en experimentos en los que utiliza PHLA. MORLEY en 1972 afirmó la existencia de una especificidad posicional de la PHLA de rata por la posición 1 de los TAG y ASSMAN (1973) ha encontrado especificidad por las posiciones 1 y 3 de los TAG.

NILSSON-EHLE (1975) ha estudiado la especificidad posicional de la LPL de tejido adiposo de rata, encontrando que la ruptura de los enlaces éster se produce sobre las posiciones 1, 3 utilizando TAG marcados en el ácido graso situado en posición 2.

Además, de sus experimentos se puede concluir que la LPL de tejido adiposo posee actividad en cuanto a la síntesis de DAG a partir de 2-MAG, proponiendo el siguiente esquema:



Esta secuencia es similar a la que tiene lugar por acción de la lipasa pancreática sobre emulsiones de TAG.

Características de las PHLA

Los trabajos de GANESAN y cols. (1971, 1974, 1975, 1976), así como los de LA ROSA (1972), KRAUSS (1973) y ENHOLM (1974) demuestran que existen al menos tres TAG-lipasas distintas en sangre de animales postheparinizados, que reciben los nombres de:

- 1.- Lipoprotein lipasa C-I (LPL C-I) procedente de hígado; presente en plasma post-heparina pero no en tejido adiposo. Es activado por suero o C-I pero no por C-II y es inhibido por ClNa y protamina sulfato.
- 2.- Lipoprotein lipasa CII (LPL CII) presente en tejido adiposo, es activado por suero o por C-II pero no por C-I y es inhibida por ClNa y protamina sulfato.
- 3.- Triglicérido lipasa hepática, procedente de la membrana de las células hepáticas (ASSMAM, 1973) no requiere ser activada por suero y es insensible a la protamina sulfato y no es inhibida por ClNa.

Otras actividades lipásicas en sangre

También existen en sangre actividades lipásicas post-heparínicas que utilizan como sustrato DAG, MAG (BIALE y SHAFRIR, 1969;

GRETEN y cols. 1969; NILSSON-EHLE y BELFRAGE, 1972), así como una fosforilasa de tipo A₁ (catalizadora de la ruptura del enlace ester en posición C-1) que utiliza como sustrato fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina (VOGEL y BIERMAN, 1970; VOGEL y cols., 1971; ZIERE y ZIERE, 1972).

I.4.3.- LIPASAS TISULARES

ACTIVIDAD LIPASICA EN HIGADO

GUDER (1969) encontró en hígado una lipasa cuyo pH óptimo, en la hidrólisis de trioleína, es 7,5 y que requiere la presencia del ión Ca⁺⁺; este enzima es estimulado por heparina y está localizado en la membrana plasmática. LA ROSA (1972) comunicó la existencia de una TAG-lipasa hepática que posee actividad sobre lipoproteínas ricas en TAG (ASSMAN, 1973; KRAUSS, 1973); LLOBERA y cols. (1979) encontraron actividad lipoprotein-lipasa en hígado de feto de rata.

Se ha encontrado en lisosomas (NILSSON-EHLE, 1975; BIALE y SHAFRIR, 1969; GRETEN y cols. 1969) una lipasa cuyo pH óptimo es 6.8 y que hidroliza preferentemente TAG de cadena corta, poseyendo especificidad posicional para la ruptura de ácidos grasos en posición α , de forma que rinde 1,2 dioleína a partir de trioleína (GRETEN y cols., 1969). También se ha encontrado otra lipasa en la fracción microsómica (BIALE y SHAFRIR, 1969; VOGEL y BIERMAN, 1970; NILSSON-EHLE y BELFRAGE, 1972) con actividad MAG-lipásica y cuyo pH óptimo es 8-9.

ACTIVIDAD LIPASICA EN TEJIDO ADIPOSEO

El tejido adiposo, como órgano clave en el proceso de acumulación y liberación de ácidos grasos, posee una variada actividad acil-hidrolasa (KHOO y cols., 1976) que es activada por AMPc; TAG, DAG, MAG y ester de colesterol-hidrolasas. Otra actividad lipásica, a la cual ya nos hemos referido, es la desarrollada por la LPL de tejido adiposo, cuya actividad no parece ser afectada por AMPc.

La TAG-lipasa sensible a las hormonas (HSL) ha sido estudiada exhaustivamente, pero sin embargo no existen datos suficientes para afirmar que sea una enzima distinta de la DAG-lipasa; por otro lado KHOO y STEINBERG (1978) en diferentes ocasiones han encontrado distinto o el mismo grado de activación, por protein-kinasa dependiente de AMPc, de las actividades TAG y DAG-lipásicas en tejido adiposo de pollo.

SCOW y cols. (1965) encontraron acumulación de DAG y MAG durante la movilización de grasa; STEINBERG y cols. (1965) no han encontrado acumulación de DAG o MAG por acción de HSL sobre TAG.

VAUGHAN y cols. (1963, 1964) han establecido que existe una actividad MAG-lipásica no realizada por la HSL y que el enzima responsable de la misma hidroliza más rápidamente el isomero 2 que el 1-MAG.

I.5.- SINTESIS DE TAG EN TEJIDO ADIPOSO

Al igual que ocurre en intestino, la biosíntesis de TAG en tejido adiposo se puede llevar a cabo mediante dos vías posibles: la síntesis de novo, ampliamente estudiada, y la síntesis "vía monoglicéridos", cuya existencia ha sido postulada por SCHULTZ y JOHNSTON (1971) a raíz de sus estudios en tejido adiposo de hamster.

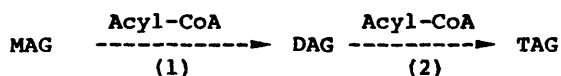
I.5.1.- VIA MONOGLICERIDO

Esta ruta posee una gran importancia cuantitativa en intestino, además de ser determinante de la posicionalidad en 2 de los ácidos grasos de 18 C insaturados; sin embargo no se conoce su importancia real en tejido adiposo. Nosotros consideramos que existe un gran paralelismo entre ambos órganos que se puede cifrar en:

- a) Existencia de una vía de biosíntesis de novo de TAG.
- b) Existencia de una vía monoglicérido para la síntesis de TAG.
- c) Los AGL y 2-MAG que ingresan en el intestino proceden de la acción hidrolítica de la lipasa pancreática (especificidad posicional 1, 3) mientras que en tejido adiposo los AGL proceden de la acción hidrolítica de la LPL (especificidad posicional 1, 3) cuando son de origen exógeno.

- d) Los TAG sintetizados en el intestino (quilomicrones) y en tejido adiposo poseen una desigual distribución posicional de los ácidos grasos (preferencia β para largos insaturados).
- e) Los TAG que sirven de sustrato a la lipasa pancreática y LPL (dieta y suero) también poseen esa misma desigual distribución posicional.

Aunque en intestino está claro que la "vía monoglicérido" representa una forma de "transmisión", de la posicionalidad de los ácidos grasos no se conoce el ingreso de 2-MAG o DAG en el tejido adiposo desde el suero. Esta vía monoglicérido se llevaría a cabo en dos pasos:



siendo el paso (2) común a la biosíntesis "de novo".

¿Cuál puede ser la función de MAG-acyl-transferasa?. Los MAG que dicha enzima utiliza como sustrato pueden tener dos orígenes: del suero o del proceso lipolítico propio del tejido.

La primera posibilidad implicaría la existencia de un ingreso de MAG desde el suero hacia el tejido adiposo, hecho esto no demostrado. Sin embargo, los trabajos de BORSTROM y JORDAN (1959), BRAGDON y GORDON (1958) y ROBBELL y SCOW (1965) parecen indicar que pudiera existir una captación de glicéridos no hidrolizados

por parte del tejido adiposo; sin embargo, BEZMAN y cols. (1962) piensan que este hecho podría achacarse a un fenómeno de adsorción física.

La segunda posibilidad nos situaría ante un ciclo conservativo:

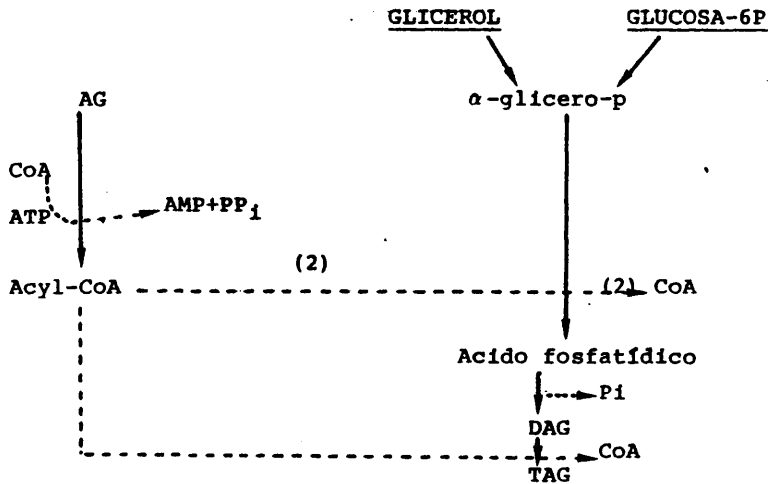


que en esencia podría tener un doble significado:

- 1) Un papel de mantenimiento de la temperatura corporal, como sugirió ya CAHILL en 1964 en cuanto al ciclo continuo de lipólisis-esterificación.
- 2) Un papel de conservación de los ácidos grasos de 18 C e insaturados y en particular del ácido graso esencial: linoleico.

I.5.2.- BIOSINTESIS DE NOVO

La ruta biosintética "de novo" de TAG en tejido adiposo es esencialmente similar a la que ocurre en hígado e intestino WEISS y KENNEDY (1956), STEIN y SHAPIRO (1957). Esta vía se puede esquematizar como sigue:~



El α -glicerofosfato, matriz de la molécula de los glicéridos se puede formar por varios mecanismos, sujetos en parte a control hormonal.

La vía mejor conocida de síntesis de α -glicerofosfato es a partir de glucosa, utilizando la conocida ruta glucolítica (MARGOLIS y VAUGHAN, 1962).

Glucosa (G) -----> G-6-P -----> α -glicerofosfato
(+) Insulina

Otras vías, teóricamente posibles, son la neoglucogénica y la del 6-fosfogluconato (HERRERA, 1977).

Por último merece especial atención la formación α -glicerofosfato por fosforilación del glicerol libre. La importancia

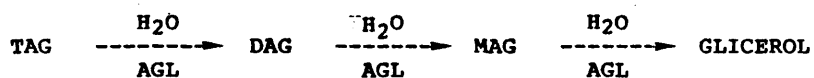
cuantitativa de esta vía ha sido muy discutida; MARGOLIS y VAUGHAN en 1962, obtuvieron un bajo rendimiento en sus trabajos con homogenizados de tejido. ROBINSON y NEWHOL (1967) y HERRERA y AYANZ (1972) encontraron elevadas cantidades de glicero-kinasa en tejido, lo cual indica un elevado grado de recaptación de glicerol. DOMINGUEZ y HERRERA (1976) han observado un incremento en la captación de glicerol por el tejido por acción de la insulina en tanto que la adrenalina ejerce la acción contraria. SMITH y cols. (1957) encontraron la actividad ácido-fosfatídico-fosfatasa en microsomas; donde también se encuentra el 90% de la actividad pirofosfatasa del tejido (MARGOLIS y VAUGHAN, 1962).

El último paso de es "vía de novo" es común a la "vía monoglicérido" y convierte a los DAG en el eje central del proceso lipólisis-esterificación. GOLDMAN y VAGELOS (1961) lo estudiaron en tejido adiposo de pollo utilizando α , β -DAG encontrando que:

- 1) El palmitil-CoA es utilizado preferentemente al oleil-CoA.
- 2) Los DAG conteniendo un ácido graso insaturado (α o β) son más reactivos que los que solamente contienen mirístico (C_{14}) son peor utilizados que los que contienen palmítico y a su vez más reactivos que los que contienen esteárico.
- 3) Se produce igual esterificación de DL- α -oleil- β palmitil-DAG que de DL- α -palmitil- β oleil-DAG.

I.6.- DEGRADACION DE TAG EN TEJIDO ADIPOSO

La degradación de los TAG en sus elementos constituyentes, AGL + glicerol, se conoce con el nombre de lipólisis y es realizado mediante la siguiente secuencia de reacciones:



Este proceso parece ser realizado por varias enzimas distintas: TAG-lipasa, DAG-lipasa y MAG-lipasa, que además podrían tener una determinada especificidad posicional o de cadena como veremos posteriormente.

Los experimentos de HELLER y STEINBERG (1972) en tejido adiposo de rata, y de KHOO y cols. (1976) en tejido adiposo de pollo permiten clasificar al menos en cuatro grupos las distintas actividades acil-hidrolasas del tejido que parecen ser activadas por el AMP-c:

- actividad TAG lipásica.
- actividad DAG-lipásica
- actividad MAG-lipásica
- actividad colesterol-ester hidrolasa.

Estas actividades se encuentran activadas por el AMPc en diferente grado, HELLER y STEINBERG (1972) encontraron una activación

en tejido adiposo de rata de la HSL de 50 a 70% mientras que para la DAG y MAG-lipasa fué inferior al 15%. La diferencia obtenida es un factor que se consideró decisivo en la clarificación del problema relativo a la identidad de la HSL y DAG-lipasa.

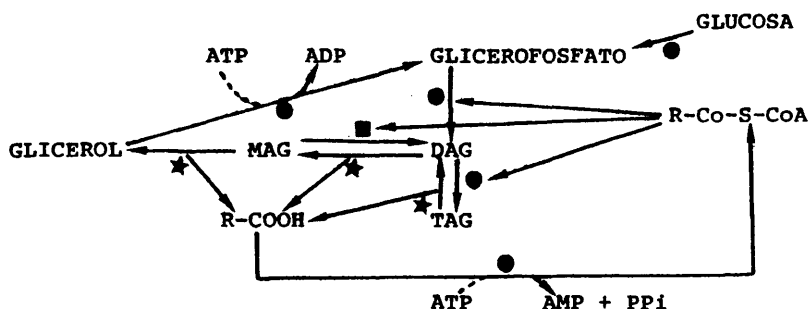
KHOO y cols. (1976) trabajando con tejido adiposo de pollo obtuvieron, utilizando protein-kinasa, una activación de la HSL de 200 a 900% frente a un 60 a 80% para la DAG-lipasa.

Sin embargo KHOO y STEINBERG en 1978 obtuvieron un grado semejante de activación para ambas enzimas bajo determinadas condiciones de ensayo. Efectivamente obtuvieron una activación de la DAG-lipasa inferior al 10% utilizando como medio fosfato sódico 100 mM, mientras que en fosfato sódico 0-4 mM el grado de activación fué de 1000%.

No existe por tanto una evidencia clara en el sentido de que TAG-lipasa y DAG-lipasa sean la misma o distintas enzimas.

La distinta entidad de TAG y MAG lipasas quedó demostrada por VAUGHAN y cols en 1963, asimismo demostraron que la MAG-lipasa posee una mayor afinidad por los β -MAG (VAUGHAN y cols., 1964) que por los α -MAG. No existen sin embargo datos que permitan afirmar que la HSL y DAG-lipasa poseen una especificidad posicional sobre los ácidos grasos esterificados en α , α' .

Los datos que se poseen sobre los distintos mecanismos de acilación y desacilación que constituyen el proceso de lipólisis-esterificación se pueden resumir en el siguiente esquema:



- Esterificación
- ★ Lipólisis
- Vía monoglicérido

El proceso de lipólisis y de esterificación parecen producirse simultáneamente; la tasa de lipólisis basal (STEINBERG, 1964) permitiría hidrolizar la mitad de los TAG en 23 días, sin embargo, la vida media de los ácidos grasos en el tejido (STEIN y STEIN, 1962) en ratas vivas es de 170 días; esta diferencia parece evidenciar una continua re-esterificación de ácidos grasos formados por lipólisis.

Efectivamente, VAUGHAN y STEINBERG (1963) estiman que durante la lipólisis estimulada por hormonas son re-esterificados cerca de un 20% de los ácidos liberados.

STEINBERG y VAUGHAN (1965) han encontrado que en distintas condiciones (lipólisis estimulada por epinefrina o ACTH) no se produce acumulación de DAG o MAG; sin embargo SCOW (1965) encontró que después de una estimulación hormonal de la lipólisis se producía acumulación de DAG, pero no así de MAG.

I.7.- ESPECIFICIDAD DE POSICION, CADENA Y GRADO DE INSATURACION EN EL PROCESO DE LIPOLISIS-ESTERIFICACION

HOLLENBERG y DOUGLAS en 1962 compararon las composiciones en ácidos grasos entre 14 y 18 C de las fracciones TAG y AGL en tejido adiposo incubado con Adrenalina y ACTH encontrando que en los AGL el porcentaje de ácidos grasos de 14 y 16 C era mayor que en los TAG; asimismo encontraron que en ratas tras 72 y 120 horas de ayuno así como en ratas diabéticas, aumentaba el porcentaje de ácidos grasos de 18 C en los TAG, con respecto a controles alimentados normalmente.

HOLLENBERG y ANGEL (1963) encontraron resultados similares en condiciones de estimulación de la lipólisis. HOLLENBERG en 1964 emite dos posibilidades para explicar la diferencia de composición entre AGL y TAG que había obtenido:

- 1) La acción de la HSL podría ser similar a la de la lipasa pan

creática; efectivamente, en el tejido adiposo de rata los TAG poseen las posiciones α , α' ocupadas por ácidos grasos predominantemente saturados y de 16 C, mientras los ácidos de 18 C se disponen preferentemente en posición β (Tabla III).

2.- Determinadas especies de TAG (más ricas en ácidos de 14 y 16 C y saturados serían hidrolizados más rápidamente por la HSL.

La primera posibilidad apuntada por HOLLENBERG está aparentemente en contradicción con el hecho de que la hidrólisis "in vitro" parece ser completa (VAUGHAN y cols., 1964) y que por cada 3 moles de AGL se forma un mol de glicerol.

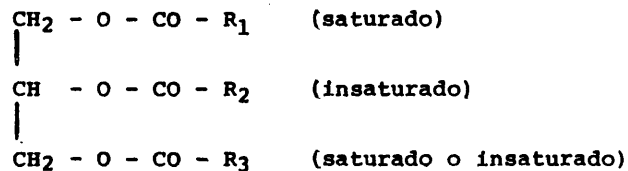
Además tampoco parece compatible con los resultados obtenidos por SCOW (1964) en el sentido de que no existe acumulación de MAG durante la lipólisis.

Por otra parte GELLHORN y BENJAMIN (1964) encontraron que con la edad de las ratas (seguido de un incremento del peso) aumenta la proporción de 18:1 y 18:2 en el tejido adiposo; asimismo encontraron acumulación de ácidos grasos de 18 C en ratas diabéticas. Paralelamente se observó una disminución en ambos casos de la síntesis en tejido adiposo de ácidos mono-insaturados a partir de sus precursores saturados. Además, la esterificación producida con glucosa e insulina parece realizarse en mayor exten-

sión (HOLLENBERG y ANGEL, 1963) para los ácidos grasos de 16 C y dentro de la misma longitud de cadena para los más insaturados.

Existen varios estudios (BROCKERHOFF y cols., 1966) sobre la distribución posicional de los AG en la molécula de TAG en distintas especies (Tabla III) de ellos se deduce una tendencia general en los animales a disponer los AG más largos e insaturados en posición β .

PRIVET y cols. (1965) realizaron el fraccionamiento de los TAG de tejido adiposo de rata, y con diferentes dietas encontraron una estructura similar a la encontrada por HANAHAN y cols. (1960) para lecitina de huevo y TAG de hígado:



En cuanto a la distribución posicional de los TAG de tejido y composición de los mismos en AG, se ha hablado mucho de la influencia de la dieta. Debemos considerar dos factores como son dieta y especie, que son los que más afectan a la composición de los TAG de tejidos y analizar las relaciones entre los mismos:

1.- Dieta constante y especies diferente. HILDITCH (1956) anali-

z6 las composiciones en AG en distintas especies con dietas similares; de los resultados obtenidos en 17 especies (11 de ellas mamíferos) se puede observar una variación lo suficientemente amplia como para poder deducir la existencia de una especificidad de especie en los mecanismos que conducen a la acumulación de ácidos grasos en tejido adiposo.

2.- Diferentes dietas para la misma especie. PRIVETT y cols. en 1966 realizaron extensos experimentos con rata y analizaron las variaciones en composición y posicionalidad. De la comparación, de los resultados se sugiere una influencia muy importante de la dieta, en períodos tan largos para la rata como son seis meses, pero no la existencia de mecanismos simples que permitan deducir una relación directa en las composiciones. Indudablemente uno de ellos es el porcentaje de 18:2 (esencial en la dieta y precursor de los ácidos poli-insaturados). Un hecho importante es que se mantiene la constancia en la disposición II (S o I) con dietas y composiciones muy distintas.

3.- Un ejemplo de la inexistencia de una relación directa la encontramos en el trabajo de GUNSTONE en 1965 que pone de manifiesto que dos especies, chimpancé y hombre del Oeste Norteamericano con dietas muy distintas poseen una misma composición en los AG de sus depósitos grasos.

4.- Debemos considerar por último que con una dieta constante existen factores que conducen a modificaciones en la composición de los depósitos como son los ya expresados de la diabetes y la edad (peso), a los que habría que añadir cierta influencia del frío (FAWCETT y LYMAN, 1954).

Asimismo se conoce que la adición en la dieta de linoleico provoca un incremento de 16:0, 18:0 y 18:2 en los depósitos (KAUNIT, 1961) y la adición de oleico provoca un incremento de 18:1 y un decremento de 14:0 y 16:0 (TOVE y SMITH, 1960).

Nos hemos referido con anterioridad a una posible especificidad posicional y de cadena de la HSL. También se ha analizado la posible especificidad de los mecanismos de esterificación (introducción página 41); debemos reseñar aquí el extraordinario interés al respecto de los experimentos de COLEMAN y cols., 1976, en los cuales demostraron que la diacil-glicerol-aciltransferasa posee una especificidad de cadena tanto por los 1,2-DAG utilizados como por los Acil-CoA.

Efectivamente la velocidad de la reacción fué sensiblemente mayor para los 1,2-DAG de 18:1 que para los de 16:0 o 14:0. Asimismo fué mayor para el palmitil-CoA y miristil-CoA que para Oleil-CoA. Esto parece en franca correlación con los resultados de HILDITCH en 1956 y de PRIVETT y cols. en 1965 ya mencionados anteriormente.

I.8.- ESTRUCTURA DE LA HSL Y REGULACION DE SU ACTIVIDAD

RIZACK en 1964 y TSAI y VAUGHAN en 1970 sugirieron que la actividad de la HSL está regulada mediante un proceso de fosforilación dependiente de AMPc.

Los experimentos de HUTTUNEN y STEINBERG en 1971 en tejido adiposo de rata y de KHOO y cols. (1974) en humano pusieron en evidencia que existe una activación de la TAG-lipasa por AMPc, dependiente de protein-kinasa.

El mecanismo de activación de la protein-kinasa es bien conocido, y se realiza por asociación del AMPc a la subunidad reguladora de ésta, provocando la transformación de subunidad catalítica en su forma activa (BROSTROM y cols., 1971; RUBIN y cols., 1972; REIMANN y cols., 1971).

La acción de la protein-kinasa fue estudiada por HUTTUNEN y STEINBERG en 1971 que encontraron la existencia de una transferencia de ^{32}P desde ATP a la HSL en presencia de protein-kinasa. Esto indica la existencia de dos formas de la HSL llamadas respectivamente "lipasa a" y "lipasa b; la forma inactiva (lipasa b), no fosforilada, es transformada así en la forma activa (lipasa a) fosforilada. El peso molecular (3×10^6 a 7×10^6) de la lipasa hizo sugerir a HUTTUNEN y STEINBERG, que bien pudiera tratarse de un complejo multienzimático. Es indudable que esto puede modificar

el planteamiento del problema sobre la posible identidad de la HSL y DAG-lipasa.

KHOO y cols. (1978) encontraron que la DAG-lipasa activada por AMPc, al igual que la TAG-lipasa, es desactivada por fosfatasa y que esta desactivación era del 50% a los 15 minutos.

En la figura 3 podemos ver resumido el mecanismo de activación y desactivación de la lipasa.

I.9.- REGULACION NEUROENDOCRINA DEL PROCESO LIPOLISIS-ESTERIFICACION

I.9.1.- SIGNIFICADO

El único factor de regulación cuyo mecanismo de acción es conocido en el proceso de lipólisis-esterificación es el AMPc, y por este motivo a él van referidos los mecanismos de actuación de las distintas hormonas, metabolitos y agentes químicos que provocan una respuesta del sistema en uno u otro sentido (lipólisis-esterificación).

En nuestra opinión cabe diferenciar la acción sobre el proceso de lipólisis de la acción sobre el proceso de esterificación, puesto que si bien está claro que los mecanismos de activación e

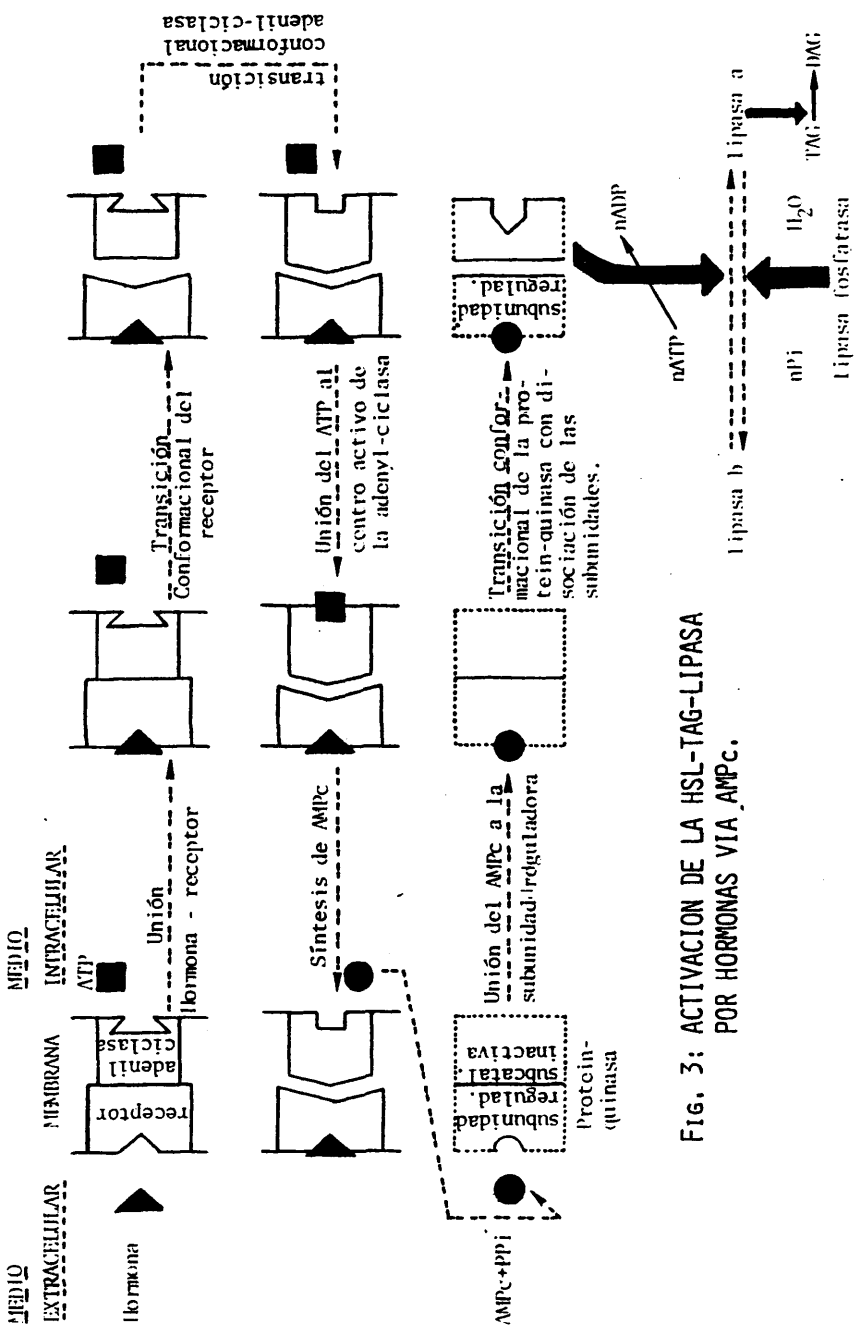


FIG. 3: ACTIVACION DE LA HSL-TAG-LIPASA POR HORMONAS VIA AMPc.

inhibición de la lipólisis son antagónicos (V.G. la activación por fosforilación de la lipasa y la inhibición por defosforilación de la misma) y respondiendo a una lógica de economía celular ambos mecanismos deben ser regulados por el mismo metabolito (AMPc); sin embargo, no es evidente que ese mismo principio lógico de economía celular implique un ligamiento obligatorio de activación lipolítica e inhibición esterificadora.

En este sentido es de señalar que los trabajos de BALL y JUN GAS (1963), JUNGAS y BALL (1963) y de VAUGHAN y STEIBERG (1963) (Tabla IV), así como los de HERRERA y AYANZ (1972), concluyen que las hormonas lipolíticas provocan también un incremento de la esterificación. Únicamente SOORANNA y SAGGERSON en 1976 han establecido que las catecolaminas produzcan una inhibición de la esterificación (del 50%) para el primer enzima de la misma por la vía de la biosíntesis de novo (glicerol-P-acil-transferasa) y cabe argumentar en este caso que fué utilizado FNa, conocido inhibidor de la esterificación. El argumento económico que podría esgrimirse en este caso está en contraposición al hecho de que la posicionalidad de los ácidos grasos en el seno de la molécula de los TAG sea desigual y por lo tanto también opuesto al principio lógico de economía.

Esto nos ha conducido a pensar que ese desgaste energético que se produce en una continua lipólisis-esterificación podría corresponderse con el necesario aporte energético que conlleva la desigual disposición de los AG en el seno de la molécula de los TAG,

54

TABLA IV.- EFECTOS LIPOLITICOS Y ESTERIFICADORES DE ALGUNAS HORMONAS (uequ AG/g. tejido)
(VAUGHAN Y STEINBERG, 1963)

CONCENTRACION HORMONA	CONTROL		EFECTO DE LA HORMONA EN:	
	lipolisis	esterificación	lipolisis	esterificación
Epinefrina 0,1 ug/ml	3,5	3,1	+12,7±1,7	+5,0±1,4
ACTH 0,04 U/ml	3,7	3,4	+14,1±0,7	+5,1±0,6
GH 200 ug/ml	3,2	3,1	+ 5,2±0,7	+0,8±0,7
TSH 25 ug/ml	3,8	3,8	+14,3±2,0	+4,5±1,3

y que en consecuencia la función de este proceso de "turnover" permanente no sea otra que la de crear una desigualdad posicional manteniendo un bajo punto de fusión de los TAG y en consecuencia la necesaria fluidez de la gota grasa para la acción en interfase de la HSL.

En este sentido de no ser evidente el antagonismo entre ambos procesos es donde cobra mayor importancia el análisis de la técnica utilizada para la cuantificación de la lipólisis; así la valoración de glicerol únicamente nos informa de la cantidad de TAG, DAG y MAG que son totalmente hidrolizados, pero en nada de la hidrolisis parcial ni de la esterificación que se produce paralelamente, además tampoco es evidente que el proceso de liberación de AGL y el de producción lipolítica de los mismos sea regulado por los mismos mecanismos, ni tampoco la cuantificación de los AGL nos dice más que el sentido global del proceso lipólisis-esterificación.

A todo esto hay que añadir el hecho de que el AMPc no sólo promueve la activación de la lipasa HSL, sino que también lo hace sobre la glucógeno-fosforilasa de tejido adiposo, hecho éste que puede tener no sólo una lógica de producción energética, puesto que el proceso esterificador requiere además de un aporte de energía un aporte de glucosa; y además cabe considerar que la glucosa es al mismo tiempo un precursor en la biosíntesis de novo de ácidos grasos, y quizás sea en este sentido donde hay que anali-

zar este triple proceso de activación de la glucógeno-fosforilasa, esterificación y lipólisis que parecen promover las llamadas hormonas lipolíticas.

Por otro lado es de señalar que en los experimentos en los que se ha demostrado la existencia de una activación de la MAG y DAG-lipasa por parte del AMPc se han utilizado MAG y DAG marcados en sus ácidos grasos, pero estos estuvieron distribuidos al azar, lo cual en nuestra opinión no permite conclusiones tan claras como las establecidas por KHOO y cols. (1978).

Además, cuando éstos autores encontraron el mismo grado de activación para HSL y DAG-lipasa por AMPc utilizaron como sustrato una mezcla de los isómeros 1,2 y 1,3 de la dioleína (KHOO y cols. 1978). Es evidente, a la vista de todo ello, que cabría plantearse la validez de tales experimentos y de las conclusiones que se establecen, en cuanto la HSL podría hidrolizar los α -MAG y los α y α' -DAG; en nuestra opinión tales resultados y conclusiones deben tomarse con precaución en tanto no se conozca con certeza si la HSL posee especificidad posicional o produce una ruptura al azar, así como su mecanismo de reconocimiento de los TAG.

I.9.2.- MECANISMOS DE REGULACION HORMONAL DE LA LIPOLISIS

Las hormonas actúan regulando procesos preexistentes y pueden ejercer su acción de tres maneras:

- 1.- Influyendo sobre la velocidad de síntesis de enzimas y otras proteínas.
- 2.- Afectando a la velocidad de catálisis enzimática.
- 3.- Alterando la permeabilidad de las membranas celulares.

En el tejido adiposo adquiere gran importancia la actuación de hormonas mediando la velocidad de catálisis enzimática que se ejerce a través de la lipasa sensible a las hormonas (HSL) y cuyo mecanismo hemos visto anteriormente.

En el siguiente cuadro podemos observar algunos de los mecanismos de acción de hormonas, metabolitos y agentes químicos en el tejido adiposo. (Figura 4).

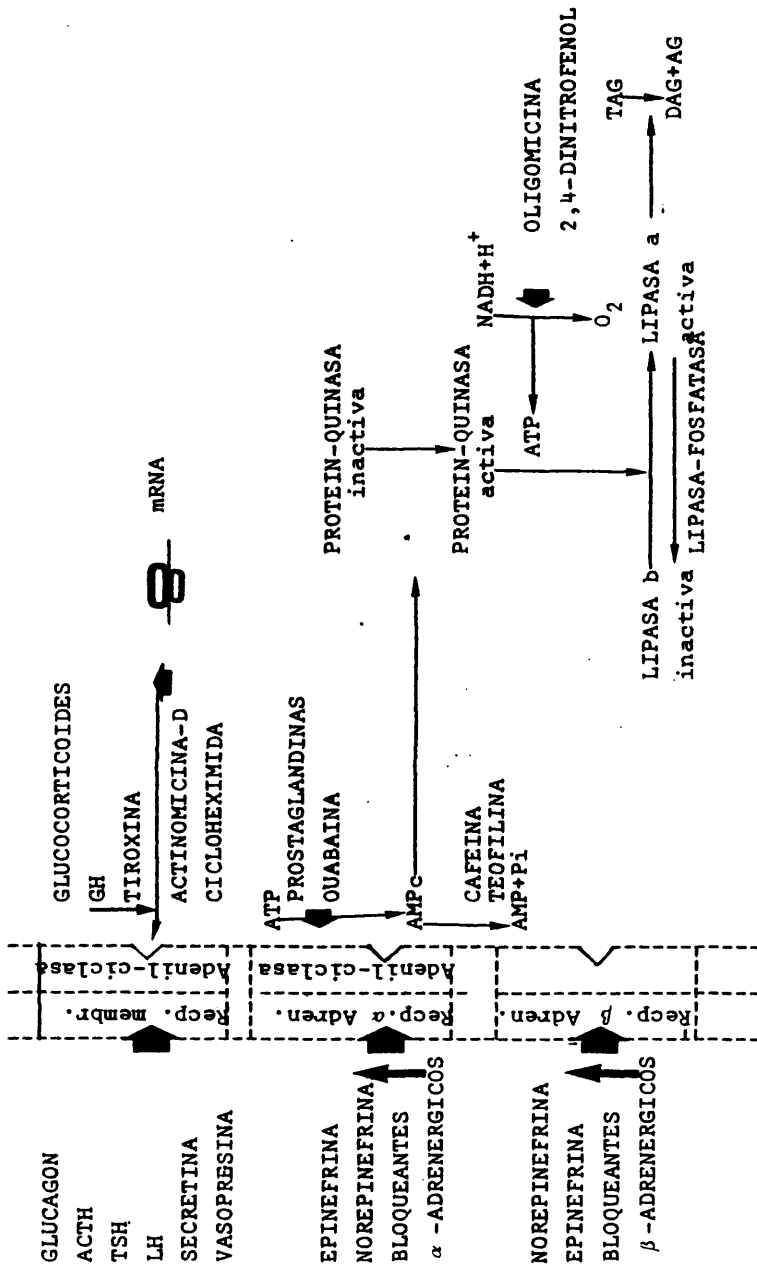


Fig. 4: ESQUEMA DE LA ACCION DE HORMONAS, METABOLITOS Y AGENTES QUIMICOS SOBRE EL PROCESO LIPOLITICO.

I.9.3.- ACCION LIPOLITICA DE LAS CATECOLAMINAS

Las múltiples acciones de las catecolaminas, patentes en casi todos los sistemas se ejercen mediante un doble método de transporte a sus puntos de influencia:

- De manera sistemática, generalizada, a través de la sangre.
- De manera local, mediante la liberación "in situ" por las terminaciones axónicas de las neuronas catecolaminérgicas.

Las catecolaminas circulantes proceden en su casi totalidad de la médula suprarrenal; y ejercen sus efectos intracelulares mediante la interacción con los receptores de membrana del órgano diana utilizando el AMPc como segundo mensajero.

AHLQUIST en 1948 postuló la existencia de dos tipos de receptores, α y β , según el tipo de respuesta que producía su estimulación.

Según TURNER en 1976, los receptores α median las respuestas para las cuatro aminas simpatomiméticas comunes con el siguiente orden de preferencia: Epinefrina > Norepinefrina > Fenilefrina > Isoprenalina; mientras que los receptores β median la respuesta con el siguiente orden de respuesta: Isoprenalina > Epinefrina > Norepinefrina > Fenilefrina.

WENKE en 1970 estudió la lipólisis inducida por E, NE, e ISO encontrando que aunque poseen distintas potencialidades α y β producen el mismo efecto lipolítico máximo sobre el tejido a diposo de rata.

En tejido adiposo, GORDON y CHERKES en 1958, y WHITE y ENGEL en 1958, encontraron que tanto la E como la NE incrementan la liberación de AGL desde este tejido y que esta acción se debía realizar mediante una TAG-lipasa.

BUTCHER y cols. (1965) encontraron que existía una relación directa entre la concentración de E y los niveles de AMPc en te jido adiposo epididimal.

En cuanto a la acción de las catecolaminas como neurotransmi sores es de señalar que WERTHEINER y SHAPIRO en 1948 comprobaron que el estímulo de la neurotransmisión movilizaba las grasas; además se comprobó que la actividad del sistema nervioso autónomo es necesaria para el mantenimiento de los niveles plag máticos de AGL y su turnover como lo demuestra la acumulación grasa que se sigue a la administración de un agente bloqueante gangliónico como el hexametonio (HAVEL y GOLDFIEN, 1959).

CORRELL en 1961 estudió la estimulación eléctrica del nervio aferente a un trozo de grasa epididimal incubada y vio que se estimulaba fuertemente la liberación de AGL.

EULER (1956) concluyó que el mediador químico liberado en el nervio simpático postganglionar era la Norepinefrina.

I.9.4.- ACCION LIPOLITICA DE LA SEROTONINA

Según ROBINSON, SHUTERLAND y BUTCHER, en 1971, la serotonina tendría en los invertebrados una función semejante a la de las catecolaminas en los organismos superiores. Así uno de sus efectos (la estimulación de la glicolisis en la Fasciola hepática) está claramente mediado por el AMPc (MANSOUR, 1967). Dicha acción se ejerce mediante la activación de la fosfofructoquinasa.

Otros dos efectos de la serotonina que parecen realizarse a través del AMPc son la estimulación del transporte de Na⁺ en músculo de rana (SAYOC y LITTLE, 1967; BABA y cols., 1967); y la estimulación de la secreción salival en insectos (BERRIDGE y PATEL, 1968).

No existe evidencia clara de que la serotonina actúe en los vertebrados a través del AMPc. Aún no se ha demostrado una relación entre la serotonina y un aumento en los niveles de AMPc, salvo en cerebro (KAKIUCHI y RALL, 1968; SHIMIZU y cols., 1970) en donde demostraron una acción de la serotonina que provocaba un incremento en los niveles de AMPc neuronales, aunque se desconoce el mecanismo de este aumento.

En otros tejidos existen datos de indudable interés en cuanto a los mecanismos de acción de la serotonina a nivel intracelular. LEOVITZ, en 1970, encontró que la serotonina, al igual que la epinefrina, inhibe en el hamster la liberación de insulina por el páncreas, no sólo en respuesta a la glucosa, sino en respuesta al dibutiril-AMPC ("in vitro").

Este trabajo creó una controversia en torno a la acción de la serotonina sobre páncreas. TAMARIT y cols. (1973) aportaron una serie de experimentos que clarificaron notablemente los aspectos principales de la acción de la serotonina sobre la secreción de insulina:

- 1.- Los niveles de serotonina en suero de diabéticos (240 ngr/ml.) son sensiblemente mayores que en los controles.
- 2.- Los niveles de insulina en suero de animales tratados con glucosa más serotonina fueron más bajos que los observados en animales que sólo habían recibido glucosa.
- 3.- En la perfusión de páncreas con glucosa + serotonina observaron un primer pico normal de liberación de insulina, mientras que estuvo ausente el segundo pico.

Es un hecho bien conocido y estudiado por numerosos autores la similitud existente entre los efectos excitantes de la serotonina y catecolaminas en músculo liso, incluyendo una tendencia a interaccionar con los mismos receptores.

LEBOVITZ, demostró que la phentolamina bloquea el efecto inhibitorio de ambas aminas (serotonina y catecolaminas) en la liberación de insulina. Sin embargo, el efecto de la serotonina puede ser antagonizado selectivamente por la metisergida. Esto sugiere la diferenciación de receptores para ambas sustancias.

En cuanto a la acción de la serotonina sobre tejido adiposo al igual que la epinefrina, glucagón y ACTH, estimula la actividad de la glucógeno-fosforilasa en dicho tejido (VAUGHAN, 1960).

La acción de la serotonina estimulando la fosforilasa, contrasta con el hecho de que, si bien las otras hormonas que provocan en tejido adiposo la activación de la glucógeno-fosforilasa, producen paralelamente una movilización de AGL, ésto no se ha encontrado para la serotonina (STEINBERG, 1964).

Existe una disociación en la acción de la serotonina en cuanto que causa una activación de la fosforilasa, mientras que el incremento de la lipólisis lo produce sólo a muy elevadas concentraciones (STEINBERG, 1964).

Efectivamente a concentraciones de serotonina tan altas como 10^{-3} M se produce un importante incremento en la actividad fosforilasa, mientras que sólo se produce un pequeño efecto lipolítico (VAUGHAN, 1960; VAUGHAN y BARCHAS, 1966; STEINBERG, 1964).

1964).

Sin embargo es de reseñar que no parece ser la vía del AMPc la única vía posible para la activación de la fosforilasa-quinasa. Así, KHOO en 1975, encontró que existe una activación de la fosforilasa-quinasa de tejido adiposo dependiente del ión Ca^{++} .

Por último BIECK y cols. (1966), proponen que la inactividad de la serotonina a dosis fisiológicas sobre el sistema lipolítico es debida a la inactivación de la 5-OH-Triptamina por acción de la MAO y, realizaron experimentos con pargilina (inhibidor de la MAO) y/o teofilina, en trozos de tejido adiposo incubado. De este trabajo derivan fundamentalmente los actuales conocimientos sobre la acción lipolítica de la serotonina. En este trabajo se estudia la acción de la 5-HT en concentraciones entre 10^{-6} - 10^{-3} M. Los resultados obtenidos son:

- Cuando utilizaron sólo serotonina, el resultado hasta 10^{-4} M. se omite, mientras que entre 10^{-4} y 5×10^{-3} M. se produce, incluso en algunos puntos, una ligera esterificación (no significativa), pero en ningún momento lipolisis.
- Cuando utilizaron pargilina, se produce lipolisis a alta concentración de 5-HT (máxima a 5×10^{-4} M.), mientras que no existe prácticamente lipolisis a dosis fisiológicas. A dosis superior

res (5×10^{-3} M.) se produce una pequeñísima esterificación.

- La adición de teofilina o de teofilina + pargilina produce un máximo de lipólisis a 5×10^{-5} M., y un descenso de ésta tanto con el aumento como con el descenso de las concentraciones de serotonina, llegando en los extremos a producirse esterificación.

I.9.5.- HORMONAS QUE ACTUAN ACTIVANDO LA SINTESIS PROTEICA

Estas hormonas actúan activando la síntesis proteica de la adenyl-ciclasa, de forma que se incrementa la velocidad de transformación de ATP en AMPc. Se puede observar que aunque la vía de actuación es a través del AMPc, el proceso es marcadamente distinto del seguido por las hormonas que actúan sobre los receptores de membrana.

Las principales hormonas conocidas que actúan siguiendo este mecanismo son: Tiroxina, GH y Glucocorticoides.

La GH (hormona estimuladora del crecimiento) es un polipéptido sintetizado en la adenohipófisis. Regula el crecimiento y desarrollo (sobre todo en la infancia). RABEN y HOLLENBERG (1969) descubrieron que la administración intravenosa de GH en ratas, provocaba un incremento en la concentración de AGL en sangre.

La tiroxina (triyodotironina) es elaborada por la glándula tiroides. Su acción sobre el metabolismo general es bien conocida. DEBONS y SCHWARTZ, en 1961, describieron que la grasa obtenida de ratas hipertiroideas era más sensible a la acción de hormonas lipolíticas que la grasa de animales normo e hipotiroideos.

Los glucocorticoides son esteroides derivados del pregnano, de 21 átomos de carbono. El principal glucocorticoide en el ser humano es el cortisol, en tanto que en los roedores es la corticosterona. JEANRENAUD y RENOLD, en 1960, demostraron la acción estimuladora de los glucocorticoides en el proceso lipolítico.

I.9.6.- SUSTANCIAS QUE INHIBEN LA SINTESIS PROTEICA

Entre las sustancias que actúan bloqueando dicha síntesis en general, se encuentran la Actinomicina-D y la Cicloheximida. Ambas actúan en el proceso lipolítico bloqueando la síntesis proteica de la adenyl-ciclase.

I.9.7. SUSTANCIAS QUE ACTUAN A NIVEL DE LA ADENYL-CICLASA

STOCK y cols. (1968), estudiaron la acción antilipolítica de la prostaglandina E₁, y descubrieron que antagoniza competitivamente

mente las acciones de la norepinefrina y ACTH.

HO y cols. (1967), descubrieron asimismo la acción antilipolítica de la ouabaina (agente inhibidor específico de la bomba $\text{Na}^+ - \text{K}^+$).

I.9.8.- INHIBIDORES DEL CATABOLISMO DEL AMPc

VAUGHAN y STEINBERG, en 1963, encontraron una actuación sinérgica de las metilxantinas (cafeína y teofilina) con la acción de las catecolaminas. Ello se debe a que las metilxantinas ejercen su función evitando la degradación del AMPc mediante la inhibición de la enzima fosfodiesterasa, (aunque no pueden provocar un incremento directo de los niveles de AMPc).

I.9.9.- AGENTES DESACOPLANTES DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA

El proceso lipolítico requiere energía en forma de ATP a dos niveles (síntesis de AMPc y fosforilación de la lipasa).

Los agentes capaces de desacoplar el proceso de fosforilación oxidativa en el cual se sintetiza ATP, bloquean a su vez el proceso lipolítico (FASSINA, 1957). Entre estos agentes se encuentran la oligomicina y el 2-4-dinitrofenol.

I.9.10.- HORMONAS PEPTIDICAS QUE ACTUAN A NIVEL DE RECEPTOR DE MEMBRANA PLASMATICA

El Glucagón, ACTH, TSH, LH, Oxitocina y Vasopresina, son hormonas que actúan a nivel del receptor de membrana provocando la estimulación de la adenil-ciclasa.

La ACTH (hormona adenocorticotropa) es secretada por la adenohipófisis y estimula la actividad metabólica de la corteza adrenal. Estructuralmente se trata de un polipéptido de 39 aminoácidos, de los cuales los 24 primeros son comunes para todas las especies, siendo los 15 restantes variables de unas especies a otras. Su acción facilitadora del proceso lipolítico fué descrita por WHITE y ENGEL (1958) y HOLLENBERG y cols. (1962).

La TSH (hormona tirotrópica) y la LH (hormona luteinizante) son asimismo secretadas por la adenohipófisis. Tienen respectivamente como funciones la estimulación de la glándula tiroidea y del "cuerpo lúteo" (entre otras). WHITE y ENGEL, en 1958 y FREINKEL en 1961, demostraron la función estimuladora de la TSH en la lipólisis. BUTCHER y cols. (1968) demostraron la estimulación provocada por la LH en la lipólisis.

La neurohipófisis de los mamíferos secreta los nonapéptidos Oxitocina y Vasopresina. La primera determina la contracción de la musculatura lisa y la eyección de leche en las hembras lac-

tantes, en tanto que la vasopresina ejerce acciones presoras y antidiuréticas. Ambas hormonas son polipéptidos idénticos salvo en los aminoácidos de las posiciones 3 y 8. VAUGHAN (1964), WHITE y ENGEL (1958) demostraron la acción mediadora de la vasopresina en el proceso lipolítico. CARLSON (1966) demostró el mismo efecto para la oxitocina.

El glucagón, producido por las células alfa de los islotes de LANGERHANS del páncreas, tiene un efecto hipergluceante, al acelerar la glucogenolisis hepática por la reactivación de la fosforilasa hepática desde una forma inactiva al aumentar la producción de AMPc. HAGEN (1961) demostró la función estimuladora del glucagón en el proceso lipolítico.

I.9.11.- ACCION DE LA INSULINA

La insulina actúa sobre el tejido adiposo antagonizando la acción liberadora de AG que ejerce la epinefrina (GORDON y CHERKES, 1958). Esta actividad antilipolítica de la insulina se lleva a cabo mediante la disminución de los niveles de AMPc (BUTCHER y cols., 1968).

El mecanismo que hace posible este descenso no es aún conocido aunque se cree que lo hace bloqueando la activación de la adenilciclase, si bien también se ha sugerido una activación de la

fosfodiesterasa (APPLEMAN y cols., 1973).

El efecto antilipolítico de la insulina parece no ser un hecho constante. Así, en presencia de glucosa no se produce tal efecto (HALL y BALL, 1970). Además el efecto antilipolítico de la insulina se torna en activador de la lipólisis cuando aumenta la concentración de epinefrina o de insulina (DESAI y cols., 1973).

En cuanto a su efecto sobre la composición del tejido adiposo en ácidos grasos, GELLHORN y BENJAMIN en 1965 encontraron que la insulina "in vivo" promueve un incremento en la biosíntesis de ácidos grasos monoinsaturados (16:1 y 18:1), lo cual es acorde con los resultados de CHERNIK en 1951 y WIELAND en 1963, que encontraron un descenso en la síntesis "in vitro" de ácidos grasos monoenoicos en diabetes inducida por alloxana. En tejido adiposo de ratas diabéticas se produce un descenso en la síntesis de oleico a partir de esteárico; sin embargo, la insulina restaura la síntesis (GELLHORN y BENJAMIN, 1965).

Las diferencias en composición en ácidos grasos del tejido adiposo de ratas diabéticas y normales pueden explicarse sólo parcialmente por los hechos referidos anteriormente, puesto que el notable incremento en la proporción de ácido linoleico (ácido graso esencial) que se produce en diabéticos no parece que pueda ser debido a un mecanismo de decrecimiento en la biosíntesis de ácidos monoenoicos.

Además HOLLENBERG y ANGEL (1963) encontraron que la esterificación promovida por la insulina es mayor para los ácidos grasos más cortos (16 C), y dentro de los de la misma longitud de cadena para los más insaturados.

12

II.- MATERIAL Y METODOS

II.1.- EXPERIMENTOS "IN VIVO"

En el curso de estos experimentos hemos valorado la composición en AG de los TAG de tejido adiposo y de AG totales de suero en ratas sometidas a distintas situaciones experimentales, como son el ayuno, la inyección de dosis de 5-HT o cambios en la composición de la dieta.

II.1.1.- OBTENCION DE TEJIDOS Y SUEROS

Tomamos grupos de ratas machos de raza Wistar de nuestra colonia, de 250-300 g . de peso, sometidas a ayuno prolongado, con o sin tratamiento con 5-HT en una dosis de 50 ug . diaria inyecta da intraperitonealmente. Durante el ayuno dispusieron en todo momento de agua.

A los 4 y 8 días se tomaron las muestras de sangre (4 cc.) por punción directa en el corazón, y de tejido adiposo epididimal.

II.1.2.- ANALISIS DE LA COMPOSICION DE LOS ACIDOS GRASOS DEL SUE

RO

Este análisis se realiza mediante las siguientes operaciones:

1.- Extracción de los lípidos del suero.

- 2.- Obtención de los ésteres metílicos de los AG, por transesterificación.
- 3.- Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los AG.

II.1.2.a. Extracción de los lípidos del suero

La sangre obtenida es centrifugada a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos y tomamos 1 ml. del suero sobrenadante. A continuación extraemos los lípidos totales mediante la técnica de FOLCH (1951) de la siguiente forma:

Se deposita 1 ml. de suero en tubo de extracción y se añaden 20 ml. de cloroformo-metanol (2:1). Tras agitar durante 2 minutos en agitador mecánico se deja reposar a temperatura ambiente durante una noche. Posteriormente añadimos 6 ml. de una disolución de ClNa al 8% en agua destilada y se agita mecánicamente durante 2 minutos. Se produce la separación en dos fases que es acelerada mediante centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos, obteniéndose así una fase superior (agua + metanol) una interfase proteica en forma de banda sólida, y una fase inferior, clorofórmica, que contiene todos los lípidos del suero (fosfolípidos, colesterol, acilglicéridos, ácidos grasos libres y ésteres de colesterol).

La fase superior es desechada mediante extracción con pipeta

Pasteur unida a trompa de vacío. Sólo una parte de la interfase puede ser arrastrada por la acción del vacío; para eliminar totalmente la interfase proteica y desecar al mismo tiempo la fase clorofórmica se procede a la adición al tubo de extracción de SO_4Na_2 anhidro y se agita mecánicamente durante 2 minutos dejando reposar a continuación. Se añade el patrón interno para el análisis cuantitativo (ácido heptadecanoico de Sigma). Tras repetir la operación de agitación se procede a centrifugar durante 10 minutos a 4.000 r.p.m., quedando en el fondo del tubo el sulfato sódico hidratado más la interfase proteica en forma sólida, y como sobrenadante la fase clorofórmica conteniendo los lípidos del suero más el patrón interno (17:0).

La fase clorofórmica se decanta en una columna de 15 x 1 cm. en cuyo fondo se pone lana de vidrio con objeto de filtrar partículas proteicas o de sulfato sódico que sean arrastradas. La fase clorofórmica se recoge en tubos de metanolisis de diámetro inferior 1,5 cm. y grueso de pared 2 mm. con una longitud superior a los 15 cm. (al objeto de evitar la inflamación de los gases durante la operación de cierre). A continuación se procede a la evaporación de disolvente bajo atmósfera de nitrógeno (N_2) en baño de arena a 25 °C. Una vez evaporado todo el disolvente se procede a realizar la transmetilación.

II.1.2.b.- Obtención de los ésteres metílicos de los AG del suero.

La metilación de los AG totales del suero se realizó mediante transmetilación, utilizando la técnica de METCALFE y cols. (1961).

A los lípidos secos obtenidos en II.1.2.a. en tubos de metanolisis se añaden 1,2 ml. de reactivo de metilación cuya composición es Metanol-B F₃, Metanol 14% : Benceno (10:10:9).

Los tubos son introducidos en baños de hielo, gaseados con nitrógeno y cerrados con parafilm. A continuación se cierran los tubos a la llama utilizando soplete, y tras retirarlos del baño de hielo se introducen en una estufa a 110 °C donde permanecen 1 hora y 30 minutos.

Transcurrido este tiempo se sacan de la estufa y se introducen en un baño de hielo procediendo a su apertura, que se realiza cortando la parte superior del tubo mediante un cortador de vidrio de acero "Vidia". Una vez abiertos los tubos se procede a la extracción de los ésteres metílicos que se realiza en los mismos tubos de metanolisis de la siguiente forma:

A 1 volumen de la solución de ésteres metílicos se añaden 2 volúmenes de hexano y 1 volumen de agua destilada. Se agita mecáni

camente durante 2 minutos y la mezcla se transfiere a un tubo de extracción. Se centrifuga durante 5 minutos a 3.000 r.p.m. y se extrae la fase superior (hexano + ésteres metílicos) y se transfiere a otro tubo. Los restos del tubo de metanolisis se recuperan con 2 volúmenes de hexano y se añaden a la fase inferior que aún conservamos, repitiendo la centrifugación y volviendo a obtener la fase superior (hexano) que se junta al obtenido en la primera extracción.

El siguiente proceso es la preparación para la inyección de la mezcla de ésteres metílicos en el cromatógrafo de gases, para ello es preciso desecar totalmente la disolución utilizando sulfato sódico anhidro, y tras una filtración se transfiere la disolución a un tubo de fondo cónico donde se concentra a sequedad bajo atmósfera de N₂ en baño de arena. Se añade hexano quedando la muestra preparada para su inyección en el cromatógrafo de gases.

II.1.2.c.- Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los AG

La técnica cromatográfica se fundamenta en el distinto coeficiente de reparto que poseen diferentes sustancias en un sistema bifásico. De las diferentes formas de cromatografía la que alcanza el más alto grado de complejidad tecnológica es la cromatografía gas-líquido (CGL), en la cual el sistema bifásico está

constituido por:

- 1.- Fase líquida (que es la fase estacionaria). Ejerce una distinta retención para las diferentes sustancias que constituyen la mezcla a analizar.
- 2.- Fase gaseosa (que es la fase móvil). Ejerce una función de arrastre indiscriminante para los distintos elementos componentes de la mezcla a analizar.

La fase estacionaria se encuentra impregnando un soporte que, necesariamente, debe ser químicamente inerte e incapaz de retener de forma discriminatoria las sustancias en estudio.

El soporte, impregnado de fase estacionaria, constituye el llamado "relleno" de la columna, y se encuentra en el interior de la misma, compactado a lo largo de toda su longitud. La columna debe ser de un material inerte (metálica o de vidrio). En nuestro laboratorio utilizamos normalmente columnas de vidrio.

La columna se encuentra dentro de un horno a la temperatura adecuada, dependiendo del punto de ebullición de la sustancia que se trate de analizar, y teniendo como factor limitante el punto de ebullición de la fase estacionaria.

Los dos extremos de la columna se encuentran conectados respectivamente

tivamente a:

- 1.- El inyector, por donde se introduce el gas portador (fase móvil) y por donde, también se inyecta la mezcla a analizar.
- 2.- El detector, que para la valoración de AGL, es un detector de ionización de llama (FID), cuyo funcionamiento se basa en la ionización que se produce en la parte externa de una llama producida por combustión de gas H_2 , durante el proceso de oxidación de determinados radicales orgánicos ($-CH_2-$, $-CH=$, y con muy poca contribución $-COOH$).

Dicha ionización, producida por la llegada de una sustancia a la llama es función de su masa para sustancias con la misma es estructura química.

La respuesta producida en el detector es amplificada y recogida gráficamente en forma de pico cromatográfico, puesto que la salida de la masa es teóricamente gaussiana.

De la disolución de ésteres metílicos en hexano se procede a la inyección en la columna cromatográfica de una alícuota de 2 ul. utilizando una microjeringa Hamilton.

Para la realización de la cromatografía gas-líquido utilizamos un cromatógrafo Packard compuesto de los módulos modelo 804 (hor

no), 824 (control de flujos), 847 (programador de temperatura) 873 (control de temperatura) 878 (electrómetros) y registro gráfico.

Las características de la cromatografía para ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron las siguientes:

- Columna: de vidrio, 3 m. de longitud, diámetro interno de 2 mm.
- Relleno: dietilenglicolsuccinato al 10% (DEGS 10%) sobre Cromosorb W (80-100 mallas).
- Gases: H₂, con un flujo de 40 ml/min; aire, con un flujo de 400 ml./min.; gas portador (N₂), con un flujo de 40 ml/min.
- Temperaturas: Detector, 200 °C; Inyector, 200 °C; horno (columna), la temperatura fué programada no linealmente entre 180 y 200 °C.
- Tiempos de retención: Fueron calculados utilizando patrones puros de ésteres metílicos de Sigma (calidad para cromatografía de gases, pureza 99%), obteniéndose los siguientes valores; (Tabla V).

TABLA V

ESTER METILICO DEL ACIDO GRASO		TIEMPO DE RETENCION
Disolvente	hexano	1 min.
14:0	mirístico	10 min.
16:0	palmitico	20 min.
16:1	palmitoleico	22 min.
17:0	heptadecanoico	26 min.
18:0	esteárico	33 min.
18:1	oleico	35 min.
18:2	linoleico	40 min.
18:3	linolénico	47 min.
20:4	araquidónico	65 min.

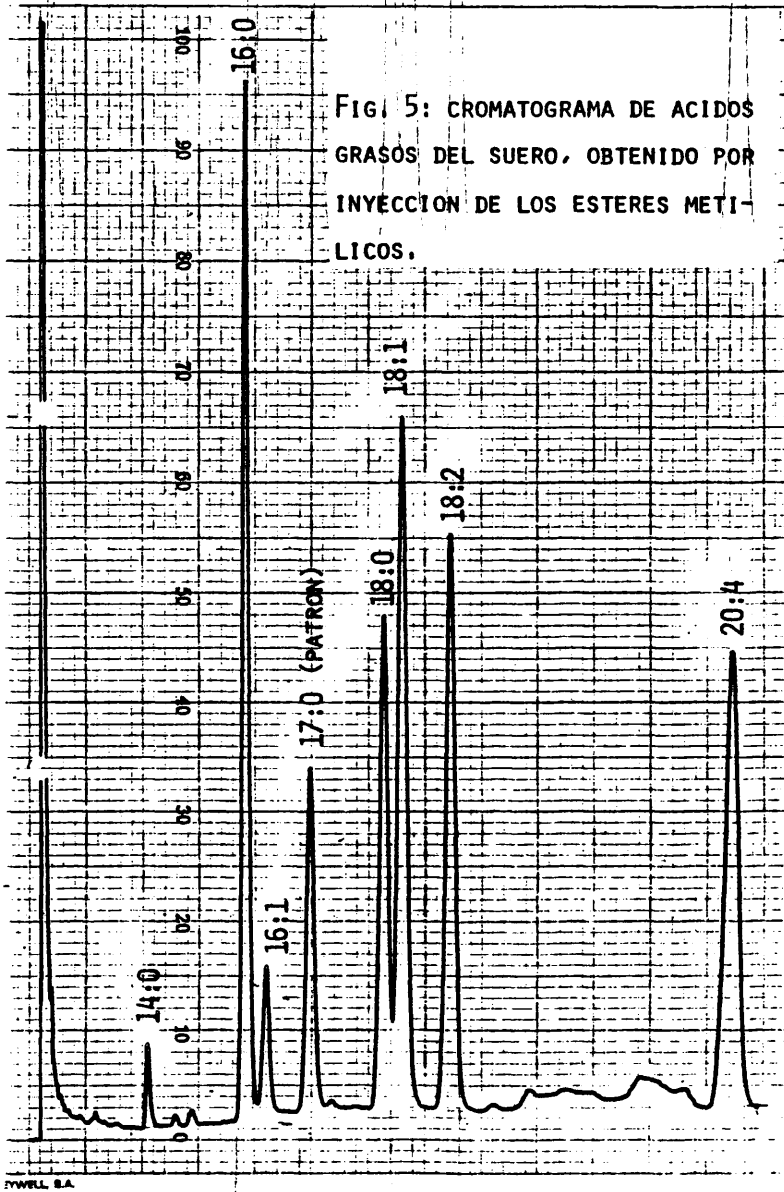
Fueron obtenidos como ácidos grasos mayoritarios los siguientes: 14:0 (mirístico), 16:0 (palmítico), 16:1 (palmitoleico), 18:0 (estearico); 18:1 (oleico), 18:2 (linoleico) y 20:4 (aracídico), como podemos comprobar en la figura 5 donde se expone un cromatograma correspondiente a AG de suero de rata obtenido en estas condiciones.

II.1.3.- ANALISIS DE LA COMPOSICION DE LOS AG DE TEJIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL

Para realizar el análisis de la composición de los ácidos grasos de tejido se procede a las siguientes operaciones:

- 1.- Homogeneización de trozos de tejido y extracción de los lípidos totales.
- 2.- Obtención de los TAG.
- 3.- Obtención de los ésteres metílicos de los AG procedentes de TAG.
- 4.- Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos de los AG.

82 Gis



II.1.3.a.- Homogeneización del tejido y extracción de los lípidos totales

Del tejido adiposo epididimal obtenido se tomaron 20 mg., pesados en balanza, y se extrajeron los lípidos con 5 ml. de cloroformo-metanol (2:1) en un homogeneizador de tejidos 4 veces (volumen total de cloroformo-metanol = 20 ml.).

El homogeneizado fué recogido en tubos de extracción y se añadieron 6 ml. de cloruro sódico al 0,8%; tras agitar mecánicamente durante 2 minutos se centrifuga a 4.000 r.p.m., de esta manera se obtiene una fase superior (agua + metanol), una interfase proteica, y una fase inferior (clorofórmica) donde se encuentran disueltos los lípidos del tejido adiposo.

La fase superior se desecha mediante pipeta Pasteur unida a trompa de vacío, y a continuación se procede simultáneamente a la eliminación de la interfase proteica y la desecación de la fase clorofórmica. Esta operación se realiza adicionando sulfato sódico anhidro y tras agitar 2 minutos mecánicamente se procede a la centrifugación a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos. Se obtiene un sedimento (sulfato sódico + proteína) y una fase sobrenadante constituida por los lípidos disueltos en cloroformo.

Se decanta y filtra sobre lana de vidrio, recogiendo la fase clorofórmica en viales de vidrio donde se va a concentrar

el material lipídico por evaporación del disolvente en baño de arena bajo atmósfera de nitrógeno.

II.1.3.b.- Obtención de los TAG del tejido

Los lípidos disueltos en cloroformo son llevados a sequedad total y se añaden 0,5 ml. de cloroformo-metanol (2:1) para redisolverlo.

La obtención de los triacilglicéridos se realiza mediante fraccionamiento por cromatografía en capa fina monodimensional. Se utilizan placas de vidrio de 20 x 20 cm., y la extensión del adsorbente se realiza mediante un extendedor Shandon modelo Unoplan.

El adsorbente empleado fué sílica-gel-PF 254 de Merck y el espesor de la placa fué de 50 u. La suspensión de sílica-gel se hizo inmediatamente antes de la extensión conforme a las siguientes proporciones: 60 g. de sílica-gel/126 cc. de agua destilada (1:2,1 P/V).

Una vez realizada la extensión se deja 5 minutos a temperatura ambiente y luego se introduce la placa en una estufa durante 1 hora a 110 °C, dejándose enfriar la placa después.

El desarrollo cromatográfico se realiza en cámaras Shandon, cuya superficies internas se tapizan con papel de filtro, al objeto de saturar la atmósfera con la fase móvil. Como fase móvil se emplea el siguiente sistema disolvente: n-hexano/eter etílico/ácido acético (80:20:1 V/V/V), siendo todos éstos productos de Merck. Para cada cámara se utilizan unos 60 cc. de fase móvil.

La muestra se deposita en una sola banda lineal mediante aplicador, en una extensión de 16 cm., dejando un margen de 2 cm. en los extremos.

El desarrollo de las cromatografías se realiza a temperatura ambiente y, una vez que el frente de la fase móvil alcanza el extremo superior de la placa se saca ésta de la cámara y se deja en el interior de la campana de extracción hasta la evaporación total de los disolventes.

La detección de las diferentes bandas se realiza mediante observación de la placa bajo luz ultravioleta en el interior de una cámara oscura, siendo la distribución de las bandas como se representa en la figura de la página 102.

La banda correspondiente a los triacilglicéridos se señala mediante un punzón y a continuación se raspa y se introduce el silicagel adsorbente con los triacilglicéridos en tubos de

metanolisis. Es en este momento cuando se adiciona el patrón interno para la cromatografía gas-líquido (ácido heptadecanoico).

II.1.3.c.- Obtención de los ésteres metílicos de los AG de la fracción TAG de tejido adiposo

La obtención de los ésteres metílicos no difiere en este caso de la que hemos visto en II.1.2.b. puesto que la transmetilación se puede realizar también en presencia del adsorbente (silicagel PF 254).

En este caso se procede de forma similar añadiendo 5 ml. del reactivo de metilación y procediendo a continuación a cerrar el tubo a la llama, introducido en baño de hielo.

Transcurrido el tiempo de metilación (1 hora 30 minutos) se procede a la extracción, que esta vez se realiza en el propio tubo de metilación, quedando como fase superior hexano que disuelve a los ésteres metílicos. Tras la desecación, filtrado y evaporación los ésteres metílicos están ya preparados para su inyección en el cromatógrafo de gases.

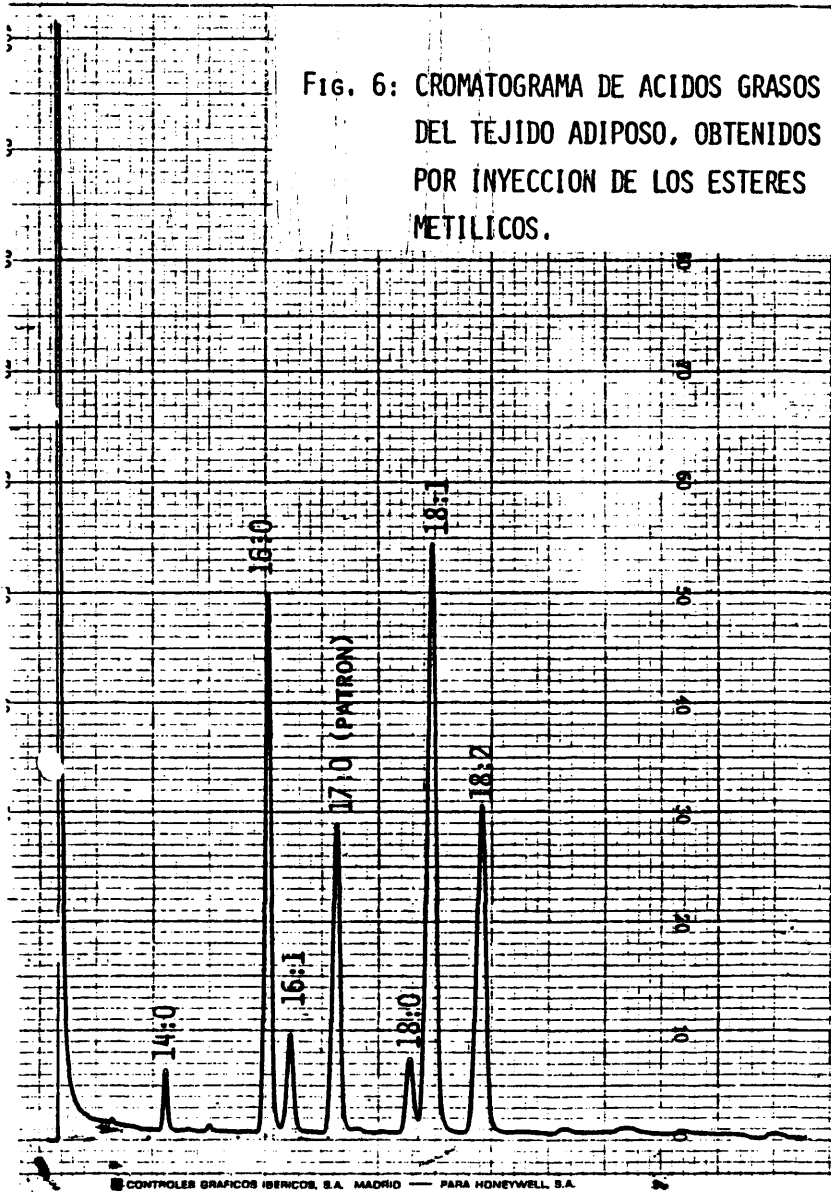
II.1.3.d.- Cromatografía gas-líquido de los ésteres metílicos

Los ésteres metílicos de ácidos grasos de la fracción TAG del tejido adiposo son inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas que han sido descritas en II.1.2.c.

Los ácidos grasos mayoritarios en tejido son los siguientes: mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1) y linoleico (18:2).

Como podemos observar el perfil cromatográfico del tejido difiere del que corresponde a suero, puesto que el ácido araquidónico (20:4), de gran importancia cuantitativa en suero, no aparece en cantidades apreciables en el tejido. En la figura 6 se expone un cromatograma correspondiente a ácidos grasos de la fracción TAG de tejido adiposo realizado en las condiciones descritas.

Fig. 6: CROMATOGRAMA DE ACIDOS GRASOS DEL TEJIDO ADIPOSO, OBTENIDOS POR INYECCION DE LOS ESTERES METILICOS.



II.2.- EXPERIMENTOS "IN VITRO" CON INCUBACION DE ADIPOCITOS

En este grupo de experimentos se utilizan una serie de técnicas dirigidas a valorar la composición de los AGL liberados por los adipocitos así como de los ácidos grasos de las fracciones DAG y TAG y de los AGL no liberados al medio.

Estas técnicas se pueden agrupar en las siguientes:

- 1.- Obtención de adipocitos.
- 2.- Incubación de adipocitos.
- 3.- Extracción y análisis de ácidos grasos liberados al medio.
- 4.- Extracción y análisis de los AGL, y ácidos grasos de los DAG del interior de los adipocitos.

II.2.1.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE ADIPOCITOS

Los adipocitos proceden del tejido graso epididimal de ratas Wistar, machos, alimentadas normalmente y de peso comprendido entre 250-300 gr. Las ratas fueron muertas por guillotinado e inmediatamente fué extraído quirúrgicamente el tejido graso de ampos epidídimos, para proceder al aislamiento de los adipocitos mediante la técnica modificada de RODBELL (1964).

En un primer paso se lavó el tejido graso en una bandeja con Krebs a 37 °C, con objeto de eliminar los restos sanguíneos.

En todo momento el tejido graso estuvo en contacto con una solución fisiológica tamponada, a 37 °C de temperatura, con el objeto de mantener "in vitro" las condiciones metabólico-fisiológicas adecuadas al tejido. Esta solución tampón fue el Krebs-bicarbonato, ajustado a pH 7,4 mediante gaseado con carbógeno (O₂/CO₂ 95:5 V/V).

A continuación se procedió a la digestión del tejido por acción del enzima Colagenasa para provocar la ruptura altamente específica del tejido colágeno, lo que conduce a la liberación de los adipocitos. Dicha digestión se realizó de la siguiente forma:

- Se introdujeron ambos epidídimos en un vial plástico con tampón de rosca en el cual previamente se había depositado 5 cc. de K-H a pH 7.4 + 10 mg. de colagenasa Worthington + albúmina fracción V de Sigma al 1% (50 mg.). Seguidamente se procedió a un gaseado del vial con carbógeno durante 1 minuto, con el objeto de saturar su atmósfera e inmediatamente fue cerrado con tapón de rosca y sellado con Parafilm.
- A continuación el vial fue introducido en un baño metabólico termostatzado a 37 °C y con una agitación de 100 golpes/mi-

nuto. El tiempo de incubación empleado fué de 30 minutos, en lo cual diferimos del método original de ROBBELL (1964) que es de 60 minutos. Esta modificación tiene por objeto el reducir el tiempo de exposición de los adipocitos ya liberados a la acción de la colagenasa.

Tras la digestión, el tejido graso epididímal, ha sido reducido a adipocitos aislados más una masa no digerida de tejido más restos capilares. Por ello se procede a la separación de los adipocitos aislados mediante filtro de seda que retiene los otros restos.

Posteriormente se procedió a lavar los adipocitos tres veces consecutivas con el fin de eliminar bien todos los restos de Colagenasa.

A continuación se procedió a la comprobación microscópica del estado de los adipocitos, según el siguiente método: a un tubo en el cual se habían depositado previamente 0.8 cc. de K-H + 0.1 cc. de Azul Tripán, se añadió 0.1 cc. de la muestra celular. Se sometió a agitación mecánica durante 10 segundos y se extrajo mediante micropipeta una alícuota de 10 ul., que se depositó en una cámara de Neubauer. Se llevó al microscopio, donde se procedió a su recuento aproximado (200 cel/campo) y se visualizaron los núcleos de los adipocitos, que se tiñen de azul cuando la célula mantiene intactas sus funciones meta-

bólicas.

II.2.2.- INCUBACION DE LOS ADIPOCITOS

La incubación de los adipocitos aislados se realizó en tubos de plástico con fondo cónico (tubos Beckman) de 1.4 cc. de volumen.

En los tubos control se depositaron mediante una pipeta automática 0,2 ml. de adipocitos + 0,05 ml. de Krebs-Hepes, cuya composición difiere del Krebs-Henseleit en que, en lugar de usar como sistema tampón el CO_2HNa /gas carbónico, se utiliza Hepes 20 mM + 1 ml. de albúmina al 5 % en Krebs-Hepes. La albúmina utilizada corresponde a la fracción V de Sigma, esencialmente libre de ácidos grasos cuyo contenido en ácidos grasos es de 0.005% de albúmina.

En los tubos que contienen la hormona se pusieron 0.2 cc. de adipocitos + 0.05 cc. de serotonina a una concentración de 0.05 ugr/cc. + 1 cc. de albúmina al 5 % en Krebs-Hepes.

La adición de la albúmina tiene como motivo el introducir en el medio de incubación de los adipocitos un factor capaz de recoger los ácidos grasos liberados al medio. El hecho de que utilizemos albúmina exenta de ácidos grasos tiene como motivo

el evitar la acción de ácidos grasos exógenos sobre el proceso de lipólisis-esterificación de las células adiposas.

Dichos tubos fueron incubados en un baño metabólico termostaticado (baño Kottermann, modelo Heron) a 37 °C y con una agitación de 60 golpes/minutos.

Al término de la incubación los tubos eran introducidos en una microfuga Beckman modelo B y sometidos a una velocidad aproximada de 20.000 r.p.m. durante un minuto. De esta forma se produjo una separación neta en dos fases debido a su diferencia de densidad. Los adipocitos quedaron en el sobrenadante y en la parte inferior el K-Hepes-Albúmina.

Inmediatamente se introdujeron en un cortador de tubos Beckman, modificado por el Servicio de Taller Mecánico de la Universidad Complutense, obteniendo por una lado la parte superior del tubo con los adipocitos + 0,25 cc. de K-Hepes-Albúmina y por otro lado la parte inferior que contiene 0.8 cc. de K-Hepes-Albúmina.

Seguidamente se procedió a la congelación de la fase superior del tubo.

Las dos fases obtenidas, tras el corte de los tubos van a seguir distintas vías de análisis:

1.- La fase inferior únicamente contiene una fracción lipídica, que son ácidos grasos libres unidos a la albúmina, y que son extraídos directamente y fraccionados por cromatografía gas-líquido.

2.- La parte superior del tubo contiene las siguientes fracciones lipídicas:

a) La fracción lipídica procedentes de los 2.5 cc. de medio con los que se extraen los adipocitos. Contiene ácidos grasos libres, ligados a la albúmina.

b) Las fracciones lipídicas procedentes de los adipocitos, que son las siguientes:

- Triacilglicéridos (TAG)
- Diacilglicéridos (DAG)
- Monoacilglicéridos (MAG)
- Ácidos grasos libres (AGL)
- Fosfolípidos

Estas fracciones son separadas mediante cromatografía en capa fina y posteriormente analizada su composición en ácidos grasos mediante cromatografía gas-líquido.

II.2.3.- EXTRACCION Y ANALISIS DE LOS ACIDOS GRASOS LIBRES (AGL)
LIBERADOS AL MEDIO.

Los ácidos grasos libres liberados al medio están unidos a la albúmina. La extracción de los mismos se realiza mediante la técnica de DOLE y MEINERTZ (1960):

En un tubo de extracción se pone 1 volumen del plasma + 5 volúmenes de mezcla de extracción de Dole (2 % de H₂SO₄ 1N + 78 % de alcohol isopropílico + 20 % de Heptano), se agita durante 1 minuto en agitador mecánico y a continuación se añaden 2 volúmenes de agua + 3 volúmenes de Heptano. Se agita mecánicamente de nuevo durante 1 minuto y se centrifuga a 3.000 r.p.m. en una centrifuga Orto, formándose 2 fases constituidas por:

28 % (H ₂ SO ₄ 0.03 N)	FASE INFERIOR
36 % (alcohol isopropílico)	...	FASE INFERIOR
36 % (heptano)	FASE SUPERIOR

Los AGL se reparten en este sistema bifásico según el coeficiente de reparto (r) y factor de recuperación relativo (f) cuyos valores se detallan en el cuadro siguiente, para aquellos ácidos grasos de interés en este trabajo.

ACIDO GRASO	r	f
14:0	8.50	0.96
16:0	11.00	1.00
17:0	12.20	1.01
18:0	13.60	1.02
20:0	14.50	1.03
16:1	9.35	0.97
18:1	10.75	0.99
18:2	10.30	0.99
20:4	9.30	0.97

$$f = \frac{r (4r_0 + 7)}{r_0(4r + 7)} = \frac{4.63 r}{4r + 7}$$

donde $r_0 = r$ del ácido palmítico = 11

Este sistema permite por lo tanto recuperar en la fase apolar (heptano) todos los ácidos grasos con un factor de recuperación relativo aproximadamente igual a 1, como se puede observar en la tabla precedente. El error de cálculo introducido es despreciable en la práctica.

En nuestro caso, procedemos a tratar el medio de incubación como si se tratase de una muestra de plasma, y tomamos los 0.8 cc. de volumen de medio de incubación, obtenido tras el corte del tubo, depositándolos en un tubo de extracción de bo-

ca esmerilada, añadiéndose después 1.2 ml. de agua destilada más 10 ug del patrón interno (ácido pentadecanoico o heptadecanoico según se utilice la cromatografía gas-líquido directa o con metilación).

Se sigue el método de Dole descrito anteriormente y, tras la separación en dos fases se recoge la fase superior, constituida por heptano que disuelve a los ácidos grasos libres, utilizando una pipeta Pasteur y procediendo a continuación a deshidratar con sulfato sódico anhidro. La muestra disuelta en heptano se dispone en un tubo de fondo cónico y ya está lista para su inyección en el cromatógrafo de gases cuando utilizamos el sistema de CGL por inyección directa de los ácidos grasos libres.

II.2.4.- EXTRACCION Y ANALISIS DE LOS AGL Y ACIDOS GRASOS DE LOS DAG DEL INTERIOR DE LOS ADIPOCITOS

Como ya hemos descrito en el punto II.2.2. la fase superior del tubo de incubación, una vez cortado, contiene ácidos grasos libres del medio, procedentes de los 2.5 cc. de medio contaminante. Además contiene las distintas fracciones lipídicas que constituyen la grasa del tejido adiposo, y de las cuales tiene especial interés para nosotros la fracción AGL y la fracción DAG.

Para analizar estas fracciones se procede a la extracción de los lípidos totales y su separación mediante cromatografía en capa fina.

Con objeto de provocar la ruptura de la membrana plasmática del adipocito y facilitar de esta forma la extracción de los lípidos que contiene en su interior la célula adiposa se procede a su descongelación, adición de 1 cc. de H₂O y sonicación en el mismo tubo, con objeto de no tener pérdidas de material. La sonicación se hizo durante 30 segundos en una sonicador MSE.

A continuación se extraen los lípidos totales por el método de FOLCH (1951): al material ya sonificado se añaden 20 cc. de cloroformo-metanol (2:1), agitando durante 2 minutos en agitador mecánico. Tras dejar reposar toda la noche se procede a la adición de 6 cc. de H₂O y tras una nueva agitación se procede a centrifugar a 3.000 r.p.m. durante 10 minutos obteniéndose dos fases:

- una superior polar (H₂O + metanol).
- una inferior apolar (cloroformo + lípidos totales),

quedando las proteínas constituyendo una interfase en forma de película. La fase superior se desecha mediante su extracción con pipeta Pasteur conectada a trompa de vacío. A la fase infe

rior, clorofórmica, que aún contiene agua residual, se añade sulfato sódico-anhidro y se agita mecánicamente durante 2 minutos. Se centrifuga, quedando el sulfato sódico hidratado + la película proteica en el fondo del tubo. La fase clorofórmica ya seca, se decanta sobre una columna en cuyo fondo depositamos lana de vidrio para filtrar, y la recogemos en tubos de vidrio de fondo cónico.

Posteriormente se evapora a sequedad bajo atmósfera de nitrógeno, en baño de arena. Seguidamente se añade 0.1 cc. de cloroformo-metano (2:1) y se somete a cromatografía en placa fina.

II.2.5.- METODO DE SEPARACION DE LIPIDOS NEUTROS POR CROMATO- GRAFIA EN PLACA FINA

El objeto de esta técnica es el de separar los lípidos polares (fosfolípidos) de los lípidos neutros (TAG, DAG, MAG y AGL), así como el de separar las distintas fracciones de estos últimos.

La cromatografía en placa fina realizada es monodimensional. Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm. y la extensión del adsorbente se realizó mediante un extendedor Shandon Unoplan. El adsorbente empleado fué el sílica-gel-G-60 de Merck

y el espesor de la placa fué de 600 u. La suspensión del silica-gel se hizo inmediatamente antes de la extensión y de acuerdo con la proporción siguiente: 50 g. de silica-gel/105 cc. de H₂O destilada (1:2,1 P/V). Una vez realizada la extensión se deja 5 minutos a temperatura ambiente y luego se introduce la placa en una estufa durante una hora a 110 °C, dejándose enfriar la placa después.

El desarrollo de las placas se realizó en cámaras Shandon, cuyas superficies internas se tapizaron con papel de filtro, con objeto de saturar la atmósfera con la fase móvil. Como fase móvil se empleó el siguiente sistema de solventes: N-Hexan/Eter etílico/ácido acético (80:20:1 V/V/V), siendo todos estos productos de Merck. Para cada cámara se utilizaron 60 cc. de fase móvil.

La muestra se depositó en una sola banda lineal mediante aplicador, en una extensión de 16 cm., dejando un margen de 2 cm. en los extremos. El desarrollo de las cromatografías se realizó a temperatura ambiente y una vez que el frente de la fase móvil alcanzó el extremo superior de la placa, se sacó ésta de la cámara y se dejó en el interior de la campana de extracción hasta la evaporación total de los disolventes.

Revelado: El revelado de las placas se hizo por pulverización de Rodamina-6-G de Merck, al 0,1 % en H₂O destilada (MANGOLD y cols., 1961).

Las diferentes bandas (que se corresponden con las distintas fracciones lipídicas) se manifiestan por un color rosa fuerte sobre el tono más débil del resto de la placa.

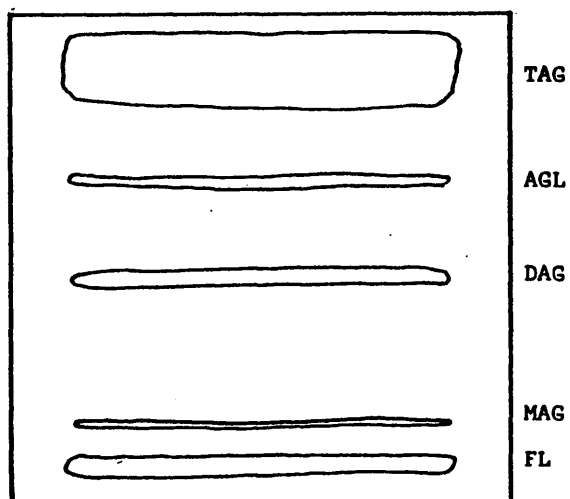
Al observar la placa bajo luz ultravioleta, en cámara oscura, se produce un mayor contraste entre las bandas y el resto de la placa.

El interés de la rodamina-6-G como agente revelador reside en que es un revelador universal de lípidos y que se caracteriza además por no afectar la estructura de los mismos (en particular la de sus ácidos grasos componentes), destrucción que sí ocurre con otros reveladores como el I₂.

La rodamina-6-G ha sido utilizada cuando la técnica empleada fué la de metilación de los ácidos grasos, pero cuando el proceso que se va a seguir no es el de metilación, se presentó el problema de qué tipo de disolvente arrastraría la rodamina en un sistema bifásico. La eliminación de la rodamina en base a que esta sustancia es muy soluble en medios polares y absolutamente insoluble en medios apolares. Por ello además es un re-

velador ideal en cuanto no produce interferencias de ningún tipo en el proceso analítico.

Mediante la utilización de patrones de TAG, DAG, MAG, AGL, colesterol y fosfolípidos de Sigma, se pudo observar que el orden de desarrollo de las distintas fracciones lipídicas de los adipocitos en este sistema es el siguiente:



De las bandas obtenidas se marcaron con un punzón las de TAG, DAG y AGL, se rasparon completamente con una espátula, se recogieron y se sometieron posteriormente a valoración mediante cromatografía gas-líquido (excepto en el caso de los TAG que fueron extraídos y pesados en balanza).

II.2.6.- ANÁLISIS DIRECTO POR CGL DE ACIDOS GRASOS

Desde que se introdujo la técnica de CGL en la analítica bioquímica y en particular en el análisis de ácidos grasos, se planteó la necesidad de realizar un previo proceso de transformación de los ácidos grasos en derivados (ésteres metílicos) por diversos motivos:

- a) Reducción de los puntos de ebullición.
- b) Eliminación del "tailing" ("encolamiento").

Es evidente que el motivo fundamental por el que no se ha llegado aún al análisis rutinario a nivel clínico de los ácidos grasos por CGL es debido a la complejidad, alto coste de material y reactivos y peligrosidad de los procesos de metilación.

Una de las vías que permitirían solucionar este problema es la consecución de una tecnología que permitiese la inyección directa de AGL.

De las motivaciones que condujeron a la introducción del proceso de metilación, la primera (reducción de los puntos de ebullición) no constituye una necesidad absoluta. Sin embargo, sí lo constituye la eliminación del "tailing", puesto que la cuantificación de los puntos cromatográficos está sometida a

errores importantes.

OTTENSTEIN y SUPINA (1974), realizaron una serie de experimentos utilizando distintos soportes y fases estacionarias con objeto de encontrar un sistema que permitiese la inyección directa de ácidos grasos sin formación de "tailing".

Sobre la formación del "tailing" se creyó durante mucho tiempo que era debida a la formación de dímeros de ácidos grasos (JAMES y MARTIN, 1952).

Otros estudios (KIRKLAND, 1963; OTTENSTEIN y BARTLEY, 1971), han permitido conocer que el "tailing" no es debido a la formación de dímeros, sino que se producen por interacción entre el ácido graso (concretamente su radical -COOH) y el soporte.

De los experimentos de OTTENSTEIN y SUPINA (1974) se pudo deducir que el sistema idóneo para la separación de ácidos grasos es el de Supelcoport lavado con ácido, tratado con DMCS (dimetil-cloro-silane) como soporte y DEGS-P (dietilenglicolsuccinato fosforilado) como fase estacionaria.

Su aplicación bioquímica y clínica ha sido desarrollada en nuestro Departamento durante los últimos años y permiten el análisis de los ácidos grasos de las distintas fracciones lipídicas por CGL, reduciendo notablemente los costes, el material

a emplear y anulando la peligrosidad de otros procesos (como el del diazometano o el sometimiento de disolventes orgánicos a altas temperaturas), cuya primera aplicación práctica está representada por la tecnología desarrollada para la valoración del proceso lipolítico en adipocitos aislados.

Esta técnica requiere únicamente una estufa, KOH-Etanol al 2 % y mezcla de extracción de Dole:

- Los ácidos grasos del medio de incubación disueltos en heptano contenidos en un tubo de fondo cónico son llevados a sequedad bajo atmósfera de N_2 , en baño de arena y en campana de extracción. A continuación se lavan las paredes con 0,1 cc. de hexano y se continúa la evaporación hasta dejar un volumen de, aproximadamente, 20 ul., y se inyecta directamente una alícuota de 6 ul. en el cromatógrafo de gases (se ha evitado todo el proceso de metilación).

- Los DAG obtenidos de la placa fina se ponen en tubos de extracción, se añade 1 cc. de H_2O destilada (requerida para saturar el silica-gel y facilitar el proceso de saponificación) + 10 cc. de KOH-etanol al 3 % + 10 ugr. de patrón 15:0. A continuación se agitaron mecánicamente y se introdujeron los tubos cerrados con tapón en estufa a 70 °C, durante 60 minutos. Al cabo de este tiempo ha

terminado el proceso de saponificación y se procede a la acidificación del medio, con objeto de transformar las sales en ácidos grasos. Esto se hace mediante la adición de 6 cc. de Cl H 1N , se agita, se añaden 10 cc de heptano y se agitan mecánicamente de nuevo durante 1 minuto. Se centrifuga durante 5 minutos a 3.000 r.p.m. con lo cual se obtienen dos fases: una inferior donde queda sílica-gel + $\text{ClK} + \text{H}_2\text{O} + \text{etanol}$, y una fase superior de heptano que disuelve los ácidos grasos. La fase superior se recoge con pipeta Pasteur y se pone en tubos cónicos, se evapora a sequedad bajo atmósfera de N_2 , en baño de arena y en campana de extracción. Se añade 0,1 cc. de hexano y se vuelve a evaporar hasta que restan aproximadamente 50 ul. Se extrae una alícuota de 5 ul. y se inyecta al cromatógrafo de gases.

II.2.7.- CARACTERISTICAS DE LA CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO (METODO DIRECTO DE INYECCION DE ACIDOS GRASOS)

- Columna: de vidrio, 3 m. de longitud, diámetro interno de 2 mm.
- Relleno: DEGS-P al 14 % sobre Supelcoport-AW, tratado con DMCS (80-100 millas) (previamente fosforilado).
- Gases: H_2 con un flujo de 40 ml./min.; aire, con un flujo de

En experimentos previos pudimos comprobar que el sistema de CGL por inyección directa presentaba una serie de ventajas sobre la técnica de CGL con metilación, que la hacía idónea para el desarrollo del trabajo que habíamos planificado.

En la figura 7 podemos observar un cromatograma de ácidos grasos libres de tejido adiposo, realizado mediante la técnica de inyección directa anteriormente descrita.

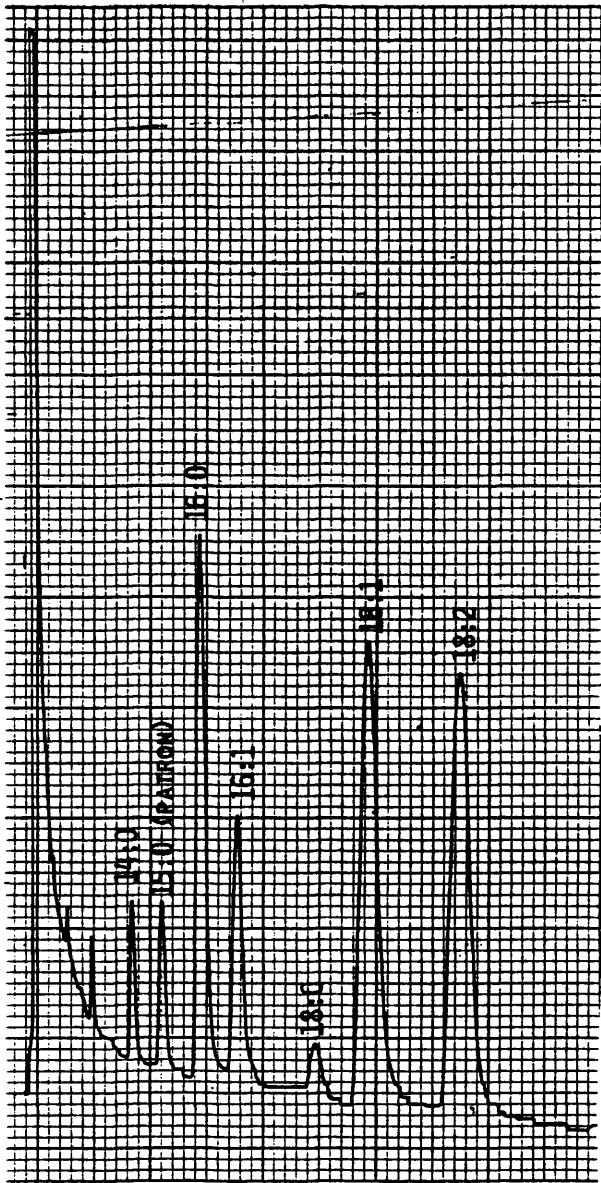


FIG. 7: CROMATOGRAMA DE ACIDOS GRASOS LIBRES, OBTENIDO MEDIANTE LA TECNICA DE INYECCION DIRECTA.

II.3.- EXPERIMENTOS ENZIMOLOGICOS SOBRE POSICIONALIDAD DE LOS ACIDOS GRASOS EN LOS TAG DE TEJIDO

Estos experimentos tienen por objeto el conocimiento de la distribución posicional de los ácidos grasos en el seno de la molécula de los TAG y se fundamentan en la acción de α -lipasa de *Rhizopus Arrizus* (Boheringer Manhein) sobre una emulsión de TAG provocando la formación de DAG, MAG y AGL; la interpretación de los resultados se hace en base a considerar que los MAG son β -MAG y los AGL proceden únicamente de la ruptura de las posiciones α y α' (BENZONANA, 1974; FISCHER y cols., 1973). Ello nos permite distinguir dos posiciones: $\alpha + \alpha'$ (AGL) y β (MAG) así como analizar su composición en AG.

Los TAG obtenidos de tejidos por extracción y placa fina siguiendo los procesos descritos en II.1.3.a. y II.1.3.b son redisueltos en cloroformo y tras realizar cuatro lavados sucesivos con agua destilada y secar con Na_2SO_4 se llevaron a sequedad en baño de arena y bajo atmósfera de nitrógeno. Se tomaron 0.2 ml. que se dispusieron en tubos de extracción, y a continuación se añadieron 2.5 ml. de Krebs-Hepes (PH 7.4). Tras sonicar durante 5 minutos se incubó con 0.04 ml. de disolución de alfa-lipasa de *Rhizopus Arrizus* (Boheringer-Manhein) durante 30 minutos, a 37 °C, en baño con agitación.

Terminada la incubación se procedió a la extracción inmediata añadiendo 50 ml. de cloroformo-metanol (2:1) y se continuó

por el procedimiento de Folch como ha sido descrito en II.1.2.a.
Se realizaron placas finas como se describe en II.2.5 y se recogieron las distintas fracciones para su posterior análisis cromatográfico según el procedimiento descrito en II.2.6.



II.4.- SEPARACION DE α α' -DAG Y α β + α' β -DAG A PARTIR DE LOS
DAG DE TEJIDO ADIPOSO, Y ANALISIS DE LAS COMPOSICIONES EN
ACIDOS GRASOS

La separación de los isómeros de posición de los DAG se realizó por cromatografía en capa fina, realizando numerosas pruebas previas con distintas fases móviles y estacionarias, a fin de obtener la mejor resolución posible.

En un primer grupo de experimentos se realizó la separación por sucesivas cromatografías (II.4.1.), y en un segundo grupo de experimentos se realizó la separación en una sola placa con distintas fases móvil y estacionaria (II.4.2.).

II.4.1.- Se partió de 50 mg. de tejido obtenido de ratas sonetidas a ayuno durante 48 horas; los lípidos totales fueron extraídos mediante la técnica descrita en II.1.3.a. A continuación se procedió a la separación de los lípidos neutros por cromatografía en placa fina según el método descrito en II.2.5, lo cual permitió separar la banda de DAG de las inmediatas (AGL y MAG). Se raspó con espátula la banda correspondiente a DAG y a continuación se procedió a redissolverlos en 10 ml. de cloroformo-metanol (2:1). Tras agitar dos minutos en agitador mecánico se centrifugó durante 10 min. a 3.000 r.p.m. quedando el silicagel en el fondo del tubo.

Se transfiere el cloroformo-metanol conteniendo los DAG a otro tubo, y filtrando con lana de vidrio. Se llevaron a sequedad en baño de arena, bajo atmósfera de nitrógeno, y se redisolviéron en 0.1 ml. de cloroformo-metanol para su aplicación en placa fina, que fué realizada utilizando un sistema 50:50:1 (hexano: eter etílico: ácido acético) y corriendo paralelamente patrones puros de Sigma ($\alpha\alpha'$ -DAG y $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG).

Se obtuvieron dos bandas, cuyo R_f coincidió con el de los patrones, quedando la banda de $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG más cercana al origen.

La extracción y análisis de los ácidos grasos componentes de cada banda se realizó según la técnica descrita en II.2.6. (ver página 105).

II.4.2.- Se partió de 40 mg. de tejido obtenido de ratas sometidas a ayuno durante 48 horas. Los lípidos totales fueron extraídos mediante la técnica descrita en II.1.3.a. A continuación se procedió a la separación cromatográfica según la técnica descrita en II.2.5. con las variaciones introducidas por THOMAS y cols. (1965) para la separación de isómeros de posición de los acilglucéridos:

- Fase estacionaria: sílica-gel GF + Acido Bórico 0.4 M (1:2 P/V)
- Fase móvil: Cloroformo : Acetona (96:4 V/V).

La extracción y análisis cromatográfico se realizó según II.4.1.

118

III.1.- EFECTO DEL AYUNO PROLONGADO SOBRE LA COMPOSICION EN ACI-
DOS GRASOS DEL TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL DE RATA

Para la realización de este experimento utilizamos dos grupos de ratas Wistar machos, de nuestra colonia, cuyo peso medio fué de 250 g . Un grupo fué sometido a ayuno prolongado durante cuatro días y el otro durante ocho días. Al finalizar el período de ayuno, las ratas fueron sacrificadas por guillotinado y se analizó la composición de los triacilglicéridos de su tejido adiposo epididimal en ácidos grasos de cadena larga (superior a 12 átomos de carbono).

En la tabla VII hemos recogido los valores obtenidos para cada ácido graso expresándolos en mg. de ácido/100 mg. de tejido, mientras que en la figura 8 se representan gráficamente dichos valores.

En el cuarto día de ayuno la cantidad total de ácidos grasos/100 mg. de tejido, que en los animales control es de 76.88 ± 7.69 mg., sufre un descenso hasta 62.57 ± 8.45 mg. Entre el cuarto y octavo días de ayuno no parece producirse modificaciones en la cantidad total, siendo ésta en el octavo día de 63.15 ± 18.93 . Sin embargo este descenso no es igual para los distintos ácidos grasos de cadena larga, sino que afecta en mayor medida a unos que a otros.

TABLA VII.- CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS EN TEJIDO ADIPOSEO DURANTE EL

AYUNO (mg./100 mg. de grasa)

ACIDOS	0 días	4 días	8 días
14:0	1.59 ± 0.29 (5)	1.08 ± 0.08 (4) (t = 3.40)	1.81 ± 0.25 (6) (t = 1.32) NS
16:0	23.55 ± 2.56 (6)	15.46 ± 3.11 (5) (t = 4.74)	15.92 ± 6.04 (6) (t = 2.85)
16:1	7.47 ± 1.14 (6)	3.72 ± 0.76 (5) (t = 6.23)	2.77 ± 1.39 (5) (t = 6.17)
18:0	2.75 ± 0.46 (6)	2.32 ± 0.41 (4) (t = 2.63)	3.74 ± 0.47 (6) (t = 3.71)
18:1	27.25 ± 2.33 (5)	25.11 ± 3.71 (5) (t = 0.37) NS	24.65 ± 7.06 (6) (t = 0.78) NS
18:2	14.27 ± 1.52 (6)	14.88 ± 3.71 (5) (t = 1.09) NS	14.26 ± 3.68 (6) (t = 0.00) NS
Total	76.88 ± 7.69 (6)	62.57 ± 8.45 (5)	63.15 ± 18.93 (6)

mg. AG / 100 mg.

- CONTROL
- ▨ 4 DIAS AYUNO
- 8 DIAS AYUNO
- $p < 0.025$

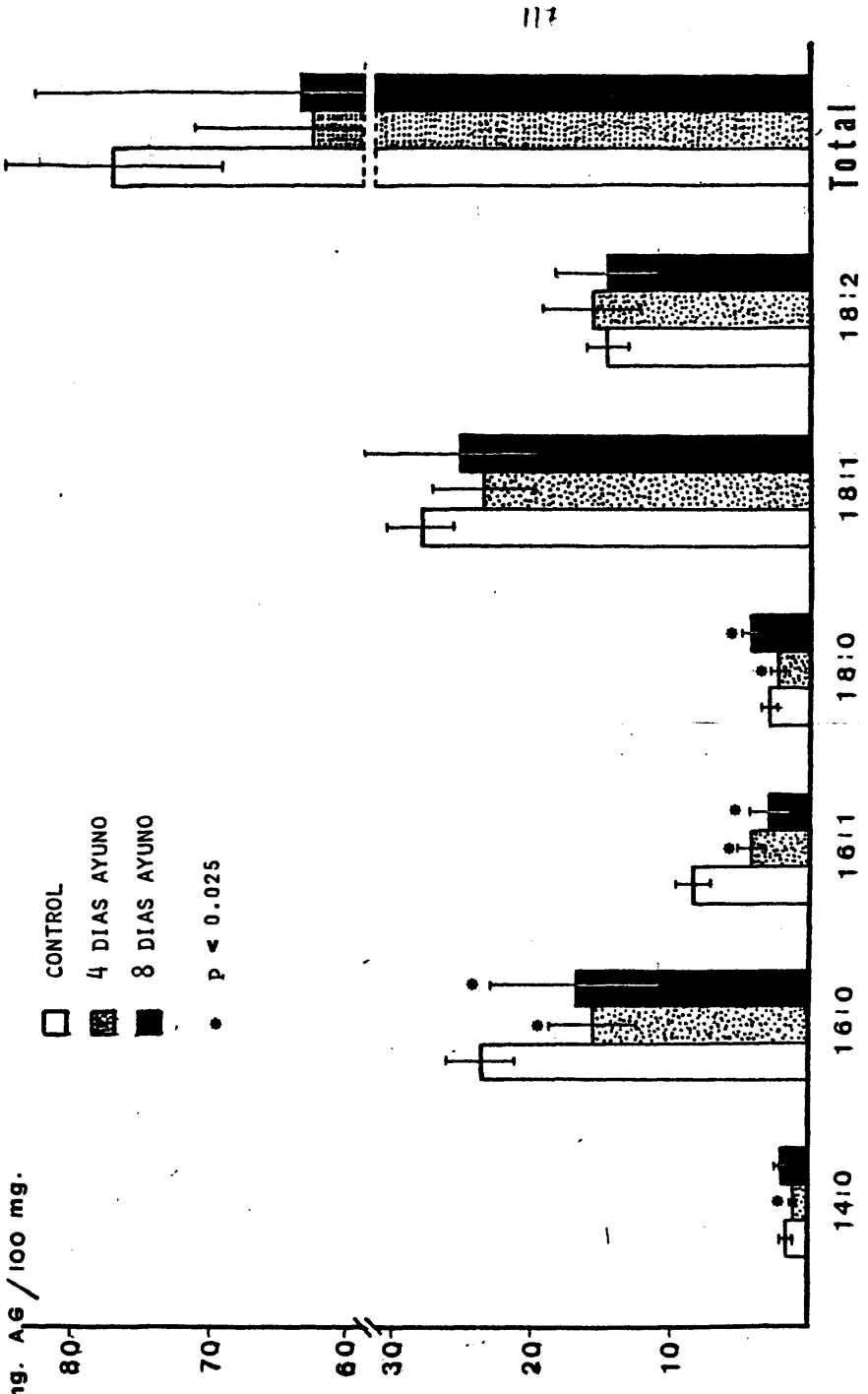


Fig. 8: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL TEJIDO ADIPOSO, EN CONTROL, 4 DIAS DE AYUNO Y 8 DIAS DE AYUNO.

El descenso cuantitativo significativo en el cuarto día afecta fundamentalmente a los ácidos 14:0 (mirístico), 16:0 (palmítico), 16:1 (palmitoleico), 18:0 (estearico), no habiendo cambios significativos para los ácidos 18:1 (oleico) ni 18:2 (linoleico).

Entre el cuarto y el octavo día de ayuno observamos una recuperación de los ácidos grasos 14:0 y 18:0 (significativa) y del 16:0 (no significativa) cuya característica común es la de ser ácidos grasos saturados. Además se mantiene el descenso de 16:1 y continúan sin modificaciones significativas oleico y linoleico.

En la tabla IX hemos expresado los valores de cada ácido graso a los cuatro y ocho días como % respecto del valor que tenía en los controles (100 %). Podemos constatar que en el cuarto día se produce una diferencia en la variación que parece estar en función de la longitud de la cadena, puesto que la disminución es mayor para los ácidos grasos de 14 C y 16 C. Además vemos que entre el cuarto y el octavo día se produce una recuperación que afecta únicamente a los ácidos grasos saturados de 14 y 18 C (significativa) y de 16 C (no significativa).

La tabla VIII recoge la composición del tejido en ácidos grasos, expresada en % de cada ácido graso sobre el total de

TABLA VIII.- VARIACION PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS EN TEJIDO
DURANTE EL AYUNO

Acido	0	4 días ayuno	8 días ayuno
14:0	100	67.92	113.84
16:0	100	65.65	67.60
16:1	100	49.80	37.08
18:0	100	84.36	136.0
18:1	100	92.15	90.46
18:2	100	104.27	99.93

TABLA IX .- COMPOSICION DEL TEJIDO EN ACIDOS GRASOS EXPRESADOS
EN %

Acido	0	4 días ayuno	8 días ayuno
14:0	2.07	1.73	2.87
16:0	30.63	24.71	25.21
16:1	9.72	5.95	4.39
18:0	3.58	3.71	5.92
18:1	35.44	40.13	39.03
18:2	18.56	23.78	22.58

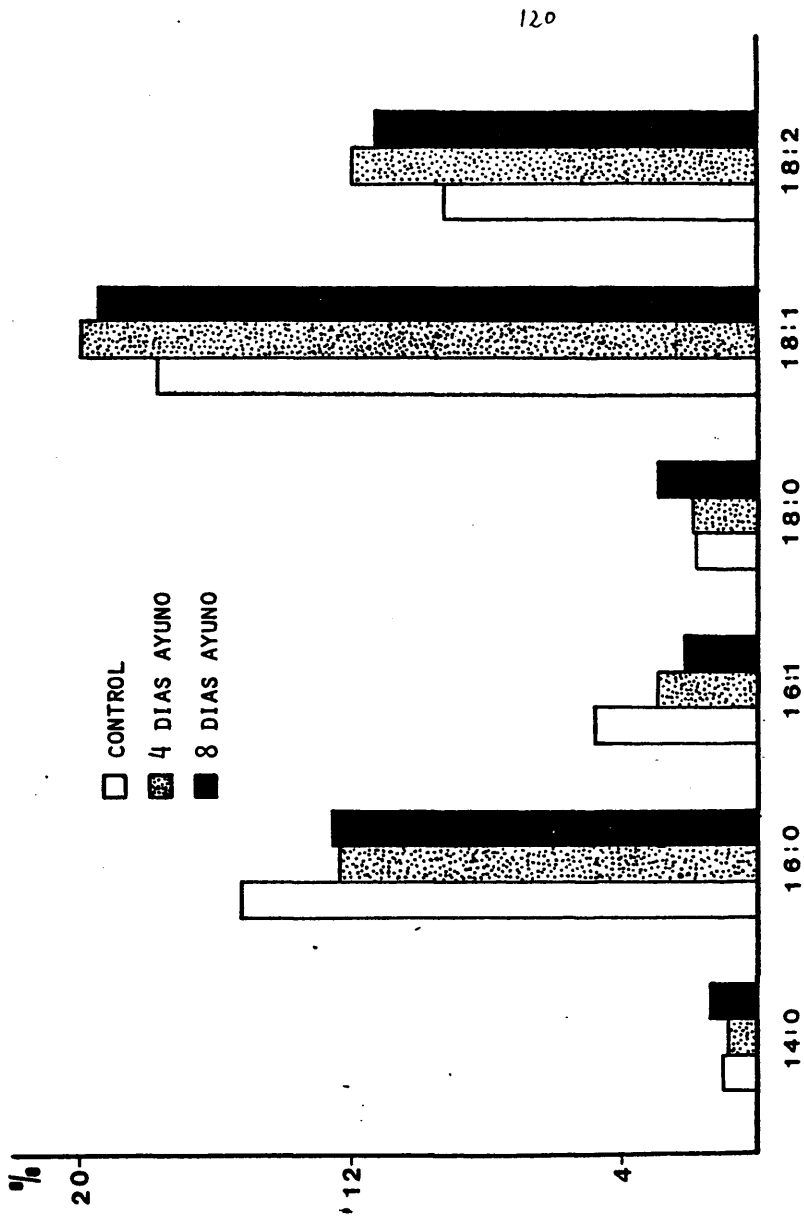


Fig.9: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL TEJ. ADIPOSO EN CONTROLES,
4 DIAS DE AYUNO Y 8 DIAS DE AYUNO.

cada grupo (100 %) en los tres grupos estudiados: controles (0 días de ayuno), 4 días de ayuno y 8 días de ayuno. Vemos que durante los primeros cuatro días de ayuno se produce un importante cambio en la composición del tejido, disminuyéndose considerablemente la proporción de los ácidos grasos más cortos e incrementándose la de los más largos. Durante los cuatro días siguientes se produce un aumento en la proporción de ácidos grasos saturados. Estas modificaciones quedan reflejadas gráficamente en la figura 9.

III.2.- EFECTO DEL AYUNO PROLONGADO MAS 5-HT SOBRE LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL TEJIDO ADIPOSEO EPIDIDIMAL DE RATA

Se utilizaron dos grupos de ratas de unos 250 g . de peso, que fueron sometidas a ayuno prolongado durante cuatro y ocho días, e inyectadas intraperitonealmente con 50 ug . diarios de 5-HT (Serotonina). Tras su guillotinado fué extraído su tejido adiposo epididimal y analizada la composición en ácidos grasos de cadena larga de sus triacilglicéridos.

En la tabla X se recogen los valores obtenidos para los distintos ácidos grasos, expresados en mg. de ácido/100 mg. de tejido. Estos datos se representan gráficamente en la figura 10.

TABLA X.- CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS EN TEJIDO ADIPOSO DURANTE EL
 AYUNO + 5-HT (mg./100 mg. de grasa)

ACIDOS	0 días	4 días	8 días
14:0	1.59 ± 0.29 (5)	0.92 ± 0.14 (6) (t = 2.03)	1.23 ± 0.58 (3) (t = 2.19)
16:0	23.55 ± 2.56 (6)	17.23 ± 2.37 (5) (t = 1.90)	18.35 ± 1.00 (3) (t = 0.67) NS
16:1	7.47 ± 1.14 (6)	4.15 ± 1.06 (5) (t = 0.74) NS	4.40 ± 2.12 (3) (t = 1.33) NS
18:0	2.75 ± 0.46 (6)	2.18 ± 0.46 (5) (t = 0.49) NS	2.48 ± 0.57 (2) (t = 3.15)
18:1	27.25 ± 2.33 (5)	25.87 ± 1.80 (5) (t = 0.41) NS	27.33 ± 0.20 (3) (t = 0.56) NS
18:2	14.25 ± 1.52 (6)	16.63 ± 2.56 (5) (t = 0.87) NS	18.44 ± 0.34 (2) (t = 1.92)
TOTAL	76.88 ± 7.69 (6)	66.98 ± 7.69 (6)	72.23 ± 8.46 (3)

mg AG / 100 mg.



Fig. 10: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL TEJIDO ADIPOSO EN CONTROL, 4 DIAS DE AYUNO+5-HT Y 8 DIAS DE AYUNO+5-HT.

Se observa que la concentración de ácidos grasos en tejido sufre un descenso sensiblemente menor que en ratas en ayuno y sin tratamiento.

La cantidad de ácidos grasos expresada en mg ./100 mg. de tejido disminuye desde 76.88 ± 7.69 mg . en las ratas no tratadas ni ayunadas (controles) hasta 66.98 ± 7.69 mg . en las ratas sometidas a cuatro días de ayuno y tratamiento con 5-HT. A los ocho días de ayuno y tratamiento encontramos un valor de 72.23 ± 8.46 mg. Este hecho puede deberse a la existencia de reesterificación o resíntesis de ácidos grasos, o bien a un mayor descenso relativo en proteína inducido por Serotonina.

En la tabla XI se expresan los valores de cada ácido graso a los cuatro y ocho días como % del valor en controles (100 %). El análisis de los valores de cada ácido graso es particularmente interesante en cuanto el ácido linoleico, que muestra tanto en el cuarto como en el octavo día un incremento, siendo sin embargo un ácido graso esencial. Es evidente, por lo tanto, que el incremento no es producido por resíntesis de ácidos grasos, sino por recaptación y posterior esterificación de ácidos grasos extraadiposos o bien por que la Serotonina provoque en estas condiciones un mayor descenso en peso de proteína del tejido que de los ácidos grasos del mismo.

TABLA XI.- COMPOSICION DEL TEJIDO EN ACIDOS GRASOS EXPRESADAEN %

Acido	0	4 días ayuno y Serotonina	8 días ayuno y Serotonina
14:0	2.07	1.37	1.70
16:0	30.63	25.72	25.40
16:1	9.72	6.20	6.09
18:0	3.58	3.25	3.43
18:1	35.44	38.62	37.84
18:2	18.56	24.82	25.53

TABLA XII.- VARIACION PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS EN TEJIDODURANTE EL AYUNO MAS 5-HT

Acido	0	4 días ayuno y Serotonina	8 días ayuno y Serotonina
14:0	100	57.86	77.35
16:0	100	73.16	77.92
16:1	100	55.55	58.90
18:0	100	79.27	90.18
18:1	100	94.94	100.29
18:2	100	116.54	129.22



Fig.11: COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL TEJIDO ADIPOSO EN CONTROLES.
4 DIAS DE AYUNO + 5-HT Y 8 DIAS DE AYUNO + 5-HT.

En cuanto a las variaciones individuales podemos ver que en el cuarto día el descenso es más pronunciado para los ácidos grasos de cadena más corta (de 14 y 16 átomos de carbono) al igual que ocurría en ratas no tratadas con Serotonina. Asimismo, entre los días cuarto y octavo se produce una recuperación selectivamente mayor de los ácidos grasos saturados de 14 y 18 átomos de carbono (mirístico y esteárico).

Ambos fenómenos los podemos analizar con más claridad en la tabla XII y figura 11 donde se expresa la variación en la proporción de los distintos ácidos grasos expresados en % de cada grupo (controles, 4 días de ayuno + 5-HT y 8 días de ayuno + 5-HT). Vemos que en el cuarto día se produce una disminución en la proporción de ácidos grasos de cadena más corta (de 14 y 16 C) así como un pequeño descenso en la proporción de 18:0, mientras que entre el cuarto y el octavo día se produce un incremento en el % de los saturados de 14 y 18 C (mirístico y esteárico). El porcentaje de linoleico aumenta tanto en el cuarto como en el octavo día.

La acción de la Serotonina sobre la composición de los ácidos grasos del tejido, según parece deducirse del análisis comparativo de las tablas VIII y XII, se manifiesta en un descenso en el % de los ácidos grasos saturados de 14 y 18 C.

III.3.- EFECTO DEL AYUNO PROLONGADO SOBRE LA COMPOSICION EN
ACIDOS GRASOS DEL SUERO DE RATA

Se utilizaron para este experimento dos grupos de ratas de 250 g . de peso sometidos a ayuno durante cuatro y ocho días, al cabo de los cuales se extrajeron muestras de sangre por punción directa en el corazón. Fueron valorados cuantitativa y cualitativamente los ácidos grasos totales del suero. Encontramos como ácidos grasos mayoritarios los mismos que en tejido, además del ácido araquidónico (20:4).

La tabla XIII recoge los valores obtenidos para cada ácido graso expresados en mg . de ácido/100 ml. de suero tanto en controles basales como a los cuatro y ocho días de ayuno. Estos datos se representan gráficamente en la figura 12. Se observa un pequeño descenso, no significativo, en la cantidad total de ácidos grasos (mg./100 ml. de suero) que de 158.51 \pm 26.78 mg. en controles baja a 153.49 \pm 32.89 mg. a los cuatro días y 147.13 \pm 23.88 mg. a los ocho días.

En el cuarto día se produce un descenso en la concentración de 14:0, 16:0 y 16:1; es decir, de los ácidos grasos de cadena corta. El resto de los ácidos grasos no sufren descensos en sus concentraciones, a excepción del esencial linoleico.

129

TABLA XIII. - CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS EN SUERO DURANTE EL AYUNO

(mg./100 ml.)

ACIDOS	0 días	4 días	8 días
14:0	1.17 ± 0.34 (5)	1.04 ± 0.57 (8) (t = 0.49) NS	0.68 ± 0.09 (4) (t = 2.75)
16:0	40.54 ± 10.28 (5)	30.85 ± 8.80 (8) (t = 1.82)	40.86 ± 5.37 (5) (t = 0.06) NS
16:1	6.02 ± 2.28 (5)	3.17 ± 1.47 (8) (t = 2.77)	2.16 ± 0.33 (4) (t = 3.31)
18:0	20.64 ± 7.06 (6)	21.49 ± 3.82 (8) (t = 0.29) NS	20.26 ± 2.76 (4) (t = 0.10) NS
18:1	21.69 ± 5.67 (4)	35.94 ± 9.26 (6) (t = 2.72)	27.05 ± 1.38 (4) (t = 1.84)
18:2	33.03 ± 5.03 (5)	24.73 ± 5.96 (8) (t = 2.58)	25.00 ± 1.45 (4) (t = 3.05)
20:4	35.42 ± 8.52 (5)	36.29 ± 6.74 (8) (t = 0.20) NS	31.11 ± 5.43 (4) (t = 0.87) NS
TOTAL	158.51 ± 26.78 (5)	153.49 ± 32.89 (7) (NS)	147.13 ± 23.88 (5) (NS)

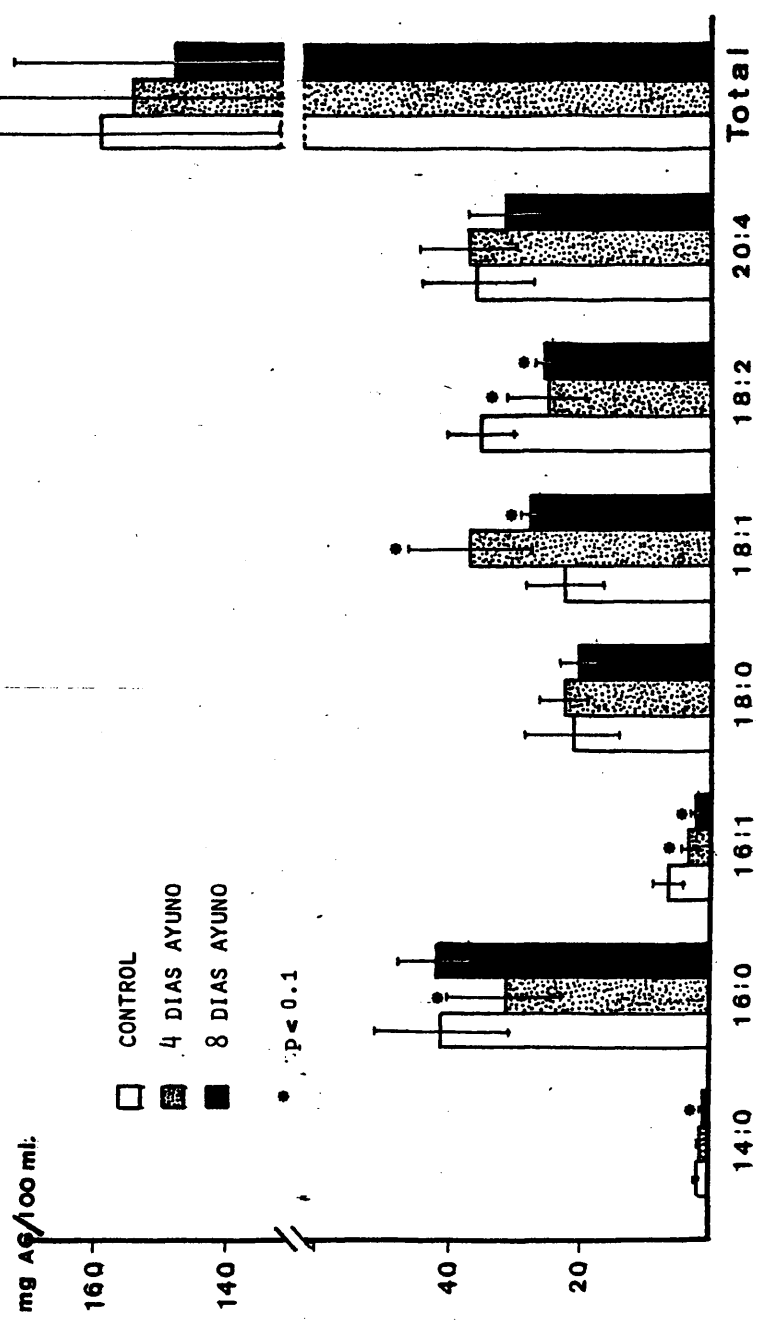


FIG. 12: COMPOSICION DEL SUERO EN ACIDOS GRASOS, EN CONTROL, 4 DIAS DE AYUNO Y 8 DIAS DE AYUNO.

Entre el cuarto y el octavo días de ayuno se produce un descenso generalizado, excepto en el 16:0 que sufre un incremento en su concentración.

Las modificaciones en la proporción de los distintos ácidos grasos se recogen en la Tabla XIV y están representados gráficamente en la figura 13. En el cuarto día de ayuno se produce una importante disminución en el % de los ácidos grasos de cadena corta (14:0, 16:0 y 16:1) así como un incremento en los de cadena larga (18:0 y 18:1). El comportamiento de los ácidos linoleico (18:2) y araquidónico (20:4) debemos considerarlos en tanto en cuanto se trata de ácidos grasos esenciales y vemos que sufren un descenso durante los cuatro primeros días de ayuno.

Entre el cuarto y el octavo día de ayuno continúa el descenso general excepto en el saturado de 16 C, afectando en menor medida a los también saturados de 18 y 14 C.

Parece por lo tanto mantenerse la tónica general que observábamos en el tejido en cuanto a un descenso de los más cortos en el cuarto día y una recuperación de los saturados entre el cuarto y el octavo días.



Fig. 13: COMPOSICION DEL SUERO EN ACIDOS GRASOS, EN CONTROLES, 4 DIAS DE AYUNO Y 8 DIAS DE AYUNO.

III.4.- EFECTO DEL AYUNO PROLONGADO MAS 5-HT SOBRE LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DEL SUERO DE RATA

En este experimento se utilizaron dos grupos de ratas de unos 250 g . de peso, sometidas a ayuno prolongado durante cuatro y ocho días e inyectadas intraperitonealmente con una dosis de 50 ug . diarios de Serotonina. Las muestras de sangre se extrajeron por punción directa en el corazón.

Los datos obtenidos de la valoración de los distintos ácidos grasos se recogen en la Tabla XVI y están representados gráficamente en la figura 14. Del análisis de los mismos parece establecerse un descenso acusadamente mayor en la cantidad total de ácidos grasos/100 ml. de suero con respecto al de ratas no tratadas con Serotonina (ver Tabla XIII y figura 12).

La concentración de ácidos grasos desciende de 158.51 ± 26.78 mg./100 ml. en controles a 111.78 ± 23.48 mg./100 ml. en ratas en ayuno y tratadas durante cuatro días, y a 110.61 ± 20.0 en ratas en ayuno y tratadas durante ocho días. Este fenómeno puede relacionarse directamente con los resultados obtenidos en el experimento III.2 donde encontrábamos que se produce un incremento de la relación peso de ácido/peso de tejido por acción de la serotonina y que como vemos (página 125) no puede ser debido a una resíntesis de ácidos grasos.

TABLA XIV.- COMPOSICION DEL SUERO EN ACIDOS GRASOS EXPRESADA EN %

Acido	0	4 días ayuno	8 días ayuno
14:0	0.74	0.67	0.46
16:0	25.57	20.10	27.77
16:1	3.80	2.06	1.47
18:0	13.02	14.00	13.77
18:1	13.68	23.42	18.39
18:2	20.84	16.11	16.99
20:4	22.35	23.64	21.15

TABLA XV.- VARIACION PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS EN SUERO DURANTE EL AYUNO MAS 5-HT

Acido	0	4 días ayuno y serotonina	8 días ayuno y serotonina
14:0	0.74	0.56	0.61
16:0	25.57	22.53	25.02
16:1	3.80	2.65	1.35
18:0	13.02	13.62	14.90
18:1	13.68	22.43	16.54
18:2	20.84	16.21	15.36
20:4	22.35	21.00	26.22

TABLA XVI.- CAMBIOS EN LA CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS EN SUERO DURANTE EL AYUNO MAS

5-HT (mg./100 ml.)

ACIDOS	0 días	4 días	8 días
14:0	1.17 ± 0.34 (5)	0.63 ± 0.17 (6) (t = 1.70)	0.68 ± 0.26 (4) (t = 0.97) NS
16:0	40.54 ± 10.28 (5)	25.18 ± 2.13 (5) (t = 2.13)	27.67 ± 2.58 (3) (t = 3.90)
16:1	6.02 ± 2.28 (5)	2.96 ± 1.23 (7) (t = 1.36)	1.49 ± 0.40 (4) (t = 2.59)
18:0	20.64 ± 7.06 (6)	15.22 ± 2.51 (7) (t = 3.69)	16.48 ± 1.50 (4) (t = 2.41)
18:1	21.69 ± 5.67 (4)	25.07 ± 5.42 (6) (t = 2.48)	18.30 ± 2.06 (3) (t = 6.79)
18:2	33.03 ± 5.03 (5)	18.12 ± 3.86 (7) (t = 2.50)	17.00 ± 1.68 (3) (t = 6.78)
20:4	35.42 ± 8.52 (5)	23.47 ± 4.51 (7) (t = 3.82)	29.00 ± 5.03 (4) (t = 0.57) NS
TOTAL	158.51 ± 26.78 (5)	111.78 ± 23.48	110.61 ± 20.00

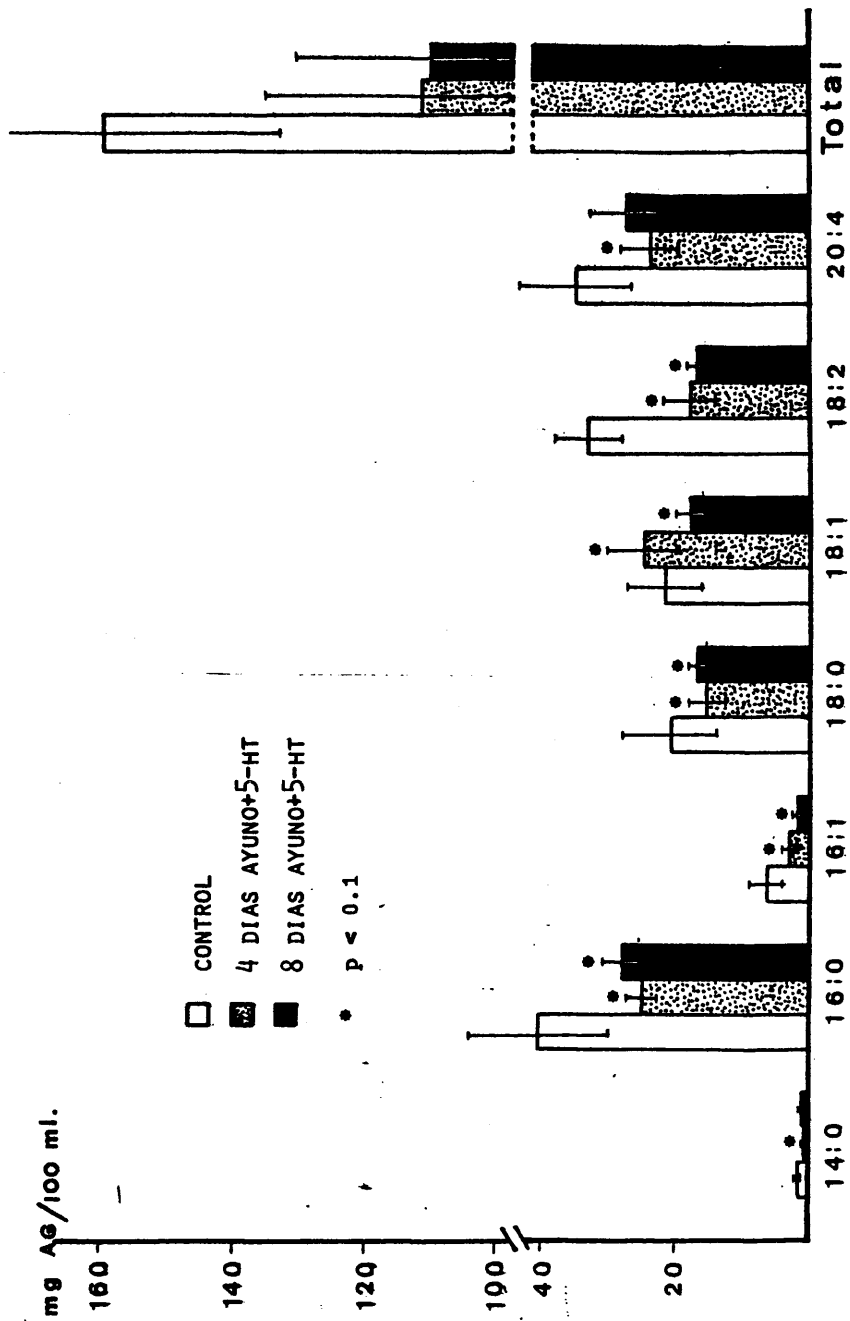


Fig. 14: COMPOSICION DEL SUERO EN ACIDOS GRASOS, EN CONTROLES, 4 DIAS DE AYUNO+5-HT Y 8 DIAS DE AYUNO+5-HT.

El ácido linoleico sufre en suero, al contrario que en tejido una disminución no sólo en su concentración sino también en su proporción (ver Tabla XV), y además si analizamos la acción de la Serotonina en ratas en ayuno vemos que el descenso de linoleico y araquidónico parece ser estimulado por 5-HT. Esto nos induce a pensar en una posible recaptación y reesterificación en tejido de ácidos grasos procedentes del suero, por acción de 5-HT bajo estas condiciones.

En la Tabla XV se recogen los % de cada ácido graso en cada grupo de ratas (controles, en ayuno y tratadas durante cuatro días y en ayuno y tratadas durante ocho días). Estos valores se representan gráficamente en la figura 15. En el cuarto día se produce un notable descenso en el porcentaje de los ácidos grasos de cadena más corta (14:0, 16:0 y 16:1) así como un incremento en los del esteárico y oleico.

Entre el cuarto y octavo día se produce un fenómeno similar al analizado hasta ahora en sueros y tejidos: un incremento en el tanto por ciento de los ácidos grasos saturados.

•

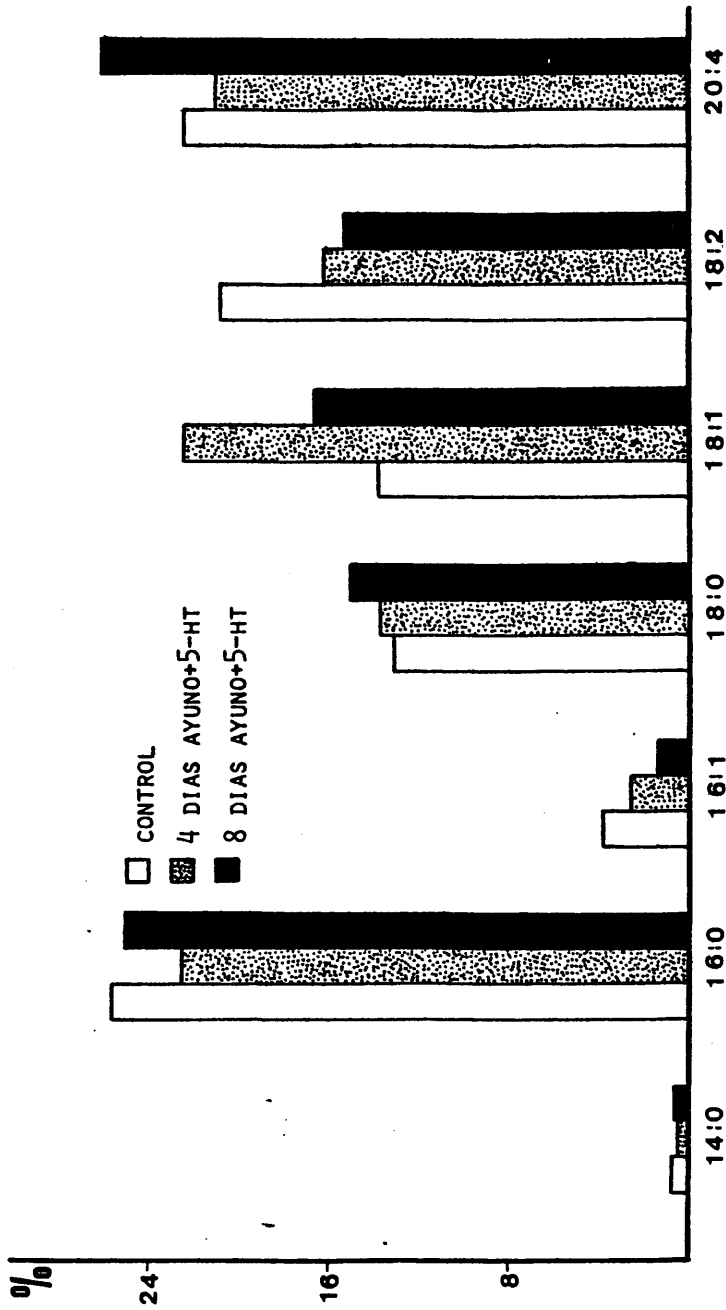


FIG. 15: COMPOSICION DEL SUERO EN ACIDOS GRASOS; EN CONTROLES, 4 DIAS DE AYUNO + 5HT Y 8 DIAS DE AYUNO + 5HT.

Esta serie de experimentos (III.1, III.2, III.3 y III.4) nos permiten observar que la modificación en las concentraciones de ácidos grasos tanto en suero como en tejido adiposo no afectan a los distintos ácidos de una manera uniforme sino que deben existir mecanismos específicos en su metabolismo que propician los cambios en su proporción.

Las variaciones que se producen en suero y tejido parecen apuntar en el sentido de que durante los cuatro primeros días de ayuno se produce un descenso preferente de los ácidos grasos de cadena más corta (14 y 16 C) frente a los de cadena más larga (18 C).

Las diferencias entre el cuarto y el octavo días de ayuno parecen centrarse en el grado de saturación, existiendo en general un incremento en la proporción de los ácidos grasos saturados. Quizás como resultante de la acción sobre ambos factores (longitud de cadena y grado de saturación) el ácido palmitoleico (corto y monoinsaturados) es el que sufre un descenso más considerable tanto en el cuarto como en el octavo días y tanto en tejido como en suero (ver figuras 9, 11, 13 y 15).

Cualquiera que sea el mecanismo o mecanismos que lo hacen posible, es evidente que con el ayuno se produce un incremento de los ácidos oleico, y fundamentalmente linoleico.

A partir de los datos expresados anteriormente en las Tablas VII, X, XIII y XVI hemos elaborado la Tabla XVII en la cual se recoge el orden de las variaciones en la proporción de los ácidos grasos del suero y el tejido respecto de sus controles. En dicha Tabla podemos observar como norma general que existe una importante correlación entre las variaciones en tejido y suero. Efectivamente, el orden de descenso porcentual sigue el mismo patrón en casi todos los casos, produciéndose un mayor descenso tanto en suero como en tejido de los ácidos grasos de cadena más corta, tanto al cuarto como al octavo día en ratas tratadas y sin tratar con Serotonina.

TABLA XVII.- ORDEN EN EL DESCENSO PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS EN TEJIDO Y SUERO

4 días ayuno		8 días ayuno		4 días ayuno + 5-HT		8 días ayuno + 5-HT	
Tejido	Suero	Tejido	Suero	Tejido	Suero	Tejido	Suero
16:1	• 16:1	16:1	• 16:1	16:1	• 16:1	16:1	• 16:1
16:0	• 16:0	16:0	14:0	14:0	• 14:0	14:0	• 14:0
14:0	• 14:0	—	18:2+20:4	—	18:2+20:4	—	18:2+20:4
—	18:2+20:4	18:1	18:0	16:0	• 16:0	16:0	• 16:0
18:0	• 18:0	18:2	16:0	18:0	• 18:0	18:0	• 18:0
18:1	• 18:1	14:0	18:1	18:1	• 18:1	18:1	• 18:1
18:2		18:0		18:2		18:2	

141

• Idéntica posición en el orden de descenso

— El 20:4 no aparece en tejido

III.5.- COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LAS FRACCIONES ACIL-
GLICERIDAS Y AGL DE TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL DE RATA

El motivo de este trabajo fué el de conocer la composición en ácidos grasos de las distintas fracciones lipídicas del tejido, al objeto de aproximarnos al problema de si existe una relación entre la distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de los TAG y la liberación selectiva de ácidos grasos durante el ayuno o el estímulo hormonal.

Para la realización de este trabajo tomamos un grupo de doce ratas de un peso comprendido entre los 250 y 300 g.. Las ratas fueron decapitadas y tras la extracción de su tejido adiposo epididimal se procedió al fraccionamiento de los lípidos en sus distintas clases para un posterior análisis de la composición en ácidos grasos de los TAG, DAG, MAG y AGL.

En la Tabla XVIII se recogen los valores obtenidos para los distintos ácidos grasos, expresados en % del ácido graso en cada fracción.

Tomando como base la composición de los TAG podemos observar que en los DAG la composición difiere bastante en el sentido de un incremento importante de los ácidos grasos de ca-

TABLA XVIII.- COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LAS FRACCIONES ACILGLICERIDAS DE TEJIDO ADIPOSEO.

ACIDO GRASO	TAG E.S.	DAG E.S.	MAG E.S.	AGL E.S.
	(8)	(7)	(6)	(9)
16:0	24.19 ± 0.29	★ 17.61 ± 0.80	★ 28.87 ± 1.70	★ 18.85 ± 1.47
16:1	10.98 ± 1.02	11.24 ± 0.29	10.03 ± 0.75	★ 13.48 ± 0.15
18:0	2.63 ± 0.19	★ 4.62 ± 0.61	★ 7.38 ± 0.97	2.72 ± 0.14
18:1	30.70 ± 0.77	31.63 ± 0.44	28.76 ± 0.99	30.39 ± 1.34
18:2	28.18 ± 0.22	★ 33.43 ± 0.85	★ 23.56 ± 1.15	30.35 ± 1.06

143

★ p < 0.025

dena más larga, este hecho resulta de bastante interés puesto que los resultados obtenidos por COLEMAN y cols. (1976) en sus experimentos (Introducción, pag. 49) nos permitirían suponer que los DAG, procedentes de la lipólisis de los TAG o bien de la esterificación "Vía de novo" deberían tener una proporción de ácidos grasos de cadena larga menor que los TAG. Esta diferencia de composición entre ambas fracciones en el sentido contrario al esperado de acuerdo con los conocimientos sobre especificidad de los enzimas por los distintos ácidos grasos puede interpretarse en varias formas:

- 1.- Existencia de una acción específica de la TAG-lipasa sobre las posiciones α y α' o por determinadas especies de TAG.
- 2.- Existencia de especificidad por los acil-CoA en la biosíntesis "de novo" de los DAG.
- 3.- Por resíntesis de una importante fracción de los DAG mediante la "Vía monoglicérido", que permitiría la recuperación de una parte de los ácidos grasos situados en la posición β .

HOLLENBERG ya había propuesto en 1964 (Introducción pags. 45 y 46) las dos primeras posibilidades como medio de explicación del fenómeno por él encontrado también de una liberación selectiva de los ácidos grasos, y aunque MEINERTZ (1962)

llegó a la conclusión de que este fenómeno era consecuencia no de fenómenos de especificidad enzimática sino de una liberación selectiva de los distintos ácidos grasos. En nuestra opinión los datos aportados por MEINERTZ sobre variación de la posicionalidad con variaciones en la dieta no permiten concluir la existencia de tal liberación selectiva. La comparación de los valores obtenidos en la fracción AGL con los de la fracción TAG no permite conclusiones claras en el sentido de que los AGL son tanto de origen exógeno como endógeno, y el desconocimiento del aporte en cada momento desde el exterior impide un análisis serio de estas diferencias; sin embargo, las diferencias entre ambas fracciones en ácidos grasos de cadena larga no son significativas, únicamente se observa un incremento en 14:0 y 16:1 con respecto a TAG y un descenso en 16:0.

La fracción MAG nos ofrece una posibilidad importante de análisis puesto que es la única fracción que cabe suponer sea de origen endógeno, y que por lo tanto su única fuente sea la lipólisis a partir de los DAG.

La comparación de los porcentajes para cada ácido graso obtenido en esta fracción con los de TAG y DAG nos permite observar que constituye la fracción más diferenciada, y que se produce un importante incremento en los porcentajes de los ácidos grasos que se sitúan en posición α y α' en los TAG

(16:0 y 18:0) y un importante descenso de los que se sitúan en la posición β de los TAG (18:1 y 18:2) (Ver Tabla III).

Este hecho es fundamental en el análisis del problema, puesto que encontramos una distribución diametralmente opuesta a la que cabía esperar en el caso de que existiera una acción específica de la TAG-lipasa sobre las posiciones α y α' . Un análisis más detenido del problema nos llevó a considerar la posible influencia de las vías de desaparición de los MAG, que se pueden reducir a:

- 1.- Acción de la MAG-lipasa, que según VAUGHAN tiene una acción preferencia sobre los β -MAG.
- 2.- Acción de la MAG-acilCoA-acil-transferasa encontrada por SCHULTZ y JOHNSTON (1971) en tejido adiposo de hamster y que es el enzima responsable de la "vía monoglicérido" para la síntesis de DAG.

Para analizar si esta diferencia de composición pudiera ser debida a las vías de desaparición de MAG procedimos al análisis cuantitativo y cualitativo de los MAG y obtuvimos los valores que se recogen en la Tabla XIX, que nos muestra la existencia de una correlación bastante clara entre la composición en ácidos grasos de esta fracción y su concentración en tejido, expresada en μg de AG/g de tejido.

TABLA XIX.- VARIACION DE LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LA
FRACCION MAG CON SU CONCENTRACION EN TEJIDO

<u>ACIDO GRASO</u>	<u>MAG-1</u>	<u>MAG-2</u>	<u>MAG-3</u>	<u>MAG-4</u>
16:0	30.2	26.3	25.9	18.4
16:1	13.0	14.0	9.2	9.2
18:0	8.0	10.3	9.3	4.8
18:1	27.1	27.4	29.0	33.1
18:2	21.7	21.8	26.6	34.5
<u>ugr.AG/gr.tej:</u>	186	269	503	720

Efectivamente podemos observar como se produce un notable incremento del porcentaje de los ácidos grasos 18:1 y 18:2 al incrementarse la concentración de MAG en tejido, y una disminución de 16:0 y 18:0. Parece por lo tanto existir una disminución selectiva de los ácidos grasos situados en β a medida que disminuye la concentración de MAG en el tejido.

Esto nos llevó nuevamente al planteamiento de la cuestión central: ¿es la HSL-TAG lipasa un enzima dotada de especificidad posicional?. Para resolver de una forma definitiva esta cuestión, clave en el conocimiento de los mecanismos de conservación de la posicionalidad de los ácidos grasos en los tejidos animales nos planteamos la realización de los siguientes experimentos (III.6 y III.7).

III.6.- DISTRIBUCION POSICIONAL DE LOS ACIDOS GRASOS EN LOS TAG DEL TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL

El conocimiento de la especificidad o inespecificidad de posición o de especie de TAG en la acción de la TAG-lipasa sobre los triacilglicéridos del tejido se podría realizar de dos formas distintas:

- 1.- Mediante el aislamiento y purificación de la HSL y el posterior análisis de su acción sobre una emulsión de TAG de

distribución posicional conocida.

2.- Mediante el análisis de la distribución posicional de los ácidos grasos en los TAG del tejido y el posterior fraccionamiento y análisis en la composición de los $\alpha\beta$ -DAG, $\alpha'\beta$ -DAG α α' -DAG, α -MAG y β -MAG en condiciones de lipólisis.

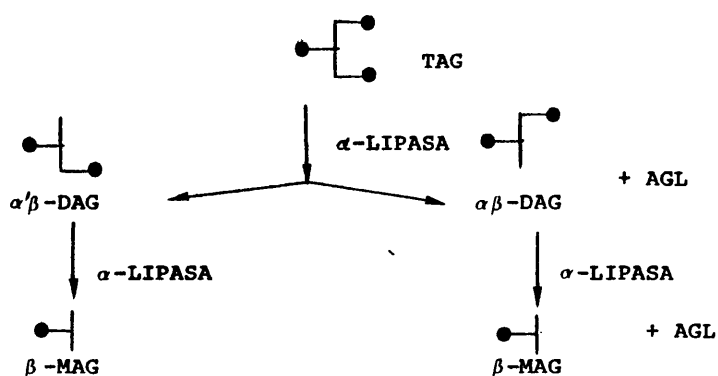
En nuestra elección del segundo método influyó decisivamente el buscar un sistema donde continuasen en funcionamiento los otros posibles mecanismos de recuperación de los ácidos grasos de cadena larga e insaturados, como es el de la vía de los MAG para la síntesis de TAG.

Para el análisis de la distribución posicional de los ácidos grasos partimos de TAG de tejido adiposo epididimal, obtenidos por fraccionamiento de los lípidos totales según II.1.3.b. y los sometimos a la acción de α -lipasa de *Rhizopus arrhizus* según la técnica descrita en II.2.5.

En la tabla XX se recoge la composición de los TAG sobre los que se realizó la acción de la alfa-lipasa y de las distintas fracciones producto de la acción enzimática sobre los Triacilglíceridos, la cual se realiza según el siguiente esquema:

TABLA XX.- COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE TAG Y DE LAS FRACCIONES DAG, MAG Y AGL
 OBTENIDAS TRAS LA ACCION DE α -LIPASA DE RHIZOPUS ARRIZUS SOBRE LOS TAG

ACIDO GRASO	TAG (4)	DAG (4)	MAG (4)	AGL (4)
14:0	1.65 ± 0.16	1.64 ± 0.20	1.05 ± 0.21	1.39 ± 0.19
16:0	22.88 ± 0.47	21.46 ± 0.36	14.76 ± 0.61	27.3 ± 0.60
16:1	9.93 ± 0.51	9.52 ± 0.26	10.28 ± 0.39	8.41 ± 0.41
18:0	2.42 ± 0.27	3.47 ± 0.30	1.14 ± 0.42	6.72 ± 0.48
18:1	30.88 ± 0.30	31.17 ± 0.36	31.73 ± 0.55	32.61 ± 0.77
18:2	32.22 ± 0.33	32.74 ± 0.53	41.06 ± 0.69	23.55 ± 0.29



La composición de la fracción AGL se debe corresponder con la composición en ácidos grasos de las posiciones $\alpha + \alpha'$.

La composición de la fracción MAG se debe corresponder con la composición en ácidos grasos de la posición β .

La composición de la fracción DAG se debe corresponder con una media de las posiciones α , β y α' . $\bar{M} = \frac{2\beta + \alpha + \alpha'}{4}$ y por lo tanto con la media de las posiciones β y $\alpha + \alpha'$ (MAG y AGL).

En la Tabla XXI se recogen las composiciones respectivas de las posiciones $\alpha + \alpha'$ y β , analizándose la significación de la heterogeneidad posicional.

Podemos observar como los ácidos grasos 16:0, 16:1, 18:0 y 18:2 tienen una marcada tendencia a disponerse en $\alpha + \alpha'$ o en β .

TABLA XXI.- ANALISIS EN LAS DIFERENCIAS EN LA POSICIONALIDAD DE LOS AG EN LA MOLECULA
DE LOS TAG

ACIDOS GRASOS	POSICION $\alpha + \alpha'$	POSICION β	t
14:0	1.39 \pm 0.19	1.05 \pm 0.21	1.04
16:0	27.30 \pm 0.60	14.76 \pm 0.61	12.67
16:1	8.41 \pm 0.41	10.28 \pm 0.39	2.88
18:0	6.72 \pm 0.48	1.14 \pm 0.42	7.54
18:1	32.61 \pm 0.77	31.73 \pm 0.55	0.81
18:2	23.55 \pm 0.29	41.03 \pm 0.69	20.33

mientras los ácidos 14:0 y 18:1 tienen una tendencia menor a disponerse en una determinada posición.

La Tabla XXII y figura 16 recogen el porcentaje de cada ácido graso que se dispone en $\alpha + \alpha'$ y en β , y de aquí podemos deducir que 14:0, 16:0, 18:0 y 18:1 se disponen preferentemente en $\alpha + \alpha'$ mientras que 16:1 y 18:2 lo hacen preferentemente en β .

Podemos además obtener un orden en la tendencia a la disposición en β a partir de las Tablas XXI y XXII: 18:2 > 16:1 > 18:1 > 14:0 > 16:0 > 18:0. En lo cual parece establecerse la posicionalidad β de los largos-insaturados y α, α' de los cortos saturados aunque no podemos deducir unas reglas claras en este ordenamiento.

Sin embargo existe un hecho singular que pudiera ser la clave en el proceso que venimos analizando en la presente tesis: la ordenación de los ácidos grasos en cuanto a su preferencia por la posición β coincide con su ordenación en cuanto a su punto de fusión como podemos observar en la siguiente Tabla:

Acidos Graso	18:2	16:1	18:1	14:0	16:0	18:0
Punto de Fusión °C	-5	-0.5	13.4	53.9	63.1	69.6

TABLA XXII.- DISTRIBUCION POSICIONAL DE LOS AG EN LA MOLECULA DE TAG

ACIDO GRASO	% EN POSICIONES $\alpha + \alpha'$	% EN POSICION β
distribución al azar	66.66	33.33
14:0	72.58	27.42
16:0	78.72	21.28
16:1	62.07	37.93
18:0	92.18	7.82
18:1	67.27	32.43
18:2	53.44	46.56

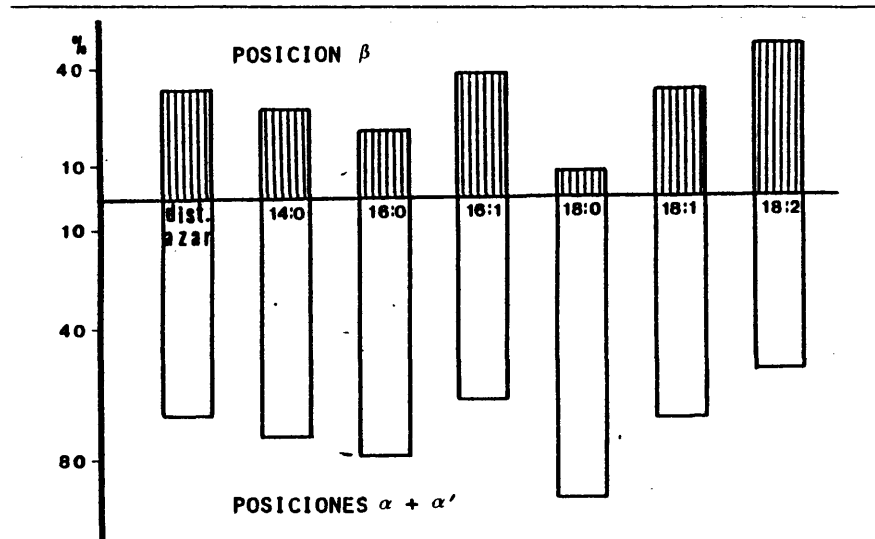


FIG. 16: DISTRIBUCION POSICIONAL DE LOS ACIDOS GRASOS DE TEJIDO ADIPOSEO, EN LA MOLECULA DE TAG.

Esta correspondencia entre ambos ordenamientos nos aproxima de nuevo a nuestra hipótesis, ya planteada en la introducción (pag. 52-55) de que los mecanismos hacen posible que durante el estímulo hormonal o durante el ayuno se produzca una acumulación de ácidos grasos de cadena larga-insaturados no sean sino un sistema cuyo objetivo es el de mantener un bajo punto de fusión de la gota grasa del adipocito que haga posible la actuación interfásica de la HSL-TAG-lípasa, la cual no se realizaría frente a una gota grasa en estado sólido

En este contexto sería analizable el triple efecto de las hormonas AMPc estimulantes, sobre tejido adiposo:

- estimulan la glucógeno-fosforilasa.
- estimulan la esterificación.
- estimulan la lipólisis.

El ciclo de Cahill explica uno de los posibles objetivos de este triple efecto: la producción de calor; sin embargo un análisis más exhaustivo nos lleva a plantear la posibilidad de que el ciclo sea más amplio en sus objetivos y no sea sino una forma de mantener el punto de fusión de los TAG mediante la regulación de su composición en ácidos grasos. Quizás dicho ciclo sea ampliable a los MAG, existiendo los mecanismos posibles para el cumplimiento de esta función:

- 1.- Estímulo de la esterificación con selectividad para los ácidos grasos largos-insaturados.
- 2.- Acción específicamente posicional de la TAG-lipasa.
- 3.- Estímulo de la biosíntesis de TAG "vía monoglicérido".
- 4.- Por liberación selectiva de ácidos grasos al medio.

Cuando analizamos los datos obtenidos en III.1, III.2, III.3 y III.4 desde estos modelos podemos observar que el orden de descenso porcentual de los ácidos grasos con el ayu no no coincide exactamente con el orden de preferencia posicional en $\alpha + \alpha'$ (Tablas XVII y XXII bis).

Orden de descenso 4 días ayuno	Orden de preferencia en β
16:1	18:0
16:0	16:0
14:0	14:0
18:0	18:1
18:1	16:1
18:2	18:2

Como podemos observar en esta Tabla las hipótesis 2 y 3 ex puestas anteriormente no se ajustan totalmente a la realidad ya que dos ácidos grasos (16:1 y 18:0) ocupan posiciones de des

censo porcentual con el ayuno que no les corresponde teóricamente.

Sin embargo cabría esperar que el orden de descenso porcentual no esté sólo en función de la capacidad de recuperación del tejido por sus ácidos grasos, sino que existe un factor de consumo de ácidos grasos por el organismo que en gran medida puede afectar a la concentración en suero de cada ácido graso. Vimos anteriormente (Tabla XVII) que el orden de descenso porcentual de los ácidos grasos en suero y tejido a los 4 días de ayuno, 4 días de ayuno + 5-HT y 8 días de ayuno +5-HT siguen un patrón común, variando únicamente a los 8 días de ayuno. Esto parece indicar la influencia de un factor de consumo que podría manifestarse en tejido a través del suero, posiblemente por la creación de un gradiente de concentraciones que fuese distinto para cada ácido graso.

Cuando analizamos el orden del gradiente observamos que en suero el porcentaje de 18:0 (13.02) es sensiblemente superior al de tejido (3.58), mientras que el % de 16:1 en suero (3.80) es sensiblemente inferior al de tejido (9.72). Esto nos induce a pensar que la variación en los porcentajes de cada ácido graso en tejido sea la resultante de dos fuerzas:

- 1.- La retención discriminatoria de unos ácidos grasos en función de su posición en la molécula de los TAG.
- 2.- El flujo de cada ácido graso en función de su distinto %

en suero y tejido.

La retención real ejercida por el tejido sobre cada ácido graso nos vendría dada en este caso por la variación de la tasa $\frac{\% \text{ Acido graso en tejido}}{\% \text{ Acido graso en suero}}$. El valor de esta relación para cada ácido graso es el siguiente:

Acido	0 días	4 días ayuno	8 días ayuno	14 días ayuno + serotonina	8 días ayuno + serotonina
14:0	2.80	2.58	6.24	2.45	2.79
16:0	1.20	1.23	0.91	1.14	1.015
16:1	2.56	2.89	2.99	2.34	4.51
18:0	0.275	0.265	0.43	0.24	0.23
18:1	2.59	2.50	2.30	1.72	2.29
18:2	0.89	1.00	1.07	1.53	1.66

Al expresar la relación $\frac{\% \text{ ácido graso tejido}}{\% \text{ ácido graso suero}}$ para cada ácido graso en los diferentes días de ayuno como $\frac{\% \text{ de su valor en el día 0 (controles)}}$ obtenemos los siguientes valores:

Acido	0 días	4 días ayuno	8 días ayuno	4 días ayuno + serotonina	8 días ayuno + serotonina
14:0	100	92.0	223	87.5	99.64
16:0	100	102.5	75.83	95	84.58
16:1	100	112.9	116.8	91.4	176.2
18:0	100	96.36	156.4	87.3	83.6
18:1	100	96.50	88.8	66.4	88.4
18:2	100	112.34	120.22	171.9	186.5

Podemos observar que la variación del valor de la relación % de AG en tejido/% de AG en suero es positiva en los diferentes días para los ácidos 18:2 y 16:1 (con un pequeño descenso a los 4 días de ayuno más serotonina); es decir, los ácidos grasos dispuestos preferentemente en β . Además el efecto de la serotonina parece manifestarse por un incremento de la relación en 18:2 y 16:1. Esto parece ligar el fenómeno de la esterificación que al parecer promueve la serotonina con el proceso de recuperación de los ácidos grasos en β .

En el aspecto técnico del experimento III.6, y como método que nos permite conocer el grado de fiabilidad de nuestros datos obtenidos en la incubación con alfa-lipasa hemos valorado la composición de los DAG tras la acción del enzima sobre los TAG y la hemos comparado (ver Tabla XXIII) con los valores teóricamente esperados a partir de los AGL (posiciones $\alpha+\alpha'$) y MAG (posición β). Las di

TABLA XXIII.- CORRELACION ENTRE LAS COMPOSICIONES TEORICA Y EXPERIMENTAL DE LAS
 α β + α' β -DAG OBTENIDAS POR ACCION DE LA α -LIPASA

ACIDO GRASO	α β + α' β -DAG teórico	α β + α' β -DAG experimental	t
14:0	(n=4) 1.22 ± 0.40	(n=4) 1.64 ± 0.20	0.81
16:0	21.03 ± 1.21	21.46 ± 0.36	0.29
16:1	9.35 ± 0.80	9.52 ± 0.26	0.18
18:0	3.93 ± 0.89	3.47 ± 0.30	0.43
18:1	32.17 ± 1.32	31.17 ± 0.36	0.63
18:2	32.29 ± 0.98	32.74 ± 0.53	0.35

ferencias entre ambas composiciones no son significativas, lo cual nos indica que el método empleado (sin utilización de detergentes) es altamente fiable.

III.7.- COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG Y $\alpha\alpha'$ -DAG DEL TEJIDO ADIPOSO EPIDIDIMAL DE RATA DURANTE EL AYUNO

El objetivo de este trabajo fué, junto a III.6, el de dilucidar de una forma clara si la HSL (TAG-lipasa) es un enzima dotada de especificidad posicional para los TAG ($\alpha\alpha'$ o β) o bien posee una mayor afinidad por ciertas especies de TAG.

Es evidente que caso de existir una especificidad posicional por parte del enzima cabría esperar en condiciones de estimulación de la lipólisis la producción exclusiva de ciertas formas isoméricas de DAG, concretamente $\alpha\beta$ y $\alpha'\beta$ -DAG, así como de β -MAG. Sin embargo esto no quiere decir aparición exclusiva de $\alpha\beta$ y $\alpha'\beta$ -DAG y β -MAG, puesto que existe un proceso de isomerización espontánea de $\alpha\beta$ y $\alpha'\beta$ -DAG en $\alpha\alpha'$ -DAG, y de β -MAG en α -MAG:

Sin embargo hemos considerado que a pesar del proceso de isomerización, el conocimiento de la composición de las fracciones $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG y $\alpha\alpha'$ -DAG sería suficiente para resolver el problema si ésta última procede de la isomerización de la

primera o bien es el producto de la acción de la TAG-lipasa, en cuanto cabe esperar que si su procedencia fuese por isomerización la composición en ácidos grasos sería similar para ambas fracciones, mientras que en el caso de ser la acción de la HSL al azar cabría esperar que la composición de ambas fracciones fuese distintas y ambas se ajustasen a las composiciones teóricamente deducidas a partir de la conocida distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de TAG (III.6), aún existiendo una influencia en la composición de la fracción α α' -DAG debida a la isomerización.

Para la realización de este trabajo utilizamos ratas de 250 a 300 g . de peso a las que sometimos a ayuno durante 48 horas y obtuvimos su tejido adiposo epididimal para el fraccionamiento de los lípidos.

III.7.a.- Los lípidos totales obtenidos fueron separados en una primera etapa en las fracciones TAG, AGL, DAG y MAG + FL según la técnica descrita en II.2.5.

En una segunda etapa los DAG fueron recromatografiados según la técnica descrita en II.4.1. al objeto de obtener las fracciones:

- 1.- $\alpha \beta + \alpha' \beta$ -DAG
- 2.- $\alpha \alpha'$ -DAG.

Ambas fracciones fueron recogidas para el posterior análisis cuantitativo en AG, por C.G.L. por inyección directa (técnica descrita en II.2.6).

En la Tabla XXIV recogemos la composición de la fracción -DAG obtenida experimentalmente y la comparamos con los valores teóricos que calculamos de los datos obtenidos en III.6 (Tablas XXI y XXIII) sobre la composición de las posiciones

Como podemos observar las diferencias son significativas para los ácidos grasos 14:0, 16:1 18:1 y 18:2, siendo no significativas para los ácidos 16:0 y 18:0.

En la Tabla XXV se recogen los valores obtenidos experimentalmente sobre la composición de la fracción $\alpha \beta + \alpha' \beta$ -DAG del tejido y la comparamos con los valores teóricos, calculados a partir de los datos obtenidos en III.6 (Tablas XXI y XXIII) sobre composición de las posiciones $\alpha + \alpha'$ y β de los TAG del tejido. Se observan diferencias significativas únicamente en 16:0 y 18:1, siendo las diferencias entre los valores teóricos y experimentales no significativas para el resto de los AG (14:0, 16:1, 18:0 y 18:2).

La correlación entre las composiciones de la fracción $\alpha \alpha'$ -DAG de tejido y la esperada teóricamente para una ruptura al azar es negativa como hemos podido ver, siendo bastante buena

TABLA XXIV.- COMPOSICION DE LAS α α' -DAG OBTENIDAS DE TEJIDO ADIPOSEO UTILIZANDO
 2 C.C.F. SUCESIVAS Y CORRELACION CON UNA RUPTURA AL AZAR.

ACIDOS GRASOS	α α' -DAG teórico	α α' -DAG experimental	t
14:0	1.39 \pm 0.19	2.81 \pm 0.16	4.58
16:0	27.30 \pm 0.58	27.53 \pm 0.47	0.25
16:1	8.41 \pm 0.41	11.17 \pm 0.39	4.00
18:0	6.72 \pm 0.48	4.66 \pm 0.51	2.45
18:1	32.61 \pm 0.77	28.21 \pm 0.38	3.94
18:2	23.55 \pm 0.29	25.61 \pm 0.38	4.68

TABLA XXV.- COMPOSICION DE LOS $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG OBTENIDOS DE TEJIDO ADIPOSEO UTILIZANDO
 2 c.c.F. SUCESIVAS Y CORRELACION CON UNA RUPTURA AL AZAR

ACIDO GRASO	$\alpha\beta + \alpha'\beta$ (n=4)	-DAG teórico	$\alpha\beta + \alpha'\beta$ (n=5)	-DAG experimental	t
14:0	1.22 ± 0.40		2.14 ± 0.20		1.92
16:0	21.03 ± 1.21		25.29 ± 0.54		3.02
16:1	9.35 ± 0.80		10.87 ± 0.47		1.50
18:0	3.93 ± 0.89		2.81 ± 0.54		0.99
18:1	32.17 ± 1.32		28.46 ± 0.34		2.63
18:2	32.29 ± 0.98		30.43 ± 0.41		1.66

para la fracción $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG esto no nos permite llegar a una conclusión clara, puesto que si bien observamos una significación en las diferencias de la fracción $\alpha\alpha'$ -DAG con una ruptura al azar, los ácidos grasos que con mayor proporción se disponen en posiciones $\alpha + \alpha'$ y menor en β (18:0 y 16:0) no tiene diferencias significativas en ninguna de las fracciones con los valores teóricamente esperados. Además es evidente la existencia de una diferencia significativa para 18:2 (el ácido en mayor proporción dispuesto en β) entre las fracciones $\alpha\alpha'$ -DAG experimental y $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG experimental ($t = 6.66$).

Los valores cuantitativos para ambas fracciones son (en 50 mg. de tejido):

AG de $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG	...	105.52	\pm	1.57 ug	(9.56 uequ/g.tej.)
AG de $\alpha\alpha'$ -DAG	...	77.03	\pm	1.60 ug	(7.14 uequ/g.tej.)

Siendo la relación (AG de $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG)/(AG de $\alpha\alpha'$ -DAG) = 1.34, difiriendo significativamente del valor de la ruptura al azar (2/1) y siendo mayor de la esperada la concentración ($\alpha\alpha'$ -DAG).

Esto nos llevó a tratar de reducir al mínimo la influencia de las técnicas empleadas buscando un sistema que evitase la recromatografía por cuanto implica de pérdida de material en

el proceso de raspado y depósito de la muestra en la segunda cromatografía, así como la existencia en el raspado de la primera de grandes cantidades de ácido acético procedente de la fase móvil y que puede favorecer el proceso de isomerización.

III.7.b.- En este caso preferimos utilizar el sistema descrito en II.4.2 mediante el cual se produce una menor resolución entre las fracciones $\alpha \beta + \alpha' \beta$ -DAG y $\alpha \alpha'$ -DAG, que aparecen más juntas pero que nos dan una mayor fiabilidad en los resultados cuantitativos al no existir recromatografía y al evitar el posible fenómeno de isomerización imputable a la existencia de ácido acético en el medio entre dos cromatografías.

Fueron desechadas todas las placas en las que nos se produjo una distancia óptima entre ambas fracciones, las que corrieron irregularmente (no linealmente) y aquellas en las que el raspado pudiera causar a nuestro juicio la más leve contaminación. Por este motivo únicamente fueron utilizadas para su valoración por C.G.L. las fracciones procedentes de tres placas de las diecinueve realizadas.

En la Tabla XXVI podemos observar la composición de los $\alpha \alpha'$ -DAG obtenidos así como los valores teóricamente esperados para una ruptura al azar y vemos que no se producen diferencias significativas para ningún ácido graso.

TABLA XXVI.- COMPOSICION DE LOS α α' -DAG OBTENIDOS DE TEJIDO ADIPOSEO UTILIZANDO UN
 SOLO DESARROLLO CROMATOGRAFICO Y CORRELACION CON UNA RUPTURA AL AZAR

ACIDOS GRASOS	α α' -DAG teórico (n=4)	α α' -DAG experimental (n=3)	t
14:0	1.39 \pm 0.19	2.06 \pm 0.29	1.67
16:0	27.30 \pm 0.58	29.71 \pm 0.63	2.36
16:1	8.41 \pm 0.41	8.52 \pm 0.49	0.15
18:0	6.72 \pm 0.48	4.82 \pm 0.59	2.13
18:1	32.61 \pm 0.77	31.80 \pm 0.55	0.68
18:2	23.55 \pm 0.29	23.12 \pm 0.58	0.61

En la Tabla XXVII se recogen las composiciones de los $\alpha \beta + \alpha' \beta$ -DAG obtenidos y de los $\alpha \beta + \alpha' \beta$ -DAG esperados y que fueron calculados a partir de las composiciones de las posiciones $\alpha + \alpha'$ y β (Tablas XXI y XXIII). Se observa que tampoco en esta fracción se producen diferencias significativas para ningún ácido graso.

La cantidad de ácidos grasos de cadena larga obtenidos a partir de 40 mg. de tejido fueron:

AG en $\alpha \beta + \alpha' \beta$ -DAG ... 76.77 \pm 0.91 ug (7.1 uequ/ g. tejido)
 AG en $\alpha \alpha'$ -DAG ... 42.60 \pm 0.91 ug (3.94 uequ/g. tejido)

Siendo la relación $\frac{(\text{AG en } \alpha \beta + \alpha' \beta \text{ -DAG})}{(\text{AG en } \alpha \alpha' \text{ -DAG})} = 1.79$

Este trabajo nos permite deducir:

- 1.- La no existencia de significación en la diferencia entre los $\alpha \beta + \alpha' \beta$ -DAG esperados y obtenidos experimentalmente.
- 2.- La no existencia de significación en las diferencias entre los $\alpha \alpha'$ -DAG esperados y obtenidos experimentalmente.
- 3.- El acercamiento de la relación $\frac{(\alpha \beta + \alpha' \beta \text{ -DAG})}{(\alpha \alpha' \text{ -DAG})}$ al valor de 2/1 esperado para una ruptura al azar, e idéntico grado de metabolización, lo cual nos permite sugerir que la ruptura provocada por la HSL (TAG-lipasa) sea una ruptura al azar, no poseyendo preferencia por las posiciones α o β de los TAG.

TABLA XXVII.- COMPOSICION DE LOS $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG OBTENIDOS DE TEJIDO ADIPOSO UTILIZANDO UN SOLO DESARROLLO CROMATOGRAFICO Y CORRELACION CON UNA RUPTURA AL AZAR

ACIDO GRASO	$\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG teórico	$\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG experimental	t
14:0	1.22 ± 0.40	1.72 ± 0.24	0.83
16:0	21.03 ± 1.21	23.44 ± 0.51	1.39
16:1	9.35 ± 0.80	10.75 ± 0.53	1.15
18:0	3.93 ± 0.89	1.84 ± 0.39	1.63
18:1	32.17 ± 1.32	30.45 ± 0.44	0.92
18:2	32.29 ± 0.98	31.80 ± 0.43	0.35

Por otra parte es de destacar un fenómeno que sistemáticamente se repite en los análisis por C.G.L.: en los cromatogramas en los que se analizan los AG de DAG aparecen elevadas proporciones de AG de cadena inferior a los 14C mientras que en los procedentes de TAG son sólo trazas (ver figura 17). Únicamente aparecen estos AG en cierta proporción (no cuantificable por las técnicas empleadas) en la fracción MAG. Además la proporción es parecida (no cuantificable) en $\alpha\beta + \alpha'\beta$ -DAG y en $\alpha\alpha'$ -DAG. Este fenómeno puede deberse quizás a una cierta selectividad de la TAG-lipasa o de otros enzimas (DAG-lipasa) por el tamaño de la cadena.

CROMATOGRAMA DE ACIDOS GRASOS
DE TAG DE TEJIDO ADIPOSEO.

CROMATOGRAMA DE ACIDOS GRASOS
DE DAG DE TEJIDO ADIPOSEO.

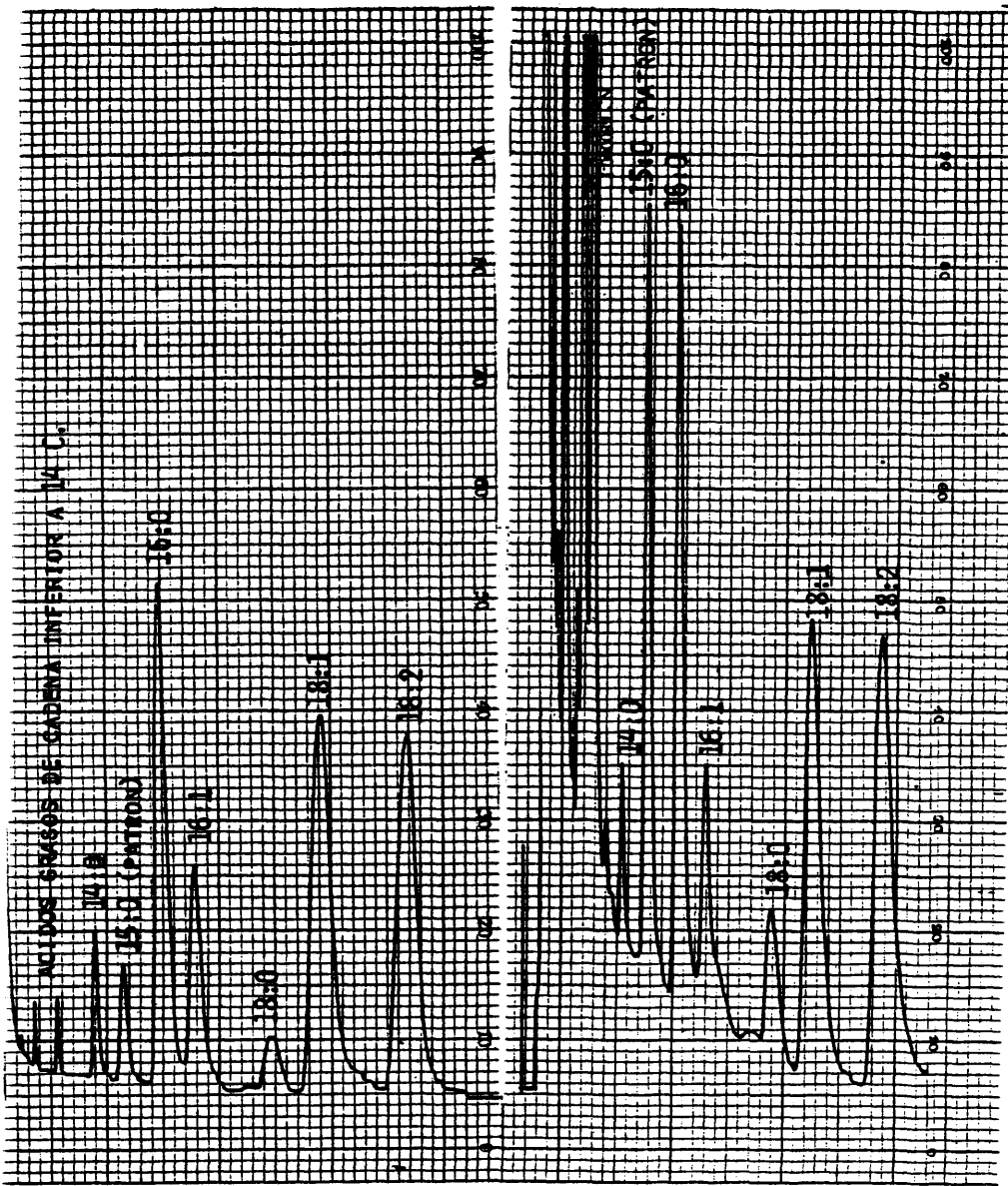


Fig 17: DIFERENCIA EN LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE CADENA CORTA ENTRE LAS FRACCIONES TAG Y DAG.

III.8.- ACCION DE LA SEROTONINA SOBRE EL PROCESO LIPOLISIS-ESTERIFICACION EN ADIPOCITOS AISLADOS

En este trabajo hemos realizado la incubación de adipocitos aislados, con y sin serotonina, según la técnica descrita en II.2 y valoramos por C.G.L. los ácidos grasos liberados al medio, los ácidos grasos libres en el interior del adipocito, así como los ácidos grasos esterificados en forma de DAG; utilizamos distintos tiempos de incubación: 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos y 30 minutos (técnicas descritas en II.2.2, 3 y 4).

En los controles, incubados sin serotonina se observa un paulatino proceso de descenso en la cantidad total de ácidos grasos libres entre los 5 y 30 min. (ver Tabla XXVIII y figura 18) que debe interpretarse como un proceso de esterificación.

En los adipocitos incubados en presencia de 5-HT observamos que tanto a los 5 como a los 10 min. la cantidad total de AGL es inferior a la de los controles, hecho que interpretamos como un estímulo de la esterificación por la 5-HT.

Sin embargo tanto a los 20 como a los 30 min. se produce una inversión del proceso, puesto que se produce un incremento de los AGL que es máximo a los 20 minutos.

Cuando analizamos las variaciones en la concentración de DAG

TABLA XXVIII.- ACIDOS GRASOS LIBRES (MEDIO+INTERIOR) EN INCUBACIONES DE ADIPOCITOS AISLADOS. CONTROLES (C) Y CON SEROTONINA (S). EXPRESADO EN μ g ACIDO GRASO/ /g TEJIDO.

TIEMPOS	n	x	E.S.
5C	4	1689.42	\pm 195.14
10C	3	1293.82	\pm 78.62
20C	4	1264.79	\pm 54.28
30C	4	1229.85	\pm 86.40
5S	3	1366.79	\pm 103.42
10S	4	1170.72	\pm 36.47
20S	4	1509.56	\pm 55.80
30S	3	1438.64	\pm 139.18

TABLA XXIX.- ACIDOS GRASOS ESTERIFICADOS EN FORMA DE DAG EN INCUBACIONES DE ADIPOCITOS AISLADOS. CONTROLES (C) Y CON SEROTONINA (S). EXPRESADO EN μ g DE ACIDO GRASO/gDE TEJIDO.

TIEMPOS	n	\bar{x}	E.S.
5C	4	11439.79	\pm 227.18
10C	4	9749.86	\pm 398.14
20C	4	8428.35	\pm 375.22
30C	4	8317.95	\pm 184.23
5S	4	9586.54	\pm 296.14
10S	4	7987.25	\pm 246.35
20S	4	10689.31	\pm 195.28
30S	3	9504.30	\pm 225.49

175

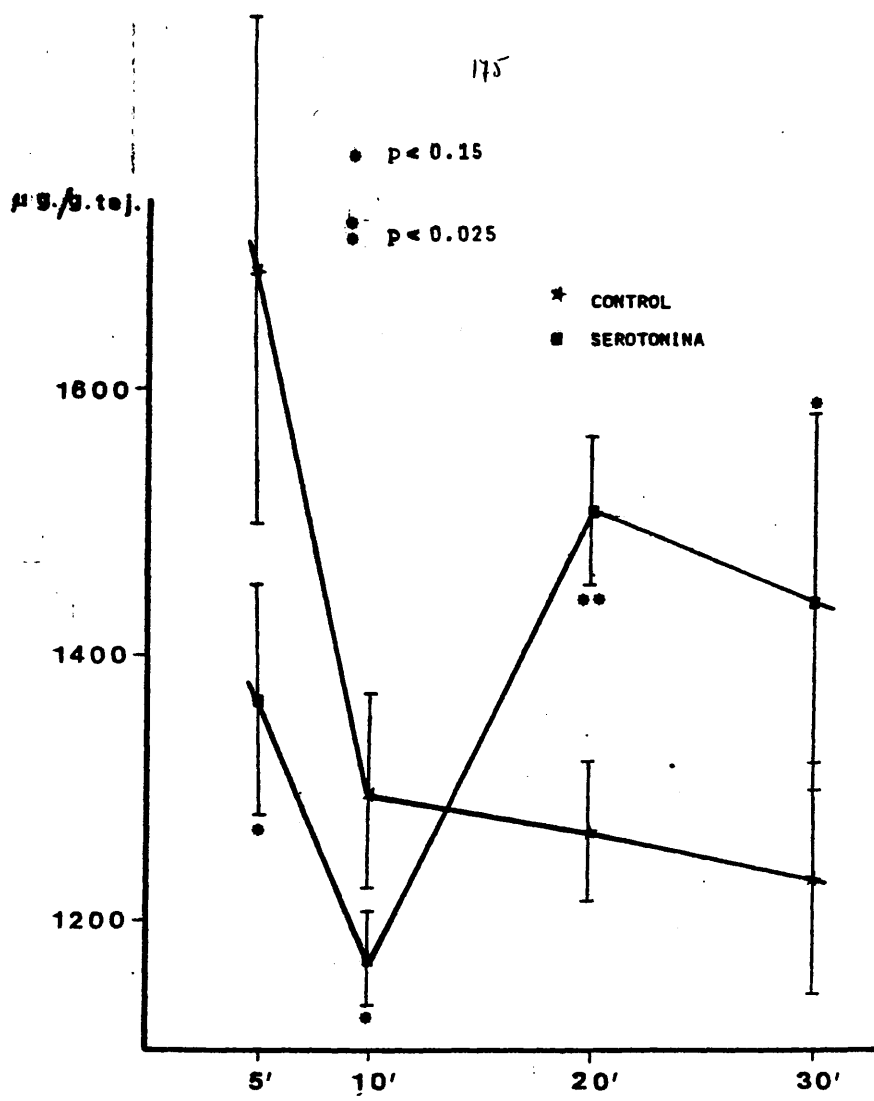


FIG. 18: VARIACIONES EN LA CONCENTRACION DE AC. GRASOS (MEDIO-INTERIOR ADIPOCITOS) DURANTE EL TIEMPO DE INCUBACION, EN CONTROLES Y CON SEROTONINA.

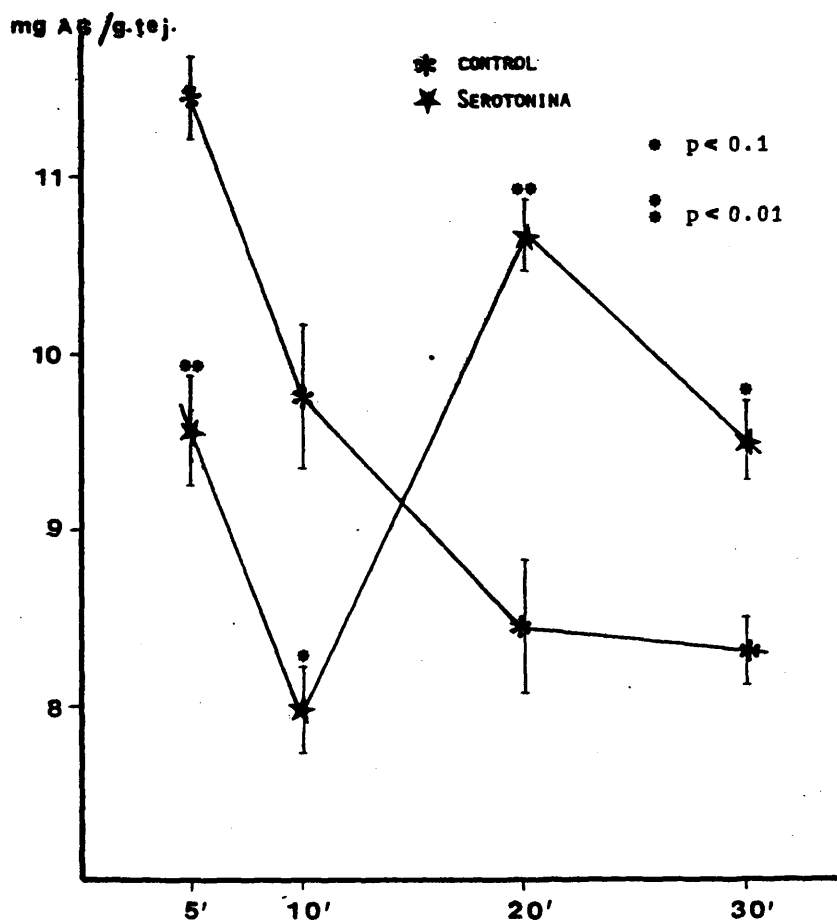


Fig. 19: VARIACIONES EN LA CONCENTRACION DE ACIDOS GRASOS EN DAG DURANTE EL TIEMPO DE INCUBACION, EN CONTROLES Y CON SEROTONINA.

(expresados en función de los AG componentes) observamos (Tabla XXIX y figura 19) que en los controles se produce un proceso de descenso que dura todo el tiempo de incubación (de los 5 a los 30 min.) mientras que en los adipocitos incubados con serotonina el descenso en la concentración de DAG es más acusado que en los controles tanto a los 5 como a los 10 min. A los 20 y 30 minutos se invierte el sentido del proceso, al igual que ocurría con los AGL, produciéndose un aumento de los DAG que es máximo a los 20 min.

Del análisis de estos datos puede deducirse que el proceso de esterificación se realiza con un descenso paralelo (figuras 20 y 21) de los AGL y DAG. Este hecho es de capital importancia, en el sentido de que si el proceso de esterificación se realiza preferentemente por la vía biosintética "de novo" el descenso en la cantidad de AGL iría acompañado de un proceso de incremento en DAG; sin embargo esto no ocurre así sino que se produce el fenómeno inverso, lo cual parece indicar claramente que la esterificación en los controles y la incrementada por la serotonina se produce preferentemente sobre el último paso de la biosíntesis: $\text{DAG} + \text{Acil-CoA} \longrightarrow \text{TAG} + \text{CoA-SH}$

Por otra parte el análisis de los datos cuantitativos de las Tablas XXVIII y XXIX evidencia que en el proceso de esterificación el descenso de AGL y DAG no se realiza en la relación 1:2 que aproximadamente debería resultar de la sola actividad de la dia-

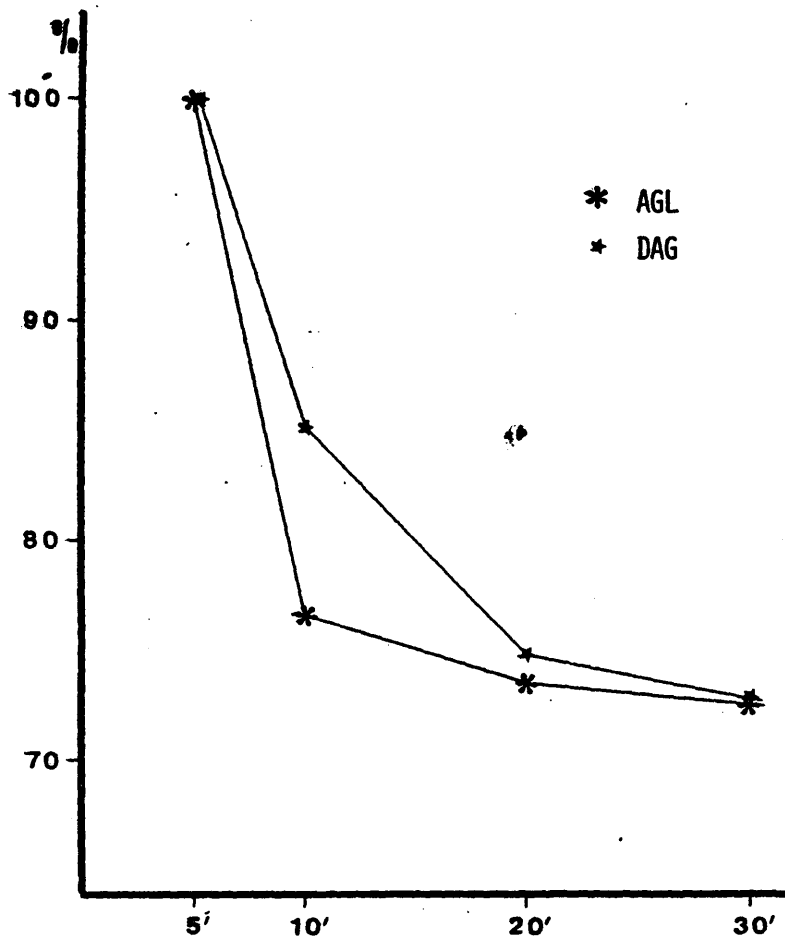


FIG. 20: VARIACION PORCENTUAL DE LOS AGL Y ACIDOS GRASOS DE DAG EN CONTROLES.

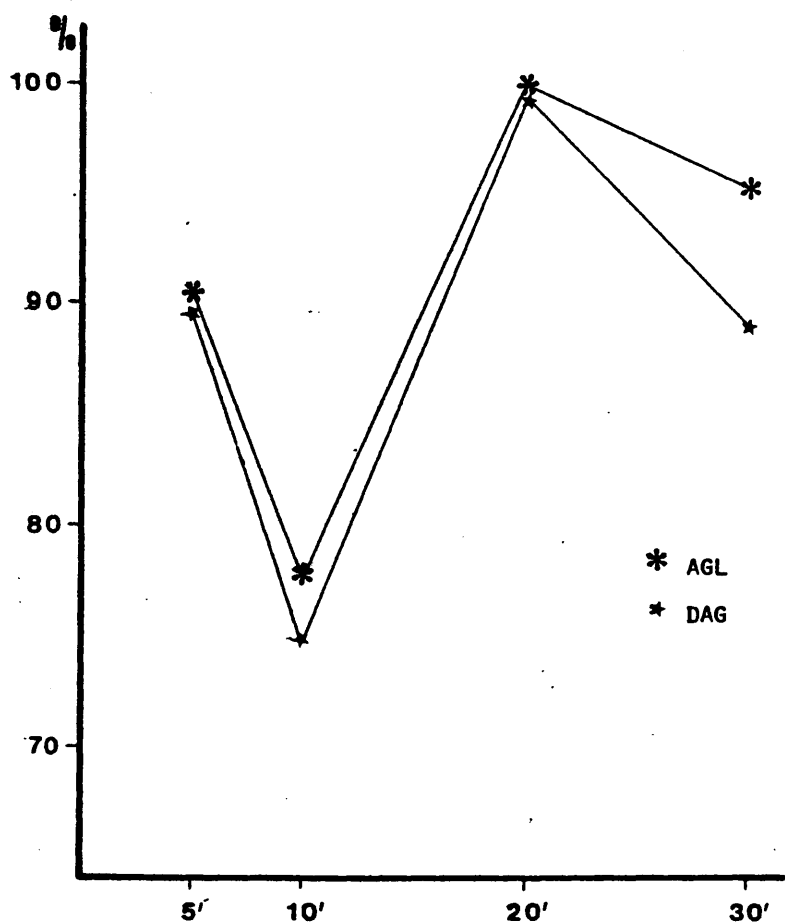


FIG. 21: VARIACION PORCENTUAL DE LOS AGL Y ACIDOS GRASOS DE DAG EN INCUBACIONES CON SEROTONINA.

cilglicerol - aciltransferasa, sino que es mucho mayor, lo cual parece indicar que el proceso de ruptura de DAG hasta AGL y glicerol continúa durante este proceso aunque el balance global sea una activación de la esterificación. En las incubaciones con serotonina, a los 20 y 30 min., se observa sin embargo que aún continuando el proceso de hidrólisis de DAG se produce una acumulación de los mismos con la lipólisis; parece claro por lo tanto que el grado de actividad de la TAG-lipasa es superior al de la DAG-lipasa. Este incremento en las concentraciones de DAG parece poner de manifiesto la exactitud de los discutidos resultados de SCOW (1965), que encontraba un incremento de la densidad de las bandas de DAG en placa fina durante la lipólisis estimulada por ACTH.

Además encontramos que la cantidad de MAG con la lipólisis no se incrementa en forma apreciable, impidiendo en la práctica revelar la banda de MAG en la placa fina y su posterior análisis por C.G.L. Este hecho también coincide con los resultados de SCOW (1965) que no encontraba cantidades apreciables de MAG en placa fina; sin embargo debe tenerse en cuenta que las cantidades de adipocitos utilizadas (una media de 60 mg.) son demasiado bajas a efecto de valorar la fracción MAG.

La esterificación promovida por la serotonina parece estar asimismo acorde con los resultados obtenidos por SHAFRIR y KERPEL (1961) que encontró esterificación en los primeros minu-

tos de incubación promovida por la epinefrina y previa a la ac
tivación de la lipólisis.

Las cantidades de AGL liberadas al medio sufren incrementos muy pequeños con la lipólisis (Tabla XXX y figura 22), siendo inferiores a los controles. Esto podría deberse a una saturación de la albúmina en su capacidad de transporte de ácidos grasos. Hemos comprobado que la albúmina totalmente exenta de ácidos grasos de Sigma (AGL inferior a 0.005%) no alcanza una tasa moles AGL/moles albúmina superior a 0.28, pero hemos pre
ferido utilizar este tipo de albúmina por la orientación de nuestro trabajo hacia el análisis de la especificidad del proceso lipólisis-esterificación por los distintos ácidos grasos; con ello hemos tratado de evitar la influencia de la distinta compo
sición de los AGL ligados a la albúmina bovina y los AG de teji
do adiposo de rata.

Las variaciones en la composición de las fracciones DAG y AGL son, en nuestra opinión, de gran importancia de cara a cono
cer los mecanismos de liberación selectiva de ácidos grasos, así como de los procesos de creación y/o conservación de la dis
tinta posicionalidad de los diferentes ácidos grasos en la mo
lécula de TAG del tejido adiposo.

En la Tabla XXXI podemos analizar la composición en AG de loa DAG a los 5, 10, 20 y 30 minutos tanto en controles como en

**TABLA XXX.- ACIDOS GRASOS LIBERADOS AL MEDIO EN INCUBACIONES DE ADIPOCITOS AISLADOS. CONTROLES (C) Y CON SE-
ROTONINA (S). EXPRESADO EN ug ACIDO GRASO / g DE
TEJIDO.**

TIEMPOS	n	\bar{x}	E.S.
5C	4	927.55	\pm 35.42
10C	4	977.74	\pm 49.91
20C	4	979.82	\pm 29.63
30C	4	998.86	\pm 65.36
5S	4	824.67	\pm 28.32
10S	4	865.46	\pm 35.27
20S	4	912.60	\pm 52.28
30S	4	887.48	\pm 17.48

• p < 0.10
•• p < 0.05

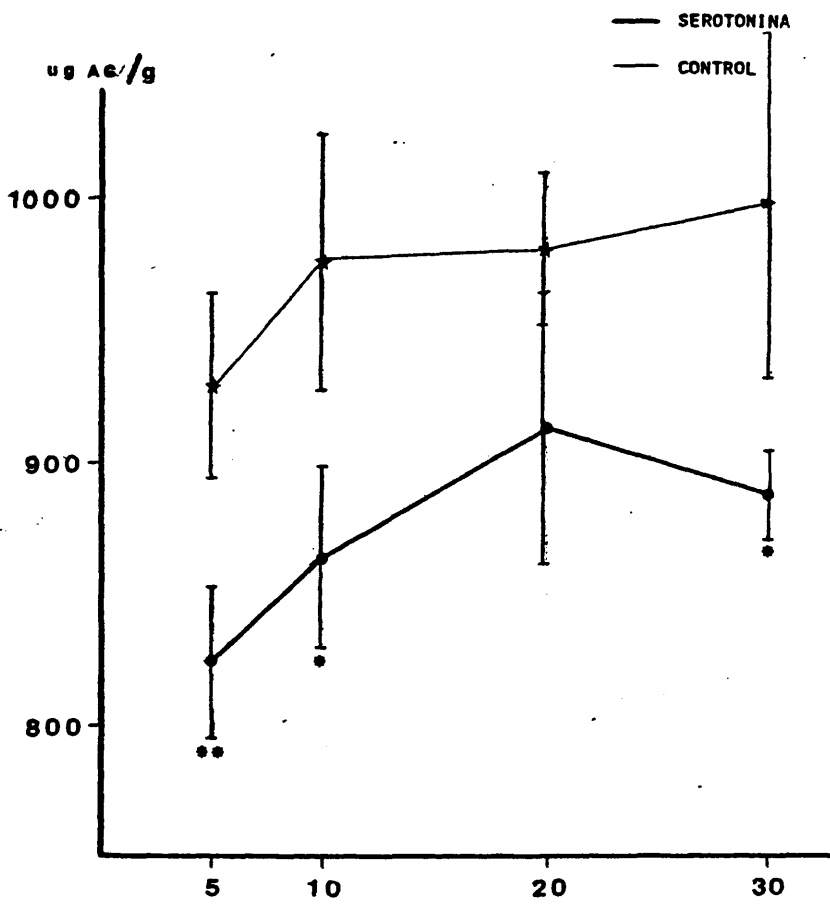


Fig. 22: ACIDOS GRASOS LIBERADOS AL MEDIO DE INCUBACION EN DISTINTOS TIEMPOS.

TABLA XXXI.- COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS DAG EN INCUBACION DE ADIPOCITOS AISLADOS
CONTROLES (C) Y CON SEROTONINA (S).

ACIDOS	5C	10C	20C	30C	5S	10S	20S	30S
	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4	n=4
16:0	24.56 ±0.86	25.64 ±0.59	25.41 ±0.81	25.59 ±0.39	25.16 ±0.61	25.79 ±0.46	23.98 ±0.39	23.90 ±0.47
16:1	8.57 ±0.78	8.47 ±0.51	8.02 ±0.58	7.34 ±0.47	7.39 ±0.60	6.68 ±0.54	9.90 ±0.51	9.25 ±0.49
18:0	5.88 ±0.67	6.60 ±0.39	8.42 ±0.46	8.86 ±0.70	7.99 ±0.44	8.93 ±0.38	5.46 ±0.37	5.45 ±0.35
18:1	33.14 ±0.82	34.27 ±0.49	34.37 ±0.54	35.54 ±0.62	34.62 ±0.64	35.92 ±0.57	32.86 ±0.61	33.21 ±0.56
18:2	27.96 ±0.33	25.02 ±0.89	23.77 ±0.72	22.67 ±0.65	24.85 ±0.93	22.77 ±0.98	27.81 ±0.75	28.18 ±0.88

182

incubaciones con serotonina.

En los controles el ácido 16:0 sufre un incremento coincidente con la esterificación de los 5 a los 30 minutos, mientras que en la incubación con serotonina se produce un incremento (con respecto al control de 5 min.) a los 5 y 10 minutos paralelo a la esterificación. Los valores mínimos, a los 20 y 30 minutos, se corresponden por lo tanto con la lipólisis.

Este mismo fenómeno lo podemos observar en los ácidos 18:0 y 18:1, en los cuales se produce también una correlación entre esterificación e incremento porcentual y lipólisis y descenso porcentual. En la Tabla XXXII y figura 23 representamos el porcentaje de cada ácido graso (16:0, 18:0 y 18:1) en controles e incubaciones con serotonina expresado como % y asignando el valor 100% al punto de máxima concentración en DAG (control 5 minutos). Podemos observar como se corresponden los descensos en la concentración de DAG con incrementos en los porcentajes de estos ácidos grasos y los incrementos que se producen a 20 y 30 minutos con serotonina con disminuciones en el porcentaje de 16:0, 18:0 y 18:1.

En la Tabla XXXII y figura 24 se representan los porcentajes de los ácidos grasos 16:1 y 18:2 expresados en base al control de 5 minutos (100%). Vemos una correspondencia entre los descensos en la concentración de DAG y los descensos en los porcenta

TABLA XXXII.- VARIACION PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS EN DAG DURANTE LA INCUBACION DE ADIPOCITOS TOMANDO COMO REFERENCIA EL CONTROL 5 MINUTOS. CONTROLES (C) Y CON SEROTONINA (S).

ACIDOS	5C	10C	28C	30C	5S	10S	20S	30S
16:0	100	104.38	103.44	104.19	102.42	104.62	97.62	97.99
16:1	100	98.77	93.58	85.65	86.17	77.89	115.46	107.93
18:0	100	112.34	143.23	150.72	135.90	151.91	92.85	92.68
18:1	100	103.43	103.74	107.27	104.47	108.42	99.17	100.24
18:2	100	89.50	85.03	81.08	88.88	81.46	99.46	100.77

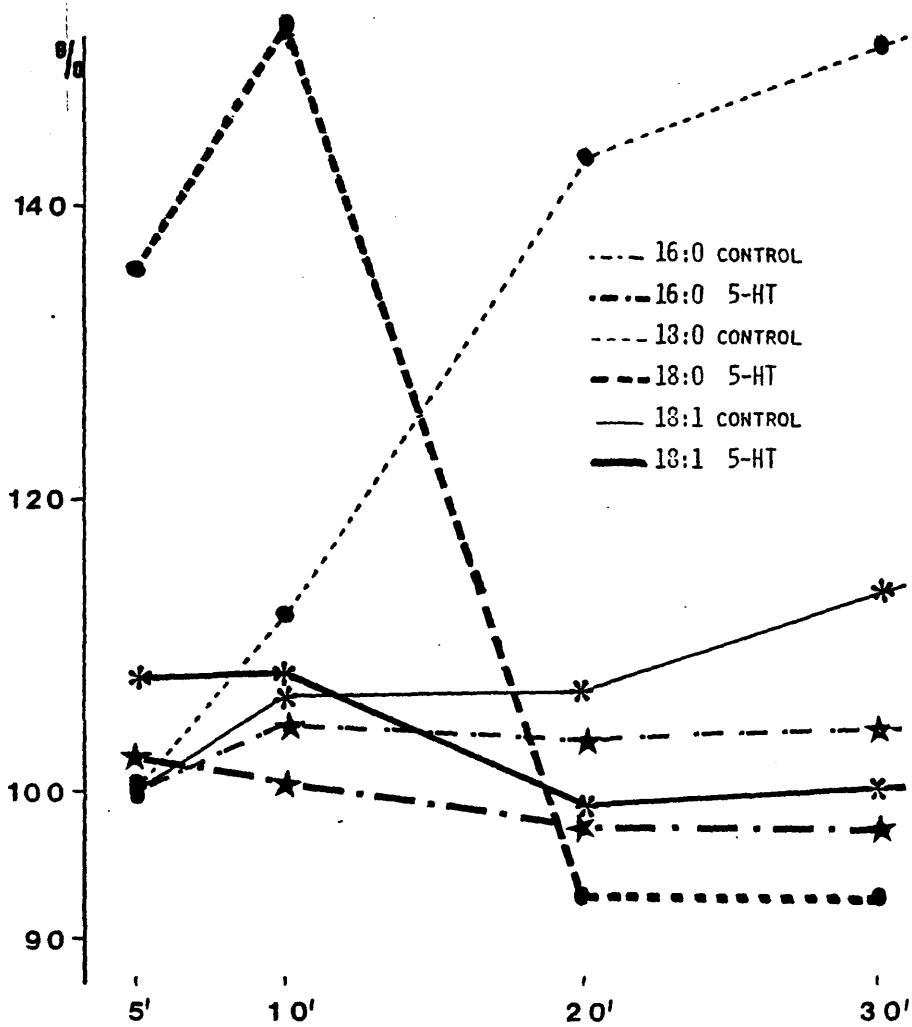


Fig. 23: VARIACION PORCENTUAL DE 16:0, 18:0 Y 18:1 EN:
 INCUBACION DE ADIPOCITOS, VALORES EXPRESADOS
 RESPECTO DEL CONTROL 5 MINUTOS (100%).

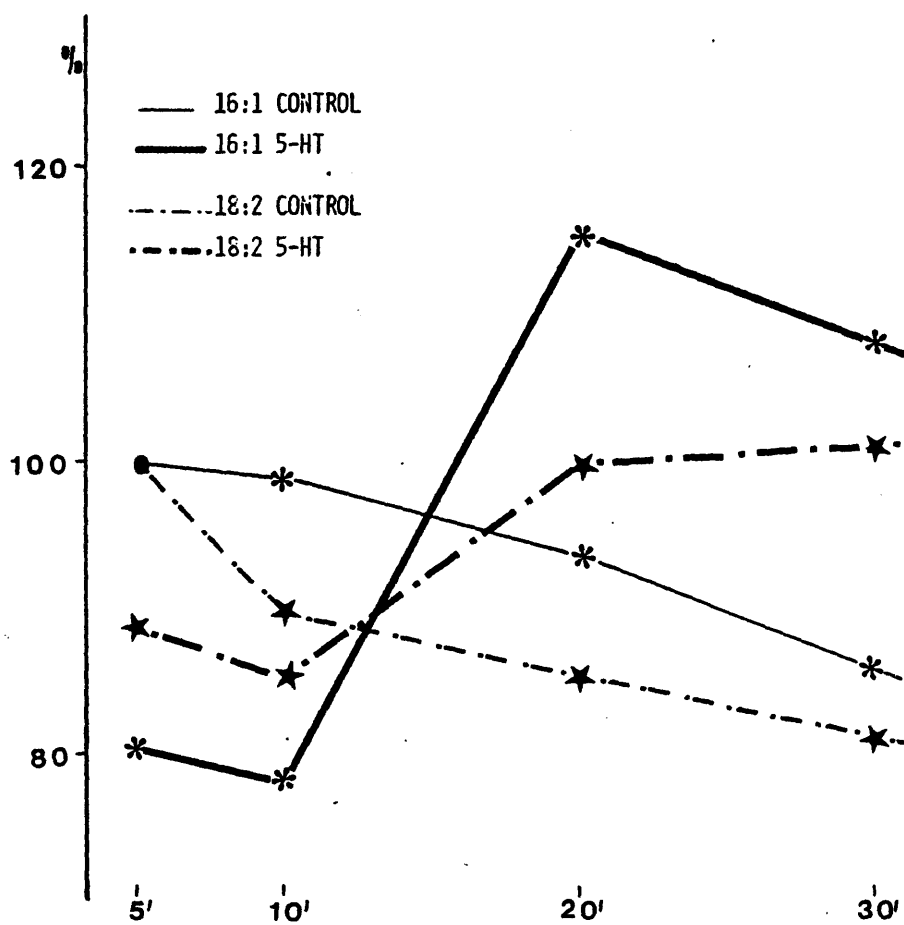


FIG. 24: VARIACION PORCENTUAL DE 16:1 Y 18:2 EN INCUBACION DE ADIPOCITOS. VALORES EXPRESADOS RESPECTO DEL CONTROL 5 MINUTOS. (100%).

jes de estos ácidos, así como una correlación entre los incrementos de los porcentajes de 16:1 y 18:2 y los incrementos en la concentración de DAG (20 y 30 minutos con serotonina).

En la Tabla XXXIII se recoge el orden de descenso porcentual de los ácidos grasos en DAG durante la incubación (sobre los datos de las Tablas XXXI y XXXII).

Observamos que los ácidos grasos 18:2 y 16:1, preferentemente dispuestos en β (ver Tabla XXII) son los que ocupan una situación más alta en el descenso porcentual durante la esterificación (10'C, 20'C, 30'C, 5'S y 10'S), que interpretamos como la resultante de la actividad selectiva de la diacilglicerol-aciltransferasa por los α, β -DAG en cuya estructura deben participar preferentemente estos dos ácidos grasos; lo cual pudiera constituir la base del mecanismo de creación y/o conservación de la posicionalidad en β de estos ácidos grasos.

Los ácidos 16:0, 18:0 y 18:1, dispuestos en $\alpha + \alpha'$, sufren un incremento porcentual en estos tiempos, siendo el 18:0 el ácido que mayor preferencia posee por las posiciones $\alpha + \alpha'$ el que sufre un mayor incremento.

A los 20 y 30 min. de incubación, y coincidiendo con el proceso lipolítico, se produce un cambio en el orden de descensos porcentuales, lo cual entendemos que debe interpretarse en el

TABLA XXXIII.- ORDEN EN EL DESCENSO PORCENTUAL DE LOS ACIDOS GRASOS EN DAG DURANTE LA INCUBACION DE ADIPOCITOS CON RESPECTO AL CONTROL 5 MINUTOS.

	10 C	20C	30C	5S	10S	20S	30S
	18:2	18:2	18:2	16:1	16:1	18:0	18:0
	16:1	16:1	16:1	18:2	18:2	16:0	16:0
	18:1	16:0	16:0	16:0	18:0	18:1	18:1
	16:0	18:1	18:1	18:1	18:1	18:2	18:2
	18:0	18:0	18:0	18:0	18:0	16:1	16:1

sentido de que la ruptura al azar de los TAG por la HSL-TAG-li pasa tiende a restaurar una composición similar a la de los TAG. Efectivamente el ácido 18:0 sufre ahora un notable descenso puesto que era el más incrementado en las condiciones de esterificación mientras que 16:1 y 18:2 tienden a recuperar su porcentaje en TAG.

Las Tablas XXXIV y XXXV recogen, respectivamente, los % de cada ácido graso en el medio y el interior del tejido a los diferentes tiempos de incubación con y sin serotonina.

Vemos que la composición de ácidos grasos liberados al medio no sufre importantes oscilaciones a lo largo del tiempo, y que no parece seguir una pauta en relación al proceso lipólisis-esterificación. Este mismo fenómeno lo encontramos en los ácidos grasos libres del interior de los adipocitos.

En cuanto a la composición de ambas fracciones observamos que son bastantes homogéneas, lo cual parece poner de manifiesto que no existe un factor de "solubilidad" o de diferente grado de liberación al medio para los distintos ácidos grasos.

La comparación de las composiciones obtenidas para la fracción AGL y la de las posiciones $\alpha + \alpha'$ (ver Tablas XX y XXI) nos muestra una gran similitud entre las mismas.

TABLA XXXIV.- COMPOSICION DE LOS ACIDOS GRASOS LIBERADOS AL MEDIO DURANTE LA INCUBACION DE ADIPOCITOS. CONTROLES (C) Y CON SEROTONINA (S).

ACIDOS	5C	10C	20C	30C	5S	10S	20S	30S
	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4	n = 4
16:0	29.59 ±0.48	30.18 ±0.63	29.52 ±0.45	28.75 ±1.02	30.52 ±0.45	29.95 ±0.84	30.74 ±1.32	28.64 ±0.76
16:1	8.67 ±0.12	10.50 ±0.56	8.93 ±0.35	9.28 ±0.68	9.57 ±0.43	8.92 ±1.01	9.65 ±0.60	9.49 ±0.15
18:0	8.15 ±0.44	7.47 ±0.31	7.28 ±0.68	7.99 ±0.23	8.50 ±0.33	7.34 ±0.61	7.75 ±0.18	7.67 ±0.37
18:1	29.87 ±1.32	28.47 ±0.27	30.18 ±0.45	30.45 ±0.71	29.90 ±0.21	30.14 ±1.25	28.25 ±1.06	28.80 ±0.67
18:2	23.70 ±0.12	23.39 ±0.84	24.07 ±0.49	23.52 ±1.41	21.50 ±1.13	23.63 ±0.32	23.61 ±0.51	23.72 ±0.85

TABLA XXXV.- COMPOSICION DE LOS ACIDOS GRASOS LIBRE EN EL INTERIOR DE LOS ADIPOCITOS DURANTE SU INCUBACION. CONTROLES (C) Y CON SEROTONINA (S).

ACIDOS	5C	10C	20C	30C	5S	10S	20S	30S
	n=4	n=3	n=4	n=4	n=3	n=4	n=4	n=3
16:0	30.15 ±0.75	28.74 ±1.32	29.65 ±0.93	28.47 ±0.36	30.73 ±1.04	28.79 ±0.52	30.62 ±0.68	29.36 ±1.46
16:1	8.43 ±0.40	10.26 ±0.19	8.84 ±0.24	9.38 ±0.54	9.35 ±0.41	10.08 ±0.30	9.84 ±0.31	8.90 ±0.15
18:0	7.74 ±0.27	7.83 ±0.10	8.15 ±0.47	8.59 ±0.47	9.09 ±0.69	7.41 ±0.45	8.23 ±0.25	8.74 ±0.31
18:1	29.19 ±1.09	30.45 ±0.39	28.74 ±0.71	31.02 ±1.22	28.76 ±0.77	30.68 ±1.29	29.46 ±0.73	29.22 ±0.82
18:2	24.49 ±0.42	22.71 ±1.16	24.62 ±1.63	22.52 ±0.84	22.07 ±0.74	23.05 ±0.92	21.83 ±1.63	23.77 ±0.62

174

IV.- CONCLUSIONES

IV.- CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio sobre la liberación selectiva de ácidos grasos almacenados en tejido adiposo epididimal de rata como respuesta a determinados estímulos (ayuno y serotonina) tratando de encontrar los mecanismos que la propician.

Para cumplir este objetivo desarrollamos un conjunto de técnicas apropiadas, entre las que cabe destacar las siguientes:

1.- La valoración por cromatografía gas-líquido de AGL y de AG procedentes de fracciones acil-glicéridas, por inyección directa, suprimiendo la necesidad de transformarlos previamente en sus ésteres metílicos. Ello posibilita su utilización rutinaria tanto en análisis clínicos como en investigación, al reducir notablemente la complejidad y peligrosidad de otras técnicas y al incrementar el grado de recuperación de ácidos grasos.

2.- Hemos comprobado que tras la incubación con alfa-lipasa de una emulsión de TAG obtenida por sonicación, la composición de la fracción DAG se correlaciona con la media de las composiciones de AGL y MAG. Esto nos indica la alta sensibilidad de esta técnica y su posibilidad de empleo para lipasas sensibles a detergentes, así como en los estudios sobre posicionalidad.

3.- El sistema de incubación de adipocitos aislados y la

posterior separación de los mismos de su medio de incubación ha permitido una valoración de los AGL y AG esterificados en DAG que ha hecho posible el fraccionamiento y valoración de estos por C. G.L., lo cual constituye una aportación a la tecnología del estudio del metabolismo del tejido adiposo, en cuanto hasta ahora las técnicas sistemáticamente utilizadas se limitaban a la evaluación global del proceso lipólisis-esterificación en función de los valores obtenidos de glicerol o de AGL por fotometría o microtitulación. La aplicación de la cromatografía gas-líquido por inyección directa al análisis de los AGL elimina totalmente la posible contaminación con otras fracciones lipídicas tanto en el medio como en el interior del tejido.

En cuanto a las conclusiones que resultan de los datos obtenidos experimentalmente encontramos:

1.- El análisis de la distribución posicional de los ácidos grasos en la molécula de TAG del tejido adiposo nos revela que el orden de preferencia de los ácidos grasos por la posición β coincide con su ordenamiento en función del punto de fusión: 18:2, 16:1, 18:1, 14:0, 16:0 y 18:0.

2.- En ratas en ayuno 4 y 8 días, tratadas y sin tratar con serotonina se produce un descenso de la concentración de ácidos grasos en tejido que afecta fundamentalmente a los ácidos de cadena mas corta. Se produce un incremento en la proporción de los ácidos de 18 C, que además es función del grado de insatura-

ción.

3.- En ratas en ayuno 4 y 8 días tratadas y sin tratar con serotonina se produce un descenso de la concentración de ácidos grasos en suero, que afecta fundamentalmente a los ácidos de cadena más corta. En todos los casos se observa un incremento en la proporción de ácidos grasos de 18C que es función del grado de insaturación.

4.- El orden de descenso porcentual de los ácidos grasos en suero y tejido durante el ayuno, con o sin tratamiento con serotonina es el mismo, y coincide con el orden de preferencia por las posiciones $\alpha + \alpha'$ en TAG, excepto para los ácidos 16:1 y 18:0

5.- Los ácidos grasos dispuestos en β (16:1 y 18:2) sufren un incremento sistemático de la relación % en tejido/% en suero, lo cual se ajusta a que las variaciones en la proporción de los distintos ácidos grasos en tejido estén en función de dos factores:

- La recuperación selectiva por el tejido de los ácidos grasos según su grado de posicionalidad en β .

- El flujo de cada ácido graso en función de su gradiente de concentración entre suero y tejido.

En la conocida influencia de especie y dieta en la compo

sición en ácidos grasos de tejido adiposo, el primer factor podría ser específico de la especie, en tanto el segundo factor estaría determinado fundamentalmente por la dieta y el consumo.

6.- Entre el 4º y el 8º días de ayuno, tanto en ratas tratadas como en no tratadas con serotonina, se produce una recuperación porcentual en suero y tejido de ácidos grasos saturados; es decir, de los que se disponen preferentemente en las posiciones $\alpha + \alpha'$.

7.- La acción de la serotonina se manifiesta en un descenso de la concentración de ácidos grasos de suero y un incremento de la concentración en tejido, que interpretamos como un incremento de la retención de ácidos grasos por el tejido, inhibición de la lipólisis o de la liberación.

La serotonina causa un incremento de la proporción, en tejido, de los ácidos grasos preferentemente dispuestos en la posición β de los TAG (16:1 y 18:2), así como de la relación $\frac{\%}{\text{tejido}} / \frac{\%}{\text{suero}}$ de los mismos. Esto parece ligar el proceso de esterificación promovido por la serotonina a la retención de los ácidos en posición β .

8.- En ratas alimentadas normalmente la composición de los DAG se diferencia de la de TAG en una mayor proporción de ácidos grasos de 18 C. La composición de los MAG tiende a ajustarse con la composición de las posiciones $\alpha + \alpha'$; esto puede ser

debido a la hidrólisis preferencial de los β -MAG por la MAG-li pasa, descrita por Vaughan, o bien a que durante la alimentación la "vía monoglicérido" represente una forma de conservación de la posicionalidad de los ácidos grasos. A ambas posibilidades se ajusta el hecho de que con el aumento de la concentración de MAG en tejido se observe un descenso de la proporción en ácidos grasos preferentemente dispuestos en α, α' (18:0 y 16:0).

9.- La composición de los α, α' -DAG de tejido adiposo durante el ayuno se ajusta a la composición teóricamente esperada en el caso de que su origen sea por ruptura de TAG y no por isomerización espontánea, lo cual parece demostrar que la TAG-li pasa es un enzima no dotada de especificidad posicional, sino que causa la hidrólisis de las posiciones α , β y α' al azar.

10.- La composición de los $\alpha, \beta + \alpha', \beta$ -DAG de tejido adiposo durante el ayuno se ajusta también a la composición teóricamente esperada en el caso de que su origen sea debido a una hidrólisis al azar.

11.- En ratas en ayuno encontramos que la relación $(\alpha, \beta + \alpha', \beta - \text{DAG}) / (\alpha, \alpha' - \text{DAG})$ es siempre inferior a 2, lo cual evidencia que existe una desaparición preferente de la fracción $\alpha, \beta + \alpha', \beta - \text{DAG}$, que interpretamos en el sentido de que durante el ayuno no está bloqueada la acción de la diacilglicerol-aciltransferasa.

12.- En todos los casos estudiados encontramos una ele

vada concentración en DAG y MAG de ácidos grasos de cadena corta (inferior a 14 átomos de C), mientras que en TAG y AGL representan únicamente trazas.

13.- En adipocitos aislados la serotonina causa un incremento de la esterificación durante los primeros minutos, que se manifiesta en un descenso simultáneo de las concentraciones de AGL y DAG. El análisis de los datos cuantitativos para ambas fracciones permiten suponer que el proceso de esterificación es simultáneo a la hidrólisis de DAG y MAG por DAG-lipasa y MAG-lipasa, y que la acción de la serotonina se ejerce mediante una activación de la diacilglicerol-aciltransferasa.

14.- La serotonina causa un incremento de la lipólisis en adipocitos a partir de los 10 minutos de incubación, que se manifiesta en un incremento en las concentraciones de AGL y DAG, lo cual permite suponer que la serotonina activa la HSL-TAG-lipasa.

15.- Simultáneamente al proceso de esterificación activado por serotonina se observa en los DAG un incremento en la proporción de ácidos grasos dispuestos en $\alpha + \alpha'$ y un descenso en la de ácidos dispuestos en β . El proceso lipolítico tiende a igualar la composición de las fracciones DAG y TAG.

16.- La concentración de ácidos grasos liberados al medio por adipocitos incubados con serotonina es inferior a los contro-

les, en todos los tiempos experimentados, lo cual podría ser indicativo de una inhibición de la liberación al medio causada por la serotonina.

17.- La composición de las fracciones AGL del medio y del interior son similares, lo cual parece demostrar la inexistencia de factores de liberación selectiva, posibilidad ésta apuntada por algunos autores. Además, la composición de los AGL posee una gran similitud con la composición de las fracciones $\alpha + \alpha'$.

18.- El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo, y el de los datos obtenidos por otros autores, nos llevan a emitir la hipótesis de que la desigualdad posicional de los distintos ácidos grasos en la molécula de los TAG de tejido adiposo, así como la simultánea activación de la lipólisis y la esterificación observada con varias hormonas no representa sino un mecanismo de recuperación selectiva de ácidos grasos, y que la activación de ambos procesos se lleva a cabo a través de la HSL y la diacilglicerol-aciltransferasa, por distintos mecanismos.

Esta activación simultánea tendría como resultado un ciclo conservativo de los ácidos grasos dispuestos en β , y como consecuencia la liberación selectiva de los dispuestos en $\alpha + \alpha'$. Ello haría posible el mantenimiento de un bajo punto de fusión de la gota grasa de los adipocitos, necesario para la acción de la HSL-TAG-lipasa.

202

AHLQVIST, R.P.

Am. J. Physiol. 153, 586 (1948)

AHERNE, W. and HULL, D.

J. Pathol. Bacteriol. 91, 223 (1966)

AHRENS, E.H.Jr. and BORGSTROM, B.

J. Biol. Chem. 219, 665 (1956)

APPLEMAN, M.M.; THOMPSON, W.J.; RUSSELL, T.R.

Adv. in Cyclic Nucleotide Res. Vol. 3 p. 65. Ed. Greengard
and Robison. Raven Press. New York. (1973)

ASSMANN, G.; KRAUSS, R.M.; FREDICKSON, D.S.; LEVY, R.I.

J. Biol. Chem. 248, 7184 (1973)

AUERBACH, A.

Handbook of Physiology. Adipose Tissue. Ed. Renold, Cahill.
Am. Physiol. Soc. c.9. Washington. (1965)

BABA, W.I.; SMITH, A.J. and TOWNSNEND, M.M.

Quart J. Exp. Physiol. 52, 416 (1967)

BALL, E.G; and JUNGAS, R.L.

Biochemistry 2, 586 (1963)

BARNARD, T.; SKALA, J. and LINBERG, O.

Comp. Biochem. Physiol. 33, 499 (1970)

BELL, E.T.

Am. J. Anat. 9, 412 (1909)

BENZONANA, G.

Lipids 9, 166 (1974)

BERGMAN

Citado por Lindberg, O. en: "Brown Adipose Tissue". Elsevier
Publishing Company Inc. New York (1970)

BERRIDGE, M.J. and PATEL, N.G.

Science, 162, 462 (1968)

BEZMAN, A.; FELTS, J.M. and HAVEL, R.J.

Clin. Res. 10, 84 (1962)

BEZMAN, A.; FELTS, J.M. and HAVEL, R.J.

J. Lipid. Res. 3, 427 (1962)

BIALE, Y. and SHAFRIR, E.

Clin. Chim. Acta. 23, 413 (1969)

BIECK, P.; STOCK, K. and WESTERMANN, E.

Life Sci. 5, 2157 (1966)

BJORNTORP, P. and FURMAN, R.H.

Amer. J. Physiol. 203, 316 (1962)

BLANKEHORN, D.H. and AHRENS, E.H.

J. Biol. Chem. 212, 69 (1955)

BORGSTROM, B.

Acta Chem. Scandinav. 7, 557 (1953)

BORGSTROM, B.

Biochim. Biophys. Acta 13, 491 (1954)

BORGSTROM, B.

Arch. Biochem. and Biophys., 49, 268 (1954)

BORGSTROM, B.; DAHLQVIST, A.; LUNDH, G. and SJOVALL, J.

J. Clin. Invest. 36, 1521 (1957)

BORGSTROM, B. and JORDAN, P.

Handbook of Physiology. Adipose Tissue.p. 219. Ed. Renold, Cahill. Washington. (1965)

BRAGDON, J.H. and GORDON, R.S.

J. Clin. Invest. 37, 574 (1958)

BROCKERHOFF, H.; HOYLE, R.J. and WOLMARK, N.

Biochim. Biophys. Acta, 116, 67 (1966)

BROSTROM, C.O.; CORBIN, J.D.; KING, C.A. and KREBS, E.G.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2444 (1971)

BUJAN, M.J.

"Concepto actual del tejido adiposo pardo" Tesis Doctoral.

Facultad de Medicina. Madrid (1981).

BUTCHER, R.W.; HO, R.J.; MENG, H.C. and SUTHERLAND, E.W.

J. Biol. Chem. 240, 4514 (1965)

BUTCHER, R.W.; BAIRD, C.E.; SUTHERLAND, E.W.

J. Biol. Chem. 243, 1705 (1968)

CAHILL, G.F.Jr.

En: "Fat as a tissue". Ed. Rodahl and Issekut-McGraw Hill

c. 8 (1964)

CARDELL, R.R.; BADENHAUSEN, S.Jr. and PORTES, K.K.

J. Cell. Biol., 34, 123 (1967)

CARLSON, L.A.

En: "Cyclic AMP". Academic Press. New York, p. 286 (1971)

CLARK, S.B. and HOLT, P.R.

Federation Proc. 27, 331 (1968)

CLARK, B. and HUBSCHER, G.

Nature. London, 185, 35 (1960)

- CLARK, B. and HUBSCHER, G.
Biochim. et Biophys. Acta., 46, 479 (1961)
- COHEN, M.; MORGAN, R.G.H. and HOFMANN, A.F.
Federation Proc. 27, 574 (1968)
- COLEMAN, R. and BELL, R.M.
J. Biol. Chem. 251, 4537 (1976)
- CORRELL, J.W.
Federation Proc. 20, 275 (1961)
- CHEARNICK, S.S. and CHAIKOFF, I.L.
J. Biol. Chem. 188, 389 (1951)
- DEBONS, A.F. and SCHWARTZ, I.L.
J. Lipid. Res., 2, 86 (1961)
- DESAI, K.S.; LI, K.C. and ENGEL, A.
J. Lipid. Res. 14, 647 (1973)
- DESNUELLE, P.; NAUDET, M. and ROUZIER, J.
Biochim. et Biophys. Acta, 2, 561 (1948)
- DESNUELLE, P. and SAVARÝ, P.
Conference on Comparative Atherosclerosis. Beverly Hills.
(1964)
- DOLE, V.P. and MEINERTZ, H.
J. Biol. Chem. 235, 2595 (1960)
- DOMINGUEZ, M.C. and HERRERA, E.
Biochem. J. 158, 183 (1976)

DOMINGUEZ, M.C. and HERRERA, E.

Horm. Metab. Res. 8, 33 (1976)

EHNHOLM, C.; GRETEN, H. and BROWN, W.V.

Biochim. et Biophys. Acta, 360, 68 (1974)

FASSINA, G.

Life Sci., 6, 825 (1967)

FAWCETT, D.W. and LYMAN, C.P.

J. Physiol. 126, 235 (1954)

FISCHER, W.; HEINZ. and ZEUS, M.

Physiol. Chem. 354, 1115 (1973)

FOLCH, J.

J. Biol. Chem., 191, 807 (1951)

FOOT; N.C.

Beitr. Pathol. Anat. Allgem. Pathol., 53, 446 (1912)

FRAZER, A.C.; SCHULMAN, J.H. and STEWAT, H.C.

J. Physiol. 103, 306 (1944)

FREINFEL, N.J.

Clin. Invest., 40, 476 (1961)

- FRIEDMAN, H.I. and CARDELL, R.R.Jr.
Exptl. Cell. Res., 75, 57 (1972)
- GANESAN, D. and BRADFORD, R.H.
Biochem. et Biophys. Res. Commun., 43, 544 (1971)
- GANESAN, D.; BRADFORD, R.H. and BASS, H.B.
Clin. Res., 22, 649 (1974)
- GANESAN, D.; and BASS, H.B.
Fed. European Biochem. Soc. Letters., 53, 1 (1975)
- GANESAN, D; GANESAN, D. and BRADFORD, R.H.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 151, 390 (1976)
- GELLHORN, A.; BENJAMIN, W.
Biochim. et Biophys. Acta, 84, 167 (1964)
- GELLHORN, A. and BENJAMIN, W.
Handbook of Physiology. Adipose Tissue. c.p.41., Ed. Renold,
and Cahill. Washington (1965)
- GLICKMAN; R.M.; KIRSCH, K. and ISSELBACHER, K.J.
J. Clin. Invest. 51, 356 (1972)
- GOLDMAN, P. and VAGELOS, R.P.
J. Biol. Chem. 236, 2620 (1961)

GORDON, R.S. and CHERKE, S.A.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 97, 150 (1958)

GRETEN, H.R.; LEVY, I. and FREDRICKSON, D.S.

J. Lipid. Res., 10, 326 (1969)

GUDER, W.; WEISS, L. and WIELAND, O.

Biochim. Biophys. Acta, 187, 173 (1969)

GUNSTONE, F.D.

Biochem. J., 59, 454 (1955)

HAGEN, J.H.

J. Biol. Chem., 236, 1023 (1961)

HAHN, P.F.

Science, 98,19 (1943)

HALL, C.L. and BALL, E.C.

Biochim. Biophys. Acta. 210, 209 (1970)

HANAHAN, D.J.; BROCKERHORFF, H. and BARRON; E.J.

J. Biol. Chem., 235, 1917 (1960)

HAM, A.W.

"Tratado de histología". Ed. Interamericana. c.11. Mejico.
(1970)

HAMMER, J.A.,

Arch. Mikoskop. Anat. Entwickl. 45, 512 (1895)

HAVEL, R. J. and GOLDFIEN, A.

J. Lipid. Res. 1, 102 (1959)

HAVEL, R.J. and GOLDFIEN, A.

Clin. Res., 7, 116 (1959)

HARRIS.

J. Clin. Invest., 34, 655 (1955)

HELLER, R.A. and STEINBERG, D.

Biochim. Biophys. Acta, 270, 65 (1972)

HERRERA, E. and AYANZ, A.

J. Lip. Res., 13, 802 (1972)

HERRERA, E.

Inv. Ciencia, 1, 28 (1977)

HERTING, D.C. and AMES, S.R.

Arch. Biochem. Biophys., 55, 295 (1955)

HILDITCH, T.P.

In: "The chemical constitution of natural fats". Ed. Wiley,

J. Inc., p. 565. New York. (1956)

HO, R.J.; JEANRENAUD, B.; POSTERNAK, T. and RENOLD, A.E.

Biochim. Biophys. Acta., 144, 74, (1967)

HOLLENBERG, C.H.; RABEN, M.S. and ASTWOOD, E.B.

Endocrinology, 68, 589 (1961)

HOLLENBERG, C.H. and HOROWITZ, I.

J. Lipid. Res. 3, 445, (1962)

HOLLENBERG, C.H. and DOUGLAS, D.E.

Nature, 193, 1074 (1962)

HOLLENBERG, C.H. and ANGEL, A

Am. J. Physiol., 205, 909 (1963)

HOLLENBERG, C.H.

Handbook of Physiology. Adipose Tissue. Ed. Renold and Cahill. p. 306. Am. Physiol. Soc. Washington (1965)

HULL, D.

Brit. Med. Bull., 22, 92 (1966)

HULL, D. and SEGALL, M.M.

Nature, 212, 469 (1966)

HUTTUNEN, J.K. and STEINBERG, D.

Biochim. Biophys. Acta., 239, 411 (1971)

HUTTUNEN, J.K. and NIKKILA, E.A.

European J. Clin. Invest., 3, 483 (1973)

JACKSON, R.L.; MORRISETT, J.D. and GOTTO, A.M.Jr.

Physiological. Rev., 56, 259 (1976)

JAMES, A.T. and MARTIN, A.J.P.

Biochem. J., 50, 679 (1952)

JEANRENAUD, B. and RENOLD, A.E.

J. Biol. Chem., 235, 2217 (1960)

JUNGAS, R.L. and BALL, E.G.

Biochemistry, 2, 383 (1963)

KAKIUCHI, S. and RALL, T.W.

Mol. Pharmacol., 4, 367 (1968)

KAUNITZ, H.; SLANETZ, C.A.; JOHNSON, R.E. and BABAYAN, V.K.

J. Nutr., 73, 386 (1961)

KENNEDY, E.P.

Ann. Rev. Biochem., 26 (1957)

KUKSIS, A.

In; " Progress in the Chem. of Fats and other Lipids", v. 12.

Ed. Pergamon Press, Oxford. (1972)

KHOO, J.C.; AQUINO, A.A. and STEINBERG, D.

J. Clin. Invest., 53, 1124 (1974)

KHOO, J.C.

Biochim. Biophys. Acta., 422, 87 (1976)

KHOO, J.C.; STEINBERG, D.; HUANG, J. and VAGELOS, P.R.

J. BIOL. Chem., 251, 2882 (1976)

KHOO, J.C.; STEINBERG, D. and LEE, E.Y.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 80, 418 (1978)

KHOO, J.C. and STEINBERG, D.

Methods in enzymology, 42, 181 (1978)

KHURT, J.

J. Am. Oil. Chem. Soc., 29, 217 (1952)

KIRKLAND, j.j.

Anal. Chem., 35, 2003 (1963)

KOLLIKER, A.

Anat. Anz. 1, 206 (1886)

KORN, E.D.

Science, 120, 399 (1954)

KORN, E.D. and QUIGLEY, T.W.

Biochim. Biophys. Acta, 18, 143 (1955)

KORN, E.D. and QUIGLEY, T.W.

J. Biol. Chem., 226, 833 (1957)

KORN, E.D.

J. Biol. Chem., 236, 1638 (1961)

KRAUSS, R.M.; WINDMUELLER, H.G.; LEVY, R.I. and FREDRICKSON,

D.S.

J. Lipid. Res., 14, 286 (1973)

LA ROSA, J.C.; LEVY, R.I.; WINDMUELLER, H.G. and FREDRICKSON,

D.S.

J. Lipids. Res., 13, 356, (1972)

LEBOVITZ, H.E. and FELDMAN, J.M.

Diabetes, 19, 480 (1970)

LEVI, G.

"Unione tipografica editrice forinese" (1954)

LEWIS, B.M. and HAYER, T.M.

Clinical Sci. Mol. Mod., 48, 323 (1975)

- LLOBERA, M.; MONTES, A. and HERRERA, E.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 91, n 1, 272 (1979)
- MANGOLD, H.K. and MALINC, D.C.
J. Am. Oil. Chem. Soc., 37, 383 (1961)
- MANSOUR, T.E.
Fed. Proc., 26, 1179 (1967)
- MARGOLIS, S. and VAUGHAN, M.
J. Biol. Chem., 237, 44 (1962)
- MATTSON, F.H.; BENEDICT, J.H.; MARTIN, J.B. and BECK, L.W.
J. Nutrition., 48, 335 (1952)
- MATTSON, F.H. and BECK, L.W.
J. Biol. Chem., 214, 115 (1955)
- MATTSON, F.H. and VOLPENHEIN, R.A.
J. Lip. Res. 13, 256 (1972)
- MAYLIE, M.F.; CHARLES, M. and DESNUELLE, P.
Biochim. Biophys. Acta, 178, 196 (1969)
- MAYLIE, M.F.; CHARLES, M.; GACHE, C. and DESNUELLE, P.
Biochim. Biophys. Acta, 229, 286 (1971)

MAYLIE, M.F.; CHARLES, M. and DESNUELLE, P.

Biochim. Biophys. Acta. 178, 196 (1972)

McBRIDE, O.W. and KORN, E.D.

J. Lipid. Res., 4, 17 (1963)

MEINERTZ, H.

Lipids, 284, 204 (1962)

METCALFE, L.E. and SCHMITZ, A.A.

Anal. Chem. 33, 363 (1961)

MONESI, A.

Istologia. Ed. Piccin. Padua (1965)

MORGAN, R.G.H.; BARROWMAN, J. and BORGSTROM, B.

Biochim. Biophys. Acta, 175, 65 (1969)

MORLEY, N. and KUKSIS, A.

J. Biol. Chem. 247, 6389 (1972)

NAPOLITANO, L.

J. Cell. Biol. 18, 665 (1963)

NILSSON-EHLE, P.; BELFRAGE, P. and BORGSTROM, B.

Biochim. Biophys. Acta, 248, 114 (1971)

- NILSSON-EHLE, P. and BELFRAGE, P.
Biochim. Biophys. Acta, 270, 60 (1972)
- NILSSON-EHLE, P.
Lipids, Vol. 9, n.8, 548 (1975)
- OLEDZKA-SLOTWINSKA, H. and DESMET, V.I.
Histochemie, 28, 276 (1971)
- OOSTERBAAN, R.A. and COHEN, J.A.
"Structure of activity of enzymes". Ed. Goodwin, Hartley.
Harris. Academic. Press. New York (1964)
- OTTENSTEIN, D.M. and BARTLEY, D.A.
J. Chromatogr. Sci. 9, 673 (1971)
- OTTENSTEIN, M. and SUPINA, W.R.
J. Chrom. 91, 119 (1974)
- POPE, J.L.; McPHERSON, J.C. and TIDWELL, H.C.
J. Biol. Chem., 241, 2306 (1966)
- PRIVETT, O.S.; BLANK, M.L. and VERDINO, B.
J. Nutr. 85, 187 (1965)
- RABEN, M.S. and HOLLENBERG, C.H.
J. Clin. Invest., 38, 484 (1959)
- REDGRAVE, T.G.
Aus. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 49, 209 (1971)
- REDGRAVE, T.G.
Aus. J. Exptl. Biol. Med. Sci., 51, 427 (1973)

- REIMANN, E.M.; WALSH, D.A. and KREBS, E.G.
J. Biol. Chem. 246, 1986 (1971)
- REISER, R.; BRYSON, M.J.; CARR, M.J. and KUIKEN, K.A.
J. Biol. Chem. 194, 131 (1952)
- RIZACK, M.A.
J. Biol. Chem' 239, 392 (1964)
- ROBIN, L.R.VAN and RONCART, D.A.K.
Cell and Tissue Research. 195, 317 (1978).
- ROBINSON, D.S.
J. Lipid. Res., 4, 21, (1963)
- ROBINSON, J. and NEWSHOLME, E.A.
Biochem. J., 104, 2c (1967).
- ROBISON, G.A.; SUTHERLAND, E.W. and BUTCHER, R.W.
"Cyclic AMP". Academic Press. C. 8, P. 288. New York (1971).
- RODBELL, M.
Handbook of Physiology. Adipose Tissue. Ed. Renold, Cahill.
Am. Phis. Soc. c. 47-48. Washington. (1965).
- RODBELL, M. and SCOW, R.O.
Am. J. Physiol., 208, 106 (1964).
- ROGERS, J.B.Jr. and BOCHENEK, W.
Biochim. Biophys. Acta., 202, 426 (1970).
- RUBIN, C.S.; ERLICHMAN, J. and ROSEN, O.O.
J. Biol. Chem. 247, 36 (1972).

- SARDA, L. and DESNUELLE, P.
Biochim. Biophys. Acta. 30, 513 (1958).
- SAVARY, P.; CONSTANTIN, M.J. and DESNUELLE, P.
Biochim. Biophys. Acta, 48, 562 (1961).
- SAYOC, E.R. and LITTLE, J.M.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 115, 352 (1967).
- SCHONHEYDER, F. and VOLGRARTZ, K.
Acta Physiol. Scandinav., 11, 349 (1946).
- SCHULTZ, F.M. and JOHNSTON, J.M.
J. Lipid. Res., 12, 132 (1971).
- SCOW, R.O.; STRICKER, F.A.; PICK, T.Y. and CLARY, T.R.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 131, 288 (1965).
- SCOW, R.O.
Handbook of Physiology. Adipose Tissue. Ed. Renold. Cahill.
Am. Physiol. Soc. p. 437. Washington (1965).
- SEMERIVA, M.; DUFOUR, C. and DESNUELLE, P.
Biochemistry, 10, 2143 (1971).
- SENIOR, J. and ISSELBACHER, K.J.
Biochim. Biophys. Acta, 44, 399 (1960).
- SHAFRIR, E. and KERPEL, S.
"Fat as a Tissue". Ed. Rodahl, Issekut, McGraw-Hill. p. 143
(1964).
- SHIMIZU, H.; CREVELING, C.R. and DALY, J.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 65, 1033 (1970).

SIMON, G.

Handbook of Physiology. Adipose Tissue. Ed. Renold, Cahill.
Am. Physiol. Soc. c. 11. Washington. (1965)

SMITH, S.W.; WEISS, S.B. and KENNEDY, E.P.

J. Biol. Chem. 228, 915 (1957)

SOORANNA, S.R. and SAGGERSON, E.A.

FeBs. Lett. 64, 36 (1976).

STEIN, Y and STEIN, O.

Biochim. Biophys. Acta, 60, 58 (1962)

STEIN, Y. and SHAPIRO, B.

Biochim. Biophys. Acta, 24, 197 (1957)

STEINBERG, D.

In: "Fat as a Tissue". Ed. Rodahl, Issekutz, McGraw-Hill.
p. 169. (1964)

STEINBERG, D. and VAUGHAN, M.J.

Handbook of Physiology. Adipose Tissue. Ed. Renold, Cahill.
Am. Physiol. Soc. p. 342. Washington. (1965)

STOCK, K.; AULICH, A. and WESTERMANN, E.

Life Sci., 7, 113 (1968)

- SUBBAIAH, P.V. and GANGULY, J.
Biochem. J., 118, 223 (1970)
- SUTER, E.R.
Lab. Investigation, 21, 246 (1969).
- TAMARIT, J.
Diabetología, 9, 92 (1973)
- THOMAS, A.E.; SCHAROUN, J.A.E and RALSTON, H.
J. Am. Oil. Chem. Soc., 42, 789 (1965).
- TOLDT, C.
Handbook of Physiology. Adipose Tissue. Ed. Renold, Cahill.
Am. Physiol. Soc. p. 87. Washinton (1965).
- TOVE, S.B. and SMITH, F.H.
J. Nutr., 71, 264 (1960)
- TSAI, S.A. and VAUCHAN, M.
Fed. Proc., 29, 602 (1970)
- TURNER, D.C. and BAGNARA, J.T.
General Endocrinology. 6° ed. Ed. W.B. Saunders C.
Philadelphia. London. Toronto.
- UMAHARA, Y.
Archiv. Histol. Japon. 29, 459 (1968).
- VAUGHAN, M.J.
J. Biol. Chem., 235, 3049 (1960)
- VAUGHAN, M. and STEINBERG, D.
J. Lipid. Res., 4, 193 (1963).

- VAUGHAN, M.J.; BERGER, J.E. and STEINBERG, D.
J. Biol. Chem. 239, 401 (1964)
- VAUGHAN, M.J.
"Fat as a tissue". Ed. Rodahl-Issekutz. McGraw-Hill. c. 9
(1964)
- VAUGHAN, M.J. and BARCHAS, P.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 152, 298 (1966)
- VERGER, R.; HAAS, G.H.; SARDA, L. and DESNUELLE, P.
Biochim. Biophys. Acta, 188, 272 (1969)
- VERGER, R.; SARDA, L. and DESNUELLE, P.
Biochim. Biophys. Acta, 242, 580 (1971)
- VOGEL, W.C. and BIERMAN, L.
Lipids., 5, 385 (1970)
- VOGEL, W.C.; BRUNZELL, J.D. and BIERMAN, E.L.
Lipids., 6, 805 (1971).
- VON EULER, U.S.
Handbook of physiology. Adipose Tissue. Ed. Renold. Cahill.
Am. Physiological. Soc. p. 347. Washington (1965).
- WASSERMANN, F. and McDONALD, T.F.
"Fat as a tissue". Ed. Rodahl, Issekutz. McGraw-Hill. c. 2
(1964).
- WASSERMAN, F.
Handbook of physiology. Adipose Tissue. Ed. Renold, Cahill.
Am. Physiological. Soc. p. 87. Washington (1965).

WEIS, S.B. and KENNEDY, E.P.

J. Am. Chem. Soc. 78, 3550 (1956)

WENKE, M.

Adipose Tissue regulation and metabolic function. Academic Press. New York. London. p. 55. (1970).

WERTHEINER, E. and SHAPIRO, B.

Physiol. Rev., 28, 451 (1948)

WHITE, J.E. and ENGEL, F.L.

Clin. Res., 6, 226 (1958)

WHITE, J.E. and ENGEL, F.L.

J. Clin. Invest., 37, 1556 (1958)

WIELAND, O.; NEUFELDT, I.; NUMAN and LYNEN, F.

Biochem. Z., 336, 455 (1963).

ZIERE, F.J. and ZIERE, L.

Biochem. Biophys. Res. Com., 47, 1480 (1972)

