

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
CATEDRA DE BIOQUIMICA**

**Transporte intracelular de acidos grasos de  
cadena larga en higado e intestino de bovino.**

**- Tesis -  
1993**

**Med. Vet. Alejandro Palacios**

## AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.

Presidente: Ing. Luis Lima.

Vicepresidente: Lic. Angel Tello.

Secretaria General: Abog. Claudio Contreras.

Secretaria de Asuntos Académicos: Med. Vet. Rogelio Bruniard.

Secretaria de Ciencia y Técnica: Dra. Carlota Sempé.

Secretaria de Extensión Cultural y Difusión: Lic. Pedro Garcia Cortina

Secretaria de Asuntos Económicos y Financieros: Cdor. Ruben Torre.

Prosecretaria General: Dra. Mercedes Molteni.

Guardasellos: Dr. Carlos Alconada Aramburu.

## AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS.

Decano: Med. Vet. Luis Alberto Dibbern.

Vicedecano: Med. Vet. Eduardo Pons.

Secretaria de Asuntos Académicos: Med. Vet. Alicia Antonini.

Secretaria de Extensión Universitaria: Bact. Sandra Arauz.

Secretaria de Postgrado: Dra. Maria E. Echeverrigaray.

Secretaria de Ciencia y Técnica: Dr. Carlos Perfumo.

Secretaria de Supervisión Administrativa: Cdor. Edgardo Silvera.

## CARRERA DE CIENCIAS VETERINARIAS.

Catedras	Profesores
Primer Año	
Anatomía Descriptiva y T.	Dra. Cristina Alonso
Histología y Embriología	Dr. Felix Moreno
Introducción a la Biofísica	Dr. Jesús Carroza
Bioquímica	Dr. Angel Catalá
Segundo Año	
Anatomía Comparada	Dra. Cristina Alonso
Patología General Veterinaria	Dr. Eduardo Gimeno
Fisiología	Dr. Eduardo Zaccardi
Microbiología	Dr. Nestor Stanchi
Genética y Biometría	Ing. Fernando Dulout
Tercer Año	
Semiología y Propedéutica	Dr. Jorge Andreatta
Anatomía y Fisiología Patológica	Dr. Julio Idiart
Farmacología, Farmacotecnia y Terapéutica	Dr. Jorge Errecalde
Medicina Operatoria	Dr. Pablo Videla
Parasitología y Enf. Parasitarias	Dra. Lucia Venturini
Zootecnia General y Agrostología	Dra. Liliana Lagreca

#### Cuarto Año

Zootecnia Especial I parte	Dr. Eduardo Marota
Zootecnia Especial II parte	Dr. Benjamin Rodriguez
Zootecnia Especial III parte	Dra. Virginia Grillo
Economía Agraria	Dr. Gustavo De La Arena
Enfermedades Infecciosas	Dr. Carlos Amasino
Patología Médica	Dr. Fortunato Iseas
Patología Quirúrgica y Podología	Dr. Francisco Boccia
Patología de Aves y Pílferos	Dr. Nestor Menendez

#### Quinto Año

Tecnología y Sanidad de los Alimentos	Dr. Jorge Lasta
Higiene, Epidemiología y Salud P.	Dr. Emilio Gimeno
Inmunología Veterinaria	Dr. Enrique Pennimpe
Reproducción Animal	Med. Vet. Angel Russo
Clínica de Pequeños Animales	Dr. Francisco Boccia
Clínica de Grandes Animales	Med. Vet. Juan Renner

**CONTENIDO GENERAL.**

	pag.
-INDICE	I - III
-LISTA DE TABLAS	IV - VIII
-LISTA DE FIGURAS	IX - XI
-ABREVIATURAS	XII - XIV

INDICE.	I
	pag.
1-. Introducción	1
1-1. Generalidades sobre digestión de lípidos en animales rumiantes y monogástricos.	2
1-2. Digestión lipídica en los preestómagos del bovino.	6
1-3. Procesos digestivos en intestino delgado.	9
1-3a. Aspectos fisiológicos de la absorción en la mucosa intestinal.	13
1-3b. Transporte intracelular de lípidos y metabolismo.	15
1-3c. Transporte lipídico en linfa y plasma.	17
1-4. Metabolismo lipídico en el hígado.	18
2-. Generalidades sobre la Proteína Transportadora de Acidos Grasos.	20
2-1. Familia de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos citosólica.	25
2-2. Funciones de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos.	28
2-3. Datos fisicoquímicos y estructurales de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos.	32
2-4. Características de pegado de ligandos de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos.	34
2-5. Estructuras de los genes de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos y su distribución celular.	35

2-6. Aspectos funcionales de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos.	38
- Materiales y Métodos.	40
- Preparación de intestino delgado bovino.	40
- Raspado diferencial de la mucosa intestinal bovina.	40
- Obtención de citosol a partir de mucosa intestinal bovina e hígado.	41
- Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina.	42
- Filtración a través de Sephadex G75 de los diferentes citosoles obtenidos por raspado diferencial de mucosa intestinal bovina e hígado.	42
- Filtración a través de Sephadex G75 de los diferentes citosoles obtenidos ( intestino e hígado ) con ácido palmítico radioactivo.	43
- Caracterización de proteínas citosólicas por cromatografía de intercambio iónico.	44
- Tratamiento térmico de proteínas citosólicas.	44
- Obtención de microsomas.	44
- Preparación de microsomas con ácido palmítico radioactivo.	45
- Remoción de ácido palmítico radioactivo desde membranas microsomales por proteínas citosólicas.	45
- Deslipidización de proteínas citosólicas.	46

- Pegado de sulfobromoftaleina a proteínas citosólicas.	46
- Desplazamiento de sulfobromoftaleina desde proteínas citosólicas y albúmina de suero bovino por ácido palmítico.	47
- Precipitación de proteínas citosólicas con sulfato de amonio.	47
- Ensayo de pegado de ácidos grasos ( Lipidex 1000 ).	48
- Incubación de un area de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo.	49
- Extracción de lípidos totales de la mucosa intestinal bovina.	50
- Separación de lípidos polares y neutros de la mucosa intestinal bovina.	50
- Resultados.	52
- Discusión y conclusiones.	86
- Conclusiones Generales.	95
- Resumen.	98
- Summary.	102
- Agradecimientos.	106
- Bibliografía.	107

## LISTA DE TABLAS.

	pag.
- Tabla 1. Miembros de la familia genética de la PTAG citosólica.	25
- Tabla 2. Posibles funciones de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos.	29
- Tabla 3. Efectos en la célula de ácidos grasos o sus esteres de acil CoA.	31
- Tabla 4. Capacidad de pegado de BSP por fracciones citosólicas F1 Y F2.	56
- Tabla 5. Remoción de ácido palmítico desde membranas microsomales.	58
- Tabla 6. Actividad de fosfatasa alcalina en diferentes homogenatos obtenidos por raspado diferencial de mucosa intestinal bovina.	59

- Tabla 7. Pegado de ácido palmítico 1-<sup>14</sup>C a fracciones de alto y bajo peso molecular. 60
  
- Tabla 8. Diferentes fracciones F1 conteniendo C16:0 1-<sup>14</sup>C analizadas por cromatografía de intercambio iónico. 61
  
- Tabla 9. Fracciones F1 ápice y F1 cripta con C16:0 1-<sup>14</sup>C analizadas por cromatografía de intercambio iónico. 62
  
- Tabla 10. Capacidad de pegado de BSP por diferentes citosoles intestinales y fracciones F1. 63
  
- Tabla 11. Ensayo de pegado de ácido palmítico radioactivo a fracciones protéicas de alto y bajo peso molecular. 64
  
- Tabla 12. Fracciones protéicas intestinales de alto y bajo peso molecular analizadas por cromatografía de intercambio iónico. 65

- Tabla 13. Precipitación con sulfato de amonio sobre diferentes citosoles obtenidos por raspado diferencial de mucosa intestinal bovina. 66
- Tabla 14. Pegado de palmitato a fracciones solubles de sulfato de amonio separadas por Sephadex G75. 67
- Tabla 15. Incubación de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo. 69
- Tabla 16. Incubación de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo. Radioactividad total en cada uno de los raspados. 70
- Tabla 17. Medición de la radioactividad en las distintas fracciones obtenidas por precipitación de proteínas citosólicas, de diferentes raspados intestinales, con sulfato de amonio. 71
- Tabla 18. Obtención de lípidos neutros y polares. 72

- Tabla 19. Relación lípidos polares / lípidos neutros en los diferentes raspados. 72
  
- Tabla 20. Relación de lípidos microsomales con los miligramos de proteína obtenidos en la fracción de bajo peso molecular. 73
  
- Tabla 21. Remoción de ácido palmítico radioactivo desde microsomas por proteínas de bajo peso molecular. 74
  
- Tabla 22. Remoción de ácido palmítico desde microsomas por fracciones solubles resultantes de la precipitación con sulfato de amonio. 75
  
- Tabla 23. Actividad de pegado de ácido palmítico por proteínas citosólicas hepáticas. 76
  
- Tabla 24. Actividad de pegado de ácido palmítico radioactivo de fracciones obtenidas a partir de F1 por cromatografía de intercambio iónico: DE 1 y DE 2. 77

- Tabla 25. Ensayo de Lipidex 1000 con diferentes fracciones de proteínas citosólicas hepáticas obtenidas a partir de precipitación con sales y cromatografía de intercambio iónico.

## LISTA DE FIGURAS.

	pag.
- Figura 1. Rol de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos en el metabolismo celular de los ácidos grasos de cadena larga.	24
- Figura 2. Pegado de ácido palmítico 1- <sup>14</sup> C a citosol intestinal nativo.	52
- Figura 3. Fl conteniendo ácido palmítico 1- <sup>14</sup> C analizada por cromatografía de intercambio iónico.	53
- Figura 4. Idem Fig. 3 mas 3 mg de BSA.	54
- Figura 5. Pegado de ácido palmítico 1- <sup>14</sup> C a proteínas citosólicas termicamente estables.	55
- Figura 6. Desplazamiento de BSP desde proteínas citosólicas y BSA por ácido palmítico.	57

- Figura 7. Ensayo de pegado de ácido palmítico radioactivo a fracciones protéicas citosólicas de alto y bajo peso molecular. 64
  
- Figura 8. Precipitación con sulfato de amonio sobre diferentes citosoles obtenidos por raspado diferencial de mucosa intestinal bovina. 66
  
- Figura 9. Pegado de palmitato a fracciones solubles de sulfato de amonio separadas por Sephadex G75. 68
  
- Figura 10 a-b. Incubación de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo. 80-81
  
- Figura 11 a-b. Area de intestino delgado incubada con ácido palmítico radioactivo. 82
  
- Figura 12 a-b. Relación de la radioactividad con cada una de las fracciones protéicas obtenidas por precipitación con sulfato de amonio. 83

- Figura 13. Remoción de ácido palmítico radioactivo desde microsomas por proteínas de bajo peso molecular. 84
  
- Figura 14. Análisis de las fracciones solubles, de la precipitación con sulfato de amonio, por remoción de ácido palmítico desde microsomas. 85

## ABREVIATURAS.

ADN	: ácido desoxirribonucleico
AG/a.g.	: ácido graso
ARN <sub>m</sub>	: ácido ribonucleico mensajero
ATP	: adenosina-5'-trifosfato
BSA	: albúmina de suero bovino
BSP	: sulfobromoftaleina
cADN	: clonado de ácido desoxirribonucleico
Ci	: Curie ( $2,2 \times 10^{12}$ desintegraciones por minuto)
cm	: centímetro
CoA, CoASH	: coenzima A
cpm	: cuentas por minuto
C 16:0	: ácido palmítico
Da	: Dalton
DEAE	: Dietilaminoetil
EDTA	: ácido etilendiaminotetraacético
EEM	: Error-standart de la media
ES	: Error standart
FABP	: Fatty Acid Binding Protein
F1	: Fracción 1
F2	: Fracción 2
g	: gramo

h/hs	: hora
HDL	: Lipoproteína de alta densidad
KDa	: kilodalton ( $10^3$ dalton)
LDL	: Lipoproteínas de baja densidad
lip	: lípido
LN	: lípido neutro
LP	: lípido polar
M	: Molar
mM	: milimolar
mCi	: milicurie( $10^{-3}$ Curie)
mg	: miligramo
ml	: mililitro
mmol	: milimol
N	: Normal
NADH	: Nicotinamida dinucleotido reducido
NADPH	: Nicotinamida dinucleotido fosfato reducido
PM	: peso molecular
pmol	: picomol
% P / P	: porcentaje peso en peso
pt/prot	: proteína

PTAG	: Proteína Transportadora de Acidos Grasos
TRIS	: 2-amino-2-hidroximetil propano-1,3-diol
U	: Unidad
UV	: ultravioleta
VLDL	: lipoproteína de muy baja densidad
v/v	: volumen en volumen
xg	: fuerza de gravedad
$\mu\text{Ci}$	: microcurie ( $10^{-6}$ Curie)
$\mu\text{g}$	: microgramo
$\mu\text{l}$	: microlitro

## 1-. INTRODUCCION

El término lípido es usado para describir una amplia variedad de compuestos que son insolubles en agua y que se disuelven en solventes orgánicos, tales como, cloroformo y éter etílico. En términos de nutrición los lípidos más importantes son: triacilgliceroles, fosfolípidos, esteroles y vitaminas liposolubles. Debido a la poca solubilidad de estos compuestos en medios acuosos, tales como, luz intestinal, citosol y en la circulación, el organismo animal se enfrenta a un especial número de problemas metabólicos. Un eficiente metabolismo y transporte de los lípidos requiere que estos sean dispersados en formas relativamente estables.

Los lípidos de la dieta que representan un alto porcentaje del total de las calorías diarias tomadas por el animal , juegan un importante rol en la nutrición y procesos fisiológicos del organismo (Thomson A., 1978). Los ácidos grasos se obtienen por la hidrólisis de las grasas. Los ácidos grasos que existen en las grasas naturales generalmente contienen un número par de átomos de carbono ( porque son sintetizados a partir de unidades de dos carbonos ) y son de cadena lineal. La cadena puede ser saturada ( sin dobles ligaduras ) o no saturada ( una o mas dobles ligaduras ).

Aunque muchas células pueden sintetizar ácidos grasos, estos derivan primariamente de la dieta y de la resíntesis realizada en el hígado. Los ácidos grasos de cadena larga ( mas de 10 átomos de carbono ) son

la fuente primaria de energía en muchas células del organismo y además pueden ser utilizados para la síntesis de lípidos de membrana ( Scow R., 1985 ). El tránsito intracelular de ácidos grasos es mediado por proteínas transportadoras específicas. Estas proteínas de bajo peso molecular facilitan la solubilización intracelular de los ácidos grasos favoreciendo el flujo de los mismos hacia diferentes vías metabólicas ( Matarese V., 1989 ).

#### **1-1. Generalidades sobre digestión de lípidos en animales ruminantes y monogástricos.**

Los lípidos alimentarios permiten al animal que los ingirió asegurar una serie de importantes funciones metabólicas y estructurales de la célula.

Así los triglicéridos que ingresan con la dieta proveen de energía química ( 9,5 Kcal./ gr contra 4,2 Kcal./ gr de los glucidos ), los fosfolípidos constituyen membranas celulares y juegan un rol vital en la permeabilidad de la célula, los esteroides ( colesterol y sus derivados ) actúan como reguladores químicos ( hormonas suprarrenales y sexuales ) de funciones orgánicas esenciales o participando como agentes emulsionantes ( sales biliares ) en la digestión intestinal y los ácidos grasos esenciales, incapaces de ser sintetizados por el animal, cumplen funciones indispensables en el organismo. Las principales funciones de estos últimos son de orden estructural (formando parte de fosfolípidos de membrana y regulando la fluidez de

la misma) o dinámica ( precursores de prostaglandinas )( Bauchart D., 1981 ). Los mecanismos utilizados en las sucesivas etapas de la digestión de lípidos marcan una profunda diferencia entre los rumiantes y los monogástricos, ya sea, por la naturaleza de los alimentos, las particularidades anatómicas, la intensidad de acción de las enzimas digestivas o la presencia de microorganismos en diferentes compartimientos del tubo digestivo.

En general se admite que la digestión lipídica comienza en monogástricos y prerumiantes a nivel del duodeno, ya que, la importancia fisiológica de la lipasa gástrica en la digestión de materias grasas varía ampliamente de acuerdo a la edad del animal y el tipo de alimento ingerido.

El animal prerumiante se comporta como un monogástrico, ya que, el alimento ingerido ( leche materna ) es transportado al estómago verdadero o abomaso por la gotera esofágica, evitando así los proventrículos aun sin evolución. El rumiante por el contrario posee en el rumen una importante población microbiana de gran actividad (  $10^{11}$  bacterias y  $10^6$  protozoos por mililitro de contenido ruminal ).

Los lípidos de la dieta sufren en el rumen profundas transformaciones, debido a que las lipasas microbianas hidrolizan casi completamente los lípidos esterificados del alimento. Los ácidos grasos liberados ( no saturados ) son progresivamente hidrogenados con la consiguiente formación de ácidos grasos saturados. Las enzimas bacterianas involucradas en estas reacciones son principalmente galactosidasas, fosfolipasas y lipasas; las enzimas de los protozoos

no ejercen actividad lipolítica significativa en el rumen. Los ácidos grasos alimentarios, en la mayoría poliinsaturados se hallan unidos a la superficie de partículas alimentarias y sufren una rápida hidrogenación por enzimas bacterianas extracelulares previa isomerización de la doble ligadura de tipo cis en tipo trans. Solo una pequeña fracción de ácidos grasos poliinsaturados escapa a la biohidrogenación bacteriana y son directamente absorbidos por los microorganismos pasando a formar la estructura lipídica de los mismos. Otra función importante de los microorganismos ruminales es la síntesis de ácidos grasos de cadena larga a partir de ácidos grasos volátiles.

En monogástricos y prerumiantes los lípidos en el estómago se hallan groseramente emulsionados aumentando considerablemente su grado de emulsión al entrar al duodeno gracias a la acción de las sales biliares ( Gangl A.,1975a; Boyer J.,1980 ).

La lipasa de la secreción pancreática adsorvida a las micelas lipídicas necesita la presencia de un cofactor protéico de origen pancreático denominado colipasa; la lipólisis intestinal a diferencia de la lipólisis bacteriana ruminal es incompleta ya que libera gran cantidad de  $\beta$  monoglicéridos .

Las micelas solubles en el contenido luminal del intestino se hallan constituidas por sales biliares y productos de la hidrólisis de los lípidos alimentarios: ácidos grasos y  $\beta$  monoglicéridos ( a partir de triglicéridos), ácidos grasos y lisofosfolípidos ( a partir de los fosfolípidos alimentarios ó biliares) y ácidos grasos y colesterol ( a

partir de esteres de colesterol ). Estas micelas representan la principal forma de absorción de los lípidos por parte de las células de la mucosa duodenal y yeyuno . Las sales biliares retornan al hígado, vía vena porta, al ser absorvidas posteriormente a nivel del ileon (circulación enterohepática) (Stremmel W., 1990 ;Caspary W., 1992).

Los ácidos grasos de cadena corta y media ( Takase S., 1990 ) en su forma no esterificada son vehiculizados directamente por la vena porta mientras que los ácidos grasos de cadena larga sufren la reesterificación en la célula intestinal (Carlier H., 1991) junto con fosfolípidos y colesterol son transportados por vía linfática mediante lipoproteínas como quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad ( Jackson R., 1976 ; Charman W., 1991).

En los rumiantes los lípidos alimentarios que ingresan al intestino delgado son en su mayoría ácidos grasos no esterificados debido a la acción lipolítica de las bacterias ruminales y en gran medida se hallan unidos a partículas de material vegetal de la dieta , fragmentos celulares de los microorganismos ó descamaciones del tubo digestivo. Debido a la hidrólisis de los lípidos en el rumen la reesterificación de los ácidos grasos de cadena larga en la mucosa intestinal se lleva a cabo por la vía del glicerofosfato y no por la vía del  $\beta$  monoglicérido como ocurre en los monogástricos.

En los rumiantes el proceso de transferencia de los lípidos para su absorción consiste fundamentalmente en la desadsorción de los ácidos grasos del material particulado y no desde las micelas producidas por

sales biliares como ocurre en monogástricos.

## 1-2. Digestión lipídica en los preestómagos de bovino.

Los ruminantes se distinguen de los animales de estómago simple o monogástricos por el desarrollo de una serie de cavidades anteriores al estómago verdadero. Una de estas cavidades llamada rumen, es la mayor de todas y la de mayor importancia metabólica.

En el rumen los constituyentes químicos de origen vegetal que ingresan con la dieta sufren la fermentación microbiana mediante la cual el poligástrico obtiene sus nutrientes ( Bergman E, 1990 ).

Como resultado de esta conversión dentro de los microorganismos ruminales de origen vegetal, el metabolismo del animal rumiante es diferente al de los monogástricos y por lo tanto la composición de tejidos, en especial la composición lipídica es distinta a la de los animales poligástricos. Por ejemplo, es en el rumen donde son sintetizados ácidos grasos volátiles utilizados posteriormente en los tejidos del animal y es también en esta cavidad donde son hidrogenados los ácidos grasos no saturados, lo que provoca importantes consecuencias en la composición lipídica de los tejidos del rumiante ( Friedman H, 1980 ).

La composición lipídica de la dieta del poligástrico difiere considerablemente de la del contenido ruminal. Estas diferencias son dadas por la alta proporción de ácidos grasos linoléico y linolénico presentes en el forraje comparada con la baja proporción de los mismos

en el rumen y la elevada proporción de ácido graso esteárico en esta cavidad comparada con la poca cantidad de ácidos grasos saturados del forraje. La gran acumulación de ácido graso esteárico en el rumen se obtiene a expensas de los ácidos grasos linoléico y linolénico de la dieta que son biohidrogenados por los microorganismos ruminales. Para realizar esta biohidrogenación, es por lo tanto, de suma importancia la hidrólisis de los ácidos grasos esterificados que se produce por las lipasas de las bacterias ruminales.

Los microorganismos ruminales también resintetizan lípidos, en especial ácidos grasos de cadena larga y fosfolípidos a partir de diferentes productos metabólicos, y aunque ciertas bacterias anaeróbicas son capaces de realizar la síntesis de ácidos grasos de cadena larga, la síntesis de los mismos, con más de una doble ligadura, es restricta a microorganismos aeróbicos. La introducción de dobles ligaduras se realiza por desaturación oxidativa, ya que todos los sistemas enzimáticos de desaturasas tienen un requerimiento obligatorio de oxígeno. Sin embargo, en bacterias ruminales se ha encontrado ácidos grasos poliinsaturados, pero debido a las condiciones anaeróbicas del rumen se asume que estos no son sintetizados por las bacterias sino que los microorganismos los toman del medio ruminal.

Los procesos de fermentación que ocurren en el rumen involucran un amplio rango de hidratos de carbono y proteínas, dando como producto final ácidos grasos volátiles ( Baile C., 1974 ). Las concentraciones y proporciones relativas de ácidos grasos volátiles dependen de la

naturaleza de la dieta, siendo normalmente los más importantes los ácidos acético ( 60-70% ), propiónico ( 15-20% ) y butírico ( 10-15% ). Estos ácidos grasos de cadena corta tienen gran importancia en el requerimiento energético del poligástrico y en procesos de lipogénesis. La capacidad del rumen para absorber ácidos grasos volátiles es proporcional al largo de cadena de los mismos, siendo absorbidos en esta cavidad alrededor del 70% del total de ácidos grasos volátiles producidos ( Bugaut M., 1987 ).

Debido a la intensa actividad metabólica en la cavidad retículo-ruminal grandes volúmenes de líquido ingresan al omaso. El material que entra al omaso o librillo contiene 90 a 95 % de agua y la función primaria de este órgano es remover la misma, reduciendo el volumen de la ingesta que llegue al abomaso. La cantidad de agua absorbida en el librillo es de alrededor de un 50 %, variando entre un 33 a 65 % según diferentes estudios. Además de remover el agua, el omaso absorbe ácidos grasos volátiles; estimándose que la concentración total de ácidos grasos volátiles que dejan el abomaso hacia el intestino varía entre un 5-15 % de la concentración total presente en la cavidad retículo-ruminal.

El abomaso corresponde en estructura y función, a la región fúndica del estómago de los no rumiantes. El epitelio abomasal posee células que secretan electrolitos, especialmente ácido clorhídrico y además pepsina y mucus. El pH de esta secreción está en el rango de 1.0 a 1.3 y el total del contenido abomasal posee un pH alrededor de 2. El bajo pH de los contenidos abomasales es responsable de la muerte y

desintegración de los microorganismos ruminales, proveyendo óptimas condiciones para la actividad de las enzimas proteolíticas responsables de la digestión de proteínas microbianas en este órgano.

### 1-3. Procesos digestivos en intestino delgado.

La porción de intestino delgado inmediatamente distal al abomaso es llamada duodeno. El duodeno recibe la bilis y las secreciones pancreáticas por un conducto en común ( Johnson R., 1988 ). La bilis esta constituida principalmente por ácidos y pigmentos biliares y con pequeñas cantidades de colesterol, lecitinas, electrolitos y proteínas. Los ácidos biliares no llegan en forma libre al duodeno, sino que se hallan unidos a glicina ( ácido glicocólico ) o a taurina ( ácido taurocólico ) (Thomson A., 1989 ). En rumiantes y no rumiantes, el volumen y composición de la bilis, secretada dentro del duodeno depende de varios factores regulatorios. Entre los más importantes, en rumiantes, se halla la constante presencia de alimentos en la cavidad retículo-ruminal; el continuo pasaje de la ingesta a través del abomaso al duodeno mantiene la circulación biliar entero-hepática. La circulación entero-hepática de las sales biliares demuestra tener vital importancia en la mantención de la secreción continua de bilis en el poligástrico. Al igual que en monogástricos, en los rumiantes, la secretina juega un rol decisivo en la regulación de la secreción de las sales biliares, en respuesta al ingreso del material dietético al duodeno proveniente del abomaso. Aunque existen

evidencias de la actividad de pancreozimina sobre la secreción de sales biliares en monogástricos, en los rumiantes su actividad no ha sido fehacientemente determinada.

En el rumiante el flujo de la secreción pancreática es considerablemente menor al biliar, también se encuentra disminuido si se lo compara con la producción de los monogástricos. Esto podría ser una posible consecuencia de la digestión previa al duodeno característica en los poligástricos.

Durante el pasaje de la ingesta, a través de la porción proximal del duodeno, el alimento es mezclado con las secreciones vertidas por las glándulas de Brunner ; estas glándulas en los herbívoros son especialmente abundantes entre el esfínter pilórico y la entrada común del conducto biliar-pancreático.

En monogástricos, el quimo ácido que entra al duodeno con un pH:2 es neutralizado rápidamente por la adición de secreciones pancreáticas, biliares y duodenales. En los rumiantes esta neutralización es más lenta, ya que, la ingesta conserva un pH bajo hasta el yeyuno ( proximal de yeyuno pH: 3.5-5.0, distal de yeyuno pH: 7-8 ). Aparentemente la capacidad de neutralización de las secreciones duodenales es insuficiente debido al gran volumen de la ingesta que deja el abomaso ( Noble R., 1981 ). Esta carencia en la acción neutralizadora se podría deber en parte al bajo contenido de  $\text{HCO}_3^-$ , en la secreción pancreática de los rumiantes, ya que, la secreción biliar posee un contenido similar de  $\text{HCO}_3^-$  al encontrado en los monogástricos.

Aunque bajo circunstancias normales de nutrición, el rumiante recibe

entre 1 a 3 % de contenido lipídico, es conocido que el sistema digestivo del poligástrico tiene la capacidad de absorber grandes cantidades de lípidos cuando se elevan las necesidades. La capacidad de los rumiantes, para digerir lípidos, es mayor que la de los monogástricos. Se han sugerido varios motivos para explicar la eficiente absorción, una de ellos radica en la continua y lenta liberación de ácidos grasos dentro del duodeno, condición que no existe en los monogástricos, para facilitar la asimilación por parte de la mucosa intestinal.

En los animales no rumiantes una alta proporción de lípidos que alcanzan el intestino se hallan en forma esterificada, en contraste con la predominante forma de ácidos grasos libres en el material intestinal de la ingesta del rumiante ( Gangl A., 1975 ). Sin embargo, en estos últimos los ácidos grasos libres se hallan íntimamente relacionados con el material de la dieta.

En los poligástricos existen mayores requerimientos de bilis que de jugo pancreático. En experimentos realizados en ausencia de bilis y de jugo pancreático, se observó que la concentración de ácidos grasos en linfa disminuía en forma considerable cuando faltaba la primer secreción. Esto podría ser debido a la digestión previa al intestino en la cavidad retículo-ruminal, lo que hace que los alimentos lleguen al duodeno prácticamente en forma absorbible para la mucosa intestinal.

En contraste con lo que ocurre en monogástricos, donde la digestión lipídica ocurre en un medio bifásico, consistente en una fase micelar

y otra lipídica, en los poligástricos hay una notable ausencia de fase lipídica. En realidad, una fase micelar es acompañada por una segunda fase consistente en material particulado, al que se hallan unidos los lípidos endógenos y los provenientes de la dieta. Estos lípidos unidos a partículas no están inmediatamente disponibles para la absorción; incluyendo ácidos grasos libres y también otros componentes lipídicos necesarios para la solubilización desde el material particulado a la mucosa intestinal; por ejemplo, ácidos biliares conjugados, fosfolípidos de origen biliar o microbiano y sus lisoderivados.

En los animales rumiantes predominan dentro de los conjugados biliares la taurina sobre la glicina, esto es de importancia por las condiciones de acidez, conservando moléculas parcialmente ionizadas y por lo tanto la fase micelar puede llevar a cabo la solubilización.

Bajo condiciones similares los conjugados de glicina están preferencialmente adsorbidos al material particulado. En animales no rumiantes donde los valores de pH intestinal son mas elevados, los conjugados de glicina en bilis pueden realizar su función mas eficientemente.

A medida que aumenta el pH en el intestino las condiciones mejoran para una buena solubilización y comienza a aumentar la transferencia de ácidos grasos no esterificados desde el material particulado a la fase micelar y luego a las células de la mucosa intestinal. La bilis volcada al duodeno asiste en la transferencia de ácidos grasos no esterificados desde el material particulado, esto explica la virtual abolición de la absorción de ácidos grasos en ausencia de flujo

biliar.

Si bien los lípidos de la ingesta llegan inalterados al duodeno desde el rumen, se ha encontrado un aumento en la cantidad de los mismos al ingresar al intestino delgado, por ejemplo, los ácidos grasos de cadena larga provenientes del abomaso se hallan aumentados en un 27 % respecto a los tomados con la dieta. Dentro de las posibles fuentes lipídicas que ocasionarían este incremento se incluyen las secreciones salivares y gástricas y descamaciones epiteliales, pero el aporte más importante es la síntesis realizada por las poblaciones ruminales de bacterias y protozoos.

### **1-3a. Aspectos fisiológicos de la absorción en la mucosa intestinal**

Ha sido demostrado, en estudios morfológicos, que la absorción de lípidos ocurre en el tercio proximal del intestino delgado. Grandes gotas lipídicas fueron detectadas en las células apicales de la mucosa del duodeno, en contraste con pequeñas gotas en otras áreas de absorción ( Landsverk T., 1979 ).

Las células de la vellosidad intestinal sufren un proceso de maduración hasta alcanzar plenamente sus cualidades absorptivas en el ápice de la misma ( Maroux S., 1988; Smith M., 1989 ). Este proceso de maduración puede ser seguido por incremento en la actividad de las enzimas de la célula intestinal, por ejemplo, en la región de la cripta donde la mitosis celular es importante la actividad de la fosfatasa alcalina es baja ( Weiser M., 1986 ). Sin embargo, la

fosfatasa alcalina va aumentando su grado de actividad hasta que la célula alcanza su mayor grado de diferenciación ( Sussman N., 1989; Shirazi-Beechey S., 1989 ). En cuanto a la modificación lipídica de acuerdo al grado de maduración de la célula intestinal, las tres principales clases de lípidos involucrados en la evolución son los fosfolípidos, colesterol y glicolípidos. Estas tres variedades de lípidos aumentan en la porción superior de la vellosidad intestinal comparada con la base de la misma.

La biosíntesis endógena del colesterol se efectúa primordialmente en las zonas de las criptas de la vellosidad, mientras que su absorción es realizada por las células cilíndricas diferenciadas de la región apical ( Alessandri J., 1990; Thurnhofer H., 1990a ).

Muy poco es lo conocido acerca de la interacción de los lípidos de la dieta con la zona apical o microvellosidad de la célula intestinal, como son incorporados en la capa externa de dicha membrana la forma de difusión a través de la misma y su ulterior mecanismo de liberación al citosol. La biogénesis de los lípidos de la membrana de las células de la vellosidad intestinal, también es otro factor aun no completamente comprendido; como así también cual es el mecanismo que utilizan los lípidos para alcanzar su sitio en la composición de la misma ( Thurnhofer H., 1990b ).

La fluidez de la membrana lipídica es la característica central del modelo del mosaico fluido de las membranas biológicas y es esencial para mantener las propiedades físico-químicas que facilitan la actividad absorptiva de las células de la mucosa intestinal. Entre los

principales determinantes químicos de las propiedades de membrana adquieren importancia las cadenas acilo de los fosfolípidos, el contenido de colesterol y la composición del grupo polar de los fosfolípidos ( Alessandri J., 1990; Ibrahim S., 1991 ). Para lograr las condiciones físico-químicas adecuadas de la membrana juegan un rol fundamental los sistemas enzimáticos de elongación y desaturación ( Thomassen M., 1990 ). Existen numerosos trabajos sobre la actividad de las desaturasas en microsomas hepáticos de diferentes especies, sin embargo, aun no ha sido identificada fehacientemente la actividad de desaturación en la mucosa intestinal ( Garg M., 1988 ).

Datos obtenidos demuestran que la microvellosidad de membrana del intestino delgado, manifiesta diferencia desde región proximal a la distal en la composición lipídica y sus propiedades biofísicas, por lo tanto ciertos aspectos de la membrana, como fluidez de la misma y composición enzimática se hallan íntimamente relacionados con estos cambios ( Schwarz S, 1985; Bernard A., 1992 ).

### **1-3b. Transporte intracelular de lípidos y metabolismo.**

La resíntesis de triglicéridos en las células de la mucosa intestinal puede ser realizada por dos vías, la vía del  $\alpha$ -glicerofosfato, localizada principalmente en el retículo endoplásmico rugoso y membranas del aparato de Golgi, la cual se halla distribuída en casi todos los sistemas celulares y la vía del monoglicerato, localizada en el retículo endoplásmico liso y

considerada fundamentalmente como característica de la mucosa intestinal. En los monogástricos donde gran parte de los lípidos de la dieta son absorbidos como  $\beta$  monoglicéridos y ácidos grasos libres, la vía del monoglicérido predomina sobre la vía del  $\alpha$  glicerofosfato; esta última es realmente activa solamente en aquellos casos en que existe gran cantidad de ácidos grasos libres en intestino delgado del no rumiante ( Hulsman W., 1975 ).

Bajo condiciones normales, los poligástricos absorben los lípidos de la dieta casi totalmente como ácidos grasos libres y la vía del  $\alpha$ -glicerofosfato es la principal ruta para la resíntesis de triglicéridos en las células de la mucosa intestinal. Tal actividad enzimática es principalmente encontrada en las células de la mucosa del duodeno, parte anterior del yeyuno y es acompañada por una alta actividad de la enzima gliceroquinasa, como ha sido demostrado en otras especies.

La vía del monoglicérido en rumiantes, ha sido encontrada con alta actividad en las células de la mucosa intestinal de fetos y neonatos, lo cual podría sugerir que las enzimas necesarias para esta ruta metabólica son retenidas por el rumiante adulto pudiendo utilizar esta vía si fuese necesario ( Noble R., 1981 ). El largo de cadena de los ácidos grasos, grado de insaturación y concentración de sustrato son factores determinantes para su velocidad de incorporación dentro de los triglicéridos por la vía del  $\alpha$  glicerofosfato y como en otros tejidos determina su posición dentro de la molécula de triglicérido.

La metabolización de los fosfolípidos y el colesterol, en la mucosa

intestinal del poligástrico, coincide en un todo con lo que ocurre en monogástricos. El intestino delgado de los rumiantes realiza una gran síntesis de colesterol, pero este proceso es altamente influenciado por la dieta.

### 1-3c. Transporte lipídico en linfa y plasma.

En rumiantes y no rumiantes, la síntesis de componentes lipídicos en las células de la mucosa intestinal es seguida de la incorporación o empaquetamiento de los mismos dentro de partículas lipoprotéicas, tales como quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad ( VLDL ) siendo luego vehiculizados por linfa, via conducto torácico, y volcados finalmente a plasma ( Tso P., 1984 ).

En comparación con los monogástricos, en los que el flujo de lípidos drenados a linfa desde el intestino está sujeto a considerables fluctuaciones, la absorción lipídica y transporte linfático en rumiantes es un proceso continuo. Los lípidos vehiculizados por la linfa en el conducto torácico se presentan asociados en un 73% a VLDL y 27% a los quilomicrones.

En plasma los principales componentes son ésteres del colesterol y fosfolípidos acompañados por triglicéridos, ácidos grasos libres y colesterol libre. Una alta proporción de lípidos plasmáticos son transportados por lipoproteínas de alta densidad ( HDL ), siendo diferente al humano en el que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) cumplen un rol mas importante.

El transporte de ácidos grasos en plasma es mediado por una íntima relación con la albúmina, que les permite ser solubilizados en el torrente circulatorio. La capacidad de la albúmina, por el pegado de ácidos grasos, aumenta con el largo de cadena de los mismos; aunque se cree que podrían llegar a existir sitios de unión específicos para diferentes tipos de ácidos grasos( Noble R., 1981 ).

#### **1-4. Metabolismo lipídico en el hígado.**

El hígado es uno de los órganos mas importantes en el metabolismo lipídico; después de la asimilación de los lípidos circulatorios estos pueden tener diferentes destinos, tales como, biosíntesis de ácidos grasos, componentes de membrana, volcados a intestino con el jugo biliar o pueden ser incorporados a lipoproteínas y secretados al torrente circulatorio para ser transportados a otros sitios del organismo ( Stremmel W, 1989; Armentano L., 1992 ).

En el hígado, como en todos los tejidos, los ácidos grasos deben ser convertidos antes de ser metabolizados en tioésteres de coenzima A, a expensas de la hidrólisis de adenosintrifosfato (ATP). Esta activación es catalizada por acil CoA sintetetasas, las que se hallan clasificadas según el largo de cadena de los ácidos grasos sobre los que actúan ( Rosenthal M., 1987 ).

La actividad de la acil CoA sintetasa con afinidad por ácidos grasos de cadena larga no ha sido determinada en los rumiantes. En el hígado de los monogástricos esta enzima está localizada en el retículo

endoplásmico y en la membrana mitocondrial externa y se sostiene que podría formar parte de un complejo multienzimático. En ausencia de evidencias contrarias, se ha asumido que la vía metabólica para los ácidos grasos de cadena larga en rumiantes sería la misma que la empleada por los animales de estómago simple.

En rumiantes los lípidos de la dieta son mayormente absorbidos como ácido esteárico debido a la activa biohidrogenación ruminal de los ácidos oleico, linoleico y linolénico, los que son componentes principales en el alimento ingerido. Sin embargo, se hallan en los tejidos del poligástrico significativas cantidades de ácido oleico debido a la actividad de las desaturasas sobre el ácido esteárico. En los hepatocitos los ácidos grasos de cadena larga saturados son desaturados a sus derivados 9-10 cis-monoin saturados por un sistema enzimático localizado en microsomas. Este sistema requiere de dadores de electrones y de oxígeno molecular como cofactores obligatorios para actuar sobre el estearil CoA.

La elongación de ácidos grasos en el hígado de rumiantes sigue dos vías diferentes localizadas en microsomas y mitocondrias. El sistema microsomal realiza la elongación en presencia de malonil CoA y nicotinamida dinucleótido fosfato reducido ( NADPH ), mientras que el sistema mitocondrial requiere acetyl CoA y NADH o nicotinamida dinucleótido reducido ( NADH ).

La asimilación de ácidos grasos de cadena larga en el hígado del rumiante es considerable, siendo controlada la velocidad de la  $\beta$ -oxidación en el tejido hepático del rumiante por la concentración

plasmática de lípidos.

La capacidad del hígado de rumiantes para oxidar ácidos grasos de cadena larga no es tan activa si se la compara con la de los monogástricos, aunque la oxidación de cuerpos cetónicos, en los poligástricos, es más activa que en los animales de estómago simple. Gran parte de los ácidos de cadena larga son catabolizados en el hepatocito en forma de cuerpos cetónicos ( acetoacetato y 3-hidroxi-butirato ), por ejemplo, se conoce que alrededor de un 63% de la palmitoil carnitina oxidada en la mitocondria hepática es transformada en acetoacetato. Debido a esta característica de los rumiantes ha sido establecido que los niveles de cuerpos cetónicos circulantes excede el encontrado en los no rumiantes.

En particular el control de la lipogénesis y cetogénesis deben ser relacionados con la constante gluconeogénesis que ocurre en el hígado del rumiante. La gluconeogénesis es la mayor y continua función del hígado del poligástrico, la disponibilidad de oxalacetato puede ser un importante factor común en la regulación de esta vía, la lipogénesis y cetogénesis ( Bell A., 1981 ).

## 2-. Generalidades sobre la Proteína Transportadora de Ácidos Grasos.

La proteína citosólica Z fue aislada inicialmente a partir de hígado y reconocida como ligadora de iones orgánicos ( Levi A., 1969 ). En la actualidad todas las evidencias, incluyendo datos sobre la estructura primaria y secundaria, indican que la proteína Z es idéntica a la

Proteína Transportadora de Ácidos Grasos ( PTAG ) la que también posee capacidad de pegar ácidos grasos ( Haunerland N., 1984 ). Por otra parte se encontró que la Proteína A, aislada de hígado de rata luego de la administración del colorante carcinogénico " aminoazodye " , sería también idéntica a la PTAG.

Existen similitudes concernientes a proteínas sin actividad enzimática involucradas en el pre y postmetabolismo del colesterol, tales como, Proteínas Transportadoras del Escualeno ( Morton R., 1986).

Estas proteínas transportadoras representan un 5 a 8 % de las proteínas citosólicas halladas en hígado, pero aún continúan existiendo datos conflictivos concernientes a su punto isoeléctrico, peso molecular, estabilidad y especificidad de pegado. Por ejemplo, el isoelectroenfoque de proteínas transportadoras produjo varias subfracciones capaces de formar complejos con ácidos grasos; fenómeno explicado por la heterogeneidad o la concomitante ocurrencia de proteínas en su forma libre y con sus ligandos. Como consecuencia de estos resultados la verdadera función de las PTAG aun no ha sido demostrada. Sin embargo, un importante rol en la regulación del metabolismo del triacilglicerol, en hígado de rata, ha sido indicado por varios autores ( Bass N., 1990 ).

La solubilidad de los ligandos hidrofóbicos en los espacios intra y extracelulares es facilitada por proteínas transportadoras de lípidos. Muchas proteínas han sido descritas, las cuales ligan con alta afinidad ácidos grasos en forma no covalente ( Glatz J., 1985 ;

Potter B., 1989 ).

Los ácidos grasos intracelulares son importantes moléculas para la producción de energía, la síntesis de lípidos de membrana y mediadores lipídicos, tales como, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos.

Los ácidos grasos, sus CoA derivados y ésteres de carnitina, pueden influenciar directa o indirectamente varios procesos y funciones celulares por su interacción con membranas, enzimas, transportadores y receptores. Por lo tanto, la regulación de la concentración de ácidos grasos, sus CoA derivados y ésteres de carnitina es de vital importancia y es donde podría entrar en juego la actividad desarrollada por la PTAG ( Takahashi K., 1983; Mogensen I., 1987; Knudsen J., 1990 ).

Las Proteínas Transportadoras de Ácidos Grasos citosólicas pertenecen a una familia con un gen ancestral común ( Bernier I., 1987; Billich S., 1988 ). Estas proteínas de 14-15 KDa son expresadas en una amplia variedad de tejidos y aunque sus funciones no han sido claramente definidas, se ha establecido que aumentan la transferencia de ácidos grasos de cadena larga entre membranas lipídicas, artificiales o nativas y también que poseen un efecto estimulador sobre ciertos grupos de enzimas del metabolismo de ácidos grasos ( Ockner R., 1990 ). Por otra parte se supone que la PTAG podría tener un rol en la modulación del crecimiento y proliferación celular, posiblemente por su afinidad por ligandos, tales como, prostaglandinas, leucotrienos y ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena larga juegan un rol vital en el organismo; además de proveer energía, son

precursores de eicosanoides, covalentemente modifican la estructura de ciertas proteínas y son constituyentes esenciales de membrana para mantener la integridad de las organelas ( Bass N.,1985 )

En intestino delgado los ácidos grasos de cadena larga son principalmente esterificados en triacilglicéridos, secretados y transportados hacia la linfa y circulación sanguínea en forma de quilomicrones y VLDL; en el adipocito los triacilglicérols son liberados por lipólisis y transportados por sangre unidos a albúmina ( Siegenbeek J., 1986; Pavero C., 1992 ). Analizando las PTAG desde el punto de su expresión tisular, actividad de pegado, efectos de transferencia in vitro y su actividad sobre enzimas, ha sido postulado que esta familia de enzimas juega un rol importante en el transporte y metabolismo de ácidos grasos de cadena larga; ver figura 1.

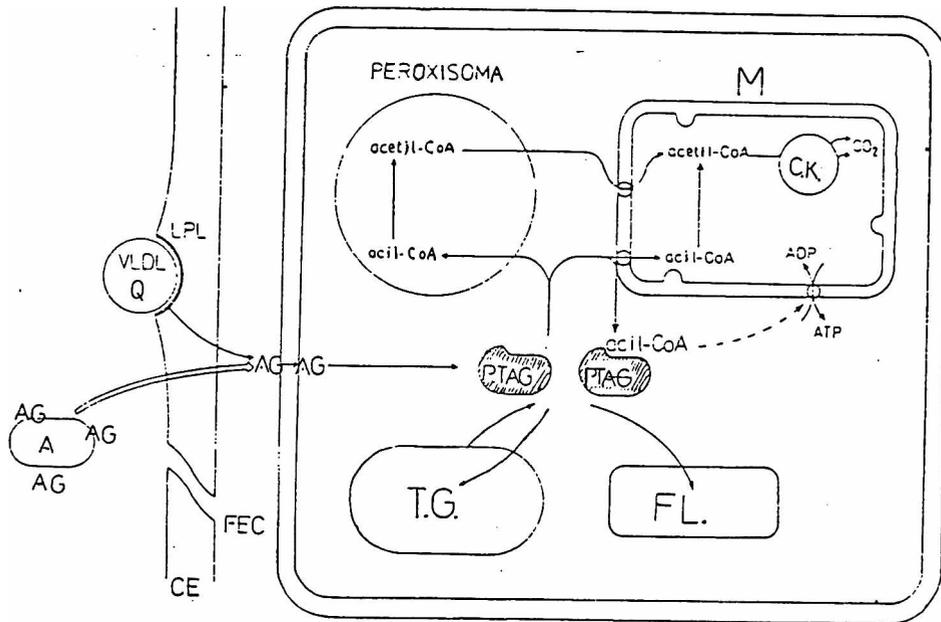


Fig 1- Rol de la Proteína Transportadora de Ácidos Grasos en el metabolismo celular de los ácidos grasos de cadena larga. Abreviaturas: M, mitocondria; CK, Ciclo de Krebs; TG, triacilgliceroles; FL, fosfolípidos, A; albúmina; AG, ácidos grasos; Q, quilomicron; CE, célula endotelial, FEC, fluido extracelular; LPL, lipoproteinlipasa; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad.

**2-1. Familia de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos citosólica.**

Las PTAG citosólicas, de bajo peso molecular, estan ampliamente distribuídas y pertenecen a una familia que incluye a las proteínas citosólicas transportadoras de retinoides. En la actualidad se conocen ocho miembros de esta familia y su nomenclatura se basa fundamentalmente en el tejido en el que primariamente fue identificada, aunque aún se requiere establecer una terminología adecuada ( Bassuk J., 1987 ), Tabla 1.

Tabla 1-. Miembros de la familia genética de la PTAG citosólica.

	Sinónimos y abreviaturas	Tejidos
Hepática PTAG	HPTAG Proteína Z Proteína Transportadora del Hemo ( PTH )	hígado, intestino
Intestinal PTAG	IPTAG	intestino delgado
Cardíaca PTAG	CPTAG MiocardialPTAG	corazón, endotelio músculo esquelético ovario, testículo gl. mamaria, cerebro
Mielina P2	mP2	mielina ( nervio )

Adipocito PTAG	$\alpha$ P2, p422, APTAG Proteína Transportadora de lípidos del adipocito ( PTLA )	tejido adiposo
Factor de inhibición del crecimiento de la glándula mamaria*	FIGCGM	glándula mamaria
Gastrotropina*		íleon terminal
Proteína Transportadora PTR I de Retinol I		hígado, pulmón testículo, riñón
Proteína Transportadora PTR II de Retinol II		intestino delgado
Proteína Transportadora PTAR de Ácido Retinoico		Amplia distribución Ausente en yeyuno e íleon.

---

\* No han sido fehacientemente corroborados como miembros de esta familia.

---

La PTAG variedad hepática ( HPTAG ) se halla presente en hígado y células de la mucosa intestinal, alcanzando entre un 2 a 5 % de las proteínas citosólicas totales en estos tejidos ( Ockner R., 1982; Kanda T., 1990 ). El epitelio intestinal contiene otra abundante PTAG que se encuentra sólo en intestino delgado y por ese motivo es

denominada como variedad intestinal ( Ockner R.,1976; Nemezc G.,1991a).La tercer variedad en importancia es la cardíaca ( Fournier N., 1978, 1983a, 1983b, 1985, 1988; Glatz J., 1985b; Fujii S., 1988 ) que se encuentra distribuída en corazón, músculo esquelético, cerebro, ovario, testículo, riñon y glándula mamaria. La PTAG también ha sido aislada de pulmón ( Haq R., 1985 ) y placenta ( Brandes R.,1987) pero aún no han sido estructuralmente caracterizadas. El cuarto miembro de esta familia es designado como la Proteína Transportadora de lípidos del adipocito, la que presenta una cercana homología con otro miembro de la familia llamado mielina P2 la que se halla presente en la vaina de los nervios mielínicos ( Bernlohr D., 1984 ).

Otros miembros aún no definitivamente caracterizados parecerían tener relación estructural con las PTAG citosólicas, entre ellos se encuentra el Factor de Inhibición del Crecimiento de la Glándula Mamaria ( Böhmer F., 1987 ) el que posee un 84% de homología en la secuencia de aminoácidos con la PTAG variedad cardíaca. Recientemente ha sido identificado un Factor Regulador del Crecimiento Fibroblástico ( 13 KDa ) que presenta reacción antigénica cruzada con el factor antes mencionado de la glándula mamaria y con la PTAG cardíaca, aunque aún se desconoce su secuencia de aminoácidos ( Kaikus R., 1990 ).

Otro posible miembro de esta familia de PTAG es una proteína de 14054 Da, aislada de la mucosa del ileon y llamada gastrotropina ( Sacchetini J., 1990; Kanda T., 1991 ). La gastrotropina porcina posee un 35 % de homología en la secuencia de aminoácidos respecto a la PTAG hepática, pero difiere de los otros miembros en que posee poca

afinidad por los ácidos grasos aunque pega sales biliares y bilirrubina ( Stremmel W., 1983, 1986 ). Esta proteína constituye alrededor del 0,1 % de las proteínas citosólicas halladas en las células de la mucosa del ileon y al igual que el factor de la glándula mamaria y el fibroblástico fue detectada en sangre.

Varias proteínas incluyendo la Proteína Transportadora de Acido Retinoico y las Proteínas Transportadoras de Retinol I y II, también pertenecen a esta familia ( Fukai F., 1987; Ong D., 1987; Kakkad B., 1988; Glatz J., 1990 ). Finalmente se ha demostrado que la Proteína Transportadora de Selenio es idéntica a la PTAG hepática ( Bansal M., 1989 ).

## 2-2. Funciones de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos.

Si bien en la actualidad no se conoce exactamente la actividad que puede llevar a cabo la PTAG en la célula, se han considerado la siguientes posibles funciones de esta proteína, Tabla 2.

---

Tabla 2-. Posibles funciones de la Proteína Transportadora de Ácidos Grasos.

---

- a- Pegado de ácidos grasos.
  - b- Transporte de ácidos grasos.
  - c- Actuar como cofactor en reacciones metabólicas lipídicas.
  - d- Afectar la compartimentalización intracelular de ácidos grasos.
  - e- Influenciar el crecimiento celular y mitosis.
  - f- Interactuar con el mecanismo de acción de la insulina.
  - g- Contribuir en el metabolismo del hemo, selenio y biosíntesis de esteroides.
  - h- Protección celular contra efectos nocivos de los ácidos grasos.
- 

Analizando detalladamente las posibles funciones de esta proteína, como se mostró en la Tabla 2, se podría llegar a concluir lo siguiente:

- a) Por definición su capacidad de ligar ácidos grasos, podría ser considerada como su principal función y las otras actividades como secundarias a esta ( Peeters R., 1989a ).
- b) El transporte de ácidos grasos dentro de la célula o entre membranas y citosol, es una de las posibilidades atractivas pero aun en discusión ( Ockner R., 1972 ).
- c) Existe abundante evidencia de que la PTAG podría actuar como cofactor aumentando la velocidad de reacción de las vías oxidativas y sintéticas del metabolismo de ácidos grasos ( Iseki S., 1989; Brandes

R., 1990 ).

d) En las células de la mucosa intestinal intervendría en el destino de los ácidos grasos post-absorción ( Peeters R., 1989b, 1989c )

e) Se ha relacionado a la PTAG con ciertos procesos que gobiernan la replicación y desarrollo celular ( mitosis, crecimiento celular en cultivos celulares de hígado y células de cáncer mamario ) ( Suzuki T., 1992 ).

f) En estudios realizados con la p422 en adipocitos, se la ha hallado como intermediario fosforilado que jugaría un rol esencial en la señal de la insulina, influyendo de esta manera en la regulación del flujo de la glucosa y ácidos grasos en la célula ( Sacchetini J., 1986 ).

g) La PTAG hepática podría jugar un importante rol en el metabolismo del hemo y selenio, como así también en la biosíntesis de esteroides, aunque es muy poco lo que se conoce acerca de estas interacciones ( Vincent S., 1985; Nemezc G., 1991b; Bogdarin Y., 1990 ).

h) La PTAG actuaría protegiendo a la célula contra indeseados y potenciales efectos nocivos de los ácidos grasos de cadena larga, que podrían llegar a dañar la integridad de la membrana, algunos de estos efectos se hallan mencionados en la Tabla 3.

---

Tabla 3-. Efectos en la célula de ácidos grasos o sus ésteres de acil-CoA.

---

- Disturbios en la estructura de membrana y su función.
  - Acción inhibitoria sobre Na-K-ATPasa.
  - Activación de los canales de K.
  - Perturbación del flujo de Ca.
  - Inhibición del pegado de angiotensina.
  - Modulación de la activación de la protein quinasa C.
  - Estimulación del transporte de glucosa.
- 

A pesar de estas posibles e hipotéticas funciones de PTAG, su importancia en aspectos fisiológicos o patológicos permanece oscuro. Mas aún, es probable que su función difiera no sólo en los diferentes tipos de tejidos en los que se expresa, sino también, que sea influenciada por cambios metabólicos, ciclos celulares y otros factores regulatorios exógenos y endógenos.

### 2-3. Datos fisicoquímicos y estructurales de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos.

Preparaciones de PTAG fueron aisladas de hígado, corazón, intestino y mielina de varias especies, pero recientemente también de músculo esquelético, pulmón, placenta, cerebro bovino, mucosa gástrica de rata ( Kanda T., 1989 ), adipocitos humanos y porcinos, glándula mamaria bovina y de riñón humano y de rata ( Rustow B., 1979; Bass N., 1985b; Pähler A., 1985; Smith S., 1985; Fujii S., 1987 ).

El peso molecular de todas las PTAG estudiadas oscila entre 14 y 16 kDa y el número de aminoácidos varía entre 127 y 133 ( Alpers D., 1984 ). Los diferentes tipos de PTAG difieren marcadamente en sus puntos isoeléctricos; la PTAG cardíaca es una proteína ácida ( PI:5 ), la PTAG hepática es neutra y las PTAG presentes en mielina y adipocito son proteínas básicas ( PI: 7,6 - 9,0 ). Todas las PTAG, incluyendo el tipo mielínico, poseen un grupo acetilo en su aminoácido N-terminal ( Schoentgen F., 1989, Veerkamp J., 1991).

Técnicas electroforéticas y cromatografía de intercambio iónico, demostraron la existencia de isoformas de la PTAG hepática en rata, humano, cerdo y bovino y de PTAG cardíaca en bovino y cerdo ( Takahashi K., 1983 ). También fueron halladas isoformas en placenta humana, tejido adiposo de cerdo y cerebro bovino. La PTAG cardíaca, presente en corazón bovino, se halla en dos isoformas citosólicas con un punto isoeléctrico de 4,9 y 5,1 ( Jagshies G., 1985 ).

Hasta ahora la estructura de las PTAG ha sido establecida, ya sea,

por técnicas químicas para proteínas, como en los casos para PTAG cardíaca en rata y hombre, mielínicas de hombre, ternero, conejo y cerdo o por secuenciación de nucleótidos de cADN para la PTAG hepática de rata y hombre, PTAG cardíaca de rata, ternero y ratón, PTAG intestinal en hombre y rata, variedad adipocítica en ratón y hombre y la variedad mielínica en conejo ( Gordon J., 1983 ). Un alto grado de homología ( mayor al 80 % ) existe entre las PTAG del mismo tejido, por ejemplo, corazón, hígado o mielina, de diferentes especies de mamíferos. La PTAG hepática y la PTAG intestinal son entre un 20 a 35 % homologas entre sí y con los tipos cardíaca, adipocito y mielínica. Estos tres últimos tipos de PTAG poseen un 60 a 80 % de homología en la secuencia de aminoácidos, mientras que la PTAG de cerebro de ternero tiene mayor homología con la PTAG cardíaca de bovino que con la variedad mielínica.

El análisis de la estructura secundaria indica un alto porcentaje de  $\alpha$  hélice ( 12 a 38 % ) y estructuras  $\beta$  ( 34 a 76 % ) en las PTAG de hígado, corazón, intestino y mielina. La mayoría de las PTAG se cree que poseen dos regiones  $\alpha$  hélice alternadas con láminas  $\beta$ , excepto PTAG intestinal de rata y PTAG de corazón humano que poseen tres regiones de  $\alpha$  hélice ( Ropson I., 1992 ). También fue encontrado, en el caso de la PTAG cardíaca, un estado de autoagregación que actuaría como un sistema de competición en los procesos de pegado de ácidos grasos. Este estado de autoagregación podría ser influenciado por la concentración de proteínas en el corazón de terneros, ratas y humanos.

## 2-4. Características de pegado de ligandos de la Proteína Transportadora de Ácidos Grasos.

Las características de pegado de las PTAG a diversos ligandos, ha sido estudiada por varios métodos. La variedad de técnicas, condiciones y diferentes grados de pureza de PTAG utilizados en las preparaciones pueden explicar las grandes diferencias en la naturaleza de sus ligandos, afinidad y estequiometría. Originalmente la filtración en geles fue utilizada para probar la existencia de PTAG, pero la afinidad del gel por los ácidos grasos impide, sin embargo, la determinación precisa de los parámetros de pegado.

Ensayos de pegado con radioquímicos o ensayos de transferencia con liposomas, han producido importante información, ya que en estos casos los ligandos libres o unidos a proteínas pueden ser separados y pegados en un medio en equilibrio ( Suzuki T., 1988; Paulussen R., 1989 ).

Los ligandos específicos varían ampliamente entre los diferentes tipos de PTAG. Se ha encontrado que la PTAG hepática se halla asociada a ácidos grasos pero también al hemo ( Billheimer, 1980 ) y bilirrubina. Las PTAG presentes en el hígado de rata y corazón bovino poseen mayor cantidad de ácidos grasos no saturados que la albúmina; también se encontró que las diferentes isoformas de estas proteínas en hígado de rata, pulmón y placenta difieren cuali y cuantitativamente en el pegado de ácidos grasos de cadena larga ( Schulenberg-Schell H., 1988 ).

Estudios con ligandos exógenos de PTAG hepática muestran que un gran número de moléculas hidrofóbicas se unen a esta proteína, pero la mayoría de estas lo hace con menor afinidad que los ácidos grasos. Dentro de este grupo se hallan incluidos acil CoA, acil-carnitina, hemo, hormonas esteroideas y sus metabolitos, ácidos biliares, lisofosfatidilcolina, bilirrubina, sulfobromoftaleína, retinol palmitato, hormonas tiroideas, porfirinas y prostaglandinas E<sub>1</sub> ( Catalá A., 1985; Tazuma S., 1987 ).

La estequiometría de unión de los ácidos grasos a PTAG es de un mol de ácido graso por mol de proteína, aunque existen discrepancias según la técnica utilizada para el estudio.

#### **2-5. Estructura de los genes de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos y su distribución celular.**

La secuencia de nucleótidos para los genes que codifican a la PTAG hepática, PTAG intestinal ha sido ya establecida. La organización de estos genes es idéntica, consisten en 3400 a 4000 nucleótidos conteniendo cuatro exones y tres intrones ( Sweetser D., 1986 ). La comparabilidad, posición de los intrones de los genes, varía marcadamente de tamaño ( por ejemplo, el primer intrón puede tener 1,2 o 8,4 kilobases ) pero la interrupción de la secuencia del código es precisamente en la misma posición.

El primer exón de la PTAG hepática exhibe una significativa homología con el resto de los miembros de la familia, mientras que el tercer

exón solo muestra similitud con la PTAG intestinal ( Veerkamp J., 1991).

Aunque los miembros de la familia PTAG se encuentran altamente relacionados y posiblemente originados a partir de un gen ancestral común, los genes que codifican a estas proteínas están dispersos a través del genoma.

La distribución de los diferentes tipos de PTAG, principalmente derivan de estudios inmunohistoquímicos y ensayos inmunoquímicos, aunque se han mejorado significativamente los resultados obtenidos por el uso de "Northern Blotting" del mensajero del ácido ribonucleico ( mARN ) de la PTAG ( Iseki S., 1990a; 1990b ). Muchos de los tipos de PTAG tienen una distribución limitada dentro del organismo, por ejemplo mARN de PTAG hepática se halla en hígado, estómago e intestino, mientras que el mARN correspondiente a PTAG intestinal fue hallado solamente en intestino ( Sweetser D., 1987 ).

La presencia de PTAG cardíaca en rata y/o su mARN fue demostrado en músculo esquelético, aorta, estómago, glándula mamaria, placenta, glándula adrenal, testículos y no así en hígado, pulmón e intestino.

La abundancia en los diferentes tejidos de PTAG se ve reflejada por el contenido de mARN. El mARN de la PTAG hepática fue encontrado en alta concentración en hígado e intestino ( 0,7 y 2,1 % del total de mARN respectivamente ) mientras que el correspondiente a PTAG intestinal fue sólo el 1 % del total de mARN en intestino delgado ( Alpers D., 1984; Gordon J., 1985 ).

Estudios inmunohistoquímicos han demostrado la localización

específica de la PTAG dentro de las células de hígado, intestino y estómago. En el hígado la PTAG hepática fue encontrada solamente dentro de los hepatocitos y no en otras células del tejido hepático. Las concentraciones de PTAG intestinal y hepática son respectivamente 2 y 1,3 veces mayores en yeyuno de rata que en ileon. Técnicas de inmunohistoquímica indican que la concentración de PTAG decrece desde proximal a distal del intestino, ya sea en ratones o ratas. El intestino también mantiene una relación en la concentración de mARN de PTAG a lo largo del eje vertical de la vellosidad de la mucosa intestinal bovina, siendo mas abundante en los enterocitos del ápice que en las células de la cripta de la vellosidad.

Los tipos de PTAG también se ven afectados por cambios en las condiciones fisiológicas, por ejemplo, por el ayuno la concentración de PTAG aumenta en la porción proximal del intestino. Además la PTAG se ve influenciada por el sexo, ya que, en el caso de las variedades cardíaca y hepática las hembras poseen un nivel de concentración mas alto que los machos. Tratamientos realizados con el suministro o privación de hormonas han demostrado la influencia del sexo ( Paulussen R., 1986 ) en los niveles de PTAG hepática de hembras, correlacionado con un aumento en la concentración del respectivo mARN. Por otra parte un aumento en el contenido graso de la dieta, aumenta la concentración de los tipos de PTAG presentes en hígado, corazón, intestino y glándula mamaria.

Los efectos producidos por el tratamiento con clofibrato son diferentes para los dos tipos de PTAG presentes en intestino, mientras

que la PTAG hepática aumenta su concentración dos veces la PTAG intestinal sólo lo hace en un 25 %. Esto no se debe a la velocidad de recambio de esta proteína ( 3 días ) sino que se halla relacionado directamente con los niveles de mRNA.

## **2-6. Aspectos funcionales de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos.**

Como se ha mencionado, se cree que la PTAG juega un rol en la asimilación y transporte de ácidos grasos y en la regulación de la concentración de los mismos a nivel celular. La existencia y la distribución celular de los diferentes tipos de PTAG, sugieren una adaptación de estas moléculas a distintas funciones, que pueden estar relacionadas con requerimientos metabólicos de la célula.

En experimentos realizados con PTAG enfrentados a liposomas, membranas mitocondriales, microsomas, se encontró que la proteína remueve ácidos grasos desde estas membranas. Esta transferencia de ácidos grasos no sería sencillamente por colisión de PTAG contra las membranas, sino que se cree que la disociación de los ácidos grasos ocurre en una reacción con velocidad límite ( Spener F., 1989 ). Esta proteína también entrega ácidos grasos y acil CoA a los peroxisomas para la oxidación, pero no transporta acil CoA a través de la membrana peroxisomal ( Mikolagczyk S., 1990 ).

El pegado de prostaglandinas y leucotrienos por la PTAG hepática podría estar relacionado con el crecimiento celular. La incubación de

prostaglandinas E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> con membranas de adipocito de rata en presencia de PTAG hepática aumenta el pegado de prostaglandinas. La modulación de la concentración de ácidos grasos libres y acil CoA por PTAG podría también ser importante debido a un posible mecanismo de activación de proteín-quinasa C, varios factores de crecimiento utilizan indirectamente esta proteína como señal de proliferación celular ( Cohen-Luria R., 1990 ).

## MATERIALES Y METODOS.

El ácido palmítico [ 1-<sup>14</sup>C ], 58 mCi/mmol, y omnifluor fueron provistos por New England Nuclear, Boston, Estados Unidos. Sephadex G75 y sulfobromoftaleína fueron obtenidos en Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Piscataway, Estados Unidos. 4-nitrofenilfosfato hexahidrato disódico se obtuvo de Fluka Chemie AG, Buchs ; el Lipidex 1000 fue provisto por Packard Instrument Company, Inc., Downers Grove, Estados Unidos. DEAE ( dietilaminoetil ) fue un producto de Whatman.

### - Preparación de intestino delgado bovino.

Se trabajó en playa de faena, recibiendo y enfriando en hielo al intestino delgado ( 9 metros ) a los 15 minutos de muerto el animal. De esta manera se redujeron en gran forma las alteraciones post-mortem que sufren rápidamente este tipo de tejidos ( Landsverk T., 1981 ).

### - Raspado diferencial de mucosa intestinal bovina.

En la misma playa de faena, el intestino fue abierto longitudinalmente y lavado con solución fría de ClNa 0,15 M. Cortando trozos de aproximadamente 20 centímetros de longitud cada uno, se los

fija sobre una placa de vidrio y con la ayuda de una segunda placa se realiza el raspado de la mucosa intestinal utilizando diferentes presiones ( leve, media y fuerte ); entre los raspados el intestino es lavado con solución 0,15 M de ClNa. Tambien fue obtenido el total de la mucosa por un raspado único ( este material representa la sumatoria de los obtenidos por raspado diferencial ).

El material obtenido en cada uno de los raspados fue colocado en vasos de precipitado y conservados en hielo hasta la llegada al laboratorio.

#### - Obtención de citosol a partir de mucosa intestinal bovina e hígado.

El material obtenido en cada uno de los raspados del intestino fue homogeneizado en tres volúmenes de solución A ( sacarosa 0,25 M, EDTA 0,01 M, NaNa 0,01% y Tris HCl pH 7,4 0,01 M ) por cada gramo de tejido, utilizando un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem. En cada uno de los homogeneizados obtenidos se determinó proteína ( Lowry O., 1951) y actividad de fosfatasa alcalina ( Skillen A., 1979 ).

Cada uno de los homogeneizados fue centrifugado a 10000 xg 10 minutos. El precipitado obtenido se descartó y el sobrenadante post-mitocondrial fue llevado a pH 5,0 con HCl 1 N y recentrifugado a 10000 xg durante 10 minutos. Se obtuvo el pellet microsomal y citosol, este último fue llevado a pH 7,4 con OHNa 1 M. Todas las operaciones

descriptas fueron realizadas a 4°C.

El procedimiento utilizado para la obtención de citosol de hígado bovino fue similar al descripto para intestino.

**- Determinación de la actividad de Fosfatasa Alcalina.**

La actividad de fosfatasa alcalina fue determinada en cada uno de los homogeneizados obtenidos a partir de raspado diferencial de la mucosa intestinal bovina, usando mezcla de reacción 1 ml ( 10 mM paranitrofenilfosfato y 0,5 mM  $Cl_2Mg$  en 50mM buffer carbonato/bicarbonato pH 9,5 ) mas 10-20  $\mu$ l de muestra ( previa dilución 1:10 ) durante 20 minutos a 35°C. La reacción fue detenida por el agregado de 2 ml de solución de terminación ( 5 mM EDTA en 0,5 M OHNa ), la cantidad de paranitrofenol formado se estimó por lectura de la absorbancia a 405 nm.

**- Filtración a través de Sephadex G75 de diferentes citosoles obtenidos por raspado diferencial de mucosa intestinal bovina e hígado.**

Se utilizó cromatografía de filtración en geles para determinar el peso molecular de las proteínas citosólicas. Una columna de Sephadex G75 ( 3 x 39 cm ) con un caudal de 90 ml/h, eluida con buffer B ( Tris

HCl 0,01 M pH 7,4; NaNa 0,01% y EDTA 0,01M ) fue calibrada usando albúmina de suero bovino ( BSA - peso molecular: 67000 ) y citocromo C ( peso molecular: 12700 ). Se sembraron separadamente 5 ml de cada uno de los citosoles ( 30 a 50 mg de proteína ), recogién dose fracciones de 5 ml. cada una, en las que se determinó proteína ( Lowry O.,1951 ).

Se obtuvieron dos picos de proteína, a los que se denominó F1 ( entre 70 - 120 ml ) y F2 ( 130- 190 ml )

**- Filtración a través de Sephadex G75 de los diferentes citosoles obtenidos ( intestino e hígado ) con ácido palmítico radioactivo.**

Se sembraron 5 ml de citosol ( 30 a 50 mg de proteína ) previamente incubados con 0,83  $\mu$ Ci de C 16:0 1-<sup>14</sup>C ( sal de amonio ) y sembrados separadamente en una columna de Sephadex G75, bajo las condiciones antes mencionadas. Se recogieron fracciones de 5 ml cada una, desde los 65 ml hasta los 200 ml de eluído.

De cada fracción se tomaron muestras para determinar proteínas y radioactividad por espectrofotometría de centelleo líquido utilizando una mezcla de tolueno-tritón, conteniendo 4 g. de omnifluor, 666 ml de tolueno y 333 ml de Triton X 100 . Se obtuvieron dos picos de proteínas con afinidad por ácido palmítico radioactivo, denominados F1 ( 65 a 130 ml de eluído ) y F2 ( 135 a 200 ml de eluído ).

**- Caracterización de proteínas citosólicas por cromatografía de intercambio iónico.**

Las fracciones F1 y F2 obtenidas de los diferentes citosoles fueron analizadas en columnas de DEAE-celulosa, previa concentración realizada con celda de ultrafiltración Amicon, provista de membrana PM 10. El buffer utilizado fue 0,03 M Tris-HCl pH 8,5 sin y con adición de ClNa 0,03M como eluente. Se recogieron fracciones de 2 ml..

**- Tratamiento térmico de proteínas citosólicas.**

Aproximadamente 30 mg de proteínas citosólicas fueron tratadas durante 5' a 60 °C con agitación constante. Luego se enfrió en hielo y se centrifugó a 8000 xg 5'. El precipitado de proteínas desnaturalizadas se descartó, determinando las proteínas del sobrenadante y calculando el porcentaje de desnaturalización.

**- Obtención de microsomas.**

Hígados de 7 ratones ( aproximadamente 1 gramo cada uno ) con ayuno de 24 hs, fueron homogenizados en 22 ml. de solución A utilizando un homogeneizador mecánico tipo Potter-Elvehjem. Luego se centrifugó a 10000 xg durante 10' a 4 °C, obteniéndose el sobrenadante

post-mitocodrial que fue fraccionado en muestras de 4 ml. cada una, las que posteriormente fueron filtradas a través de Sepharosa 4B para obtener la fracción microsomal.

**- Preparación de microsomas con ácido palmítico radioactivo.**

Se evaporaron a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 60 °C, 60  $\mu$ l de una solución 0,01 M de C 16:0 ( sal de amonio ) mas 50  $\mu$ l ( 0,5  $\mu$ Ci) de C 16:0 1- <sup>14</sup>C. Se agregaron 4 gotas de amoníaco y se agitó vigorosamente a 70 °C, evaporando posteriormente a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Luego se agregaron 6 ml. de la fracción microsomal ( 20 mg. de proteína conteniendo 0,5 g. de sacarosa ).

**- Remoción de ácido palmítico radioactivo desde membranas microsomales por proteínas citosólicas.**

Microsomas conteniendo ácido palmítico 1-<sup>14</sup>C ( 0,428 mg. de proteína y 12,72 nmoles de ácido graso) fueron incubados con proteínas citosólicas o BSA ( testigo )en un volumen final de 1 ml. de buffer B. Luego de 10' a temperatura ambiente, y con agitación constante, se ajustó rápidamente el pH del medio a 5,0 por adición de 50  $\mu$ l de ácido acético-acetato de sodio 2 N, pH 5,0. Los microsomas fueron sedimentados por centrifugación a 10000 xg durante 5 minutos.

La radioactividad presente en microsomas y sobrenadante fue determinada en un espectrofotómetro de centelleo líquido.

**- Deslipidización de proteínas citosólicas.**

La solución de proteínas a deslipidizar, se agregó lentamente con agitación constante a acetona previamente enfriada a  $-7^{\circ}\text{C}$ . Se utilizaron 10 ml. de acetona por cada ml. de solución de proteínas.

Luego de 30' se centrifugó la mezcla a 2000 xg durante 3', descartando la acetona. El precipitado, secado bajo corriente de nitrógeno, fue resuspendido en medio volumen del original buffer B (Lester R., 1961). Se calculó el porcentaje de proteínas desnaturalizadas.

**- Pegado de sulfobromoftaleína ( BSP ) a proteínas citosólicas.**

Proteínas citosólicas ( 1 a 3 mg ), obtenidas por raspado diferencial de mucosa intestinal bovina, fueron incubadas con BSP ( 500 nmoles ) durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla fue aplicada a una columna de Sephadex G50 ( 15,5 x 1,3 cm ), equilibrada y eluída con buffer B. Se recogieron fracciones de 2 ml que fueron alcalinizadas con 150  $\mu\text{l}$  de  $\text{OHNa}$  0,01 M y determinada su absorbancia a 580 nm en un espectrofotómetro Metrolab MV 40.

**- Desplazamiento de BSP desde proteínas citosólicas y BSA por ácido palmítico.**

La fracción F1, obtenidas de intestino, o BSA ( 2 a 3 mg de proteína) fueron incubadas con BSP ( 500 nmoles ) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron cantidades crecientes de palmitato de amonio ( 250 a 3000 nmoles ) incubando durante 5'. La mezcla fue aplicada a Sephadex G50 y se repitió el procedimiento explicado anteriormente ( Catalá A., 1985 ).

**- Precipitación de proteínas citosólicas con sulfato de amonio.**

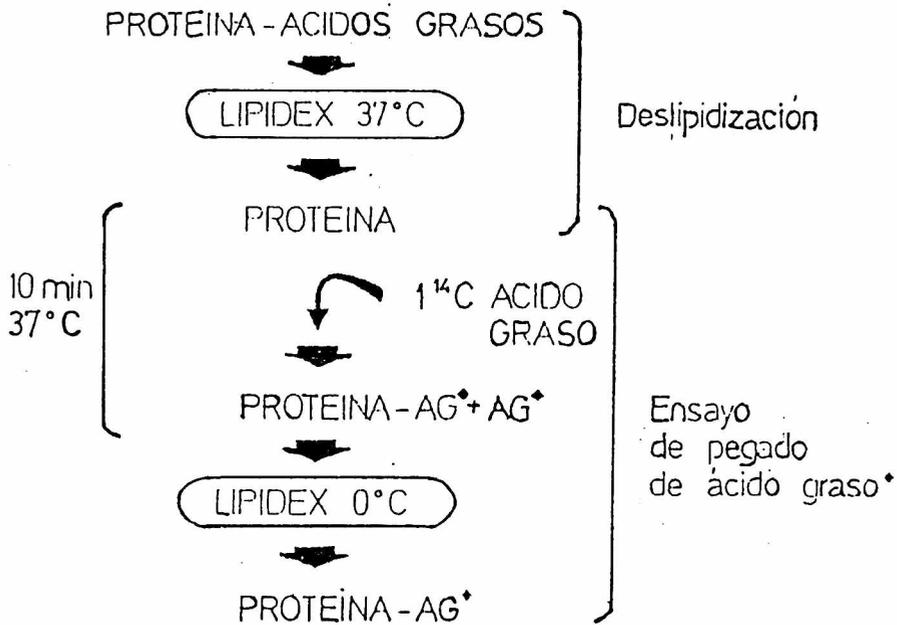
Utilizando 100 mg. de proteínas de cada uno de los citosoles, por separado, se realizó la precipitación con sulfato de amonio al 70% ( 472 g de sal por 1000 ml de solución ). La solución fue agregada a los citosoles , con agitación en un lapso de 30'. Luego se centrifugó a 10000 xg durante 5',-obteniéndose el sobrenadante y precipitado, este último fue resuspendido en buffer Tris HCl 0,01 M pH 7,4. Ambas fracciones fueron dializadas durante 48 hs contra 3 cambios de buffer Tris HCl pH 7,4 ( 2 litros de buffer cada cambio ). Todas las operaciones fueron realizadas a 4°C.

- Ensayo de pegado de ácidos grasos ( Lipidex 1000 ).

Con la utilización de Lipidex 1000 ( al 10 % P/P derivado hidroxialcoxipropil de Sephadex G25 ) se pueden aislar proteínas que pegan moléculas hidrofóbicas como los ácidos grasos ( Veerkamp J., 1983 ). Esta técnica parece ser superior a la separación en geles ( ya que esta última posee menor sensibilidad debido a la afinidad que poseen los ácidos grasos por el gel ) y a experimentos en los que se utilizan diferentes tipos de membrana, ya que se considera que puede haber una transferencia espontánea que dificultaría la medición de la actividad de la proteína ( Veerkamp J., 1985-1989 ).

Alicuotas de diferentes fracciones protéicas ( 50  $\mu$ g de proteína ) fueron incubadas en tubos Ependorf con ácido palmítico radioactivo ( 450 pmoles de ácido graso ) y llevado a volumen ( 400  $\mu$ l ) utilizando ClNa 0,15 M. Luego de incubar las muestras durante 10' a 37°C, se llevó a 0°C 5' y se adicionaron 100  $\mu$ l de Lipidex 1000 ( este último fue preparado en columna, un volumen del material original con tres volúmenes de buffer Tris HCl 0,01 M pH 7,4 y tomándolo luego del lavado en 4 ml. de ClNa 0,15 M ). Después de agitar e incubar 10' a 0°C se centrifugó a 10000 xg 5'. Se tomaron, del sobrenadante, 200  $\mu$ l para medir la radioactividad asociada a proteínas. En el siguiente esquema se observa las diferentes etapas de la utilización del Lipidex 1000.

## ESQUEMA DE USO DE LIPIDEX 1000



**- Incubación de un área de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo.**

Un área ( 65 cm<sup>2</sup> de intestino delgado bovino ) fue incubado en 40 ml. de una solución que contenía 1000 nmoles de ácido palmítico ( sal de amonio ), 1 µCi C 16:0 1-<sup>14</sup>C en 0,01 M Tris HCl pH 7,4. La incubación se realizó durante 10' a 37°C. El procesamiento posterior del tejido se realizó como se explicó anteriormente.

#### **- Extracción de lípidos totales de la mucosa intestinal bovina.**

Los lípidos totales fueron extraídos utilizando la siguiente mezcla de extracción: cloroformo-metanol ( 2:1 V/V ) ( Folch J., 1957 ).

En una probeta fueron colocados separadamente, 4 ml. de cada uno de los homogeneizados obtenidos por raspado diferencial de la mucosa intestinal bovina más 5 partes de la mezcla de extracción. Luego de agitar vigorosamente cada uno, con una varilla de vidrio, se los dejó a 4° C durante 24 hs.. En cada probeta ( leve, medio y fuerte ) se formaron 2 fracciones, la superior con metanol y constituyentes no lipídicos de los homogeneizados y la inferior conteniendo los lípidos disueltos en el cloroformo. La fase superior fue descartada por vacío, con el uso de una bomba de agua, y la inferior evaporada a sequedad a 60° C bajo corriente de nitrógeno y luego redisuelta en 1ml de cloroformo.

El peso de los lípidos totales se estableció utilizando viales previamente tarados y evaporando a sequedad hasta peso constante.

#### **- Separación de lípidos polares y neutros de la mucosa intestinal bovina.**

Después de extraer los lípidos totales como se explicó anteriormente, se realizó la separación de los mismos en polares y neutros. Los lípidos obtenidos de cada uno de los raspados fueron tomados en 3 ml

de cloroformo, siendo luego agitados con 1 g de ácido silícico ( activado durante 15 hs. a  $110^{\circ}\text{C}$  ). De esta manera los lípidos quedan adsorbidos en el ácido silícico; los lípidos neutros son extraídos mediante dos lavados con cloroformo centrifugando 5' a 2000 xg. Para obtener los lípidos polares se utilizó metanol repitiendo el procedimiento explicado para los lípidos neutros. El peso de los lípidos polares y neutros se determinó como se explicó anteriormente para lípidos totales.

## RESULTADOS

Cuando una alícuota de citosol de mucosa intestinal bovina fue incubada con ácido palmítico radioactivo y luego analizada por filtración en geles, pudo observarse que el ácido palmítico se encuentra unido a dos fracciones protéicas de bajo y alto peso molecular ( Fig. 2 ), siendo la primera de ellas identificada en una primera aproximación ( de acuerdo a las características de elución ) como la PTAG descrita en no rumiantes. Analizando la actividad específica de pegado de ambas fracciones, se determinó que F1 es 1,7 veces mayor que F2 ( 19.995 versus 11.649 cpm/mg. de proteína respectivamente ).

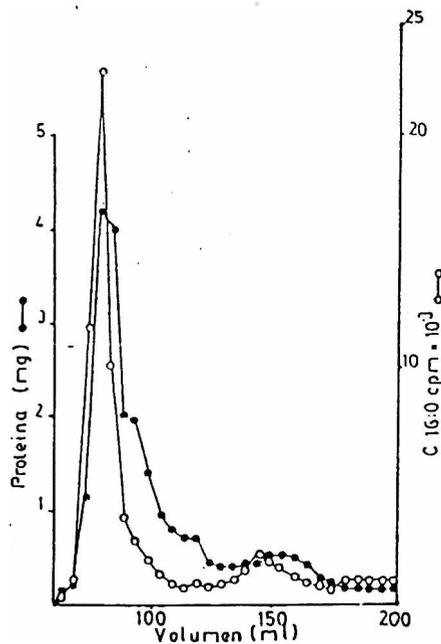


Fig.2- Pegado de ácido palmítico  $1-^{14}C$  a citosol intestinal nativo.

Cuando una alícuota de F1 conteniendo ácido palmítico radioactivo fue analizada por cromatografía de intercambio iónico, como se describió en materiales y métodos, pudo observarse que la radioactividad fue eluída asociada a proteínas en ausencia de ClNa 0,3 M ( Fig. 3 ). Esto indica que la proteína/s responsable del pegado de ácido palmítico, no es albúmina, ya que, esta es retenida en la DEAE-celulosa a pH 8,5 debido a su caracter ácido ( punto isoelectrico: 5 ). Sin embargo una pequeña cantidad de ácido graso radioactivo aparece en el material eluído en presencia de ClNa 0,3 M.

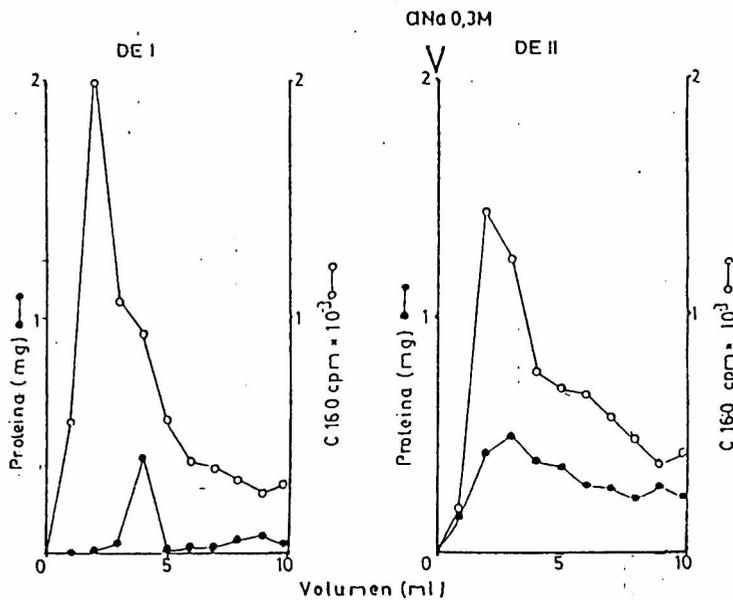


Fig.3- F1 conteniendo ácido palmítico 1-<sup>14</sup>C analizada por cromatografía de intercambio iónico.

Para analizar el grado de afinidad de las proteínas presentes en DE1, se le agrego, al material sembrado en la columna de intercambio iónico, 3 mg. de albúmina de suero bovino ( BSA ) . Las proteínas presentes en DE1 de la fracción F1 se mantuvieron fuertemente unidas al ácido graso aun en presencia de 3 mg.de BSA ( Fig. 4 ).

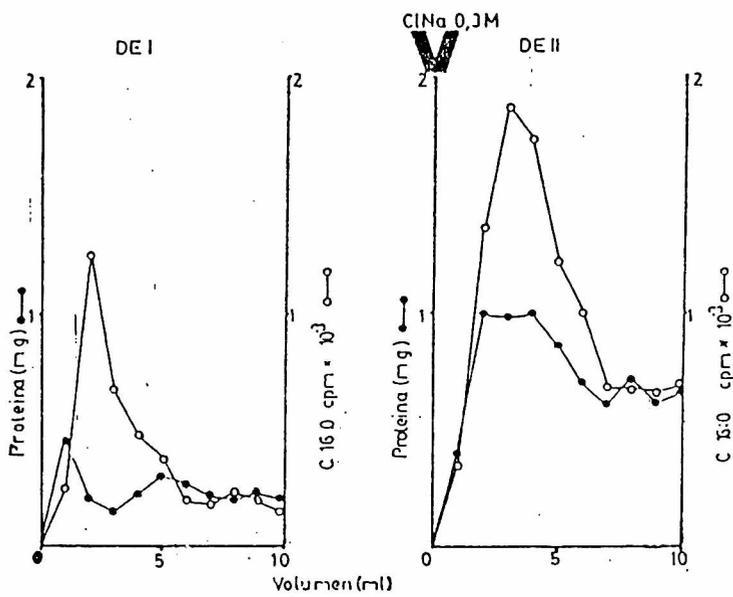


Fig.4- Idem Fig.3 mas 3 mg de BSA.

Al calentar el citosol de intestino (  $60^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos ) se desnaturalizaron el 47 % de las proteínas citosólicas totales, las cuales fueron separadas por centrifugación. Luego de la incubación de las proteínas citosólicas térmicamente estables con ácido palmítico radioactivo ( sal de amonio ) y posterior filtración a través de Sephadex G75 ( Fig. 5 ) pudo observarse un aumento considerable en la actividad específica de pegado de ácido palmítico radioactivo a la fracción protéica de alto peso molecular, mientras que F2 mantuvo valores similares a aquellos obtenidos utilizando citosol nativo.

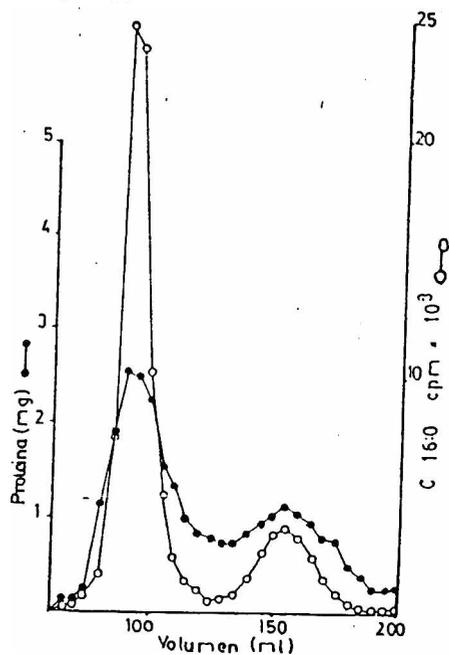


Fig.5- Pegado de ácido palmítico  $1-^{14}\text{C}$  a proteínas citosólicas térmicamente estables.

Habiendo determinado estos resultados preliminares, se comparó la capacidad de pegado de proteínas con afinidad por ácido grasos ( contenidas en las fracciones citosólicas intestinales F1 y F2 ) por ligandos diferentes a ácido palmítico.

Para ello F1 y F2, separadas por exclusión molecular en Sephadex G75, fueron concentradas por ultrafiltración, mezcladas con BSP y sometidas a filtración en Sephadex G50 para separar BSP unida a proteínas de BSP libre. Albúmina de suero bovino se usó desde un punto de vista comparativo.

Los resultados en Tabla 4 muestran que ambas fracciones protéicas pegan cantidades similares de BSP. Luego del tratamiento térmico o deslipidización el pegado de BSP a F1 se incrementó aproximadamente 2 y 8 veces respectivamente. Los cambios observados en F2 y BSA no fueron significativos. La BSA incorporó 9 veces más BSP que F1 y F2 cuando fueron analizadas en su estado nativo.

---

Tabla 4.-Capacidad de pegado de BSP por fracciones citosólicas F1 y F2

---

nmol de BSP / mg de proteína

Fracción	Nativa	Trat. Térmico	Deslipidizada
F1	2,77 ± 0,54	6,19 ± 0,61	21,46 ± 1,69
F2	2,36 ± 0,46	1,75 ± 0,42	3,32 ± 0,61
BSA	25,56 ± 1,50	21,27 ± 3,06	23,86 ± 1,45

---

Valores expresados en media ± ES.

---

Cuando F1 o BSA complejados con BSP fueron incubados con cantidades crecientes de ácido palmítico, se observó que el ácido graso es capaz de desplazar BSP. La Fig 6 muestra que el desplazamiento de BSP desde F1, por ácido palmítico, alcanza un máximo de 35 % cuando se adicionan 500 nmoles de ácido graso, manteniendo estos valores aun en presencia de mayores cantidades del mismo. El desplazamiento de BSP desde BSA es muy diferente al observado para F1, ya que, el desplazamiento aumenta gradualmente hasta los 2000 nmoles de ácido palmítico, desplazando un 70 % del BSP complejo a albúmina.

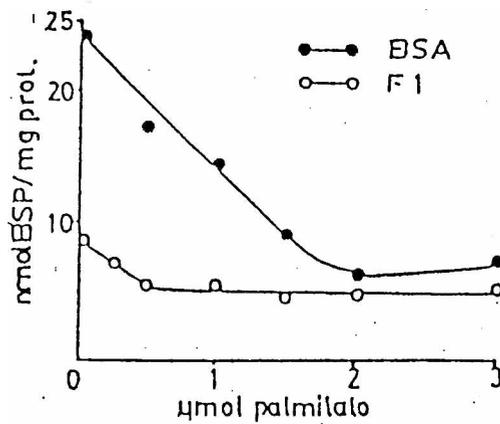


Fig.6- Desplazamiento de BSP desde proteínas citosólicas y BSA por ácido palmítico.

La capacidad de remoción de ácido palmítico desde membranas microsomales por F1, F2 y BSA se muestra en la Tabla 5. Los datos indican que F1 posee mayor capacidad que F2 en la remoción de ácido graso incorporado en microsomas de hígado de ratón. En contraste con los resultados obtenidos con BSP, la deslipidización no modifica la capacidad de remoción de ácido palmítico por F1, F2 o BSA. Estos resultados indicarían que F1 posee diferentes sitios de unión para BSP y ácido palmítico.

Tabla 5.- Remoción de ácido palmítico desde membranas microsomales.

Fracción	nmol de ácido palmítico / mg. de proteína (*)	
	Nativa	Deslipidizada
F1	0,97 ± 0,08	0,91 ± 0,07
F2	0,64 ± 0,14	0,44 ± 0,06
BSA	3,18 ± 0,87	3,37 ± 0,47

(\*) Media ES de tres experimentos diferentes.

La actividad de fosfatasa alcalina en homogenatos obtenidos a partir de raspados de mucosa intestinal de bovino indica un grado de diferenciación mayor en el ápice de las vellosidades que en las criptas, por lo tanto, como se observa en la Tabla 6 la actividad de esta enzima que decrece de raspados suaves a fuertes muestra la mayor especialización de las células apicales con respecto a las zonas

mitóticas de las criptas.

---

Tabla 6.- Actividad de fosfatasa alcalina en diferentes homogeneizados obtenidos por raspado diferencial de mucosa intestinal bovina.

---

Raspado	Proteína total removida ( mg.)	Fosfatasa alcalina U / mg.Pt.
Leve	85,1 ± 8,49	1,78 ± 0,10
Medio	104,4 ± 19,6	0,54 ± 0,01
Fuerte	137,8 ± 12,8	0,18 ± 0,03

---

Los resultados expresan valor medio ± EEM de tres determinaciones independientes.

---

Quando fueron analizados por filtración en Sephadex G75 los diferentes citosoles intestinales previamente incubados con ácido palmítico  $1-^{14}C$  se observó que el ácido graso se encuentra unido a dos fracciones protéicas, como se indicó anteriormente estas muestras son de bajo ( F2 ) y alto ( F1 ) peso molecular, siendo la primera de ellas de acuerdo a las características de elución identificada como la Proteína Transportadora de Acidos Grasos ( PTAG ) descripta en animales no rumiantes. La actividad de pegado de ácido palmítico de estas fracciones en los diferentes citosoles se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7.- Pegado de ácido palmítico  $1-^{14}C$  a fracciones de alto y bajo peso molecular.

Fracción	Proteína mg.	%	Radioactividad cpm	%	cpm/mg. pt.	$\frac{\Sigma cpm \text{ F1-F2}}{\Sigma mg. pt. \text{ F1-F2}}$	
Leve	F1	15,49	52,8	159180	81,2	10316	6711,4
	F2	13,77	47,2	36795	18,8	2672	
Medio	F1	18,02	67,0	161468	92,7	8960,5	6479,1
	F2	8,87	33,0	12690	7,3	1470,7	
Fuerte	F1	28,53	57,4	180830	90,2	6338,3	4036,1
	F2	21,13	42,6	19603	9,8	927,7	

La actividad específica de pegado por C16:0  $1-^{14}C$  de proteínas citosólicas ( F1 - F2 ) de los diferentes raspados disminuye de fracciones leve a fuerte. En el caso de las proteínas de F2 la caída de la actividad específica ( F2 leve cpm / mg.prot.: 2672 y F2 fuerte cpm / mg.prot.: 927,7 ) es más notable que para la fracción F1 ( F1 leve cpm / mg.prot.: 10316 y F1 fuerte cpm / mg.prot.: 6338,3 ), la relación cpm / mg.proteína decrece en el primer caso 2,8 veces mientras que F1 lo hace 1,63 veces. Analizando la misma tabla se observa que la radioactividad presente en F1 aumenta de raspado leve a fuerte no ocurriendo lo mismo con la actividad específica, ya que, la cantidad de proteína por raspado se incrementa en el mismo sentido; en

el caso de las proteínas de la fracción F2 no ocurre lo mismo debido a que la radioactividad disminuye en dicho sentido.

Utilizando cromatografía de intercambio iónico para analizar diferentes fracciones F1 de intestino, se observó que existen proteínas con afinidad de pegado a ácido palmítico en ambas fracciones de DEAE- celulosa, siendo mas activa la DE 2. En la Tabla 8 se observa que las variaciones en la actividad específica, miligramos de proteína y cpm en DE 1 a través de los sucesivos raspados no muestra diferencias netas según la zona de la vellosidad, por el contrario en DE2 aumentan tanto las cpm como la relación cpm / mg. de proteína a medida que se profundizan los raspados.

Tabla 8.- Diferentes fracciones F1 conteniendo  $C_{16}O$   $1-^{14}C$  analizadas por cromatografía de intercambio iónico.

Fracción	DE1			DE2		
	Proteína mg.	Radioactividad cpm	Radioactividad cpm/ mg. pt.	Proteína mg.	Radioactividad cpm	Radioactividad cpm/ mg. pt.
F1 leve	2,02	272	134,6	5,6	2510	448
F1 medio	4,48	568	126,8	6,8	6202	944
F1 fuerte	2,93	372	126,9	5,5	5796	1046

En otro experimento realizando haciendo uso de cromatografía de intercambio iónico se analizó F1 ápice ( raspado correspondiente a la sumatoria de leve y medio ) y F1 cripta ( raspado fuerte ), se observó

que en las fracciones de raspados superficiales existe en DE1 una proteína con afinidad por ácido palmítico que aparece en DE1 de cripta con muy baja actividad, Tabla 9.

Tabla 9.- Fracciones F1 ápice y F1 cripta con  $C_{16}O$   $1-^{14}C$  analizadas por cromatografía de intercambio iónico.

Fracción	DEAE									
	DE1				DE2					
	Proteína mg	%	Radioactividad cpm	%	cpm/ mg. pt.	Proteína mg.	%	Radioactividad cpm	%	cpm/ mg. pt.
F1 ápice	1,7	24	3912	20	2261	5,5	71	15780	80	2876
F1 cripta	0,7	11	84	0,8	118	5,3	89	10848	99,2	2049

El pegado de BSP a citosoles intestinales leve, medio y fuerte, señala un aumento de la actividad específica a medida que aumenta la presión de raspado. Utilizando este anión como indicador de pegado sobre las fracciones F1 ápice y F1 cripta, se observa la misma tendencia de pegado que en los citosoles, datos en Tabla 10.

Tabla 10.- Capacidad de pegado de BSP por diferentes citosoles intestinales y fracciones F1.

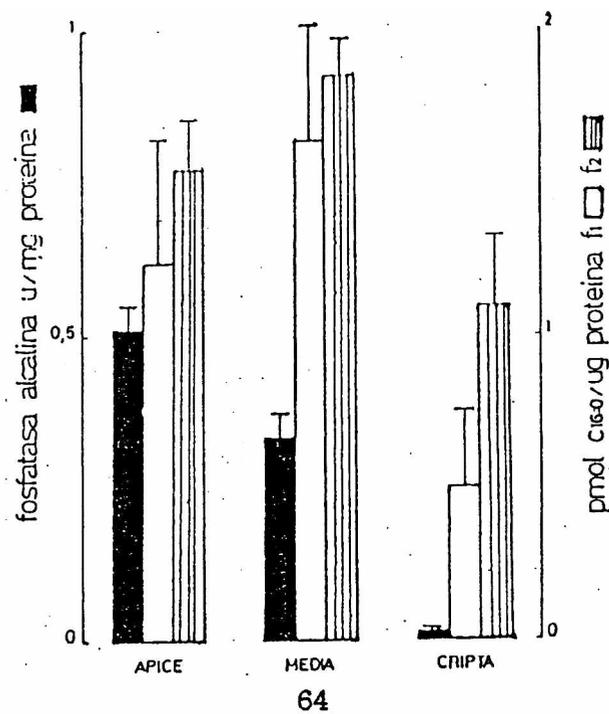
Fracción		nmoles de BSP / mg. de proteína
Citosoles	Leve	0,29
	Medio	0,43
	Fuerte	0,61
F1	Apice	2
	Cripta	5,6

Al obtener fracciones protéicas, de cada uno de los citosoles intestinales, de alto y bajo peso molecular ( F1 y F2 respectivamente) por filtración a través de Sephadex G75 y realizar el ensayo de pegado de ácido palmítico ( como se mostró en el esquema de Ensayo con Lipidex 1000 en materiales y métodos ), se observa que las fracciones de peso molecular de aproximadamente 14000 en los que se hallaría la PTAG poseen una significativa actividad de pegado, Tabla 11 y Figura 7.

Tabla 11.- Ensayo de pegado de ácido palmítico radioactivo a fracciones proteicas de alto y bajo peso molecular.

Fracción		pmol de ácido graso / $\mu$ g de proteína
	Leve	$1,24 \pm 0,41$
F1	Medio	$1,69 \pm 0,40$
	Fuerte	$0,50 \pm 0,25$
	Leve	$1,54 \pm 0,16$
F2	Medio	$1,85 \pm 0,19$
	Fuerte	$1,10 \pm 0,23$

Fig 7.- Ensayo de pegado de ácido palmítico radioactivo a fracciones proteicas citosólicas de alto y bajo peso molecular.



Mediante cromatografía de intercambio iónico se analizaron las fracciones protéicas de alto y bajo peso molecular de cada uno de los citosoles intestinales obtenidos; en las diferentes fracciones se practicó el ensayo de pegado de ácido palmítico observando una importante actividad en DE1 de F2 y en DE2 de F1. Este último dato podría llegar a indicar una contaminación con albúmina producida durante el raspado diferencial de la mucosa intestinal, Tabla 12.

Tabla 12.- Fracciones proteicas intestinales de alto y bajo peso molecular analizadas por cromatografía de intercambio iónico.

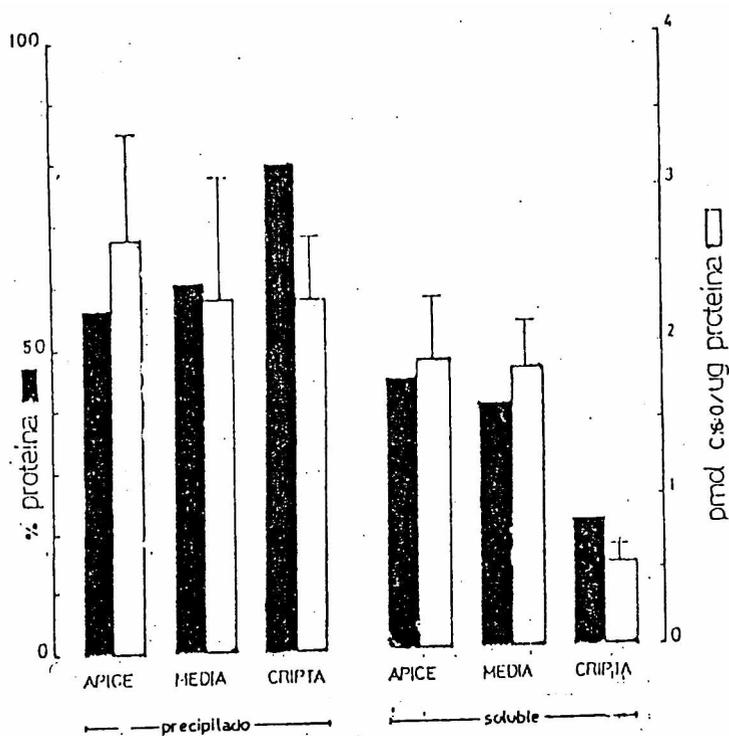
Fracción	DEAE				
	DE1		DE2		
	%prot.	pmol a. g. /ug. prot.	%prot.	pmol a. g. /ug. prot.	
F1	leve	6,25	0,15 ± 0,07	93,75	5,1 ± 0,3
	medio	10,76	0,00	89,24	4,9 ± 0,2
	fuerte	19,69	0,11 ± 0,04	80,31	6,6 ± 0,4
F2	leve	53	1,67 ± 0,98	47	0,7 ± 0,2
	medio	39	1,16 ± 0,88	61	0,4 ± 0,2
	fuerte	32	2,10 ± 0,25	68	2,2 ± 0,2

Cuando se realizó sobre cada uno de los citosoles intestinales la precipitación con sulfato de amonio, se observó que en los sobrenadantes de citosoles obtenidos de raspados leve y medio, donde se espera encontrar la PTAG, existe una alta actividad de pegado de ácido palmítico, Tabla 13 y Figura 8.

Tabla 13.- Precipitación con sulfato de amonio sobre diferentes citosoles obtenidos por raspado diferencial de mucosa intestinal bovina.

CITOSOL	SOBRENADANTE		PRECIPITADO	
	%prot.	pmol a. g. /ug. prot.	%prot.	pmol a. g. /ug. prot.
LEVE	44	1,9 ± 0,4	56	2,7 ± 0,7
MEDIO	40	1,8 ± 0,3	60	2,3 ± 0,8
FUERTE	21	0,5 ± 0,1	79	2,3 ± 0,4

Fig.8.- Idem Tabla 13.



En otro experimento los diferentes sobrenadantes de precipitación con sulfato de amonio fueron analizados por filtración a través de Sephadex G75, obteniendo fracciones protéicas de alto y bajo peso molecular. Un valor significativo es el encontrado en la fracción de bajo peso molecular ( F2 ) del sobrenadante de sulfato de amonio leve, donde cabría esperar que las células de mayor especialización del ápice de la vellosidad intestinal tuviesen una alta actividad de PTAG. Los valores elevados de F1 sobrenadante de citosol fuerte pueden ser debidos a la contaminación con albúmina ocasionada al realizar el raspado diferencial., Tabla 14 y Figura 9.

---

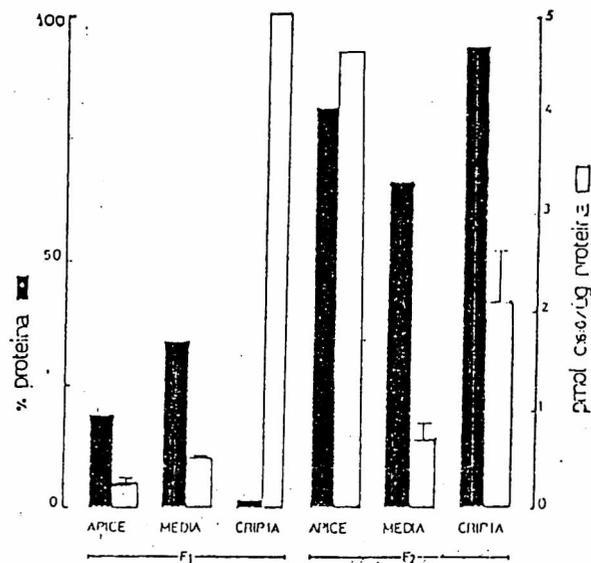
Tabla 14.- Pegado de palmitato a fracciones solubles de sulfato de amonio separadas por Sephadex G75.

---

SOBRENADANTE	F1	F2
	pmol a. g. /ug. prot.	pmol a. g. /ug. prot.
LEVE	0,25 ± 0,05	4,7 ± 0,2
MEDIO	0,50 ± 0,0	0,7 ± 0,2
FUERTE	5,90 ± 1,3	2,1 ± 0,6

---

Fig.9.-Pegado de palmitato a fracciones solubles de sulfato de amonio separadas por Sephadex G75.



Al realizar la incubación de ácido palmítico radioactivo con un área de intestino delgado, se observó que en las tres fracciones obtenidas la radioactividad decrece de ápice a cripta de la vellosidad intestinal, al igual que la relación cpm / mg. de proteína, Tabla 15 y Figura 10 a-b, esta última se muestra al final de resultados.

Tabla 15.- Incubación de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo.

Fracción	Raspado	Radioactividad ( cpm )	Porcentaje	cpm/mg. prot.
Citosol	Leve	3690	40,2	113,9
	Medio	2985	32,5	94,8
	Fuerte	2505	27,3	83,0
Microsomas	Leve	858	40,5	214,5
	Medio	664,7	31,4	70,7
	Fuerte	595,7	28,1	126,7
Precipitado Mitochondrial	Leve	3571	68,5	118,2
	Medio	1068	20,5	21,0
	Fuerte	577,6	11,0	19,9

Sumando las tres fracciones obtenidas en cada uno de los diferentes raspados, resulta aún más evidente la tendencia de la radioactividad captada a lo largo del eje cripta-ápice de la vellosidad de la mucosa intestinal bovina, Tabla 16 y Figura 11 a-b ( despues de resultados ).

Tabla 16.- Incubación de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo. Radioactividad total en cada uno de los raspados.

---

RASPADOS	RADIOACTIVIDAD ( cpm )	PORCENTAJE
LEVE	8119	49
MEDIO	4717	28,6
FUERTE	3678,3	22,4

---

Luego de realizar la precipitación de proteínas con sulfato de amonio, en cada uno de los citosoles intestinales por separado, se obtuvo una fracción soluble ( sobrenadante ) y precipitado, en los que se determinó la radioactividad previa diálisis. Los valores de la fracción soluble ( enriquecida en PTAG ) decrecen de leve a fuerte, mientras ocurre lo contrario con los precipitados, Tabla 17 y Figura 12 a-b ( después de resultados ). Realizando la sumatoria de la radioactividad presente en las diferentes fracciones solubles y en los precipitados se encontró que el porcentaje fue 43,7 % y 56,3 % respectivamente.

Tabla 17.- Medición de la radioactividad en las distintas fracciones obtenidas por precipitación de proteínas citosólicas, de diferentes raspados intestinales, con sulfato de amonio.

Raspados	cpm	Fracción soluble %cpm	cpm/mg. prot.	cpm	Precipitado %cpm	cpm/mg. prot.
Leve	3060	83	900	630	17	37,5
Medio	800	26,8	348	2185	73,2	132,4
Fuerte	150	6	41	2355	94	218,0

Si se consideran los valores de radioactividad encontrados en cada una de las fracciones solubles obtenidas en la precipitación con sales de proteínas citosólicas intestinales, donde se espera la presencia de PTAG, se observa que la zona apical de la vellosidad ( Leve ) posee un 76,3 %, la región media 19,9 % y la cripta 3,8 %.

Los valores mencionados guardan estricta relación con la actividad de fosfatasa alcalina, utilizada para medir el grado de diferenciación celular en la vellosidad intestinal bovina, ya que, como es de esperar la PTAG se encontraría preponderantemente en las células con mayor especialización.

Al separar los lípidos totales en neutros y polares con la utilización de ácido silícico, se obtuvieron los resultados que se

muestran en Tablas 18 y 19, en los que se puede analizar que existe un aumento en la relación de lípidos polares / neutros hacia la región apical de la vellosidad intestinal, lo que demostraría un incremento en el grado de diferenciación en esta zona de la mucosa intestinal bovina.

Tabla 18.- Obtención de lípidos neutros y polares.

RASPADOS	LIPIDOS			
	Polares		Neutros	
	mg. totales	Porcentaje	mg. totales	Porcentaje
Leve	381,8	51,5	275,98	36,9
Medio	192	25,9	228	30,5
Fuerte	167,7	22,6	243,75	32,6

Tabla 19.- Relación lípidos polares / lípidos neutros en los diferentes raspados.

Raspados	Lípidos				Relación LP/LN
	Polares		Neutros		
	mglip/mgpt	%	mglip/mgpt.	%	
Leve	0,126	58	0,091	42	1,38
Medio	0,104	46	0,124	54	0,84
Fuerte	0,138	41	0,200	59	0,69

Comparando los miligramos de lípidos microsomales extraídos ( Método

Folch ) de cada uno de los diferentes raspados intestinales con los miligramos de proteína obtenidos en la fracción de bajo peso molecular ( F2 ) por filtración a través de Sephadex G75, se observa que la relación lípido/ proteína es más estrecha en ápice que en cripta de la vellosidad. Dado que en la fracción de bajo peso molecular ( 14 KDa) se hallaría la PTAG y que se supone que las células ápicales son mas ricas en esta proteína, estos datos apoyarían la teoría que señala que esta molécula se halla relacionada al el transporte lipídico en las células altamente especializadas de la vellosidad intestinal, Tabla 20.

---

Tabla 20.- Relación de lípidos microsomales con los miligramos de proteína obtenidos en la fracción de bajo peso molecular.

---

Raspados	Relación mg. lípidos microsomales/mg. prot. F2		
	Lípidos totales	Lípidos Neutros	Lípidos Polares
Leve	6,0	1,7	1,2
Medio	10,7	3,5	2,0
Fuerte	11,4	2,6	2,6

---

Los resultados obtenidos al realizar remoción de ácido palmítico radioactivo desde microsomas con proteínas de bajo peso molecular (F2),

concuerdan con las tendencias antes mencionadas, ya que la mayor actividad de F2 ( PTAG ) se encuentra en la zona apical de la vellosidad, Tabla 21 y Figura 13 ( después de resultados ).

---

Tabla 21.-Remoción de ácido palmítico radioactivo desde microsomas por proteínas de bajo peso molecular.

---

FRACCIONES	nmoles C 16:0 1- <sup>14</sup> C / mg. prot.F2
LEVE	0,48
MEDIO	0,28
FUERTE	0,14

---

Al analizar la remoción de ácido palmítico desde microsomas por fracciones solubles resultantes de la precipitación de proteínas citosólicas intestinales con sulfato de amonio; se observó que la mayor actividad se encuentra asociada con las células mas diferenciadas y especializadas del ápice de la vellosidad de la mucosa intestinal bovina, Tabla 22 y Figura 14( después de resultados ).

---

Tabla 22.- Remoción de ácido palmítico desde microsomas por fracciones solubles resultantes de la precipitación con sulfato de amonio.

---

FRACCIONES	nmoles $C_{16}O$ $1-^{14}C$ / mg. prot. fracción soluble
LEVE	1,04
MEDIO	0,91
FUERTE	0,15

---

El citosol de hígado bovino ( lóbulo de Spigel ) obtenido como se detalló en Materiales y Métodos, fué analizado utilizando diversas técnicas .

Practicando sobre el mismo cromatografía de intercambio iónico fué separado en fracciones , DE1 y DE2 , en las cuales se determinó la actividad de pegado de ácido palmítico radioactivo. En el mismo experimento se utilizó citosol nativo, Tabla 23.

Tabla 29.- Actividad de pegado de ácido palmítico por proteínas citosólicas hepáticas.

CITOSOL NATIVO pmola. g./ug. pt.	DE1		DEAE		DE2	
	mgpt.	% pmola. g./ugpt.	mgpt.	%	pmola. g./ugpt	
1,0	59,3	55	0,8	49,3	45	2,9

Al analizar el citosol por filtración en geles, columna de Sephadex G75, se obtuvieron dos fracciones , una de ellas de alto peso molecular ( F1 ) y la otra de bajo peso molecular ( F2 ). Debido a las características del tejido y su procesamiento se esperó una alta contaminación con albúmina de suero bovino ( BSA - peso molecular : 67.500 ) en la fracción F1.

Esta posible contaminación con BSA fué corroborada al estudiar la fracción de alto peso molecular ( F1 ) mediante cromatografía de intercambio iónico, ya que la fracción eluida en la columna de DEAE con adición de 0,3 M de ClNa (DE2) contiene 15,1 veces más proteína

que DE1 ; debido al punto isoeléctrico ácido de esta proteína es el comportamiento que cabe esperar al utilizar este tipo de columna.

En el ensayo de pegado de ácido palmítico ( Lipidex 1000) realizado sobre las diferentes fracciones obtenidas a partir de F1 , por cromatografía de intercambio iónico ( DE1 y DE2), se observó que DE1 pega 1,8 veces mas ácidos grasos que DE2 ( como se menciona en el párrafo anterior esta última correspondería principalmente a una contaminación con BSA ). Este resultado indicaría la existencia de alguna molécula con afinidad por ácidos grasos en las fracciones de alto peso molecular , Tabla 24.

---

Tabla 24.- Actividad de pegado de ácido palmítico radioactivo de fracciones obtenidas a partir de F1 por cromatografía de intercambio iónico : DE1 y DE2.

---

DEAE - F1						
DE1			DE2			
mgpt	%	pmolag/ugpt	mgpt	%	pmolag/ugpt	
0,59	7	0,7	8	99	0,4	

---

Este mismo ensayo, cuando fue realizado sobre la fracción F1 de citosol de hígado bovino ( F1 nativa ) se encontró que su actividad

de pegado fue de 0,6 pmol ácido graso /  $\mu$ g proteína.

Al tratar al citosol de hígado bovino mediante la técnica de precipitación con sales ( sulfato de amonio al 70 % ) se obtuvieron dos fracciones, como se explicó en materiales y métodos, llamados sobrenadante y precipitado de sulfato de amonio. En este experimento se halló que en el sobrenadante se encuentran un 18 % de las proteínas citosólicas y en el precipitado un 82 % de las mismas.

Filtrando, a través de Sephadex G75, el sobrenadante y precipitado de amonio de citosol de hígado bovino, se observó que se logra una gran purificación de las proteínas de bajo peso molecular en el caso del primero ( sobrenadante F1: 18 % - sobrenadante F2: 82 % ) no resultando de igual forma con el precipitado ( precipitado F1: 45 % - precipitado F2: 55 % ). Esta respuesta de las proteínas citosólicas hepáticas podría influir en los resultados obtenidos al realizar el experimento de pegado a ácidos grasos como se explica a continuación.

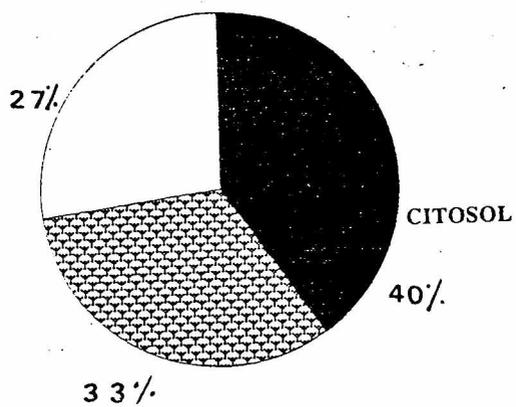
El estudio del sobrenadante y precipitado de sulfato amonio al 70 %, por el ensayo de Lipidex 1000, utilizando fracciones nativas y obtenidas por cromatografía de intercambio iónico demostró que esta técnica es muy efectiva para la purificación de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos. El enriquecimiento de la actividad de la PTAG, en el sobrenadante de sulfato de amonio, se observa claramente en la Tabla 25.

Tabla 25.- Ensayo de Lipidex 1000 con diferentes fracciones de proteínas citosólicas hepáticas obtenidas a partir de precipitación con sales y cromatografía de intercambio iónico.

FRACCIONES	SOBRENADANTE	PRECIPITADO
	pmol ag / ug. pt.	pmol ag. / ug. pt.
NATIVO	4,4	0,3
DE 1	1,6	0,2
DEAE DE2	2,7	0,6

En esta tabla se puede observar la real purificación de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos, ya que el sobrenadante nativo tiene 14,7 veces mas actividad que el precipitado. Además la fracción DE1 del sobrenadante, donde se espera encontrar a esta proteína, es 8 veces mas activa que DE1 del precipitado. En el caso de DE2 del sobrenadante y precipitado tambien se observa una diferencia amplia, pero esta alta actividad encontrada en DE2 del sobrenadante se puede deber o a una contaminación con albúmina o bien ser otro miembro de la familia de la PTAG.

Fig. 10 a.- Incubación de intestino delgado con ácido palmítico radiactivo ( porcentaje de radioactividad ).



■ Leve  
▨ Medio  
□ Fuerte

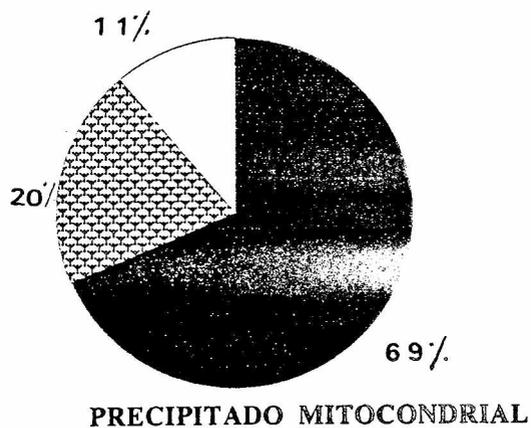
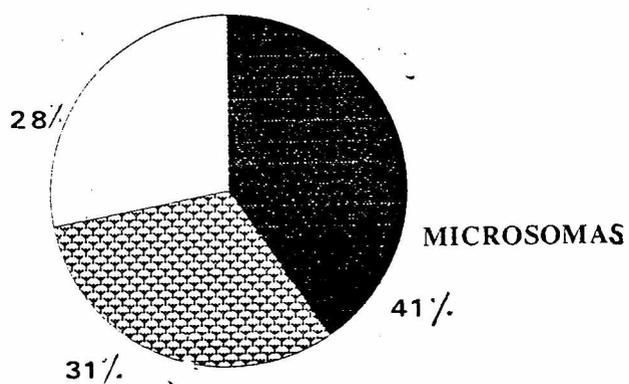


Fig. 10 b.- Incubación de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo.

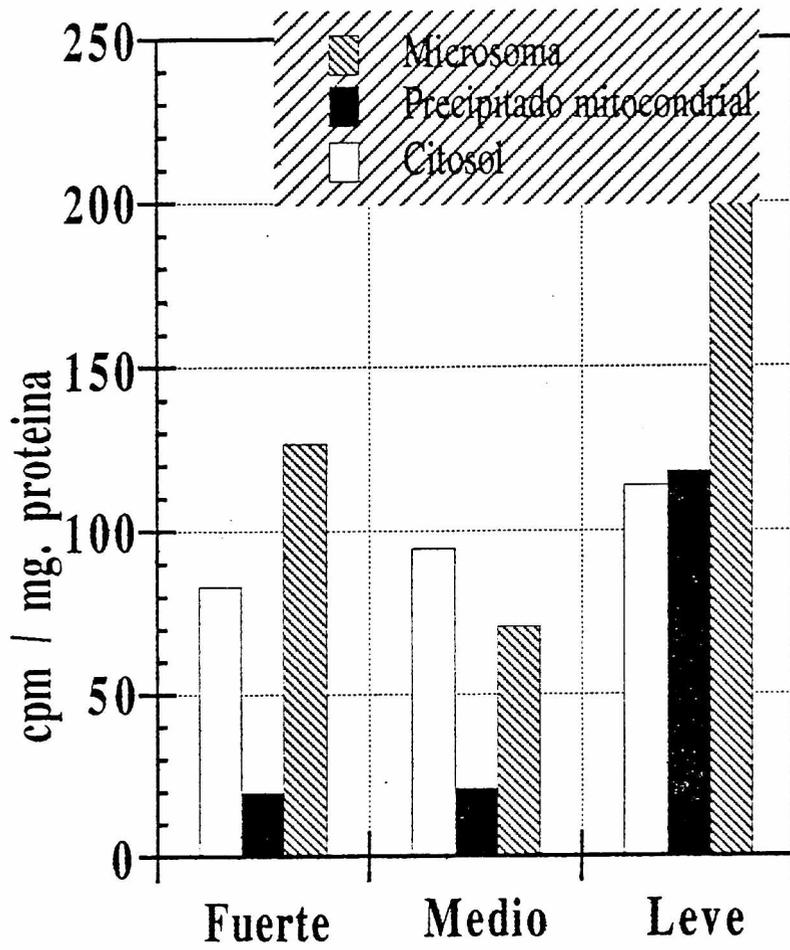
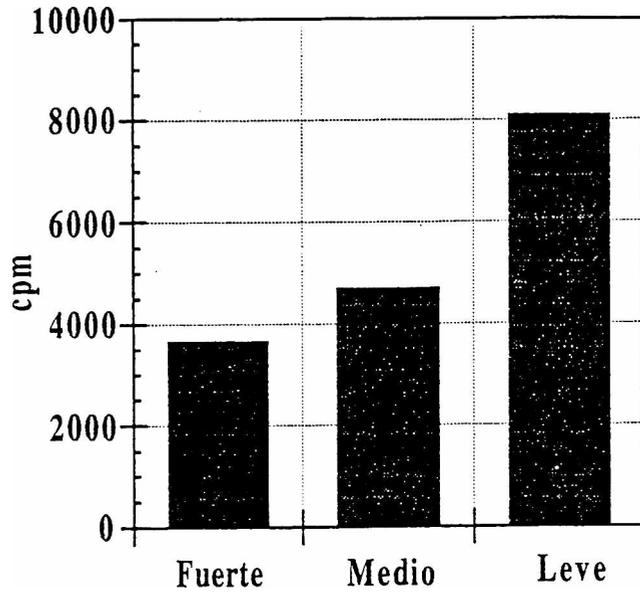


Fig. 11- Area de intestino delgado incubada con ácido palmítico radioactivo.

a.- Radioactividad total en cada uno de los raspados.



b.- Porcentaje de radioactividad.

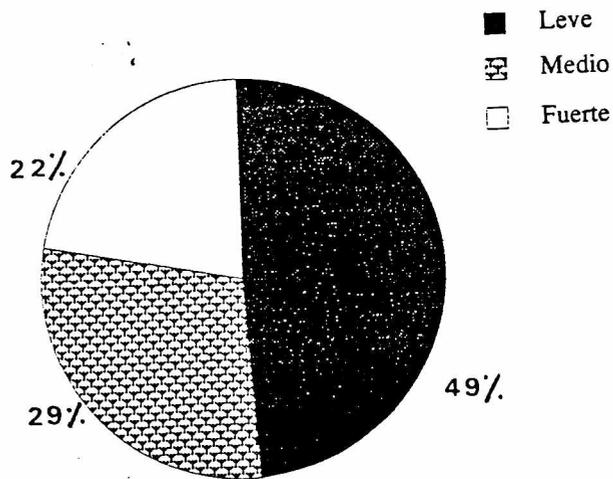
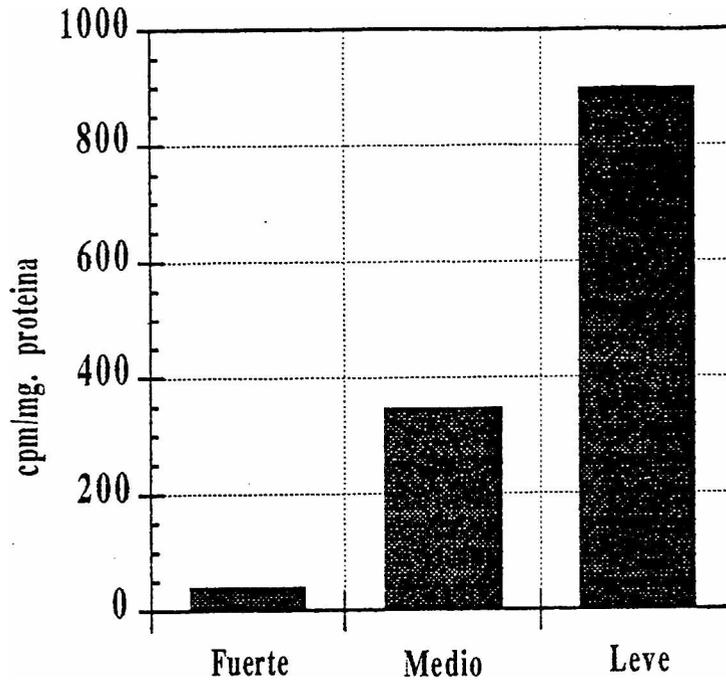


Fig 12- Relación de la radioactividad con cada una de las fracciones proteicas obtenidas por precipitación con sulfato de amonio.

a.- Fracción soluble



b.- Precipitado.

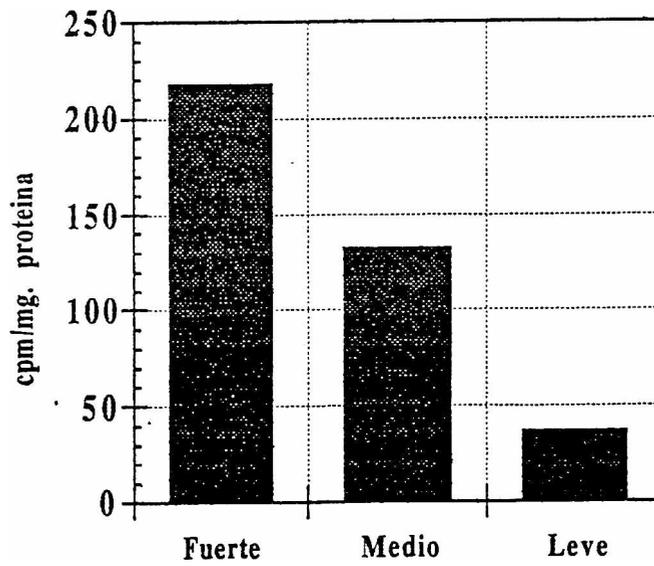


Fig. 13- Remoción de ácido palmítico radioactivo desde microsomas por proteínas de bajo peso molecular.

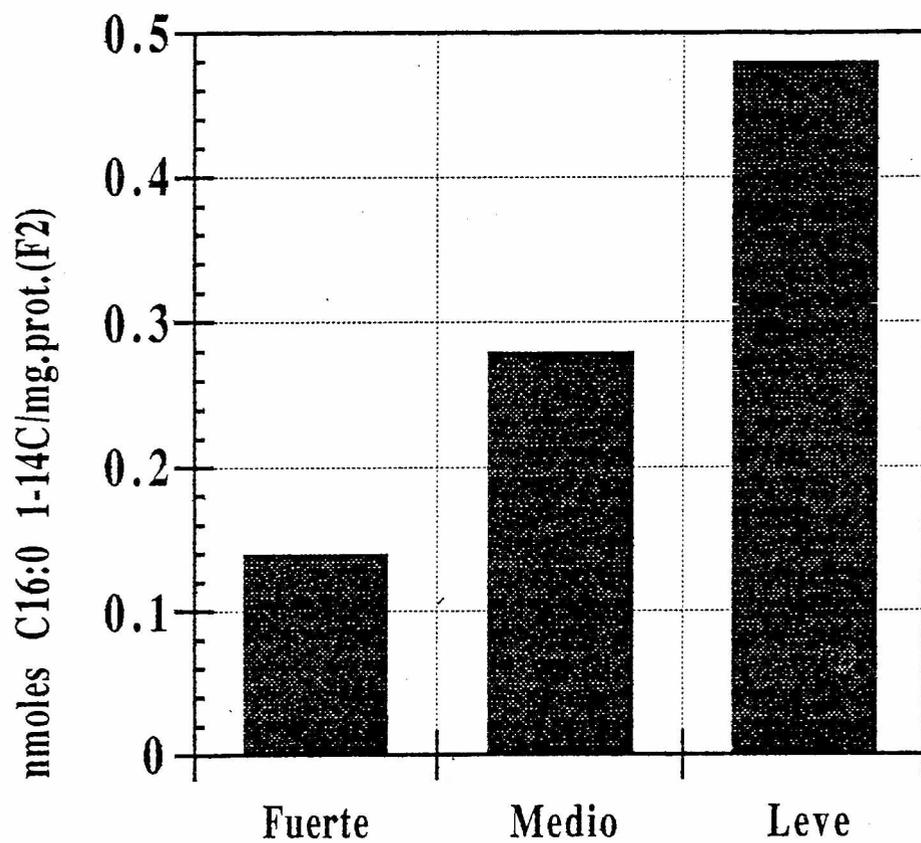
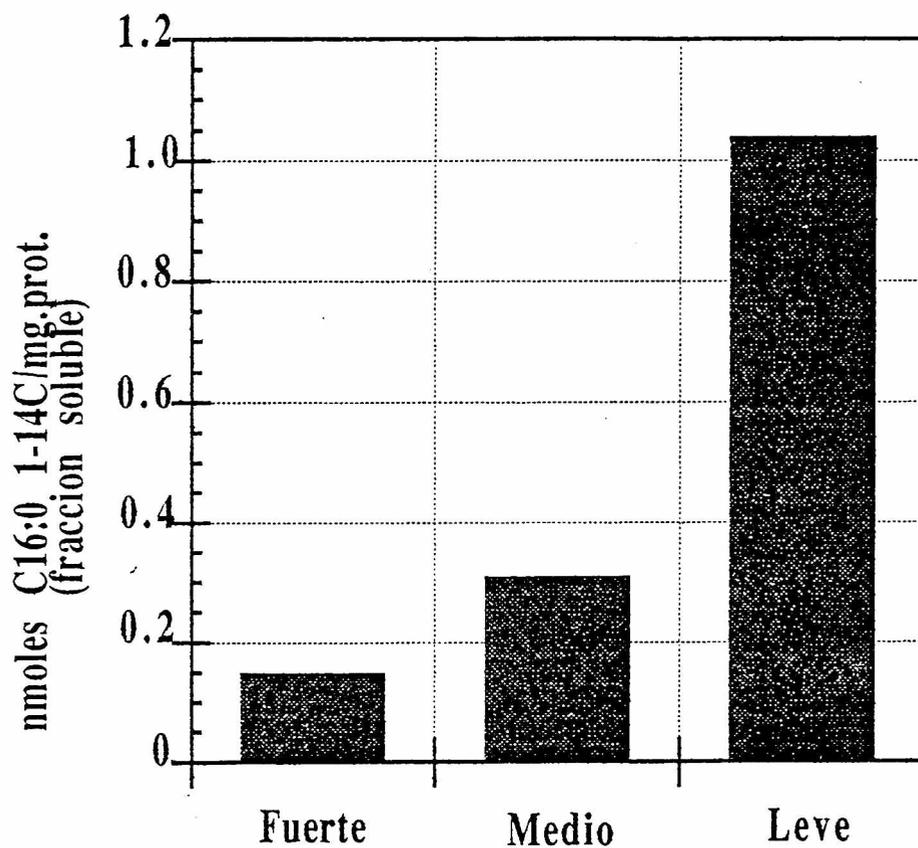


Fig 14- Análisis de las fracciones solubles, de la precipitación con sulfato de amonio, por remoción de ácido palmítico desde microsomas.



## DISCUSION Y CONCLUSIONES.

La existencia de una abundante Proteína Transportadora de Acidos Grasos ( PTAG, Peso molecular: 14000 ) presente en la fracción citosólica de varios tejidos de los mamíferos fue informada por primera vez por Ockner y colaboradores en 1972. Desde este punto inicial las PTAG intracelulares han sido extensivamente estudiadas en lo que confiere a su estructura, función y regulación. En muchos aspectos esta proteína parece representar un equivalente intracelular a la albúmina sérica, participando en el almacenaje y transporte citosólico de lípidos e influenciando la utilización de los mismos en diferentes vías metabólicas( Bass N., 1988 ).

Los resultados de este estudio han demostrado la existencia de un transportador protéico intracitoplasmático con afinidad por ácidos grasos de cadena larga en hígado e intestino de bovino. La presencia de esta proteína transportadora de ácidos grasos en mucosa intestinal de monogástricos ha sido informada por varios autores ( Nemezc G., 1991c ; Richieri G., 1992 ; Reinhart G., 1992 a-b ), aunque en animales de estómago simple ha sido mas estudiada la proteína presente en hígado ( Poorthuis B., 1981 ; Cooper R., 1989 ).

Un hallazgo realmente importante que emerge de este estudio es que el citosol obtenido a partir de la mucosa intestinal contiene una o mas proteínas ligadoras de ácido palmítico dentro de las proteínas de mayor peso molecular, ademas de la PTAG descrita en no rumiantes.

En la última década la información concerniente a la Proteína Transportadora de Acidos Grasos, en monogástricos, ha sido muy abundante ( Glatz J., 1984 ; Sorrentino D., 1988 ; Knowlton A., 1989), sin embargo existen pocos estudios realizados sobre rumiantes.

Trabajos realizados con músculo y tejido adiposo de novillos, muestran que en ambos casos el 50-60 % del pantoil-CoA marcado radioactivamente fue encontrado unido a proteínas con un peso similar a la albúmina y un segundo pico correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 12 KDa fue observado en los dos tejidos ( Smith S., 1985 ).

En este trabajo se ha demostrado que el citosol de la mucosa intestinal bovina contiene dos fracciones con capacidad de pegado de ácido palmítico radioactivo y sulfobromoftaleína. Luego de calentar a 60°C durante 5 minutos o por deslipidización, la fracción F1 mostró cambios en su afinidad por BSP. Analizando a la BSA bajo las mismas condiciones se encontró que esta mantiene sus propiedades de pegado ya sea en presencia de BSP o ácido palmítico.

En experimentos realizados utilizando proteínas citoplasmáticas de mucosa intestinal de terneros se determinó que el ácido palmítico radioactivo se encuentra debilmente unido a dos fracciones protéicas que corresponderían en nuestro trabajo a las proteínas de alto y bajo peso molecular ( Jenkins K., 1986 ). Sin embargo, mientras este autor encuentra similar cantidad de radioactividad en ambas fracciones, nuestros estudios revelan que cuando las proteínas citosólicas de la mucosa intestinal bovina son incubadas con ácido palmítico marcado y

analizadas por filtración en geles utilizando Sephadex G75, un 77,6 % de la radioactividad eluída se halla asociada a la fracción F1 y sólo 22,4 % a F2.

Por otra parte, como se señaló en resultados, las proteínas citosólicas de la mucosa intestinal pertenecientes a la fracción F1 además de presentar mayor afinidad por el pegado de BSP y ácidos grasos, remueven mayor cantidad de ácido palmítico al realizar el experimento con membranas microsomales.

La presente investigación revela que F1 puede ser separada por cromatografía de intercambio iónico en dos fracciones ( DE 1 y DE 2 ) que poseen actividad de pegado sobre BSP y ácido palmítico. Estos resultados también demuestran claramente que la fracción con mayor capacidad de pegado en F1 no es albúmina, ya que, bajo las condiciones experimentales utilizadas para separar DE 1 de DE 2, la BSA queda retenida en la columna.

Con el propósito de ahondar más sobre el conocimiento acerca de las proteínas encargadas del transporte de ácidos grasos, en las células de la mucosa intestinal bovina, se practicó un raspado diferencial de la misma obteniendo distintas zonas a lo largo del eje de la vellosidad.

El mecanismo por el cual los ácidos grasos son absorbidos en la mucosa intestinal bovina, es hasta ahora no muy bien comprendido. Por muchos años la asimilación celular de ácidos grasos fue considerada como un proceso pasivo; sólo recientemente se ha detectado la presencia de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos en la región

apical y lateral de las células de yeyuno, pero no en la superficie luminal del esófago y colon ( Stremmel W., 1985 ). Sin embargo aun existen insuficientes conocimientos con respecto a la absorción de ácidos grasos de cadena larga en las células intestinales de los rumiantes.

En resultados se observan datos que muestran claramente que los citosoles obtenidos a partir de raspados diferenciales de la mucosa intestinal bovina contienen fracciones de alto y bajo peso molecular con actividad de pegado de ácido palmítico . Además estas fracciones protéicas varían su actividad de pegado de acuerdo a su ubicación a lo largo del eje cripta-ápice de la vellosidad intestinal.

Las diferentes zonas a lo largo del eje de la vellosidad fueron determinadas por la actividad de la fosfatasa alcalina. Un enriquecimiento de la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina corresponde a las zonas apicales de la vellosidad, decreciendo la misma hacia las criptas ( Hartman F., 1982 ). La progresiva disminución de la actividad de pegado de ácido palmítico desde los raspados superficiales a los profundos sugieren que el transporte intracelular de ácidos grasos de cadena larga es una propiedad localizada fundamentalmente en las células apicales de la vellosidad. Respecto a estos hallazgos es importante resaltar que coinciden con trabajos realizados en monogástricos, en los que se demostró que la asimilación de ácidos grasos en las células de yeyuno es realizada por las células de mayor diferenciación ( zona apical ) con una importante participación de la PTAG ( Stremmel W., 1988 )

En estudios realizados in vivo, con ratas, se encontró unido el ácido palmítico radioactivo a la PTAG, principalmente en la región apical ( 20 % ) en comparación con las criptas ( 9 % ) ( Ockner R., 1974 ).

En ratas, alimentadas " ad libitum ", fue demostrado que la inmunoradioactividad de la PTAG se encuentra principalmente en las células diferenciadas de la mucosa intestinal; lo que sugeriría que en los monogástricos estas proteínas están íntimamente relacionadas con los procesos de transporte intracelular del material absorbido durante la digestión ( Iseki S., 1989 ). De igual forma por los resultados obtenidos al estudiar la mucosa intestinal bovina, se sugiere que como en los animales de estómago simple la PTAG en poligástricos cumpliría un importante rol en el transporte intracelular de los ácidos grasos y su posterior metabolización.

La interacción de ácidos grasos de cadena larga y la membrana celular de la mucosa intestinal, ha sido examinada utilizando varios sistemas modelo; entre ellos el análisis de la linfa presente en el conducto torácico luego de la ingesta y sacos invertidos de yeyuno de rata ( Clark S., 1971 ).

La incubación de un trozo de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo, aportó datos que corroboran lo anteriormente mencionado, ya que, las fracciones obtenidas en los raspados superficiales demostraron tener una mayor capacidad adsorptiva que aquellas presentes en la zona de las cripta. En este experimento se observó que el citosol correspondiente a las zonas apicales de la vellosidad de la

mucosa intestinal bovina posee proteínas con mayor afinidad y actividad de pegado por ácido palmítico que la que poseen los citosoles obtenidos de regiones celulares menos diferenciadas de la vellosidad. Por otra parte al tratar los diferentes citosoles intestinales con la técnica de precipitación con sulfato de amonio, la fracción soluble del citosol leve, donde se encontraría la PTAG, fue ampliamente más activa, lo que indica un enriquecimiento de esta proteína en las células de real importancia absorptiva.

Las células de la mucosa intestinal son capaces de sintetizar apoproteínas, colesterol, ésteres del colesterol y fosfolípidos necesarios para la formación de quilomicrones y así transportar los triglicéridos ( Garg M., 1987 ). Las enzimas responsables de la síntesis de quilomicrones se hallan localizadas en microsomas y si bien existe relativamente poca información acerca de la variación de la membrana es sabido de la importancia de interacción de las mismas con proteínas citosólicas ( Bordewick U., 1989; Catalá A., 1993 ).

Al incubar un área de intestino delgado de bovino con ácido graso radioactivo se observó que los microsomas de las zonas apicales de la vellosidad intestinal captaron más ácido palmítico que los presentes en otras zonas de la mucosa. Debido a la importancia de los microsomas en la formación de los quilomicrones luego de la resíntesis intestinal de triglicéridos, fue de esperar que tuviesen mayor actividad en la porción de la vellosidad con alta función absorptiva de lípidos, siendo en la misma región donde fue observada una gran afinidad por ácidos grasos por la PTAG. La interacción entre los microsomas y la PTAG se

observa claramente ( resultados: Tablas 18-19 ) cuando fue realizado el ensayo de remoción utilizando fracción F2 nativa y fracciones citosólicas solubles obtenidas por precipitación con sulfato de amonio, debido a que estas fracciones protéicas enriquecidas en PTAG presentan mayor actividad en las células apicales de la vellosidad intestinal.

Estudios realizados con hígado de rata han demostrado la existencia de proteínas con actividad de pegado de ácidos grasos. La concentración de la PTAG encontrada en tejido hepático de los monogástricos representa un 5 % de la masa total de proteínas citosólicas ( Lowe J., 1985 )

En los experimentos con hígado bovino se encontraron en el citosol hepático dos fracciones protéicas ( alto y bajo peso molecular ) con afinidad por ácido palmítico radioactivo. En el citosol hepático analizado por cromatografía de intercambio iónico, fueron detectadas dos fracciones protéicas ( DE 1 y DE 2 ) con afinidad por ácidos grasos. En monogástricos ha sido informada la presencia, en el citosol hepático, de proteínas inespecíficas transportadoras de lípidos, proteína transportadora de fosfatidilcolina que no tendrían homología en la secuencia de nucleótidos con la PTAG ( Storch J., 1989 ).

Debido a la gran vascularización de este tejido la fracción de proteínas hepáticas de alto peso molecular presento una gran contaminación con albúmina sérica. Sin embargo al tratar a esta fracción mediante cromatografía de intercambio iónico y analizar su actividad de pegado con ácido palmítico radioactivo, se halló en DE 1

la existencia ( resultados: Tabla 21 ) de proteína/s con afinidad por el ácido graso marcado, descartando la presencia de BSA ya que esta queda retenida en la columna ( eluye en DE 2 por la adición al buffer de 0,3 M ClNa ).

Esta proteína distinta a la albúmina, hallada en la fracción citosólica hepática de alto peso molecular podría llegar a ser una lipoproteína sintetizada en el hígado y utilizada como transporte de ácidos grasos de cadena larga hacia los tejidos extrahepáticos.

Existen muchas evidencias que sugieren que la utilización celular y metabolismo de los ácidos grasos involucra la participación de proteínas citosólicas de bajo peso molecular (aproximadamente 14KDa); en el caso de la purificación mediante precipitación con sulfato de amonio de proteínas citosólicas hepáticas, se encontró que la fracción soluble se encuentra enriquecida con proteínas con alta afinidad por ácidos grasos ( Avanzati B., 1983 ).

Cuando se trató ,al citosol de hígado bovino,mediante la precipitación con sulfato de amonio al 70 % se obtuvo una fracción soluble ( sobrenadante ) que presentó una gran actividad de pegado sobre ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga son una importante fuente de energía en muchos tejidos, interviniendo en varios procesos metabólicos. Debido a su naturaleza hidrofóbica es esencial contar con un sistema de transporte en el medio acuoso citoplasmático, por este motivo se ha postulado a la Proteína Transportadora de Acidos Grasos como responsable de esta función ( Paulussen R., 1990 ).

Al realizar la precipitación con sales de citosol de hígado bovino se logró una importante purificación de la PTAG, ya que, la fracción soluble mostró una alta actividad de pegado de ácidos grasos con respecto a las proteínas presentes en el precipitado de sulfato de amonio. Analizando la misma fracción soluble (sobrenadante de sulfato de amonio) se determinó que ambas fracciones (DE 1 y DE 2) poseen afinidad por ácidos grasos, siendo DE 1 la fracción en la que se encontraría la PTAG. Como se mencionó en resultados, la DE 2 de la fracción soluble de citosol de hígado bovino es posible que se halle enriquecida con algún otro miembro de la familia de la PTAG o bien parte de la actividad presente pueda deberse a una contaminación con BSA.

Estos estudios realizados con citosol de tejido hepático bovino demuestran la existencia de proteínas encargadas de ligar ácidos grasos en los hepatocitos y facilitar su metabolización.

## CONCLUSIONES GENERALES.

- Los citosoles obtenidos a partir de mucosa intestinal e hígado bovino presentaron fracciones protéicas con afinidad por ácidos grasos.

- La fracción protéica citosólica de alto peso molecular presente en mucosa intestinal posee actividad de pegado por ácidos grasos, determinándose que esta fue diferente a la BSA ante una posible contaminación.

- Luego del tratamiento térmico del citosol intestinal se constató que las proteínas de alto ( F1 ) y bajo peso molecular ( F2 ), encargadas del pegado de ácido palmítico, son termoestables. En el caso de las primeras hubo un importante aumento en su actividad, lo que indicaría que esta fracción inicialmente posee proteínas termolábiles que no intervienen en la captación de ácidos grasos.

- Mediante la deslipidización de F1 y F2 de citosol intestinal se incrementó la capacidad de pegado de BSP. En el mismo experimento se demostró que la actividad de BSA al ser enfrentada a BSP es diferente a la obtenida con F1.

- Ambas fracciones protéicas intestinales ( F1 y F2 ) poseen capacidad de remover ácido palmítico desde membranas microsomales.

- Determinando la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina se conoció el grado de diferenciación celular a lo largo del eje cripta-ápice de la vellosidad intestinal, siendo la región apical de la misma la que presenta células con mayor grado de especialización.

Esto es coincidente con el aumento en la relación lípidos polares / lípidos neutros ( Tabla 19 ) en células mas diferenciadas.

- Obteniendo citosoles de cada uno de los raspados ( leve, medio y fuerte ) se observó que la fracción de bajo peso molecular, donde se hallaría la PTAG, presenta una actividad de pegado por ácidos grasos que decrece de ápice a cripta, vale decir que disminuye de acuerdo al grado de diferenciación celular. Este dato concuerda con la posible función transportadora de la PTAG en citoplasma, ya que, las células mas especializadas son las que se encargan fundamentalmente de la absorción de ácidos grasos.

- En citosoles obtenidos a partir de hepatocitos bovinos se determinó la presencia de una fracción de bajo peso molecular ( F2 - PTAG ) con afinidad por ácido palmítico. También se encontró actividad de pegado por ácidos grasos en la fracción de alto peso molecular ( F1 ), diferente a la albúmina y que probablemente sea una lipoproteína hepática.

- Por precipitación de los citosoles hepáticos con sulfato de amonio al 70 %, se observó que la fracción soluble del mismo ( sobrenadante ) se encontró enriquecida en la fracción protéica asociada al pegado de ácidos grasos. En dicho sobrenadante se hallaría la PTAG, como fue determinado previamente en monogástricos.

## RESUMEN.

En el citosol de la mucosa intestinal fueron obtenidas, mediante la filtración a través de Sephadex G75, dos fracciones protéicas denominadas F1 y F2. Las proteínas de alto peso molecular ( F1 ) presentaron 1,7 veces más actividad de pegado de ácido graso que aquellas de bajo peso molecular ( F2 ). En esta última fracción ha sido descrita, en monogástricos, la presencia de la Proteína Transportadora de Acidos Grasos ( PTAG ).

Conociendo que la fracción citosólica intestinal F1 poseía albúmina sérica bovina, se determinó mediante cromatografía de intercambio iónico la existencia de otra proteína con capacidad de pegado de ácidos grasos. De esta manera se encontró en la fracción DE 1 moléculas con afinidad por ácido palmítico y se descartó la contaminación con albúmina, ya que, es eluida en DE 2 al agregar al buffer de elución ClNa 0,3 M. Otro experimento realizado para demostrar que F1 presenta actividades de pegado distintas a las que puede ocasionar una contaminación con albúmina fue remover BSP previamente complejoado a F1 y BSA con ácido palmítico, en el primer caso sólo pudo removerse un 35 % del BSP unido mientras que de la proteína sérica se liberó hasta un 70 % de las moléculas complejadas.

Al analizar la respuesta al tratamiento térmico ( 60°C durante 5 minutos ) de las proteínas involucradas en el pegado de ácidos grasos, se observó que las mismas son termoestables. En el caso de F2

la actividad de pegado de ácido palmítico y BSP se mantuvo luego del tratamiento, mientras que en F1 se incrementó ( 2,2 veces respecto a la nativa ) debido a la desnaturalización que presentaron las proteínas de alto peso molecular no asociadas al pegado de ácidos grasos.

Luego de realizar la deslipidización sobre las fracciones F1 - F2 y someterlas a incubación con BSP, se constató que en el caso de las proteínas de alto peso molecular el pegado aumentó 7,8 veces mientras que en las de bajo peso molecular fue de 1,5 veces respecto a la fracción nativa. Este experimento demostró fehacientemente que ambas fracciones citosólicas nativas se presentan unidas a ácidos grasos y que por lo tanto podrían llegar a estar encargadas del transporte intracelular de los mismos.

La actividad enzimática de la fosfatasa alcalina fue superior en las células del ápice de la vellosidad que en aquellas ubicadas en la región de la cripta, esto demostró claramente un mayor grado de diferenciación y especialización celular que se correlacionó directamente con las funciones absortivas y los niveles intracelulares de PTAG existentes. En el caso de las proteínas de bajo peso molecular ( F2 - PTAG ) se determinó que su actividad de pegado decrece 2,8 veces de ápice a cripta mientras que esta disminución, para las proteínas de alto peso molecular, alcanzó una caída de 1,6 veces entre las células diferenciadas e indiferenciadas de la mucosa intestinal bovina.

Un importante dato obtenido fue que la fracción DE 1 de F1 ápice

tuvo 19 veces mayor afinidad por ácidos grasos que la que presentó la misma fracción obtenida de criptas.

En el ensayo de pegado de ácido palmítico radioactivo a proteínas citosólicas intestinales de alto y bajo peso molecular, se determinó que la actividad de ambas cae de raspados leves a fuertes, disminuyendo 2,5 veces la fracción F1 y 1,4 veces la fracción F2 (PTAG). Al analizar esta última fracción por cromatografía de intercambio iónico pudo demostrarse que DE 1 de F2 ( PTAG ) posee mayor actividad de pegado de ácidos grasos que su correspondiente DE2.

Otra técnica utilizada para purificar la PTAG fue la de someter a los citosoles intestinales ( leve, medio y fuerte ) a precipitación con sulfato de amonio al 70 %. La fracción soluble ( sobrenadante de sulfato de amonio ) enriquecida en PTAG decreció en su actividad de leve a fuerte 3,8 veces. Analizando las fracciones solubles a través de Sephadex G75 se encontró que la F2 obtenida luego de la filtración también poseía una disminución de su actividad ( 2,2 veces ) de ápice a cripta de la vellosidad, quedando establecida una relación directa entre la actividad de la PTAG y el grado de diferenciación celular de la mucosa intestinal bovina. La misma tendencia fue encontrada al realizar la incubación de un área de intestino delgado con ácido palmítico radioactivo, ya que todas las fracciones obtenidas por raspado diferencial mostraron una disminución en la absorción de este ácido graso de ápice a cripta de la vellosidad. La actividad encontrada en citosoles, microsomas y precipitado mitocondrial decayó 1,5; 1,4 y 6,2 veces respectivamente

En el citosol obtenido a partir de hígado bovino se observó una importante actividad de pegado de ácidos grasos por proteínas citosólicas ( 1,9 picomoles de ácidos grasos /  $\mu$ g. de proteína ). En el citosol hepático analizado por cromatografía de intercambio iónico se encontró que tanto la fracción DE 1 como la DE 2 poseen afinidad por ácido palmítico; en el caso de esta última fracción se tuvo en cuenta una posible contaminación con BSA.

Por precipitación de proteínas citosólicas hepáticas con sulfato de amonio al 70 % se logró purificar ostensiblemente a la PTAG, encontrándose enriquecida en la fracción soluble ( sobrenadante de sulfato de amonio ). Mediante esta técnica se observó que la fracción soluble fue 15 veces mas activa en el pegado de ácidos grasos que las proteínas presentes en el precipitado de sulfato de amonio, cuando se realizó el ensayo de Lipidex 1000.

Cuando se utilizó la cromatografía de intercambio iónico para analizar la fracción soluble del citosol hepático y el precipitado de sulfato de amonio se encontró que DE 1 del sobrenadante ( fracción rica en PTAG ) pegó 8 veces más ácidos grasos que DE 1 del precipitado. Este último dato demostró que con la combinación de las técnicas de precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico se logra una importante purificación de la PTAG en citosol de hígado bovino.

## SUMMARY.

Two cytosolic protein fractions ( F1 and F2 ) from bovine intestinal mucosa were obtained through Sephadex G75 filtration. Fraction F1, of high molecular weight, bound 1,7 times more fatty acids than fraction F2, of lower molecular weight.

In monogastric animals, fatty acid binding protein ( FABP ) has been found in fraction 2. Bovine serum albumin ( BSA ) was present in F1, but another protein with binding capacity for fatty acids was identified through ionic exchange chromatography. In this way, fraction DE 1 was found to possess binding capacity for palmitic acid and albumin contamination was ruled out, since albumin eluates with DE 2 when NaCl 0,3 M is added to the buffer. Bromosulphophthalein (BSP) removal was carried out to demonstrate that F1 shows fatty acid binding properties different from that arises from albumin contamination. Removal of BSP from F1 and BSA palmitic acid complex was 35 % and 70 % respectively.

Thermostability of the proteins that have fatty acid binding proteins was demonstrated after heating at 60°C for 5 minutes. In the case of F2 there was no change in the binding capacity while F1 increased its binding capacity by a rate of 2,2, when compared with native fraction, due to the denaturalization of high molecular weight proteins not associated to fatty acid binding.

After delipidization, BSP binding by fraction F1 and F2 increased by

a rate of 7,8 times and 1,5 times in high and low molecular weight proteins respectively, compared with native fractions. This clearly show that both native cytosolic proteins bind fatty acids and may have a role in intracellular transport.

Enzyme activity of alkaline phosphatase was higher in the apical region of the villus than in the basal region and this indicates a greater degree of cellular differentiation and specialization that correlates with absorptive functions and intracellular FABP levels. Low molecular weight proteins ( F2-FABP ) binding capacity decreased 2,8 times from the apical region to the basal regions of the crypt while this decreased was 1,6 times between differentiated and undifferentiated cells in the intestinal mucosa of cattle.

An important finding was that fraction DE 1 from F1 obtained from the apical region had 19 times greater affinity for fatty acids than the same fraction from the crypts.

The experiment of radioactive palmitic acid binding activity to high and low molecular weight proteins from intestinal cytosol, showed that the activity of both decreased according to the degree of scrapping.

Palmitic acid binding activity by intestinal cytosol proteins of high and low molecular weight was measures . We found that binding activity was stronger when intestinal cytosol was obtained by superficial scrappings than when it was obtained by deep scrapping. Binding activity decreased by 2,5 times in fraction F1 and 1,4 times in fraction F2 ( FABP ) respectively.

After analyzing this latter fraction by ionic exchange chromatography we found that DE 1 from F2 ( FABP ) has a greater fatty acid binding activity than its homologous fraction from DE 2.

FABP was also purified by ammonium sulfate ( 70 % ) precipitation of intestinal cytosol ( superficial, middle and deep ). Soluble fraction, FABP enriched, showed a decrease in binding activity from superficial to deep of 3,8 times.

Analysis of soluble fractions through Sephadex G75 showed that F2, obtained after filtration, also decreased its activity 2,2 times from apex to crypt, which means that there is a direct relationship between FABP activity and degree of cellular differentiation of mucosal cells in bovine. The same behavior was found after incubation of an area of small intestine with radioactive palmitic acid, since all fractions ( obtained through differential scrapping ) showed a decrease in the uptake of this fatty acid from apex to crypt. Binding activity found in cytosol, microsomes and mitochondrial precipitate decreased 1,5; 1,4 and 6,2 times respectively.

In the liver cytosol from bovine an important binding activity of fatty acids by the protein fractions was observed ( 1,9 pmol. of fatty acids /  $\mu$ g of protein ). Analyzing liver cytosol by ionic exchange chromatography it was found that DE 1 and DE 2 fraction have affinity for palmitic acid. The latter fraction was assayed for possible BSA contamination.

FABP was ostensibly purified by ammonium sulfate ( 70 % )

precipitation. FABP was found enriched in the soluble fraction ( supernatant ). Soluble fraction had 15 times more binding activity than the proteins in the precipitate, when they were assayed by Lipidex 1000.

When ammonium sulfate supernatant and precipitate of liver cytosol was analyzed by ionic exchange chromatography it was found that binding activity of DE 1 from the supernatant was 8 times higher than binding activity of DE 1 from precipitate. This demonstrates that through ammonium sulfate precipitation and ionic exchange chromatography an important purification of FABP can be obtained.

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Catalá y autoridades de la Facultad de Ciencias Veterinarias por permitirme realizar la Tesis Doctoral en esta unidad académica de la Universidad Nacional de La Plata.

A mis compañeros de las Cátedras de Bioquímica y Fisiología.

A Viviana y Carlos por su amistad incondicional.

A mi padre y hermanos por los esfuerzos que realizamos juntos.

A Myriam por su compañerismo y comprensión.

## BIBLIOGRAFIA.

- Alessandri, J.M.; Arfi, T.S.; Thieulin, C.. La muqueuse de l'intestine grêle: évolution de la composition en lipides cellulaires au cours de la différenciation entérocytaire et de la maturation postnatale. *Reprod. Nutr. Dev.*, Vol. 30, pp. 551-575, 1990.
  
- Alpers, D.H.; Strauss, A.W.; Ockner, R.K.; Bass, N.M.; Gordon, J.I.. Cloning of a cDNA encoding rat fatty acid binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, Vol. 81, pp. 313-317, 1984.
  
- Armentano, L.E.. Ruminant hepatic metabolism of volatile fatty acid, lactate and pyruvate. *J. Nutr.*, Vol. 122, pp. 838-842, 1992.
  
- Avanzati, B.; Catala, A.. Partial purification of fatty acid binding protein by ammonium sulphate fractionation. *Arch. Int. Physiol. Biochim.*, Vol. 91, pp. 103-108, 1983.
  
- Baile, C.A.; Forbes, J.M.. Control of feed intake and regulation of energy balance in ruminants. *Physiol. Reviews*, Vol. 54, No. 1, pp. 160-214, 1974.

- Bansal, M. P.; Cook, R. G.; Danielson, K. G.; Medina, D.. A 14-kilodalton selenium binding protein in mouse liver is fatty acid binding protein. *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, No. 23, pp. 13780-13784, 1989.
- Bass, N. M.; Manning, J. A.; Ockner, R. K.; Gordon, J. I.; Seetharam, S.; Alpers, D. H.. Regulation of the biosynthesis of two distinct fatty acid binding proteins in rat liver and intestine. *J. Biol. Chem.*, Vol. 260, No. 3, pp. 1432-1436, 1985a.
- Bass, N. M.. Function and regulation of hepatic and intestinal fatty acid binding proteins. *Chem. and Physics of lipids*, Vol. 38, pp. 95-114, 1985b.
- Bass, N. M.. The cellular fatty acid binding proteins: Aspects of structure, regulation and function. *Int. Rev. Cytol.*, Vol.3, pp. 143-183, 1988.
- Bass, N. M.. Fatty acid Binding protein expression in the liver: its regulation and relationship to the zonation of fatty acid metabolism. *Mol. Cell. Biochem.*, Vol. 98, pp. 167-176, 1990.

- Bassuk, J.K.; Tsihchlis, P.N.; Sorof, S.. Liver fatty acid binding protein in mitosis-associated polypeptide target of a carcinogen in rat hepatocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 84, pp. 7547-7551, 1987.
  
- Bauchart, D.. Digestion comparée des lipides chez les ruminants et les monogastriques. Bull. Techn. C.R.Z.V. Theix I.N.R.A., Vol. 46, pp. 45-55, 1981.
  
- Bell, A.W.. Lipid metabolism in liver and selected tissues and in the whole body of ruminant animals. In: Christie W.W. ( ed. ), Lipid Metabolism in ruminant animals, pp. 363-403, 1981.
  
- Bergman, E.N.. Energy contribution of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. Physiol. Reviews, Vol. 70, No. 2, pp. 567-591, 1990.
  
- Bernard, A.; Caselli, C.; Blond, J.P.; Carlier, H.. Diet fatty acid composition, age and rat jejunal microvillus enzyme activities. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 101A, No. 3, pp. 607-612, 1992.
  
- Bernier, I.; Jolles, P.. A survey on cytosolic non enzymic proteins involved in the metabolism of lipophilic compounds: from organic anion binders to new protein families. Biochimie, Vol. 69, pp. 1127-1152, 1987.

- Bernlorh, D.; Angus, W. C.; Lane, M. D.; Bolanowski, M. A.; Kelly, T. J.. Expression of specific mRNAs during adipose differentiation: Identification of an mRNA encoding a homologue of myelin P2 protein. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 81, pp. 5468-5472, 1984.

- Billheimer, J.; Gaylor, J.. Cytosolic modulators of activities of microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. J. Biol. Chem., Vol. 255, pp. 8128-8135, 1980.

- Billich, S.; Wissel, T.; Kratzin, H.; Hanh, U.; Hagenhoff, B.; Lezius, A. G.; Spener, F.. Cloning of a full-length complementary DNA for fatty acid binding protein from bovine heart. Eur. J. Biochem., Vol. 175, pp. 549-556, 1988.

- Bogdarin, I. A.. Effect of estrogen-receptor interaction on the levels of fatty acid-binding proteins and spectra of free acids in small intestinal mucosa of rabbits. Exp. Clin. Endocrinol., Vol. 96, No. 2, pp. 177-184, 1990.

- Böhmer, F. D.; Kraft, R.; Otto, A.. Identification of polypeptide growth inhibitor from bovine mammary gland. J. Biol. Chem., Vol. 262, No. 31, pp. 15137-15143, 1987.

- Bordewick, U.; Heese, M.; Borchers, T.; Robenek, H.; Spener, F..  
Compartmentation of hepatic fatty acid binding protein in liver cells  
and its effect on microsomal phosphatidic acid biosynthesis. J. Biol.  
Chem., Vol. 370, pp. 229-238, 1989.
  
- Boyer, J.L.. New concepts of mechanisms of hepatocyte bile  
formation. Physiol. Rev., Vol. 60, No. 2, pp. 303-327, 1980.
  
- Brandes, R.; Arad, R.; Barash, B.. Cytosolic fatty acid binding  
proteins in rat placenta. Placenta, Vol. 8, pp. 347-350, 1987.
  
- Brandes, R.; Kaikaus, R.M.; Lysenko, N.; Ockner, R.K.; Bass, N.M..  
Induction of fatty acid binding protein by peroxisome proliferators in  
primary hepatocyte cultures and its relationship to the induction of  
peroxisomal  $\beta$ -oxidation. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1034, pp. 53-61,  
1990.
  
- Bugaut, M.. Occurrence, absorption and metabolism of short chain  
fatty acids in the digestive tract of mammals. Comp. Biochem.  
Physiol., Vol. 86b, No. 3, pp. 439-472, 1987.
  
- Carlier, H.; Bernard, A.; Caselli, C.. Digestion and absorption of  
polyunsaturated fatty acids. Reprod. Nutr. Dev., Vol. 31, pp. 475-500,  
1991.

- Caspary, W.F.. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. Am. J. Clin. Nutr., Vol. 55, pp. 299-308, 1992.

- Catala, A.. Displacement of sulphobromophthalein from albumin and fatty acid binding protein by oleic acid. Arch. Int. Physiol. Biochim., Vol. 93, pp. 307-311, 1985.

- Catala, A.. Interaction of fatty acids, acyl-CoA derivatives and retinoids with microsomal membranes: effect of cytosolic proteins. Mol. Cell. Biochem., Vol. 120, pp. 89-94, 1993.

- Clark, S.B.. The uptake of oleic acid by rat small intestine: a comparison of methodologies. J. Lip. Res., Vol. 12, pp. 43-55, 1971.

- Cohen-Luria, R.; Danon, A.; Rimon, G.. Fatty acid binding protein (FABP) modulates prostaglandin E binding to rat epididymal adipocyte membrane similarly to albumin. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1021, pp. 96-100, 1990.

- Cooper, R.B.; Noy, N.; Zakim, D.. Mechanism for binding of fatty acids to hepatocyte plasma membranes. J. Lipid. Res., Vol. 30, pp. 1719-1726, 1989.

- Charman, W.N.; Stella, V.J.. Transport of lipophilic molecules by the intestinal lymphatic system. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 7, pp. 1-14, 1991.
  
- Folch, J.; Lees, M.; Stanley, S.. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, Vol. 226, pp. 497-509, 1957.
  
- Fournier, N.; Geoffroy, M.; Deshusses, J.. Purification and characterization of a long chain fatty acid binding protein supplying the mitochondrial  $\beta$ -oxidative system in the heart. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 533, pp. 457-464, 1978.
  
- Fournier, N.; Zuker, M.; Williams, R.E.; Smith, C.P.. Self-association of the cardiac fatty acid binding protein. Influence on membrane-bound, fatty acid dependent enzymes. *Biochemistry*, Vol. 22, pp. 1863-1872, 1983a.
  
- Fournier, N.; Rahim, M.H.. Self-aggregation, a new property of cardiac fatty acid binding protein. *J. Biol. Chem.*, Vol. 258, No. 5, pp. 2929-2933, 1983b.
  
- Fournier, N.; Rahim, M.H.. Control of energy production in the heart: a new function for fatty acid binding protein. *Biochemistry*, Vol. 24, pp. 2387-2396, 1985.

- Fournier, N.; Richard, M. A.. Fatty acid binding protein, a potential regulator of energy production in the heart. J. Biol. Chem., Vol. 263., No. 28, pp. 14471-14479, 1988.
  
- Friedman, H.; Nylund, B.. Intestinal fat digestion, absorption and transport. J. Clin. Nutr., Vol. 33, No. 5, pp. 759-773, 1980.
  
- Fujii, S.; Kawaguchi, H.; Yasuda, H.. Purification and characterization of fatty acid binding protein from rat kidney. Arch. Biochem. Biophys., Vol. 254, No. 2, pp. 552-558, 1987.
  
- Fujii, S.; Kawaguchi, H.; Okamoto, H.; Saito, H.; Yasuda, H.. Fatty acid cardiac muscle in spontaneously hypertensive rats: effect of hypertrophy and its regression. J. Mol. Cell. Cardiol., Vol. 20, No. 9, pp. 779-787, 1988.
  
- Fukai, F.; Kase, T.; Shidotani, T.; Nagai, T.; Katayama, T.. A novel role of fatty acid binding protein as a vehicle of retinoids. Biochem. Biophys. Res. Comm., Vol. 147, No. 2, pp. 899-903, 1987.
  
- Gangl, A.; Ockner, R.. Intestinal metabolism of lipids and lipoproteins. Gastroenterology, Vol. 68, No. 1, pp. 167-186, 1975a.
  
- Gangl, A.; Ockner, R.. Intestinal metabolism of plasma free fatty acid. J. Clin. Invest., Vol. 55, pp. 803-813, 1975b.

- Garg, M.L.; Keelan, M.; Wierzbicki, A.; Thomson, A.B.R.; Clandinin, M.T.. Regional differences in lipid composition and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into microsomal membranes of rat small intestine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Vol. 66, pp. 794-800, 1987.
- Garg, M.L.; Keelan, M.; Thomson, A.B.R.; Clandinin, M.T.. Fatty acid desaturation in the intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 958, pp. 139-141, 1988.
- Glatz, J.F.; Baerwaldt, C.C.F.; Veerkamp, J.H.; Kempen, H.J.. Diurnal variation of fatty acid binding protein content and of palmitate oxidation in rat liver and heart. *J. Biol. Chem.*, Vol. 259, No. 7, pp. 4295-4500, 1984.
- Glatz, J.F.; Veerkamp, J.H.. Intracellular fatty acid binding proteins. *Int. J. Biochem*, Vol. 17, No. 1, pp. 13-22, 1985a.
- Glatz J.F., Paulussen, R.J.A.; Veerkamp, J.H.. Fatty acid binding protein from heart. *Chem. Physics. Lip.*, Vol. 38, pp. 115-129, 1985b.
- Glatz, J.F.; Van der Vusse, G.J.. Cellular fatty acid binding proteins: current concepts and future directions. *Mol. Cell. Biochem.*, Vol. 98, pp. 237-251, 1990.

- Gordon, J.I.; Alpers, D.H.; Ockner, R.K.; Strauss, A.W.. The nucleotide sequence of rat liver fatty acid binding protein mRNA. *J. Biol. Chem.*, Vol. 258, No. 5, pp. 3356-3363, 1983.
  
- Gordon, J.I.; Lowe, J.B.. Analyzing the structures, functions and evolution of two abundant gastrointestinal fatty acid binding proteins with recombinant DNA and computational techniques. *Chem. Physics. Lip.*, Vol. 38-, pp. 137-158, 1985.
  
- Haq, R.; Shrago, E.; Christodoulides, L.; Ketterer, B.. Purification and characterization of fatty acid binding protein in mammalian lung. *Exp. Lung. Res.*, Vol. 9, pp. 43-55, 1985.
  
- Hartman, F.; Owen, R.; Bissel, D.M.. Characterization of isolated epithelial cells from rat small intestine. *Am. J. Physiol.*, Vol. 242, pp. 147-155, 1982.
  
- Haunerland, N.; Jagschies, G.; Schulenberg, H.; Spener, F.. Occurrence of two fatty acid binding proteins in bovine liver cytosol and their binding fatty acids, cholesterol, and other lipophilic ligands. *Physiol. Chem.*, Vol. 365, pp. 365-376, 1984.
  
- Hulsman, W.C.. Energy metabolism in different preparations of rat small intestinal epithelium. *Excerpta Medica*, Vol. 219, pp.229-238, 1975.

- Ibrahim, S.; Balasubramanian, K. A. . Covalently bound fatty acids in the gastrointestinal epithelial cell membrane. Indian J. Biochem. Biophys, Vol. 28, pp. 312-315, 1991.
  
- Iseki, S.; Hitomi, M.; Ono, T.; Kondo, H. . Immunocytochemical localization of hepatic fatty acid binding protein in the rat intestine: effect of fasting. Anatomical Record, Vol. 223, pp. 283-291, 1989.
  
- Iseki, S.; Kondo, H.; Hitomi, M.; Ono, T. . Localization of liver fatty acid binding protein and its mRNA in the liver and jejunum rats: an immunohistochemical and in situ hybridization study. Mol. Cell. Biochem., Vol. 98, pp. 27-33, 1990a.
  
- Iseki, S.; Kondo, H. . Light microscopic localization of hepatic fatty acid binding protein mRNA in jejunal epithelia of rats using in situ hybridization, immunohistochemical and autoradiographic techniques. J. Histochem. Cytochem., Vol. 38, No. 1, pp. 111-115, 1990.
  
- Jackson, R.L.; Morrisett, J.D.; Gotto, A.M. . Lipoprotein structure and metabolism. Physiol. Rev., Vol. 56, No. 2, pp. 259-316, 1976.
  
- Jagschies, G.; Reers, M.; Unterberg, C.; Spener, F. . Bovine fatty acid binding proteins. Eur. J. Biochem., Vol. 152, pp. 537-545, 1985.

- Jenkins, K.J.. Fatty acid binding protein in liver and small intestine of the preruminant calf. *J. Dairy Sci.*, Vol. 69, 155-159, 1986.
  
- Johnson, R.L.. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiol. Rev.*, Vol. 68, No. 2, pp. 457-502, 1988.
  
- Kaikaus, R.M.; Bass, N.M.; Ockner, R.K.. Function of fatty acid binding proteins. *Experientia*, Vol. 46, pp. 617-630, 1990.
  
- Kakkad, B.P.; Ong, D.E.. Reduction of retinaldehyde bound to cellular retinol binding protein ( Type II ) by microsomes from rat small intestine. *J. Biol. Chem.*, Vol. 263, No. 26, pp. 12916-12919, 1988.
  
- Kanda, T.; Iseki, S.; Hitomi, M.; Kimura, H.; Odani, S.; Kondo, H.; Matsubara, Y.; Muto, T.; Ono, T.. Purification and characterization of fatty acid binding protein from the gastric mucosa of rats. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 185, pp. 27-33, 1989.
  
- Kanda, T.; Ono, T.; Matsubara, Y.; Muto, T.. Possible rol of rat fatty acid binding proteins in the intestine as carrier of phenol and phthalate derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Vol. 168, No. 3, pp. 1053-1058, 1990.

- Kanda, T.; Odani, S.; Tomoi, M.; Matsubara, Y.; Ono, T.. Primary structure of a 15 KDa protein from rat intestinal epithelium. Eur. J. Biochem., Vol. 197, pp. 759-768, 1991.
  
- Knowlton, A. A.; Apstein, C. S.; Saouf, R.; Brecher, P.. Leakage of heart fatty acid binding protein with ischemia and reperfusion in the rat. J. Mol. Cell. Cardiol., Vol. 21. pp. 577-583, 1989.
  
- Knudsen, J.. Acyl CoA binding protein ( ACBP ) and its relation to fatty acid binding protein ( FABP ): an overview. Mol. Cell. Biochem., Vol. 98, pp. 217-223, 1990.
  
- Landsverk, T.. The gastrointestinal mucosa in young milk fed calves. Acta Vet. Scand., Vol. 20, pp. 572-582, 1979.
  
- Landsverk, T.. Pathomorphology of intestinal mucosa in diarrheic calves. Acta Vet. Scand., Vol. 22, pp. 1-14, 1981.
  
- Lester, R.L.; Fleischer, S.. Studies on the electron-transport system. XXVII The respiratory activity of acetone extracted beef-heart mitochondria. Role of coenzyme Q and other lipids. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 47, pp. 358-377.

- Levi, A.J.; Gatmaitan, Z.; Arias, I.M.. Two hepatic cytoplasmic protein fractions, Y and Z, and their possible role in the hepatic uptake of bilirubin, sulfobromophthalein and other anions. *J. Clin. Invest.*, Vol. 48, pp. 2156-2167, 1969.
- Lowe, J.B.; Boguski, M.S.; Sweetser, D.A.; Elshourbagy, N.A.; Taylor, J.M.; Gordon, J.I.. Human liver fatty acid binding protein. *J. Biol. Chem.*, Vol. 260, No. 6, pp. 3413-3417, 1985.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Vol. 193, pp. 265-275, 1951.
- Maroux, S.; Coudrier, E.; Feracci, H.; Gorvel, J.P.; Lovard, D.. Molecular organization of the intestinal brush border. *Biochimie*, Vol. 70, pp. 1297-1306, 1988.
- Matarese, V.; Stone, R.L.; Waggoner, D.W.; Bernlohr, D.A.. Intracellular fatty acid trafficking and the role of cytosolic lipid binding proteins. *Prog. Lip. Res.*, Vol. 28, pp. 245-272, 1989.
- Mikolajczyk, S.; Brody, S.. De novo fatty acid synthesis mediated by acyl carrier protein in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 187, pp. 431-437, 1990.

- Mogensen, I. B. ; Schulenberg, H. ; Hansen, H. O. ; Spener, F. ; Knudsen, J.. A novel acyl binding protein from bovine liver. *Biochem. J.*, Vol. 241, pp. 189-192, 1987.
  
- Morton, R. E.. Specificity of lipid transfer protein for molecular species of cholesteryl ester. *J. Lipid. Res.*, Vol. 27, pp. 523-529, 1986.
  
- Nemezc, G. ; Hubbel, Y. ; Jefferson, J. R. ; Lowe, J. B. ; Schroeder, F.. Interaction of fatty acid with recombinant rat intestinal and liver fatty acid binding proteins. *Arch. Biochem. Biophys*, Vol. 286, No. 1, pp. 300-309, 1991a.
  
- Nemezc, G. ; Jefferson, J. R. ; Schroeder, F.. Polyene fatty acid interactions with recombinant intestinal and liver fatty acid binding proteins. *J. Biol. Chem.*, Vol. 266, No. 26, pp. 17112-17123, 1991b.
  
- Nemezc, G. ; Schroeder, F.. Selective binding of cholesterol by recombinant fatty acids binding proteins. *J. Biol. Chem*, Vol. 266, No. 26, pp. 17180-17186, 1991c.
  
- Noble, R. C.. Digestion, absorption and transport of lipids in ruminant animals. In: W.W. Christie ( ed. ), *Lipid metabolism in ruminant animals*, Pergamon Press, Oxford, pp. 57-93, 1981

- Ockner, R. K.; Manning, J. A.; Poppenhausen, R. B.; Ho, W. K. L.. A binding protein for fatty acids in the cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium and other tissues. Science, Vol. 177, pp. 56-58, 1972.

- Ockner, R. K.; Manning, J. A.. Fatty acid binding protein in small intestine. Identification, isolation and evidence for its role in cellular fatty acid transport. J. Clin. Invest., Vol. 54, pp.326-328, 1974.

- Ockner, R. K.; Manning, J. A.. Fatty Acid Binding Protein: role in esterification and absorbed long chain fatty acid in rat intestine. J. Clin. Invest., Vol. 58, pp. 632-641, 1976.

- Ockner, R. K.; Manning, J. A.; Kane, J. P.. Fatty Acid Binding Protein: isolation from rat liver, characterization and immunochemical quantification. J. Biol. Chem., Vol. 257, No. 13, pp. 7872-7878, 1982.

- Ockner, R. K.. Historic overview of studies on fatty acid binding proteins. Mol. Cell. Biochem., Vol. 98, pp. 3-9, 1990.

- Ong, D. E.; Kakkad, B.; Mac Donald, P. N.. Acyl CoA independent esterification of retinol bound to cellular retinol binding protein ( type II ) by microsomes from rat small intestine. J. Biol. Chem., Vol. 262, No. 6, pp. 2729-2736, 1987.

- Pähler, A.; Maslowska, M.; Parge, H. E.; Schneider, M.; Steifa, M.; Saenger, W.; Keuper, H. J. K.; Spener, F.. X-ray studies on triclinic crystals of fatty acid binding protein. FEBS, Vol. 184, No. 2, pp. 185-187, 1985.
  
- Pavero, C.; Bernard, A.; Carlier, H.. Administration modalities and intestinal lymph absorption of arachidonic acid in rats. J. Nutr., Vol. 122, pp. 1672-1681, 1992.
  
- Paulussen, R. J. A.; Jansen, G. P. M.; Veerkamp, J. H.. Fatty acid binding capacity of cytosolic proteins of various rat tissues: effect of post-natal development, starvation, sex, clofibrate feeding and light cycle. Biochim. Biophys. Acta., Vol. 877, pp. 342-349, 1986.
  
- Paulussen, R. J. A.; Geelen, M. J. H.; Beynen, A. C.; Veerkamp, J. H.. Immunochemical quantitation of fatty acid binding proteins. Tissue and intracellular distribution, post natal development and influence of physiological conditions on rat heart and liver FABP. Biochim. Biophys. Acta, Vol. 1001, pp. 201-209, 1989.
  
- Paulussen, R. J. A.; Van Moerkerk, H. T. B.; Veerkamp, J. H.. Immunochemical quantitation of fatty acid binding proteins. Tissue distribution of liver and heart FABP types in human and porcine tissues. Int. J. Biochem., Vol. 22, No. 4, pp. 393-398, 1990.

- Peeters, R. A.; Moel, M. P.; Van Moerkerk, H. T. B.; Veerkamp, J. H. . The binding affinity of fatty acid binding proteins from human, pig and rat liver for different fluorescent fatty acid and other ligands. *Int. J. Biochem.*, Vol. 21, No. 4, pp. 407-418, 1989a.

- Peeters, R. A.; Veerkamp, J. H. . The fatty acid binding protein from human skeletal muscle. *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 274, No. 2, pp. 556-563, 1989b.

- Peeters, R. A.; Veerkamp, J. H. . Does fatty acid binding protein play a role in fatty acid transport?. *Mol. Cell. Biochem.*, Vol. 88, pp. 45-49, 1989c.

- Poorthuis, B. J. H. M.; Glatz, J. F. C.; Akeroyd, R.; Wirtz, K. W. A. . A new high yield procedure for the purification of the non specific phospholipid transfer protein from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 665, pp. 256-261, 1981.

- Potter, B. J., Sorrentino, D.; Berk, P. D. . Mechanisms of cellular uptake of free fatty acids. *Annu. Rev. Nutr.*, Vol. 9, pp. 253-270, 1989.

- Reinhart, G. A.; Simmen, F. A.; Mahan, D. C.; Simmen, R. C. M.; White, M. E.; Trulzsch, D. V.. Perinatal ontogeny of fatty acid binding protein activity in porcine small intestine. Nutr. Res., Vol. 12, No. 11, pp. 1345-1356, 1992a.

- Reinhart, G. A.; Simmen, F. A.; Mahan, D. C.; White, M. E.; Roehrig, K. L.. Intestinal development and fatty acid binding protein activity of new born pigs fed colostrum or milk. Biol. Neonate, Vol. 62, pp. 155-163, 1992b.

- Richieri, G. V.; Ogata, R. T.; Klienfeld, A. M.. A fluorescently labeled intestinal fatty acid binding protein. J. Biol. Chem., Vol. 267, No. 33, pp. 23495-23501, 1992.

- Ropson, I. J.; Frieden, C.. Dynamic NMR spectral analysis and protein folding: identification of highly populated folding intermediate of rat intestinal fatty acid binding protein by  $^{19}\text{F}$  NMR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 89, pp. 7222-7226, 1992.

- Rosenthal, M. D.. Fatty acid metabolism of isolated mammalian cells. Prog. Lipid. Res., Vol. 26, pp. 87-124, 1987.

- Rustow, B.; Kunze, D.; Hodi, J.; Egger, E.. A fatty acid binding peptide of rat liver cytosol. FEBS, Vol. 108, No. 2, pp. 469-471, 1979.

- Sacchettini, J.C.; Said, B.; Schulz, H.; Gordon, J.I.. Rat heart fatty acid binding protein is highly homologous to the murine adipocyte 422 protein and the P2 protein of peripheral nerve. *J. Biol. Chem.*, Vol. 261, No. 18, pp. 8218-8223, 1986.

- Sacchettini, J.C.; Hauf, S.M.; Van Camp, S.L.; Cistola, D.P.; Gordon, J.I.. Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in the ileal epithelium. *J. Biol. Chem.*, Vol 265, No. 31, pp. 19199-19207, 1990.

- Schoentgen, F.; Pignede, G.; Bonanno, L.M.; Jolles, P.. Fatty acid binding protein from bovine brain. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 185, pp. 35-40, 1989.

- Schulenberg-Schell, H.; Schäfer, P.; Keuper, H.J.K.; Stanilawski, B.; Hoffmann, E.; Ruterjans, H.; Spener, F.. Interactions of fatty acids with neutral fatty acid binding protein from bovine liver. *Eur. J. Biochem.*, Vol. 170, pp. 565-574, 1988.

- Schwarz, S.M.; Hostetler, B.; Ling, S.; Mone, M.; Watkins, J.B.. Intestinal membrane lipid composition and fluidity during development in the rat. *Am. J. Physiol.*, Vol. 248, pp. 200-207, 1985.

- Scow, R. O.; Blanchette-Mackie, E. J.. Why fatty acids flow in cell membranes. *Prog. Lipid. Res.*, Vol. 24, pp. 197-241, 1985.
  
- Shirazi-Beechey, S. P.; Kemp, R. B.; Dyer, J.; Beechey, R. B.. Changes in the function of the intestinal brush border membrane during the development of the ruminant habit in lambs. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 94b, No. 4, pp. 801-806, 1989.
  
- Siegenbeek Van Heukelom, J.. Physiological aspects of absorption and secretion in intestine. *Vet. Res. Commun.*, Vol. 10, pp. 341-354, 1986.
  
- Skillen, A. W.; Rahbani-Nobar, M.. ATPase and alkaline phosphatase activities of chick and rat small intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 571, pp. 86-93, 1979.
  
- Smith, M. W.; Brown, D.. Dual control over microvillus elongation during enterocyte development. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 93a, No. 3, pp. 623-628, 1989.
  
- Smith, S. B.; Ekeren, P. A.; Sanders, J. O.. Fatty acid binding protein activities in bovine muscle, liver and adipose tissue. *J. Nutr.*, Vol. 115, pp. 1535-1539, 1985.

- Sorrentino, D.; Stump, D.; Potter, B. J.; Robinson, R. B.; White, R.; Kiang, C. L.; Berk, P. D.. Oleate uptake by cardiac myocytes is carrier mediated and involves a 40KDa plasma membrane fatty acid binding protein similar to that in liver, adipose tissue and gut. J. Clin. Invest., Vol. 82, pp. 928-935, 1988.
- Spener, F.; Borchers, T.; Mukherjea, M.. On the role of fatty acid binding proteins in fatty acid transport and metabolism. FEBS, Vol. 244, No. 1, pp. 1-5, 1989.
- Storch, J.; Bass, N. M.; Kleinfeld, A. M.. Studies of the fatty acid binding site of rat liver fatty acid binding protein using fluorescent fatty acids. J. Biol. Chem., Vol. 264, No. 15, pp. 8708-8713, 1989.
- Stremmel, W.; Gerber, M. A.; Glezerov, V.; Thung, S. M.; Kochwa, S.; Berk, P. D.. Physicochemical and immunohistological studies of sulfobromophthalein and bilirubin binding protein from rat liver plasma membranes. J. Clin. Invest., Vol. 71, pp. 1796-1805, 1983.
- Stremmel, W.; Lotz, G.; Strohmeyer, G.; Berk, P. O.. Identification, isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillus membranes. J. Clin. Invest., Vol. 75, pp. 1068-1076, 1985.

- Stremmel, W.; Berk, P.D.. Hepatocellular uptake of sulfobromophthalein and bilirubin is selectively inhibited by an antibody to the liver plasma membrane sulfobromophthalein-bilirubin binding protein. *J. Clin. Invest.*, Vol. 78, pp. 822-826, 1986.

- Stremmel, W.. Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by fatty acid binding membrane protein. *J. Clin. Invest.*, Vol. 82, pp. 2001-2010, 1988.

- Stremmel, W.. Mechanism of hepatic fatty acid uptake. *J. Hepatol.*, Vol. 9, pp. 374-382, 1989.

- Stremmel, W.; Hofmann, A.F.. Intestinal absorption of unconjugated dihydroxy bile acids: non mediation by carrier system involved in long chain fatty acid absorption. *Lipids*, Vol. 25, No. 1, pp. 11-16, 1990.

- Sussman, N.L.; Eliakim, R.; Rubin, D.; Perlmutter, H.; DeSchryver-Kecskemeti, K.; Alpers, D.H.. Intestinal alkaline phosphatase is secreted bidirectionally from villous enterocytes. *Am. J. Physiol.*, Vol. 257, pp. 14-23, 1989.

- Suzuki, T.; Hitomo, M.; Ono, T.. Immunohistochemical distribution of hepatic fatty acid binding protein in rat and human alimentary tract. *J. Histochem. Cytochem.*, Vol. 36, No. 4, pp. 349-357, 1988.

- Suzuki, T.; Watanabe, K.; Hirota, M.; Aoyagi, Y.; Ito, S..  
Establishment of a human hepatoblastoma model in athymic nude mice.  
Acta Pathol. Jpn, Vol. 42, pp. 255-261, 1992.
- Sweetser, D. A.; Lowe, J. B.; Gordon, J. I.. The nucleotide sequence of  
rat liver fatty acid binding protein gene. J. Biol. Chem., Vol. 261,  
No. 12, pp. 5553-5561, 1986.
- Sweetser, D. A.; Birkenmeier, E. H.; Klisak, I. J.; Zollman, S.;  
Gordon, J. I.. The human and rodent intestinal fatty acid binding  
protein genes. J. Biol. Chem., Vol. 262, No. 33, 1987.
- Takahashi, K.; Odani, S.; Ono, T.. Isolation and characterization of  
the three fractions ( DEI, DEII and DEIII ) of rat liver Z protein and  
the complete primary structure of DEII. Eur. J. Biochem., Vol. 136,  
pp. 589-601, 1983.
- Takase, S.; Goda, T.. Effects of medium chain triglycerides on brush  
border membrane bound enzyme activity in rat small intestine. J.  
Nutr., Vol. 120, pp. 969-976, 1990.
- Tazuma, S.; Holzbach, T.. Transport of conjugated bilirubin and  
other organic anions in bile: relation to biliary lipid structures.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, pp. 2052-2056, 1987.

- Thomassen, M. S.; Rortveit, T.; Nilsson, A.; Prydz, K.; Christiansen, E. N.. Chain elongation of fatty acid in rat small intestine: subcellular localization and effects of clofibrate and partially hydrogenated fish oil. *Ann. Nutr. Metab.*, Vol. 34, pp. 13-20, 1990.
  
- Thomson, A. B. R.. Intestinal absorption of lipids: influence of the unstirred water layer and bile acid micelle. Disturbances in lipid and lipoprotein metabolism, *Am. Physiol. Soc.*, Chapter 2, 1978.
  
- Thomson, A. B. R.; Keelan, M.; Garg, M. L.; Clandinin, M. T.. Intestinal aspect of lipid absorption: review. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, Vol. 67, pp. 179-191, 1989.
  
- Thurnhofer, H.; Hauser, H.. Uptake cholesterol by small intestinal brush border membrane is protein mediated. *Biochemistry*, Vol. 29, No. 8, pp. 2142-2148, 1990.
  
- Thurnhofer, H.; Hauser, H.. The uptake of phosphatidylcholine by small intestine brush border membrane is protein mediated. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1024, pp. 249-262, 1990.
  
- Tso, P.; Drake, D. H.; Black, D. D.; Sabesin, S. M.. Evidence for separate pathways of chylomicron and very low density protein assembly and transport by rat small intestine. *Am. J. Physiol.*, Vol. 247, pp. 599-610, 1984.

- Veerkamp, J.H.; Glatz, J.. A radiochemical procedure for the assay of fatty acid binding protein. *Analyt. Biochem.*, Vol. 132, pp. 89-95, 1983.
  
- Veerkamp, J.H.; Glatz, J.. Intracellular fatty acid binding protein. *Int. J. Biochem.*, Vol. 17, No. 1, pp. 13-22, 1985.
  
- Veerkamp, J.H.; Demel, R.; Peeters, R.. Are fatty acid binding protein involved in fatty acid transfer?. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1002, pp. 8-13, 1989.
  
- Veerkamp, J.H.; Peeters, R. A.; Maatman, R. G. H. J.. Structural and functional features of different types of cytoplasmic fatty acid binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1081, pp. 1-24, 1991.
  
- Vincent, S.H.; Muller-Eberhard, U.. A protein of the Z class of liver cytosolic proteins in the rat that preferentially binds heme. *J. Biol. Chem.*, Vol. 260, No. 27, pp. 14521-14528, 1985.
  
- Weiser, M.M.; Walters, J.R.F.; Wilson, J.R.. Intestinal cell membranes. *Int. Review Cytol.*, Vol. 101, pp. 1-57, 1986