

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

EFEECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL
Y DE LA L-TRIIODOTIRONINA EN EL
METABOLISMO LIPIDICO

ANA VES LOSADA

TESIS

1989

Fe de erratas.

Los acentos \ corresponden a /.

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas se realizó en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Raúl Omar Peluffo.

a mi Padre, a mi Madre
a Eddie, a Virginia

Mi reconocimiento:

Al Dr. Rodolfo R. Brenner, por haberme tenido confianza y brindado la posibilidad de realizar el presente trabajo de investigación en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata que él dirige.

A la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP) y a la Facultad de Ciencias Médicas por haberme permitido el uso de sus equipos e instalaciones para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por haber brindado el apoyo económico necesario para desarrollar este trabajo a través de sucesivas becas y subsidios.

Mi agradecimiento:

Al Dr. Raul Omar Peluffo por su dirección.

A Laura E. Hernandez por su valiosa colaboración técnica. A la Lic. Susana M. González Rodríguez por el importante apoyo técnico que siempre me brindó. A ellas y al Dr. Omar R. Rimoldi, mis compañeros de laboratorio, por tantas horas compartidas en una atmósfera de franca amistad.

Al Diseñador en Comunicación Visual Daniel Sergnece, por la realización de los gráficos de esta tesis.

Al personal del INIBIOLP y de la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP) quienes de una u otra forma también hicieron posible la ejecución de este trabajo.

A la Dra. Nélide Ferretti por su valioso asesoramiento en el análisis estadístico.

A mi familia y amigos, en quienes siempre encontré cariño, comprensión, estímulo y apoyo.

Los resultados de esta Tesis se encuentran parcialmente publicados en:

- * (1987) Lipids 22: 282.
- * (1987) Lipids 22: 563.
- * (1989) Lipids. Aceptado para su publicación.

ABREVIATURAS

ACTH: hormona adrenocorticotrófica
ADP: adenosina difosfato
AGL: ácido graso libre
AMPe: adenosina-3',5'-monofosfato cíclico
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
ATP: adenosina trifosfato
CoA: coenzima A
DC: dieta control
DH: dieta hiperglucídica
DPH: 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno
EM: esfingomiélinea
FC: fosfatidilcolina
FE: fosfatidiletanolamina
FI: fosfatidilinositol
FS: fosfatidilserina
PD: proteína desacoplante
RIE: Radio Inmuno Ensayo
rs: anisotropía de fluorescencia
TIE: termogénesis independiente de escalofrío
TE: termogénesis por escalofrío
T4: tiroxina
T3: L-triiodotironina
T3r: T3 reversa

INDICE

	Página
INTRODUCCION	
A.- Biosíntesis de ácidos grasos no saturados.	
A.1.- Generalidades.....	1
A.2.- Activación de los ácidos grasos.....	2
A.3.- Elongación de los ácidos grasos.....	2
A.4.- Desaturación oxidativa de los ácidos grasos.....	4
A.4.1.- Δ^9 Desaturasa.....	5
A.4.2.- Δ^6 Desaturasa.....	8
A.4.3.- Δ^5 Desaturasa.....	9
A.4.4.- Δ^4 Desaturasa y otras.....	10
A.5.- Retroconversión de ácidos grasos.....	10
B.- Regulación de la biosíntesis de ácidos grasos no saturados.	
B.1.- Generalidades.....	11
B.2.- Factores nutricionales.....	12
B.3.- Factores hormonales.....	14
B.4.- Edad y sexo.....	16
B.5.- Sustancias de distinta naturaleza química.....	16
B.6.- Factores ambientales.....	17
C.- Objetivos.....	21
CAPITULO 1: EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL EN EL METABOLISMO LIPIDICO.	
1.1.- <u>Introducción</u>	
1.1.1.- Generalidades.....	23
1.1.2.- Aclimatación al frío.....	24
1.1.2.1.- Termogénesis por escalofrío.....	24
1.1.2.2.- Termogénesis independiente de escalofrío.....	27
1.1.3.- Aclimatación al calor.....	29
1.2.- <u>Materiales y Métodos.</u>	
1.2.1.- Animales utilizados.....	30
1.2.2.- Dietas.....	31
1.2.2.1.- Dieta comercial.....	31

1.2.2.2.- Dietas sintéticas.....	31
1.2.3.- Obtención de fracciones subcelulares.	
1.2.3.1.- Fracción microsomal.....	35
1.2.3.2.- Fracción mitocondrial.....	35
1.2.4.- Determinación de proteínas.....	38
1.2.5.- Análisis lipídico.	
1.2.5.1.- Extracción de lípidos.....	39
1.2.5.2.- Separación de lípidos polares.....	39
1.2.5.3.- Cuantificación.	
1.2.5.3.1.- Lípidos totales.....	40
1.2.5.3.2.- Lípidos polares.....	41
1.2.5.4.- Análisis de ácidos grasos.....	41
1.2.6.- Medida de la actividad desaturante.....	44
1.2.7.- Medidas de fluorescencia.....	45
1.2.8.- Dosaje de T3 y T4 séricas por Radio Inmuno Ensayo (RIE).....	48
1.2.9.- Análisis estadístico.....	48
1.3.- <u>Experimentos realizados.</u>	
1.3.1.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales en el metabolismo lipídico.....	50
1.3.2.- Efecto del frío ambiental y la restricción alimenticia en el metabo- lismo lipídico.....	50
1.3.3.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales en la actividad enzimática de las Δ6 y Δ5 desaturasas deprimidas por una dieta hiperglucídica.....	51
1.4.- <u>Resultados.</u>	
1.4.1.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales y tiempo de exposición en el metabolismo lipídico.	
1.4.1.1.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales durante 5 días de exposición en la ingesta, grado de crecimiento, conversión de alimentos y peso hepático.....	53
1.4.1.2.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales durante 15 días de exposición en la ingesta, grado de	

	crecimiento, conversión de alimentos y peso hepático.....	53
1.4.1.3.-	Efecto de diferentes temperaturas ambientales durante 5 días de expo- sición en los niveles séricos de T3 y T4.....	55
1.4.1.4.-	Efecto de diferentes temperaturas ambientales en la actividad desatu- rante de microsomas hepáticos.	
1.4.1.4.1.-	Δ 9 Desaturasa.....	57
1.4.1.4.2.-	Δ 6 Desaturasa.....	57
1.4.1.4.3.-	Δ 5 desaturasa.....	60
1.4.1.5.-	Efecto de diferentes temperaturas ambientales en la composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas hepáticos.....	60
1.4.1.6.-	Efecto de diferentes temperaturas ambientales durante 5 días de exposición en la composición fosfo- lipídica de fracciones subcelulares hepáticas.	
1.4.1.6.1.-	Fracción microsomal.....	64
1.4.1.6.2.-	Fracción mitocondrial.....	64
1.4.1.7.-	Efecto de diferentes temperaturas ambientales durante 5 días de expo- sición en la anisotropia de fluores- cencia microsomal.....	66
1.4.2.-	Efecto de la ingesta en el metabolismo lipídico en el frío.....	66
1.4.2.1.-	Efecto de la restricción alimenticia y el frío en la ingesta, grado de crecimiento, conversión de alimentos y peso hepático.....	69
1.4.2.2.-	Efecto de la ingesta y el frío en la actividad desaturante microsomal.....	71
1.4.2.2.1.-	Δ 9 Desaturasa.....	71
1.4.2.2.2.-	Δ 6 Desaturasa.....	72
1.4.2.2.3.-	Δ 5 Desaturasa.....	72
1.4.2.3.-	Efecto de la ingesta y el frío en la composición de ácidos grasos hepáticos.	
1.4.2.3.1.-	Composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas y mitocondrias.....	75
1.4.2.3.2.-	Composición de ácidos grasos de las fracciones fosfolipídicas mayoritarias de microsomas.....	79
1.4.3.-	Efecto de diferentes temperaturas ambientales en la actividad enzimática de las Δ6 y Δ5 desaturasas deprimidas	

por una dieta hiperglucídica.....	84
1.4.3.1.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales en la ingesta, grado de crecimiento, conversi3n de alimentos y peso hepático de ratas alimentadas con dieta control (DC) e hiperglucídica (DH).....	84
1.4.3.2.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales en la actividad enzimática de las $\Delta 8$ y $\Delta 5$ desaturasas deprimidas por una dieta hiperglucídica.	
1.4.3.2.1.- $\Delta 6$ Desaturasa.....	86
1.4.3.2.2.- $\Delta 5$ Desaturasa.....	88
1.4.3.3.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales en la composici3n de ácidos grasos de lípidos totales de ratas mantenidas con DC y DH.....	88
1.5.- <u>Discusi3n.</u>	
1.5.1.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales en el metabolismo lipídico.....	92
1.5.2.- Efecto de diferentes temperaturas ambientales en los niveles séricos de las hormonas tiroideas.....	93
1.5.3.- Efecto de la temperatura ambiental en la relaci3n fluidéz de membrana-actividad desaturante.....	95
1.5.4.- Efecto de la temperatura ambiental en la composici3n fosfolipídica mitocondrial.....	96
1.5.5.- Efecto de la temperatura ambiental en la actividad microsomal de hígado de rata macho.	
1.5.5.1.- $\Delta 9$ Desaturasa.....	97
1.5.5.2.- $\Delta 8$ Desaturasa.....	100
1.5.5.3.- $\Delta 5$ Desaturasa.....	101
1.5.6.- Efecto de la temperatura ambiental en la actividad enzimática de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas deprimidas por una dieta hiperglucídica.....	103
1.5.6.1.- $\Delta 6$ Desaturasa.....	104
1.5.6.2.- $\Delta 5$ Desaturasa.....	105

CAPITULO 2: EFECTO DE LA L-TRIODOTIRONINA
EN EL METABOLISMO LIPIDICO.

2.1.- <u>Introducción.</u>	
2.1.1.- Generalidades.....	107
2.1.2.- Mecanismo de acción de las hormonas tiróideas.....	108
2.1.3.- Efecto termogénico de las hormonas tiróideas.....	110
2.1.4.- Efecto de las hormonas tiróideas en el metabolismo lipídico.....	111
2.2.- <u>Experimentos realizados.</u>	
2.2.1.- Efecto de la L-triiodotironina (T3) en la actividad desaturante y composición de ácidos grasos microsomaes hepáticos.....	114
2.2.2.- Efecto de la T3 en la actividad de la Δ 9 desaturasa en el tiempo.....	115
2.2.3.- Estudio del compromiso de la síntesis proteica en el efecto de T3 en la actividad de la Δ 9 desaturasa y la composición de ácidos grasos microsomaes hepáticos.....	115
2.2.4.- Efecto de la cicloheximida en la actividad de la Δ 9 desaturasa 8 horas después de haberse administrado T3.....	116
2.3.- <u>Resultados.</u>	
2.3.1.- Efecto de la T3 en la actividad desaturante, composición de ácidos grasos y anisotropía de fluorescencia de microsomas hepáticos.	
2.3.1.1.- Actividad desaturante.....	118
2.3.1.2.- Composición de ácidos grasos.....	118
2.3.1.3.- Anisotropía de fluorescencia.....	121
2.3.2.- Efecto de la T3 en la actividad de la Δ 9 desaturasa en el tiempo.....	122
2.3.3.- Compromiso de la síntesis proteica en el efecto de la T3 en la actividad de la Δ 9 desaturasa y en la composición de ácidos grasos de microsomas hepáticos.	
2.3.3.1.- Δ 9 Desaturasa.....	126
2.3.3.2.- Composición de ácidos grasos.....	128

2.3.4.- Efecto de la cicloheximida en la actividad de la Δ^9 desaturasa 8 horas después de haberse administrado T3.....	129
2.4.- <u>Discusión.</u>	
2.4.1.- Efecto de la T3 en la actividad desaturante.	
2.4.1.1.- Δ^9 Desaturasa.....	132
2.4.1.2.- Δ^6 y Δ^5 Desaturasas.....	136
2.4.2.- Efecto de la T3 en la composición de ácidos grasos de microsomas hepáticos.....	138
CONCLUSIONES.....	142
BIBLIOGRAFIA.....	148

INTRODUCCION

A.- BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS NO SATURADOS.

A.1.- GENERALIDADES.

Existe una gran variedad de ácidos grasos no saturados naturales que se diferencian entre sí por el número y posición de las dobles ligaduras y por la longitud de la cadena. A pesar de esta diversidad, sólo se han encontrado dos mecanismos generales para la introducción de dobles ligaduras: uno anaeróbico y el otro aeróbico. El mecanismo anaeróbico es el que poseen ciertos Eubacteriales (1,2,3). El aeróbico es el más evolucionado, se encuentra en vegetales superiores (4,5) y animales (6,7) y posee varias variantes. En las plantas, la nueva doble ligadura se introduce entre una preexistente y el metilo terminal, mientras que en los animales se forma entre el carboxilo terminal y la doble ligadura preexistente.

En los mamíferos, la síntesis de ácidos grasos no saturados se realiza en el retículo endoplásmico por transformación de los ácidos precursores tioesterificados con CoA. En este proceso se alternan dos reacciones: la desaturación que introduce dobles ligaduras y la elongación que alarga la molécula por el agregado de dos unidades de carbono a partir de malonil-CoA.

Los ácidos grasos precursores son: el palmitoleico (16:1), oleico (18:1), linoleico (18:2 n-6) y α -linolénico (18:3 n-3), que determinan la formación de cuatro familias o series de ácidos grasos no saturados independientes y no interconvertibles (Fig.

I.1) (8-13). Por otro lado, las moléculas de una misma serie se caracterizan por poseer una ubicación constante de la doble ligadura más cercana al metilo terminal del ácido o posición n. Así la familia del palmitoleico es n-7, la del oleico n-9, la del linoleico n-6 y la del α -linolénico n-3. Los ácidos linoleico y α -linolénico son esenciales para los animales debido a que éstos no los pueden sintetizar, y por lo tanto, deben ser aportados por la dieta. Mientras que a los ácidos 16:1 y 18:1 los pueden sintetizar "de novo".

A.2.- ACTIVACION DE LOS ACIDOS GRASOS.

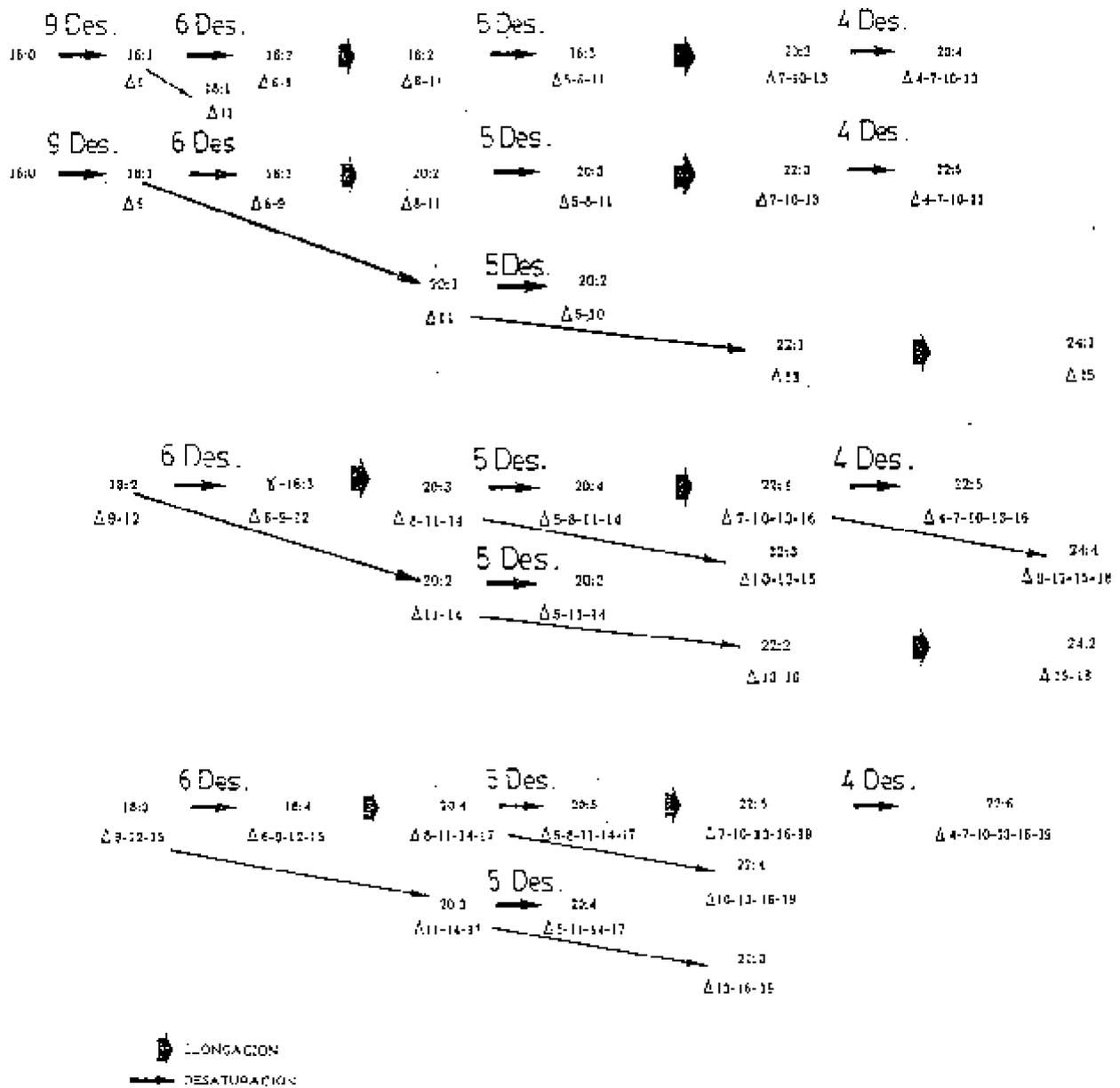
La biosíntesis de ácidos grasos no saturados no se produce sobre el ácido libre, sino sobre el correspondiente ácido activado al unirse mediante un enlace tioéster a la CoA. La síntesis de los acil-CoA es catalizada por la acil-CoA sintetasa y se produce fundamentalmente en la fracción microsomal. La reacción requiere, además de CoA libre, ATP y Mg^{++} (14-20).

La reacción de activación de los ácidos grasos no es considerada una etapa limitante en la síntesis de ácidos grasos no saturados en el hígado, ya que la velocidad de la misma es mucho mayor (21) que la correspondiente a las reacciones de desaturación (22) y de elongación (12).

A.3.- ELONGACION DE LOS ACIDOS GRASOS.

Figura I.1.

Principales rutas metabólicas en la biosíntesis de ácidos grasos no saturados en los animales.



La elongación de ácidos grasos puede desarrollarse en mitocondrias y en microsomas (23). En ambos casos la cadena se alarga por el agregado de dos unidades de carbono, a partir de acetil-CoA en mitocondrias y de malonil-CoA en microsomas.

En las mitocondrias la elongación se produce por condensación del acil-CoA correspondiente con acetil-CoA, y por la inversión de la β -oxidación, a excepción de la reducción de enoil-CoA en la que participa una enzima diferente: la enoil-CoA reductasa.

En la fracción microsomal la elongación comienza con una condensación del acil-CoA no saturado con malonil-CoA y se libera dióxido de carbono. Luego, el cetoacil-CoA formado es hidrogenado por una hidrogenasa a hidroxiacil-CoA, posteriormente deshidratado a enoil-CoA y finalmente reducido por la enoil-CoA reductasa al homólogo superior del ácido graso original (23,24). La reacción limitante en el proceso de elongación es la de condensación (25,26).

Los microsomas poseen más de un sistema elongante (27-30). Estos se diferenciarían entre sí en la enzima condensante, mientras que el resto del sistema elongante sería el mismo (31). Hasta el momento se han encontrado tres enzimas condensantes diferentes en microsomas hepáticos, una para acil-CoAs saturados, otra para acil-CoAs monosaturados y una tercera para acil-CoAs polinosaturados (32).

A.4.- DESATURACION OXIDATIVA DE LOS ACIDOS GRASOS.

Se ha estudiado el sistema enzimático que cataliza la desaturación oxidativa de ácidos grasos en un gran número de organismos que va desde, microorganismos (como el *Bacillus megaterium* (33)), *Candida lipolitica* (34,35) y *Tetrahymena* (36-38), a plantas superiores (39-40) y a animales (fundamentalmente en ratas).

En los animales, las enzimas que catalizan la desaturación de los ácidos grasos bajo la forma de tioésteres de acil-CoA, se encuentran en el retículo endoplásmico y son las Δ^9 , Δ^6 , Δ^5 y Δ^4 desaturasas que introducen una doble ligadura con configuración cis en las posiciones 9-10, 6-7, 5-6 y 4-5 respectivamente.

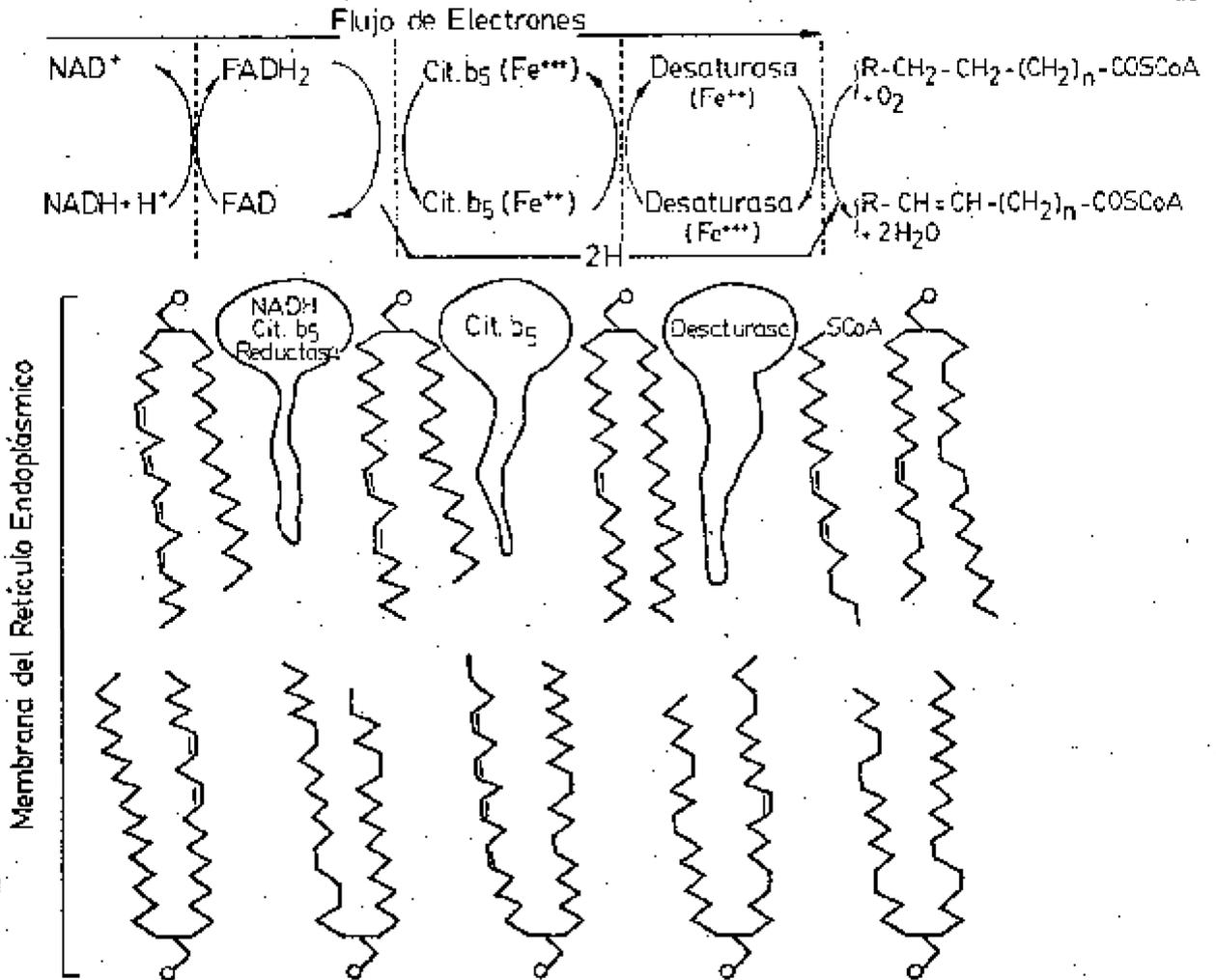
Las desaturasas son el último componente del sistema de transporte electrónico del retículo endoplásmico, y utilizan NADH citoplasmático y oxígeno molecular (41-43). Controlan además, la síntesis de ácidos grasos no saturados, ya que el flujo electrónico suministrado a las desaturasas es mucho mayor que el que estas enzimas requieren (44) (Fig. I.2).

Los tres tipos de enzimas que intervienen en esta secuencia, la NADH citocromo b5 reductasa (flavoproteína), el citocromo b5 y las desaturasas, son enzimas anfipáticas que poseen el dominio catalítico (hidrofilico) orientado hacia el lado citoplasmático del organoide, mientras que la porción hidrofóbica de la enzima intervendría en el anclaje de la misma a la membrana (45-48).

A.4.1.- Δ^9 DESATURASA.

Figura 1.2.

Esquema del sistema desaturante de ácidos grasos de mamíferos.



La desaturasa que se ha estudiado en forma más completa es la Δ^9 desaturasa de hígado de rata. Esta enzima es una proteína integral de la membrana del retículo endoplásmico de los animales, y representa el 0,7-0,8 % de la proteína total del organoide. Es además, una holoenzima formada por un átomo de hierro (no hémico) por molécula, y por un único polipéptido que posee un alto contenido de residuos hidrofóbicos (62 %) y un peso molecular de 53.000 daltons (46).

La estructura primaria de la desaturasa (49) es similar a la de una de las formas del citocromo P 450 (50). Ambas proteínas integrales contienen varios segmentos polares ricos en cargas catiónicas, que están interrumpidos por secuencias no polares. Estos segmentos no polares deben introducirse en la región hidrocarbonada de la bicapa lipídica, y así orientar hacia la fase acuosa a las asas polares (51).

La Δ^9 desaturasa, al igual que el citocromo b₅, son sintetizados en los ribosomas citoplasmáticos, y luego son incorporados postraduccionalmente en el retículo endoplásmico y se les une, ya sea el hierro o el grupo hemo respectivamente, para formar las holoenzimas activas (51-53).

Los sustratos más importantes de la Δ^9 desaturasa son los ácidos palmítico y esteárico (54,55). Los respectivos productos de estos sustratos, los ácidos palmitoleico y oleico, son los precursores de las familias de ácidos grasos polinsaturados n-7 y n-9 respectivamente. Estos ácidos grasos sólo son desaturados

cuando se encuentran como tioésteres de CoA, y no en el caso de estar esterificados formando fosfolípidos (56,57). De todas formas, se ha demostrado que también son desaturados por la Δ^8 desaturasa ácidos grasos monoenoicos de diferente longitud de cadena con una doble ligadura en posición cis o trans (58-60). También hay evidencias que sugieren que se necesitan proteínas citosólicas para que la actividad enzimática sea máxima (61).

A.4.2.- Δ^6 DESATURASA.

La Δ^6 desaturasa es la primera enzima que interviene en la síntesis de ácidos grasos de las cuatro familias de ácidos grasos polinosaturados (Fig. I.1) y es la etapa limitante en estas cuatro secuencias de reacciones (11,12).

Esta desaturasa está constituida por un único polipéptido cuyo peso molecular es de 66.000 daltons, y por un átomo de hierro no hémico por molécula de enzima. Al igual que las restantes desaturases, es una proteína integral del retículo endoplásmico y constituye el 0,16 % de la proteína total del organelo (45).

Los principales sustratos de esta enzima son los tioésteres de los ácidos grasos esenciales linoleil-CoA y α -linolenil-CoA (9,10), aunque también puede desaturar a ácidos grasos esterificados formando fosfolípidos (56). A pesar de esto, la Δ^6 desaturasa también actúa sobre varios ácidos grasos monoenoicos de configuración trans (58) y sobre ácidos grasos saturados

(58,62,63).

La actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa, al igual que la de la $\Delta 9$, es modificada por proteínas citosólicas (61,64,65).

A.4.3.- $\Delta 5$ DESATURASA.

En la rata, la ruta principal para la biosíntesis de ácido araquidónico y ácidos polienóicos de las series n-6 y n-3, comienza con una desaturación en posición 6-7 seguida por una elongación a ácidos de 20 átomos de carbono y, finalmente, una nueva desaturación a cargo de la $\Delta 5$ desaturasa (Fig. I.1).

La $\Delta 5$ desaturasa es una enzima microsomal muy activa (12,66,67), que desatura ácidos eicosatrienoicos en los correspondientes análogos de araquidonilo, ya sea que éstos se encuentren como derivados de CoA o como eicosatrienoil fosfolípidos (56). Esta desaturasa actúa, además, sobre un cierto número de ácidos grasos que poseen la primera doble ligadura en posición 11 (68-72) y sobre ácidos monoenoicos de configuración cis y trans (58,59,73).

La importancia de esta enzima se debe a que interviene en la biosíntesis de los ácidos 5,8,11-eicosatrienoico, araquidónico y 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, que son los precursores de los eicosanos. Los eicosanos son una serie de ácidos de 20 átomos de carbono conocidos como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos, que poseen una relevante función

fisiològica (74-77).

A.4.4.- Δ^4 DESATURASA Y OTRAS.

La Δ^4 desaturasa es una de las desaturasas sobre la que se tiene, hasta el momento, menor informaciòn. Interviene en la biosíntesis de los ácidos 22:5 n-6 y 22:6 n-3 a partir de los correspondientes sustratos, los ácidos 22:4 n-5 y 22:5 n-3, respectivamente (12,78) (Fig. I.1). El ácido 22:5 n-6 es un componente importante en los testículos, mientras que el 22:6 n-3 lo es en el cerebro (79).

La Δ^8 desaturasa, sobre la que se tiene menos informaciòn aún, estaría presente en testículos (71,80), en el intestino y la vejiga (81).

A.5.- RETROCONVERSION DE ACIDOS GRASOS.

En los tejidos animales, los ácidos polietilénicos 22:5 n-6 y 22:6 n-3, que son los últimos miembros de las familias del linoleico y el α -linolénico (Fig. I.1), son retroconvertidos en los ácidos araquidónico y 20:5 n-3 respectivamente. Este proceso se lleva a cabo en los peroxisomas por un mecanismo de β -oxidaciòn (82,83).

El mecanismo de retroconversiòn sería una de las causas que impide una acumulaciòn importante de los ácidos polietilénicos de 22 carbonos en la mayoría de los tejidos.

B.- REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE ACIDOS GRASOS NO SATURADOS.

B.1.- GENERALIDADES.

La biosíntesis de los ácidos grasos no saturados es modificada por diversos factores. Estos actuarían en forma directa y / o indirecta activando o desactivando las desaturasas o modificando la cantidad de enzima presente. De todas formas, hasta el momento, no podemos explicar detalladamente el intrincado mecanismo de regulación de la biosíntesis de ácidos grasos no saturados a nivel molecular.

Como ya se mencionara, la regulación de la biosíntesis hepática de ácidos grasos no saturados en los animales se produce fundamentalmente a nivel de las desaturasas, ya que, tanto la reacción de activación de los ácidos grasos como la de elongación y las del sistema de transporte electrónico microsomal, son generalmente mucho más rápidas que las de desaturación (Fig. I.2) (12,21,22,44).

Los factores que afectan la biosíntesis de los ácidos grasos no saturados incluyen: la edad y sexo de los animales, características nutricionales y ambientales a las que son sometidos, propiedades fisicoquímicas de las membranas del retículo endoplásmico (donde se encuentran las desaturasas) y hormonas. Cabe señalar que si bien en esta clasificación los

distintos factores enumerados no son totalmente independientes entre si, la misma sirve para ordenar la informaci3n.

B.2.- FACTORES NUTRICIONALES.

La actividad enzimática de las desaturasas es muy sensible a la dieta, ya que cuando se modifica en forma cuali o cuantitativamente alguno de los componentes de la misma, la actividad desaturante se altera indefectiblemente.

El ayuno provoca una disminuci3n en la actividad enzimática de las $\Delta 6$ (54,66,84-86) y $\Delta 8$ desaturasas (54,66,84,87) y un aumento en la $\Delta 5$ desaturasa (88). Esta disminuci3n en la actividad enzimática de la $\Delta 8$ desaturasa se revierte al realimentar los animales con dietas libres de lipidos por inducci3n de la desaturasa (53,87).

Las dietas ricas en ácidos grasos saturados aumentan la actividad enzimática de la $\Delta 8$ desaturasa (89) y disminuyen la de la $\Delta 6$ (90), mientras que las dietas con un alto contenido en ácidos grasos no saturados provocan los efectos contrarios en dichas actividades enzimáticas (89,91). Por otro lado la actividad $\Delta 5$ desaturasa aumenta en las ratas con dietas ricas en ácidos grasos saturados (90).

Cuando una dieta posee cantidades adecuadas de los ácidos grasos esenciales, la síntesis del ácido graso eicosatrienoico n-9 está bloqueada, ya que los ácidos grasos de las series n-6 y n-3 inhiben la desaturaci3n del ácido oleico por la $\Delta 6$

desaturasa (91). Pero cuando se alimenta a los animales con dietas deficientes en los ácidos grasos esenciales, la inhibición es eliminada y la actividad enzimática de las $\Delta 9$ (54,88,90,92,93), $\Delta 6$ (54,66,84,93,94) y $\Delta 4$ desaturasas (94) aumenta y la de la $\Delta 5$ desaturasa disminuye (13,95). Estas variaciones en la actividad desaturante determinan que bajo estas condiciones nutricionales aumente el contenido de los ácidos oleico e eicosatrienoico n-9 y disminuya el de linoleico y araquidónico (92,96).

La proporción de proteína de la dieta es un factor que modifica la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa (89). Una dieta hiperproteica aumenta la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa, cuando el contenido de proteínas de la misma es superior al 35 % (87). En este proceso estaría involucrada la síntesis proteica (98). Por otro lado, cuando se alimentan ratas recién destetadas con una dieta hipoproteica, la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa disminuye (99).

Las dietas hiperglucídicas, al igual que otras dietas lipogénicas, aumentan la actividad enzimática de la $\Delta 9$ desaturasa y disminuyen la de la $\Delta 6$ desaturasa (89,90,98).

Si se alimenta a las ratas con dietas que poseen colesterol en exceso, se modifica, entre otros parámetros, la actividad desaturante y la composición lipídica microsomal hepática. Se observa un aumento en la actividad enzimática de la $\Delta 9$ desaturasa y una disminución en la de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas (100,101). Si luego se reemplaza esta dieta por una que no posee

colesterol, se invierten las variaciones observadas en la actividad desaturante (102).

La actividad desaturante no sólo se modifica como consecuencia de variaciones cuali y cuantitativas de los lípidos, hidratos de carbono y proteínas de la dieta, sino también cuando se modifican las vitaminas y minerales de la misma. Un exceso de vitamina A en la dieta provoca una disminución en la actividad enzimática de la Δ^8 desaturasa (103), mientras que se observa el efecto contrario cuando la dieta es deficiente en dicha vitamina (104). Por otro lado, la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa no se modifica por exceso o defecto de vitamina A en la dieta (103,104).

El Zn, Cu, Fe y Na de la dieta también modifican la actividad desaturante (105-108).

B.3.- FACTORES HORMONALES.

En la rata diabética se observa una disminución en la actividad enzimática de las Δ^9 (109-113), Δ^6 (98,109,111,113,114) y Δ^5 desaturasas (115), que es revertida por la administración de insulina. La Δ^9 desaturasa ha sido la más estudiada, y se ha sugerido que la síntesis proteica sería necesaria para que la actividad de esta desaturasa aumente en ratas diabéticas tratadas con insulina (110). Por otro lado, teniendo en cuenta que en las ratas diabéticas alimentadas con fructosa o glicerol la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa

no está inhibida (116,117), y que además estos dos carbohidratos, a diferencia de la glucosa, pueden ser metabolizados por la rata diabética (118), se ha propuesto que intermediarios de la vía glicolítica tendrían un papel importante en la inducción de la actividad de la Δ^9 desaturasa.

La actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa no es afectada por la administración de glucagón (119), ni de adrenalina (120). Por el contrario, ambas hormonas deprimen la actividad enzimática de las Δ^6 y Δ^5 desaturasas (119,121-124) y en el hígado este efecto estaría mediado por el AMPc (123), vía un mecanismo β -adrenérgico (125). La ACTH también inhibe la actividad enzimática de las Δ^6 y Δ^5 desaturasas (126).

Los glucocorticoides naturales (hidrocortisona) y los sintéticos (dexametasona), aumentan la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa (127,128) e inhiben la de las Δ^6 y Δ^5 desaturasas (129,130).

Estas variaciones en la actividad desaturante provocadas por los glucocorticoides se producirían a través de un "factor citosólico proteico", cuya síntesis estaría estimulada por la hormona (130,131).

El nivel de las hormonas tiroideas tiene un marcado efecto sobre la actividad desaturante. En las ratas tiroidectomizadas se observa una disminución en la actividad enzimática de las Δ^9 y Δ^6 desaturasas (132). Por otro lado, las ratas tratadas con hormonas tiroideas presentan un aumento en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa y una disminución en la de

la $\Delta 6$ desaturasa (133-135). Cabe señalar, que en todos estos estudios las hormonas tiroideas fueron administradas por varios días y hasta semanas, antes que se pudieran observar cambios en la actividad desaturante.

B.4.- EDAD Y SEXO.

La edad de los animales tiene una importancia relevante sobre la actividad desaturante. La misma es más dramática en los primeros estadios del desarrollo donde la actividad de las $\Delta 9$, $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas presentan marcadas inducciones enzimáticas con el crecimiento (136-138).

Se han observado, además, diferencias en la actividad desaturante entre hembras y machos de animales sometidos a diferentes tratamientos. En general, las hembras han presentado una mayor actividad enzimática en las $\Delta 9$, $\Delta 6$, $\Delta 5$ y $\Delta 4$ desaturasas que las ratas macho (139,140).

B.5.- SUSTANCIAS DE DISTINTA NATURALEZA QUIMICA.

La actividad enzimática de las $\Delta 9$, $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas son inhibidas por el KCN (141,142). La actividad enzimática de la 5 desaturasa también es inhibida por la azida sódica y por la o-fenantrolina (143).

También se ha observado que sustancias que aumentan la proliferación peroxisomal, como el ácido clofibrico y el

triadenol, aumentan la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa (144).

B.6.- FACTORES AMBIENTALES.

Variaciones en la temperatura ambiental determinan modificaciones en la composición lipídica de distintos tipos de organismos procarióticos al igual que de eucarióticos, tendientes a mantener los lípidos de la membrana en un estado físico adecuado (líquido cristalino). El proceso de "adaptación homeoviscosa" mantiene la temperatura de transición de fase por debajo de la de crecimiento y al mismo tiempo cercana a la misma, evitando así los efectos perniciosos de una heterogeneidad de fases lipídicas y de lípidos hiperfluidos en las membranas (145).

Tanto en bacterias (146,147), como en levaduras (148), hongos (149,150), protozoarios (151), plantas superiores (152) y animales poiquiloterms (22), este mecanismo de adaptación a temperaturas de crecimiento menores a las de su normal desarrollo, determina un aumento en la proporción de ácidos grasos no saturados de los lípidos de las membranas. Se establece así una relación inversa entre el grado de insaturación de la membrana y la temperatura de aclimatación.

Uno de los factores más importantes que afectan la fluidez de la membrana lipídica en los eucariotes y procariotes es precisamente el grado de insaturación de las cadenas de ácidos grasos. También son factores relevantes a tener en cuenta, el

colesterol en los animales, y en los procariotas la longitud de la cadena de los ácidos grasos y la presencia de ramificaciones en los mismos.

Si bien hasta el momento las bases metabólicas que determinan el aumento en la insaturación no están totalmente elucidadas, hay suficiente evidencia de que los organismos adaptados al frío poseen una mayor producción de ácidos grasos normales. Esto ha sido demostrado en distintos tipos de organismos. En *Escherichia coli* la producción de ácido oleico respecto a palmítico producidos por el complejo de la ácido graso sintetasa aumenta en los cultivos a 10 C respecto a los que se encuentran a 40 C (153). Cuando se transfiere un cultivo de *Bacillus megaterium* de 35 a 20 C, se produce una hiperinducción en la síntesis de la Δ^5 desaturasa (154). En *Tetrahymena* la actividad de la Δ^9 desaturasa también aumenta cuando se transfieren los cultivos de 40 a 15 C (151). Este aumento en la actividad desaturante sería consecuencia de: una inducción en la síntesis de la desaturasa y una activación de moléculas preexistentes de la enzima (155). En el pez *Pimelodus maculatus* se observa un aumento en la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa cuando la temperatura del acuario se disminuye de 30 a 15 C. Este aumento sería producido por una inducción enzimática (22).

En conclusión, en microorganismos y en animales poiquilotermos, la disminución de la temperatura de crecimiento provoca una disminución en la fluidez de las membranas. Esta

disminución sería contrarrestada por una inmediata activación del sistema desaturante tendiente a restaurar un estado físico adecuado en la membrana. De todas formas, este no sería el único mecanismo que explica la relación inversa que existe entre el grado de insaturación de los ácidos grasos de la membrana con la temperatura de crecimiento. Actualmente hay suficiente evidencia sobre la existencia de un control genético en la síntesis de las desaturasas. Este último sería un mecanismo que actuaría en la respuesta a largo plazo.

El efecto de la temperatura ambiental en las propiedades físicas de las membranas de animales homeotermos no es tan obvio como en el caso de microorganismos y animales poiquilotermos. Los animales homeotermos poseen un mecanismo complejo, en el que interviene el sistema nervioso y el endocrino, que mantiene la temperatura corporal constante sobre un amplio rango de diferentes temperaturas ambientales.

En estudios previos hechos en nuestro laboratorio (139), en los que ratas hembra adaptadas a vivir a 31 C durante 23 días eran transferidas posteriormente al frío (14 C) durante diferentes periodos de tiempo, se observó una disminución en la actividad de la Δ^9 desaturasa luego de 24 h de exposición al frío, mientras que la actividad de la Δ^6 desaturasa aumentó en ese mismo periodo de tiempo. Posteriormente se demostró que los niveles séricos de estradiol estarían implicados en esta respuesta de la Δ^6 desaturasa al frío (156). Por otro lado, ratas macho adaptadas a las mismas condiciones no presentaron

variaciones significativas en la actividad enzimática de las $\Delta 6$ y $\Delta 9$ desaturasas por efecto del frío.

C.- OBJETIVOS.

Como ya se mencionara en la Introducción, existe una estrecha interrelación entre la temperatura de crecimiento de microorganismos y de animales poiquiloterms y sus respectivos metabolismos lipidicos. Más específicamente con las propiedades fisicoquímicas de sus membranas y el metabolismo de los ácidos grasos no saturados. En el caso de los animales homeotermos, la información existente en relación al metabolismo de los ácidos grasos no saturados de animales expuestos a diferentes temperaturas ambientales se restringe casi exclusivamente a la aportada por los trabajos previos hechos en nuestro laboratorio.

Por otro lado, teniendo en cuenta el activo rol de las hormonas tiroideas en el proceso de termogénesis de animales homeotermos y la escasa información sobre los efectos regulatorios de estas hormonas en la actividad desaturante, nos planteamos los siguientes objetivos generales para la realización de este trabajo:

- a) Profundizar el estudio del efecto de la temperatura ambiental en el metabolismo lipidico de animales homeotermos.

- b) Estudiar el efecto de la L-triiodotironina (T3) en la actividad desaturante de animales homeotermos.

A partir de estos objetivos, el trabajo desarrollado se

presenta en dos capítulos de la siguiente forma:

1. En el Capítulo 1 se detallan los experimentos destinados a profundizar nuestro conocimiento sobre el efecto de la temperatura ambiental en la actividad desaturante microsomal hepática de rata. En los mismos se estudió, además, la interrelación entre la composición lipídica, la composición de ácidos grasos, las propiedades fisicoquímicas de los microsomas y el efecto de dietas de diferente composición, con la actividad de las desaturasas de animales expuestos a diferentes temperaturas ambientales.
2. En el Capítulo 2 se describen las investigaciones realizadas con el fin de estudiar el efecto de la T3 en la actividad de la Δ^9 desaturasa en el tiempo y los posibles mecanismos involucrados en esta respuesta enzimática, como así también el efecto de esta hormona tiroidea en la actividad de las Δ^6 y Δ^5 desaturasas, la composición lipídica y las propiedades fisicoquímicas de los microsomas hepáticos.

CAPITULO 1

EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL EN EL METABOLISMO LIPIDICO

1.1.- INTRODUCCION.

1.1.1.- GENERALIDADES.

El hombre y otros animales homeotermos (mamíferos y aves) son capaces de mantener su temperatura interna prácticamente constante cuando se los expone a una amplia gama de condiciones climáticas. Esta regulación térmica en animales de sangre caliente es crítica dada la dependencia de las velocidades de las reacciones enzimáticas con la temperatura.

Los animales homeotermos hibernantes poseen variaciones de temperatura estacionales muy marcadas; sin embargo, ellos también controlan su temperatura durante la hibernación dentro de un rango de hasta 35 C, manteniéndola unos pocos grados por encima del ambiente para retardar la actividad celular y conservar energía.

Entre los dos extremos, el hombre y los animales hibernantes, se hallan muchas otras especies homeotermas que poseen fluctuaciones diarias y estacionales de su temperatura corporal, pero todas poseen la capacidad de controlarla independientemente del ambiente exterior, pudiendo mantener así una temperatura celular óptima necesaria para cumplir con sus demandas metabólicas (157).

Estos procesos de aclimatación requieren de un equilibrio entre la producción y la pérdida del calor.

Así, cuando un homeotermo es expuesto al frío disminuirá las

pérdidas de calor y aumentará su producción; mientras que, por el contrario cuando se encuentre en un ambiente caluroso aumentará las pérdidas de calor y disminuirá la producción del mismo.

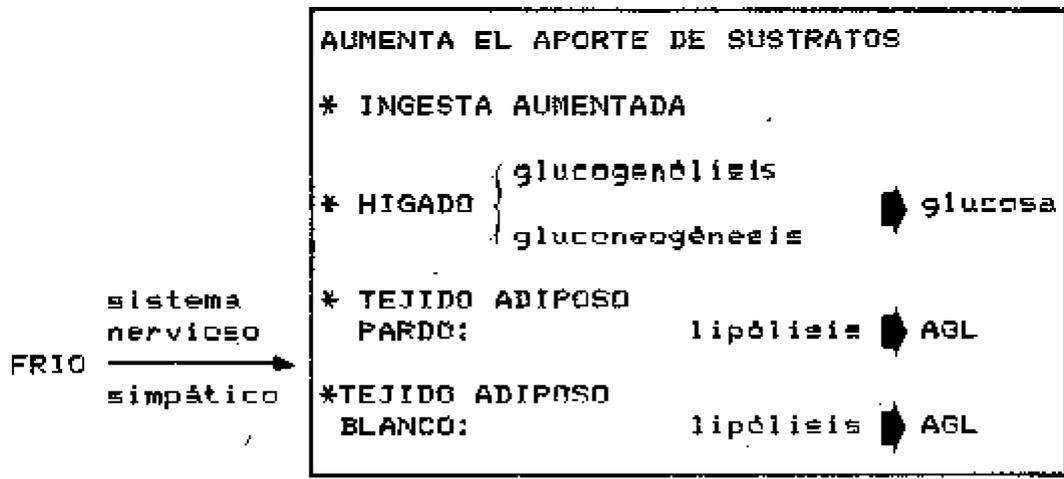
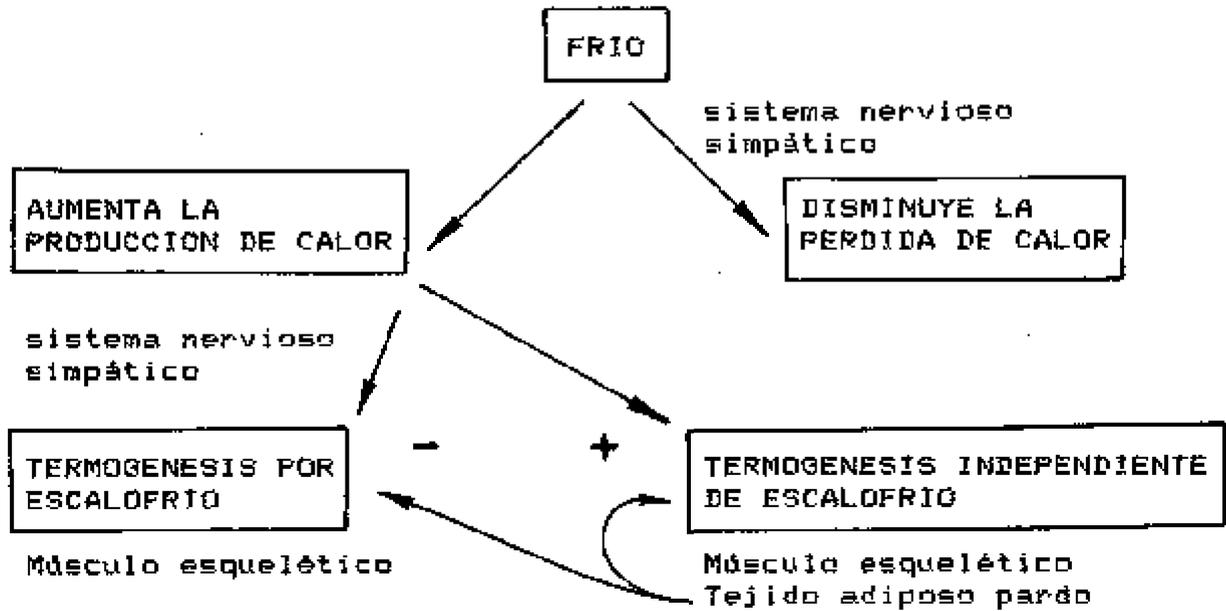
1.1.2.- ACLIMATACION AL FRIO.

Cuando un mamífero es expuesto al frío (temperatura ambiental menor a la que estaba aclimatado), se desencadenan mecanismos regulatorios adicionales a los ya existentes, tendientes a disminuir las pérdidas de calor y a aumentar su producción. Se produce una vasoconstricción cutánea, piloerección o crecimiento de pelo para así aumentar el aislamiento periférico. Al mismo tiempo, hay un aumento en la termogénesis que en un principio será provocada por escalofríos, y luego, cuando el animal se haya adaptado al frío, será reemplazada por termogénesis independiente de escalofrío. Una de las especies que se adapta más rápido al frío, es la rata (158-162) (Fig. 1.1.).

1.1.2.1.- Termogénesis por escalofrío.

El escalofrío involucra el mecanismo normal de contracción muscular, y el efecto de aumentar la producción de calor es similar al del ejercicio (163). El grado de utilización de oxígeno (y de sustratos) por las mitocondrias musculares está normalmente controlado por el aporte de ADP. El escalofrío propiamente dicho está bajo el control del sistema nervioso

Figura 1.1.



central (163,164), mientras que el aporte de sustratos es regulado por el sistema nervioso simpático. Por otro lado, tanto el sistema nervioso simpático como la glándula suprarrenal, son estimulados por el frío para liberar noradrenalina y adrenalina respectivamente (158).

El principal aporte de sustratos, utilizados durante la exposición al frío, proviene de los lípidos. Hay un aumento en la movilización de lípidos como ácidos grasos libres (AGL), debido a una lipólisis acelerada en el tejido adiposo blanco (165-168). La concentración sanguínea de AGL se eleva (165,166,169-172), así como también el "turn-over" de los mismos (173), y disminuyen los triglicéridos en el tejido adiposo blanco (174,175). Los triglicéridos y diglicéridos del músculo esquelético también disminuyen (176) mientras que no se modifican apreciablemente en el hígado (176,177). El cambio más marcado en los lípidos del plasma, además de aumento de los AGL ya mencionado, es una disminución en los triglicéridos de las lipoproteínas de muy baja densidad (178).

Junto con los lípidos, la glucosa es otro de los sustratos utilizados durante la exposición al frío para mantener un metabolismo basal elevado. La concentración de glucosa aumenta en sangre (170-172,179), como así también su oxidación y "turn-over" (179). Este aumento en la producción de glucosa como consecuencia de la exposición al frío, se debe a un incremento en la glucogénesis y gluconeogénesis hepática (180,181). El catabolismo proteico y de amino ácidos también está aumentado

(181,182).

1.1.2.2.- Termogènesis independiente de escalofrío.

Cuando un animal se transfiere al frío, el aumento en la producción de calor que se produce al principio se debe a la termogènesis por escalofrío (TE). Luego, cuando el animal se ha adaptado al frío, este mecanismo es reemplazado por termogènesis independiente de escalofrío (TIE). La conversión de TE en TIE está controlada por el sistema nervioso simpático a través de la acción calorígenica de las catecolaminas, principalmente en el tejido adiposo pardo (158,183-185) y en el músculo esquelético (158,186,187). También participan en la TIE, aunque en menor proporción, el hígado (188,189), el intestino (159), el corazón y el cerebro (190).

Se necesitan niveles normales de hormonas tiroideas para que se produzca la adaptación al frío (185,191,192), y éstas actúan en forma sinérgica con las catecolaminas (184-186,191-194).

También se requiere de un normal funcionamiento de la corteza suprarrenal para que se mantenga la homeostásis térmica en el frío (160,194).

La gran capacidad del tejido adiposo pardo de aumentar la producción de calor, se debe a que responde al estímulo simpático aumentando la respiración celular desacoplada de la fosforilación del ADP (162,195). Hay, por lo menos, dos elementos necesarios para una respuesta adecuada de este tejido: disponibilidad de

sustrato y un mecanismo para desacoplar la fosforilación.

La activación simpática provoca rápidamente una hidrólisis de los triglicéridos intracelulares del tejido adiposo pardo (196). La lipoproteinlipasa se activa en horas luego de la exposición al frío, proveyendo a los tejidos ácidos grasos de los triglicéridos del plasma (197).

Al igual que en la TE, en la TIE que se desencadena en los animales adaptados al frío, se utiliza a la glucosa como sustrato, además de los AGL. La concentración aumentada de la misma se debe a una elevada gluconeogénesis y glucogenólisis hepática (158). La ingesta de alimentos incrementada que poseen los animales en el frío, también provee de los sustratos necesarios para poder mantener una elevada producción de calor en estas condiciones (158,185).

La disipación de energía como calor proveniente de la oxidación de ácidos grasos depende de una única proteína mitocondrial del tejido adiposo pardo, la termogenina o proteína desacoplante (PD). Esta es una proteína de la membrana interna de las mitocondrias del tejido adiposo pardo, que posee un peso molecular de 32.000 (198). La PD estimula la respiración mitocondrial y desacopla la fosforilación al reducir el gradiente de protones a través de la membrana interna mitocondrial (199). La exposición al frío aumenta la síntesis de la PD (200,201).

Los AGL (182,199,202,203) y los nucleótidos (199,204) controlan el acoplamiento de la fosforilación oxidativa ya que actúan regulando el pasaje de protones a través de las

mitocondrias. Una elevación en el nivel de AGL favorece la reducción del gradiente y en consecuencia estimula la respiración celular. El aumento en la densidad mitocondrial de la PD es la que determina el grado de desacoplamiento en la respiración, que se pueda generar (162,195).

1.1.3.- ACLINATAACION AL CALOR.

El calor ambiental desencadena mecanismos de adaptación en los animales homeotermos, tendientes a mantener constante la temperatura corporal, y a ajustar el equilibrio de líquidos corporales, el metabolismo energético y el comportamiento a los requerimientos necesarios para sobrevivir en las nuevas condiciones ambientales.

Se originan los procesos que aumentan las pérdidas del calor, tales como vasodilatación, transpiración en el hombre y jadeo y salivación en los animales (160,194). Por otro lado, hay una disminución en la producción de calor (194,205,206) y en la lipólisis (207). También se observa una disminución en el grado de crecimiento (206) y en el consumo de alimentos (208). Esta termogénesis e ingesta disminuida podrían ser consecuencia de la menor actividad tiroidea y conversión periférica de T4 (194,209,210) que presentan los animales en el calor. Además, los animales hipotiroideos poseen una mayor tolerancia al calor (184,211).

1.2.- MATERIALES Y METODOS.

1.2.1.- ANIMALES UTILIZADOS.

En los estudios realizados se eligió trabajar con ratas, ya que estos animales se adaptan rápidamente a las distintas condiciones ambientales (158). Por otro lado, los cambios fisiológicos que se producen en los procesos de adaptación, están ampliamente estudiados (158,160-162,194,212).

Con respecto al sexo de los animales, se optó por trabajar con ratas macho y no con hembras, ya que los machos no presentan las variaciones hormonales debidas al ciclo estral que se observa en las hembras, y por lo tanto, no es necesario tener que sincronizar los animales en una misma etapa, como hay que hacer cuando se trabaja con hembras.

Las ratas macho que se utilizaron fueron ratas Wistar de 60-70 días de edad cuyo peso osciló entre 150-250 g. Las mismas fueron provistas por el bioterio de la cátedra de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Médicas (UNLP), o adquiridas en la CONEA. Todos los animales estuvieron alojados en jaulas individuales con la temperatura ambiental controlada a 24 ± 1 C (a menos que se especifique otra temperatura) y sujetos a 12 h de luz y 12 h de oscuridad (siendo media noche el punto medio del periodo de oscuridad). Se determinó diariamente la ingesta y el grado de crecimiento de cada animal.

Los animales se sacrificaron siempre a las 8 a.m. para evitar

variaciones en los datos debidas a ritmos circadianos (213). Luego de decapitar las ratas, se recogió sangre (para luego separar suero), y se extrajo el hígado de donde se obtuvieron las fracciones subcelulares microsomal y mitocondrial. En el suero se dosaron las hormonas tiroideas. A las fracciones subcelulares se les hizo el análisis lipídico y en la fracción microsomal se midió la actividad desaturante.

1.2.2.- DIETAS.

Los animales se alimentaron con dieta comercial estándar o sintéticas y agua de la canilla ad libitum. A menos que se indique de otra forma.

1.2.2.1.- Dieta comercial.

Se utilizó dieta comercial Nutrimiento N 3 para roedores (Escobar, Argentina). La composición, distribución de calorías y composición de ácidos grasos de la misma se describen en las Tablas 1.1, 1.2 y 1.3 respectivamente.

1.2.2.2.- Dietas sintéticas.

Las dietas sintéticas que se prepararon fueron isocalóricas (4,4 cal / g de comida) y contenían cantidades iguales de sales y vitaminas (214). En las mismas, se utilizó caseína, aceite de maíz, glucosa y almidón como fuente de proteína, lípidos e hidratos de carbono respectivamente.

Tabla 1.1.

Composición de la dieta comercial Nutrimiento N 3 para roedores.

	%
Humedad	13,0 máx.
Proteína	20,0 mín.
Grasa	2,0 mín.
Fibra	11,0 máx.
Cenizas	10,0 máx.
Calcio	1,5
Fósforo	0,7

Tabla 1.2.

Distribución de las calorías aportadas por la dieta comercial
Nutrimento N 3 para roedores.

	Cal (%)
Hidratos de carbono	56,7
Proteínas	32,9
Lípidos	10,4

TABLA 1.3.

Composición de ácidos grasos de la dieta comercial Nutrimiento N 3 para roedores.

ACIDO GRASO	% (en peso)
16:0	16,7
16:1	0,8
18:0	4,9
18:1	21,8
18:2 (n-6)	52,4
18:3 (n-3)	4,3

Se utilizaron dos tipos diferentes de dietas sintéticas, la dieta control (DC) y la hiperglucídica (DH). La distribución de las calorías aportadas por los distintos componentes y la composición de ácidos grasos de las mismas se detallan en las Tablas 1.4 y 1.5 respectivamente.

1.2.3.- OBTENCION DE FRACCIONES SUBCELULARES.

1.2.3.1.- Fracción microsomal.

Las ratas se sacrificaron por decapitación e inmediatamente después, se les extrajo el hígado. Estos se homogeneizaron a continuación, en una solución fría (3:1, v/p) que contenía: sacarosa 0,25 M, cloruro de potasio 0,15 M, solución amortiguadora de fosfato de potasio 62 mM (pH=7,4), cloruro de magnesio 5 mM, EDTA 0,01 mM y N-acetil-L-cisteína 1,4 mM. El homogenato se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos en una centrifuga Sorval. El precipitado, formado por núcleos y desechos celulares se descartó y el sobrenadante, luego de ser filtrado a través de gasa, se centrifugó a 100.000 x g durante 60 minutos en una centrifuga Spinco o MSE. El precipitado así obtenido correspondiente a la fracción microsomal se resuspendió en la misma solución homogeneizadora. Todas las etapas se realizaron a 4 C. La fracción microsomal se congeló a -70 C, concentrada a razón de 35-45 mg proteína / ml.

1.2.3.2.- Fracción mitocondrial.

TABLA 1.4.

Distribución de las calorías aportadas por las dietas sintéticas control (DC) e hiperglucídicas (DH).

	Cal (%)	
	Dieta control (DC)	Dieta hiperglucídica (DH)
Hidratos de carbono	55 (100 % almidón)	69 (62% almidón y 38 % glucosa)
Proteínas	20	6
Lípidos	25	25

Tabla 1.5.

Composición de ácidos grasos de las dietas sintéticas.

Acido graso	% (en peso)
14:0	0,1
16:0	12,0
16:1	0,4
18:0	2,9
18:1	33,8
18:2 (n-6)	50,3
18:3 (n-3)	0,5

Luego de extraer el hígado de animales sacrificados por decapitación, se separó una porción de los mismos y se homogeneizó en sacarosa 0,25 M y solución amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM (pH=7,4) (9:1, v/p). La fracción mitocondrial se separó por centrifugación diferencial siguiendo el método de Hogeboom (215). Se centrifugaron 10 ml de homogenato con 10 ml de sacarosa 0,34 M a 700 x g durante 10 minutos en una centrifuga Sorval. El precipitado, formado por núcleos, glóbulos rojos, tejido conectivo y células intactas, se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 5.000 x g durante 10 minutos. El precipitado formado que corresponde a la fracción mitocondrial, se resuspendió en sacarosa 0,25 M y se centrifugó a 24.000 x g durante 10 minutos. Esta operación se repitió 2 veces más y finalmente la fracción mitocondrial se resuspendió en 1 ml de sacarosa 0,25 M (35-45 mg proteína / ml) y se congeló a -70 C hasta su posterior utilización.

1.2.4.- DETERMINACION DE PROTEINAS.

La concentración proteica se efectuó por el método de Lowry y col. (216). El primer paso del mismo implicó la formación de un complejo de cobre-proteína en una disolución alcalina. Este complejo redujo posteriormente un reactivo fosfomolibdico-fosfowolfrámico que da un color azul intenso. La reacción colorimétrica se leyó a 750 nm y se usó albúmina sérica bovina cristalizada como estándar.

1.2.5.- ANALISIS LIPIDICO.

1.2.5.1.- Extracción de lípidos.

Los lípidos de las distintas fracciones subcelulares se extrajeron mediante el procedimiento de Folch y col. (217). La muestra se homogeneizó en un homogeneizador rotatorio de vidrio con émbolo de teflón, con cloroformo:metanol (2:1, v/v) en una relación de una parte de muestra a 20 partes de mezcla extractiva. La mezcla se filtró a continuación, por papel de filtro y luego éste se lavó varias veces con la mezcla de extracción. Al filtrado total se le agregó un 20 % de su volumen de agua destilada, se agitó vigorosamente y se dejó decantar en frío para permitir una mejor separación de las dos fases. Luego se desechó la fase acuosa superior por aspiración y la inferior, que contiene los lípidos purificados, se evaporó a sequedad mediante un evaporador rotatorio o bajo corriente de nitrógeno. El extracto lipídico se guardó en un pequeño volumen de éter de petróleo a -20 C en atmósfera de nitrógeno para su posterior análisis.

1.2.5.2.- Separación de lípidos polares.

La composición de los lípidos polares se realizó por cromatografía en capa fina con doble desarrollo en un mismo

sentido (218). Se utilizaron placas de vidrio de 20 x 20 cm y silica gel H como fase estacionaria de 500 μ de espesor. Antes de ser usadas, las placas se activaron durante 60 minutos a 120 C. Los extractos lipidicos se disolvieron en cloroformo: metanol (2:1 v/v) y se sembraron en la placa en forma puntual o en banda. En la primera corrida la fase móvil estuvo constituida por: cloroformo: metanol: amoniacco: agua (70 : 25 : 3,5 : 1,5 ; v/v/v/v), mientras que en la segunda corrida la composición de la fase móvil fue la siguiente: cloroformo : metanol : ácido acético : agua (80 : 10 : 2 : 0,75). Las cubas de desarrollo fueron saturadas con los respectivos solventes previamente a ser utilizadas. Una vez completado el desarrollo de las placas, éstas se secaron bajo corriente de nitrógeno y el revelado se realizó mediante exposición a vapores de iodo bisublimado. El iodo es un reactivo inespecifico que tiñe las zonas lipidicas de color amarillo-parduzco. Este procedimiento, si bien no permite una identificación exacta de los distintos fosfolípidos, permite comparar los Rf de la muestra con los de estándares de fosfolípidos que se siembran simultáneamente.

1.2.5.3.- Cuantificación.

1.2.5.3.1.- Lípidos totales.

Los lípidos totales extraídos previamente de la muestra a analizar con cloroformo : metanol (2 : 1, v/v) siguiendo la técnica ya descripta, se cuantificaron gravimètricamente tomando

una pequeña fracción del extracto lipídico y evaporando el solvente a sequedad con nitrógeno hasta peso constante.

1.2.5.3.2.- Lípidos polares.

Los fosfolípidos se determinaron midiendo el contenido de fósforo en la muestra mediante el método de Chen y col. (219). La cuantificación de cada fracción fosfolipídica se realizó previa separación cromatográfica de las mismas en capa fina, raspado y extracción con metanol.

Este procedimiento para la determinación de fósforo es una modificación del de Fiske y Subbarrow (220), y emplea ácido perclórico para mineralizar la muestra y posteriormente la formación de un complejo de fosfomolibdato con molibdato de amonio que se reduce con ácido ascórbico. La reacción colorimétrica se lee a 820 nm y se usó fosfato de potasio 1 mM como estándar.

1.2.5.4.- Análisis de ácidos grasos.

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas-líquido. Esta técnica ofrece buenas separaciones de ácidos grasos libres, pero principalmente cuando éstos poseen una cadena corta.

Las muestras biológicas, sin embargo, poseen en general ácidos grasos de mayor longitud de cadena y además con distinto grado de insaturación. Por esta razón, los ácidos grasos son

derivatizados en sus ésteres metílicos para ser analizados por cromatografía gas-liquido (221), ya que éstos son más volátiles que los respectivos ácidos grasos debido a una reducción en la polaridad al formarse el éster, y además son relativamente más estables que los ácidos grasos libres.

Previa a la esterificación, los ácidos grasos fueron liberados de los lípidos mediante una saponificación con KOH en etanol al 10 % en una proporción de 8 ml por gramo de lípido a 82 C durante 45 minutos en atmósfera de nitrógeno. De esta forma se hidrolizaron los ácidos grasos de los ésteres de colesterol, glicéridos y fosfolípidos y se transformaron en los respectivos jabones solubles en agua. El insaponificable se eliminó agregando a la mezcla una vez fría, igual volumen de agua destilada y lavando 3 veces con 2 ml por vez de éter de petróleo (p.e. 30-65). Luego se acidificó la mezcla con HCL concentrado y se extrajeron los ácidos grasos con 2 ml de éter de petróleo, y esta operación se repitió 3 veces. El extracto se llevó a sequedad y se agregó 3 ml de metanol-HCL 3 N, y la esterificación se llevó a cabo a 64 C durante 1 hora en atmósfera de nitrógeno. Una vez que la muestra estuvo fría se le agregaron 3 ml de cloroformo y se lavó 3 veces con 2 ml de agua destilada. Cada vez se desechó la fase acuosa superior, el extracto clorofórmico se llevó a sequedad y los ésteres metílicos de los ácidos grasos se resuspendieron en éter de petróleo (p.e.30-65) y mantuvieron a -20 C en atmósfera de nitrógeno hasta el momento de ser utilizados.

Para determinar la composición de ácidos grasos de los distintos fosfolípidos las fracciones separadas e identificadas por cromatografía en capa fina y que no fueron expuestas a vapores de yodo, se eluyeron con metanol. El extracto se evaporó a sequedad para su posterior saponificación y esterificación siguiendo la técnica descrita anteriormente.

El análisis de los ésteres metílicos no radiactivos se hizo en un cromatógrafo gas-líquido Hewlett Packard 5840 A provisto de un detector de ionización de llama y un sistema automático de integración de áreas y procesamiento de datos que registra la composición de la muestra. Se usaron columnas de vidrio de 1,8 m de largo y 2 mm de diámetro interno rellenas con 10 % de SP 2330 sobre Chromosorb WAW (100/120 mallas) y nitrógeno como gas portador (20 ml / min). Las temperaturas del detector y del inyector fueron de 260 C y de 205 C respectivamente, mientras que la del horno fue de 140 C durante el primer minuto de corrida y luego aumentó a razón de 3 C / min hasta los 220 C.

Los picos se identificaron por medio de sus respectivos tiempos de retención relativos referidos a los de los ácidos grasos testigo esteárico y araquidónico. Estos valores así definidos dependen del sistema de partición utilizado (relleno de columna) y de la temperatura, y son independientes de otras condiciones experimentales (222).

El análisis de ésteres metílicos radiactivos provenientes de los ácidos grasos marcados utilizados en los distintos experimentos, se hizo en un radiocromatógrafo provisto de un

contador proporcional Packard modelo 893 con registrador Honeywell. El relleno de la columna utilizado fue 10 % de SP 2330 sobre Chromosorb WAW (100 / 120 mallas) y Ar como gas portador. Las temperaturas del detector y del inyector fueron de 250 C y de 230 C respectivamente, mientras que la temperatura del horno se mantuvo constante entre 140 y 185 C dependiendo del tipo de éster metílico a estudiar.

Los picos cromatográficos se identificaron por medio de sus respectivos tiempos de retención y fueron cuantificados por triangulación.

1.2.6.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DESATURANTE.

La actividad enzimática de las Δ^9 (18:0 \rightarrow 18:1 y 18:0 \rightarrow 18:1), Δ^6 (18:2 n-6 \rightarrow 18:3 n-6) y Δ^5 (20:3 n-6 \rightarrow 20:4 n-6) desaturasas se midió, determinando el porcentaje de conversión del sustrato (ácido (1-14C) graso) en el correspondiente producto (ácido (1-14C) graso).

Las reacciones enzimáticas se iniciaron agregando proteína microsomal a tubos previamente termostatizados durante 1 minuto a 37 C que contenían: sacarosa 0,25 M, cloruro de potasio 0,15 M, solución amortiguadora de fosfato de potasio 0,04 M (pH=7,2), N-acetil-L-cisteína 1,41 mM, fluoruro de potasio 0,04 M, ATP 1,3 mM, CoA 0,06 mM, NADH 0,87 mM, cloruro de magnesio 5 mM, 5 nmol de sustrato marcado (ácido (1-14C) graso) y 45 nmol de sustrato frío (ácido graso) en un volumen final de 1,6 ml. Para medir la

actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa, se usaron como sustratos los ácidos palmítico y esteárico y 4 mg de proteína microsomal. Los sustratos empleados para determinar las actividades enzimáticas de las Δ^6 y Δ^5 desaturasas fueron los ácidos linoleico y 8,11,14-eicosatrienóico, y 3 y 2 mg de proteína microsomal respectivamente. La mezcla de reacción se incubó a 37 C durante 15 minutos con agitación constante. La reacción de desaturación se detuvo agregando 2 ml de KOH alcohólico al 10 % y los ácidos grasos fueron esterificados, como ya se indicara previamente, para luego ser analizados por radiocromatografía gas-liquido.

1.2.7.- MEDIDA DE FLUORESCENCIA.

a. Introducción.

Las técnicas de fluorescencia han sido muy usadas en el estudio de las propiedades físico-químicas y estructurales de los lípidos constitutivos de las membranas biológicas y artificiales.

Todas las moléculas tienen un juego de niveles de energía electrónicos: S_0 , estado singulete del nivel fundamental; S_1 , estado singulete del primer estado excitado y T_1 , estado triplete del primer estado excitado. A su vez, cada uno de estos niveles poseen subniveles vibracionales. Al irradiar moléculas con luz ultravioleta o visible, se produce una absorción de energía que hace que algunas moléculas pasen del estado S_0 a un nivel energético superior. Después de la excitación, la molécula en

solución vuelve al nivel vibracional más bajo de S₁ sin emitir radiación, de donde puede retornar a S₀ a través de distintos mecanismos. Uno de los más relevantes es el de fluorescencia, que implica la transición desde el nivel más bajo de energía de S₁ al nivel fundamental de S₀.

Si una sustancia fluorescente, también llamada fluoróforo, se excita con luz polarizada, su emisión también estará polarizada. El grado de depolarización de fluorescencia, relacionado con la anisotropía, dependerá del desplazamiento angular promedio del fluoróforo entre la absorción y la subsiguiente emisión de un fotón. Este desplazamiento está condicionado por la velocidad y el rango de la rotación difusional durante el tiempo de vida del estado excitado.

El 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) ha sido muy usado como fluoróforo para medir anisotropía de fluorescencia. Es uno de los marcadores más eficientes para la región hidrocarbonada de las bicapas lipídicas por su alto rendimiento cuántico y su estructura todo trans que se adapta bien al interior hidrofóbico de las cadenas hidrocarbonadas, y por lo tanto brinda información sobre los cambios del estado físico de los lípidos que allí se encuentran (223).

b. Medidas de anisotropía de fluorescencia.

Para medir la anisotropía de fluorescencia, se utilizó un espectrofluorómetro Aminco-Bowman de American Instruments Co. Inc., equipado con dos prismas desmontables, el polarizador y

el analizador.

Las muestras se excitaron con luz polarizada verticalmente a 360 nm y la intensidad de fluorescencia se midió a 430 nm con el analizador vertical ($I_{||}$) o en posición horizontal (I_{\perp}).

Se utilizó una solución de nitrito de sodio 2 M, colocada a la salida del monocromador de emisión, como filtro que deja pasar únicamente longitudes de onda superiores a 390 nm. A pesar del filtro, fue necesario aplicar una corrección por la luz dispersada a $I_{||}$ e I_{\perp} , a las cuales se descontaron los respectivos valores de los blancos sin marcador fluorescente. En las mediciones de polarización de fluorescencia, surgen dos tipos de errores: uno, es la contribución de la dispersión de la luz de excitación a la señal de fluorescencia, lo que principalmente incrementa los valores de $I_{||}$ y se corrigió como se indicó anteriormente. El otro, es debido a la dispersión de la emisión de fluorescencia, que induce depolarización adicional, importante en soluciones de gran turbidez. Además, fue necesario aplicar una corrección, factor G, debido a factores instrumentales (224). El mismo se calculó excitando las muestras con luz polarizada horizontalmente y midiendo la fluorescencia con el analizador en posición horizontal (I_{hh}) o vertical (I_{hv}), siendo $G = I_{hh} / I_{hv}$. Así, la expresión utilizada para calcular la anisotropía de fluorescencia (rs) fue:

$$rs = \frac{I_{||}^{\circ} - GI_{\perp}^{\circ}}{I_{||}^{\circ} + 2GI_{\perp}^{\circ}}$$

siendo $I_{||}^{\circ}$ e I_{\perp}° las intensidades paralelas y perpendiculares, respectivamente, corregidas como se indicó anteriormente.

En nuestros experimentos la relación DPH:lipido (mol/mol) fue 1:200. Los microsomas (50 µg de proteína/ml) se resuspendieron en sacarosa 0,25 M y solución amortiguadora de fosfato de potasio 50 mM (pH=7), y se marcaron agregando 3-5 µl de DPH en tetrahidrofurano. Se utilizaron muestras de la misma concentración pero sin marcador fluorescente, como blanco de referencia para corregir la contribución de luz dispersada a la señal de fluorescencia.

1.2.8.- DOSAJE DE T3 Y T4 SERICAS POR RADIO INMUNO ENSAYO (RIE).

Estas determinaciones se hicieron en el Centro de Referencia de Radio Inmuno Ensayo.

La concentración sérica de T3 se dosó utilizando el Kit de Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, California).

En la determinación de la concentración sérica de T4 se utilizó el protocolo de Kit de Diagnostic Products Corporation. La hormona (¹²⁵I) T4 fue adquirida a New England Corp. Boston (M.A., USA). Los anticuerpos utilizados anti T4 (suero de conejo con un título de 1/50) y el segundo anticuerpo (anticuerpo de carnero anticonejo con un título de 1.5) fueron obtenidos en el mismo centro.

1.2.9.- ANALISIS ESTADISTICO.

Se aplicó el test "t" de Student y el Análisis de Varianza

según el caso.

Los datos correspondientes al experimento 1.3.3. se analizaron estadísticamente a través del Análisis de Varianza de dos factores y del Test de Comparaciones Múltiples de Duncan.

1.3.- EXPERIMENTOS REALIZADOS.

1.3.1.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN EL METABOLISMO LIPIDICO.

Con el fin de estudiar el efecto de diferentes temperaturas ambientales en la actividad desaturante y en el metabolismo lipidico se armaron lotes de 5 o 10 ratas cada uno y se los alojò durante 5 o 15 días en cámaras con temperatura ambiental controlada a 5 ± 1 C; 12 ± 1 C; 24 ± 1 C o 31 ± 1 C. Se les suministrò dicta comercial y agua ad libitum y se controlò diariamente la ingesta y el peso corporal de cada rata. Finalizados los respectivos tratamientos, los animales se sacrificaron a las 8 a.m.. Se les extrajo el hígado y se separaron las fracciones microsomales y mitocondriales como se detallara en la sección 1.2.3..

1.3.2.- EFECTO DEL FRIO AMBIENTAL Y LA RESTRICCIÓN ALIMENTICIA EN EL METABOLISMO LIPIDICO.

Cuando se estudiò el efecto del grado de crecimiento y la ingesta que presentan las ratas en el frío, en el metabolismo de los ácidos grasos, los experimentos se realizaron utilizando 4 lotes de 5 o 10 animales cada uno. Las ratas se alimentaron con dieta comercial y el agua les fue suministrada ad libitum. Lote I: ratas mantenidas a 24 ± 1 C y alimentadas ad libitum (control ad

libitum); lote II: ratas mantenidas a 5 ± 1 C y alimentadas ad libitum (frio ad libitum); lote III: ratas mantenidas a 5 ± 1 C cuya ingesta estaba restringida de tal forma que fuera como la del lote I (frio-alimentación como lote I); y lote IV: ratas mantenidas a 24 ± 1 C cuya ingesta fue restringida para que el grado de crecimiento de este lote fuera como el del lote II (control-crecimiento como lote II). El lote III fue diseñado para determinar si los cambios observados en la actividad desaturante o en la composición lipídica de ratas en el frio, podría deberse a la ingesta aumentada que poseen los animales en estas condiciones. Por otro lado, dado que las ratas en el frio a pesar de presentar una relativa hiperfagia poseen un grado de crecimiento disminuido respecto a las que se encuentran a 24 ± 1 C; se estudió el lote IV para establecer si los cambios que presentan las ratas en el frio en la actividad desaturante y composición lipídica, podrían ser consecuencia del grado de crecimiento disminuido que se observa en los animales a 5 C.

Todos los lotes se mantuvieron 5 días en las condiciones descriptas. Los animales se sacrificaron a las 8 a.m. y se extrajo el hígado de donde se separaron las fracciones microsomal y mitocondrial como ya se detallara en la sección 1.2.3..

1.3.3.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN LA ACTIVIDAD DE LAS $\Delta 6$ Y $\Delta 5$ DESATURASAS DEPRIMIDAS POR UNA DIETA HIPERGLUCIDICA.

Dado que una dieta hiperglucídica (DH) deprime la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa (88,90,98), se pensó que si se partía de niveles de actividad enzimática deprimidos, podría llegar a observarse variaciones en la actividad de esta enzima a diferentes temperaturas, que no se observan cuando las ratas son alimentadas con una dieta control (Fig. 1.4.).

Teniendo en cuenta que la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa ya está disminuida a los 2 días de alimentar a las ratas con una dieta hiperglucídica (98), se dividió a los animales en 2 grupos de 15 ratas cada uno, un grupo recibió DC y el otro DH. La comida y el agua fue provista ad libitum y se los mantuvo con estas dietas a 24 ± 1 C durante 2 días.

Luego de este periodo de tiempo, cuando la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa ya está disminuida, se transfirió las ratas a las distintas temperaturas ambientales. Previamente, cada grupo fue subdividido en 3 lotes de 5 ratas cada uno, manteniéndose la misma dieta. Un lote de cada dieta fue transferido a una cámara fría a 12 ± 1 C (lote I (DC) y lote II (DH)); otros dos lotes se mantuvieron a la misma temperatura (lote III (DC) y lote IV (DH)) y los últimos dos lotes se transfirieron a una cámara caliente a 31 ± 1 C (lote V (DC) y lote VI (DH)). Luego de 5 días en estas condiciones los animales fueron sacrificados a las 8 a.m., se extrajo el hígado y se separó la fracción microsomal como ya se describiera en la sección 1.2.3.1..

1.4.- RESULTADOS.

1.4.1.-EFEECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES Y TIEMPO DE EXPOSICION EN EL METABOLISMO LIPIDICO.

1.4.1.1.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES DURANTE 5 DIAS DE EXPOSICION EN LA INGESTA, GRADO DE CRECIMIENTO, CONVERSION DE ALIMENTOS Y PESO HEPATICO.

Cuando se disminuye la temperatura ambiental de 24 C a 12 C, y se deja las ratas expuestas a esta menor temperatura durante 5 días, el grado de crecimiento y la conversión de alimentos de los animales disminuyen en un 58 y 52 % respectivamente, mientras que su ingesta no se modifica (Tabla 1.6.). Mientras que, si se disminuye más la temperatura (a 5 C), la disminución de estos dos parámetros es aún mayor (grado de crecimiento 64 % y conversión de alimentos 71 %) a pesar del aumento en la ingesta del 31 % que se observa en las ratas a 5 C (Tabla 1.6.).

Si se aumenta la temperatura ambiental de 24 a 31 C no se observan variaciones significativas en la ingesta ni en el grado de crecimiento de los animales (aunque este último tendería a disminuir) (Tabla 1.6.).

El peso hepático no se modificó por efecto de modificaciones en la temperatura ambiental.

1.4.1.2.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES DURANTE

Tabla 1.6.

Efecto de distintas temperaturas ambientales durante 5 y 15 días en la ingesta, grado de crecimiento y conversión de alimentos.

Temperatura (C)	5		12		24		31	
	(control)							
Periodo (días)	5	15	5	15	5	15	5	15
Lote	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Ingesta (g/día)	0,144 ± 0,006 ^a	0,155 ± 0,006 ^b	0,095 ± 0,005	0,101 ± 0,002	0,110 ± 0,007	0,120 ± 0,004 ^c	0,096 ± 0,004 ^d	0,087 ± 0,004 ^e
Grado de crec. (g/día)	2,6 ± 0,7 ^a	1,9 ± 0,0 ^b	3,0 ± 0,2 ^c	2,8 ± 0,3 ^d	7,2 ± 0,7	5,0 ± 0,6	5,6 ± 0,4 ^f	4,5 ± 0,1 ^g
Conversión de alimentos	10,1 ± 2,1 ^a	12,3 ± 1,5 ^b	29,2 ± 3,8	23,0 ± 2,7 ^c	61,5 ± 6,4	48,3 ± 5,1	56,3 ± 6,2 ^h	44,4 ± 4,5 ⁱ
Peso hepático (g)	8,7 ± 0,9	9,0 ± 0,9	9,2 ± 0,5	9,6 ± 0,7	10,1 ± 1,1	9,7 ± 1,0	9,1 ± 0,6	9,3 ± 0,8

Ingesta: consumo diario de alimento/peso corporal; grado de crecimiento: aumento diario de peso corporal; conversión de alimentos: grado de crecimiento/ingesta x 100. El tratamiento de los animales se detalla en la sección 1.3.1.. Los valores tabulados corresponden a las medias de 5 animales por lote ± E.S.. Diferencias significativas para P<0,001: a: I vs VI; b: III vs VI; c: VII vs VI; d: I vs VIII; e: III vs VIII; f: II vs VII; g: IV vs VII; h: VI vs VIII; i: II vs VII; j: IV vs VIII. a', e', f', g', h', i', j' corresponden a P<0,01 y d'' a P<0,05.

15 DIAS DE EXPOSICION EN LA INGESTA, GRADO DE CRECIMIENTO, CONVERSION DE ALIMENTOS Y PESO HEPATICO.

Con el fin de determinar si periodos mayores a 5 dias de exposici3n a 5, 12 y 31 C causaban alguna variaci3n adicional a las ya encontradas, los animales fueron mantenidos a estas temperaturas ambientales durante 15 dias con dieta comercial y agua ad libitum. Transcurrido este periodo, no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos durante 5 dias con los que estuvieron 15 dias a 5, 12, 24 y 31 C, en la ingesta, grado de crecimiento, conversi3n de alimentos y peso hepático (Tabla 1.6.). Por otro lado, se observaron las mismas variaciones en estos parámetros por efecto de la temperatura luego de 15 dias de exposici3n que después de 5 dias a excepci3n de la ingesta que disminuy3 pero solo luego de 15 dias en el lote mantenido a 31 C (VI) respecto al de 24 C (IV).

1.4.1.3.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES DURANTE 5 DIAS DE EXPOSICION EN LOS NIVELES SERICOS DE T3 Y T4.

Dado que variaciones de la temperatura ambiental producen variaciones en los niveles séricos de las hormonas tiroideas se determinaron los niveles séricos de las mismas en nuestras condiciones experimentales, por RIE (secci3n 1.2.8.)

Los resultados aparecen en la Tabla 1.7.. Los niveles séricos de T4 disminuyeron al transferir ratas durante 5 dias de

TABLA 1.7.

Efecto de la temperatura ambiental en la concentración sérica de las hormonas tiroideas.

Temperatura ambiental (C)	5	24 (control)	31
T3 (ng/100ml)	94,2 ± 8,3	90,0 ± 3,5	34,5 ± 5,3*
T4 (µg/100ml)	2,2 ± 0,2*	5,0 ± 0,3	3,2 ± 0,2**

Las hormonas tiroideas se dosaron por RIE (Sección 1.2.8.). Los datos tabulados corresponden a la media de 5 ratas por lote ± E.S.. Diferencias significativas respecto del control: *, P<0,001 y **, P<0,01.

24 (lote control) a 5 y 31 C en un 56 y 36 % respectivamente, mientras que los de T3 solo se modificaron en el lote a 31 C en el que disminuyeron un 62 % respecto del control.

1.4.1.4.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN LA ACTIVIDAD DESATURANTE DE MICROSOMAS HEPATICOS.

1.4.1.4.1.- Δ^9 Desaturasa.

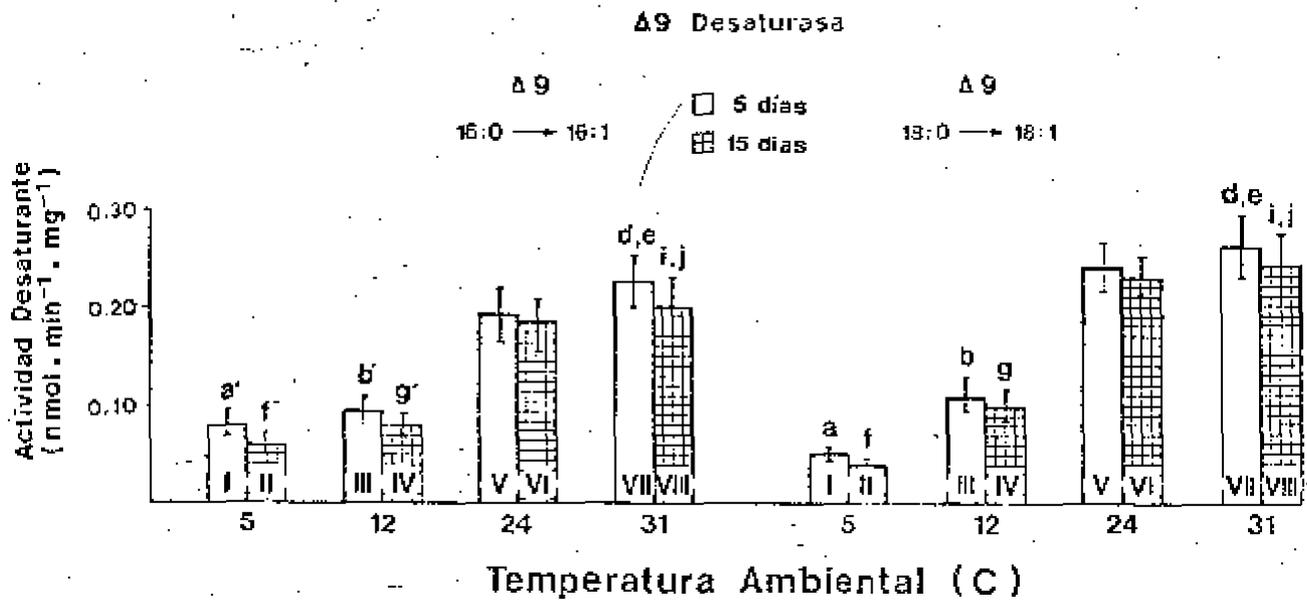
Los resultados se expresan en la Fig. 1.2.. La actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa (Δ^9 (16:0) y Δ^9 (18:0)) disminuye al disminuir la temperatura ambiental. Este comportamiento en la actividad desaturante se observó luego de 5 y 15 días (Fig. 1.2.) de exposición a las distintas temperaturas de animales alimentados con dieta comercial y agua ad libitum. La disminución en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa a 12 y a 5 C respecto de 24 C (control) fue del 51 % (Δ^9 (16:0)) y 55 % (Δ^9 (18:0)) y del 58 % (Δ^9 (16:0)) y 80 % (Δ^9 (18:0)) respectivamente. Mientras que, por otro lado, dicha actividad enzimática no se modificó al aumentar la temperatura ambiental de 24 a 31 C durante 5 y 15 días (Fig.1.2.)..

1.4.1.4.2.- Δ^6 Desaturasa.

La actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa, medida en ratas macho alimentadas con dieta comercial y agua ad libitum, no se modificó por efecto de la temperatura ambiental entre los lotes expuestos a 5, 12, 24 y 31 C durante 5 y 15 días (Fig.

Figura 1.2.

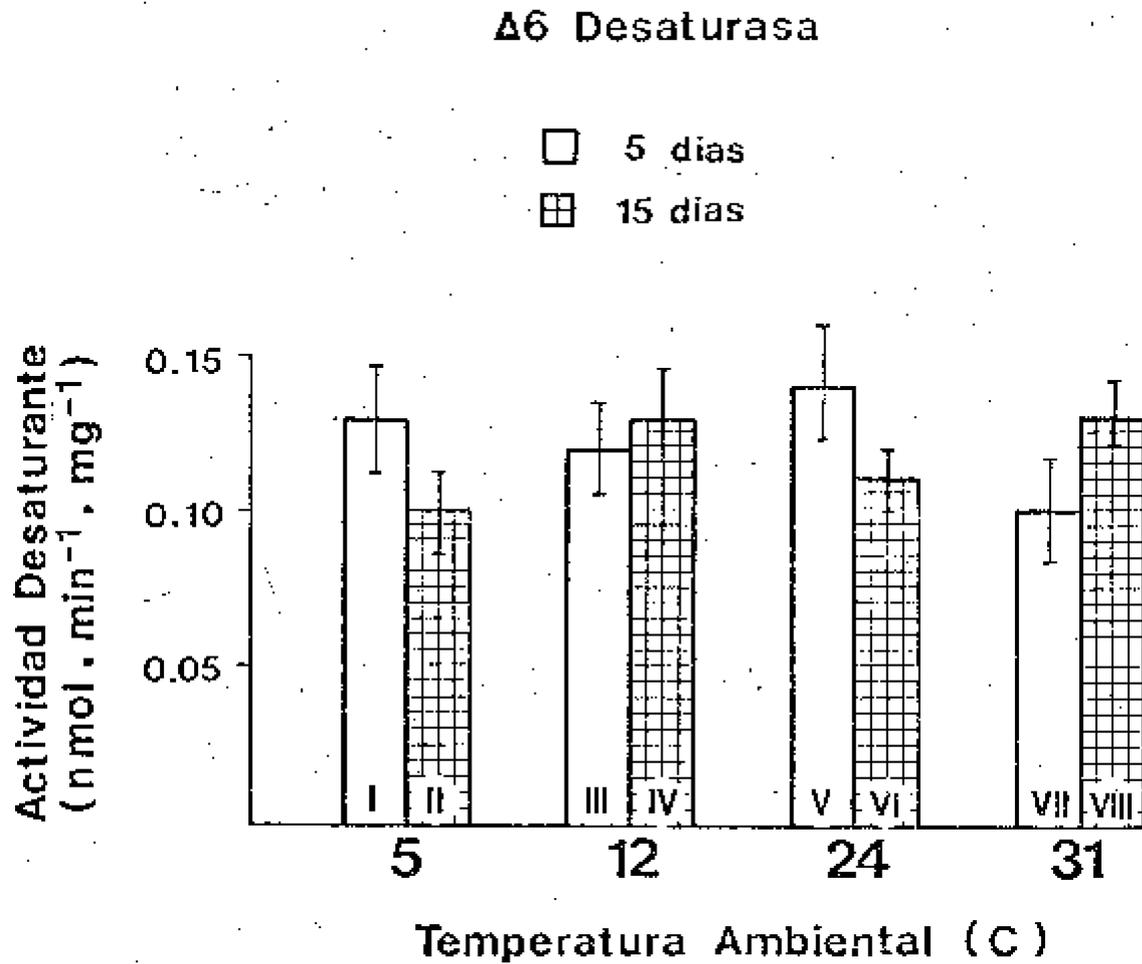
Efecto de distintas temperaturas ambientales durante 5 y 15 días en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa.



Los ensayos enzimáticos se realizaron como se detalla en la sección 1.2.6.. Los lotes se describieron en la sección 1.3.1.. Los resultados graficados corresponden a las medias de 5 ratas por lote \pm E.S.. Las ratas se alimentaron con dieta comercial y agua ad libitum y se mantuvieron durante 5 (□) o 15 (▣) días a una temperatura ambiental de 5, 12, 24 o 31 C. El tipo de lote se especifica en cada barra. Las letras sobre las barras indican diferencias significativas para $P < 0,001$: a: lote I vs lote VI; b: III vs VI; c: VII vs VI; d: I vs VII; e: III vs VII; f: II vs VI; g: IV vs VI; h: VI vs VIII; i: II vs VIII; j: IV vs VIII; a', b', f', g' corresponden a $P < 0,01$.

Figura 1.3.

Efecto de distintas temperaturas ambientales durante 5 y 15 días en la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa.



Las especificaciones de esta figura son las mismas que las de la Fig. 1.2.

1.3.).

1.4.1.4.3.- Δ^5 Desaturasa.

La actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa no se modificó al disminuir la temperatura ambiental a 5 y 12 C respecto de 24 C (control) en ratas macho alimentadas con dieta comercial y agua ad libitum, y expuestas a dichas temperaturas ambientales durante 5 y 15 días (Fig. 1.4.). Sin embargo, cuando se aumentó la temperatura ambiental a 31 C, la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa disminuyó un 30 %. Esta disminución en la actividad desaturante se observó luego de 5 y 15 días de exposición de los animales a 31 C (Fig. 1.4.).

1.4.1.5.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE LIPIDOS TOTALES DE MICROSOMAS HEPATICOS.

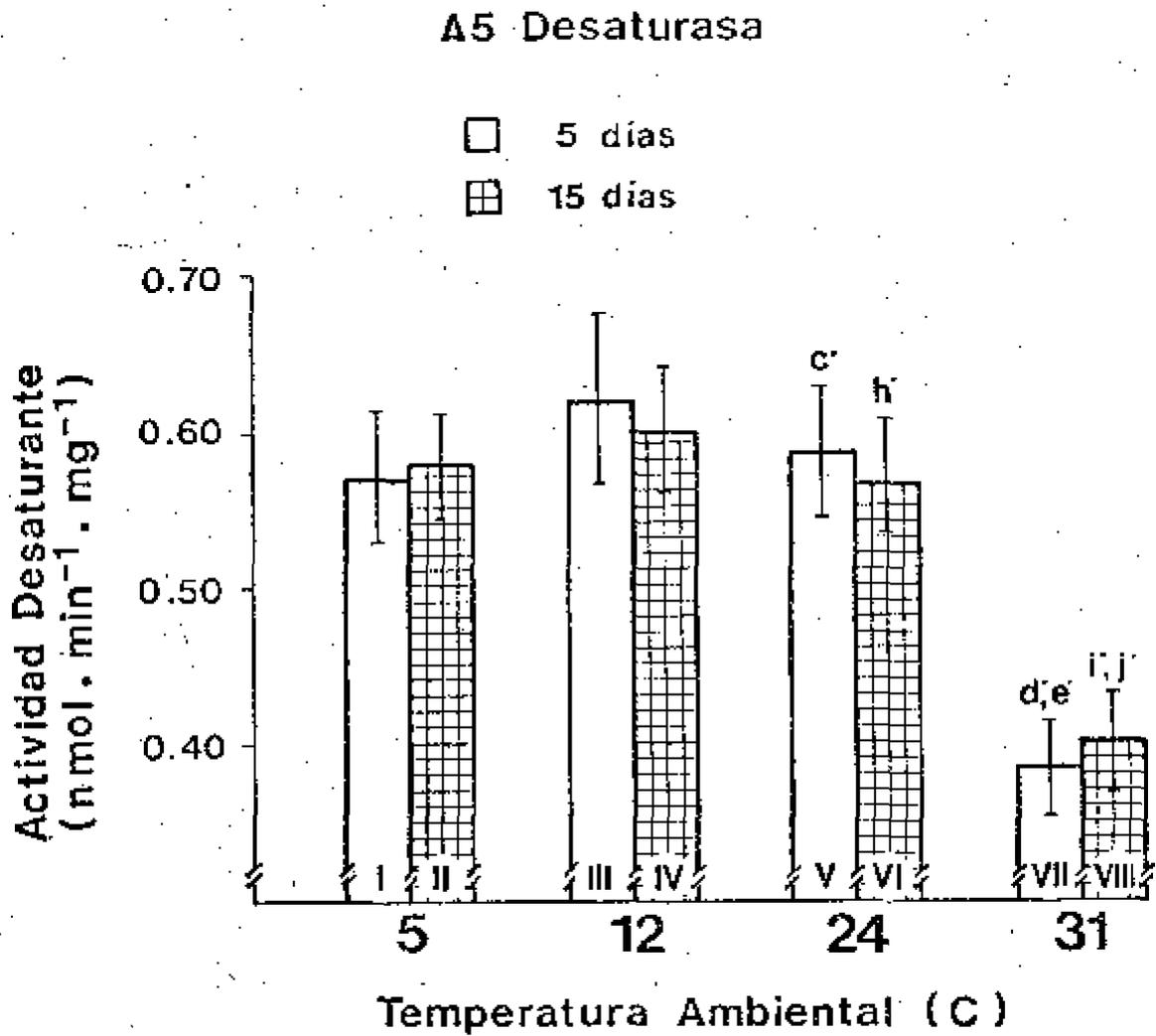
Teniendo en cuenta que las variaciones observadas en la actividad desaturante microsomal, podrían determinar cambios en la composición de ácidos grasos de dichas membranas, se estudió la composición de ácidos grasos de las mismas como ya se detallara en la sección 1.2.5.4..

En la Tabla 1.8. se detalla el efecto de distintas temperaturas ambientales en la composición de ácidos grasos de lipidos totales durante 5 y 15 días respectivamente.

Al disminuir la temperatura ambiental de 24 C a 12 y a 5 C,

Figura 1.4.

Efecto de distintas temperaturas ambientales durante 5 y 15 días en la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa.



Las especificaciones de esta figura son las mismas que las de la Fig. 1.2..

Tabla 1.5.

Efecto de distintas temperaturas ambientales durante 5 y 15 días en la composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas hepáticos.

Temperatura	5		12		24		31	
(C)	(control)							
Periodo (días)	5	15	5	15	5	15	5	15
Lote	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Ácido graso								
(%)								
16:0	18,2 ± 0,4	18,2 ± 0,6	20,8 ± 1,1	21,0 ± 0,7	19,1 ± 1,1 ^a	19,1 ± 0,4 ^b	22,4 ± 0,4 ^c	22,5 ± 0,8 ^d
16:1	1,0 ± 0,14 ^e	1,0 ± 0,14 ^e	1,2 ± 0,14 ^e	1,1 ± 0,14 ^e	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,24 ^e	2,1 ± 0,34 ^f
18:0	22,9 ± 1,04 ^g	23,4 ± 0,24 ^g	23,1 ± 0,5 ^g	23,4 ± 0,54 ^g	20,0 ± 0,2	21,4 ± 0,4	19,6 ± 0,44 ^g	20,3 ± 0,54 ^g
18:1	8,0 ± 0,24	8,2 ± 0,24 ^h	9,1 ± 0,44 ^h	8,3 ± 0,24 ^h	10,6 ± 0,1	9,5 ± 0,2	9,8 ± 0,34 ^h	9,9 ± 0,44 ^h
18:2 n-6	15,4 ± 0,7	14,8 ± 1,1	13,9 ± 0,2	14,3 ± 0,3	13,8 ± 0,2	14,0 ± 0,3	14,5 ± 0,7	14,5 ± 0,7
20:3 n-6	1,2 ± 0,14 ⁱ	1,4 ± 0,14 ⁱ	2,0 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,24 ⁱ	1,9 ± 0,14 ⁱ	2,4 ± 0,14 ⁱ	2,5 ± 0,24 ⁱ
20:4 n-6	25,7 ± 0,1	24,9 ± 1,0	24,9 ± 1,0	24,3 ± 0,9	26,7 ± 1,04	24,6 ± 1,04 ^j	20,4 ± 0,14 ^j	21,3 ± 0,94 ^j
22:5 n-3	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,2 ± 0,2
22:6 n-3	5,6 ± 0,2	5,8 ± 0,8	4,4 ± 0,8	4,7 ± 0,8	5,6 ± 0,6	6,5 ± 0,3	6,3 ± 0,4	5,8 ± 0,3
20:4 n-6/	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,14 ^k	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,14 ^k	1,8 ± 0,14 ^k	1,4 ± 0,1	1,9 ± 0,14 ^k
18:2 n-6								
Índice de	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
insat.								

Tabla 1.6. La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquida como se describe en la sección 1.2.5.4. Solo se consideraron los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción. Los resultados tabulados corresponden a la media de 3 ratas por lote ± E.S. Las ratas se alimentaron con dieta comercial y agua ad libitum y se mantuvieron a una temperatura ambiental de 5, 12, 24 o 31 °C durante 5 o 15 días (sección 1.3.1). a: Índice de insaturación:

$\sum (\text{mol insaturado} \times \text{número de dobles ligaduras}) / \sum \text{mol total}$. Las letras indican diferencias significativas para $P < 0,001$: a: lote I vs lote III; b: III vs V; c: I vs V; d: II vs IV; e: IV vs VI; f: II vs VI; g', h', i', j', k', l' corresponden a diferencias significativas para $P < 0,05$, mientras que a'', b'', c'', d'', e'' y f'' para $P < 0,05$.

se observó una disminución en los porcentajes de los ácidos palmitoleico (16:1) y oleico (18:1) y un aumento en el de esteárico (18:0) de las ratas en el frío respecto al control (24 C). Estas variaciones podrían ser consecuencia de la menor actividad enzimática que presenta la Δ^9 desaturasa en el frío (Fig. 1.2.). En el lote a 31 C, el porcentaje del ácido palmítico (16:0) aumentó y el de 18:1 disminuyó pero no siempre en forma significativa.

Con respecto a la familia de ácidos grasos n-6, el porcentaje de ácido linoleico (18:2 n-6) no se modificó por efecto de la temperatura ambiental, mientras que, en el lote a 31 C el porcentaje del ácido 8,11,14-eicosatrienoico (20:3 n-6) aumentó y el del ácido araquidónico (20:4 n-6) disminuyó. Estos cambios que determinaron la disminución del cociente 20:4 n-6 / 18:2 n-6, son coherentes con la menor actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa en el lote a 31 C (Fig. 1.4.).

A pesar de las modificaciones observadas en la composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas, el índice de insaturación de los mismos no se modificó.

En general, las variaciones que se produjeron como consecuencia de la exposición de los animales a las distintas temperaturas ambientales, son las mismas luego de 5 días de exposición que después de 15 días.

1.4.1.6.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES DURANTE 5 DIAS DE EXPOSICION EN LA COMPOSICION FOSFOLIPIDICA DE FRACCIONES

SUBCELULARES HEPATICAS.

1.4.1.6.1.- Fracción microsomal.

Dado que las desaturasas son proteínas integrales de las membranas del retículo endoplásmico (sección A.4.) y por lo tanto, variaciones en la composición lipídica de estas membranas podrían modificar la actividad enzimática de las desaturasas, se estudió la composición fosfolipídica de microsomas hepáticos de ratas mantenidas a diferentes temperaturas ambientales siguiendo las técnicas detalladas en la sección 1.2.5..

La composición fosfolipídica microsomal no se modificó en forma significativa por efecto de la temperatura ambiental en los lotes que estuvieron a 5, 24, y 31 C durante 5 días (Tabla 1.9.), a excepción del lote a 31 C que presentó una disminución en la fracción de fosfatidilserina (FS) con respecto al lote control (24 C).

1.4.1.6.2.- Fracción mitocondrial.

Como se detallara en la Introducción, las mitocondrias tienen un papel relevante en los procesos que se desencadenan en los homeotermos a causa de modificaciones en la temperatura ambiental. Por eso, nos pareció interesante estudiar el efecto de la temperatura ambiental en la composición fosfolipídica de este organoide.

En estos estudios observamos que como consecuencia de la exposición de las ratas a distintas temperaturas ambientales, se

Tabla 1.9.

Efecto de la temperatura ambiental en la composición fosfolipídica de microsomas hepáticos.

Temperatura ambiental (C)	5	24 (control)	31
FC	66,4 ± 3,1	59,3 ± 7,3	62,5 ± 3,0
FE	16,8 ± 0,9	21,2 ± 1,3	20,1 ± 3,4
FI	11,6 ± 2,2	13,8 ± 4,0	14,7 ± 1,0
EM	2,8 ± 1,1	3,1 ± 1,8	2,5 ± 0,5
FS	2,5 ± 1,3	2,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2*

FC: fosfatidilcolina; FE: fosfatidiletanolamina; FI: fosfatidilinositol; EM: esfingomielina y FS: fosfatidilserina. Las fracciones fosfolipídicas se cuantificaron como se detalla en la sección 1.2.5.3.2. y se expresan como: µg/mg de lípido total x 100. Los datos tabulados corresponden a las medias de 3 ratas por lote ± E.S.. Diferencias significativas respecto del control:*, P<0,001.

produjeron variaciones en algunas fracciones fosfolipidicas de mitocondrias hepáticas. El porcentaje de fosfatidicolina (FC) disminuyó, mientras que el de fosfatidiletanolamina (FE) aumentó en los lotes a 5 y 31 C respecto del control (24 C). Se observó asimismo, una disminución en la fracción de esfingomiélin (EM) en el frío. Las restantes fracciones fosfolipidicas mitocondriales no presentaron variaciones (Tabla 1.10.).

1.4.1.7.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES DURANTE 5 DIAS DE EXPOSICION EN LA ANISOTROPIA DE FUORESCENCIA MICROSOMAL.

Como ya se detallara en la sección 1.2.7., las técnicas de fluorescencia son muy usadas en el estudio de las propiedades fisico-químicas y estructurales de los lípidos constituyentes de las membranas biológicas y artificiales. Por esta razón, se midió la anisotropia de fluorescencia utilizando el fluoróforo 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH).

En estas determinaciones no se observaron variaciones en la anisotropia de fluorescencia de microsomas pertenecientes a ratas mantenidas a 5, 24 y 31 C durante 5 días (Tabla 1.11.). Estos resultados son coherentes, ya que tampoco se encontraron variaciones en el índice de insaturación (Tabla 1.8.), ni en las principales fracciones fosfolipidicas (Tabla 1.9.) de estos mismos lotes.

1.4.2.- EFECTO DE LA INGESTA EN EL METABOLISMO LIPIDICO EN EL

Tabla 1.10.

Efecto de la temperatura ambiental en la composición fosfolipídica de mitocondrias hepáticas.

Temperatura ambiental (C)	5	24 (control)	31
FC	43,90 ± 0,50*	52,10 ± 0,10	45,60 ± 1,70*
FE	36,40 ± 1,10*	22,50 ± 0,80	34,90 ± 3,10**
CL	13,50 ± 0,80	15,20 ± 1,10	11,90 ± 1,10
FI	5,40 ± 0,90	6,50 ± 0,50	4,90 ± 1,20
EM	0,70 ± 0,20**	1,80 ± 0,10	1,70 ± 0,50
FS	0,10 ± 0,02	1,90 ± 1,10	1,00 ± 0,20

CL: cardiolipina; las demás abreviaciones se especifican en la Tabla 1.9.. Las fracciones fosfolipídicas se expresan como: $\mu\text{g}/\text{mg}$ de lípido total $\times 100$ y se cuantificaron como se indica en la sección 1.2.5.3.2.. Los datos tabulados corresponden a las medias de 5 ratas por lote \pm E.S. Diferencias significativas respecto del control:*, $P < 0,001$; ** y $P < 0,01$.

Tabla 1.11.

Anisotropía de fluorescencia (rs) de microsomas hepáticos de ratas mantenidas a distintas temperaturas ambientales.

Temperatura ambiental (C)	5	24	31
rs	0,140 ± 0,002	0,139 ± 0,003	0,142 ± 0,003

Las mediciones de la anisotropía de fluorescencia (rs) del DPH se hicieron como se describe en la sección 1.2.7.. Los valores tabulados corresponden a las medias de 5 ratas por lote ± E.S..

FRIO.

Teniendo en cuenta que los animales expuestos al frío poseen una ingesta aumentada y un grado de crecimiento y conversión de alimentos disminuidos (Tabla 1.6.), ya que utilizan parte de las calorías suministradas por la dieta y por las reservas endógenas, en mantener constante la temperatura corporal, se estudió la existencia de alguna correlación entre la ingesta y el grado de crecimiento de los animales en el frío, con los cambios observados en la composición lipídica y en la actividad desaturante en esas condiciones.

Con este propósito se dividieron los animales en 4 lotes como se describe en la sección 1.3.2..

1.4.2.1.- EFECTO DE LA RESTRICCIÓN ALIMENTICIA Y EL FRÍO EN LA INGESTA, GRADO DE CRECIMIENTO, CONVERSIÓN DE ALIMENTOS Y PESO HEPÁTICO.

En la Tabla 1.12. se detalla la ingesta, grado de crecimiento, conversión de alimentos y peso hepático de los 4 lotes. Las ratas mantenidas a 5 C con comida ad libitum (lote II) presentaron un aumento del 25 % en la ingesta y una disminución en el grado de crecimiento y conversión de alimentos del 74 y 86 % respectivamente. Estas variaciones son equivalentes a las observadas previamente bajo estas condiciones (Tabla 1.6.).

En el lote III, constituido por animales mantenidos a 5 C

Tabla 1.12.

Efecto de la temperatura ambiental y la restricción alimenticia en la ingesta, grado de crecimiento, conversión de alimentos y peso hepático.

	Lote I Control ad libitum (n=10)	Lote II Frio ad libitum (n=10)	Lote III Frio-Aliment. como lote I (n=4)	Lote IV Control-Crecic. como lote II (n=4)
A	0,108 ± 0,003	0,135 ± 0,004*	0,100 ± 0,004	0,064 ± 0,004*
B	4,38 ± 0,36	1,68 ± 0,51*	-2,70 ± 0,30*	0,95 ± 0,7*
C	54,0 ± 5,0	7,5 ± 4,6*	-32,4 ± 4,4*	-13,7 ± 8,0*
D	9,92 ± 0,80	6,44 ± 0,90	6,70 ± 0,35**	6,90 ± 0,42**

A: ingesta (consumo diario de alimento / peso corporal (g/g)); B: grado de crecimiento (aumento diario de peso corporal (g/día)); C: conversión de alimentos (grado de crecimiento / ingesta x 100) y D: peso hepático (g). El tratamiento de los animales se detalla en la sección 1.3.2., Los valores tabulados corresponden a las medias de cada lote ± E.S.. n: número de animales de cada lote. Diferencias significativas respecto del control:*, P<0,001 y **, P<0,01.

con la misma ingesta que los animales a 24 C (frío-alimentación como lote I), se observó una disminución en el grado de crecimiento, conversión de alimentos y peso hepático del 142, 162 y 32 % respectivamente. El balance metabólico negativo debido al frío, se acentuó aun más en este lote, a causa de la disminución en el aporte de calorías de la dieta restringida.

Las ratas del grupo IV (control-crecimiento como lote II) que se mantuvieron a 24 C con la comida restringida de tal forma que el grado de crecimiento de las mismas fuera como el del lote II, presentaron una disminución en la conversión de alimentos y peso hepático del 126 y 30 % respectivamente, ya que la ingesta restringida provocó un aumento en el catabolismo de sustratos endógenos.

1.4.2.2.- EFECTO DE LA INGESTA Y EL FRIO EN LA ACTIVIDAD DESATURANTE MICROSOMAL.

De los cuatro lotes descritos anteriormente (sección 1.3.2.) se separó la fracción microsomal hepática y se midió la actividad de las Δ^9 , Δ^6 y Δ^5 desaturasas, de acuerdo a cómo se detalla en la sección 1.2.6..

1.4.2.2.1.- Δ^9 Desaturasa.

Los animales mantenidos a 5 C con comida ad libitum presentaron una marcada disminución no sólo en la conversión de alimentos (Tabla 1.12.), sino también en la actividad

enzimática de la Δ^9 desaturasa (Fig. 1.5.). Estos resultados concuerdan con los encontrados previamente (Tabla 1.6. y Fig. 1.2.).

Es poco probable que la ingesta aumentada que poseen las ratas mantenidas a bajas temperaturas, causara los cambios observados en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa, ya que, cuando se restringe la alimentación de los animales a 5 C (lote III), los cambios observados se acentúan en vez de anularse. Por otro lado, la disminución en el grado de crecimiento de las ratas en el frío, sería un factor importante a tener en cuenta, dado que en los animales mantenidos a 24 C con un grado de crecimiento similar al de las ratas en el frío (lote IV), también se observa una disminución en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa.

Todos los lotes que presentan una conversión de alimentos disminuida (II, III y IV), también poseen disminuida la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa (Fig. 1.5.).

1.4.2.2.2.- Δ^6 desaturasa.

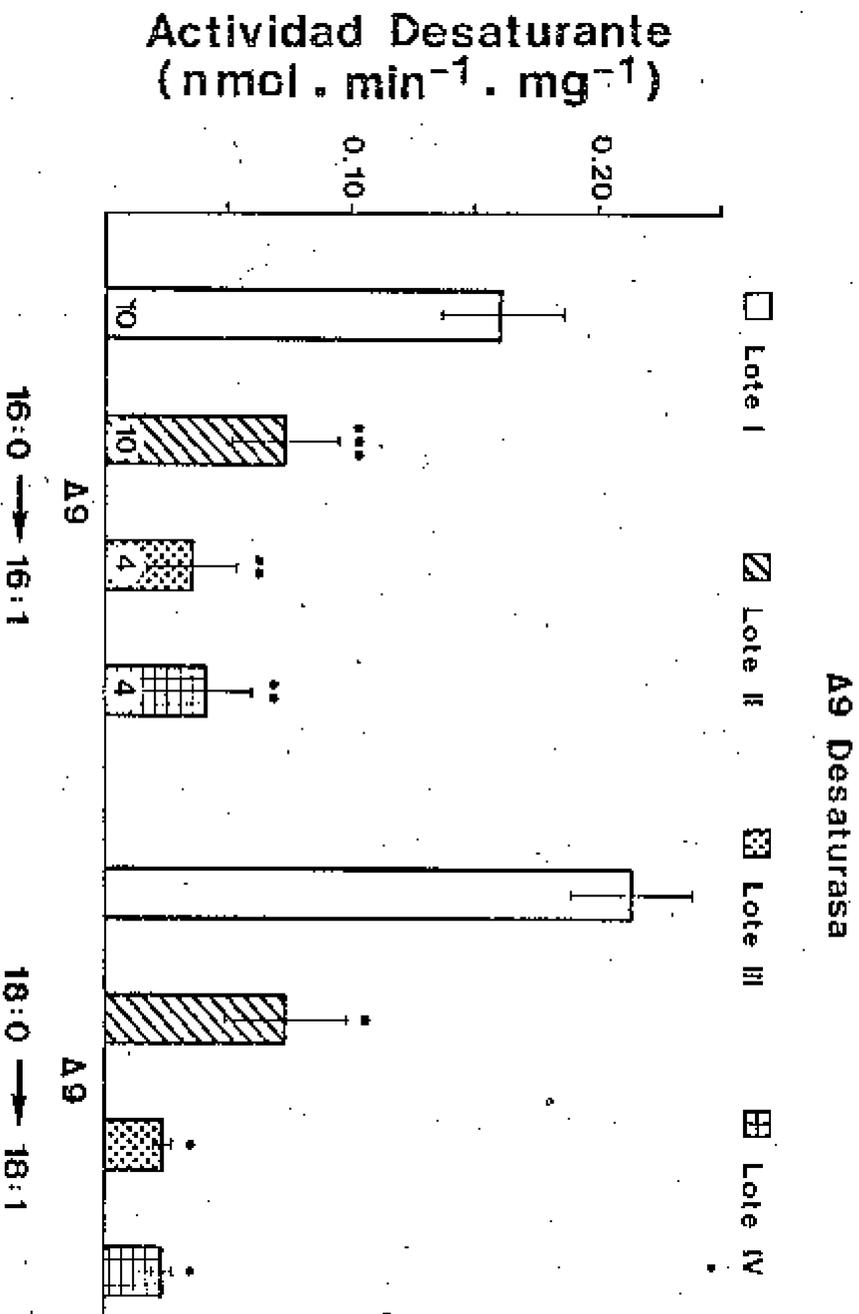
La actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa no se modificó en el lote a 5 C con comida ad libitum, mientras que aumentó cuando se restringió la alimentación tanto a 5 C (lote III) como a 24 C (lote IV) (Fig. 1.6.).

1.4.2.2.3.- Δ^5 Desaturasa.

No se observó ningún tipo de modificación en la actividad

Figura 1.5.

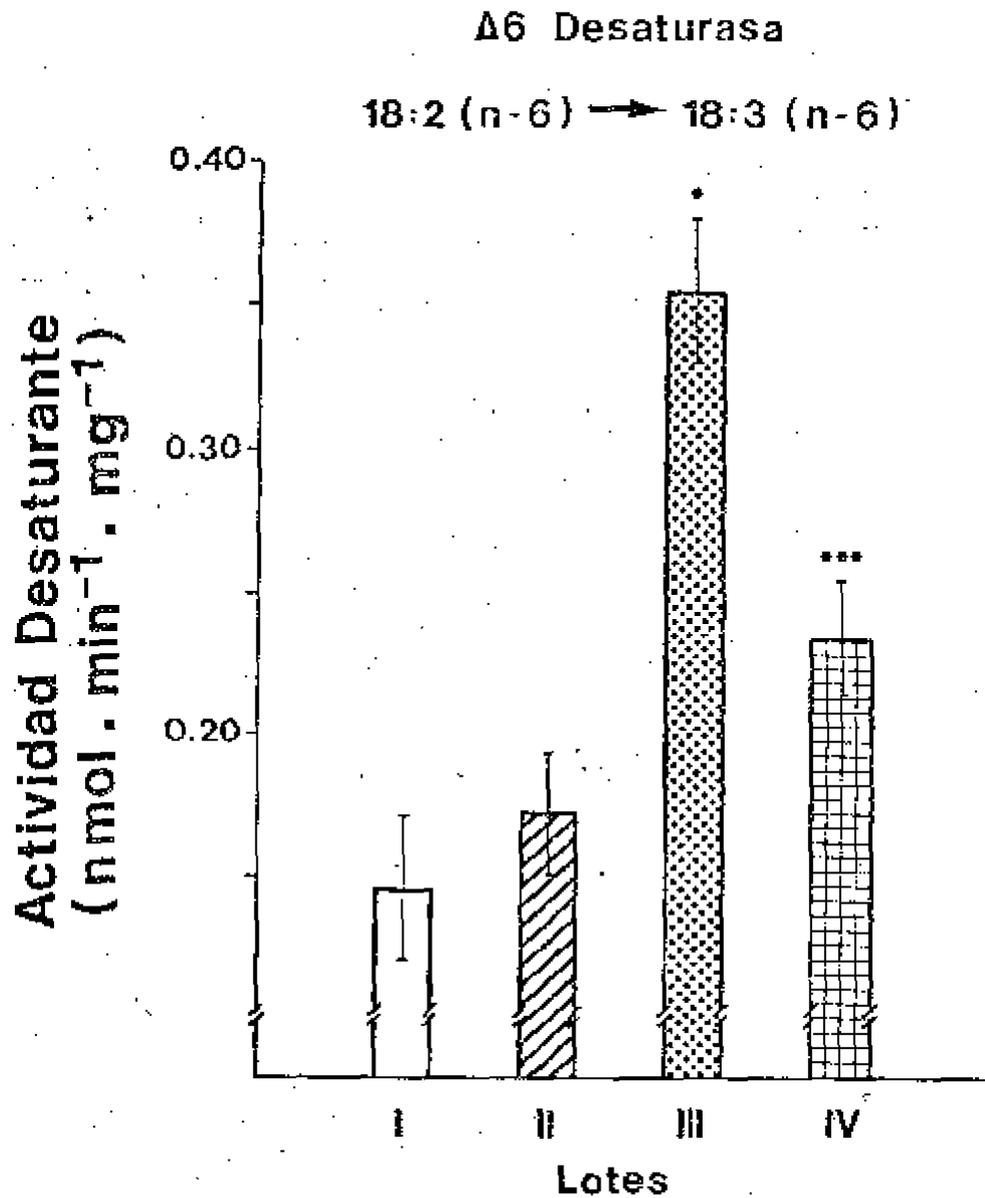
Efecto del frío ambiental y la restricción de alimentos en la actividad enzimática de la $\Delta 9$ desaturasa.



Las determinaciones de actividad enzimática se detallan en la sección 1.2.4.. Lote I, control ad libitum (□); lote II, frío ad libitum (▨); lote III, frío-alimentación como lote I (▤); lote IV, control-crecimiento como lote II (▧). Los resultados se expresan como la media ± E.S. El número de animales de cada lote se especifica en el primer juego de columnas. Diferencias significativas respecto del control (lote I, □): *, P<0,001; **, P<0,01 y ***, P<0,05.

Figura 1.6.

Efecto del frío ambiental y la restricción de alimentos en la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa.



Las especificaciones de esta figura son las mismas que las de la Fig. 1.5..

enzimática de la Δ^5 desaturasa por efecto del frío, ni por la restricción alimenticia provocada en las ratas a 5 C y 24 C (Fig. 1.7.).

1.4.2.3.-EFECTO DE LA INGESTA Y EL FRIO EN LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS HEPATICOS.

1.4.2.3.1.-Composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas y mitocondrias.

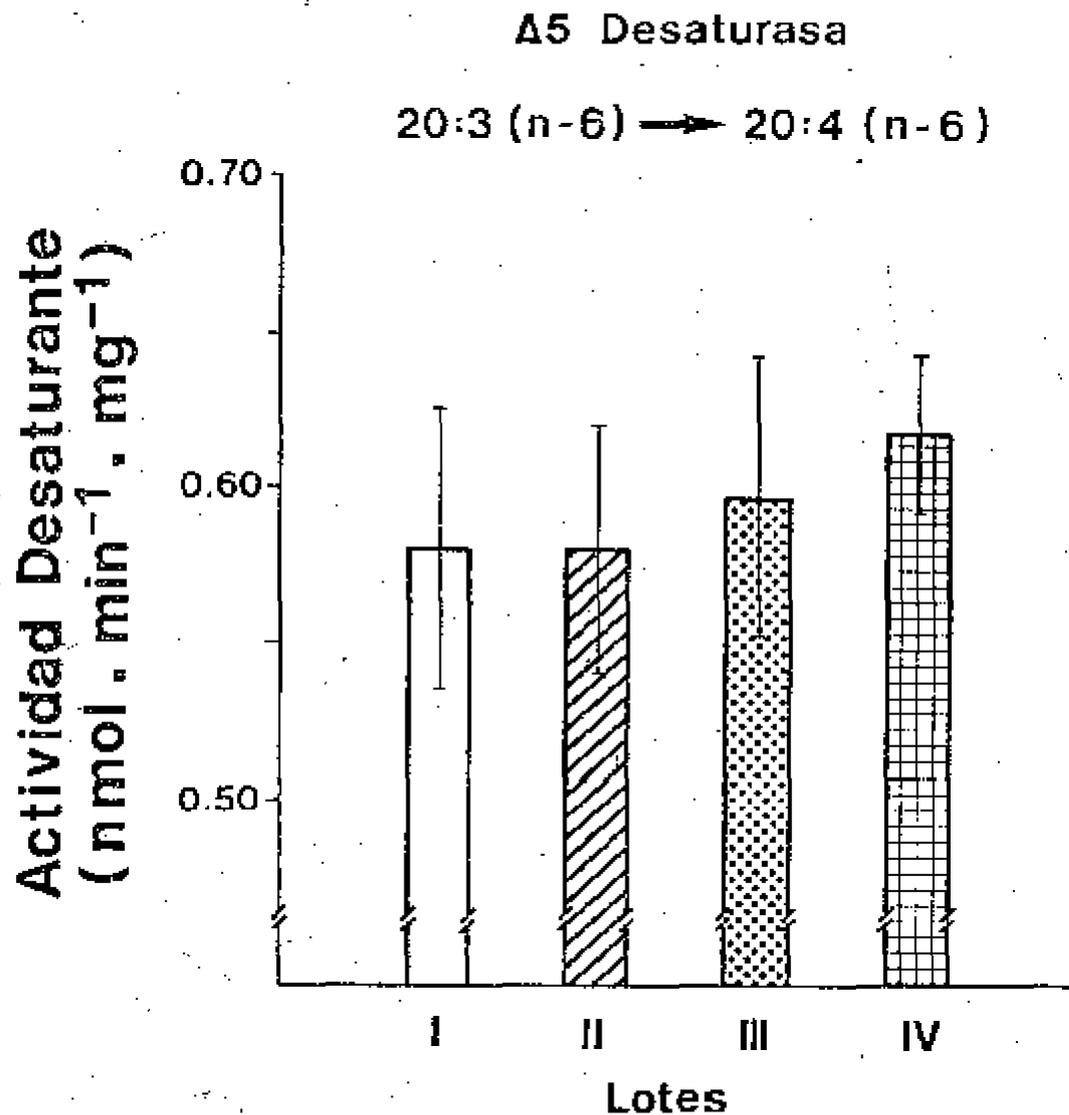
Las Tablas 1.13. y 1.14. muestran la composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas y mitocondrias hepáticas, respectivamente. Las variaciones observadas en la composición de ácidos grasos de microsomas y mitocondrias de hígado de rata, fueron en general similares.

Las ratas a 5 C con comida ad libitum (lote II) presentaron en ambas fracciones subcelulares, un aumento en el porcentaje de 18:0 y una disminución en el de 18:1. Sólo en mitocondrias disminuyó significativamente el porcentaje de 16:1. Estos cambios en la composición de ácidos grasos concuerdan con la disminución en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa que presentaron las ratas de este lote (Fig. 1.5.).

En el lote III, se observaron las mismas modificaciones que en el lote II en los porcentajes de los ácidos 18:1, 18:0 y 16:1 de los lípidos de microsomas y mitocondrias hepáticas. Al igual que en el grupo II, estos cambios son consecuencia de la disminución en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa

Figura 1.7.

Efecto del frío ambiental y la restricción de alimentos en la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa.



Las especificaciones de esta figura son las mismas que las de la Fig. 1.5..

Tabla 1.13.

Efecto de la ingesta y el frío ambiental en la composición de ácidos grasos de microsomas hepáticos.

Acido graso (%)	Lote I Control ad libitum	Lote II Frío ad libitum	Lote III Frío-Aliment. como lote I	Lote IV Control-Crec. como lote II
16:0	21,4 ± 0,1	20,7 ± 0,4	20,2 ± 0,2**	18,9 ± 0,4*
16:1	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,5 ± 0,5	0,7 ± 0,4***
18:0	20,7 ± 0,2	23,5 ± 0,3*	23,8 ± 0,4*	24,3 ± 0,5*
18:1	10,2 ± 0,2	8,3 ± 0,3**	8,2 ± 0,4**	8,2 ± 1,7
18:2~	15,1 ± 0,4	15,3 ± 0,3	15,2 ± 0,5	14,7 ± 0,6
20:3~	2,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2***	1,4 ± 0,1**	1,7 ± 0,2***
20:4~	21,0 ± 0,3	21,0 ± 0,6	22,8 ± 0,2**	25,5 ± 1,2**
22:5"	2,5 ± 0,2	2,1 ± 0,1	1,6 ± 0,1**	1,4 ± 0,2**
22:6"	4,6 ± 0,2	5,2 ± 0,3	5,3 ± 0,3	4,5 ± 0,4
20:4~/	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,1***
18:2~				
Indice isatu.s	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,1

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquido como se describe en la sección 1.2.5.4.. Solo se consideraron los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción. Los resultados tabulados corresponden a la media de 4 ratas por lote ± E.S.. El tratamiento que recibió cada lote se detalla en la sección 1.3.2.. ~ y " : ácidos de las familias n-6 y n-3 respectivamente. a Índice de insaturación: se describe en la Tabla 1.8.. Diferencia significativa respecto del control: *, P<0,001; **, P<0,01 y ***, P<0,05.

Tabla 1.14.

Efecto de la ingesta y el frío ambiental en la composición de ácidos grasos de mitocondrias hepáticas.

Acido graso (%)	Lote I Control ad libitum	Lote II Frío ad libitum	Lote III Frío-Aliment. como lote I	Lote IV Control-Crec. como lote II
16:0	20,0 ± 0,2	20,3 ± 0,5	17,8 ± 0,5**	17,3 ± 0,4*
16:1	2,0 ± 0,1	1,6 ± 0,1***	1,4 ± 0,1**	1,4 ± 0,1**
18:0	18,0 ± 0,3	20,7 ± 0,3*	21,3 ± 0,3*	21,1 ± 0,2*
18:1	10,9 ± 0,1	9,0 ± 0,3*	9,1 ± 0,2*	6,5 ± 0,2*
18:2 [~]	21,7 ± 0,4	22,3 ± 0,2	22,0 ± 0,3	22,7 ± 0,7
20:3 [~]	1,9 ± 0,1	1,3 ± 0,1**	1,5 ± 0,3	1,2 ± 0,1**
20:4 [~]	19,7 ± 0,4	18,8 ± 0,3	20,8 ± 0,3	23,2 ± 0,9***
22:5 [~]	2,1 ± 0,3	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,3	1,0 ± 0,1**
22:6 [~]	3,7 ± 0,3	4,1 ± 0,2	4,2 ± 0,3	3,6 ± 0,3
20:4 [~] /	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
18:2 [~]				
Indice insat.a	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,1

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquido como se describe en la sección 1.2.5.4.. Solo se consideraron los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción. Los resultados tabulados corresponden a la media de 4 ratas por lote ± E.S..El tratamiento que recibió cada lote se detalla en la sección 1.3.2.. ~ y " : Ácidos de las familias n-6 y n-3 respectivamente. a Índice de insaturación: se describió en la Tabla 1.8. Diferencia significativa respecto del control: *, P<0,001; **, P<0,01 y ***, P<0,05.

observada en el lote III. Sólo los microsomas tuvieron una disminución en el porcentaje de 20:3 n - 6 y aumento en el de 20:4 n - 6, que concuerda con el aumento observado en la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa de este lote III (Fig. 1.6.) (la Δ^6 desaturasa cataliza el paso limitante en la biosíntesis de ácidos polinosaturados (13)).

El lote IV presentó un aumento en el porcentaje de 18:0 y disminución en el de 16:1, tanto en microsomas como en mitocondrias. El porcentaje de 18:1 sólo disminuyó en mitocondrias. Estos cambios son consecuencia de la disminución observada en la actividad enzimática de la Δ^8 desaturasa de este lote. Por otra parte, en ambas fracciones se observó una disminución en el porcentaje de 20:3 n - 6 y un aumento en el de 20:4 n - 6, que podrían ser atribuidos al aumento observado en la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa (Fig. 1.6.).

1.4.2.3.2.- Composición de ácidos grasos de las fracciones fosfolipídicas mayoritarias de microsomas.

Se midió además la composición de ácidos grasos de las fracciones fosfolipídicas mayoritarias de los microsomas, con el fin de determinar si en estas fracciones se observaban las mismas variaciones en la composición de ácidos grasos que las observadas en los lípidos totales (medidos anteriormente, sección 1.4.2.3.1.) por efecto de la temperatura ambiental.

La composición de ácidos grasos de fosfatidilcolina,

fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol de los 4 lotes se detalla en las Tablas 1.15., 1.16. y 1.17. respectivamente.

En general, las variaciones observadas en la composición de ácidos grasos de las tres fracciones fosfolipídicas de los 4 lotes de animales, fueron equivalentes a las observadas en la composición de ácidos grasos de lípidos totales.

Se observó una disminución en los porcentajes de los ácidos 16:1 y 18:1 (aunque no siempre en forma significativa) y un aumento en el de 18:0, perteneciente a fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de los lotes II, III y IV. Estas variaciones serían consecuencia de la disminución observada en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa en dichos lotes (Fig. 1.5.).

Con respecto a la familia n - 6 de ácidos grasos de las ratas mantenidas a 5 C con comida ad libitum (lote II), sólo se observó una disminución en el porcentaje de 18:2 y 20:3 y un aumento en el de 20:4 de fosfatidilcolina, ya que no se modificaron los pertenecientes a fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol. Por otro lado, los lotes III y IV también presentaron una disminución en el porcentaje de 20:3 y un aumento en el de 20:4 de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol, mientras que las variaciones observadas en fosfatidiletanolamina en el porcentaje de estos dos ácidos grasos no siempre fueron significativas.

Tabla 1.15.

Efecto de la ingesta y el frío ambiental en la composición de ácidos grasos de fosfatidilcolina de microsomas de hígado de rata.

Ácido graso (%)	Lote I Control ad libitum	Lote II Frío ad libitum	Lote III Frío-Aliment. como lote I	Lote IV Control-Crec. como lote II
16:0	22,5 ± 0,5	23,3 ± 1,7	20,0 ± 1,2	20,9 ± 0,1
16:1	2,1 ± 0,1	1,2 ± 0,1*	0,6 ± 0,6***	0,4 ± 0,4**
18:0	19,2 ± 0,1	23,3 ± 0,2*	22,3 ± 0,1*	23,4 ± 0,2*
18:1	10,1 ± 0,1	6,8 ± 0,2*	6,9 ± 0,1*	5,9 ± 0,8*
18:2 [~]	17,6 ± 0,8	13,1 ± 1,3***	14,4 ± 0,2**	14,6 ± 2,4
20:3 [~]	2,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1*	1,1 ± 0,3**	0,9 ± 0,4***
20:4 [~]	20,4 ± 0,4	21,9 ± 0,2***	25,1 ± 1,2**	25,8 ± 0,8*
22:5 [*]	1,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1*	4,0 ± 2,4	4,2 ± 2,8
22:6 [*]	4,1 ± 0,4	5,4 ± 0,9	5,0 ± 0,3	3,7 ± 0,4
20:4 ^{~/} 18:2 [~]	1,2 ± 0,1	1,7 ± 0,1**	1,7 ± 0,2***	1,8 ± 0,2***

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquida como se describe en la sección 1.2.5.. Solo se consideraron los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción. Se trabajó con un "pool" de 2 ratas por lote. [~] y ^{*}: ácidos de las familias n-6 y n-3, respectivamente. Los datos tabulados corresponden a la media de 5 determinaciones ± E.S.. Diferencia significativa respecto del control: *, P<0,001; **, P<0,01 y ***, P<0,05.

Tabla 1.16.

Efecto de la ingesta y el frío ambiental en la composición de ácidos grasos de fosfatidiletanolamina de microsomas de hígado de rata.

Acido graso (%)	Lote I Control ad libitum	Lote II Frío ad libitum	Lote III Frío-Aliment. como lote I	Lote IV Control-Crec. como lote II
16:0	22,4 ± 0,6	20,3 ± 1,5	19,2 ± 0,5**	18,4 ± 0,4*
16:1	2,0 ± 0,1	0,8 ± 0,2*	0,4 ± 0,4*	0,8 ± 0,2*
18:0	18,7 ± 0,2	24,0 ± 1,3**	22,4 ± 0,2*	24,6 ± 0,2*
18:1	8,4 ± 0,7	6,8 ± 0,5	6,6 ± 0,4	6,6 ± 1,0
18:2~	11,1 ± 0,4	10,0 ± 1,2	11,5 ± 1,1	11,6 ± 2,6
20:3~	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,8 ± 0,1***	0,8 ± 0,3
20:4~	24,0 ± 0,9	23,8 ± 1,4	23,2 ± 0,7	26,9 ± 0,8***
22:5"	4,8 ± 0,4	3,8 ± 0,4	2,7 ± 0,1**	2,4 ± 0,9***
22:6"	6,6 ± 0,7	8,4 ± 0,9	12,4 ± 1,5**	7,3 ± 0,9
20:4~/	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,4	2,0 ± 0,2	2,3 ± 0,3
18:2~				

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquido como se describe en la sección 1.2.5.4.. Solo se consideraron los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción. Se trabajó con un "pool" de 2 ratas por lote. ~ y " : ácidos de las familias n-6 y n-3 respectivamente. Los datos tabulados corresponden a la media de 5 determinaciones ± E.S.. Diferencia significativa respecto del control: *, P<0,001; **, P<0,01 y ***, P<0,05.

Tabla 1.17.

Efecto de la ingesta y el frío ambiental en la composición de ácidos grasos de fosfatidilinositol de microsomas de hígado de rata.

Acido graso (%)	Lote I Control ad libitum	Lote II Frío ad libitum	Lote III Frío-Aliment. como lote I	Lote IV Control-Crec. como lote II
16:0	10,0 ± 0,4	8,8 ± 0,7	7,4 ± 0,8***	6,8 ± 1,4
16:1	0,5 ± 0,4	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,6	0,7 ± 0,7
18:0	38,7 ± 1,7	40,2 ± 0,2	40,4 ± 1,9	40,6 ± 0,7
18:1	4,7 ± 0,2	3,7 ± 0,1**	3,3 ± 0,2**	3,4 ± 1,0
18:2~	4,8 ± 0,1	4,6 ± 0,4	4,4 ± 0,5	4,4 ± 0,8
20:3~	3,6 ± 0,4	2,6 ± 0,6	1,6 ± 0,2**	2,4 ± 0,1***
20:4~	30,8 ± 0,6	33,6 ± 1,5	37,4 ± 1,4**	37,3 ± 1,1*
22:5 ⁿ	3,1 ± 0,8	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,8 ± 0,2
22:6 ⁿ	4,1 ± 0,5	3,8 ± 0,2	3,1 ± 0,3	3,3 ± 0,4
20:4~/	6,4 ± 0,7	7,3 ± 0,8	8,5 ± 0,8	8,5 ± 0,9
18:2~				

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquido como se describe en la sección 1.2.5.4.. Solo se consideraron los ácidos grasos que se encuentran en mayor proporción. Se trabajó con un pool de 2 ratas por lote. ~ y ⁿ: ácidos de las familias n-6 y n-3 respectivamente. Los datos tabulados corresponden a la media de 5 determinaciones ± E.S.. Diferencia significativa respecto del control: *, P<0,001; **, P<0,01 y ***, P<0,05.

1.4.3.-EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS Δ_6 Y Δ_5 DESATURASA DEPRIMIDAS POR UNA DIETA HIPERGLUCIDICA.

Teniendo en cuenta que la actividad enzimática de la Δ_6 desaturasa no se modificó por efecto de diferentes temperaturas ambientales durante distintos periodos de exposición (Fig. 1.3.), se estudió el efecto de la temperatura ambiental en ratas que tenían la actividad enzimática de la Δ_6 desaturasa deprimida a causa de haber recibido los 2 días previos una dieta hiperglucídica (DH). Estos experimentos se realizaron utilizando 6 lotes de ratas, cuya descripción se detalla en la sección 1.3.3..

1.4.3.1.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN LA INGESTA, GRADO DE CRECIMIENTO, CONVERSION DE ALIMENTOS Y PESO HEPATICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA CONTROL (DC) E HIPERGLUCIDICA (DH).

Las variaciones observadas en el grado de crecimiento y conversión de alimentos por efecto de la temperatura ambiental en ratas alimentadas con DC (Tabla 1.18.) son equivalentes a las que presentaron los animales alimentados con dieta comercial a esas mismas temperaturas ambientales (Tabla 1.6.), ya que, a 12 C (lote I) las ratas tuvieron una disminución en el grado de crecimiento y conversión de alimentos respecto a 24 C, mientras

Tabla 1.18.

Efecto de la temperatura ambiental en la ingesta, grado de crecimiento, conversión de alimentos y peso hepático de ratas alimentadas con dieta control (DC) e hiperglucídica (H).

	12		24		31	
	DC	H	DC	H	DC	H
Ingesta (g/g)	0,120 ± 0,005	0,119 ± 0,002	0,137 ± 0,006	0,115 ± 0,004	0,137 ± 0,008	0,087 ± 0,0024
Grado de crec. (g/día)	3,0 ± 0,24	3,8 ± 0,4	4,7 ± 0,81	3,1 ± 0,3	5,1 ± 0,44	2,9 ± 0,34
Conversión de alimentos	27,1 ± 3,04	30,5 ± 3,2	45,3 ± 4,98	26,9 ± 2,6	39,2 ± 4,16	29,7 ± 3,2
Peso hepático (g)	9,2 ± 0,5	9,7 ± 0,6	9,3 ± 0,3	9,4 ± 0,3	9,3 ± 0,5	8,5 ± 0,7

Los términos ingesta, grado de crecimiento, conversión de alimentos y peso corporal están explicados en la Tabla 1.6. Los valores tabulados corresponden a la media de 5 ratas por lote ± E.S. Los lotes se describen en la sección 1.1.3. Los lotes indican diferencias significativas para P(0,00); a: lote I vs lote II; b: III vs IV; c: V vs VI; d: I vs III; e: I vs VI; f: III vs VI; g: II vs III; h: II vs IV; i: II vs V; j: II vs VI; k: III vs IV; l: III vs V; m: III vs VI; n: IV vs V; o: IV vs VI; p: V vs VI; q: I vs II; r: I vs III; s: I vs IV; t: I vs V; u: I vs VI; v: II vs III; w: II vs IV; x: II vs V; y: II vs VI; z: III vs IV; aa: III vs V; ab: III vs VI; ac: IV vs V; ad: IV vs VI; ae: V vs VI; af: I vs II; ag: I vs III; ah: I vs IV; ai: I vs V; aj: I vs VI; ak: II vs III; al: II vs IV; am: II vs V; an: II vs VI; ao: III vs IV; ap: III vs V; aq: III vs VI; ar: IV vs V; as: IV vs VI; at: V vs VI; au: I vs II; av: I vs III; aw: I vs IV; ax: I vs V; ay: I vs VI; az: II vs III; ba: II vs IV; bb: II vs V; bc: II vs VI; bd: III vs IV; be: III vs V; bf: III vs VI; bg: IV vs V; bh: IV vs VI; bi: V vs VI; bj: I vs II; bk: I vs III; bl: I vs IV; bm: I vs V; bn: I vs VI; bo: II vs III; bp: II vs IV; bq: II vs V; br: II vs VI; bs: III vs IV; bt: III vs V; bu: III vs VI; bv: IV vs V; bv: IV vs VI; bw: V vs VI; bx: I vs II; by: I vs III; bz: I vs IV; ca: I vs III; cb: I vs IV; cc: I vs V; cd: I vs VI; ce: II vs III; cf: II vs IV; cg: II vs V; ch: II vs VI; ci: III vs IV; cj: III vs V; ck: III vs VI; cl: IV vs V; cl: IV vs VI; cm: V vs VI; cn: I vs II; co: I vs III; cp: I vs IV; cq: I vs V; cr: I vs VI; cs: II vs III; ct: II vs IV; cu: II vs V; cv: II vs VI; cw: III vs IV; cx: III vs V; cx: III vs VI; cy: IV vs V; cy: IV vs VI; cz: V vs VI; ca: I vs II; cb: I vs III; cc: I vs IV; cd: I vs V; ce: I vs VI; cf: II vs III; cg: II vs IV; ch: II vs V; ch: II vs VI; ci: III vs IV; cj: III vs V; ck: III vs VI; cl: IV vs V; cl: IV vs VI; cm: V vs VI; cn: I vs II; co: I vs III; cp: I vs IV; cq: I vs V; cr: I vs VI; cs: II vs III; ct: II vs IV; cu: II vs V; cv: II vs VI; cw: III vs IV; cx: III vs V; cx: III vs VI; cy: IV vs V; cy: IV vs VI; cz: V vs VI;

que no se modificò la ingesta ni el peso hepático.

Cuando los animales se alimentaron con DH, la ingesta disminuyò a 31 C y no se observaron variaciones en el grado de crecimiento, conversiòn de alimentos ni peso hepático de las ratas expuestas a las diferentes temperaturas ambientales.

Si se compara el comportamiento de estos parámetros ⁴ a una misma temperatura pero con diferente dieta, se observa que la ingesta disminuye a 31 C con DH, y que el grado de crecimiento y la conversiòn de alimentos disminuyen a 24 y 31 C con DH con respecto a los lotes alimentados con DC. A 12 C no hay diferencia en el grado de crecimiento y conversiòn de alimento de los animales alimentados con DH respecto a los que recibieron DC, ya que a 12 C con DC, estos 2 parámetros disminuyen respecto a 24 C.

1.4.3.2.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS $\Delta 6$ Y $\Delta 5$ DESATURASAS DEPRIMIDAS POR UNA DIETA HIPERGLUCIDICA.

1.4.3.2.1.- $\Delta 6$ Desaturasa.

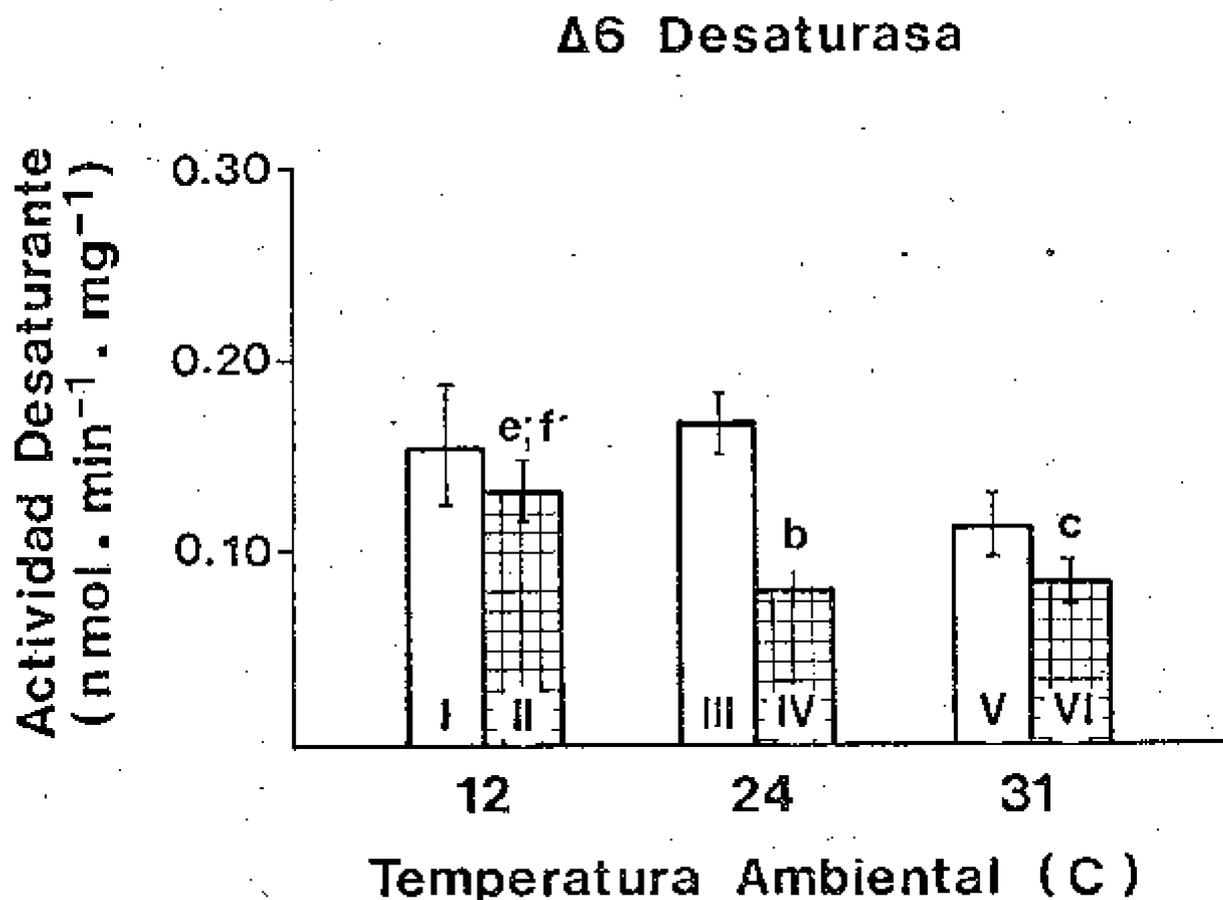
Confirmando resultados anteriores (Fig. 1.3.), en los animales alimentados con DC no se modificò la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa al transferir las ratas de 24 a 12 y 31 C (Fig. 1.8.).

Por el contrario, en los lotes alimentados con DH la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa aumentò en los animales mantenidos a 12 C respecto a los que estuvieron a 24 y 31 C.

La dieta hiperglucidica provocò una disminuciòn en la

Figura 1.8.

Efecto de la temperatura ambiental en la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa de ratas alimentadas con dieta control (DC) e hiperglucídica (DH).



Los ensayos enzimáticos se describen en la sección 1.2.6.. Los resultados graficados corresponden a la media de 5 ratas por lote \pm E.S.. El tipo de lote (DC: \square y DH: \boxplus) se especifica en cada barra (sección 1.3.3.). Las letras sobre las barras indican diferencias significativas del 1%: a, lote I vs lote II; b, III vs IV; c, V vs VI; d, I vs VI; e, II vs IV; f, II vs VI; g, III vs V; a', c', e' y f' corresponden a diferencias significativas del 5%.

actividad de la Δ^6 desaturasa en los lotes expuestos a una temperatura ambiental de 24 y 31 C, respecto a los lotes alimentados con DC a esas mismas temperaturas. Mientras que a 12 C no se observaron diferencias significativas en la actividad desaturante entre los lotes alimentados con DH y DC. Estos resultados indicarian que el efecto depresor de la dieta hiperglucidica es contrarrestado en el frio por un aumento en la actividad de la Δ^6 desaturasa.

1.4.3.2.2.- Δ^5 Desaturasa.

Se observò un aumento en la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa de ratas alimentadas con DC y DH a 12 C respecto a 31 C (Fig. 1.9.), mientras que sòlo hubo un aumento en la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa a 12 C respecto de 24 C, en los animales alimentados con DH. La mayor actividad enzimática se observò a la menor temperatura ambiental.

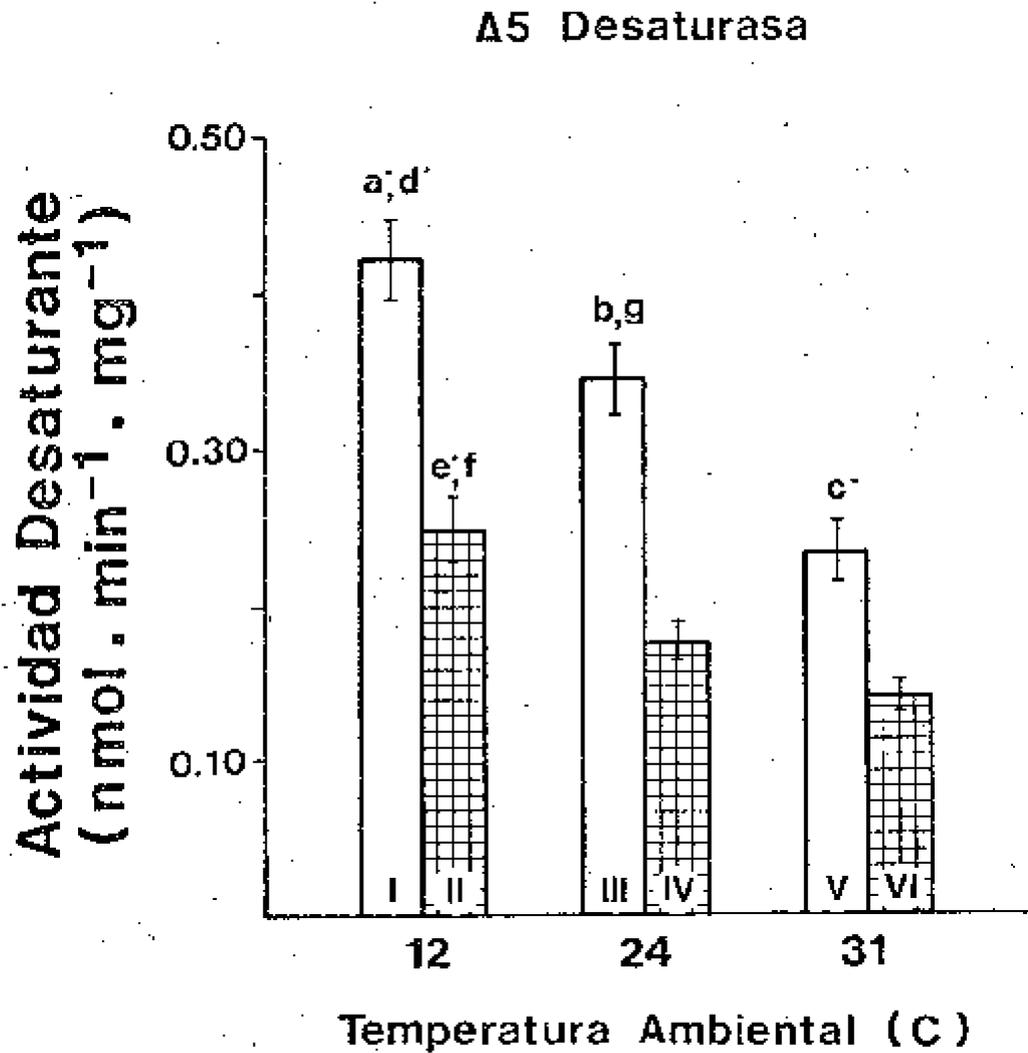
Por otro lado, independientemente de la temperatura a que estuvieron expuestos los animales, la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa disminuyò en los lotes con DH respecto de los de DC.

1.4.3.3.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE LIPIDOS TOTALES DE RATAS ALIMENTADAS CON DC Y DH.

Los animales alimentados con DH y mantenidos a 12 C tuvieron un índice de insaturación mayor que los que estuvieron a 24 y 31

Figura 1.9.

Efecto de la temperatura ambiental en la actividad enzimática de la $\Delta 5$ desaturasa de ratas alimentadas con dieta control (DC) e hiperglucídica (DH).



Las especificaciones de esta figura son las mismas que las de la Fig. 1.8..

C (Tabla 1.19.). Esto sería consecuencia de la mayor actividad enzimática de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasa en ese lote (Fig. 1.8. y 1.9.). En todos los lotes, la disminución observada en el cociente 20:4 n-6 / 18:2 n-6, se acompañó con una disminución en la actividad enzimática de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas, a excepción de las ratas mantenidas a 12 C en las que la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa no se modificó.

Los animales alimentados con DC y DH a 12 C presentaron una disminución en el porcentaje del 20:3 n-6 y un aumento en el de 20:4 n-6 cuando se los compara con aquellas ratas mantenidas a una temperatura ambiental mayor; estos cambios podrían atribuirse al aumento observado en la actividad enzimática de la $\Delta 5$ desaturasa causada por las bajas temperaturas (Fig. 1.9.).

Tabla 1.19.

Efecto de la temperatura ambiental en la composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas de ratas alimentadas con dieta control (DC) e hiperglicídica (DH).

Temperatura (°C)	12		24		31	
Dieta	DC	DH	DC	DH	DC	DH
Lote	I	II	III	IV	V	VI
Ácido graso						
(%)						
16:0	15,4 ± 0,34	15,5 ± 0,31	17,3 ± 0,41	17,0 ± 0,3	18,6 ± 0,41	18,2 ± 0,74
16:1	0,2 ± 0,24	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,20	1,2 ± 0,11	1,6 ± 0,24	1,6 ± 0,14
18:0	24,1 ± 0,3	24,8 ± 0,3	22,2 ± 1,0	23,2 ± 0,46	20,9 ± 1,04	19,6 ± 0,81
18:1	8,7 ± 0,2	9,1 ± 0,2	10,0 ± 0,2	10,2 ± 0,4	9,9 ± 0,6	11,1 ± 0,61
18:2 n-6	13,4 ± 0,51	13,2 ± 0,3	13,8 ± 0,51	13,6 ± 0,2	13,9 ± 0,4	13,9 ± 0,70
20:3 n-6	0,9 ± 0,12	1,2 ± 0,4	1,0 ± 0,10	1,5 ± 0,11	1,6 ± 0,12	1,9 ± 0,21
20:4 n-6	31,7 ± 0,41	29,2 ± 0,41	31,8 ± 1,20	29,6 ± 0,31	28,9 ± 0,32	26,4 ± 0,61
22:5 n-3	1,0 ± 0,12	1,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,3 ± 0,12
22:6 n-3	4,6 ± 0,3	4,2 ± 0,13	4,6 ± 0,21	3,2 ± 0,31	3,4 ± 0,3	3,8 ± 0,3
20:4 n-6/	2,4 ± 0,11	1,8 ± 0,1	2,3 ± 0,20	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,11	1,7 ± 0,12
18:2 n-6						
Índice de	1,87 ± 0,014	1,79 ± 0,013	1,86 ± 0,014	1,70 ± 0,021	1,76 ± 0,014	1,73 ± 0,011
insat.s						

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquida como se describe en la sección 1.2.3.4. Las ratas se alimentaron con dieta control o hiperglicídica y agua ad libitum y se mantuvieron a una temperatura ambiental de 12, 24 o 31 °C (sección 1.3.3.). Los resultados tabulados corresponden a la media de 5 ratas ± E.R. el índice de insaturación se describió en la tabla 1.6. Las letras indican diferencias significativas del 1 % a, lote I vs lote II; b, III vs IV; c, V vs VI; d, I vs III; e, I vs V; f, III vs VI; g, II vs IV; h, II vs VI; i, IV vs VI. a', b', c', f', g', h', i' corresponden a diferencias significativas de 5 %.

1.5.- DISCUSION.

1.5.1.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN EL METABOLISMO LIPIDICO.

Como ya se detallara en la introducción de este capítulo, cuando una rata es expuesta al frío, se desencadenan procesos de adaptación de termogénesis por escalofrío (TE) o independiente de escalofrío (TIE) dependiendo de las condiciones (158), tendientes a disminuir las pérdidas de calor y a aumentar la producción del mismo. Los principales sustratos utilizados en esta termogénesis aumentada son los ácidos grasos y la glucosa. Los ácidos grasos son provistos por un aumento en la lipólisis del tejido adiposo blanco y pardo (165-167,225), mientras que el aumento observado en la concentración de glucosa se debe a una elevada glucogenólisis y gluconeogénesis hepáticas (180,226). Junto con los sustratos endógenos, también son utilizados en este proceso de termogénesis aumentada, los sustratos de origen exógeno aportados por la ingesta aumentada. Esta es la razón por la que, cuando ratas macho son mantenidas a 5 C durante 5 días (Tabla 1.6.), a pesar de presentar un aumento en la ingesta, su grado de crecimiento y conversión de alimentos disminuyen, ya que las calorías son utilizadas preferentemente en la producción de calor para poder mantener constante la temperatura corporal. Por otro lado, los procesos de adaptación que se pudieran producir entre el quinto y décimo quinto día de exposición a 5 C, no provocan

modificaciones adicionales en estos parámetros (Tabla 1.6.).

Estos datos concuerdan con los encontrados por Bakke y Lawrence (227) y por Kuhn y col. (228) en ratas aclimatadas al frío. Las ratas mantenidas a 12 C durante 5 días también presentaron una disminución en el grado de crecimiento y conversión de alimentos, aunque en este caso, la ingesta no se modificó.

Por otro lado, los procesos de adaptación que se desencadenan cuando una rata es mantenida a temperaturas elevadas, tendientes a aumentar las pérdidas de calor y disminuir su producción, determinan que el grado de crecimiento y la ingesta de los animales disminuya una vez que éstos se han adaptado a las nuevas condiciones ambientales (194,206,208). Sin embargo, nosotros no observamos ninguna modificación en dichos parámetros cuando las ratas se mantuvieron a 31 C durante 5 y 15 días, a excepción de la ingesta que disminuyó a 31 C pero sólo luego de 15 días de exposición a esa temperatura (Tabla 1.6.). Esto estaría indicando que en estos períodos de 5 y 15 días de exposición a 31 C, los animales no estarían totalmente adaptados a vivir en el calor.

1.5.2.- EFECTO DE DEFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN LOS NIVELES SERICOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Teniendo en cuenta que las hormonas tiroideas juegan un importante papel en los procesos de adaptación de los mamíferos a

las distintas temperaturas ambientales (sección 1.1.), se midieron los niveles séricos de dichas hormonas (T4: tiroxina y T3: triiodotironina) en las ratas transferidas al frío y al calor, con el fin de determinar el grado de modificación de las mismas en nuestras condiciones experimentales (Tabla 1.7.).

Se observó que los niveles séricos de T4 disminuyeron en las ratas mantenidas a 5 y a 31 C durante 5 días, mientras que los de T3 sólo se modificaron en el lote a 31 C en el que disminuyeron. Estos resultados concuerdan con los niveles séricos de las hormonas tiroideas observados en ratas (228) y hamster (229) adaptados al frío, y con los de ratas mantenidas a 34 C (208) durante varias semanas.

La disminución observada en los niveles séricos de T4, podría deberse principalmente a dos causas: 1) una disminución en su producción y 2) un aumento en su utilización. En los animales mantenidos a 31 C, la primera causa sería la más probable, ya que en estas condiciones ambientales hay una disminución en la actividad tiroidea (194,209) y ésta explicaría la disminución observada en los niveles séricos de T4 y T3. Por el contrario, en el lote mantenido a 5 C, la disminución en la concentración sérica de T4 sería consecuencia de la segunda causa, ya que habría una mayor utilización de la hormona en los tejidos periféricos.

Para transformarse en hormona metabólicamente activa, la T4 debe ser deiodinada enzimáticamente y así transformada en T3. Esto ocurre en los tejidos periféricos de la oveja, rata y

humanos (230,231). Por otro lado, el 36 % de la T4 es deiodinado enzimáticamente en "T3 reversa" (T3r) que es metabólicamente inactiva (Introducción del capítulo 2).

Durante la exposición al frío, el aumento en la utilización de la T4 por parte de los tejidos periféricos, se debería a una alteración en la deiodinación de la hormona, determinando que una mayor proporción de T4 se deiodine en T3 (232-234) en detrimento de la producción de T3r a partir de la T4 (229).

1.5.3.- EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL EN LA RELACION FUIDEZ DE MEMBRANA - ACTIVIDAD DESATURANTE.

Como ya se indicara en la introducción, modificaciones en la temperatura de crecimiento de microorganismos y de animales poiquiloterms determinan variaciones en la composición lipídica de los mismos, tendientes a mantener los lípidos de las respectivas membranas en un estado físico adecuado. En el caso de los animales homeoterms el efecto de la temperatura ambiental no es tan obvio, ya que éstos mantienen su temperatura corporal constante sobre un amplio rango de diferentes temperaturas ambientales, a través de mecanismos de adaptación regulados por el sistema nervioso y el endócrino (sección 1.1.).

Por otro lado, la actividad enzimática de las desaturasas de animales homeoterms se modifica cuando se alteran las propiedades fisicoquímicas de la membrana microsomal. En estos experimentos se variaron las propiedades fisicoquímicas de las

membranas: modificando la composición de las mismas en ensayos "in vitro" (235,236) y alimentando los animales con dietas de diferente composición (96,101,102).

Teniendo en cuenta esta correlación que existe entre la fluidez de la membrana microsomal y la actividad desaturante de la misma, se estudiaron algunos de los parámetros que afectan la fluidez de la membrana microsomal. Con tal fin, se determinó la composición fosfolipídica y el índice de insaturación de microsomas hepáticos de ratas mantenidas a 5, 24 y 31 C (Tablas 1.9. y 1.8.). En estos estudios, en general, no se observaron diferencias significativas en dichos parámetros por efecto de las distintas temperaturas ambientales. Estos resultados son coherentes con los de anisotropía de fluorescencia (usando como fluoróforo al 1,8-difenil-1,3,5-hexatrieno) de estos microsomas, ya que ésta tampoco se modificó por efecto de la temperatura ambiental (Tabla 1.11.).

Por otro lado, a partir de estos resultados, quedaría claro que las variaciones observadas en la actividad desaturante por efecto de la temperatura ambiental en la rata, no se producirían a través de modificaciones de la fluidez de la membrana microsomal en la que dichas enzimas se encuentran.

1.5.4.- EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL EN LA COMPOSICION FOSFOLIPIDICA MITOCONDRIAL.

Es interesante destacar, que si bien la composición

fosfolipídica microsomal en general no se modificó, por efecto de la temperatura (Tabla 1.9.), los fosfolípidos de mitocondrias hepáticas sufrieron importantes variaciones a 5 y a 31 C (Tabla 1.10.). El porcentaje de FC disminuyó, mientras que el de su precursor FE aumentó en los lotes a 5 y 31 C; y solamente en el frío disminuyó el de EM.

Por otro lado, estas variaciones observadas en mitocondrias hepáticas de ratas mantenidas a 5 C, coinciden con las encontradas en mitocondrias de tejido adiposo pardo de ratas expuestas a una temperatura ambiental de 4 C (237).

Esta disminución en el contenido de FC y aumento de FE (su precursor), podrían sugerir que tanto en los animales mantenidos a 5 como a 31 C, la transmetilación estaría disminuida (FE, FC).

1.5.5.- EFECTO DE DIFERENTES TEMPERATURAS AMBIENTALES EN LA ACTIVIDAD DESATURANTE MICROSOMAL DE HIGADO DE RATAS MACHO.

1.5.5.1.- Δ^9 Desaturasa.

En estudios previos hechos en el laboratorio por Gozález y col. (139), se encontró que la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa no se modificaba cuando ratas macho eran transferidas a 14 ± 1 C luego de haber sido adaptadas a 31 ± 1 C, mientras que ratas hembras adaptadas a las mismas condiciones presentaban una disminución en dicha actividad enzimática. Sin embargo, nosotros observamos que cuando se disminuye la temperatura ambiental de 24

a 5 o 12 C, las ratas macho mantenidas a esa menor temperatura y alimentadas ad libitum, presentan la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa disminuida (Fig. 1.2.). Esta disminución en la actividad desaturante, sería la causa de la disminución observada en el porcentaje de los ácidos 16:1 y 18:1 y aumento de 18:0, tanto de fosfatidilcolina (Tabla 1.15.), fosfatidiletanolamina (Tabla 1.16.) y lípidos totales de microsomas (Tabla 1.8.), como de lípidos totales de mitocondrias hepáticas (Tabla 1.14.). Mientras que, por otro lado, la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa no se modificó al aumentar la temperatura ambiental de 24 a 31 C durante 5 y 15 días (Fig. 1.2.).

A partir de estos resultados y teniendo en cuenta que los animales expuestos al frío poseen además una ingesta aumentada y un grado de crecimiento disminuido (Tabla 1.6.), debido a la utilización de las calorías aportadas por la dieta y por los sustratos endógenos en el mantenimiento de la temperatura corporal, se estudió la existencia de alguna correlación entre la ingesta aumentada y el grado de crecimiento disminuido de los animales en el frío con los cambios observados en el metabolismo lipídico.

En estos estudios se observó que las ratas mantenidas a 5 C con comida restringida (lote III), de tal forma que ésta fuera como la de las ratas a 24 C con comida ad libitum, presentaban una disminución en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa aún mayor que la observada en los animales a 5 C con comida ad libitum (lote II) (Fig. 1.5.). Por lo tanto, es poco probable

que la ingesta aumentada causara los cambios observados en el frío en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa. Sin embargo, el grado de crecimiento disminuido de las ratas en el frío, sería un factor importante a tener en cuenta, ya que los animales mantenidos a 24 C con el mismo grado de crecimiento (lote IV) que las ratas en el frío con comida ad libitum también presentaron una disminución en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa. Además en los lotes II, III y IV que presentaron una disminución en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa, también se observó una disminución en el porcentaje de los ácidos 16:1 y 18:1 y aumento de 18:0 (Tablas 1.13. y 1.14.), como consecuencia de la actividad desaturante disminuida.

En el lote II, hubo un balance metabólico negativo (conversión de alimentos disminuida) y la ingesta estuvo aumentada para proveer de sustratos al proceso de termogénesis que está aumentada en el frío. En el lote III, el balance metabólico negativo fue aún mayor que en el lote II, ya que hubo un aumento en el catabolismo de sustratos endógenos en el proceso de termogénesis, debido a la restricción impuesta en la ingesta. Finalmente, las ratas del lote IV también presentaron un balance metabólico negativo, para compensar la restricción de la ingesta, aumentando el uso de sustratos endógenos.

En los lotes II, III y IV, caracterizados por un balance metabólico negativo, la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa estuvo disminuida.

Como ya se indicara en la Introducción, la actividad

enzimática de la Δ^9 desaturasa es muy sensible a factores nutricionales (89,90,238-241) y hormonales (112,113,134,135). Por otra parte, es considerada una enzima lipogénica ya que durante el ayuno, donde el balance metabólico es negativo y la lipólisis está aumentada, la actividad desaturante está disminuida (89); mientras que las dietas lipogénicas son las más eficientes en aumentar la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa (89,24). La lipogénesis y la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa responden a factores regulatorios de la misma forma (242).

Se puede concluir entonces, que la disminución observada en la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa de ratas macho a 5 C, es consecuencia del balance metabólico negativo que poseen los animales en estas condiciones (243).

1.5.5.2.- Δ^6 Desaturasa.

La actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa no se modificó por efecto de la temperatura ambiental al transferir ratas macho al frío o al calor (Fig. 1.3.), ni el porcentaje de 18:2 n - 6 de lípidos totales de microsomas y mitocondrias (Tabla 1.13. y 1.14.). Sólo en fosfatidilcolina de microsomas disminuyó el porcentaje de 18:2 n - 6 y 20:3 n - 6 a pesar de no modificarse en ese lote, la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa (Tabla 1.15.). Hughes y York tampoco observaron modificaciones en la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa por efecto de la temperatura ambiental en el "ratón flaco" (244). Estos resultados concuerdan con los encontrados previamente en nuestro laboratorio.

por González y col. (139) cuando se transfirieron ratas macho de 30-32 C (adaptadas a esta temperatura durante 20 días) a 12 C durante 5 días, ya que en este caso, tampoco se observaron variaciones en la actividad desaturante de la Δ^6 desaturasa. Estos resultados indicarían que los cambios hormonales y metabólicos inducidos por una disminución en la temperatura ambiental que desencadenan un aumento en la termogénesis, no son factores que modifiquen la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa en animales alimentados con una dieta comercial ad libitum. No obstante, en ratas hembra adaptadas a las mismas condiciones, se observó un aumento en la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa debida al frío y, en esta modificación estarían involucrados los niveles séricos de estradiol (156).

Cuando se estudió el efecto de la ingesta y el grado de crecimiento de los animales en el frío, sobre la actividad desaturante, se observó un aumento inesperado en la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa en los lotes con alimentación restringida tanto a 5 C (lote III) como a 24 C (lote IV) (Fig. 1.8.). Estos resultados, son difíciles de explicar ya que en el ayuno la actividad de esta enzima está inhibida (89,97), y estarían enfatizando la importancia de la dieta como otro factor a ser tenido en cuenta en el complejo control de la actividad desaturante.

1.5.5.3.- Δ^5 Desaturasa.

La actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa no se modificó

al disminuir la temperatura ambiental, mientras que disminuyó al transferir ratas de 24 a 31 C (Fig. 1.4.). Esta disminución en la actividad desaturante provocada por el calor, sería la responsable del aumento observado en el porcentaje de 20:3 n - 6 y disminución en el de 20:4 n - 6 de lípidos de microsomas hepáticos de ratas macho, lo que determina además que disminuya el cociente 20:4 n-6 / 18:2 n-6 en dicha fracción subcelular (Tabla 1.8.). Estos resultados serían equivalentes a los encontrados por González y col. (139) cuando transfirieron ratas hembra de 30 - 32 C (mantenidas a esta temperatura durante 20 días) a 12 C, dado que la actividad enzimática de esos animales aumentó. A partir de estos datos, se puede concluir que la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa disminuye al aumentar la temperatura ambiental tanto en ratas macho como en ratas hembra.

Por otro lado, tampoco se observó modificación alguna en la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa, en los lotes con alimentación restringida a 5 C (lote III) como a 24 C (lote IV) (Fig. 1.7.), cuando se estudió el efecto de la ingesta y grado de crecimiento de los animales en el frío sobre la actividad desaturante. Sin embargo, a pesar de no haberse encontrado variaciones en la actividad de dicha desaturasa en los lotes III y IV, éstos presentaron una disminución en el porcentaje del ácido 20:3 n - 6 y un aumento en el de 20:4 n - 6 de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol microsomales (en lípidos totales y fosfatidiletanolamina estas variaciones no siempre

fueron significativas) y en lípidos totales mitocondriales (Tablas 1.13-1.17.). Por lo tanto, estas variaciones en los porcentajes de los ácidos de la familia n - 6, no serían una consecuencia directa de la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa, sino de la Δ^6 desaturasa que presenta una actividad enzimática aumentada en estos lotes y es por otro lado, la enzima reguladora en la síntesis del ácido araquidónico (20:4 n-6).

1.5.6.- EFECTO DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL EN LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LAS Δ^6 Y Δ^5 DESATURASAS DEPRIMIDAS POR UNA DIETA HIPERGLUCIDICA.

Cuando se estudió el efecto de la temperatura ambiental en la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa de ratas macho (Fig. 1.3.), no se observó ningún tipo de modificación en la misma. Estos resultados son coherentes además, con los encontrados en condiciones experimentales equivalentes (139,244). A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta que las ratas hembra a 12 C poseen la actividad enzimática de las Δ^5 y Δ^6 desaturasas aumentada respecto a 31 C (139), se pensó que si se partía de niveles disminuidos en la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa, se podrían observar variaciones en dicha actividad desaturante por efecto de la temperatura ambiental. Por otro lado, se sabe que la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa disminuye en ratas alimentadas con una dieta hiperglucídica (89,90,98), mientras que hasta el momento, no se habían observado

modificaciones significativas a causa de dicha dieta en la actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa (90). Considerando, entonces, todos estos datos y resultados, se midió la actividad enzimática de las Δ^6 y Δ^5 desaturasas en ratas macho alimentadas con dietas control (DC) e hiperglucídica (DH) en animales transferidos de 24 C a 12 y 31 C durante 5 días (las características de cada lote se especifican en la sección 1.3.3.).

1.5.6.1.- Δ^6 Desaturasa.

La actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa no se modificó al transferir ratas macho alimentadas con DC de 24 a 12 y 31 C (Fig. 1.8.). Estos resultados coinciden con los observados a las mismas temperaturas pero en ratas alimentadas con dieta comercial (Fig. 1.3.).

Sin embargo, cuando se disminuyó la temperatura ambiental a 12 C en las ratas alimentadas con DH, la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa aumentó respecto a los animales mantenidos a 24 y a 31 C con DH.

La DH con la que se alimentó a los animales, además de ser hiperglucídica es hipoproteica, ya que un 6 % de las calorías de la misma es aportada por las proteínas, mientras que en la DC éstas aportan un 20 % (sección 1.2.2.). Por otro lado, Peluffo y col. (97) encontraron que la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa no se modifica en ratas mantenidas a 24 C con dietas isocalóricas en las que el 5, 15 o 25 % de las calorías es

aportado por las proteínas. Por lo tanto, podemos suponer que la disminución observada en la actividad enzimática de la $\Delta 6$ desaturasa a 24 y 31 C en ratas alimentadas con una DH respecto a los lotes que recibieron DC a la misma temperatura, se debe al aumento en el contenido de hidratos de carbono y no a la disminución de proteínas de la misma. Por el contrario, la disminución observada a 12 C entre el lote alimentado con DH respecto al lote con DC no fue significativa, sugiriendo que en el frío existirían factores que contrarrestan el efecto depresor de la DH.

1.5.6.2.- $\Delta 5$ Desaturasa.

La actividad enzimática de la $\Delta 5$ desaturasa aumentó en los animales a 12 C respecto a 31 C tanto en las ratas alimentadas con DC como con DH (Fig. 1.9.). Mientras que el aumento sólo fue significativo en los animales mantenidos a 12 C respecto a los que estuvieron a 24 C, cuando se los alimentó con DH.

Por otro lado, la mayor actividad enzimática se observó en los animales mantenidos a la menor temperatura independientemente de la dieta suministrada.

En los animales alimentados con DH, la actividad enzimática de la $\Delta 5$ desaturasa disminuyó con respecto a las ratas que recibieron DC, independientemente de la temperatura ambiental. Sin embargo, Jeffcoat y James (80) no pudieron detectar ninguna variación significativa en la actividad enzimática de la $\Delta 5$ desaturasa de ratas alimentadas con una dieta rica en sacarosa.

Estas variaciones observadas en la actividad enzimática de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas, provocaron modificaciones en la composición de ácidos grasos de la serie n - 6.

En conclusión, estos resultados sugieren que en el frío la actividad enzimática de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas de ratas macho solo aumentaría, cuando éstas se encuentran deprimidas por factores nutricionales, tales como una dieta hiperglucídica (245).

CAPITULO 2

EFFECTO DE LA L-TRIODOTIRONINA EN EL METABOLISMO LIPIDICO

2.1.- INTRODUCCION.

Las hormonas tiroideas son aminoácidos iodados cuya función consiste en modular la actividad de los diversos tejidos del organismo, especialmente aquellos relacionados con el crecimiento, maduración neuromuscular, oxidaciones tisulares y termogénesis.

2.1.1.- GENERALIDADES.

En personas eutiroideas el principal producto de secreción de la glándula tiroidea es la tiroxina (T4). El 20-30 % de la 3,3',5-triiodotironina (T3) circulante también es secretado por la glándula, pero la producción tiroidea de 3,3',5'-triiodotironina (T3 reversa = T3r) es despreciable. El 70-80 % de la T3 y más del 97.5 % de la T3r plasmática se originan a partir de una monodeiodinación de la T4 en posición 5' y 5 respectivamente, en los tejidos periféricos (246).

En la sangre la T3 y la T4 están unidas a proteínas transportadoras y sólo una pequeña fracción de las mismas se encuentra como hormona libre. De estas proteínas, las más importantes son la TBG ("thyroxine binding globulin"), TBPA ("thyroxine binding prealbumin") y la albúmina, aunque se han demostrado interacciones entre las hormonas tiroideas y otras proteínas, incluyendo lipoproteínas (247) y varios tipos de inmunoglobulinas (248). En el caso de la T3, ésta está asociada

con TBG y TBPA, aunque tiene en general, menor afinidad por las proteínas transportadoras que la T4.

La T3 es la hormona que posee la actividad biológica, mientras que la T4 sería su precursor o prohormona (249,250). La T3r presenta escasa actividad biológica. Se ha demostrado que, de acuerdo con el estado metabólico del organismo, tiene preponderancia la conversión de la T4 en T3 o en T3r. En el ayuno la concentración sérica de T3 disminuye considerablemente, mientras que la de T3r aumenta (251).

El metabolismo de T4, T3 y T3r es complejo e involucra deiodinación, deaminación y decarboxilación de la cadena aminoácida y esterificación del oxidrilo fenólico con ácido sulfúrico y glucurónico. Otra vía por la que se metaboliza T4 involucra una reacción oxidativa y el clivaje del enlace éter, aunque este proceso no sería importante en condiciones basales (246).

2.1.2.- MECANISMO DE ACCION DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Las hormonas tiroideas ejercen una amplia gama de diferentes efectos biológicos. Promueven el crecimiento celular, la diferenciación, la maduración neuromuscular, las oxidaciones tisulares y el proceso de termogénesis.

Estos efectos son iniciados principalmente por la unión de la T3 a su receptor nuclear.

La respuesta biológica a las hormonas tiroideas dependería

del porcentaje de ocupación de estos receptores y en muchos casos sería consecuencia del efecto de la T3 sobre la transcripción nuclear (252).

Los receptores nucleares se encuentran distribuidos en todos los tejidos sensibles a las hormonas tiroideas (252). Estos receptores están constituidos por una proteína ácida no histónica asociada a la cromatina (253-256), y se caracterizan por poseer alta afinidad por la hormona y limitada capacidad de unión (257). La unión de la hormona al receptor nuclear no requiere del receptor citoplasmático de T3 (258-261) ni de energía (159,160).

Se han encontrado sitios de unión específicos para T3 en otros componentes celulares además del núcleo, que incluyen a la membrana plasmática (262-268), mitocondrias (269), citoplasma (270-272), membrana nuclear (273) y retículo endoplásmico (274,275). Sin embargo, si bien a través de la vía nuclear no se pueden explicar todos los efectos biológicos de T3, los datos que poseemos hasta el momento sobre los diferentes sitios de unión hormonal, son insuficientes todavía para conocer su rol fisiológico.

Los mecanismos de acción de las hormonas tiroideas propuestos hasta el momento serían los siguientes (276): 1) transcripción nuclear, 2) activación mitocondrial, 3) ATPasa-Na⁺-K⁺, 4) sensibilidad de receptores adrenérgicos, 5) efectos a nivel de membrana, 6) acción como análogos de tirosina, 7) combinación de los efectos antes enumerados.

2.1.3.- EECTO TERMOGENICO DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.

Las hormonas tiròideas aumentan el consumo de oxígeno en los tejidos animales a excepción del cerebro, bazo y testículos (257,277).

El estímulo de las hormonas tiròideas sobre el consumo de energía ocurre principalmente en tres niveles: 1) aumenta la actividad del individuo (trabajo muscular), 2) incrementa el intercambio metabólico entre los diferentes órganos (ciclos de sustratos) y 3) aumenta el metabolismo celular (ciclos iónicos y fútiles). Todo esto es consecuencia de un profundo cambio en la organización intracelular, que determina modificaciones en la actividad de numerosas enzimas y la proliferación de orgánoides celulares como las mitocondrias y el retículo sarcoplásmico (276).

Las hormonas tiròideas estimulan el consumo de energía tanto en situaciones de reposo como de actividad. Los ciclos iónicos (actividad de la ATPasa- $\text{Na}^+ -\text{K}^+$ (279,280) y de la ATPasa- Ca^{++} (278), los ciclos fútiles (síntesis-oxidación de ácidos grasos en hígado y tejido adiposo y síntesis de triglicéridos-lipólisis en tejido adiposo (281)) y la producción de ATP en las mitocondrias (278), contribuirán a la termogénesis tiròidea en situaciones de reposo, mientras que durante la actividad muscular, el aumento en los ciclos iónicos (actividad ATPasa- Ca^{++}) y de la actividad ATPasa-actomiosina, contribuirían al efecto termogénico de las

energía proviene de la β -oxidación de ácidos grasos (291). Esta β -oxidación está aumentada en estados hipertiróideos, y por lo menos en parte, debido a la mayor actividad enzimática de la carnitina palmitoiltransferasa (291-293) que es la enzima limitante que controla la entrada de los ácidos grasos a la mitocondria. La concentración plasmática de ácidos grasos está aumentada (294-296) como consecuencia de un incremento en la lipólisis, principalmente en el tejido adiposo (297).

Como ya se detallara en la sección anterior 2.1.3., una importante proporción del aumento en el consumo de oxígeno que poseen los animales hipertiróideos se debe a los ciclos fútiles, ya que además de una β -oxidación y lipólisis aumentada, estos animales presentan un aumento en la síntesis de ácidos grasos y de triglicéridos (278).

La lipogénesis aumentada que poseen los animales hipertiróideos se debe a un incremento de por lo menos el 100 % en la actividad de las enzimas lipogénicas. Estas enzimas incluyen aquellas directamente involucradas en la síntesis de ácidos grasos como la acetil CoA-carboxilasa y la ácido graso sintetasa, como así también aquellas enzimas esenciales para la producción de los cofactores necesarios en dicho proceso, como la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y la enzima málica (289,298).

La actividad desaturante también es modificada por las hormonas tiroideas. Como ya ^{se}indicara en la sección B.3., en los estudios realizados hasta el momento con tratamientos prolongados de hormonas tiroideas, se observó un aumento en la actividad de

la $\Delta 9$ desaturasa y una disminución en la $\Delta 6$ desaturasa (133-135). Por otro lado, las ratas tiroidectomizadas y alimentadas con una dieta estándar poseen disminuida la actividad de las $\Delta 9$ y $\Delta 6$ desaturasas (132). Sin embargo, en los animales tratados con propil-tiouracilo (agente hipotiróideo) (134) la actividad de ambas desaturasas no se modifica, mientras que en ratas tiroidectomizadas y alimentadas con una dieta de bajo contenido en iodo (299), la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa disminuye y no se modifica la de la $\Delta 9$ desaturasa. Hasta el momento existe muy poca información de trabajos previos hechos sobre el efecto de las hormonas tiroideas en la actividad de la $\Delta 5$ desaturasa. Cuando Hoch (300) estudió el efecto del hipotiroidismo y la tirotoxicosis en la actividad de la $\Delta 5$ desaturasa, no pudo observar variaciones en dicha actividad enzimática.

Los cambios más frecuentes observados en la composición de ácidos grasos de animales hipertiróideos son un aumento en el porcentaje de los ácidos palmítico, esteárico, oleico y araquidónico y una disminución en el porcentaje del ácido linoleico y del eicosatrienoico (n-6) (134,135,295,296,301,302).

2.2.- EXPERIMENTOS REALIZADOS.

2.2.1.- EFECTO DE LA L-TRIIODOTIRONINA (T3) EN LA ACTIVIDAD DESATURANTE Y COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS MICROSOMALES HEPATICOS.

Con el propósito de estudiar el efecto de diferentes dosis de T3 durante distintos periodos de tiempo en la actividad de las desaturasas y en la composición de microsomas hepáticos, se armaron lotes con 5 o 10 ratas Wistar macho cada uno. Las ratas se alimentaron con dieta comercial y agua ad libitum y recibieron en forma intraperitoneal una inyección diaria de T3 (500 o 1000 ug/100 g de peso) disuelta en NaOH 4 mM en solución fisiológica. Se usaron dos controles: uno recibió un volumen equivalente del vehículo completo y no presentó diferencias significativas en el grado de crecimiento, actividad desaturante o composición de ácidos grasos, cuando se lo comparó con el otro lote control al que se lo había inyectado solamente con solución fisiológica. A partir de estos resultados en los subsiguientes experimentos se utilizó como control sólo el lote con solución fisiológica. Veinticuatro horas después de la última administración, los animales se sacrificaron por decapitación a las 8 a.m. para evitar variaciones por efectos circadianos (213) y se aislaron los microsomas hepáticos como se describiera en la sección 1.2.3.1.. La actividad desaturante y la composición de ácidos grasos microsomales, composición lipídica y anisotropía de

fluorescencia, se determinaron en la forma indicada en la sección 1.2..

2.2.2.- EFECTO DE LA T3 EN LA ACTIVIDAD DE LA Δ^9 DESATURASA EN EL TIEMPO.

Cuando se estudiò el efecto de la T3 en la actividad de la Δ^9 desaturasa en el tiempo, se sacrificaron en forma conjunta pares de lotes (4 ratas cada uno) de animales tratados con T3 y de ratas controles a diferentes tiempos luego de haber sido inyectadas con T3 y con solución fisiológica, respectivamente. Se aislaron los microsomas hepáticos y se determinò la actividad de la Δ^9 desaturasa como se explicitara en la sección 1.2.. En estos experimentos, las ratas se inyectaron intraperitonealmente con una única dosis de 1000 μ g de T3/100 g de peso disuelta en NaOH 4 mM en solución fisiológica a las 8 a.m.. Esta dosis de T3, de acuerdo a los datos de Oppenheimer (303), corresponde a una concentración saturante de hormona de los receptores nucleares durante un periodo de 2 días.

2.2.3.- ESTUDIO DEL COMPROMISO DE LA SINTESIS PROTEICA EN EL EFECTO DE LA T3 EN LA ACTIVIDAD DE LA Δ^9 DESATURASA Y LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MICROSOMAS HEPATICOS.

Con el fin de determinar si la síntesis proteica es necesaria para que se produzca el aumento en la actividad de la

Δ^9 desaturasa y las modificaciones observadas en la composición de ácidos grasos por efecto de la T3, se administró cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica) y T3 intraperitonealmente en ratas de la siguiente forma: el lote I recibió durante 2 días solución fisiológica y el tercer día una única dosis "saturante" de 1000 μg de T3 / 100 g de peso; los lotes II y III, IV y V y VI y VII recibieron una inyección diaria de 20, 60 y 90 μg de cicloheximida / 100 g de peso respectivamente durante 3 días. Al tercer día a los lotes III, V y VII se les administró además 1000 μg de T3 / 100 g de peso. Las ratas control recibieron el vehículo completo en forma diaria durante 3 días. Las inyecciones se realizaron a las 8 a.m. y los animales se sacrificaron 24 h después de la última administración. Se separó la fracción microsomal hepática y se midió la actividad de la Δ^9 desaturasa y composición de ácidos grasos en dicha fracción celular en la forma en que se detallara en las secciones 1.2..

2.2.4.- EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA EN LA ACTIVIDAD DE LA Δ^9 DESATURASA 8 HORAS DESPUES DE HABERSE ADMINISTRADO T3.

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos 2.2.2. y 2.2.3. se trató de determinar si la síntesis proteica era requerida durante el periodo de 8 h previo al aumento de la actividad de la Δ^9 desaturasa, o si por el contrario, la síntesis proteica era necesaria con posterioridad a ese periodo. Con este propósito se trabajó con los siguientes lotes en los que

se comenzó con los respectivos tratamientos a las 8 a.m.: un lote recibió 1000 µg de T3 / 100 g de peso disuelta en NaOH 4 mM en solución fisiológica y 8 h después solución fisiológica en forma intraperitoneal; otro lote se inyectó primeramente con la misma dosis de T3 que el lote anterior y 8 h después con 60 µg de cicloheximida / 100 g de peso (esta dosis se eligió a partir de los resultados del experimento 2.2.3.); un tercer lote se inyectó en un principio con la solución usada como vehículo y 8 h más tarde con 60 µg de cicloheximida; y finalmente el lote control se inyectó a las 8 y a las 16 h con la solución fisiológica. Todos los lotes fueron sacrificados 12 h después de iniciados los tratamientos. Se separó la fracción microsomal hepática y se midió la actividad de la Δ^8 desaturasa (sección 1.2.3.1. y 1.2.6.).

2.3.- RESULTADOS.

2.3.1.- EFECTO DE LA T3 EN LA ACTIVIDAD DESATURANTE, COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS Y ANISOTROPIA DE FLUORESCENCIA DE MICROSONAS HEPATICOS.

2.3.1.1.- Actividad desaturante.

Con el fin de estudiar el efecto de la T3 en la actividad desaturante, se midió la actividad de las Δ^8 , Δ^6 y Δ^5 desaturasas en microsomas hepáticos de ratas a las que se les administró una dosis diaria de 500 o 1000 μg de T3 / 100 g de peso durante 1 y 5 días (Tabla 2.1.). La actividad enzimática de la Δ^8 desaturasa aumentó por efecto de la T3 con todas las dosis estudiadas, mientras que la actividad de las Δ^6 y Δ^5 desaturasas sólo se modificó luego de 5 días de tratamiento. Se observó una disminución de un 23 % en la actividad de la Δ^6 desaturasa en las ratas que recibieron durante 5 días una dosis diaria de 500 o 1000 μg de T3 / 100 g de peso. Con respecto a la Δ^5 desaturasa, la actividad de la misma no se modificó con la dosis de 500 μg mientras que disminuyó un 29 % pero solamente luego de recibir una dosis diaria de 1000 μg de T3 / 100 g de peso.

2.3.1.2.- Composición de ácidos grasos.

En la Fig. 2.1. se muestra el efecto de 500 o 1000 μg de T3 / 100 g de peso administrados durante 1 y 5 días en la

Tabla 2.1.

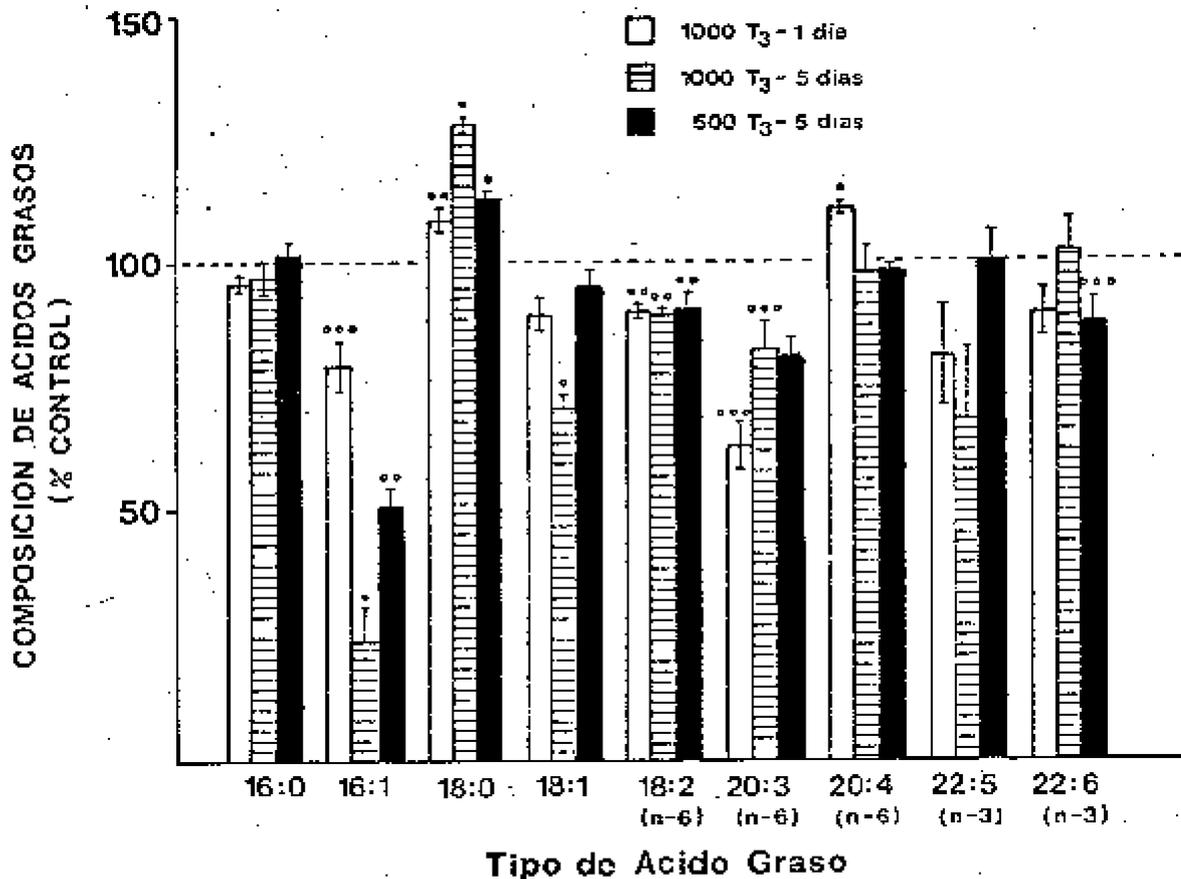
Efecto de la L-trifluorotironina (T3) en la actividad desaturante de microsomas hepáticos.

Tratamiento (µg/100 g peso)	Duración tratamiento (días)	Grado de crecimiento (% control)	Actividad desaturante (% del control)		
			Δ 9 Desaturasa	Δ 6 Desaturasa	Δ 5 Desaturasa
500 T3	5	-154 ± 23*	(a) 146 ± 14** (10)	77 ± 6** (10)	93 ± 3 (10)
1000 T3	5	-121 ± 17*	(a) 239 ± 24* (5)	76 ± 5** (5)	72 ± 4** (5)
			(b) 210 ± 24* (5)		
1000 T3	1	-114 ± 36**	(a) 260 ± 22* (10)	92 ± 9 (5)	105 ± 9 (5)
	1		(b) 220 ± 20* (10)		

En las medidas de la actividad enzimática de la Δ 9 desaturasa se usaron como sustrato los ácidos esteárico (a) y palmítico (b). Los datos tabulados corresponden a la media ± E.S.. El número de animales utilizado en cada caso se indica entre paréntesis. Las actividades ± E.S. de los controles de la Δ 9 (18:0), Δ 9 (16:0), Δ 6 (18:2) y Δ 5 (20:3) desaturasa fueron: 0,095 ± 0,010 (n=30), 0,080 ± 0,006 (n=10), 0,168 ± 0,011 (n=20) y 0,335 ± 0,012 (n=20) nmol desaturado./g proteína-1.minuto-1 respectivamente. El grado de crecimiento del lote control fue: 6,9 ± 0,7 g/día. Diferencias significativas respecto del control: *, P<0,001 y **, P<0,01.

Figura 2.1.

Efecto de T3 en la composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas hepáticos.



La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquido como se describió en la sección 1.2.5.4.. Solo se tuvieron en cuenta los ácidos grasos más importantes. Los resultados corresponden a la media \pm E.S. y se expresaron como % del control. Los animales recibieron una inyección diaria de 500 μ g de T₃/100 g de peso durante 5 días (n=5, ■), 1000 μ g de T₃/100 g de peso durante 1 (n=10, □) y 5 días (n=5, ▨). Diferencias significativas respecto del control: *, P<0,001; **, P<0,01 y ***, P<0,05.

composición de los principales ácidos grasos de lípidos totales de microsomas hepáticos. En las ratas tratadas con T3 se observó un aumento en el porcentaje de 18:0 y una disminución en el de 16:1 y 18:1 (no siempre significativo) que es independiente de la actividad de la Δ^9 desaturasa, ya que la actividad de esta enzima es aumentada por acción de las hormonas tiroideas (Tabla 2.1., 133-135). Por otro lado, en la familia de ácidos grasos n-6 se observó una disminución de 18:2 y 20:3 y sólo luego de un día de tratamiento hormonal un aumento de 20:4.

Teniendo en cuenta que la actividad de la Δ^6 desaturasa no se modifica o está disminuida por efecto de la T3, hubiéramos esperado variaciones prácticamente opuestas a las observadas en los ácidos grasos de la familia n-6.

Estos resultados de la composición de ácidos grasos de lípidos hepáticos, concuerdan con los observados previamente por otros en plasma, hígado y corazón luego de diferentes dosis y periodos de administración de las hormonas (134, 135, 295, 302).

2.3.1.3.- Anisotropía de fluorescencia.

Como ya se detallara en la sección 1.2.7., las técnicas de fluorescencia son una importante herramienta en el estudio de las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los lípidos constituyentes de las membranas biológicas y artificiales. En base a esto, se midió la anisotropía de fluorescencia de microsomas hepáticos de ratas que habían recibido veinticuatro horas antes una única dosis "saturante" de 1000 μ g de T3/100 g de

peso. Se utilizò como fluoròforo el 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH).

En estas medidas no se observaron variaciones en la anisotropia de fluorescencia (rs) del DPH en microsomas de ratas tratadas con T3 (Tabla 2.2.). Estos resultados son coherentes, ya que tampoco se observaron variaciones en el indice de insaturaciòn de estos lotes (Tabla 2.3.).

2.3.2.- EFECTO DE LA T3 EN LA ACTIVIDAD DE LA Δ^8 DESATURASA EN EL TIEMPO.

Teniendo en cuenta que el aumento observado en la actividad de la Δ^8 desaturasa por efecto de la T3 es el mismo al cabo de 24 h que luego de 120 h de haberse inyectado la hormona, resultò necesario conocer el efecto de la T3 a tiempos menores de 24 h de tramiento para determinar así la variaciòn de la actividad de la Δ^8 desaturasa por efecto de la T3 en el tiempo. Con este fin, se midiò la actividad de la Δ^8 desaturasa en microsomas hepáticos de ratas que recibieron una única dosis "saturante" de los receptores nucleares de 1000 μ g de T3 / 100 g de peso (303). En una primera etapa los animales se sacrificaron luego de 8, 12 y 16 h de la inyecciòn de hormona. En base a los resultados obtenidos se hizo una nueva experiencia sacrificando ahora los animales a las 8, 9 y 12 h de haberles administrado T3. Estos datos se presentan en la Fig. 2.2.. La actividad a cada tiempo se expresò como porcentaje respecto del lote control a ese tiempo

Tabla 2.2.

Anisotropía de fluorescencia (rs) del DPH en microsomas de rata tratadas con T3.

	Control	T3
rs:	$0,125 \pm 0,001$	$0,126 \pm 0,001$

Las medidas se realizaron como se describe en la sección 1.2.7.. Los lotes "control" y "T3" corresponden a animales inyectados con solución vehículo y 1000 µg de T3/100 g de peso respectivamente, y sacrificados 24 horas después. Los resultados tabulados se expresan como la media de 5 ratas por lote ± E.S..

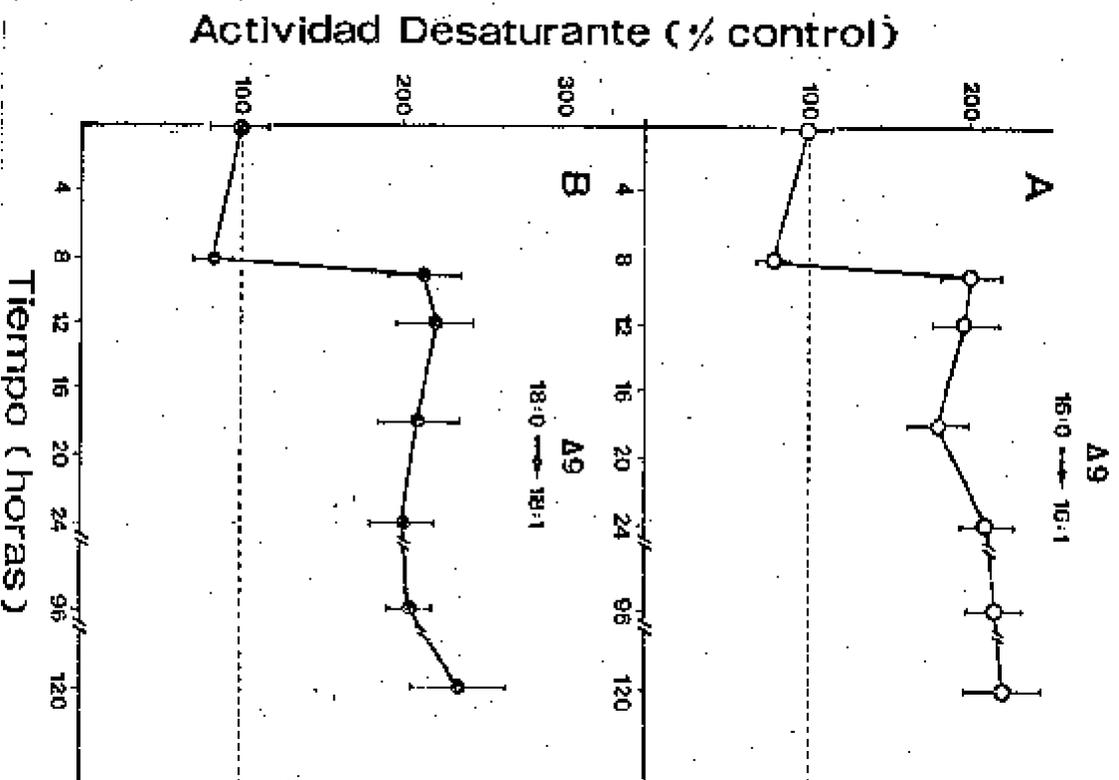
Tabla 2.3.

Efecto de L-triiodotironina (T3) y cicloheximida en la composición de ácidos grasos de microsomas hepáticos.

Acido graso (%)	Control (n=10)	T3 (n=10)	Cicloheximida (n=5)	T3+Ciclohex. (n=10)
16:0	15,8 ± 0,3	15,3 ± 0,2	15,7 ± 0,5	16,5 ± 0,2
16:1	1,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1***	0,4 ± 0,1*	0,6 ± 0,1*
18:0	22,9 ± 0,4	25,0 ± 0,6**	24,1 ± 0,3***	25,6 ± 0,2*
18:1	10,8 ± 0,3	9,8 ± 0,4***	10,1 ± 0,1	9,0 ± 0,2*
18:2 [~]	15,2 ± 0,3	13,9 ± 0,2**	16,2 ± 0,3	13,0 ± 0,4*
20:3 [~]	2,2 ± 0,2	1,4 ± 0,1**	2,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1*
20:4 [~]	24,1 ± 0,5	26,9 ± 0,2*	23,7 ± 0,4	26,0 ± 0,4**
22:5 [°]	1,5 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,4 ± 0,2
22:6 [*]	6,2 ± 0,3	5,6 ± 0,3	6,3 ± 0,2	6,6 ± 0,2
Indice de insat. ^a	1,90 ± 0,02	1,85 ± 0,05	1,88 ± 0,02	1,90 ± 0,02

La composición de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas líquida como se detalló en la sección 1.2.5.4.. La descripción de los cuatro lotes corresponde a la de la Fig. 2.3. La concentración de cicloheximida fue de 60 µg/100 g de peso. Solo se tuvieron en cuenta los ácidos grasos más importantes. Los resultados tabulados son la media ± E.S.. [~] y [°] corresponden a ácidos grasos de las familias n-6 y n-3 respectivamente. ^a: Índice de insaturación descrito en la Tabla 1.8.. n: número de ratas por lote. Diferencias significativas respecto del control: *, P<0,001; **, P<0,01 y ***, P<0,05.

Figura 2.2.
Efecto de la T3 en la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa en el tiempo.



La actividad enzimática se midió en microsomas hepáticos de ratas que recibieron una única dosis "saturante" de 1000 μg de T3 / 100 g de peso. Los animales se sacrificaron en lotes de 4 ratas cada uno en forma secuencial luego de la inyección de la hormona. Los lotes sacrificados a las 96 y 120 h recibieron diariamente la misma dosis de hormona. Los respectivos controles también se mataron a cada tiempo para evitar efectos circadeanos. Los resultados corresponden a la media \pm E.S. del lote; expresados como % de su control. La actividad de la $\Delta 9$ (16:0) y $\Delta 9$ (18:0) del lote control a tiempo cero fue de 0,072 \pm 0,006 (n=10) y 0,082 \pm 0,006 (n=10) nmol.mg⁻¹.min⁻¹, respectivamente. En las incubaciones se usó como sustrato el ácido palmítico (A) y el esteárico (B). Diferencia significativa respecto del control después de 9 h de tratamiento con T3; P<0,01.

dado que la actividad de la Δ^9 desaturasa posee un ritmo circadiano. En estos experimentos se observó que el aumento en la actividad enzimática inducido por T3, se produce luego de 8 h de inyectada la hormona. Este "lag" inicial es seguido por un drástico aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa que alcanza un "plateau" 8 horas después de la inyección de T3 y se mantiene luego de 5 días de tratamiento hormonal diario. El "plateau" se encuentra a un nivel de actividad enzimática 1-1,2 veces por sobre el valor de los controles (línea base).

2.3.3.- COMPROMISO DE LA SINTESIS PROTEICA EN EL EFECTO DE LA T3 EN LA ACTIVIDAD DE LA Δ^9 DESATURASA Y EN LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MICROSOMAS HEPATICOS.

2.3.3.1.- Δ^9 Desaturasa.

En esta sección se describen los resultados de los experimentos detallados en la sección 2.2.3., destinados a analizar si la síntesis proteica está involucrada en el efecto de la T3 en la actividad de la Δ^9 desaturasa. Para ello se utilizó cicloheximida como inhibidor de la síntesis proteica.

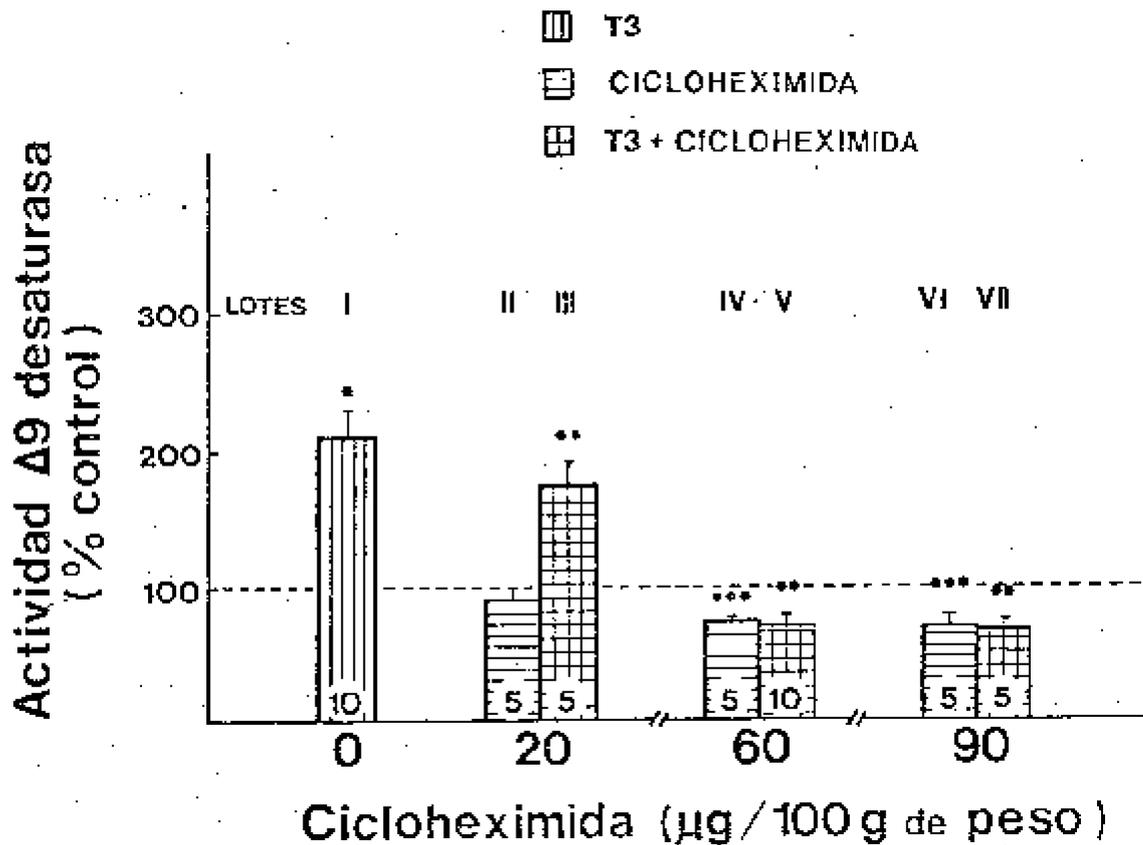
A partir de los resultados de la sección anterior, se determinó que luego de 8 h de haber inyectado T3, la actividad de la Δ^9 desaturasa se incrementa hasta un "plateau" que se mantiene durante 5 días de tratamiento hormonal diario (Fig. 2.2.). Este patrón representa una situación dinámica en la que el grado de síntesis y tal vez el de degradación de proteínas se

modifica. Con el fin de evitar problemas al comparar actividades específicas que no se encuentran en un estado estacionario, se trabajó en condiciones de estado estacionario para la Δ^9 desaturasa. Por consiguiente, se administraron ratas con diferentes dosis de cicloheximida (20, 60 o 90 μg / 100 g de peso intraperitonealmente por día) durante los 2 primeros días, y en el tercer día con la misma dosis de cicloheximida más una dosis "saturante" de 1000 μg de T3 / 100 g de peso. Otro lote recibió una única dosis "saturante" de 1000 μg de T3 / 100 g de peso y todos los lotes se sacrificaron 24 horas después de la última administración. Esto representa por lo menos 18 vidas medias para la Δ^9 desaturasa (109) durante los 3 días de tratamiento con cicloheximida y de 6 vidas medias para el periodo de 24 horas luego de la administración de T3. Por consiguiente, bajo estas condiciones de tratamiento, la actividad específica de esta enzima así como su grado de síntesis deberían ser equivalentes a aquellos característicos del estado estacionario inhibido (antibiótico) o aumentado (T3).

En estos experimentos se observó que la cicloheximida suministrada en una dosis de 60 o 90 μg / 100 g de peso evita cualquier aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa por la T3 (Fig. 2.3.). Por otro lado, cuando la dosis de cicloheximida fue de 20 μg / 100 g de peso, todavía se produjo el aumento en la actividad enzimática (Fig. 2.3.). Estos resultados determinan que el aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa causado por la T3 requiere de la síntesis proteica, ya que cuando este proceso

Figura 2.3.

Efecto de la cicloheximida en la actividad de la Δ^9 desaturasa aumentada por T3.



La actividad enzimática se midió en microsomas hepáticos de ratas que recibieron los siguientes tratamientos: el lote control (---) se le administró la solución usada como vehículo. El lote I recibió durante 2 días solución fisiológica y el tercer día una única dosis "saturante" de 1000 μg de T3/100 g de peso; los lotes II y III, IV y V y VI y VII recibieron una inyección diaria de 20, 60 y 90 μg de cicloheximida/100 g de peso respectivamente, durante 3 días. Al tercer día a los lotes III, V y VII se les administró además 1000 μg de T3/100 g de peso. Los animales se sacrificaron después de 24 horas de haber recibido la última administración. Cada barra representa la media ± E.S.. El número de animales de cada lote se especifica en cada barra. Los datos se expresan como % del respectivo control. La media ± E.S. de la actividad de la Δ^9 desaturasa del lote control fue: 0,080 ± 0,006 nmol.desat.mg-1.min-1. (n=10). Diferencias significativas respecto del control: *, P<0,001; **, P<0,01 y ***, P<0,05.

es inhibido por la cicloheximida, el aumento en la actividad enzimática no se produce.

2.3.3.2.- Composición de ácidos grasos.

En general, no se modificó la composición de ácidos grasos de lípidos totales en los microsomas de las ratas tratadas con cicloheximida (Tabla 2.3.). Sin embargo, en los animales tratados con T3 y cicloheximida se observaron las mismas modificaciones en la composición de ácidos grasos que las encontradas en ratas a las que sólo se les administró T3, a pesar de que estos lotes presentaron diferente actividad desaturante (Fig. 2.3.).

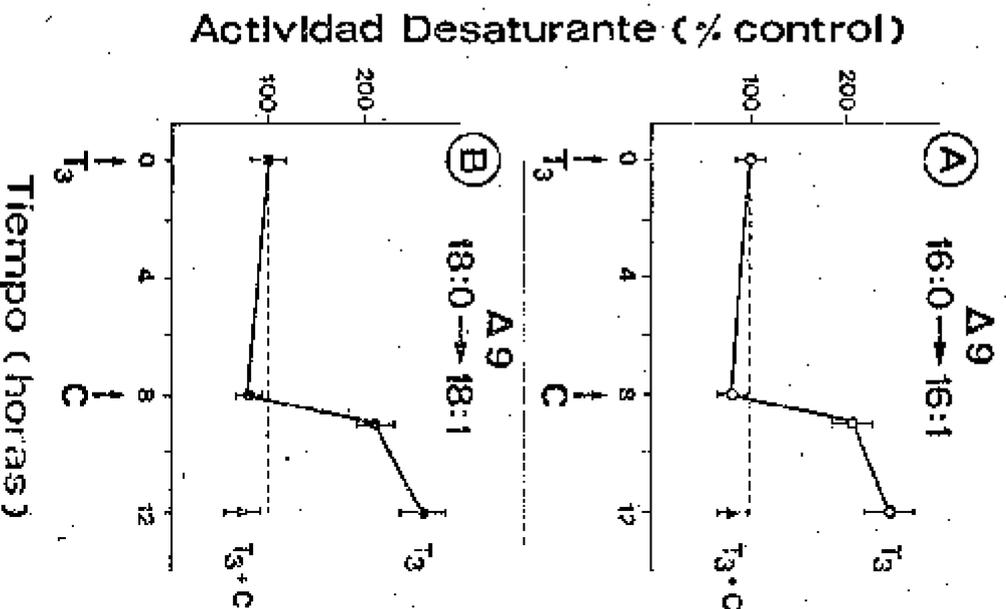
2.3.4.- EFECTO DE LA CICLOHEXIMIDA EN LA ACTIVIDAD DE LA Δ^9 DESATURASA 8 HORAS DESPUES DE HABERSE ADMINISTRADO T3.

A partir de los resultados de la sección 2.3.3.1. en donde se demostró que la síntesis proteica está involucrada en el proceso de aumento de la actividad de la Δ^9 desaturasa por la T3, pensamos que era interesante determinar si la síntesis proteica era requerida durante el periodo de 8 h previo al aumento en la actividad desaturante o con posterioridad al mismo.

Con este propósito se inyectaron ratas con una dosis "saturante" de 1000 μ g de T3 / 100 g de peso a tiempo cero, y 8 horas más tarde (cuando se esperaba el inicio del aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa), se inyectaron intraperitonealmente con 60 μ g de cicloheximida / 100 g de peso.

Estos animales se sacrificaron 4 h después de la inyección de cicloheximida (12 h después de la administración de T3). Los resultados obtenidos (Fig. 2.4.) muestran que cuando se administra cicloheximida en el momento en que se espera el aumento de la actividad de la Δ^9 desaturasa por la T3, dicho incremento se anula. Esto indicaría que la síntesis proteica es necesaria una vez que finalizó el periodo de "lag" de 3 horas para que la T3 provoque el aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa.

Figura 2.4.
Efecto de la cicloheximida en la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa 8 horas después de haberse administrado T3.



Se midió la actividad enzimática de la $\Delta 9$ desaturasa usando como sustrato a los ácidos palmítico (A) y esteárico (B). Las ratas recibieron T3 o T3 seguida de una inyección de 60 μ g de cicloheximida/100 g de peso (C) 8 h más tarde. Número de ratas /lotes. La media de la actividad enzimática y el E.S. se expresan como porcentajes de los respectivos controles a cada tiempo. Los puntos (a) y (b) representan los animales que recibieron solo T3 y el (c) los que recibieron T3 y cicloheximida. Los animales se sacrificaron luego de 8, 9 y 12 horas de haber recibido T3. Diferencias significativas respecto del control después de 9 h de tratamiento con T3: P<0,01.

2.4.- DISCUSION.

2.4.1. EFECTO DE LA T3 EN LA ACTIVIDAD DESATURANTE.

2.4.1.1.- Δ^9 Desaturasa.

Como ya se ha detallado en la Introducción general y en la de este capítulo (sección B.2., B.3. y 2.1.4.), la actividad de la Δ^9 desaturasa puede ser modificada por factores hormonales y nutricionales.

La Δ^9 desaturasa es considerada una enzima lipogénica ya que su actividad enzimática se modifica en forma similar a la de un grupo de enzimas que intervienen en la lipogénesis (enzimas lipogénicas). Este conjunto de enzimas está formado por aquellas directamente involucradas en la síntesis de ácidos grasos como la acetil-CoA carboxilasa y la ácido graso sintetasa, como así también, por las enzimas esenciales para la producción de los cofactores necesarios en dicho proceso, tales como la glucosa 6-fosfatodeshidrogenasa, la 6-fosfogluconato deshidrogenasa y la enzima málica. La actividad de estas enzimas lipogénicas es inducida por las hormonas tiroideas y por dietas lipogénicas (por ejemplo: dietas con un alto contenido de hidratos de carbono) (228).

Con respecto al efecto de las hormonas tiroideas en la actividad de la Δ^9 desaturasa, se ha establecido que la actividad enzimática de esta desaturasa es muy sensible al nivel de las hormonas tiroideas, ya que las ratas hipotiroideas poseen

disminuida la actividad de la Δ^9 desaturasa, mientras que los animales hipertiròideos (estado causado por la administraciòn de hormonas tiròideas durante varios dias y hasta semanas para poder observar cambios) presentan un aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa (133-135).

A partir de estos datos y dado que la informaciòn sobre el mecanismo por el que se produce el aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa por efecto de la T3 estaba incompleto, decidimos estudiar en un primer momento, el tiempo que transcurría desde que se inyecta la hormona hasta que se podía observar un aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa.

En estos experimentos se utilizò una ùnica dosis "saturante" de 1000 μ g de T3 / 100 g de peso, y se observò que recièn luego de 8 h de inyectada la hormona, la actividad de la Δ^9 desaturasa aumentaba en forma dràstica y llegaba en una hora a un "plateau". El nivel de actividad enzimàtica de este "plateau", està 1-1,2 veces por sobre el de los controles (línea base) y se mantiene durante 5 dias de tratamiento hormonal (Fig. 2.2.). Este "lag" de 8-9 h en el efecto de la T3 sobre la actividad de la Δ^9 desaturasa parece ser un patròn comùn de respuesta a la hormona, ya que la inducciòn de ARNm específicos tambièn estè precedida por periodos de "lag" de varias horas (304-306).

Se estudiò ademàs, el compromiso de la síntesis proteica en el proceso de aumento de la actividad de la Δ^9 desaturasa por efecto de la T3. Con este propòsito se inyectò cicloheximida (inhibidor de la síntesis proteica) junto con T3, a ratas que

habían recibido durante los 2 días previos solo cicloheximida. Los resultados mostraron que la síntesis proteica es requerida para que se produzca el aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa por acción de la T3, ya que dicho aumento es anulado por la cicloheximida (Fig. 2.3.). Esta síntesis proteica inducida por la T3 es indispensable aún con posterioridad al "lag" de 8 horas para que se produzca el aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa por efecto de la T3, ya que cuando se administra cicloheximida después de 8 horas de haberse inyectado T3, el incremento en la actividad de la Δ^9 desaturasa no se produce (Fig. 2.4.). Por otra parte, el aumento observado en la actividad de la Δ^9 desaturasa en animales alimentados con una dieta rica en hidratos de carbono y libre de lípidos, se debe a una inducción enzimática (53). Este mecanismo de respuesta concuerda con el que presentan las enzimas lipogénicas, ya que el aumento observado en la actividad de estas enzimas por efecto de la T3, como así también el producido a causa de una dieta rica en hidratos de carbono, son consecuencia de un aumento en la cantidad de las enzimas lipogénicas (298). Estos resultados sugieren que la cicloheximida podría actuar bloqueando la inducción proteica producida por la T3 de la Δ^9 desaturasa, de proteína/s esencial/es en el proceso de respuesta a la hormona (cuya producción estaría estimulada por la hormona) o ambas posibilidades a la vez.

Hay otros factores, además de la síntesis enzimática, como la fluidez de la membrana microsomal que pueden regular la

actividad de las desaturasas (enzimas de membrana), no sólo en mamíferos sino también en levaduras y en *Tetrahymena* (307). Por esta razón, medimos la anisotropia de fluorescencia (rs) usando el marcador fluorescente liposoluble 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH) en membranas microsomales de animales que recibieron 24 h. antes una única dosis "saturante" de T3. En estas medidas no observamos diferencia alguna entre los rs de microsomas de animales tratados y no tratados con T3 (Tabla 2.2.); estos resultados son compatibles con los correspondientes índices de insaturación, ya que éstos tampoco se modificaron por efecto de la T3 (Tabla 2.3.). Estos resultados indicarían que las propiedades fisicoquímicas de la membrana, estimadas por la anisotropia de fluorescencia del DPH, no se modificaron por la administración de T3 y por lo tanto no podrían estar involucradas en el proceso de aumento de la actividad de la Δ^9 desaturasa por efecto del tratamiento hormonal.

Con estos resultados obtenidos a partir de experimentos realizados "in vivo" sobre el efecto de la T3 en la actividad desaturante de ratas tratadas con la hormona, no podemos diferenciar todavía si el mecanismo por el cual la T3 actúa sobre la Δ^9 desaturasa involucra un efecto directo de la hormona sobre el hígado y / o un efecto extrahepático. De todas formas, estos resultados sugieren que el aumento de la Δ^9 desaturasa producido por la T3 se realiza a través de un proceso que involucra la síntesis proteica.

2.4.1.2.- $\Delta 6$ y $\Delta 5$ Desaturasas.

Como se mencionó anteriormente en la Introducción general y en la de este capítulo (sección B.2., B.3. y 2.1.4.), la actividad de la $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas, al igual que la de la $\Delta 9$ desaturasa, puede ser modificada por factores hormonales y nutricionales.

En los experimentos realizados se observó que la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa no se modifica a las 24 h de haber inyectado una dosis "saturante" de 1000 μ g de T3 / 100 g de peso, pero disminuye luego de 5 días de tratamiento hormonal (Tabla 2.1.). Estos resultados concuerdan con los observados por Gómez Dúmm y col. (134), quienes observaron una disminución en la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa en ratas tratadas con dosis elevadas de tiroxina (4 mg / 100 g de peso diariamente durante 12 días). Faas y Carter (135) también encontraron resultados equivalentes en animales tratados diariamente con diferentes dosis de T3 durante 5 o más días de tratamiento hormonal. Por otro lado, las ratas hipotiróideas (tiroidectomizadas) poseen la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa disminuida (132,300), mientras que en aquellos animales tratados con propil-tiouracilo (agente hipotiróideo) (134), dicha actividad desaturante no se modifica.

Por otra parte, se observó que la actividad de la $\Delta 5$ desaturasa disminuye pero sólo en animales que recibieron durante 5 días una dosis diaria de 1000 μ g de T3 / 100 g de peso y no se modifica luego de 24 h de tratamiento hormonal. Sin embargo, cuando Hoch (300) estudió el efecto del hipotiroidismo y de la

tirotoxicosis en la actividad de la $\Delta 5$ desaturasa, no pudo observar cambio alguno.

A partir de estos resultados se desprende que las $\Delta 8$ y $\Delta 5$ desaturasas presentan un comportamiento similar, ya que sólo se modifica la actividad enzimática de las mismas luego de 5 días de tratamiento con T3. Este periodo de por lo menos 5 días, contrasta con las 8-9 h: necesarias para que aumente la actividad de la $\Delta 9$ desaturasa por efecto de la T3.

Es interesante tener en cuenta que la actividad de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas además de estar disminuida en ratas tratadas con hormonas tiroideas, también lo está en animales alimentados con una dieta con un alto contenido de hidratos de carbono (dieta lipogénica) (sección B.2.), mientras que las enzimas lipogénicas, entre las que se puede incluir a la $\Delta 9$ desaturasa, presentan un aumento en la actividad enzimática como consecuencia de estos factores hormonales y nutricionales (secciones B.2., B.3., 30, 54, 132, 133, 300, 308). Mas aún, en algunas enzimas lipogénicas ambos factores actúan en forma sinérgica (308).

Actualmente se considera que los receptores nucleares de T3 de alta afinidad y baja capacidad, son el lugar donde se inicia la acción de las hormonas tiroideas (252). Las dosis hormonales utilizadas en todos los experimentos debieran haber saturado los receptores nucleares de T3 (de acuerdo a los datos de Oppenheimer (303), y sólo luego de 5 días de tratamiento la actividad de ambas $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas disminuyó. Por esta razón,

pareciera probable que este comportamiento pudiera ser consecuencia de un efecto hormonal indirecto extrahepático, en vez de un efecto directo. De todas formas, si bien todavía no podemos explicar las bases moleculares por las que actúa la T3 sobre las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas, sabemos que la actividad de ambas enzimas también está deprimida por efecto de la adrenalina (120,122) y que además hay una interacción entre las hormonas tiroideas y las catecolaminas (276). Por lo tanto, no podemos descartar que la adrenalina estuviera involucrada en el complejo mecanismo de regulación que opera sobre la actividad de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas en respuesta a la T3.

2.4.2.- EFECTO DE LA T3 EN LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MICROSOMAS HEPATICOS.

Las modificaciones observadas en la composición de ácidos grasos de microsomas hepáticos de ratas tratadas con T3 (Fig. 2.1.) fueron similares a las observadas con otras dosis de hormonas tiroideas en la composición de ácidos grasos de lípidos de hígado, plasma y corazón (134,135,295,302).

Teniendo en cuenta estos datos de composición de ácidos grasos y las medidas realizadas de la actividad desaturante (Fig. 2.1. y Tabla 2.1.), pareciera como si la composición de ácidos grasos de estos animales no fuera una consecuencia directa de la actividad desaturante de los mismos, ya que, si bien la actividad de la $\Delta 8$ desaturasa está aumentada por efecto de la T3, el

porcentaje de 18:0 aumenta en vez de disminuir. Esto podría deberse a un aumento en la síntesis "de novo" de este ácido como consecuencia del aumento en la actividad de la acetil-CoA carboxilasa (30,109,308,310-312), ácido graso sintetasa (109,303,308,310-313) y especialmente del sistema elongante (308,312,314). Por otro lado, de los cambios observados en la familia de ácidos grasos n-6 sólo la disminución en el porcentaje de 20:3 podría deberse a la actividad de la $\Delta 6$ desaturasa de las ratas tratadas con T3, ya que se hubieran esperado resultados opuestos en los porcentajes de 18:2 y 20:4 teniendo en cuenta que la actividad de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas no se modifica o disminuye en las ratas sometidas a los distintos tratamientos con T3.

En los primeros trabajos realizados por otros donde se estudió la composición de ácidos grasos en el hipertiroidismo y en los que no se hicieron medidas de la actividad de las $\Delta 6$ y $\Delta 5$ desaturasas, se dedujo que la disminución observada en el porcentaje de 18:2 n-6, 20:3 n-6 así como el aumento en el de 20:4 n-6 se debían a un aumento en la síntesis del ácido araquidónico (135,295,302). Con nuestros resultados esta posibilidad queda descartada ya que la actividad de las $\Delta 6$ (enzima limitante (315)) y $\Delta 5$ desaturasas (enzimas éstas que están involucradas en la síntesis del ácido araquidónico), no sólo no está aumentada sino que disminuye por efecto de la T3.

Tampoco se puede atribuir el aumento observado en el 20:4 n-6 y la disminución en el 20:3 n-6 a la disminución en el grado

de crecimiento (Tabla 2.1.) ni al aumento en la ingesta que presentan los animales tratados con T3 (135). Estos dos factores, como ya fuera expuesto por Faas y Carter (135), no serian la causa de los cambios que presentan los animales tratados con hormonas tiroideas en la composición de ácidos grasos y en la actividad desaturante.

Como ya se mencionara en la Introducción de este capítulo, en el hipertiroidismo hay un aumento en la oxidación en diferentes tejidos. El principal sustrato para este proceso lo constituyen los ácidos grasos libres que son suministrados por una lipólisis aumentada en el tejido adiposo (281). Podemos suponer entonces, que el aumento observado en el porcentaje de 20:4 n-6 de animales tratados con T3, seria consecuencia de una menor utilización de este ácido por parte de los diferentes tejidos para proteger así el "pool" endógeno de ácido araquidónico ya que su síntesis disminuye por efecto de la hormona.

De todas formas, es evidente que otros factores distintos a la actividad desaturante deben estar implicados en la composición de ácidos grasos de ratas tratadas con hormonas tiroideas, como la dieta, la síntesis y la degradación de lípidos de membrana, el recambio ("turn-over") y la oxidación de los ácidos grasos.

A pesar de las variaciones observadas en la composición de ácidos grasos de microsomas hepáticos de ratas tratadas con T3, el índice de insaturación de dichos microsomas no se modificó por efecto de la hormona (Tabla 2.1.). Estos resultados, junto

con los estudios de Faas y Carter (135) en los que no se observaron variaciones en el contenido de fosfolípidos, colesterol y triglicéridos de microsomas de ratas tratadas con T3, son coherentes con la ausencia de modificaciones en la anisotropía de fluorescencia (rs) que presentaron los microsomas hepáticos de animales inyectados con T3 (Tabla 2.2.).

CONCLUSIONES

1.- Cuando ratas macho son mantenidas en el frío a pesar de incrementar la ingesta, su grado de crecimiento y conversión de alimentos disminuyen, ya que las calorías son utilizadas preferentemente en la producción de calor para poder mantener constante la temperatura corporal.

2.- En ratas macho, la actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa hepática disminuye al disminuir la temperatura ambiental. Esta disminución sería consecuencia del balance metabólico negativo que poseen los animales en estas condiciones. Por otro lado, cuando se aumenta la temperatura ambiental, la actividad de la Δ^9 desaturasa no se modifica.

3.- La actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa hepática no se modifica por efecto de la temperatura ambiental al transferir ratas macho al frío o al calor.

4.- La actividad enzimática de la Δ^5 desaturasa hepática no se modifica al disminuir la temperatura ambiental, mientras que disminuye al transferir ratas al calor.

5.- La actividad enzimática de las Δ^6 y Δ^5 desaturasas hepáticas de ratas macho solo aumenta en el frío, cuando éstas se encuentran deprimidas por factores nutricionales, tales como una dieta hiperglucídica.

6.- Al disminuir la temperatura ambiental se observa una disminución en el porcentaje de los ácidos 16:1 y 18:1 y aumento en el de 18:0 de fosfatidilcolina, de fosfatidiletanolamina y de lípidos totales de microsomas y de lípidos totales de mitocondrias hepáticas. Estas variaciones en la composición de ácidos grasos de lípidos hepáticos serían a causa de la menor actividad enzimática de la Δ^9 desaturasa que poseen los animales en el frío.

7.- Cuando se aumenta la temperatura ambiental el porcentaje del ácido 18:2 n-6 no se modifica, aumenta el de 20:3 n-6 y disminuye el de 20:4 n-6, ya que la actividad enzimática de la Δ^6 desaturasa no se modifica por el calor y disminuye la de la Δ^5 desaturasa.

8.- La composición de las principales fracciones fosfolipídicas de microsomas hepáticos no se modifica por efecto de la temperatura ambiental.

9.- Las variaciones observadas en la actividad desaturante hepática por efecto de la temperatura ambiental en la rata, no se producirían a través de modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de las membranas microsomales.

10.- La actividad enzimática de la Δ^8 desaturasa se modifica por efecto de la T3 luego de un "lag" inicial de 8 horas, seguido por

un drástico aumento en la actividad desaturante que alcanza un "plateau" 8 horas después de la inyección de T3 y se mantiene durante 5 días de tratamiento hormonal diario.

11.- La síntesis proteica es requerida aún con posterioridad al "lag" de 8 horas para que se produzca el aumento en la actividad de la Δ^9 desaturasa por efecto de la T3, ya que dicho aumento es anulado por la cicloheximida. La cicloheximida podría actuar bloqueando la inducción proteica producida por la T3 de la Δ^9 desaturasa, de proteína/s esencial/es en el proceso de respuesta a la hormona (cuya producción estaría estimada por la hormona) o ambas posibilidades a la vez.

12.- La actividad enzimática de las Δ^6 y Δ^5 desaturasas no se modifica luego de 24 horas de inyectada la T3 y disminuye después de 5 días de tratamiento hormonal diario.

13.- Las variaciones observadas en la actividad desaturante por efecto de la T3 en la rata, no se producirían a través de modificaciones en las propiedades fisicoquímicas de las membranas microsomales.

14.- Las variaciones que presentan los animales tratados con T3 en la composición de ácidos grasos de lípidos totales de microsomas hepáticos, no serían una consecuencia directa de la actividad desaturante, ya que si bien la actividad enzimática de

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Brock, D.J.H., Kass, L.R. and Bloch, K. (1967) J. Biol. Chem. 242: 4432.
- 2.- Kass, L.R., Brock, D.J.H. and Bloch, K. (1967) J. Biol. Chem. 242: 4418.
- 3.- Helmkamp, G.M., Raudo, R.R., Brock, D.J.H. and Bloch, K. (1968) J. Biol. Chem. 243: 3229.
- 4.- McKeon, T.A. and Stumpf, P.K. (1962) J. Biol. Chem. 257: 12141.
- 5.- Stymne, S. and Appelqvist, L.A. (1976) Eur. J. Biochem. 90: 223.
- 6.- Bloomfield, D.K. and Bloch, K. (1960) J. Biol. Chem. 235: 337.
- 7.- Oshino, N., Ymai, Y. and Sato, R. (1971) J. Biochem. 69: 155.
- 8.- Klenk, E. (1965) en "Adv. Lipid Res.", Vol. 13, pag. 1 (Paoletti, R. and Kritchevsky, D., eds.) Academic Press Inc., New York.
- 9.- Stoffel, W. and Ach, K.L. (1964) Z. Physiol. Chem. 337: 123.
- 10.- Brenner, R.R. and Peluffo, R.O. (1969) Biochim. Biophys. Acta 176: 471.
- 11.- Marcel, Y.L., Christiansen, K. and Holman, R.T. (1968) Biochim. Biophys. Acta 164: 25.
- 12.- Bernet, J.T. Jr. and Sprecher, H. (1975) Biochim. Biophys. Acta 398: 354.
- 13.- Brenner, R.R. (1981) Prog. Lipid Res. 21: 41.

- 14.- Kornberg, A. and Pricer, W.E. Jr. (1953) J. Biol. Chem. 204: 329.
- 15.- Vignais, P.V., Gallacher, C.H. and Zabin, I. (1958) J. Neurochem. 2: 283.
- 16.- Senior, J.R. and Isselbacher, K.I. (1960) Biochim. Biophys. Acta 44: 360.
- 17.- Borgstrom, B. and Wheeldon, L.W. (1961) Biochim. Biophys. Acta 50: 174.
- 18.- Ailbaud, G., Garda, L. and Desnuelle, P. (1962) Biochim. Biophys. Acta 59: 261.
- 19.- Creasey, W.A. (1962) Biochim. Biophys. Acta 64: 559.
- 20.- Pande, S.V. and Mead, J.F. (1968) J. Biol. Chem. 243: 352.
- 21.- Marcel, Y.L. and Suzue, G. (1972) J. Biol. Chem. 247: 4433.
- 22.- Nino, R.E., Torrenco, M.P. de, Castana, J.C. and Brenner, R.R. (1974) Biochim. Biophys. Acta 360: 124.
- 23.- Seubert, W. and Podack, E.R. (1973) Mol. Cell Biochem. 1: 29.
- 24.- Nugteren, D.M. (1965) Biochim. Biophys. Acta 106: 280.
- 25.- Bernert, J.T. and Sprecher, H. (1977) J. Biol. Chem. 252: 6736.
- 26.- Yoshida, S. and Takeshita, M. (1987) Arch. Biochem. Biophys. 254: 180.
- 27.- Sprecher, H. (1974) Biochim. Biophys. Acta 360: 113.

- 28.- Bourre, J.M., Pollet, S.A., Dubois, G. and Baumann, N.A.
(1970) C. R. Acad. Sci. (Paris) 271:1221.
- 29.- Goldberg, I., Shechter, I. and Bloch, K. (1973) Science
182: 497.
- 30.- Kawashima, Y. and Kozuka, H. (1985) Biochim. Biophys. Acta
884: 118.
- 31.- Nagi, M.N., Cook, L., Prasad, M.R. and Cinti, D.L. (1986)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 140: 74.
- 32.- Prasad, M.R., Nagi, M.N., Ghesquier, D., Cook, L. and
Cinti, D.L. (1986) J. Biol. Chem. 261: 8213.
- 33.- Fulco, A.J. (1974) Annu. Rev. Biochem. 43: 215.
- 34.- Meyer, F. and Boch, K. (1963) Biochim. Biophys. Acta
77: 671.
- 35.- Kates, M. and Paradis, M. (1973) Can. J. Biochem. 51:
184.
- 36.- Shapiro, H., Prescott, D. and Rabinowitz, J.L. (1978) Comp.
Biochem. Physiol. B, 61: 513.
- 37.- Fukushima, H., Nagao, S. and Nozawa, Y. (1978) Biochim.
Biophys. Acta 572: 176.
- 38.- Kasai, R. and Nozawa, Y. (1980) Biochim. Biophys. Acta
617: 161.
- 39.- Gennitz, J.M. and Stumpf, P.K. (1985) Arch. Biochem.
Biophys. 239: 444.
- 40.- Demandre, C., Trémolieres, A., Justin, A.M. and Mazliak, P.
(1986) Biochim. Biophys. Acta 877: 380.
- 41.- Bloomfield, D.K. and Bloch, K. (1958) Biochim. Biophys.

- Acta 30: 220.
- 42.- Marsch, J.B. and James, A.T. (1962) Biochim. Biophys. Acta 60: 320.
- 43.- Stoffel, W. (1961) Biochem. Biophys. Res. Commun. 6: 270.
- 44.- Brenner, R.R. (1977) en "Function and Biosynthesis of Lipid Adv. Expl. Med. Biol.", Vol. 83, pag. 85 (Bazan, N.G., Brenner, R.R and Giusto, N.M., eds.) Plenum Press, New York and London.
- 45.- Okayasu, T., Nagai, M., Ishibashi, T. and Imai, Y. (1981) Archs. Biochem. Biophys. 206: 21.
- 46.- Strittmatter, P., Spatz, L., Corcoran, D., Rogers, M.J., Setlow, B. and Redline, R. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 4565.
- 47.- Rogers, M.J. and Strittmatter, P. (1973) J. Biol. Chem. 249: 895.
- 48.- Beck von Bodman, S., Schuler, M.A., Jollie, D.R. and Sligar, S.G. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9443.
- 49.- Thiede, M.A., Ozols, J. and Strittmatter, P. (1986) J. Biol. Chem. 261: 13230.
- 50.- Ozols, J., Heinemann, F.S., and Johnson, E.F. (1985) J. Biol. Chem. 260: 5427.
- 51.- Strittmatter, P., Thiede, M.A., Hackett, C.S. and Ozols, J. (1988) J. Biol. Chem. 263: 2532.
- 52.- Rachubinski, R.A., Verma, D.P.S. and Bergeron, J.J.M. (1980) J. Cell Biol. 84: 705.

- 53.- Thiede, M.A. and Strittmatter, P. (1985) J. Biol. Chem. 260: 14459.
- 54.- Paulsrud, J.R., Stewart, S.E., Grass, G. and Holman, R.T. (1970) Lipids 5: 611.
- 55.- Enoch, H.G., Català, A. and Strittmatter, P. (1976) J. Biol. Chem. 251: 5095.
- 56.- Pugh, E.L. and Kates, M. (1977) J. Biol. Chem. 252: 68.
- 57.- Holloway, C.T. and Holloway, P.W. (1974) Lipids 9: 196.
- 58.- Pollard, M.R., Gunstone, F.D., James, A.T. and Morris, L.J. (1980) Lipids 15: 306.
- 59.- Mahfouz, M.M. and Holman, R.T. (1980) Lipids 15: 63.
- 60.- Mahfouz, M.M., Valicenti, A.J. and Holman, R.T. (1980) Biochim. Biophys. Acta 618: 1.
- 61.- Jeffcoat, R., Dunton, A.P. and James, A.T. (1978) Biochim. Biophys. Acta 528: 28.
- 62.- Cook, H.W. and Spence, M.W. (1973) J. Biol. Chem. 248: 1786.
- 63.- Cook, H.W. and Spence, M.W. (1974) Biochim. Biophys. Acta 362: 129.
- 64.- Català, A., Nervi, A.M. and Brenner, R.R. (1975) J. Biol. Chem. 250: 7481.
- 65.- Leikin, A.Y., Nervi, A.M. and Brenner, R.R. (1979) Lipids 14: 1021.
- 66.- Castana, J.C., Català, A. and Brenner, R.R. (1972) J. Lipid

- Res. 13: 783.
- 67.- Ullman, D. and Sprecher, H. (1971) *Biochim. Biophys Acta* 248: 81.
- 68.- Sprecher, H. and Lee, C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 388: 113.
- 69.- Dhopeswarkar, G.A. and Subramanian, A. (1978) *J. Neurochem.* 26: 1175.
- 70.- Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1976) *Mol. Cell. Biochem.* 12: 81.
- 71.- Albert, D.H. and Coniglio, J.G. (1977) *Biochim. Biophys Acta* 489: 390.
- 72.- Maeda, M., Doi, O. and Akanatsu, Y. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 530: 153.
- 73.- Lemarchal, P. and Boernens, M. (1988) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50: 195.
- 74.- Marcus, A.J. (1984) *J. Lipid Res.* 25: 1511.
- 75.- Lemarchal, P. (1985) *Cah. Nutr. Diet.* 20: 97.
- 76.- Hamberg, M., Svenson, J. and Samuelson, B. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 3824.
- 77.- Samuelson, B. (1981) *Prog. Lipid Res.* 20: 23.
- 78.- Bourre, J.M., Pollet, G., Chaix, G., Daudu, O. and Baumann, N.A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 55: 1473.
- 79.- Dhopesawarkar, G.A. and Mead, J.F. (1973) en "Adv. Lipid Res.", Vol. 11, pag. 109 (Paoletti, R. and Kritchevsky, D. eds.). Acad. Press. Inc., New York.
- 80.- Albert, D.H., Rhamy, R.K. and Coniglio, J. G. (1978) *Lipids*

- 14: 488.
- 81.- Nakazawa, I., Mead, J.F. and Yonemoto, R.N. (1976) *Lipids* 11: 78.
- 82.- Sprecher, H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 152: 519.
- 83.- Hagve, T.A. and Christophersen, B.O. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 875: 165.
- 84.- Holloway, C. and Holloway, P.W. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.* 167: 496.
- 85.- Brenner, R.R., Peluffo, R.O., Mercuri, O. and Restelli, M.A. (1988) *Am. J. Physiol.* 215: 83.
- 86.- Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1970) *J. Lipid Res.* 11: 96.
- 87.- Oshino, N. and Sato, R. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 148: 389.
- 88.- Alaniz, M.J.T. de, Gómez Dumm, I.N.T. de and Brenner, R.R. (1980) *Mol. Cell. Biochem.* 33: 165.
- 89.- Inkpen, C.A., Harris, R.A. and Quackenbush, F.W. (1969) *J. Lipid Res.* 10: 277.
- 90.- Jeffcoat, R. and James, A.T. (1977) *Lipids* 12: 469.
- 91.- Brenner, R.R. and Peluffo, R.O. (1966). *J. Biol. Chem.* 241: 5219.
- 92.- Peluffo, R.O., Nervi, A.M. and Brenner, R.R. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 441: 25.
- 93.- Gómez Dumm, I.N.T. de, Peluffo, R.O., Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1982) *Anales Asoc. Quim. Arg.* 70: 383.
- 94.- Hagve, T.A. and Christophersen, B.O. (1984) *Biochim.*

- Biophys. Acta 796: 205.
- 95.- Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1983) *Lipids* 18: 781.
- 96.- Brenner, R.R., Garda, H., Gómez Dumm, I.N.T. de and Pezzano, H. (1981) *Prog. Lipid Res.* 20: 315.
- 97.- Peluffo, R.O. and Brenner, R.R. (1974) *J. Nutr.* 104: 894.
- 98.- Peluffo, R.O., Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1971) *J Nutr.* 101: 1075.
- 99.- De Tomàs, M.E., Mercuri, O. and Rodrigo, M.A. (1980) *J. Nutr.* 110: 595.
- 100.- Garg, M.L., Snowsall, A.M. and Sabine, J.R. (1986) *Prog. Lipid Res.* 25: 639.
- 101.- Leikin, A.I. and Brenner, R.R. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 922: 294.
- 102.- Leikin, A.I. and Brenner, R.R. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 963: 311.
- 103.- Alam, S.Q., Alam, B.S. and Ta-Wi, T. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 792: 110.
- 104.- Alam, S.Q. and Alam, B.S. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 833: 175.
- 105.- Cunnane, S.C. and Horrobin, D.F. (1981) *Prog. Lipid Res.* 20: 835.
- 106.- Cunnane, S.C. (1981) *Prog. Lipid Res.* 20: 601.
- 107.- Rav, G.A., Crane, R.T. and Larkin, E.C. (1983) *Lipids* 18: 573.

- 108.- Narce, M., Poisson, J.P. and Seances, C.R. (1985) Soc. Biol. Ses. Fil. 179: 732.
- 109.- Gellhorn, A. and Benjamin, W. (1964) Biochim. Biophys. Acta 84: 167.
- 110.- Gellhorn, A. and Benjamin, W. (1965) Ann. N. Y. Acad. Sci. 131: 344.
- 111.- Mercuri, O., Peluffo, R.O. and Brenner, R.R. (1966) Biochim. Biophys. Acta 116: 409.
- 112.- Mercuri, O., Peluffo, R.O. and Brenner, R.R. (1967) Lipids 2: 284.
- 113.- Fass, F.H. and Carter, W.J. (1960) Lipids 15: 953.
- 114.- Friedman, N., Gellhorn, A. and Benjamin, W. (1968) J. Med. Sic. 2: 677.
- 115.- Poisson, J.P. (1985) Enzyme 34: 1.
- 116.- Prasad, M.R. and Joshi, V.C. (1979) J. Biol. Chem. 254: 997.
117. De Tomás, M.E., Peluffo, R.O. and Mercuri, O. (1973) Biochim. Biphys. Acta 306: 149.
- 118.- Adelman, R.C., Spolter, P.D. and Weinhouse, S. (1966) J. Biol. Chem. 241: 5467.
- 119.- Gómez Dummz, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1975) J. Lipid Res. 16: 264.
- 120.- Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1976) J. Lipid Res. 17: 616.
- 121.- Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1976) Lipids 11: 833.

- 122.- Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R.
(1980) *Lipids* 15: 1064.
- 123.- Mandon, E.C., Gómez Dumm, I.N.T. de and Brenner, R.R.
(1986) *Lipids* 21: 401.
- 124.- Mandon, E.C., Gómez Dumm, I.N.T. de and Brenner, R.R.
(1987) *Mol. Cell. Endocrinol.* 51: 127.
- 125.- Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R.
(1978) *Lipid* 10: 649.
- 126.- Mandon, E.C., Gómez Dumm, I.N.T. de, Marra, C.A. and
Brenner, R.R. (1987) *J. Lipid Res.* 28: 1377.
- 127.- Marra, C.A., Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1988)
Biochim. Biophys. Acta 958: 93.
- 128.- Kasturi, R. and Joshi, V.C. (1982) *J. Biol. Chem.*
257: 12224.
- 129.- Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R.
(1979) *J. Lipid Res.* 20: 834.
- 130.- Marra, C.A., Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1986)
Lipids 21: 212.
- 131.- Marra, C.A., Alaniz, M.J.T. de and Brenner, R.R. (1986)
Biochim. Biophys. Acta 874: 338.
- 132.- Faas, F.H. and Carter, W.J. (1982) *Biochem. J.* 207:
29.
- 133.- Gompertz, D. and Greenbaum, A.L. (1966) *Biochim. Biophys.*
Acta 118: 441.
- 134.- Gómez Dumm, I.N.T. de, Alaniz, I.N.T. de and Brenner, R.R.
(1977) *Adv. Exp. Med. Biol.* 83: 609.

- 135.- Faas, F.H. and Carter, W.J. (1981) *Biochem. J.* 193: 845.
- 136.- Wilson, A.C., Wakil, S.J. and Joshi, V.C. (1976) *Arch. Biochem. Biophys.* 173: 154.
- 137.- Clandin, M.T., Wong, K. and Hacker, R.R. (1985) *Biochem. J.* 227: 1021.
- 138.- Clandinin, M.T., Wong, K. and Hacker, R.R. (1985) *Biochem. J.* 226: 305.
- 139.- González, S., Nervi, A.M., Peluffo, R.O. and Brenner, R.R. (1983) *Lipids* 18: 7.
- 140.- Hagve, T.A. and Christophersen, B.O. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* 920: 149.
- 141.- Pugh, E.L. and Kates, M. (1979) *Lipids* 14: 159.
- 142.- Sprecher, H. (1981) *Prog. Lipid Res.* 20: 13.
- 143.- Stoffel, W. (1968) *Naturwissenschaften* 53: 621.
- 144.- Kawashima, Y., Hirose, A. and Kozuka, H. (1986) *Biochem. J.* 235: 251.
- 145.- Silvius, J.R. and McElhaney, R.N. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1255.
- 146.- Fulco, A.J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244: 889.
- 147.- Cronan, J.E. Jr. (1975) *J. Biol. Chem.* 250: 7074.
- 148.- Watson, K. (1984) en "Biomembranes", Vol. 12, Cap.17 (Kates, M. and Manson, L.A., eds.), Plenum Press, New York).
- 149.- Barran, L.R., Miller, R.W. and Roche, I.A. de la (1976) *Can. J. Microbiol.* 22: 557.

- 150.- Madhosigh, C. (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41: 1233.
- 151.- Nozawa, Y. and Kasai, R. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 529: 54.
- 152.- Mazliak, P. (1979) en "Low Temperature Stress in Crop Plants: The Role of the Membrane", pag. 391 (Lyons, J.M., Graham, D. and Raison, J.K., eds.). Acad. Press New York.
- 153.- Okuyama, H., Yamada, K., Kameyama, Y., Ikezawa, H., Akamatsu, Y. and Nojima, S. (1977) *Biochemistry* 16: 2668.
- 154.- Fujii, D.K. and Fulco, A.J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252: 3660.
- 155.- Thompson, G.A. Jr. and Nozawa, Y. (1984) en "Biomembranes" Vol. 12, Cap.13 (Kates, M. and Manson, L.A., eds.). Plenum Press, New York.
- 156.- González, S., Nervi, A.M. and Peluffo, R.O. (1986) *Lipids* 21: 440.
- 157.- Judy, W.V. (1981) en *Fisiología*, Cap. 28, Ed. "El Ateneo".
- 158.- Himms-Hagen, J. (1972) *Lipids* 7: 310.
- 159.- Jausky, L. (1973) *Biol. Rev.* 48: 65.
- 160.- Gale, C.C. (1973) *Ann. Rev. Physiol.* 35: 391.
- 161.- Himms-Hagen, J. (1976) *Ann. Rev. Physiol.* 38: 315.
- 162.- Nicholls, D.G. and Locke, R.M. (1984) *Physiol. Rev.* 64: 1.
- 163.- Hemingway, A. (1966) *Physiol. Rev.* 46: 67.
- 164.- Hemingway, A. and Price, W.M. (1968) *Anesthesiology* 29: 893.

- 165.- Mickel, R.P., Sussman, H., Yamada, K. and Brodie, B.B.
(1963) *Life Sci.* 3: 210.
- 166.- Mallov, S. (1963) *Am. J. Physiol.* 204: 157.
- 167.- Wertheimer, E., Hamosh, M. and Shafrir, E. (1980) *Am. J. Clin. Nutr.* 8: 705.
- 168.- Mitchell, C.E. and Longwell, B.B. (1984) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117: 590.
- 169.- Maickel, R.P., Westermann, E.O. and Brodie, B.B. (1961) *J. Pharmacol.* 134: 167.
- 170.- Gilgen, A., Maickel, R.P., Nikodievic, O. and Brodie, B.B.
(1962) *Life Sci.* 1: 709.
- 171.- Stock, K. and Westermann, E. (1965) *Arch. Exp. Path. Pharmac.* 251: 465.
- 172.- Himms-Hagen, J. (1965) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 43: 379.
- 173.- Masironi, R. and Depocas, F. (1961) *Can. J. Biochem. Physiol.* 39: 219.
- 174.- Pagè, E. (1957) *Rev. Can. Biol.* 16: 269.
- 175.- Therriault, D.G., Hubbard, R.W. and Mellin, D.B. (1969)
Lipids 4: 413.
- 176.- Therriault, D.G. and Poe, R.H. (1965) *Can. J. Biochem.* 43: 1427.
- 177.- Masoro, E.J. (1960) *Fed. Proc.* 19: 115.
- 178.- Radomski, M.W. (1966) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 44:
711.
- 179.- Depocas, F. and Masironi, R. (1960) *Am. J. Physiol.*

- 199: 1051.
- 180.- Penner, P.E. and Himms-Hagen, J. (1968) Can. J. Biochem.
46: 1205.
- 181.- Nakagawa, H. and Nagi, K. (1971) J. Biochem. (Tokyo)
69: 923.
- 182.- Estler, C.J., Ammon, H.P. and Lang, B. (1970) Eur. J.
Pharmacol. 2: 257.
- 183.- Bruck., K., Wunnerberg, W. and Zeisberger, E. (1969) Fed.
Proc. 28: 1035.
- 184.- LeBlanc, J. and Villenaire, A. (1970) Am. J. Physiol.
218: 1742.
- 185.- Chafee, R.R. and Roberts, J.C. (1971) Ann. Rev. Physiol.
33: 155.
- 186.- Tanche, M. and Therminarias, A. (1969) Fed. Proc. 28:
1257.
- 187.- Kuba, K. and Tomita, T. (1971) J. Physiol. London
217: 19.
- 188.- Kawahata, A. and Carlson, L.D. (1959) Proc. Soc. Exp. Biol.
Med. 101: 303.
- 189.- Jansky, L. and Hart, J.S. (1968) Can. J. Physiol.
Pharmacol. 46: 653.
- 190.- Jansky, L. (1963) Can. J. Biochem. Physiol. 41: 1647.
- 191.- Johnson, G.E., Flattery, K.V. and Schonbaum, E. (1967) Can.
J. Physiol. Pharmacol. 45: 415.
- 192.- Lutherer, L.O., Fregly, M.J. and Anton, A.H. (1969) Fed.
Proc. 28: 1236.

- 193.- Gale, C.C., Williams, R. and Toivola, P. (1971) Acta
Endocrinol. Suppl. 155: 34.
- 194.- Collins, R.J. and Weiner, J.S. (1966) Physiol. Rev.
48: 785.
- 195.- Cannon, B. and Nedergaard, J. (1985) Essays Biochem.
20: 110.
- 196.- Cannon, B. and Nedergaard, J. (1985) en "New Perspectives
in Adipose Tissue: Structure, Function and Development",
Pag. 223 (Cryer, A. and Van, R.L.R., eds.) London:
Butterworths.
- 197.- Williamson, D.H. (1986) Biochem. Soc. Trans. 14: 225.
- 198.- Nicholls, D.G. and Rial, E. (1984) TIBS 9: 489.
- 199.- Bianco, A.C. and Silva, J.E. (1987) Am. J. Physiol.
253: E255.
- 200.- Jacobsson, A., Stadler, V., Glotzer, M.A. and Kozak, L.P.
(1985) J. Biol. Chem. 260: 16250.
- 201.- Ricquier, D., Bouillaud, F.,
Toumelin, P., Mory, G., Bazin, R., Arch, J. and Penicaud,
L. (1986) J. Biol. Chem. 261: 13905.
- 202.- Bulychev, A., Kramar, R., Drahota, Z. and Lindberg, O.
(1972) Exp. Cell Res. 72: 169.
- 203.- Christiansen, E.N., Drahota, Z., Duszynski, J. and
Wojtczak, L. (1973) Eur. J. Biochem. 34: 506.
- 204.- Rafael, J., Wiemer, G., Hohorst, H.J. and Burekhardt, W.
(1974) Z. Physiol. Chem. 355: 341.
- 205.- Kuroshima, A. and Yahata, T. (1979) Jap. J. Physiol.

- 29: 683.
- 206.- Arieli, A. and Chinet, A. (1985) Horm. Metabol. Res. 17: 12.
- 207.- Rabi, T., Cassuto, Y. and Gutman, A. (1977) J. Appl. Physiol. 43: 1007.
- 208.- Yousef, M.K. and Johnson, H.D. (1970) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135: 768.
- 209.- Rousset, B. and Cure, M. (1975) Pflugers Arch. 354: 101.
- 210.- O'Brian, J.T., Bybee, D.E., Burman, K.D., Osburne, R.C., Ksiazek, M.R., Wartofsky, L. and Georges, L.P. (1980) Metabolism 29: 721.
- 211.- Andrews, J.F. and Ryan, E.M. (1976) J. Physiol. 263: 258.
- 212.- Smith, R. and Hoijer, D.J. (1962) Physiol. Rev. 42: 60.
- 213.- Actis Dato, S.M., Català, A. and Brenner, R.R. (1973) Lipids 8: 1.
- 214.- Peluffo, R.O., Brenner, R.R. and Mercuri, O. (1963) J. Nutr. 81: 110.
- 215.- Hogeboom, G.H. (1955) Methods Enzymol. 1: 18.
- 216.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193: 265.
- 217.- Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226: 497.
- 218.- Neskovic, N.M. and Kostic, D.M. (1966) J. Chromatog.

- 35: 297.
- 219.- Chen, P.S., Toribarra, T. and Huber, W. (1956) Anal. Chem. 28: 1756.
- 220.- Fiske, C.H. and Subbarow, Y.P. (1925) J. Biol. Chem. 66: 375.
- 221.- Burchfield, H.P. and Storrs, E.E. (1970) en "Biochemical Applications of Gas Chromatography", Academic Press, London.
- 222.- Ackman, R.G. (1963) Am. Oil Chem. Soc. 40: 558.
- 223.- Stubbs, C.D. and Smith, A.S. (1984) Biochim. Biophys. Acta 779: 89.
- 224.- Azumi, T. and McGynn, S.P. (1962) J. Chem. Phys. 37: 2413.
- 225.- Mitchell, C.E. and Longwell, B.B. (1964) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117: 590.
- 226.- Depocas, F. (1962) Am. J. Physiol. 202: 1015.
- 227.- Bakke, J.L. and Lawrence, N.L. (1971) Endocrinol. 89: 204.
- 228.- Kuhn, E.R., Bellon, K., Huybrechts, L. and Heyns, W. (1983) Horm. Metabol. Res. 15: 491.
- 229.- Tomasi, T.E. and Horwitz, B.A. (1987) Am. J. Physiol. 252: E260.
- 230.- DiStefano, J.J., Malone, T.K. and Jang, M. (1982) Endocrinol. 111: 108.
- 231.- Siva, J.E., Gordon, M.B., Cratz, F.R., Leonard, J.L. and Larsen, P.R. (1984) J. Clin. Invest. 73: 898.

- 232.- Bernal, J. and Escobar del Rey, F. (1975) *Acta Endocrin.*
78: 481.
- 233.- Silva, J.E. and Larsen, P.R. (1983) *Nature* 305: 712.
- 234.- Kopecky, J., Sigurdson, L., Park, I.R.A. and Himms-Hagen,
J. (1986) *Am. J. Physiol.* 251: E1.
- 235.- Garda, H.A. and Brenner, R.R. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*
769: 160.
- 236.- Garda, H.A. and Brenner, R.R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*
819: 45.
- 237.- Biequier, D., Mory, G. and Hemon, P. (1975) *FEBS Lett.*
53: 342.
- 238.- Oshino, N. and Sato, R. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*
149: 369.
- 239.- Jeffcoat, R. and James, A.T. (1978) *FEBS Lett.* 85:
114.
- 240.- Jeffcoat, R., Roberts, A. and James, A.T. (1979) *Eur. J.*
Biochem. 101: 447.
- 241.- Mercuri, O., Peluffo, R.O. and De Tomàs, M.E. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 369: 264.
- 242.- De Tomàs, M.E., Mercuri, O. and Peluffo, R.O. (1975) *Lipids*
10: 360.
- 243.- Ves Losada, A. and Peluffo, R.O. (1987) *Lipids* 22:
583.
- 244.- Hughes, S. and York, D. (1985) *Biochem. J.* 225: 307.
- 245.- Ves Losada, A. and Peluffo, R.O. (1987) *Lipids* 22:
282.

- 246.- Engler, D. and Burger, A.G. (1984) *Endocrin. Rev.* 5:
151.
- 247.- Hoch, H. and Lewallen, C.G. (1974) *J. Clin. Endocrinol.*
6: 663.
- 248.- Trimarchi, F., Benvenga, S., Frenzi, G.F., Mariotti, S. and
Consolo, F. (1982) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 54:
1045.
- 249.- Braverman, L.E., Ingbar, S.H. and Sterling, K. (1970) *J.*
Clin. Invest. 49: 855.
- 250.- Schwartz, H.L., Surks, M.I. and Oppenheimer, J.H. (1971) *J.*
Clin. Invest. 50: 1124.
- 251.- Ingraham, D.L. and Ramsden, D.B. (1981) *J. Endocrinol.*
88: 141.
- 252.- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Mariash, C.N., Kirlaw,
W.B., Wong, N.C.W. and Frenke, H.C. (1987) *Endocrin. Rev.*
8: 288.
- 253.- Surks, M.J., Koerner, D., Dillmann, W. and Oppenheimer,
J.H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248: 7066.
- 254.- Thomopoulos, P., Dastugue, B. and Defer, N. (1974) *Biochem.*
Biophys. Res. Commun. 58: 499.
- 255.- De Groot, L.J., Refetoff, S. and Strausser, J.
(1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4042.
- 256.- MacLeod, K.M. and Baxter, J.D. (1975) *Biochem. Biophys.*
Res. Commun. 62: 577.
- 257.- Oppenheimer, J.H. (1979) *Science* 203: 971.
- 258.- Dillmann, W.H., Surks, M.J. and Oppenheimer, J.H. (1974)

- Endocrinol. 95: 492.
- 259.- De Groot, L.J. and Torresani, J. (1975) Endocrinol. 96: 357.
- 260.- Surks, M.J., Koerner, D.H. and Oppenheimer, J.H. (1975) J. Clin. Invest. 55: 50.
- 261.- Visser, T.J., Bernard, H.J., Docter, R. and Hennemann, G. (1976) Acta Endocrinol. 82: 98.
- 262.- Horiuchi, R., Johnson, M.L., Willingham, M.C., Pastan, I. and Cheng, S. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 5527.
- 263.- Alderson, R., Pastan, I. and Cheng S. (1985) Endocrinol. 116: 2621.
- 264.- Pliam, N.B. and Goldfine, I.D. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 79: 116.
- 265.- Gharbi-chihi, J. and Torresani, J. (1981) J. Endocrinol. Invest. 4: 177.
- 266.- Krenning, E.P. (1979) FEBS Lett. 107: 227.
- 267.- Segal, J. and Ingbar, S.H. (1982) J. Clin. Invest. 70: 919.
- 268.- Botta, J.A., de Mendoza, D., Monero, R.D. and Favias, R.N. (1983) J. Biol. Chem. 258: 6680.
- 269.- Sterling, K., Campbell, G.A. and Brenner, M.A. (1984) Acta Endocrinol. (Copenhagen) 105: 391.
- 270.- Morgan, G. (1984) J. Endocrinol. 103: 265.
- 271.- Hashizume, K., Kobayashi, M., Miyamoto, T. and Yamauchi, K. (1986) Endocrinol. 118: 1063.

- 272.- Osty, J., Rappaport, L., Samuel, J.L. and Lennon, A.M.
(1988) *Endocrinol.* 122: 1027.
- 273.- Lefebvre, Y.A. and Venkatraman, J.T. (1984) *Biochem. J.*
219: 1001.
- 274.- Cheg, S., Hasumura, S., Willingham, M.C. and Pastran, I.
(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 947.
- 275.- Obata, T., Kitagawa, S., Gong, Q., Pastan, I. and Cheng, S.
(1988) *J. Biol. Chem.* 263: 782.
- 276.- Sterlig, K. (1979) *New Engl. J. Medic.* 300: 173.
- 277.- Schwartz, H.L. and Oppenheimer, J.H. (1978) *Endocrinol.*
103: 948.
- 278.- Van Hardeveld, C. (1986) *Basic Clin. Endocrinol.* 8:
579.
- 279.- Ismail-Beigi, F. and Edelman, I.S. (1970) *Proc. Natl. Acad.*
Sci. USA 67: 1070.
- 280.- Edelman, I.S. and Ismail-Beigi, F. (1974) *Recent. Prog.*
Horm. Res. 30: 235.
- 281.- Sestoft, L. (1980) *Clin. Endocrinol.* 13: 489.
- 282.- Weirich, R.T., Schwart, H.L. and Oppenheimer, J.H. (1987)
Endocrinol. 120: 664.
- 283.- Faas, F.H., Carter, W.J. and Wynn, J. (1972) *Endocrinology*
91: 1481.
- 284.- Diamant, S., Gorin, E. and Shapir, E. (1972) *Eur. J.*
Biochem. 26: 553.
- 285.- Roncari, D.A.K. and Murthy, V. (1975) *J. Biol. Chem.*
250: 4134.

- 286.- Volpe, J.J. and Marasa, J.C. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 380: 454.
- 287.- Gnoni, G.V., Landriscina, C. and Quagliariello, E. (1980) *Biochem. Med.* 24: 338.
- 288.- Gnoni, G.V., Landriscina, C. and Quagliariello, E. (1980) *FEBS Lett.* 122: 37.
- 289.- Goodridge, A.G. (1986) *Federation Proc.* 45: 2399.
- 290.- Mirsky, I.A. and Broh-Kahn, . (1938) *J. Biol. Chem.* 117: 6.
- 291.- Keyes, W.G. and Heimberg, M. (1979) *J. Clin. Endocrinol.* 64: 182.
- 292.- Stakkestad, J.A. and Bremer, J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* 711: 90.
- 293.- Stakkestad, J.A. and Bremer, J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 750: 2.
- 294.- Ellefson R.D. and Mason, H.L. (1984) *Endocrinol.* 75: 179.
- 295.- Peiffer, J.J. (1968) *J. Lipid Res.* 9: 193.
- 296.- Jurand, J. and Oliver, M.F. (1970) *Atherosclerosis* 11: 125.
- 297.- Deykin, D. and Vaughan, M. (1963) *J. Lipid Res.* 4: 200.
- 298.- Towle, H.C. and Mariash, C.N. (1986) *Federation Proc.* 45: 2406.
- 299.- Hoch, F.L., Depierre, J.W. and Ernster, L. (1980) *Eur. J. Biochem.* 109: 301.

- 300.- Hoch, F.L. (1981) *Prog. Lipid Res.* 20: 225.
- 301.- Patton, J.F. and Platner, W.S. (1971) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 196.
- 302.- Kirkely, K. (1972) *Acta Endocrinol.* 71: 62.
- 303.- Oppenheimer, J.H., Schwartz, H.L., Surks, M.I., Koerner, D. and Dillmann, W.A. (1976) *Recent. Prog. Horm. Res.* 32: 529.
- 304.- Towle, G.C., Mariash, C.N., Schwartz, H.L. and Oppenheimer, J.H. (1981) *Biochemistry* 20: 3486.
- 305.- Magnuson, M.A., Dozin, B. and Nikodem, U.M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 5906.
- 306.- Wong, N.C.W. and Oppenheimer, J.H. (1986) *J. Biol. Chem.* 261: 10387.
- 307.- Kates, M., Pugh, E.L. and Ferrante, G. (1984) en "Biomembranes", Vol. 12, Cap. 12, (Kates, M. and Manson, L.A., eds.) Plenum Press, New York.
- 308.- Gnoni, G.V., Landriscina, C. and Quagliariello, E. (1978) *FEBS Lett.* 94: 178.
- 309.- Mariash, C.N., Kaiser, F.E., Schwartz, H.L., Towle, H.C. and Oppenheimer, J.H. (1980) *J. Clin. Invest.* 65: 1126.
- 310.- Volpe, J.J. and Kishimoto, Y. (1972) *J. Neurochem.* 19: 737.
- 311.- Diamant, S., Gorin, E. and Shafrir, E. (1972) *Eur. J. Biochem.* 26: 553.
- 312.- Kumar, S., Das, D.K., Dorfman, A.E. and Asato, N. (1977)

Arch. Biochem. Biophys. 178: 507.

- 313.- Landriscina, C., Gnoni, G.V. and Quagliariello, E. (1976)
Eur. J. Biochem. 71: 135.
- 314.- Gnoni, G.V., Geelen, M.J.A., Bijleveld, C.E.,
Quagliariello, E. and van der Berg, S.G. (1985) Biochem.
Biophys. Res. Commun. 128: 525.
- 315.- Brenner, R.R. (1974) Mol. Cell. Biochem. 3: 41.