

R. 6515

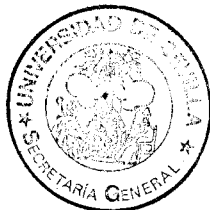
Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 137 número 73 del libro
correspondiente.

Sevilla, 14 NOV. 1988

El Jefe del Negociado de Tesis,

Ricardo de la Hita

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y BIOLOGÍA ANIMAL

**EFFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE ALGUNOS ASPECTOS
DEL METABOLISMO LIPIDICO EN RATAS**

Directores:

Dra. D^{ña}. Carmen M^{te} Vázquez Cueto

Dra. D^{ña} Valentina Ruiz-Gutierrez

Carmen Vázquez Cueto

Valentina Ruiz-Gutierrez

Tesis que presenta la Licenciada
M^{te} Teresa Molina López para optar
al grado de doctor en Farmacia.

Sevilla, Noviembre de 1988

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

El trabajo correspondiente a la Memoria que se presenta, ha sido realizado en el Departamento de Fisiología y Biología Animal de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de las Dras. D^{as}. Carmen M^a Vázquez Cueto y D^a Valentina Ruiz Gutierrez.

Deseo expresar mi agradecimiento a las Dras. Vázquez Cueto y Ruiz Gutierrez, por la dedicación y el apoyo que me han ofrecido en todo momento.

A los Profesores Dr. D. José Bolufer y Dra. D^a Anunciación Ilundáin, por su interés y asesoramiento durante la realización de la presente memoria.

Mi gratitud al Instituto de la Grasa y sus Derivados (C.S.I.C.) de Sevilla, y a su Director, D. Matías Fernández Díez, por las facilidades prestadas a la realización de este trabajo.

Asimismo, mi reconocimiento a los Departamentos de Bioquímica de la Facultad de Farmacia de Sevilla y de Ciencias de Granada por su colaboración.

También, mi agradecimiento a mis compañeros y amigos, por su ayuda y comprensión.

Finalmente, a la Junta de Andalucía, por la concesión de una Beca del Plan de Formación de Personal Investigador, sin la cual la realización de la presente Memoria no hubiera sido posible.

A mi familia

ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| ACAT | Acil CoA: colesterol aciltransferasa |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Acido etilendiaminotetraacético |
| EGTA | Acido etilenglicol-bis-(B-aminoetileter)- tetracético |
| HDL | Lipoproteínas de alta densidad |
| Hepes | Acido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperacín etano sulfónico |
| HMG-CoA | 3-Hidroxi-3-metilglutaril coenzima A |
| LDL | Lipoprotinas de baja densidad |
| Ra | Actividad HMG-CoA reductasa en el momento de la extracción del tejido |
| Rt | Actividad HMG-CoA reductasa total en el tejido una vez extraído. |
| R-50 | Ratas con resección del 50% del intestino delgado distal |
| R-75 | Ratas con resección del 75% del intestino delgado distal |
| VLDL | Lipoprotinas de muy baja densidad |

INDICE

| | |
|--|----|
| 1. <u>Introducción</u> | 1 |
| 1. <u>Metabolismo del colesterol en el hígado</u> | 2 |
| 1. <u>Origen del colesterol hepático</u> | 2 |
| 1. <u>Biosíntesis del colesterol. Actividad HMG-CoA reductasa</u> | 2 |
| 2. <u>Lipoproteínas plasmáticas</u> | 6 |
| 2. <u>Rutas metabólicas del colesterol hepático</u> | 7 |
| 1. <u>Esterificación de colesterol. Actividad ACAT</u> | 7 |
| 2. <u>Otras vías de utilización del colesterol hepático</u> .. | 9 |
| 2. <u>Metabolismo del colesterol en el intestino</u> | 11 |
| 1. <u>Absorción intestinal de colesterol</u> | 12 |
| 2. <u>Biosíntesis de colesterol en la mucosa intestinal</u> | 15 |
| 3. <u>Esterificación del colesterol en el intestino</u> | 19 |
| 4. <u>Liberación de lipoproteínas por la mucosa intestinal</u> . | 22 |
| 3. <u>Composición lipídica de membranas</u> | 25 |
| 1. <u>Modificaciones en la composición lipídica de membranas microsomales y actividad enzimática</u> | 31 |
| 4. <u>Circulación entero-hepática</u> | 33 |
| 1. <u>Efectos de la interrupción de la CEH</u> | 34 |
| 1. <u>Sobre la síntesis de colesterol</u> | 34 |
| 2. <u>Sobre la esterificación de colesterol</u> | 36 |
| 3. <u>Sobre la absorción de sustancias liposolubles (colesterol y ácidos grasos)</u> | 46 |
| 2. <u>Objeto del trabajo</u> | 40 |
| 3. <u>Material y Métodos</u> | 42 |
| 1. <u>Animales de experimentación. Dieta</u> | 43 |
| 2. <u>Reactivos</u> | 44 |
| 3. <u>Aparatos</u> | 44 |
| 4. <u>Técnica quirúrgica</u> | 45 |
| 5. <u>Determinación de la actividades enzimáticas</u> | 46 |
| 1. <u>Obtención de muestras</u> | 46 |
| 1. <u>Mucosa intestinal</u> | 46 |

| | |
|--|----|
| 2. Microsomias hepáticos e intestinales | 47 |
| 2. Determinación de actividad HMG-Co A reductasa | 48 |
| 3. Determinación de actividad ACAT..... | 52 |
| 6. Determinación de proteínas | 54 |
| 7. Análisis de lípidos | 54 |
| 1. Obtención de muestras | 54 |
| 1. Hígado | 54 |
| 2. Microsomias hepáticos e intestinales | 55 |
| 3. Sueros sanguíneos | 55 |
| 2. Aislamiento de lípidos | 56 |
| 3. Análisis espectrofotométrico de los distintos tipos de lípidos | 58 |
| 1. Determinación de colesterol y sus ésteres | 58 |
| 2. Determinación de fosfolípidos y triglicéridos | 59 |
| 4. Determinación de la composición lipídica en ácidos grasos | 60 |
| 8. Absorción intestinal | 61 |
| 1. Soluciones de incubación | 61 |
| 2. Técnica de absorción de Chow y Hollander | 63 |
| 3. Expresión de los resultados | 64 |
| 1. Cálculo de la absorción | 64 |
| 2. Cálculo de los parámetros cinéticos | 66 |
| 9. Análisis estadístico | 66 |
| 4. <u>Resultados</u> | 67 |
| 1. Características de los animales | 68 |
| 2. Determinación de las actividades HMG-CoA reductasa y ACAT en hígado e intestino. Efecto de la resección intestinal | 70 |
| 3. Composición lipídica de microsomias hepáticos e intestinales. Estudio de la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos microsomiales | 76 |
| 4. Composición lipídica del tejido hepático y suero. Estudio de la composición en ácidos grasos de las distintas fracciones lipídicas. Efecto de la resección intestinal | 83 |

| | |
|--|-----|
| 5. Absorción intestinal | 97 |
| 1. Determinación del volumen adherido a la mucosa intestinal. Efecto de la resección intestinal | 97 |
| 2. Absorción intestinal de ácido linoleico | 99 |
| 1. Absorción total de ácido linoleico en yeyuno de ratas en función de su concentración en el medio de incubación. Efecto de la resección intestinal ... | 99 |
| 2. Cálculo de los parámetros cinéticos para la absorción ción yeyunal de ácido linoleico en ratas controles y reseccionadas | 99 |
| 3. Absorción de ácido linoleico en el ciego y colon de ratas controles y reseccionadas. Efecto del ácido linolénico | 107 |
| 3. Absorción intestinal de colesterol | 111 |
| 1. Absorción total de colesterol en el yeyuno, ciego y colon en función de su concentración en el medio de incubación. Efecto de la resección intestinal | 111 |
| 5. <u>Discusión</u> | 120 |
| 1. Características de los animales | 121 |
| 2. Efecto de la resección intestinal sobre el metabolismo del colesterol | 122 |
| 3. Efecto de la resección intestinal sobre la absorción de ácido linoleico y colesterol | 136 |
| 6. <u>Conclusiones</u> | 148 |
| 7. <u>Bibliografía</u> | 153 |

1. INTRODUCCION

1.1. METABOLISMO DEL COLESTEROL EN EL HIGADO.

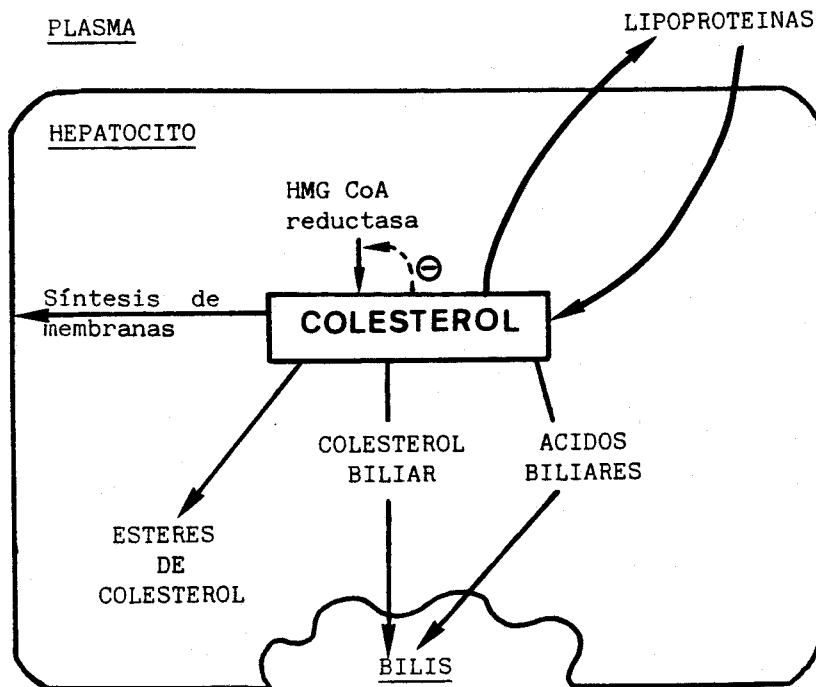
El colesterol es un elemento esencial para la mayoría de las células del organismo, por lo que su homeostasia es de vital importancia para un buen funcionamiento de las mismas. En el hepatocito, esta homeostasia resulta de un equilibrio entre, la llegada de colesterol vía lipoproteínas plasmáticas, la síntesis *de novo* de colesterol en la propia célula y la salida de éste en forma de lipoproteínas y como componente de la bilis. A su vez, el colesterol puede ser almacenado en la célula en forma de éster o formar parte de las membranas celulares como colesterol libre (ver Esquema 1).

1.1.1. ORIGEN DEL COLESTEROL HEPATICO.

1.1.1.1. Biosíntesis del colesterol. Actividad HMG-CoA reductasa.

La síntesis de colesterol en el hepatocito se produce a partir de acetil-CoA, mediante una cadena de reacciones de condensación, reducción e hidroxilación (Brown y Goldstein, 1978). En numerosas especies animales, incluida el hombre, la reacción que limita esta síntesis es la conversión de HMG-CoA a mevalonato, catalizada por la enzima HMG-CoA reductasa (E.C.1.1.1.34). Esta enzima utiliza NADPH como reductor y su pH óptimo es de 7.

Se ha encontrado actividad reductasa en muchos tejidos de mamíferos, y siempre está asociada al retículo endoplásmico de la célula. De todos los tejidos, dónde existe en mayor cantidad es en el hígado e intestino, de forma que de 2/3 a 3/4 partes del colesterol total del organismo se sintetiza en estos órganos (Gill *et al.*, 1985;



Esquema 1. Metabolismo hepático del colesterol. El hepatocito obtiene el colesterol de las lipoproteínas circulantes o mediante su biosíntesis. A su vez, la célula emplea el colesterol para la síntesis de membranas, secreción de ácidos biliares y formación de lipoproteínas. El exceso de colesterol se almacena como colesterol esterificado. La enzima HMG-CoA reductasa regula la biosíntesis de colesterol mediante retroinhibición por el sustrato formado (tomado de Packard y Shepherd, 1982).

Kenelly y Rodwell, 1985).

La actividad reductasa sufre cambios apreciables durante el desarrollo del feto y en el recién nacido, hasta alcanzar los valores basales en el adulto, acompañados de idénticas fluctuaciones en la síntesis de colesterol (Gill, *et al.*, 1985). Esta enzima presenta, además, un ritmo circadiano, con un máximo de actividad durante la noche, tanto en ratas (Shapiro y Rodwell, 1971) como en pollos (Ramirez *et al.*, 1982), detectándose este ritmo ya en las primeras semanas de vida. Gill *et al.* (1985) han postulado que el ritmo circadiano de la reductasa está bajo control hormonal, y su variación resulta de una alteración compleja de hormonas tales como la insulina, glucagón, corticoides, prolactina, T3, etc., cuyos niveles a su vez cambian en respuesta al tipo de alimentación.

La actividad reductasa está sometida a cambios que pueden ser debidos a variaciones en la cantidad total de la enzima (regulación a largo plazo) y/o a modulación de la actividad enzimática no dependiente de la síntesis de proteínas (regulación a corto plazo). Como mecanismo de regulación a corto plazo cabe destacar el mecanismo de fosforilación covalente reversible, según el cual, la reductasa es inactivada mediante fosforilación covalente, en una reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa-kinasa (Kenelly y Rodwell, 1985). La enzima inactivada, puede volver a ser reactivada por una reductasa-fosforilasa citosólica.

La modulación de la HMG-CoA reductasa mediante este mecanismo de fosforilación-defosforilación parece ser fisiológicamente importante. Así, Brown *et al.* (1979) encontraron en hígado de rata, que más del 75% de la enzima estaba fosforilada (inactiva). Según estos

autores, la reductasa fosforilada actuaría como reservorio que permitiría cambios rápidos en la actividad de la misma, cuando el hepatocito necesitara rápidamente colesterol (regulación a corto plazo). Los cambios en la proporción de reductasa activada respecto al total, revertirían a valores normales en 1-2 h después de producirse el estímulo, al mismo tiempo que se aumenta la cantidad total de la enzima. Con lo cual, tras esta primera fase de regulación, la cantidad de enzima aumenta y la relación reductasa activada/reductasa total retorna a sus valores normales (Arebalo *et al.*, 1981).

Además del mecanismo de fosforilación-defosforilación, otros posibles factores podrían actuar modulando la actividad reductasa. Entre estos factores están la composición lipídica de las membranas microsomales (como se verá en el apartado 1.3.1. de esta memoria), proteínas citosólicas transportadoras de lípidos y, por último, sales biliares (Mitropoulos *et al.*, 1978; Ramirez *et al.*, 1981; Sabine y James 1976).

En general, la mayoría de las variaciones en la actividad reductasa en distintas situaciones se deben, al menos en parte, a cambios en la cantidad de enzima (regulación a largo plazo). Shapiro y Rodwell (1971) demostraron que la cicloheximida, conocido inhibidor de la síntesis de proteínas, anulaba el aumento de actividad reductasa durante el periodo de oscuridad. Igualmente, Rodwell *et al.*, 1973, midiendo la incorporación de Leu(H^3) en reductasa purificada demostraron que los cambios en la actividad detectada a lo largo del día se debían a un aumento en la síntesis de nueva proteína, sin alterarse su degradación. El ayuno durante 24 h, produce una disminución de actividad en ratas sin cambios en la proporción de

enzima defosforilada (Ra) respecto a la enzima total (Rt). Por el contrario, el stress y la colestiramina aumentaron los niveles de actividad sin alterar la relación Ra/Rt en ninguno de los casos (Brown *et al.*, 1979). Por último, Jenke *et al.* (1981) utilizando anticuerpos específicos observaron, que la disminución de actividad que se produce en ratas a las 4 h de administrar una dieta con un 2% de colesterol, era debido a una decremento de la cantidad de proteína.

1.1.1.2. Lipoproteínas plasmáticas.

Las lipoproteínas circulantes (VLDL, LDL y HDL), constituyen otra fuente de colesterol para el hepatocito, aunque la síntesis *de novo* del colesterol, citada en el capítulo anterior, es cuantitativamente más importante. De todas las lipoproteínas circulantes parece ser que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) son las que transportan la mayor parte del colesterol en el plasma sanguíneo de la rata. Por el contrario, en el hombre son las LDL (Packard y Shepherd, 1982).

En el interior de estas lipoproteínas el colesterol es transportado en dos formas, que ocupan diferentes sitios en la partícula; el colesterol libre se localiza principalmente en la superficie, junto con fosfolípidos y proteínas, mientras que el colesterol esterificado y los triglicéridos forman parte de la matriz hidrofóbica de las lipoproteínas (Packard y Shepherd, 1982).

El colesterol de las LDL es captado por la célula hepática mediante la interacción de la lipoproteína con receptores específicos de membrana de alta afinidad. Esta vía está autorregulada, de forma

que cuando la célula tiene cubiertas sus necesidades de colesterol se suprime la síntesis de receptores de LDL. Por el contrario, ante una demanda de colesterol, la síntesis de receptores específicos para LDL se ve aumentada (Brown y Goldstein, 1978; Gill *et al.*, 1985).

1.1.2. RUTAS METABOLICAS DEL COLESTEROL HEPATICO.

El colesterol hepático proveniente de fuente endógena (síntesis) o exógena (lipoproteínas circulantes) puede ser: 1) almacenado intracelularmente como colesterol esterificado, 2) excretarse en bilis, 3) incorporarse a la síntesis de lipoproteínas y, 4) formar parte de las membranas celulares del propio hepatocito. A continuación consideraremos estas distintas rutas metabólicas (ver Esquema 1).

1.1.2.1. Esterificación de colesterol. Actividad ACAT.

El colesterol puede ser almacenado en la célula como éster de ácidos grasos de cadena larga, siendo la enzima responsable de esta reacción la ACAT. Esta es una enzima microsomal, presente prácticamente en todas las células del organismo, incluido el hígado. Como sustrato utiliza el colesterol de la misma membrana microsomal y, en cuanto a los ácidos grasos, la más alta afinidad la muestra por oléico y palmítico (Haugen y Norum, 1976; Balasubramanian *et al.*, 1978).

Al igual que la HMG-CoA reductasa, la ACAT hepática presenta un ritmo circadiano paralelo al de aquella (Mitropoulos *et al.*, 1978).

y su actividad está regulada por un mecanismo de fosforilación/defosforilación, pero de manera inversa, pues mientras la reductasa se inactiva por fosforilación la ACAT lo hace por defosforilación (Scalen y Saghvi, 1983).

La síntesis de ésteres de colesterol en el hígado se realiza bajo control de diversos factores. Uno de ellos parece ser la biodisponibilidad de colesterol celular. Tanto *in vivo* (Erickson *et al.*, 1980), como *in vitro* (Jones y Glomset, 1985), se ha observado una relación directa entre actividad ACAT y biodisponibilidad de colesterol.

Otro factor que parece afectar la actividad de esta enzima, es la composición lipídica de la membrana microsomal. La alteración de la relación fosfolípidos/colesterol de las membranas biológicas produce un cambio en la fluidez de las mismas, lo que da lugar a cambios en las actividades de las enzimas integradas en esas membranas (Spector y Yorek, 1985).

También se tiene evidencia de que la composición en ácidos grasos de la membrana microsomal regula de alguna forma la actividad de ACAT. En este sentido, se ha asociado un aumento en el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados con un aumento en la actividad ACAT, sin alteraciones apreciables en las cantidades de colesterol en las membranas, ni en la de fosfolípidos (Spector *et al.*, 1980). Otros autores asocian los cambios en la actividad ACAT con variaciones en las proporciones de ácidos grasos poliinsaturados de las series (n-6) y (n-3) en dichas membranas (Mathur *et al.*, 1981; Innis, 1986).

La ACAT hepática parece estar, igualmente, bajo control de las lipoproteínas circulantes (Packard y Shepherd, 1982). Así, se ha

comprobado que una disminución de LDL circulantes da lugar a un aumento de la actividad HMG-CoA reductasa y del número de receptores de LDL, mientras que la actividad ACAT decae hasta valores mínimos. Por el contrario, ante un aumento de LDL circulantes, los niveles de colesterol intracelular se elevan hasta hacer suprimir la actividad HMG-CoA reductasa y aumentar la actividad ACAT.

Recientemente, Gavey *et al.* (1981) han estudiado el papel de la SCP₂ (proteína citosólica transportadora de esteroides) en la esterificación del colesterol por la ACAT, demostrando que, cuando al medio de incubación se agrega SCP₂, la conversión del colesterol a sus ésteres se ve aumentada notablemente, y postulan que la SCP₂ posiblemente transporte la molécula de colesterol hasta la zona de la membrana microsomal donde se encuentra la enzima ACAT, favoreciendo así su esterificación.

1.1.2.2. Otras vías de utilización del colesterol hepático.

Una de las vías de eliminación hepática del colesterol es su secreción en bilis, bien como colesterol libre o como ácidos biliares. No existe acuerdo entre los distintos autores sobre la relación existente entre la biosíntesis de colesterol y su excreción en la bilis. En el hombre se ha encontrado una relación directa entre ambos hechos. Sin embargo, esta relación parece no existir para otras especies (Packard y Shepherd, 1982).

El colesterol en la bilis se mantiene en solución por la acción detergente de las sales biliares, de forma que la secreción de

sales biliares y colesterol parece estar acoplada. Las sales biliares se sintetizan en el hígado a partir del colesterol, por saturación e hidroxilación del mismo y posterior escisión oxidativa de su cadena lateral. Generalmente se acepta que la reacción inicial en la síntesis hepática de sales biliares es la introducción de un grupo hidroxilo en la posición 7 del anillo de colesterol. Esta reacción está catalizada por la enzima microsomal colesterol-7 α -hidroxilasa (Myant y Mitropoulos, 1977) y se ha demostrado que su sustrato de elección preferente es el colesterol libre de nueva síntesis (Ogura *et al.*, 1971; Shefer *et al.*, 1981).

Otra vía de excreción del colesterol es mediante la formación y secreción de lipoproteínas (principalmente VLDL y HDL). Parece ser que la síntesis y secreción de VLDL, lipoproteína rica en triglicéridos, está estrechamente relacionada con la síntesis de colesterol y la actividad HMG-CoA reductasa. Así, se ha demostrado que en ratas y en el hombre la estimulación de la secreción de VLDL se acompaña de un aumento en la actividad HMG-CoA reductasa, y que la secreción hepática de VLDL exhibe el mismo ciclo circadiano que la HMG-CoA reductasa (Packard y Shepherd, 1982). Basándose en estos resultados se propuso que, el aumento en la síntesis de VLDL disminuiría el "pool" de colesterol hepático, cuya consecuencia inmediata era el aumento de la actividad HMG-CoA reductasa mediante un mecanismo de retroalimentación negativo (Packard y Shepherd, 1982).

También, la ACAT hepática podría desempeñar un papel importante en la síntesis de lipoproteínas a partir de ésteres de colesterol, ya que la estimulación de la actividad ACAT en cultivos de hepatocitos da lugar a un aumento en la secreción de VLDL (Drevon *et*

al. 1980).

En cuanto a la excreción de colesterol como HDL, no parece depender de cambios en el metabolismo de triglicéridos ni de actividad HMG-CoA reductasa (Packard y Shepherd, 1982).

Finalmente, el colesterol libre intracelular del hepatocito también puede ser destinado a la formación de membranas de la propia célula.

1.2. METABOLISMO DE COLESTEROL EN EL INTESTINO.

La mucosa intestinal junto con el hígado, juega un papel importante en la homeostasia del colesterol en el organismo, debido, a que: 1) es en la mucosa intestinal donde se produce la absorción de colesterol exógeno (procedente de la dieta) y endógeno (colesterol biliar), 2) el intestino es el órgano más importante, después del hígado, para la biosíntesis de colesterol y, 3) secreta colesterol al sistema circulatorio en forma de lipoproteínas (quilomicrones).

El "pool" de colesterol en el enterocito debe mantenerse constante para cumplir eficazmente dos funciones:

1ª.- mantener el aporte de colesterol necesario para la síntesis y diferenciación de membranas celulares, ya que la superficie mucosal se haya continuamente en renovación,

2ª.- facilitar colesterol para la incorporación a lipoproteínas durante la absorción de triglicéridos.

La homeostasia de colesterol en el enterocito se basa en mantener en equilibrio el aporte y salida de colesterol celular, de manera

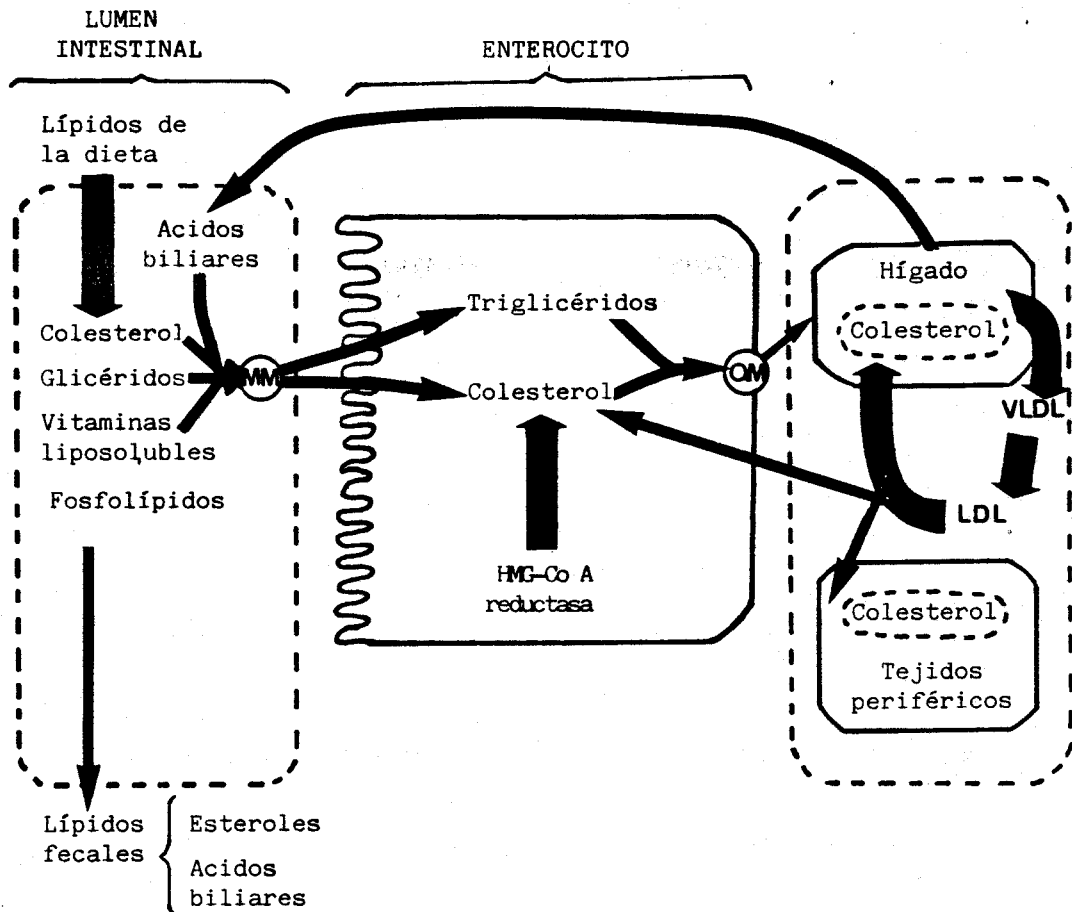
análoga a lo expuesto para el hígado. En el Esquema 2 se representa el papel que desempeña la célula intestinal en el metabolismo del colesterol, así como su relación con el hígado y otros tejidos periféricos.

A continuación se revisan las fuentes de colesterol para el enterocito y la utilización de éste por la célula epitelial.

1.2.1. ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL.

El colesterol procedente de la dieta o de la bilis, es una de las fuentes principales de colesterol para la célula intestinal. Durante mucho tiempo se ha estudiado el mecanismo por el cual los lípidos (colesterol) se absorben en el tracto gastrointestinal. Generalmente se acepta que el colesterol, al ser una molécula liposoluble, se absorbe desde la luz intestinal mediante un proceso de difusión pasiva, por dilución en la membrana de borde en cepillo del enterocito. El colesterol esterificado que entra en el lumen intestinal, es hidrolizado por la esterasa de colesterol pancreática previamente a ser absorbido (Thomson y Dietschy, 1981).

Para la absorción de los lípidos (colesterol) es esencial la participación de las sales biliares (Siperstein, 1960). Estas son sustancias anfipróticas, que en solución forman micelas, y estas micelas actúan englobando los monoglicéridos y ácidos grasos, junto con el colesterol manteniéndolos en suspensión (Westergaard y Dietschy, 1976). El paso del contenido micelar al enterocito se realiza por un proceso molecular, no a partir de micelas intactas (Watt y Simonds, 1976; Thomson y O'Brien, 1981).



Esquema 2. Balance de colesterol a través de la célula del epitelio intestinal. Tras la digestión, los lípidos se combinan con las sales biliares en el lumen intestinal para formar la mixelas mixtas (MM) que hacen posible la absorción de colesterol. Dentro de la célula intestinal triglicéridos y colesterol, además de apoprteinas específicas, forman los quilomicrones (QM), que transportan la mayoría del colesterol al hígado (tomado de Stange y Dietschy, 1985).

Se ha demostrado en ratas, que el colesterol de la dieta no se comporta de la misma forma que el colesterol biliar, siendo este último absorbido en mayor cuantía. Por otro lado, mientras la absorción de colesterol biliar se da principalmente en el yeyuno, el procedente de la dieta se absorbe a lo largo de todo el intestino delgado, preferentemente en la segunda y tercera cuarta parte. (Thomson y Dietschy, 1981).

Gallo-Torres *et al.* (1971) utilizando una técnica de canulación del conducto torácico *in vivo*, demostraron que las distintas sales biliares presentan diferente efectividad en la absorción de colesterol. Así, el taurocolato da lugar a absorciones de colesterol de igual rango que la bilis. El glicocolato y glicodeoxicolato son más efectivos que los correspondientes tauroconjugados. Además, la mayor proporción de colesterol esterificado encontrada en linfa se corresponde con la administración de trihidroxilados, con independencia de su conjugación o no. Sin embargo, todas estas observaciones sobre la relación entre la absorción de colesterol libre y esterificado y sales biliares, no se corresponden con la solubilidad *in vitro* del colesterol, utilizando estas mismas sales.

Thomson *et al.* (1983) han observado que la absorción de colesterol varía según las especies, siendo en el hombre mayor que en la rata. La absorción de colesterol, igualmente, sufre cambios a lo largo del desarrollo. En conejos, la absorción de colesterol es mayor en animales jóvenes que en viejos, probablemente debido a la mayor permeabilidad y superficie funcional de las membranas en animales jóvenes (Thomson, 1981). Por el contrario, en la rata la absorción *in*

nivo de colesterol aumenta con la edad (Hollander y Morgan, 1979). Así mismo, la captación de colesterol varía con la zona del intestino estudiada, siendo más alta en yeyuno que en íleon (Thomson, 1980) y absorbiéndose principalmente en la zona media de la vellosidad (Field *et al.*, 1982a).

Por otro lado, la permeabilidad pasiva de la membrana intestinal al colesterol se altera en respuesta a manipulaciones en el contenido de los distintos nutrientes de la dieta (Corraze *et al.*, 1984). Una dieta rica en ácidos grasos saturados da lugar a un aumento en la absorción de colesterol a los 14 días de implantar la dieta, efecto que no se observa con una dieta suplementada con ácidos grasos insaturados, pero la absorción vuelve a ser normal cuando se restituye la dieta estandard (Thomson *et al.*, 1987). Estos cambios no se ven acompañados por variaciones en los niveles de colesterol de la membrana de borde en cepillo (Thomson *et al.*, 1986).

1.2.2. BIOSINTESIS DEL COLESTEROL EN LA MUCOSA INTESTINAL.

Como ya se ha indicado, el intestino junto con el hígado son los dos órganos principales para la síntesis de colesterol en mamíferos. En la rata, el intestino contribuye con un 25% y el hígado con un 50% a la síntesis total de colesterol en el organismo y, al igual que ocurre en el hígado, la enzima reguladora de esta síntesis es la HMG-CoA reductasa (Turley *et al.* 1981; Spady y Dietschy, 1983). En esta especie animal, se ha detectado actividad HMG-CoA reductasa a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, desde el esófago al colon. Sin embargo, las mayores proporciones de síntesis de esteroides

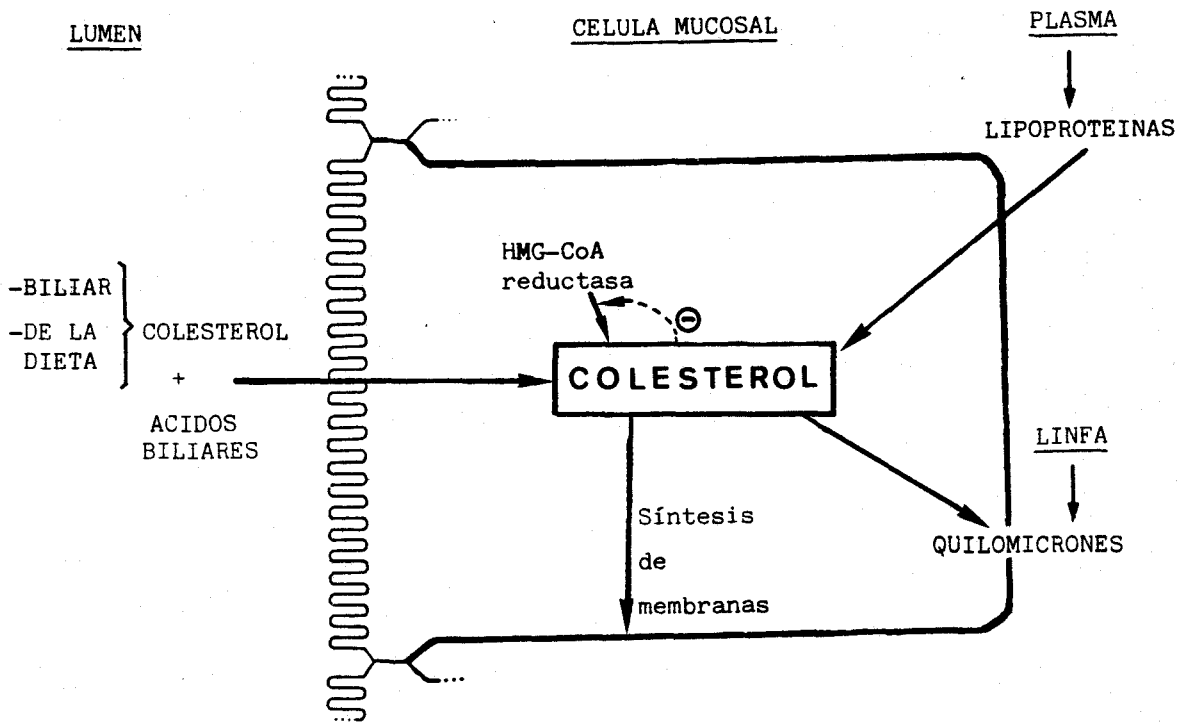
se dan en estómago, duodeno, íleon terminal y colon distal, registrándose las mas bajas en el intestino delgado medio, donde tiene lugar la absorción de colesterol. Esta distribución puede variar con la especie (Shefer *et al.*, 1973; Stange *et al.*, 1981; Stange y Dietschy, 1985). También existe un gradiente de actividad biosintética a lo largo del eje cripta-villus (Stange y Dietschy, 1985).

De forma análoga al hígado, los cambios en la actividad de la HMG-CoA reductasa intestinal pueden deberse a alteraciones en la síntesis o degradación de la enzima, ó a variaciones en la proporción de enzima fosforilada, dependiendo de que la regulación sea a largo o a corto plazo, respectivamente (Panini *et al.*, 1979; Panini y Rudney, 1980). Sin embargo, según Field *et al.* (1982b) la HMG-CoA reductasa intestinal es menos susceptible que la hepática a la modulación por fosforilación-defosforilación. Igualmente, la reductasa intestinal presenta un ritmo circadiano, que coincide con el de la hepática, aunque de menor amplitud (Stange y Dietschy, 1985).

La actividad de la HMG-CoA reductasa intestinal, y como consecuencia la síntesis de colesterol en las células de la mucosa intestinal, viene determinada por el contenido celular de colesterol que depende de: 1) la velocidad de absorción del colesterol desde la luz intestinal (ya mencionada), 2) la velocidad de captación de lipoproteínas circulantes por la membrana basal de la célula epitelial y, 3) las necesidades de colesterol que tenga la célula para formar quilomicrones y su propia estructura (ver Esquema 3).

En un principio se propuso que la biosíntesis de colesterol en el intestino dependía del "pool" de sales biliares (Dietschy, 1970).

Estudios posteriores sugieren que los cambios en el "pool" de



Esquema 3. Metabolismo del colesterol intestinal. La célula de la mucosa intestinal obtiene el colesterol a partir de tres fuentes: del lumen intestinal mediante su absorción, por síntesis directa de éste o a partir de las lipoproteínas circulantes. Parte del colesterol se utiliza para la síntesis de membranas, y otra parte sale a la circulación linfática en forma de quilomicrones. La HMG-CoA reductasa regula la biosíntesis de colesterol mediante retroinhibición por el sustrato (tomado de Packard y Shepherd, 1982).

sales biliares alteran la síntesis de colesterol de forma secundaria, es decir, afectando la absorción intestinal de colesterol, siendo el colesterol molecular el responsable de su propia síntesis (Shefer *et al.*, 1973; Stange *et al.*, 1983). En este sentido, se comprobó que algunos bloqueantes de la absorción de colesterol (surformer, diosgenina) aumentaban la colesterogénesis a lo largo del eje cripta-villus (Stange y Dietschy, 1985).

Otra fuente de colesterol para la célula epitelial es la captación de lipoproteínas circulantes (LDL) por la membrana basolateral. Recientemente se ha demostrado que en la rata y en el hamster, el intestino es el segundo lugar más importante para la degradación de LDL después del hígado. El 50-60% de la captación de LDL por el enterocito depende de la interacción de la lipoproteína con receptores específicos, siendo la captación no dependiente de receptores más importante en hígado y glándulas endocrinas (Stange y Dietschy, 1985). Se ha comprobado, que inhibidores de la secreción hepática de lipoproteínas producen un aumento de la actividad HMG-CoA reductasa en el intestino, que revierte con la administración intravenosa de LDL. De igual manera, en cultivos de células epiteliales se ha comprobado que las LDL suprimen la actividad reductasa intestinal (Andersen y Dietschy, 1977). Estos estudios ponen de manifiesto que esta actividad reductasa en la célula intestinal viene regulada por la captación de lipoproteínas circulantes.

Igualmente, pueden afectar a la actividad reductasa los cambios en las necesidades de colesterol que presente la célula para formar quilomicrones o para la propia estructura de sus membranas. Stange *et al.* (1983), comprobaron que el aumento en la ingestión de

triglicéridos daba lugar a un aumento en la síntesis de colesterol, lo que sugiere que el colesterol sintetizado *de novo* podría ser utilizado para la producción de quilomicrones (Stange y Dietschy, 1985).

La mayor síntesis de colesterol encontrada en las células de la cripta respecto a la de las células superiores de la vellosidad, sugieren que la mayor parte del colesterol sintetizado es incorporado en las membranas de las nuevas células, contribuyendo así a la formación y maduración del epitelio intestinal.

Por último, al igual que en el hígado, la actividad HMG-CoA reductasa intestinal puede depender de cambios en la fluidez de la membrana, y aunque existe controversia en este tema, Field *et al.* (1987) sugieren que la regulación de la enzima intestinal se relaciona con el grado de saturación de los ácidos grasos de la membrana microsomal.

1.2.3. ESTERIFICACION DEL COLESTEROL EN EL INTESTINO.

El colesterol se absorbe desde el lumen intestinal como colesterol libre. Sin embargo, la mayor parte del colesterol encontrado en linfa está esterificado. Por esta razón, algunos autores sugieren que la esterificación de colesterol es uno de los pasos limitantes para la absorción intestinal de este nutriente (Stange y Dietschy, 1985).

Se han descrito tres sistemas de esterificación del colesterol: ACAT intestinal, colesterol esterasa (CE) y colesterol éster-sintetasa (CES) (Stange y Dietschy, 1985).

La ACAT intestinal fué descrita por Haugen y Norum en 1976 y

se localiza en la membrana microsomal del enterocito, catalizando la misma reacción que la ACAT hepática. Tiene un pH óptimo de reacción de 7.2 y requiere ácidos grasos libres y un sistema regenerador de ATP o acil-CoA. El orden de preferencia por los sustratos es oleil>palmitoil>estearil>linoleil-CoA de manera análoga a la ACAT hepática. Respecto al colesterol, el absorbido desde la luz intestinal, parece ser el sustrato preferente para la ACAT, aunque el colesterol sintetizado *de novo* en la célula epitelial puede también ser utilizado como sustrato (Bennet-Clarck y Tercyak, 1984). Los ácidos biliares actúan como inhibidores de dicha enzima. Presenta un ritmo circadiano paralelo al de la reductasa intestinal, pero de menor amplitud.

Hasta nuestros días se ha podido detectar actividad de esta enzima en el intestino de rata, conejo y hombre (Stange y Dietschy, 1985). En la rata, está presente en alta proporción en yeyuno, disminuyendo a medida que nos desplazamos al ciego. Esta misma distribución la presenta el intestino de conejo y hombre. La localización de la enzima varía también a lo largo del eje cripta-villus, presentándose la mayor cantidad en la zona de la vellosidad (Field *et al.*, 1982a; Gallo *et al.*, 1984b). Por tanto, la mayor esterificación del colesterol se realiza en aquellas zonas donde mayoritariamente se produce su absorción. No obstante, algunos autores presentan dudas sobre el papel que realiza la ACAT en la esterificación del colesterol absorbido desde el lumen (Gallo *et al.*, 1984a). Al mismo tiempo, parece existir una relación inversa entre la actividad biosintética de colesterol (baja en yeyuno y células de las vellosidades) y la esterificante (alta en yeyuno y villus) (Field *et*

et al., 1982a).

Se ha comprobado que la actividad ACAT aumenta como consecuencia de la adición de colesterol a la dieta, pero se observó que este aumento no dependía de la síntesis de proteína enzimática (ya que la cicloheximida no lo inhibía), sino que parece ser el resultado de un aumento en la biodisponibilidad de sustrato (Field *et al.*, 1982a; Stange y Dietschy, 1985; Field y Salome, 1982; Stange y Dietschy, 1985; Helgerud *et al.*, 1982).

Posteriormente, Purdy y Field (1984) postularon que la ACAT, independientemente de factores lumbales, estaba también regulada al igual que la HMG-CoA reductasa por las lipoproteínas plasmáticas, lo que apoya la idea de que, de manera análoga a la actividad hepática, la actividad ACAT intestinal es, al menos en parte, un reflejo de la disponibilidad de sustrato en las membranas microsomales.

Gallo *et al.* (1984b, 1987), demostraron que los inhibidores de la ACAT no causaban ninguna alteración en la absorción de colesterol, y que, recíprocamente, la disminución de la absorción de colesterol causada por la interrupción de la circulación entero-hepática no estaba acompañada por una disminución de actividad ACAT. De esta forma concluyeron que la ACAT no era la enzima responsable de toda la esterificación del colesterol que se producía tras su absorción intestinal, atribuyéndole un papel bastante importante a la colesterol-esterasa.

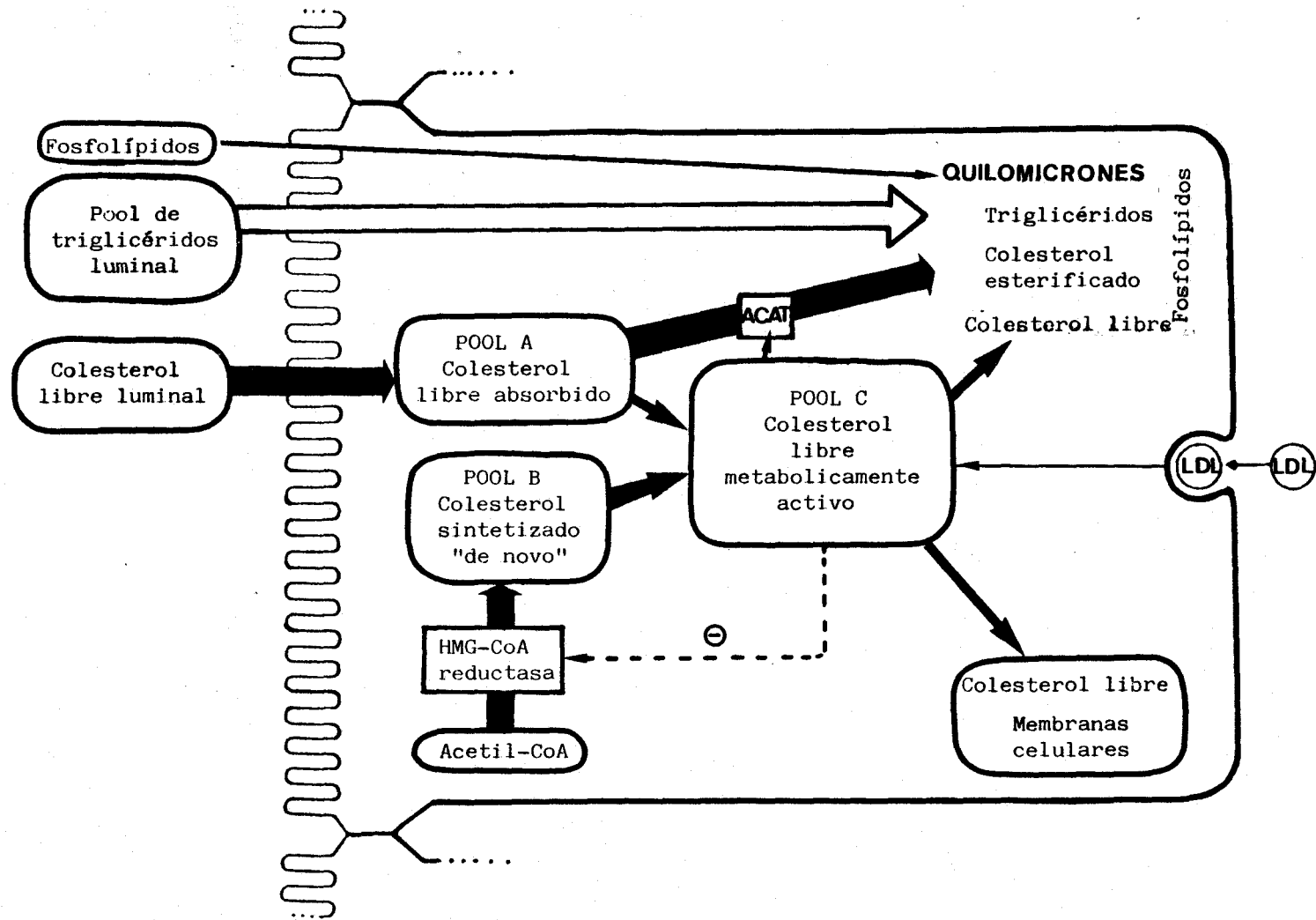
1.2.4. LIBERACION DE LIPOPROTEINAS POR LA MUCOSA INTESTINAL.

El enterocito libera a la linfa lipoproteínas, concretamente quilomicrones. Se ha demostrado que durante el ayuno, la mayoría del colesterol liberado por el enterocito en forma de lipoproteínas procede del hígado. Durante la absorción activa de triglicéridos se registra un aumento en la síntesis de colesterol en el enterocito, pasando éste a formar la cubierta de los quilomicrones. En esta situación, el intestino contribuye en una cuarta parte al colesterol encontrado en linfa. Por lo tanto, el colesterol nuevamente sintetizado en el enterocito es utilizado principalmente por la célula epitelial, y sólo aumenta marcadamente su síntesis cuando se necesita colesterol en exceso para formación de lipoproteínas durante la absorción de grasas (Stange y Dietschy, 1985). De manera análoga, cuando ratas en ayuno son tratadas con colestiramina, la formación de lipoproteínas por la célula intestinal disminuye (Gaugl y Ockner, 1975).

Según todo lo expuesto anteriormente acerca del metabolismo del colesterol en la célula intestinal, Stange y Dietschy (1985) propusieron un modelo de compartimentación del colesterol en la célula epitelial, donde se distribuyen tres "pools" distintos (ver Esquema 4):

- "pool" A: colesterol no esterificado, absorbido desde el lumen intestinal y sustrato preferente para la ACAT. Los ésteres resultantes se incorporarán al interior hidrofóbico de los quilomicrones.
- "pool" B: colesterol sintetizado por la propia célula, regulado por la HMG-CoA reductasa.
- "pool" C: formado por el "colesterol libre metabólicamente activo",

Esquema 4. Diagrama de los distintos "pools" y flujos de colesterol en la célula de la mucosa intestinal. Según la hipótesis propuesta por Stange y Dietschy (1985), es probable que existan, al menos, tres "pools" distintos de colesterol dentro de la célula mucosal: el "pool" A, formado por el colesterol absorbido desde el lumen intestinal, y que podría ser el principal sustrato para la ACAT; el "pool" B formado principalmente por el colesterol sintetizado *de novo* a partir de acetil-CoA y el pool C, que recibe el colesterol de los anteriores, probablemente con una mayor contribución del "pool" B y en menor cuantía del "pool" A. El colesterol libre de este "pool", llamado metabólicamente activo, está destinado a la formación de membranas y de quilomicrones (cubierta externa hidrofílica), y puede ser también esterificado por la ACAT. Los triglicéridos y fosfolípidos también son absorbidos y secretados en forma de quilomicrones a la linfa. Finalmente, las LDL plasmáticas son captadas por los receptores de la membrana basolateral y contribuyen también a este "pool" C metabólicamente activo (tomado de Stange y Dietschy, 1985).



que puede: 1) incorporarse a los quilomicrones como tal, 2) entrar a formar parte de la estructura de la membrana de la propia célula, y/o, 3) pasar a colesterol esterificado, por medio de la ACAT. A la formación de este "pool" contribuye, en principio, en mayor cuantía el "pool" B, y en menor cuantía, el colesterol del "pool" A y aquél que proviene de lipoproteínas captadas por receptores específicos de la membrana basal.

La contribución de cada uno de estos pools al de "colesterol metabólicamente activo", depende y varía con la localización de la célula a lo largo del intestino y su posición a lo largo del eje cripta-villus.

1.3. COMPOSICION LIPIDICA DE MEMBRANAS.

La estructura aceptada actualmente para las biomembranas es la de una bicapa lipídica, asimétrica, constituida por fosfolípidos, en cuya matriz se encuentra el colesterol y las proteínas de membrana intrínsecas y extrínsecas. La razón proteínas/lípidos varía dependiendo del tipo de membrana (membrana mitocondrial un 76%; membrana plasmática un 50%). Todos los fosfolípidos de membrana (fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol), menos las cardiolipinas, contienen ácidos grasos de 16 a 22 átomos de carbono. Estos ácidos grasos son en su mayoría insaturados, presentando de 1 a 4 dobles enlaces conjugados. Todos con conformación cis, lo que permite una mayor compactación. Dependiendo del pH, la cadena polar puede ser neutra (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina) o negativa (fosfatidilserina, fosfatidilino-

sitol).

Las membranas pueden encontrarse en estado de gel o fluido, dependiendo de la temperatura (Chapman *et al.*, 1985). Los lípidos con ácidos grasos cortos o insaturados tienen temperatura de transición más baja y, una forma de adaptación a mayores temperaturas es el aumento en la proporción de ácidos saturados, lo que mantiene el estado de fluidez a temperaturas más altas (Darnell *et al.*, 1986).

El colesterol es un componente de las membranas igualmente determinante de su fluidez. Normalmente, este colesterol se encuentra en forma libre, con sólo trazas de colesterol esterificado (Chapman *et al.*, 1985). Por su hidrofobicidad no forma estructuras compactas con él mismo, intercalándose con los fosfolípidos. Su grupo -OH interacciona con la cabeza polar de los fosfolípidos, mientras que el anillo esteroideo interacciona con las cadenas de ácidos grasos tendiendo a inmovilizarlos (Darnell *et al.*, 1986). El efecto neto del colesterol sobre la fluidez de membrana depende de la composición lipídica. Debido a las concentraciones altas de colesterol encontradas en eucariotas, el colesterol tiende a hacer la membrana menos fluida a temperaturas alrededor de 37 °C. Pero, por otro lado, impide la transición de fluido a gel y la drástica reducción de fluidez que ocurriría como consecuencia de una bajada de temperatura, ya que impide la unión entre cadenas de ácidos grasos (Darnell *et al.*, 1986).

Modificaciones en la composición lipídica, producen cambios en la fluidez de membrana, que podrían ser suficientes para alterar diversos procesos celulares tales como: transportes mediados, propiedades de enzimas de membrana y afinidades de hormonas por sus receptores. Pero, los efectos que producen las modificaciones en los lípidos de membrana

son muy complejos, varían de unas células a otras y son diferentes en cada uno de los fenómenos estudiados (Chapman *et al.*, 1985).

En los animales existen varias familias de ácidos poliénoicos, que difieren entre sí por el número de átomos de carbono existente entre el grupo metilo terminal y el doble enlace más próximo. Estas familias (ver Esquema 5) reciben el nombre de su ácido graso precursor, concretamente: palmitoleico (n-7), oleico (n-9), linoleico (n-9) y linolénico (n-3) (Brenner, 1974, 1977).

Los ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos son sintetizados en el retículo endoplásmico de la célula, a partir de ácido linoleico y α -linolénico (ácidos grasos esenciales), que mediante reacciones, alternadas, de desaturación y elongación dan lugar a ácidos grasos más insaturados y de mayor peso molecular.

De las dos reacciones microsómicas, desaturación y elongación, las de desaturación desempeñan un papel primordial en la biosíntesis de ácidos poliénoicos y están catalizadas por distintas Δ -desaturasas. Brenner (1966, 1974, 1977) ha descrito la Δ_9 , Δ_6 y Δ_5 -desaturasas hepáticas, y se postula la existencia de una Δ_4 -desaturasa. Todas estas enzimas utilizan como sustrato un ácido graso unido a CoA. En general las desaturasas muestran mayor afinidad por el sustrato más insaturado, compitiendo los distintos sustrato por el enzima. El orden de preferencia sería: familia del linolenico >linoleico >oleico >palmitoleico.

La Δ_6 -desaturasa ocupa una posición clave en la ruta biosintética de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que, regula la síntesis de ácido araquidónico (20:4, n-6), catalizando la conversión de ácido

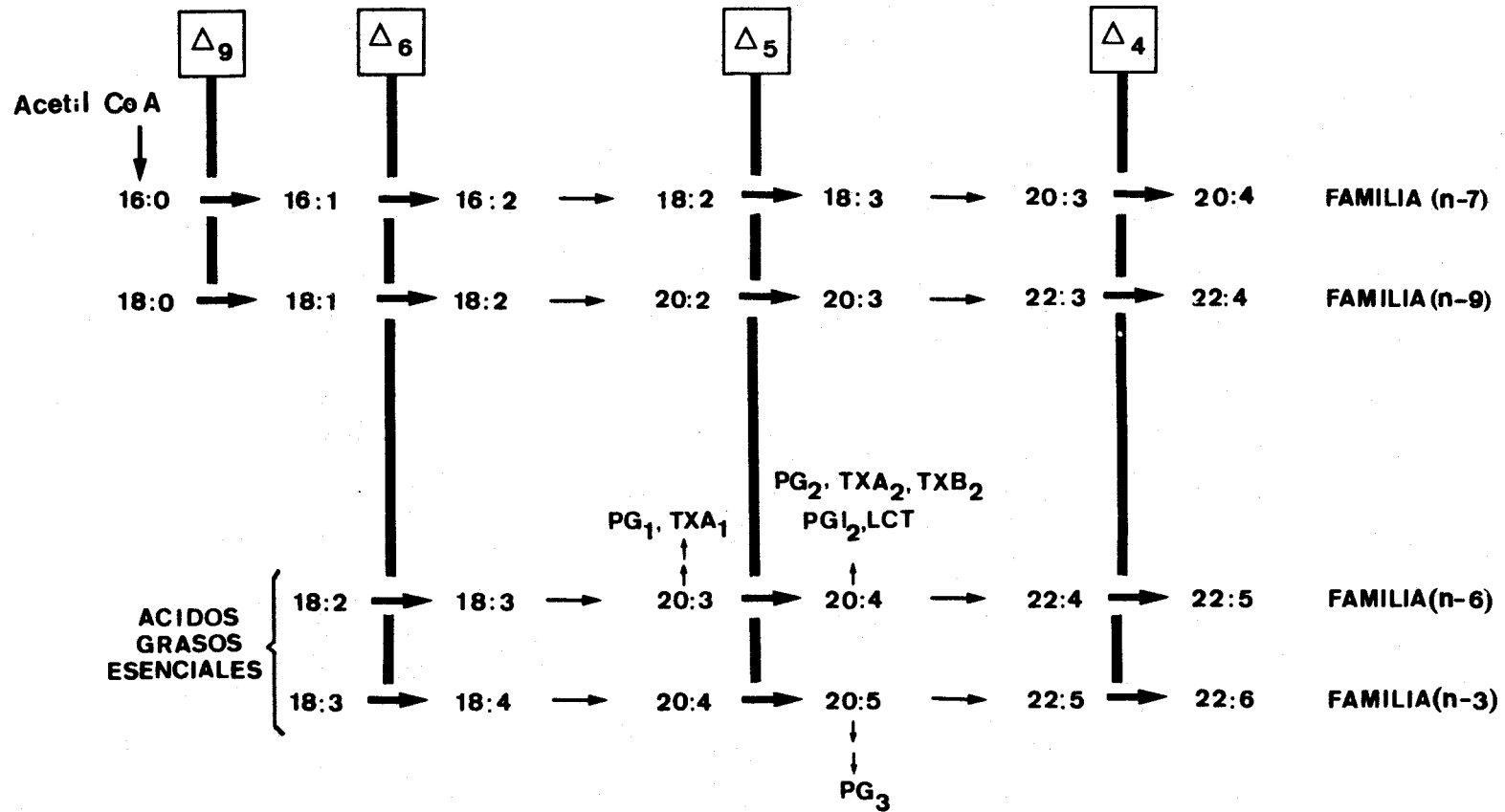
Esquema 5. Biosíntesis de ácidos grasos saturados e insaturados y destino de los ácidos poliénicos en los animales. Enzimas desaturasasa (Δ_9 , Δ_6 , Δ_5 y Δ_4): \longrightarrow ;enzimas elongasas: \longrightarrow TX: trombosanos; PG: protaglandinas; PGI: prostaciclínas; LCT: leucotrienos.

Familia (n-7): 16:0, ácido palmítico; 16:1(n-7), ácido palmitoleico.

Familia (n-9): 18:0, ácido esteárico; 18:1(n-9), ácido oleico; 20:3(n-9), ácido 5,8,11-eicosatrienoico.

Familia (n-6): 18:2(n-6), ácido linoleico; 20:4(n-6), ácido araquidónico .

Familia (n-3): 18:3(n-3), ácido α -linolénico.



linoleico (18:2, n-6) a ácido γ -linolénico (18:3, n-6). De modo que una modificación de su actividad, repercutiría rápidamente en la biosíntesis de todos los ácidos grasos superiores (Brenner, 1977). Los estudios de Brenner *et al.* (1974, 1976, 1977, 1981) han demostrado que la Δ_6 -desaturasa está bajo control de diferentes factores alimenticios, hormonales y ambientales. La falta de ácidos grasos esenciales aumenta su actividad y los poliinsaturados de cadena larga la disminuyen retroinhibición.

La Δ_5 -desaturasa cumple una función importante en la desaturación de ácidos grasos de 20 átomos de carbono, principalmente en la conversión del ácido 8,11,14-eicosatrienoico (20:3,n-6) a 5,8,11,14-eicosatetraenoico (20:4,n-6), ambos precursores de los prostanoïdes. La actividad Δ_5 -desaturasa se modifica por componentes alimenticios y hormonales, y mecanismos competitivos y de inducción. Por ejemplo, la deficiencia en ácidos grasos esenciales disminuye su actividad. La trioleína y los ácidos grasos poliinsaturados de la serie del linoleico producen una reactivación del enzima (Brenner, 1981).

Recientemente, Garg *et al.* (1988) han puesto de manifiesto que el enterocito posee actividad Δ_9 y Δ_6 desaturasa, postulando que el propio enterocito podría sintetizar parte de los ácidos grasos necesarios para formar los fosfolípidos de sus membranas, y para la síntesis de lipoproteínas.

Según lo indicado anteriormente, las desaturasas desempeñan un papel importante en la provisión de estructuras adecuadas para determinar las propiedades físico-químicas convenientes de las

membranas biológicas, y servir, además, de precursores de sustancias específicas de gran actividad biológica. Por ello, en situaciones patológicas como diabetes mellitus, ingestión crónica de alcohol o resección intestinal, las alteraciones en la composición química de las membranas celulares podrían deberse a cambios en la actividad de estas desaturases, lo que daría lugar a variaciones en las propiedades fisicoquímicas de las membranas y como consecuencia, en las características de los distintos sistemas de transporte.

1.3.1. MODIFICACIONES DE LA COMPOSICION LIPIDICA DE MEMBRANAS MICROSOMALES Y ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Los microsomas se definen como fragmentos de retículo endoplásmico obtenidos mediante la homogeneización de las células de un tejido. Estos fragmentos forman vesículas que se pueden aislar por centrifugación diferencial. La composición media de las membranas microsomales es de un 70-75% de proteínas y alrededor de un 27% de lípidos, siendo el 80% de estos últimos fosfolípidos y el resto colesterol libre (Ericksson *et al.*, 1970).

Numerosos trabajos han estudiado la relación entre la composición lipídica de las membranas microsomales y la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo de dichos lípidos.

Spector *et al.* (1980) comprobaron que la actividad ACAT en microsomas hepáticos de ratas alimentadas con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados era más alta que en los de ratas alimentadas con dieta suplementada con ácidos grasos saturados. A su vez, los microsomas de animales con una dieta rica en polinsaturados

presentaban una mayor proporción en ácidos grasos insaturados, 18:2(n-6) y 20:4(n-6), no registrándose diferencias en el contenido de colesterol o fosfolípidos, postulando que los cambios en la actividad ACAT se debían a una alteración en la composición de ácidos grasos de la membrana.

Field y Salome (1982) encontraron resultados análogos en microsomas de intestino de conejo, administrando dietas de distinto contenido en ácidos grasos y colesterol. Field *et al.* (1987) llegaron a la misma conclusión al estudiar la actividad HMG-CoA reductasa en hígado de conejos. Sin embargo, no descartaron la posibilidad de que el colesterol libre endógeno ejerciera una función reguladora sobre la enzima ACAT, ya que conejos alimentados con colestiramina, mostraron una disminución en los niveles de colesterol microsomal que iba acompañada de un decremento de la actividad ACAT.

Innis (1986) observó en ratas controles, una clara relación entre los niveles de (n-6) y (n-3) de microsomas hepáticos y altas actividades ACAT.

Davis y Poznansky (1987) encontraron que un aumento en la relación colesterol/fosfolípidos en microsomas de fibroblastos humanos daba lugar a una supresión de la actividad HMG-CoA reductasa y a una disminución de la fluidez de membrana, sugiriendo que el colesterol podría regular su propia biosíntesis, al menos en parte, mediante cambios en la fluidez de membrana producidos por el propio colesterol.

Todas estas observaciones indican que, con independencia de la regulación por el colesterol (ver apartados 1.1 y 1.2), la actividad de estas enzimas (HMG-CoA reductasa y ACAT) se afecta por la composición lipídica de la membrana.

1.4. CIRCULACION ENTERO-HEPATICA.

Como es bien sabido, las sales biliares se sintetizan en el hígado a partir del colesterol, se secretan por la bilis al intestino delgado donde, una vez cumplidas sus funciones fisiológicas, son reabsorbidas y transportadas de nuevo por vía portal al hígado. De esta forma se mantiene un depósito constante, relativamente grande, de sales biliares, a pesar de una pequeña síntesis hepática de las mismas. Este ciclo que realizan las sales biliares recibe el nombre de circulación entero-hepática (CEH).

Una interrupción en la CEH de sales biliares conduce a una alta reducción en las concentraciones de sales biliares tisular y endoluminal, que da por resultado cambios en la absorción de grasas. Como consecuencia, se producen profundas modificaciones en el metabolismo del colesterol que afectan a todos los tejidos del organismo. Esto se hace más evidente en el hígado e intestino, ya que son las principales fuentes de colesterol (Packard y Shepherd, 1982; Kuipers *et al.*, 1985).

La CEH puede quedar interrumpida patológicamente a nivel hepático, biliar o intestinal. En el hígado, por una alteración en el parénquima, a nivel de las vías biliares intra o extrahepáticas por una obstrucción funcional u orgánica de las mismas, y a nivel intestinal, por un fallo del íleon en la reabsorción de sales biliares, bien sea por una lesión de la mucosa o por una intervención quirúrgica.

1.4.1. EFECTOS DE LA INTERRUPCION DE LA CEH.

1.4.1.1. Sobre la síntesis de colesterol.

Experimentalmente la interrupción de la CEH puede lograrse por distintos métodos, siendo uno de ellos la administración oral de colestiramina, resina de intercambio iónico que fija sales biliares.

La administración a ratas de una dieta que contiene colestiramina durante 72 h. da lugar a un aumento de la actividad HMG-CoA reductasa hepática, no modificándose la relación reductasa fosforilada/defosforilada. Esto significa que en estas condiciones, la regulación a largo plazo de la biosíntesis de colesterol no es debida a cambios en el estado de fosforilación de la enzima, sino a variaciones en la actividad total de la misma. Sin embargo, no puede descartarse que, como mecanismo de urgencia, puedan ocurrir variaciones en el estado de fosforilación dentro del período de tiempo inmediato al inicio de la administración de colestiramina (Brown *et al.*, 1979; Erickson *et al.*, 1980).

Kuipers *et al.* (1985) comprobaron que la desviación total de la bilis en ratas no anestesiadas, producía un aumento de la actividad reductasa hepática de aproximadamente 5 veces a los 8 días del tratamiento quirúrgico, recuperándose los niveles de actividad normal a los dos días de la restauración de la CEH. Igualmente, la interrupción de la CEH en estos animales dió lugar a un descenso drástico en los niveles de colesterol plasmático, que gradualmente se fueron recuperando, produciéndose una fuerte subida de éstos tras la restitución de la circulación normal de la bilis. Este aumento

gradual en los niveles de colesterol era debido, según los autores, al aumento en la síntesis de colesterol producido durante el drenaje de la bilis, que se sumó a una mayor absorción de colesterol en el momento de restituir la CEH. Sin embargo, los datos de colesterol sérico obtenidos tras la ileotomía no son concluyentes. Así, mientras Vázquez *et col.* (1986) obtuvieron una tendencia al aumento en los niveles de colesterol plasmático tras la resección ileal en ratas, Miettinen y Peltokallio (1971) observaron que los valores de colesterol sérico eran normales en pacientes con ileotomía, indicando que la pérdida de colesterol tras la resección ileal estaba suficientemente compensada por un aumento en su biosíntesis. Por tanto, el mecanismo por el cual la HMG-CoA reductasa hepática se estimula como consecuencia de la interrupción de la CEH no está muy claro. Se ha sugerido, que el aumento de síntesis de sales biliares producido a partir de colesterol durante la interrupción de la CEH disminuye el pool de colesterol microsomal, anulando de esta forma la retroinhibición a la que está sometida la HMG-CoA reductasa por el colesterol (Stange y Dietschy, 1985).

En relación con la síntesis intestinal de colesterol en respuesta a la interrupción de la CEH, las variaciones en el "pool" de ácidos biliares no alteran directamente la actividad HMG-CoA reductasa, y parece estar regulada por cambios en la entrada de colesterol al enterocito. El aumento en la actividad HMG-CoA reductasa intestinal producido por la interrupción de la CEH es particularmente evidente en las células apicales de la vellosidades, que son las que normalmente están asociadas con las absorción de colesterol y sales biliares, y, en yeyuno más que en íleon. (Panini *et al.*, (1979);

Stange y Dietschy, 1985).

1.4.1.2. Sobre la esterificación de colesterol.

Los efectos de la interrupción de la CEH sobre la esterificación de colesterol han sido menos estudiados. Se ha observado que la administración de colestiramina a ratas no altera la actividad ACAT hepática, aún cuando la biosíntesis de colesterol se aumenta (Erickson *et al.*, 1980). Por otro lado, recientemente Innis (1986) ha comprobado en ratas, que la colestiramina no produce cambios en el nivel de colesterol microsomal hepático, ni en la actividad ACAT.

Respecto al intestino, la administración de colestiramina a conejos da lugar a una disminución del "pool" de colesterol microsomal junto con una reducción de la actividad ACAT intestinal, sin afectarse la composición en ácidos grasos de la membrana microsomal (Field y Salome, 1982). Sin embargo, Gallo *et al.* (1984b) efectuando una derivación del conducto biliar en ratas, no encontraron variaciones en la actividad ACAT intestinal. Análogos resultados fueron obtenidos por Stange y Dietschy (1985), administrando colestiramina o "surformer" (secuestrante de sales biliares y de colesterol, respectivamente).

1.4.1.3. Sobre la absorción de sustancias liposolubles (colesterol y ácidos grasos).

En general, la interrupción de la circulación entero-hepática da lugar a una malabsorción de lípidos, que toma especial importancia en el caso de los ácidos grasos esenciales. La deficiencia en ácidos

grasos esenciales puede causar distintas alteraciones, entre ellas: disminución del crecimiento, alteraciones en la piel, baja resistencia a infecciones, reducción de la contractilidad miocárdica, aumento de la agregación plaquetaria, disminución en la síntesis de prostanglandinas, etc. (Chow y Hollander, 1979a).

Antes de discutir los efectos de la interrupción de la CEH (por la resección intestinal) sobre la absorción de ácidos grasos y colesterol, trataremos brevemente los mecanismos que controlan su transporte intestinal en condiciones normales, y más concretamente los de ácidos grasos, ya que los de colesterol se han mencionado anteriormente (apartado 1.2.1).

Tanto el ácido linoleico como el ω -linolénico no pueden ser sintetizados por los animales, de ahí que reciban el nombre de esenciales y deban aportados por desde la dieta. Chow y Hollander (1978) describieron por primera vez el mecanismo de absorción *in vitro* del ácido araquidónico en yeyuno de ratas. A concentraciones fisiológicas, en el orden de μM , el ácido araquidónico se absorbía por un mecanismo de difusión facilitada. Por el contrario, a altas concentraciones, el mecanismo de absorción principal era el de difusión simple. Igualmente, observaron que la absorción dependía del pH luminal, aumentando con la acidez en un rango entre 7.4-5.4. Por lo tanto, la relativa acidez del contenido intraluminal del intestino delgado proximal comparado con el distal, supondría una ventaja para la absorción del ácido araquidónico en el yeyuno. El ácido oleico, linoleico, y linolénico inhibían la absorción de araquidónico en el yeyuno, lo que podría indicar que los ácidos grasos presentes en la dieta interaccionan entre ellos para su absorción. Así, se postula la

existencia de un transportador denominado genéricamente como FABP (proteína captadora de ácidos grasos) que media la absorción de estos ácidos grasos insaturados de cadena larga, compitiendo entre ellos por el transportador.

Al estudiar el mecanismo de transporte del ácido linoleico en el yeyuno *in vitro* (Chow y Hollander, 1979a) e *in vivo* (Chow y Hollander, 1979b) se observó que éste presentaba las mismas características que las del ácido araquidónico. De la misma forma, su absorción se inhibe por la presencia de otros ácidos insaturados, quizás por competir por el mismo transportador (Chow y Hollander, 1979a).

La absorción de ácidos grasos de cadena media (5-12 carbonos) se ha estudiado en yeyuno y colon, comprobando que su absorción se realiza por un proceso de difusión pasiva, aumentando el coeficiente de permeabilidad de la membrana con la longitud de la cadena carbonada (Thomson y Dietschy, 1981). Las manipulaciones en la composición de la dieta, el envejecimiento y diversos procesos patológicos como diabetes mellitus y alcoholismo crónico, dan lugar a variaciones en la absorción de estos ácidos grasos, en parte mediados, por los cambios en la resistencia de la capa de agua no agitada y variaciones en la composición lipídica de la membrana del borde en cepillo que se producen como consecuencia de estos procesos (Thomson, 1980; Thomson, 1981; Thomson, 1986a, 1986b; Thomson et al., 1986).

La resección intestinal da lugar a mecanismos compensatorios en el intestino remanente que contrarrestan la disminución de la superficie funcional de éste (Bolufer *et al.*, 1986; Molina *et al.*, 1986; Vázquez *et al.*, 1987; Vázquez *et al.*, 1988a, 1988b). La adaptación intestinal es mayor después de una resección de yeyuno que de una resección ileal

(Dowling y Booth, 1966).

Thomson (1986a) observó que en conejos con resección ileal aumentaba la absorción de colesterol, tanto en el yeyuno remanente como en colon, efecto que se atribuyó a cambios en la composición lipídica de la membrana de borde en cepillo, que hacían alterar la permeabilidad al colesterol. Así, Gray *et al.* (1984) observaron variaciones en la composición lipídica y fluidez de la membrana de borde en cepillo en ratas reseccionadas. Sin embargo, según Keelan *et al.* (1985) la resección ileal en conejos no produce modificaciones en la composición lipídica en dicha membrana. También se ha observado que la composición de la dieta puede modificar la capacidad adaptativa del intestino remanente para la absorción de colesterol (Thomson, 1986a, 1986b; Thomson *et al.*, 1987).

Los efectos de la interrupción de la CEH sobre la absorción de ácidos grasos no se han investigado en profundidad, y varían según el ácido graso estudiado. En conejos, la resección ileal provoca cambios en la permeabilidad del borde en cepillo para ácidos grasos saturados y el efecto de la resección intestinal sobre la absorción de dichos sustratos se afecta por la composición de la dieta (Thomson, 1986a; Thomson *et al.*, 1987).

2. OBJETIVO DEL TRABAJO

Como ya se ha indicado a lo largo de la introducción, la interrupción de la CEH afecta a diversos aspectos del metabolismo del colesterol, y uno de los métodos para interrumpir la CEH es la resección del intestino delgado distal.

Por ello nos pareció interesante estudiar y comparar, los efectos de dos tipos de resección del intestino delgado distal (50 y 75%) sobre el metabolismo de colesterol (hepático e intestinal), y sobre la absorción intestinal de lípidos, a las seis semanas de la operación, de acuerdo con el siguiente esquema de trabajo:

- 1) Determinación de las actividades HMG-Co A reductasa y la ACAT, en el hígado e intestino.
- 2) Determinación de la composición lipídica de las membranas microsomales hepáticas e intestinales, así como la composición en ácidos grasos de sus fosfolípidos, con el fin de conocer el posible efecto modulador de las mismas sobre la actividad de estas enzimas.
- 3) Determinación de la composición lipídica del tejido hepático y suero, junto con el perfil en ácidos grasos de sus distintas fracciones, que nos indicaría la respuesta general del organismo a la resección.
- 4) Estudio de la absorción de colesterol y ácido linoleico (ácido graso esencial) en el yeyuno, ciego y colon.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION. DIETA.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo con ratas macho de raza Wistar, de 3 meses de edad y cuyos pesos oscilaban entre 290 y 350 g. procedentes del Servicio de animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla.

Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta standard A-04 de Panlab[®], cuya composición fué la siguiente:

| | |
|-----------|--------|
| Lípidos | 3.5 % |
| Proteínas | 19.0 % |
| Glúcidos | 66.0 % |
| Celulosa | 5.0 % |
| Minerales | 5.5 % |
| Vitaminas | 1.0 % |

La composición en ácidos grasos de la fracción lipídica fué:

| | |
|-----------|--------|
| 16:0 | 18.0 % |
| 16:1(n-7) | 2.3 % |
| 18:0 | 4.0 % |
| 18:1(n-9) | 20.7 % |
| 18:2(n-6) | 49.4 % |
| 18:3(n-3) | 3.4 % |
| 20:0 | 0.1 % |
| 20:1(n-9) | 1.6 % |
| 22:0 | 0.3 % |

3.2. REACTIVOS.

Los reactivos para las determinaciones enzimáticas, así como el colesterol, ácido linoleico, ácido linolénico, ouabaina y rotenona procedían de la firma Sigma Chemical Co. (Inglaterra).

Los Kits para las determinaciones de lípidos y sus fracciones en suero fueron suministrados por QCA, Boehringer Mannheim y Wako Pure Chemical Industries.

Los radioisótopos procedían de la firma New England Nuclear.

Los restantes reactivos empleados fueron de grado analítico de las firmas Merck y Panreac.

3.3. APARATOS.

Las determinaciones espectrofotométricas se efectuaron en un espectrofotómetro Shimadzu UV-110-02. Las medidas de radioisótopos se hicieron en un contador de centelleo líquido Kontron, mod. Betamatic-I. Las centrifugaciones se realizaron en una centrífuga Beckman mod. J2.21, en una ultracentrífuga Beckman mod. Spinco L/L2 y en una microcentrífuga Eppendorf 5415. Las pesadas de los tejidos se efectuaron en una balanza analítica Sartorius 1207 MP2.

3.4. TECNICA QUIRURGICA.

Los animales se distribuyeron al azar en tres grupos experimentales:

- ratas controles
- ratas con resección del 50% del intestino delgado distal
- ratas con resección del 75% del mismo.

Veinticuatro horas antes de la operación, las ratas se mantienen en ayunas, y con agua *ad libitum*. Transcurrido este tiempo, se anestesian por vía intraperitoneal con pentobarbital sódico (4.5 mg/100 g de peso), controlando el grado de anestesia por la observación de los reflejos corneal y oculo-parpebral. Tras practicar la laparatomía media, las ratas asignadas a los grupos de resección se sometieron a la intervención quirúrgica descrita por Murillo *et al.* (1975). Para ello, una vez localizado el intestino y determinada la zona que vamos a excluir, se ligan los vasos de esta zona, seccionándolos a continuación y cortando el intestino por las zonas previamente señaladas. Finalmente se realiza la anastomosis término-terminal, preservando en todo momento la válvula ileocecal, y se cierran los planos peritoneal y muscular y piel.

En el caso de las ratas correspondientes al grupo control, se procede únicamente a cortar el intestino delgado (sin excluir parte alguna), realizando a continuación la anastomosis término-terminal.

Una vez finalizada, los animales se alojaron en jaulas individuales con un ciclo noche/día de 12 horas (4:00-16:00/16:00-4:00).

Por regla general, el periodo de recuperación fué de una semana

y. el porcentaje de mortalidad osciló alrededor de un 9%, produciéndose las muertes siempre en el periodo postoperatorio.

Todos los experimentos se realizaron a las seis semanas de la resección intestinal.

3.5. DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

3.5.1. OBTENCION DE MUESTRAS.

Seis semanas después de practicar la resección intestinal, las ratas se sometieron a una periodo de ayuno de aproximadamente 12 horas, tras el cual fueron sacrificadas mediante dislocación cervical, entre las 9 y 10 a.m. (mitad del periodo nocturno), momento de máxima actividad de las enzimas estudiadas (Brown et al., 1979; Stange y Dietschy, 1985).

Posteriormente, el hígado, intestino delgado proximal (yeyuno), ciego y colon se extrajeron rápidamente, y se procesaron como se describe a continuación.

3.5.1.1. Mucosa intestinal.

Para eliminar el contenido intestinal, los segmentos de intestino se lavaron con solución salina (NaCl 0.9%) fría con ayuda de una jeringa. Una vez medida la longitud de estos segmentos (yeyuno y colon) y sus pesos húmedos (yeyuno, ciego y colon) se raspó la mucosa de cada uno de ellos con ayuda de dos portaobjetos de vidrio, determinándose también su peso. Rápidamente estas mucosas se

congelaron en N_2 líquido y se almacenaron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de realizar los ensayos enzimáticos, que en este caso fue la determinación de actividad HMG-CoA reductasa.

3.5.1.2. Microsomas hepáticos e intestinales.

Para la obtención de los microsomas hepáticos el hígado se lavó con solución salina (NaCl 0.9%) fría. Una vez pesado y troceado, se homogeneizó en 3 volúmenes de tampón Hepes 10 mM (pH 7.4), que contenía: sacarosa 0.25 Mm, EDTA 20 mM, EGTA 2 mM y DTT 5 mM, utilizando un homogeneizador de tejidos con pistilo de teflón. Para determinar la actividad HMG-CoA reductasa presente en el hígado en el momento de la extracción (reductasa activa defosforilada), se añadió al medio de homogeneización NaF 50 mM que actúa como inhibidor de las defosforilasas durante el proceso de homogeneización.

El homogeneizado resultante se centrifugó a 500xg durante 12 minutos, para separar núcleos y células que no se han roto. El sobrenadante obtenido se volvió a centrifugar durante 20 minutos a 12000xg para sedimentar las mitocondrias y lisosomas, centrifugación que se repitió, tras la separación del sedimento, para asegurar la total eliminación de éstas. El sobrenadante postmitocondrial se centrifugó a 105000xg durante 60 minutos, resuspendiéndose el sedimento (fracción microsomal) en tampón de homogeneización en proporción 1:3. Los microsomas resuspendidos se congelaron en N_2 líquido y se conservaron a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento del ensayo.

En estas muestras microsomales se determinó actividad HMG-CoA

reductasa y ACAT.

Para obtener los microsomas intestinales, los distintos segmentos (yeyuno, ciego y colon) recién extraídos, se lavaron previamente con solución salina fría para eliminar el contenido intestinal y, una vez determinadas sus longitudes (yeyuno y colon) y pesos húmedos (yeyuno, ciego y colon) se abrieron longitudinalmente, se rasparon las mucosas y se pesaron. La mucosa de cada segmento se troceó y se homogeneizó utilizando el mismo medio descrito para los microsomas hepáticos. Las siguientes operaciones fueron similares a las realizadas para la obtención de los microsomas hepáticos. En estas muestras se determinó la actividad ACAT intestinal.

Todas las operaciones llevadas a cabo para el aislamiento de microsomas se efectuaron a 4 °C.

Los pesos de intestino se determinaron con aproximación de 1 mg. Para la medida de la longitud intestinal se siguió el método descrito por Vidal-Sivilla *et al.* (1950). Según éste, el segmento intestinal a medir se fija por un extremo y se cuelga al otro un peso de 30 g, lo que provoca una distensión máxima. La longitud medida en estas condiciones con aproximación de 1 mm se multiplica por el factor 0.6 para referirlo aproximadamente a la longitud propia del intestino *in situ*.

3.5.2. DETERMINACION DE ACTIVIDAD HMG-CoA REDUCTASA.

La actividad de esta enzima se determinó según el método descrito por Shapiro *et al.* (1974), ligeramente modificado, midiendo la formación de mevalonato radioactivo a partir de ^{14}C -HMG-CoA, usando

³H-mevalolactona como estandar interno.

La determinación se realizó en microsomas hepáticos y en mucosa intestinal de yeyuno, ciego y colon. El medio de reacción contenía en un volumen final de 150 µl: tampón imidazol 50 mM (pH 7.4) NaCl 0.25 M, EDTA 20 mM, EGTA 1 mM y DTT 5 mM. Los extractos microsomales hepáticos se diluyeron con este tampón hasta conseguir la cantidad adecuada de proteínas. Las mucosas intestinales se homogeneizaron en este medio, en proporción 1:3, al que se adicionó NaF 50 mM (al igual que en los microsomas hepáticos) en el caso de homogeneizar aquellas muestras en que se iba a medir la actividad reductasa presente en el tejido *in vivo*. Posteriormente, los homogeneizados se diluyeron hasta alcanzar la concentración óptima de proteínas.

Para el ensayo de la enzima se siguieron básicamente las siguientes etapas:

- en tubos de polietileno desechables se preincubaron a 37 °C, durante 15 min 200-400 µg de proteína microsomal o mucosal en 100 µl del medio de reacción descrito en el párrafo anterior.

- la reacción se inició con la adición de 50 µl de tampón imidazol 50 mM (pH 7.4) que contenía: NaCl 0.25 mM, EDTA 20 mM, EGTA 1 mM, DTT 5 mM, glucosa-6-fosfato 110 mM, NADP 13 mM, 1 unidad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 1 mM de ¹⁴C-DL-HMG-CoA (Re=2000 dpm/nmol para microsomas hepáticos y 5000 dpm/nmol para mucosa de intestino). La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos.

- transcurrido el tiempo de incubación la reacción se detuvo con 25 µl de HCl 1 N.

- a continuación se agregaron a cada tubo 25 µl de HCl 1 N que

contenían 0.78 mg de ^3H -mevalolactona, con una radioactividad de 3000-4000 dpm. La ^3H -mevalolactona se utiliza como estándar interno, mediante el cual pueden cuantificarse las pérdidas producidas en las etapas posteriores.

- la mezcla se mantuvo a 37 °C durante 30 minutos.

- finalmente los tubos se centrifugaron 1 minuto a 1000xg en una microcentrífuga, con el fin de sedimentar las proteínas. El producto de la reacción se aisló y se determinó en el sobrenadante obtenido.

La mevalolactona puede ser fácilmente separada del HMG-CoA y de sus productos de hidrólisis mediante cromatografía en capa fina. Para ello se emplearon placas de Silicagel G (tipo 60, Merck) de 20 x 20 cm y de 0.4 mm de espesor (50 g de Silicagel en 100 ml de agua destilada) activadas a 110 °C durante 60 minutos. Inmediatamente después se aplican 50 μl de cada uno de los sobrenadantes a unos dos cm del borde inferior de la placa. Posteriormente las placas se introducen en las cubetas que previamente se mantuvieron cerradas durante al menos 60 min conteniendo un sistema benceno:acetona (1:1) para conseguir una saturación completa, y una vez que el frente alcanza el extremo superior, las placas se sacan y se deja evaporar la fase móvil. El revelado se hizo con vapores de yodo y las zonas donde se encontraba la mevalolactona se rasparon y se depositaron en viales de centelleo líquido, a los que se añadieron 10 ml de líquido de centelleo (Triton X100-tolueno-PPO). Seguidamente se determinó la radiactividad presente en cada muestra.

Además de los viales problema, cada experimento constaba:

a) de 2 viales con 50 μl cada uno de la solución que contenía

^{14}C -DL-HMGCoA, que constituyen el patrón de ^{14}C , a partir del que se calculó la radiactividad específica (Re) en dpm/nmol.

b) de otros dos viales con 25 μl cada uno de solución clorhídrica de ^3H -mevalolactona, que constituían el patrón de ^3H , a partir del cual se calcularon las pérdidas, o factor de rendimiento (f).

La actividad específica del enzima (A_e) se calculó en cada caso según las siguientes expresiones:

$$A_e = \text{dpm } ^{14}\text{C}_m \cdot f / \text{Re. p. t.} \quad \text{donde,}$$

$$f = \text{dpm } ^3\text{H}_p / \text{dpm } ^3\text{H}_m$$

$\text{dpm } ^3\text{H}_p$ = desintegraciones por minuto de ^3H contenidas en el patrón (standard interno).

$\text{dpm } ^3\text{H}_m$ = desintegraciones por minuto de ^3H contenidas en la muestra.

$\text{dpm } ^{14}\text{C}_m$ = desintegraciones por minuto de ^{14}C contenidas en la muestra.

p = miligramos de proteína presentes en la muestra.

t = tiempo de incubación en minutos.

El ensayo se hizo por duplicado para cada muestra.

3.5.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ACAT.

La actividad de esta enzima se determinó básicamente según el método descrito por Field y Salome (1982). En el ensayo se mide la formación de oleato de colesterol radioactivo a partir de ^{14}C -oleil-CoA y usando ^3H -oleato de colesterol como standard interno.

Las determinaciones se realizaron en la fracción microsomal de hígado, yeyuno, ciego y colon.

El medio de incubación consistió en tampón Tris-HCl 0.1 M (pH 7.4) que contenía: sacarosa 0.25 M, DTT 1 mM, EDTA 1mM y 1.25 mg/ml de albúmina sérica bovina libre de ácidos grasos. Los extractos microsomales se diluyeron con este mismo medio hasta conseguir la concentración adecuada de proteínas.

Básicamente se siguieron las siguientes etapas:

- 400 μl de suspensión microsomal se preincubaron durante 5 minutos en tubos de vidrio a 37 °C. Esta suspensión contenía 200-400 μg de proteína microsomal en el caso del microsomas de hígado o de intestino delgado y 100-200 μg de proteína microsomal en el caso del ciego y colon.

- la reacción se incició con la adición al medio de 100 μl de medio de incubación que contenían 20 nmoles de ^{14}C -oleil-CoA (Re=5000 dpm/nmol para microsomas hepáticos y 8000 dpm/nmol para microsomas intestinales).

- la mezcla se incubó a 37 °C durante 8 min para los microsomas hepáticos, 4 min para los de intestino delgado y colon y 6 minutos para microsomas de ciego.

-la reacción se detuvo agregando al medio 1 ml de

cloroformo:metanol (2:1, v/v) y agitando vigorosamente.

- a continuación se añadió a cada tubo 3000 dpm, aproximadamente, de ^3H -oleato de colesterol y 0.5 mg de oleato de colesterol, disueltos en cloroformo. Estos productos actuaron como estándar interno y portador, respectivamente.

- los tubos se agitaron vigorosamente, y se centrifugaron a continuación para separar las fases. La fase clorofórmica se concentró en corriente de N_2 hasta un volumen apropiado para ser cromatografiada.

La cromatografía se realizó sobre placas de Silicagel 60 H preparadas y activadas como ya se indicó en el apartado 3.5.2 y se desarrollaron en un sistema hexano:éter etílico:ácido acético glacial (80:20:1). Al mismo tiempo se cromatografiaron patrones de oleato de colesterol y de triglicéridos, para identificar las bandas correspondientes a éstos y evitar raspar, por error, parte de la banda correspondiente a los triglicéridos, que aparece inmediatamente por debajo de los ésteres de esteroides. Tras el revelado de la placa, que se realizó con vapores de yodo, las áreas correspondientes a los ésteres de colesterol se rasparon sobre viales de centelleo y se contaron en el contador de centelleo indicado anteriormente.

El cálculo de la actividad específica se realizó como se describe en el apartado 3.5.2.

El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra.

3.6. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina sérica bovina como patrón.

3.7. ANALISIS DE LIPIDOS.

El análisis de lípidos del tejido hepático, microsomas hepáticos e intestinales y suero sanguíneo comprende: cuantificación del contenido lipídico mediante su aislamiento, separación y cuantificación de los distintos tipos de lípidos (colesterol, ésteres de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos) y determinación de la composición en ácidos grasos.

3.7.1. OBTENCION DE MUESTRAS.

3.7.1.1. Hígado.

Con objeto de evitar la contaminación de las muestras con hematies, los hígados utilizados en este estudio fueron perfundidos antes de proceder a su extracción lipídica. Para ello, al animal bajo ligera anestesia con éter, se le practicó la laparatomía media, implantando una cánula de salida en la vena cava superior (a través de la aurícula derecha) y una cánula de entrada en la vena porta, a la vez que se ligaba la vena cava descendente para evitar el desvío de flujo hacia ella. Previamente, al animal se le administró 100 U.I. de heparina por vía intravenosa (vena safena) con objeto de evitar la

coagulación. La cánula de entrada se conectó a un circuito por el que se hizo circular suero fisiológico a 4 °C utilizando una bomba peristáltica a una velocidad adecuada durante 5-10 min. Una vez limpio el hígado, éste se extrajo rápidamente y se congeló a -70 °C hasta el momento de realizar el estudio lipídico.

3.7.1.2. Microsomas hepáticos e intestinales.

Los microsomas hepáticos e intestinales utilizados para el estudio de la composición lipídica, se obtuvieron según el procedimiento descrito en el apartado 3.5.1.2, con la única diferencia de que en el caso de los microsomas hepáticos, el hígado fue previamente perfundido para evitar la contaminación sanguínea.

Los sedimentos microsomales, tanto hepáticos como intestinales, se resuspendieron en tampón Hepes 50 mM (pH 7.4) isotonicado con NaCl 0.25 mM en proporción 1:1 y se congelaron a -70 °C hasta el momento del ensayo.

3.7.1.3. Suero sanguíneo.

Los sueros se obtienen a partir de la sangre extraída por punción intracardiaca. Para ello, las muestras de sangre se mantienen 30 minutos a 37 °C y se centrifugan a 1000xg. Los sueros obtenidos se congelaron a continuación a -70 °C hasta el momento de su extracción.

3.7.2. AISLAMIENTO DE LIPIDOS.

La fracción lipídica de hígado, microsomas hepáticos e intestinales se extrajo por el método de Folch *et al.* (1957). La muestra de tejido o microsomas se homogeneizó en 20 volúmenes de la mezcla cloroformo:metanol 2:1 (v/v) con una ultra-turrax. El extracto se mezcló con un 20 % (v/v) de KCl 0.1 M con objeto de romper la emulsión formada permitiendo la separación de fases. La fase clorofórmica se recogió directamente sobre un matraz de rotavapor, previamente tarado, a través de un filtro de sulfato sódico anhidro para eliminar posibles restos de agua. La fase metanólica se extrajo de nuevo con una cantidad de cloroformo puro equivalente a la extraída en la primera separación, y el nuevo extracto clorofómico se unió al anterior.

Los extractos clorofórmicos se evaporaron hasta sequedad calculándose el peso del residuo seco (fracción lipídica). Posteriormente se resuspendieron en cloroformo:metanol, almacenándolos en tubos de vidrio con cierre de teflón en atmósfera de nitrógeno. Dichos residuos se mantuvieron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los lípidos del suero se extrajeron por el método de Sperry y Bland (1975). Para ello se empleó una mezcla cloroformo:metanol 1:1, en proporción 1:25 (volumen de suero/volumen de cloroformo:metanol), realizándose la extracción en dos etapas. Primeramente, la muestra permaneció durante 10 min. en contacto únicamente con metanol en agitación, para precipitar las proteínas. En segundo lugar se agregó el cloroformo, dejando la mezcla en agitación durante 15 min. La separación de fases, con recogida de la fase clorofórmica y

tratamiento posterior de las muestras se realizó de forma análoga a lo descrito para hígado y microsomas.

Una vez aisladas las fracciones lipídicas, los distintos tipos de lípidos a estudiar, fosfolípidos, colesterol, triglicéridos y ésteres de colesterol, se separaron mediante cromatografía en capa fina. Para ello, se utilizaron placas de 20x20 cm de Silicagel H (tipo 60, Merck) de 0.25 mm de espesor.

Sobre las placas, a unos 2 cm del borde inferior se aplicaron unos 25 mg de lípidos (pesados en balanza analítica) de cada muestra con ayuda de un capilar. Paralelamente se cromatografiaron en cada placa patrones de fosfolípidos, colesterol, triglicéridos y ésteres de esteroides. Una vez secas, las placas se desarrollaron en un sistema hexano:éter etílico:ácido acético 80:20:1 (v/v/v), y se revelaron con vapores de yodo. Tras la cromatografía se obtuvo una completa separación de triglicéridos y ésteres de colesterol, quedando los fosfolípidos en la base, bien diferenciados del colesterol. Una vez sublimado el I_2 , las bandas correspondientes a cada uno de estos lípidos se rasparon, extrayéndose los residuos lipídicos de la sílice con el disolvente apropiado para su posterior análisis (cuantificación espectrofotométrica o determinación de la composición lipídica de ácidos grasos).

3.7.3. ANALISIS ESPECTROFOTOMETRICO DE LOS DISTINTOS TIPOS DE LIPIDOS.

3.7.3.1. Determinación de colesterol y sus ésteres.

En muestras procedentes de hígado, microsomas hepáticos e intestinales la determinación de colesterol se realizó por el método de Huang *et al.* (1961), basado en la reacción de Liebermann-Burchard, consistente en la aparición de un color verde en las soluciones de colesterol en presencia de anhídrido acético y ácido sulfúrico.

El colesterol y ésteres de colesterol se extraen de la sílice eluyéndolos con 14 ml de cloroformo:metanol 2:1 y con 14 ml de éter isopropílico, respectivamente. Posteriormente, los eluatos se llevan a sequedad y sobre los residuos secos se realiza la determinación. Para ello, se adiciona a las muestras 0.2 ml de ácido acético glacial y 3 ml de una solución compuesta por: 30 ml de ácido acético glacial, 60 ml de anhídrido acético, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y 2 g de sulfato sódico anhidro. La mezcla se agita vigorosamente y se mide la absorbancia a 550 nm a los 55 minutos frente a blanco de reactivo. Los valores de colesterol y sus ésteres se determinaron frente a una curva de calibrado, preparada anteriormente utilizando colesterol como patrón.

En suero, los lípidos totales se determinaron por el método de la fosfovainillina (OCA[®]). El colesterol total y libre se determinó mediante Kits colorimétricos enzimáticos (Método CHOD-PAP de Boehringer Mannheim[®] n^o 290319 y Wako Pure Chemical Industries, Ltd. n^o 274-47109, respectivamente), obteniéndose los niveles de

colesterol esterificado por diferencia.

3.7.3.2. Determinación de fosfolípidos y triglicéridos.

En muestras de lípidos de hígado, microsomas hepáticos e intestinales se utilizó el método de determinación de ésteres de ácidos grasos de Vioque y Holman (1962). El método se basa en que los ácidos grasos esterificados reaccionan con la hidroxilamina. La amida formada como producto de esta reacción, da lugar en presencia de Fe^{+++} a un complejo coloreado que presenta un máximo de absorción a 520 nm.

Los triglicéridos y fosfolípidos se eluyeron de la sílice con 14 ml de cloroformo y 14 ml de cloroformo:metanol (2:1), respectivamente. Los eluatos se llevaron a sequedad y sobre ellos se realiza la espectrofotometría. Esta consiste en añadir 1 ml de una solución, previamente filtrada, mezcla a volúmenes iguales de NaOH (4 g de NaOH en 2.5 ml de agua destilada llevados a 50 ml con etanol absoluto) y de clorhidrato de hidroxilamina (2 g de sal en 2.5 ml de agua destilada llevados hasta 5 ml con alcohol absoluto). Los tubos se mantienen a 65-70 °C durante 5 minutos, pasados los cuales se enfriaron rápidamente, añadiendo a continuación a cada uno 2.5 ml de solución de Fe^{+++} (*).

* Solución de Fe^{+++} : primeramente se prepara una solución stock, disolviendo la cantidad de $FeCl_3$ equivalente a 0.4 g de Fe en 5 ml de HCl concentrado. Se añade 5 ml de ácido perclórico al 70% y se evapora casi a sequedad, diluyendo hasta 100 ml con agua. A partir de esta solución stock se prepara la solución de trabajo tomando 10 ml y llevándolos a un matraz de 1 l, al que se añaden 5 ml de ácido perclórico del 70%, enrasando a 1 l con alcohol de 95°.

Tras un período de tiempo de 15 min a temperatura ambiente se determinan la absorbancias a 520 nm, frente a blanco de reactivo. La curva patrón se preparó utilizando miristato de metilo como standard.

El peso molecular estimado de fosfolípidos fué de 787 (media de fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) y el de los triglicéridos de 856 (expresado como trioleato de glicerina).

La determinación de fosfolípidos y triglicéridos séricos se realiza mediante kits enzimáticos colorimétricos (Método de Boehringer Mannheim® y QCA nº 993976 (GPO) , respectivamente).

3.7.4. DETERMINACION DE LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS.

La composición en ácidos grasos de cada fracción lipídica se determinó por cromatografía gaseosa, para lo cual los ácidos grasos se transformaron en sus ésteres metílicos.

Previamente, cada fracción a analizar se eluye de la sílice con 14 ml del disolvente adecuado: cloroformo:metanol (2:1) para fosfolípidos, cloroformo para triglicéridos y eter isopropílico para ésteres de colesterol. Los eluatos se llevaron a sequedad y se saponificaron con 3 ml de metilato sódico 0.2 N calentando a 80 °C durante 10 minutos. A continuación se añade a cada muestra una gota de solución alcohólica de fenolftaleina como indicador de pH y se neutraliza con sulfúrico al 6% en metanol anhidro, calentando la mezcla a 80 °C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se dejan enfriar a temperatura ambiente y los ésteres metílicos formados se extraen 2 veces con 3 ml de hexano. Para facilitar la separación de fases se agrega a cada muestra 5 y 10 ml de

solución saturada de NaCl.

Posteriormente, los extractos hexánicos se concentraron y cromatografiaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 5710 A, equipado con un detector de ionización de llama (FID) y una columna de vidrio de 200 cm, compactada con 3% SP-2310 y 2% SP-2300 sobre 100/120 Cromosorb W AW. Como gas portador se empleó N₂ (20 ml/minuto), realizando un desarrollo a temperatura programada de 180 a 220 °C, y velocidad de 2 °C/minuto.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se identificaron, comparando los tiempos de retención con los correspondientes a muestras patrones de algunos de los ácidos grasos identificados.

3.8. ABSORCION INTESTINAL.

El estudio de la absorción intestinal se realizó en el yeyuno, ciego y colon utilizando la técnica de sacos evertidos vacíos descrita por Chow y Hollander (1978).

3.8.1. SOLUCIONES DE INCUBACION.

En todos los casos el medio de incubación utilizado fue solución Ringer (sin Ca⁺⁺) preparada extemporaneamente. El pH fue 7.4 para el ensayo de colesterol y 6.5 para el ensayo de ácido linoleico. La composición era: KHCO₃ 10 mM, K₂HPO₄ 2.4 mM, K₂HPO₄ 0.4 mM, MgCl₂ 1.3 mM y NaCl 140 mM. Este medio contenía los sustratos estudiados emulsionados con taurocolato sódico 10 mM.

Las soluciones micelares de colesterol se prepararon según la

técnica de Westergaard y Dietschy (1976) con ligeras modificaciones. Para ello se disolvieron las cantidades adecuadas de colesterol (0.4 mM) y taurocolato sódico (10 mM), junto con trazas de ^{14}C -colesterol en cloroformo:metanol 2:1. El disolvente orgánico fué evaporado en corriente de nitrógeno y el residuo seco se disolvió en solución Ringer (pH 7.4), previamente gaseada durante 15 minutos y reajustado su pH. La solución se sometió a ultrasonido durante 10 minutos con objeto de obtener una solución micelar clara. A partir de esta solución se prepararon las de concentraciones menores, 0.05, 0.1 y 0.2 mM diluyendo con taurocolato sódico 10 mM disuelto en Ringer marcado con trazas de ^{14}C -colesterol.

Las soluciones micelares de ácido linoleico (0.8 mM) se prepararon disolviendo las cantidades adecuadas de ácido graso y trazas de ^{14}C -ácido linoleico en una mínima (< del 1%) cantidad de etanol de 96°. Sobre esta mezcla se añadió la solución de taurocolato sódico 10 mM en solución Ringer (pH 6.5), previamente gaseada durante 15 minutos y reajustado su pH. La solución resultante se sometió a ultrasonido durante 10 minutos con objeto de obtener una solución clara. A partir de ésta solución se prepararon por dilución las de concentraciones menores (0.10, 0.20 y 0.40 para yeyuno; 0.05 para ciego y colon).

En el caso de la absorción de ácido linoleico y para los estudios de cinética de inhibición se emplea el ácido linolénico como inhibidor competitivo de la absorción de ácido linoleico, adicionándolo al medio de incubación a concentraciones de 0.80, 1.50 y 3 mM, en el caso del yeyuno y a concentraciones de 3 mM para el caso del ciego y colon.

Para estudiar la naturaleza del transporte de ácido linoleico en los tres segmentos intestinales, se emplea como depresor de los niveles de ATP celulares, una mezcla ouabaina/rotenona (200 μ M/80 μ M), adicionada, igualmente al medio de incubación antes de ser sometido a ultrasonido.

3.8.2. TECNICA DE CHOW Y HOLLANDER.

Esta técnica emplea sacos evertidos vacíos para el estudio de la absorción. De esta manera se preserva el lado serosal del medio de incubación, quedando únicamente expuesto al mismo el lado mucosal. Para ello, los animales, tras un período de ayuno de aproximadamente 12 horas, se anestesiaron ligeramente por vía inhalatoria con éter etílico. Tras practicarles la laparatomía media se extrajeron rápidamente el yeyuno, ciego y colon, que se lavaron con solución salina fría (NaCl al 0.9%, a 0-5 °C), para eliminar el contenido intestinal

Posteriormente, los segmentos intestinales se evertieron, preparándose trozos de aproximadamente 2 cm de longitud para el caso de yeyuno y colon, despreciándose las porciones intestinales que contenían placas de Peyer para dar homogeneidad a los preparados. En el caso del ciego, se prepararon dos sacos evertidos de cada órgano. Los extremos de los trozos se ligaron sin alojar ninguna solución en su interior, debido a que en el corto periodo de incubación no se ha detectado transporte transmural de ácido linoleico (Chow y Hollander, 1979a). Los sacos intestinales así preparados, se introdujeron en pequeños erlenmeyer con 8 ml de medio para su incubación durante 6

minutos, a 37 °C y con una agitación constante de 160 oscilaciones/min.

Tras la incubación, los sacos se sacaron y se lavaron en una solución de taurocolato sódico 1 mM frío. A continuación se secaron sobre papel humedecido, y se depositaron en viales previamente tarados, determinando su peso húmedo. Tras secarlos en estufa a 120 °C durante toda la noche, se determinó el peso seco. Los tejidos desecados se saponificaron con NaOH 1 N, se neutralizaron con HCl 1 N y a cada vial se le añadieron 10 ml de líquido de centelleo, para medir la radioactividad acumulada en el tejido. El líquido de centelleo utilizado en todos los casos fue una mezcla de tolueno:triton X-100 (2:1, v/v) que contenía un 15% de P.P.O.

3.8.3. EXPRESION DE LOS RESULTADOS.

3.8.3.1. Cálculo de la absorción.

Las concentraciones de colesterol ensayadas fueron 0.05, 0.1, 0.2 y 0.4 mM. Del medio de incubación se tomaron muestras al comienzo del experimento para su contaje. Los resultados se expresaron como pmoles de sustrato acumulados/mg de tejido húmedo, en 6 minutos, y se calcularon según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{pmoles de colesterol}}{\text{mg de tejido húmedo}} = \frac{\text{dpm tejido}}{\text{dpm medio}} \times \frac{C(\text{mM})}{P(\text{mg})} \times Y(\mu\text{l}) \quad (1)$$

donde, dpm = desintegraciones por minuto

C = concentración de colesterol en el medio en μl

P = peso del saco intestinal en mg

V = volumen de medio de incubación tomado para el
contaje en μl .

Para la absorción de ácido linoleico se ensayaron concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mM para yeyuno, y 0.05 mM en el casos del ciego y colon. El cálculo de la absorción se hizo de manera análoga a la descrita anteriormente (1), y los datos se expresaron como pmoles de ácido linoleico absorbidos/mg de tejido, en 6 minutos.

Para conocer el valor real de la cantidad de sustrato acumulado por las células, debemos descontar de la ecuación anterior la cantidad de sustrato presente en el medio líquido adherido a la mucosa intestinal. Esta se obtiene utilizando PEG 4000, que debido a su alto peso molecular no puede penetrar en las células. Se emplea ^3H -PEG 4000 y se calcula el porcentaje de volumen adherido mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\text{Volumen adherido}(\mu\text{l})}{100 \text{ mg tejido húmedo}} = \frac{\text{dpm tejido}}{\text{dpm medio}} \times \frac{V(\mu\text{l})}{P(\text{mg})} \times 100 \quad (2)$$

donde dpm, P y V tienen el mismo significado que la ecuación (1).

Una vez conocido el volumen adherido podremos determinar los pmoles de sustrato que en él se encuentran, y a partir de este valor, la cantidad real de sustrato captado por cada preparación.

3.8.3.2. Cálculo de los parámetros cinéticos.

Para determinar los parámetros cinéticos de la absorción de ácido linoleico en yeyuno, se realizaron estudios de inhibición empleando el ácido linolénico a concentraciones de 0.8, 1.5 y 3 mM junto con dos concentraciones de sustrato (0.1 y 0.8 mM). Este estudio permitió, una vez aplicada la ecuación de Dixon, determinar las constantes cinéticas.

3.9. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

El análisis estadístico aplicado a los datos experimentales del presente trabajo, ha consistido en el cálculo de las estadísticas básicas: media (\bar{x}) y error standard de la media (E.S.M.). El número de datos utilizados se indican entre paréntesis. A veces, la obtención de cada dato ha supuesto la mezcla de un determinado número de muestras (ver resultados). La significación entre los distintos grupos experimentales se ha realizado mediante análisis de varianza (ANOVA) y posterior aplicación del test de la t de Student.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERISTICAS DE LOS ANIMALES.

Las características de los animales operados se pueden observar en la Tabla 1, donde representamos los pesos iniciales (antes de la operación) y finales (en el momento del sacrificio, seis semanas después) de los animales, junto con el alimento ingerido, peso del hígado e intestino delgado y grueso.

El control realizado sobre los pesos de los animales muestra, que la resección intestinal produce un descenso significativo en el peso corporal ($p < 0.05$ y $p < 0.001$ para ratas con resección del 50% y 75%, respectivamente, frente a valores controles), descenso que es proporcional a la longitud de intestino delgado excluido ($p < 0.001$, ratas con resección del 75% v.s. ratas con resección del 50%), teniendo en cuenta que los pesos iniciales fueron similares entre los distintos grupos experimentales. Esta disminución en el peso corporal no mostraba relación con la cantidad de alimento ingerido, que fue la misma para los tres grupos. El peso del hígado expresado en gramos, no se modificó tras la resección intestinal. No obstante, cuando este parámetro se expresó por 100 g de peso corporal se observó un aumento significativo tras la operación ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, R-50 y R-75 v.s. ratas control), tanto mayor cuanto mayor fue la longitud de intestino reseccionado ($p < 0.05$, ratas R-75 v.s. ratas R-50). Este aumento se debe, principalmente al descenso en el peso corporal que encontramos en ratas reseccionadas.

Al realizar estudios de la masa intestinal, la relación g/cm aumenta significativamente en el yeyuno y colon tras la resección masiva ($p < 0.005$ para yeyuno y $p < 0.05$, para colon, 75% v.s. control).

Tabla 1. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO, PESO CORPORAL Y PARAMETROS HEPATICOS E INTESTINALES.

| | Control | R-50 | R-75 |
|---------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|
| <u>Comida ingerida</u> | | | |
| g/día | 21.0±1.5 (9) | 24.0±1.8 (7) | 21.0±0.7 (8) |
| <u>Peso corporal (g).</u> | | | |
| Inicial | 306±14 (9) | 306±7 (14) | 302±7 (15) |
| Final | 387±14 (9) | 354±10* (14) | 250±15****.d (15) |
| <u>Peso hígado (g).</u> | | | |
| Total | 10.53±0.45 (15) | 10.86±0.36 (13) | 9.64±0.35 (14) |
| /100 g peso | 2.73±0.08 (15) | 3.08±0.14* (13) | 3.97±0.20****.a (14) |
| <u>Intestino.</u> | | | |
| Yeyuno (g/cm) | 0.077±0.003 (11) | 0.096±0.006** (11) | 0.134±0.016****.c (9) |
| Ciego (g/órgano) | 1.91±0.12 (10) | 2.90±0.26*** (7) | 4.20±0.97****.b (7) |
| Colon (g/cm) | 0.093±0.006 (7) | 0.112±0.033 (11) | 0.166±0.028* (10) |

El peso corporal inicial se determinó en el momento de la operación. El peso final, peso de hígado y de intestino se determinaron en el momento del sacrificio. Las longitudes intestinales se determinaron como se describe en Material y Métodos. Los valores son $\bar{x} \pm E.S.M.$. Los números entre paréntesis representan el número de animales.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$, ratas R-50 ó R-75 frente a controles; ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.005$, ^d $p < 0.001$, ratas R-75 v.s. R-50.

Por el contrario, con una resección del 50% sólo aumenta significativamente esta relación en el yeyuno ($p < 0.01$, 50% v.s. control), no llegando a ser significativa en el colon. El ciego incrementa significativamente su tamaño tras la operación ($p < 0.005$ y $p < 0.001$, 50% y 75% v.s. control), con mayor aumento tras una resección masiva ($p < 0.01$, 75% v.s. 50%).

4.2. DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS HMG-CoA REDUCTASA Y ACAT EN HIGADO E INTESTINO. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

Los resultados de la Tabla 2 muestran que la resección intestinal produce en el hígado un aumento significativo en la actividad total de la HMG-CoA reductasa ($p < 0.001$, ratas R-50 y R-75 v.s. ratas controles) independientemente de la longitud de intestino delgado excluida. Este aumento va a su vez acompañado por un incremento en la relación R_a/R_t tras la resección intestinal, que es algo superior en las ratas con resección masiva frente al valor encontrado en ratas con resección del 50% (ver Fig. 1).

Por el contrario, se observa una disminución significativa en la actividad ACAT tras la resección intestinal ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, para ratas R-50 y R-75 v.s. ratas controles), disminución que es proporcional a la extensión de la resección ($p < 0.05$, ratas R-75 v.s. ratas R-50).

El estudio de la actividad específica de la HMG-CoA reductasa en la mucosa de el yeyuno, ciego y colon, nos indica que la resección intestinal no modifica dicha actividad en ninguno de los segmentos

62

**Tabla 2. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA
ACTIVIDAD TOTAL HMG-CoA REDUCTASA Y ACAT EN HIGADO**

| Ae | Control | R-50 | R-75 |
|-------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| HMG-CoA reductasa | 378±32 (14) | 1023±87**** (9) | 998±56**** (12) |
| ACAT | 112±8 (9) | 85±6** (7) | 68±5****.a (8) |

Las actividades específicas de los distintos enzimas se determinaron en microsomas hepáticos como se describe en la sección de Material y Métodos. Los resultados se expresan como pmol/min/mg de proteína microsomal, y se presentan como medias ± E.S.M. para el número de animales que se indica entre paréntesis.

p<0.01, **p<0.001, ratas R-50 ó R-75 v.s. ratas controles;

^ap<0.05, ratas R-75 v.s. ratas R-50.

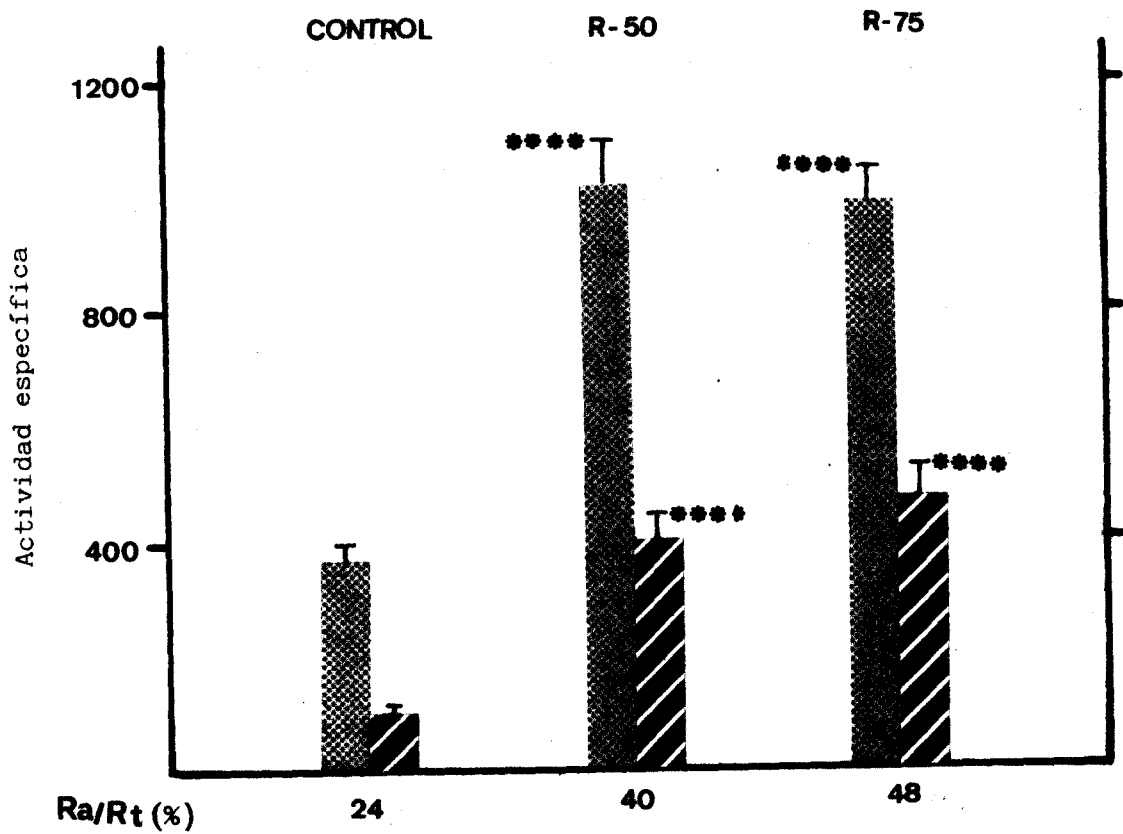


Fig. 1. Efecto de la resección intestinal sobre la relación HMG-CoA reductasa activa (Ra)/reductasa total (Rt) en hígado. Las actividades específicas se determinaron en microsomas hepáticos, aislados en ausencia (Rt) o en presencia de NaF 50 mM en el medio de homogeneización (Ra), según se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como pmoles/min/mg de proteína microsomal y vienen dados como $\bar{x} \pm$ E.S.M. (▨) Rt. (▧) Ra.

**** $p < 0.001$, ratas R-50 ó R-75 v.s. ratas controles.

Tabla 3. ACTIVIDAD TOTAL DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN MUCOSA INTESTINAL. RELACION Ra/Rt. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

| Ae | Controles | R-50 | R-75 |
|----------------|------------------|------------------|------------------|
| <u>Yeyuno.</u> | | | |
| Total (Rt) | 97.5±12.3 (6) | 85.1±6.5 (6) | 85.1±11.7 (7) |
| Activa (Ra) | 13.2±2.1 (8) | 14.23±0.8 (5) | 12.1±2.4 (9) |
| Ra/Rt | 14% | 16% | 14% |
| <u>Ciego.</u> | | | |
| Total | 17.8±1.2 (4) | 22.1±2.1 (4) | 15.98±2.3 (4) |
| Activa | 10.8±0.6 (4) | 12.1±2.8 (4) | 9.38±1.4 (4) |
| Ra/Ra | 60% | 57% | 58% |
| <u>Colon.</u> | | | |
| Total | 35.1±0.8 (4) | 31.3±3.0 (4) | 32.2±4.4 (4) |
| Activa | 18.9±2.1 (4) | 17.9±3.5 (4) | 17.3±3.7 (4) |
| Ra/Rt | 54% | 57% | 54% |

Las actividades específicas (Ae) se determinaron en mucosa de yeyuno, ciego y colon homogeneizadas en ausencia (Rt) o en presencia (Ra) de NaF 50 mM, como se describe en la sección de Material y Métodos. Los resultados se expresan como pmol de mevalonato formado/min/mg de proteína mucosal, y se presentan como medias ± E.S.M. para el número de animales que se indica entre paréntesis.

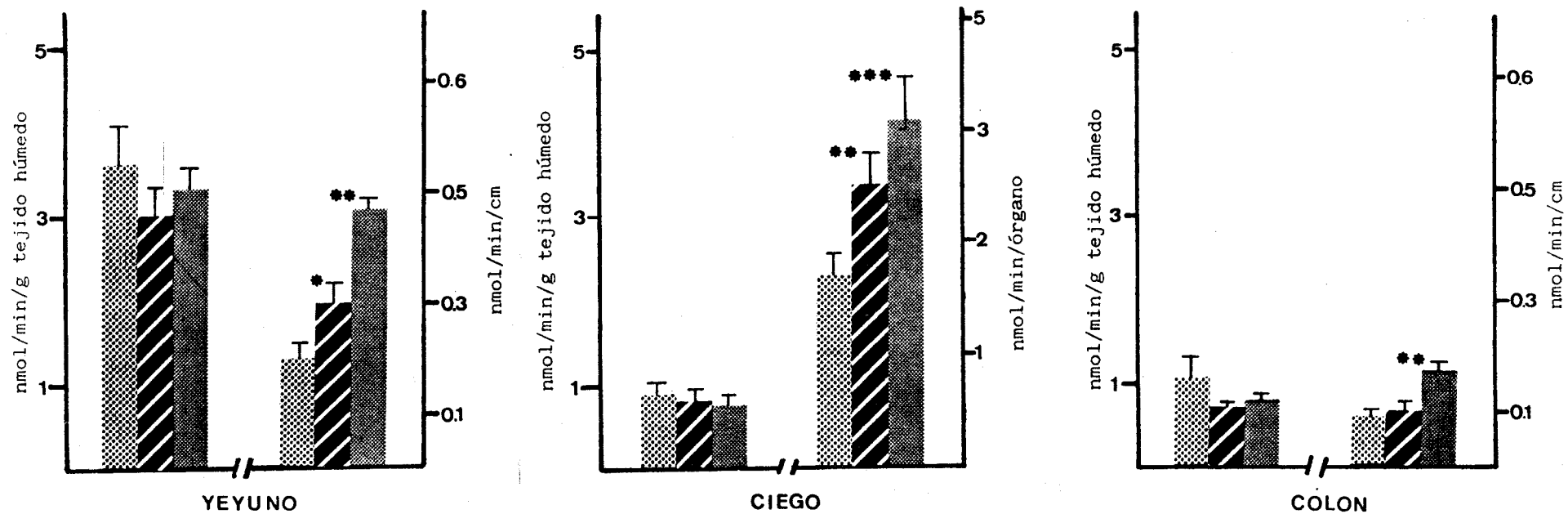


Fig. 2. Actividad HMG-CoA reductasa en mucosa de yeyuno, ciego y colon. Efecto de la resección intestinal. Los resultados vienen dados como $\bar{x} \pm E.S.M.$ para un mínimo de cuatro determinaciones. (▨) Controles, (▩) R-50, (■) R-75. *p<0.05, **p<0.01, *p<0.005, ratas reseccionadas v.s. controles.**

Tabla 4. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA ACTIVIDAD ACAT EN INTESTINO.

| Ae | Control | R-50 | R-75 |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Yeyuno | 329.5±40.1 (6) | 354.9±67.8 (8) | 367.4±58.0 (8) |
| Ciego | 212.5±45.2 (5) | 166.2±26.1 (5) | 184.9±36.0 (8) |
| Colon | 166.0±22.4 (8) | 159.8±25.1 (5) | 181.4±37.4 (5) |

Las actividades específicas (Ae), se midieron en microsomas de yeyuno, ciego y colon según se describe en la sección de Material y Métodos, expresándose como pmol de oleato de colesterol formado/min/mg de proteína microsomal. Los resultados son medias ± E.S.M. para el número de animales que se indica entre paréntesis.

intestinales estudiados (Tabla 3). Igualmente, la relación Ra/Rt no se modificó con la exclusión del intestino delgado, aunque esta relación fué mayor en el ciego y colon que en yeyuno, tanto en ratas controles como en reseccionadas.

Cuando los resultados de actividad HMG-CoA reductasa fueron dados como nmoles/min/cm en el caso del yeyuno y colon o nmoles/min/órgano, en el caso del ciego, se observó un incremento de la actividad en las ratas reseccionadas, excepto en el colon de ratas con resección del 50%, incremento que era abolido al expresar los mismos resultados por unidad de masa intestinal (nmoles/min/g de tejido) (ver Fig. 2).

La actividad específica de la ACAT en microsomas de yeyuno, ciego y colon se muestran en la Tabla 4, y ponen de manifiesto que la resección de intestino delgado distal no modifica la actividad específica de esta enzima en ninguno de los segmentos intestinales estudiados.

4.3. COMPOSICION LIPIDICA DE MICROSOMAS HEPATICOS E

INTESTINALES. ESTUDIO DE LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS

DE LOS FOSFOLIPIDOS DE MICROSOMALES.

EFFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

El análisis de la composición lipídica de microsomas hepáticos (ver Tabla 5) muestra que, la mayoría del colesterol presente en estas membranas se encuentra como colesterol libre, tanto en ratas controles como reseccionadas. La resección intestinal produce un aumento

Tabla 5. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA COMPOSICION LIPIDICA DE MICROSOMAS HEPATICOS

| | Control | R-50 | R-75 |
|-------------------------|-------------------|--------------------|--------------------------|
| Colesterol libre (CL) | 34.5±3.00 (3) | 69.7±6.50** (3) | 102.1±10.00****.a (3) |
| Colesterol esterificado | 6.7±0.46 (3) | 4.6±0.31** (3) | 0.6±0.01****.d (3) |
| Fosfolípidos (PL) | 471.6±90.0 (3) | 484.6±49.1 (3) | 405.4±0.90 (3) |
| CL/PL | 0.07 | 0.14 | 0.25 |

Los lípidos se extrajeron de los microsomas hepáticos y se determinaron como se describe en Material y Métodos. Cada muestra ensayada es fracción lipídica de microsomas hepáticos procedentes de 4 animales. Los resultados se expresan como nmoles de lípido/mg proteína microsomal y vienen dados como medias ± E.S.M. para el número de muestras que se indica entre paréntesis.

*p<0.05, ****p<0.001, ratas R-50 o R-75 v.s. ratas controles; ^ap<0.05, ^dp<0.001, ratas R-75 v.s. ratas R-50.

significativo en los niveles de colesterol libre frente a los valores encontrados en ratas controles ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, para ratas R-50 y R-75 v.s. a ratas controles), junto con una disminución, igualmente significativa, en los niveles de colesterol esterificado ($p < 0.01$ y $p < 0.001$, para R-50 y R-75 frente a ratas controles). Ambos cambios en el contenido de colesterol libre y esterificado, fueron significativamente mayores tras la exclusión del 75% que tras la exclusión del 50% del intestino delgado distal ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, ratas R-75 v.s. ratas R-50). El contenido en fosfolípidos de las membranas microsomales de hígado no se modificó tras la interrupción quirúrgica de la CEH, por lo cual, el aumento encontrado en la relación CL/FL tras la resección intestinal fué debido al aumento de colesterol libre indicado anteriormente.

En la Tabla 6 se muestran los ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos de las membranas microsomales de hígado de ratas patrones y reseccionadas. Como puede observarse, la resección intestinal aumenta ligeramente los niveles de ácidos grasos saturados. Las ratas con resección del 75% presentan niveles altos de ácidos grasos monoinsaturados (16:1 y 18:1) ($p < 0.05$, ratas R-75 v.s. ratas control), junto con una disminución significativa de los ácidos grasos poliinsaturados, representados por los ácidos linoleico ($p < 0.01$) y araquidónico ($p < 0.005$) frente a valores encontrados en controles. Estos ácidos fueron los responsables de la disminución encontrada en la proporción de ácidos grasos de la familia (n-6) en estos animales. En cuanto a la familia (n-3), la resección intestinal produjo una disminución en la proporción de ácidos grasos de ésta. Por último, el ácido 20:3(n-9) sólo se detectó en los animales con resección masiva.

Tabla 6. EFECTO DE LA ILECTOMIA SOBRE LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLIPIDOS DE MICROSOMAS HEPATICOS.

| Acido graso % | Controles | R-50 | R-75 |
|------------------|------------|---------------|---------------|
| 16:0 | 16.76±2.49 | 16.23±0.30 | 19.44±1.40 |
| 16:1(n-7) | 1.07±0.40 | 1.40±0.08 | 1.93±0.09* |
| 17:0 | n.d. | 1.41±0.04 | 2.49±0.30 |
| 18:0 | 22.20±0.74 | 22.80±0.69 | 21.10±3.70 |
| 18:1(n-9) | 9.09±0.54 | 9.06±0.23 | 11.66±0.83* |
| 18:2(n-6) | 12.65±0.31 | 11.96±0.46 | 10.70±0.05** |
| 18:3(n-6) | n.d. | 0.50±0.02 | 0.86±0.00 |
| 18:3(n-6) | n.d. | 0.25±0.12 | 0.11±0.00 |
| 20:0 | n.d. | n.d. | 0.12±0.03 |
| 20:1(n-9) | 0.27±0.01 | 0.15±0.00*** | 0.13±0.01*** |
| 20:2(n-6) | 0.45±0.03 | 0.54±0.13 | 0.45±0.03 |
| 20:3(n-9) | n.d. | n.d. | 0.66±0.04 |
| 20:4(n-6) | 28.44±1.50 | 29.41±0.61 | 20.42±2.36*** |
| 20:3(n-6) | 0.14±0.01 | 0.15±0.01 | 0.26±0.04** |
| 20:4(n-3) | n.d. | 0.11±0.00 | n.d. |
| 22:4(n-6) | 0.61±0.11 | 0.28±0.02**** | 0.25±0.02**** |
| 22:5(n-6) | 0.61±0.11 | 0.41±0.03* | 0.38±0.03* |
| 22:5(n-3) | 0.92±0.12 | 0.64±0.09* | 0.36±0.04*** |
| 22:6(n-3) | 5.22±1.32 | 3.36±0.21* | 2.81±0.03** |
| Otros | 1.56 | 1.34 | 6.52 |
| Saturados | 38.96 | 40.44 | 43.16 |
| Monoenos | 10.43 | 10.61 | 13.70 |
| Polienos | 49.05 | 47.61 | 36.60 |
| (n-6) | 42.91 | 43.25 | 33.32 |
| (n-3) | 6.14 | 4.36 | 3.28 |

Los niveles de ácidos grasos se determinaron en los microsomas hepáticos como se describe en Material y Métodos. Los resultados son $\bar{x} \pm E.S.M.$ de tres muestras independientes. Cada muestra analizada es fracción lipídica de microsomas hepáticos procedentes de cuatro animales.

n.d.: ácido graso no detectado.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001, ratas R-50 ó R-75 v. s. controles.

El examen de las fracciones lipídicas de los microsomas de mucosa de yeyuno se muestra en la Tabla 7, tanto para animales controles como para reseccionados. Como puede observarse, la ileotomía produce un aumento significativo en los niveles de colesterol libre, proporcional a la resección efectuada ($p < 0.05$ para ratas R-50 ó ratas R-75, v.s. ratas controles). Sin embargo, ni el contenido de fosfolípidos ni el de colesterol esterificado se modificó tras la intervención. Como consecuencia de estos resultados, la relación CL/FL se vió incrementa.

Los ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos de las membranas microsomales de intestino se muestran en la Tabla 8. Puede observarse que la resección intestinal produce un aumento en los niveles de ácidos grasos saturados (ácido palmítico y esteárico). Por el contrario, los ácidos grasos monoinsaturados no sufren modificaciones. Los resultados más interesantes son, el aumento encontrado en los niveles de ácido linoleico ($p < 0.05$, ratas R-50 ó R-75 frente a ratas controles) junto con el descenso en los niveles de ácido araquidónico ($p < 0.005$ y $p < 0.001$, para ratas R-50 y ratas R-75 v.s. ratas controles) en las ratas ilectomizadas. Por consiguiente, esto hace mantenerse los niveles de ácidos grasos de la familia (n-6) tras la resección intestinal. Igualmente, la resección intestinal hace que los niveles de ácidos grasos polinsaturados y de la familia (n-3) se mantengan sin ligeras modificaciones.

Tabla 7. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA COMPOSICION LIPIDICA DE MICROSOMAS INTESTINALES (YEYUNO).

| | Control | R-50 | R-75 |
|-------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Colesterol libre (CL) | 104.7±18.1 (3) | 184.9±17.7* (3) | 191.5±21.5* (3) |
| Colesterol esterificado | 19.3±3.6 (3) | 12.4±4.0 (3) | 15.6±0.7 (3) |
| Fosfolípidos (FL) | 376.8±19.0 (3) | 371.6±155.9 (3) | 444.6±48.5 (3) |
| CL/FL | 0.28 | 0.50 | 0.43 |

Los lípidos se extrajeron y se determinaron como se describe en la sección de Material y Métodos en microsomas de intestino delgado (yeyuno). Cada muestra ensayada es fracción lipídica de microsomas intestinales procedentes de 6 animales. Los resultados se expresan como moles de lípido/mg proteína microsomal y vienen dados como medias ± E. S. M. para el número de muestras que se indica entre paréntesis.

*p<0.05, ratas R-50 ó R-75 v. s. ratas controles.

Tabla 8. COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE LOS FOSFOLIPIDOS DE MICROSOMAS INTESTINALES (YEUENO). EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

| Acido graso % | Control | R-50 | R-75 |
|------------------|------------|--------------|---------------|
| 16:0 | 20.06±0.61 | 25.51±0.30* | 26.52±0.26* |
| 16:1(n-7) | 5.10±0.58 | 2.66±0.30* | 2.68±0.13** |
| 17:0 | 0.36±0.05 | 0.87±0.05*** | 1.29±0.15*** |
| 17:1 | 2.45±0.72 | 2.37±0.30 | 1.38±0.06 |
| 18:0 | 14.66±0.84 | 18.73±0.95* | 18.67±0.91** |
| 18:1(n-9) | 12.56±0.58 | 14.34±1.60 | 13.37±1.73 |
| 18:2(n-6) | 16.80±0.95 | 19.94±0.80* | 20.44±0.86* |
| 20:0 | 3.43±0.58 | 1.12±0.13*** | 0.32±0.06*** |
| 20:1(n-9) | 1.18±0.36 | 0.67±0.08 | 0.62±0.06 |
| 20:2(n-6) | 0.55±0.18 | n.d. | 1.21±0.08* |
| 20:3(n-9) | 1.49±0.21 | 0.61±0.09** | 0.50±0.01*** |
| 20:4(n-6) | 13.15±0.07 | 8.31±0.98*** | 8.06±1.73**** |
| 20:5(n-3) | 0.42±0.11 | 0.58±0.07 | 0.43±0.03 |
| 22:5(n-3) | 0.81±0.01 | 0.89±0.05 | 0.80±0.07 |
| 22:6(n-3) | 0.56±0.11 | 0.55±0.09 | 0.48±0.05 |
| Otros | 7.60 | 4.11 | 3.89 |
| Saturados | 38.51 | 45.64 | 46.14 |
| Monoenos | 20.11 | 19.37 | 18.05 |
| Polienos | 33.78 | 30.88 | 31.99 |
| (n-6) | 31.99 | 28.86 | 30.21 |
| (n-3) | 1.79 | 2.02 | 1.71 |

Los niveles de ácidos grasos se determinaron en los microsomas de yeyuno como se describe en Material y Métodos. Los resultados son $\bar{x} \pm E.S.M.$ de tres muestras independientes. Cada muestra es fracción lipídica de microsomas intestinales procedentes de seis animales.
n.d.: ácido graso no detectado.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001, ratas R-50 ó R-75 v.s. ratas controles.

4.4. COMPOSICION LIPIDICA DEL TEJIDO HEPATICO Y SUERO

SANGUINEO. ESTUDIO DE LA COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS DE

LAS DISTINTAS FRACCIONES LIPIDICAS.

EFFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

La determinación de los lípidos totales hepáticos demostró que no existía acumulación de grasas en los hígados de animales operados. El estudio de la composición lipídica revela que el contenido de colesterol libre, triglicéridos y fosfolípidos no se modifica como consecuencia de la resección del intestino delgado distal (ver Tabla 9). Por el contrario, los niveles de ésteres de colesterol descendieron significativamente tanto en ratas con resección del 50% ($p < 0.01$), como en ratas con resección del 75% ($p < 0.05$), respecto a ratas controles, siendo esta disminución significativamente mayor a menor longitud de intestino delgado excluido ($p < 0.01$, R-75 v.s. R-50).

El análisis lipídico del suero aparece reflejado en la Tabla 10. Como puede observarse, no existen diferencias significativas en el contenido total de lípidos entre los distintos grupos experimentales. De igual forma que en el tejido hepático, los niveles de fosfolípidos no se modificaron tras la resección intestinal. En este caso, no encontramos alteraciones en el contenido sérico de colesterol esterificado como consecuencia de la ilectomía, aunque sí un incremento significativo en los niveles de colesterol libre ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, para R-50 y R-75 v.s. control) y de triglicéridos ($p < 0.005$ y $p < 0.01$ para R-50 y R-75 v.s. control) tras la operación.

La composición en ácidos grasos de los triglicéridos del hígado se

Tabla 9. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA COMPOSICION LIPIDICA DEL TEJIDO HEPATICO.

| | Control | R-50 | R-75 |
|-------------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| Lípidos totales | 70.79±9.0 (3) | 84.10±19.60 (3) | 93.20±12.99 (3) |
| Colesterol esterificado | 0.81±0.18 (3) | 0.12±0.02** (3) | 0.29±0.03*.b (3) |
| Colesterol libre | 1.66±0.70 (3) | 1.52±0.14 (3) | 1.71±0.25 (3) |
| Fosfolípidos | 45.68±2.00 (3) | 42.65±4.11 (3) | 47.47±6.56 (3) |
| Triglicéridos | 9.89±1.07 (3) | 7.89±2.74 (3) | 9.98±0.38 (3) |

Los lípidos se extraen y se determinan según se describe en Material y Métodos. Los resultados se expresan como mg de lípido/g de hígado y se presentan como medias ± E.S.M.. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras ensayadas. Cada muestra es fracción lipídica aislada de tres hígados.

*p<0.05, **p<0.01, ratas R-50 o R-75 v.s. ratas control; ^bp<0.01, ratas R-75 v.s. R-50.

**Tabla 10 . EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA
COMPOSICION LIPIDICA DE SUERO.**

| | Control | R-50 | R-75 |
|-------------------------|-----------------|--------------------|------------------|
| Lípidos totales | 332±9 (6) | 355±15 (7) | 304±15 (8) |
| Colesterol esterificado | 70±5 (3) | 72±2 (3) | 61±4 (5) |
| Colesterol libre | 12.1±1.2 (3) | 19.03±1.3** (3) | 15.9±1.4* (5) |
| Fosfolípidos | 167±12 (6) | 187±13 (7) | 150±12 (9) |
| Triglicéridos | 49±4 (9) | 76±6*** (7) | 65±3** (6) |

Las determinaciones de lípidos totales y de las distintas fracciones lipídicas se realizaron según se describe en Material y Métodos. Cada muestra ensayada es fracción lipídica de suero procedentes de seis animales. Los resultados se expresan como mg de lípido/dl y vienen dados como medias ± E. S. M. El número entre paréntesis corresponde al número de muestras ensayadas.

*p<0.05. **p<0.01. ***p<0.005. ratas reseccionadas v.s. ratas controles.

muestra en la Tabla 11 y Fig. 3. Como se puede observar, la resección intestinal produce un aumento en los ácidos grasos saturados, representados principalmente por el ácido esteárico ($p < 0.005$, para R-50 ó R-75 v.s. control), junto con un incremento en los monoenoicos, ácido oleico ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, para R-50 y R-75 v.s. control). Los niveles de ácidos grasos de la familia (n-6) descienden, como consecuencia de la disminución del ácido linoleico ($p < 0.05$, R-50 ó R-75 v.s. control) y de la ausencia de ácido 22:4(n-6) y 22:5(n-6) tras la operación, ya que la proporción de ácido araquidónico no se altera. Por otra parte, en la familia (n-3) se produce, igualmente, un descenso en ratas ilectomizadas. En conjunto, estos resultados son responsables del descenso del total de ácidos grasos poliinsaturados tras la resección intestinal.

El examen de los ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos del tejido hepático se muestra en la Tabla 12, esquematizándose estos resultados en la Fig. 3. Como puede observarse, se produce una disminución en los ácidos grasos saturados tras la resección intestinal, condicionada por el ácido esteárico ($p < 0.05$, para R-50 ó R-75 v.s. control). Por el contrario, encontramos un aumento en los ácidos monoenoicos, ácido palmitoleico ($p < 0.005$ y $p < 0.01$, R-50 y R-75 v.s. control) y oleico ($p < 0.05$, R-75 v.s. control). No se observan modificaciones en los porcentajes de ácido linoleico y araquidónico tras la operación. Sin embargo, los ácidos grasos poliinsaturados, tanto de la familias (n-6) como (n-3) sufrieron un aumento tras la resección intestinal, llegando incluso a no detectarse algunos de ellos en ratas controles. Estos resultados son responsables del incremento observado tras la ilectomía en los ácidos grasos

Tabla 11. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE EL PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN TRIGLICERIDOS DE TEJIDO HEPATICO.

| Acido graso % | Control | R-50 | R-75 |
|------------------|------------|--------------|--------------|
| 16:0 | 23.58±2.50 | 23.34±0.97 | 25.91±0.44 |
| 16:1(n-7) | 5.99±0.70 | 5.01±0.08 | 6.84±1.17 |
| 17:0 | 0.36±0.04 | 1.04±0.31* | 1.16±0.18* |
| 18:0 | 1.99±0.20 | 3.26±0.13*** | 3.78±0.28*** |
| 18:1(n-9) | 28.47±2.05 | 37.36±3.01** | 34.53±0.38* |
| 18:2(n-6) | 28.71±3.15 | 17.27±0.51* | 16.85±1.76* |
| 18:3(n-3) | 1.09±0.12 | 0.45±0.10 | n.d. |
| 20:0 | 0.22±0.03 | n.d. | n.d. |
| 20:1(n-9) | 0.39±0.05 | 0.63±0.13 | 0.24±0.03* |
| 20:2(n-6) | 0.21±0.02 | n.d. | n.d. |
| 20:4(n-6) | 3.98±0.42 | 3.72±0.39 | 4.21±0.64 |
| 20:3(n-9) | 0.53±0.04 | 0.45±0.09 | n.d. |
| 22:4(n-6) | 0.34±0.04 | n.d. | n.d. |
| 22:5(n-6) | 0.31±0.04 | n.d. | n.d. |
| 22:5(n-3) | 0.36±0.05 | n.d. | n.d. |
| 22:6(n-3) | 1.51±0.17 | 1.24±0.05 | 1.30±0.66 |
| Otros | 1.16 | 6.86 | 5.17 |
| Saturados | 26.15 | 27.64 | 30.86 |
| Monoenos | 34.85 | 42.37 | 41.61 |
| Polienos | 37.84 | 23.13 | 22.36 |
| (n-6) | 35.17 | 21.89 | 21.06 |
| (n-3) | 1.87 | 1.24 | 1.30 |

Los niveles de ácidos grasos se determinaron en los triglicéridos del tejido hepático como se describe en Material y Métodos. Los resultados fueron $\bar{x} \pm E.S.M.$ de tres muestras independientes. Cada muestra analizada es fracción lipídica de tejido hepático procedente de tres animales.

n.d. : ácido graso no detectado.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ratas reseccionadas v.s. control

Tabla 12. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE EL PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN FOSFOLIPIDOS DE TEJIDO HEPATICO.

| Acido graso % | Control | R-50 | R-75 |
|------------------|------------|--------------|---------------|
| 16:0 | 21.35±2.65 | 19.39±0.59 | 19.46±0.62 |
| 16:1(n-7) | 0.66±0.07 | 1.64±0.12*** | 2.70±0.51** |
| 17:0 | 0.30±0.02 | 1.59±0.30** | 2.06±0.17**** |
| 18:0 | 30.45±3.45 | 22.07±0.48* | 21.72±0.72* |
| 18:1(n-9) | 9.46±0.80 | 9.12±0.16 | 12.36±0.72* |
| 18:2(n-6) | 11.64±1.18 | 14.03±0.23 | 11.85±0.14 |
| 20:1(n-9) | 0.18±0.02 | 0.14±0.00 | 0.42±0.06* |
| 20:3(n-9) | n.d. | 0.79±0.02 | n.d. |
| 20:4(n-6) | 21.29±1.98 | 21.92±2.39 | 19.42±0.24 |
| 20:3(n-6) | n.d. | 0.14±0.02 | 0.35±0.04 |
| 22:4(n-6) | n.d. | 0.59±0.15 | 0.58±0.11 |
| 22:5(n-6) | n.d. | 0.90±0.07 | 0.62±0.08 |
| 22:5(n-3) | n.d. | 1.09±0.01 | 1.19±0.15 |
| 22:6(n-3) | 3.45±0.21 | 5.43±0.23* | 4.33±0.12 |
| Otros | 1.22 | 0.89 | 0.18 |
| Saturados | 52.10 | 43.05 | 43.24 |
| Monoenos | 10.30 | 10.90 | 15.48 |
| Polienos | 36.38 | 45.16 | 40.10 |
| (n-6) | 32.93 | 38.64 | 34.58 |
| (n-3) | 3.45 | 6.52 | 6.52 |

Los niveles de ácidos grasos se determinaron en los fosfolípidos del tejido hepático como se describe en Material y Métodos. Los resultados fueron $\bar{x} \pm E.S.M.$ de tres muestras independientes. Cada muestra analizada es fracción lipídica de tejido hepático procedente de tres animales.

n.d. : ácido graso no detectado.

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001, ratas reseccionadas v.s. controles.

Tabla 13. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE EL PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN ESTERES DE COLESTEROL DE TEJIDO HEPATICO.

| Acido graso % | Control | R-50 | R-75 |
|------------------|------------|----------------|---------------|
| 16:0 | 14.17±2.09 | 16.99±0.11 | 3.75±1.07** |
| 16:1(n-7) | 5.15±1.10 | 21.72±0.01**** | 6.04±0.70 |
| 18:0 | 4.50±1.17 | 0.45±0.05** | 2.92±0.75* |
| 18:1(n-9) | 9.32±0.05 | 7.51±0.58*** | 14.01±0.83*** |
| 18:2(n-6) | 45.06±2.23 | 47.59±0.04 | 72.68±4.97*** |
| 20:4(n-6) | 7.43±1.00 | 3.82±0.01* | n.d. |
| Otros | 14.37 | 1.92 | 0.6 |
| Saturados | 18.67 | 19.44 | 6.67 |
| Monoenos | 14.47 | 29.23 | 20.05 |
| Polienos | 52.49 | 51.41 | 72.68 |
| (n-6) | 52.49 | 51.41 | 72.68 |
| (n-3) | n.d. | n.d. | n.d. |

Los niveles de ácidos grasos se determinaron en los ésteres de colesterol del tejido hepático como se describe en Material y Métodos. Los resultados fueron $\bar{x} \pm$ E.S.M. de tres muestras independientes. Cada muestra analizada es fracción lipídica de tejido hepático procedente de tres animales.

n.d. : ácido graso no detectado;

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001, ratas reseccionadas v.s. control.

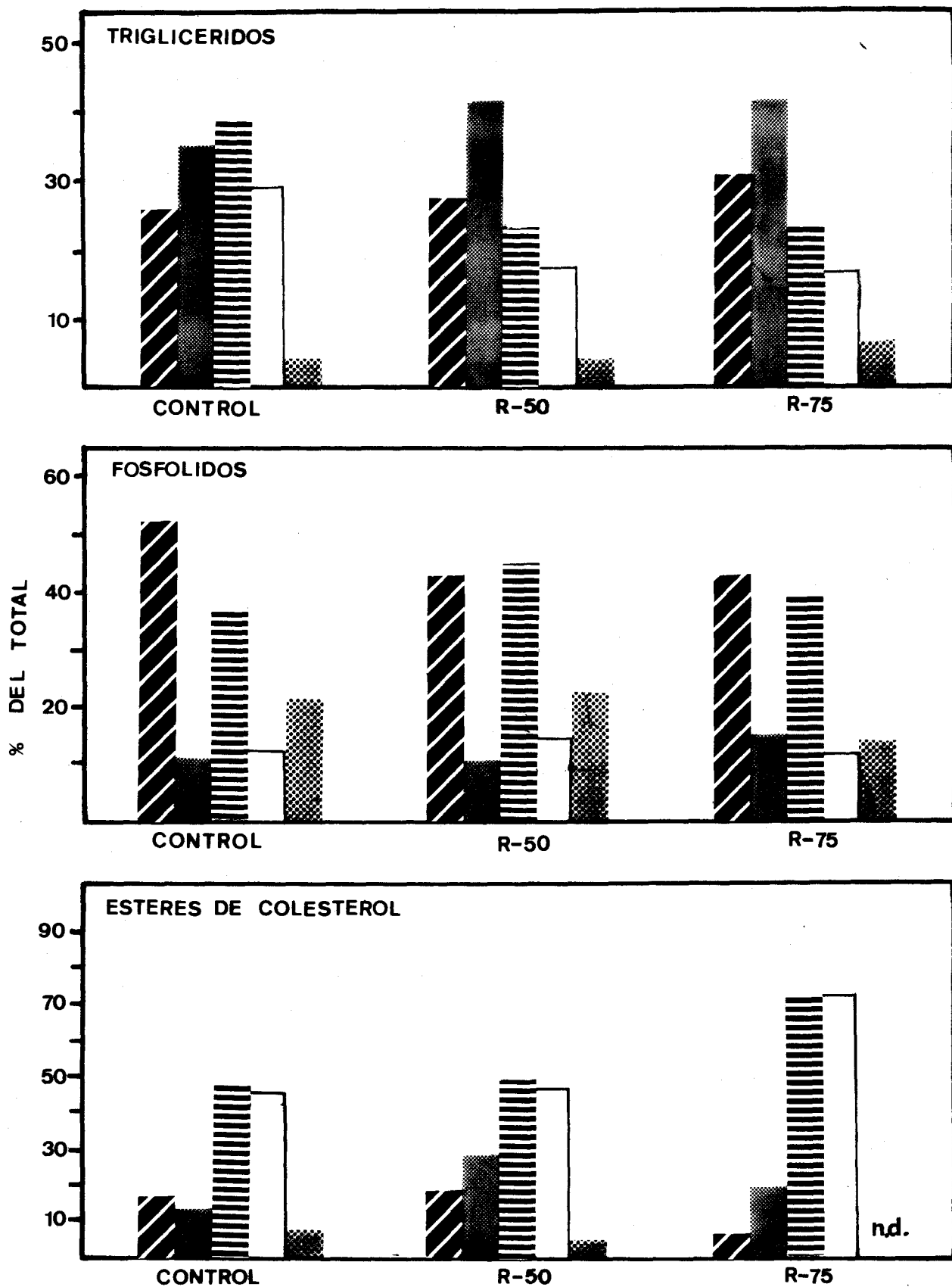


Fig. 3. Perfil de ácidos grasos de las distintas fracciones lipídicas del tejido hepático. Efecto de la resección intestinal.

() Saturados, () monoenoos, () polienos, () ácido linoleico, () ácido araquidónico.

poliinsaturados totales.

El perfil de los ácidos grasos que constituyen los ésteres de colesterol del tejido hepático se muestran en la Tabla 13 y Fig 3. Se comprueba que en ratas con resección masiva disminuyen los ácidos grasos saturados, siendo representativo de ello la disminución del ácido palmítico ($p < 0.01$ v.s. control) y esteárico ($p < 0.05$ v.s. control). Por el contrario, los monoinsaturados sufren un incremento tras la intervención. Paralelamente, en ratas con resección del 75% se observa, un aumento espectacular en el ácido linoleico ($p < 0.005$, R-75 v.s. control), acompañado por un decremento del ácido araquidónico tras la resección del 50% ($p < 0.05$, R-50 v.s. control) que llega a niveles no detectables tras la resección del 75%.

Los resultados del análisis cromatográfico de los ácidos grasos que constituyen las distintas fracciones lipídicas del suero se muestran en las Tablas 14, 15 y 16 y Fig. 4.

El estudio de los ácidos grasos que componen la fracción de los ésteres de colesterol (Tabla 14, Fig.4), muestra que, tras la resección del 75% del intestino delgado distal se produce un aumento de los ácidos grasos saturados, que no llega a ser significativo, acompañado de un incremento en los monoenoicos, representados por el ácido palmitoleico ($p < 0.005$, ratas R-75 v.s. control) y oleico ($p < 0.005$, ratas R-75 v.s. control). Las proporciones de ácidos grasos de la familia (n-6) sufren un aumento, debido a la gran elevación en la proporción de ácido araquidónico que se produce tras ambos tipos de resección ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, para R-50 y R-75 v.s. control), lo que da lugar a que los ácidos grasos poliinsaturados aumenten tras la operación. Por el contrario, la proporción de ácido linoleico no sufre

Tabla 14. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE EL PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN ESTERES DE COLESTEROL DE SUERO

| Acido graso % | Control | R-50 | R-75 |
|------------------|------------|---------------|----------------|
| 16:0 | 7.94±0.13 | 8.30±1.44 | 10.83±2.00 |
| 16:1(n-7) | 5.59±0.02 | 4.73±0.47* | 7.03±0.02*** |
| 17:0 | 0.38±0.06 | 0.20±0.01** | 1.46±0.15*** |
| 17:1 | 0.92±0.09 | 0.34±0.02*** | 0.98±0.01 |
| 18:0 | 0.29±0.03 | 0.61±0.09* | 0.52±0.07* |
| 18:1(n-9) | 3.69±0.40 | 3.79±0.82 | 6.49±0.29*** |
| 18:2(n-6) | 21.35±0.46 | 20.18±1.61 | 19.10±0.72 |
| 18:3(n-6) | 1.14±0.12 | 3.14±0.40 | n.d. |
| 20:4(n-6) | 25.78±0.10 | 43.00±0.46* | 51.00±4.55**** |
| 20:3(n-6) | 0.52±0.030 | 0.14±0.01** | 0.30±0.05 |
| 20:5(n-3) | 0.26±0.02 | 0.32±0.05 | n.d. |
| 20:4(n-3) | 1.91±0.03 | 3.19±0.40* | n.d. |
| 22:4(n-6) | n.d. | 0.19±0.01 | n.d. |
| 22:5(n-6) | 1.00±0.15 | 3.60±0.03**** | n.d. |
| 22:6(n-3) | 0.39±0.03 | 2.55±0.66* | 2.03±0.20*** |
| Otros | 28.84 | 5.72 | 0.11 |
| Saturados | 8.61 | 9.11 | 12.81 |
| Monoenos | 10.20 | 8.86 | 14.65 |
| Polienos | 52.35 | 76.31 | 72.43 |
| (n-6) | 49.74 | 70.25 | 70.40 |
| (n-3) | 2.61 | 6.06 | 2.03 |

Los niveles de ácidos grasos se determinaron en los ésteres de colesterol de los sueros como se describe en Material y Métodos. Los resultados fueron $\bar{x} \pm E.S.M.$ de tres muestras independientes. Cada muestra analizada es fracción lipídica de sueros procedentes de seis animales.

n.d.: ácido graso no detectado

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001, ratas reseccionadas v.s. control.

Tabla 15. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE EL PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN TRIGLICERIDOS DE SUERO.

| Acido graso % | Control | R-50 | R-75 |
|------------------|------------|-------------|--------------|
| 16:0 | 27.79±1.68 | 23.16±0.06* | 23.6±0.11* |
| 17:0 | 1.34±0.14 | n.d. | 0.75±0.09* |
| 17:1 | 1.24±0.07 | 3.11±0.60* | 1.69±0.18 |
| 18:0 | 2.68±0.30 | 2.45±0.08 | 2.62±0.29 |
| 18:1(n-9) | 28.54±0.38 | 22.14±1.59* | 22.30±1.03** |
| 18:2(n-6) | 26.4±4.30 | 25.08±2.83 | 25.81±1.60 |
| 20:2(n-6) | n.d. | 0.63±0.06 | n.d. |
| 20:4(n-6) | 3.65±0.81 | 8.85±1.75* | 14.55±2.42** |
| Otros | 7.78 | 14.58 | 6.73 |
| Saturados | 32.42 | 25.61 | 26.97 |
| Monoenos | 29.75 | 25.25 | 23.99 |
| Polienos | 30.05 | 34.56 | 42.31 |
| (n-6) | 30.05 | 34.56 | 42.31 |
| (n-3) | n.d. | n.d. | n.d. |

Los niveles de ácidos grasos se determinaron en los triglicéridos de los sueros como se describe en Material y Métodos. Los resultados fueron $\bar{x} \pm E.S.M.$ de tres muestras independientes. Cada muestra analizada es fracción lipídica de sueros procedentes de seis animales.

n.d. : ácido graso no detectado;

*p<0.05, **p<0.01, ratas reseccionadas v.s. control.

Tabla 16. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE EL PERFIL DE ACIDOS GRASOS EN FOSFOLIPIDOS DE SUERO.

| Acido graso % | Control | R-50 | R-75 |
|------------------|------------|--------------|---------------|
| 16:0 | 22.70±1.50 | 22.45±2.20 | 23.28±0.70 |
| 16:1(n-7) | 2.94±0.50 | 2.21±0.80 | 2.27±0.02 |
| 17:0 | 0.47±0.04 | 0.99±0.16** | 1.75±0.00**** |
| 17:1 | 1.55±0.16 | 1.49±0.18 | 1.37±0.03 |
| 18:0 | 19.65±1.08 | 21.49±1.09 | 18.48±0.56 |
| 18:1(n-9) | 9.85±1.05 | 9.05±0.66 | 9.93±1.07 |
| 18:2(n-6) | 17.2±1.09 | 17.00±0.78 | 18.79±2.28 |
| 18:3(n-6) | n.d. | 0.51±0.05 | 0.65±0.09 |
| 20:0 | n.d. | n.d. | 0.14±0.01 |
| 20:1(n-9) | n.d. | 0.42±0.03 | 0.36±0.01 |
| 20:2(n-6) | n.d. | 0.37±0.04 | 0.38±0.10 |
| 20:3(n-9) | 0.47±0.02 | 0.86±0.02*** | 0.81±0.02*** |
| 20:4(n-6) | 17.28±0.38 | 15.82±0.61* | 15.18±0.29** |
| 20:5(n-3) | n.d. | 0.98±0.27 | 0.17±0.01 |
| 20:4(n-3) | 0.27±0.01 | 0.24±0.02 | 0.46±0.02*** |
| 22:4(n-6) | 1.10±0.11 | 1.41±0.43 | 1.23±0.05 |
| 22:5(n-6) | 1.50±0.06 | 0.93±0.25 | 0.95±0.02 |
| 22:5(n-3) | 0.85±0.09 | 0.47±0.13* | 0.58±0.02* |
| 22:6(n-3) | 3.50±0.28 | 2.87±0.16* | 2.48±0.26* |
| Otros | 0.67 | 0.44 | 0.75 |
| Saturados | 42.82 | 44.93 | 43.64 |
| Monoenos | 14.34 | 13.17 | 13.93 |
| Polienos | 42.17 | 41.46 | 41.68 |
| (n-6) | 24.23 | 18.51 | 17.91 |
| (n-3) | 17.94 | 22.95 | 23.77 |

Los niveles de ácidos grasos se determinaron en los fosfolípidos de los sueros como se describe en Material y Métodos. Los resultados fueron $\bar{x} \pm E.S.M.$ de tres muestras independientes. Cada muestra analizada es fracción lipídica de sueros procedentes de seis animales.

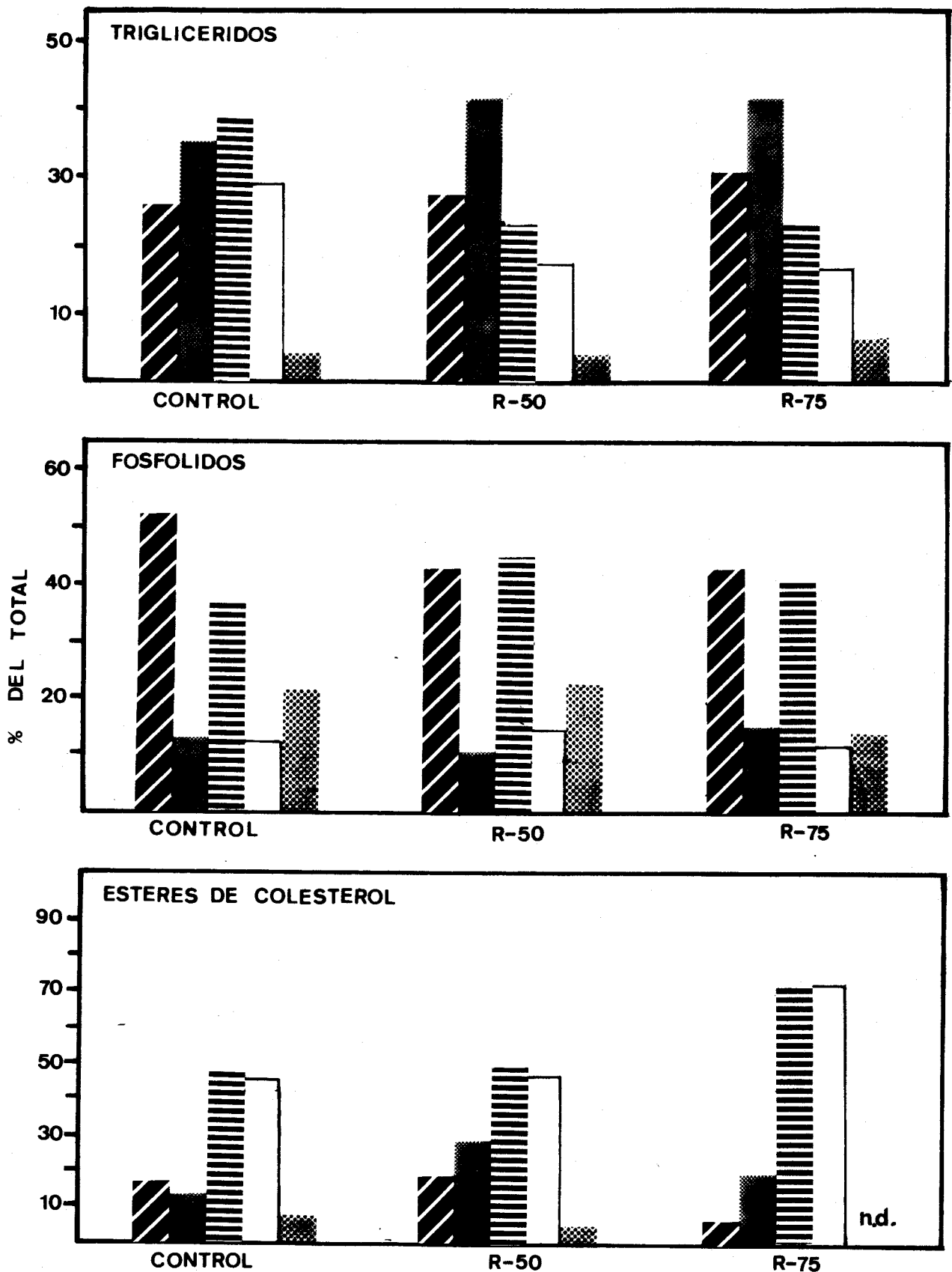


Fig.4. Perfil de ácidos grasos de las distintas fracciones lipídicas del tejido hepático. Efecto de la resección intestinal.

(/) Saturados, (x) monoenos, (—) polienos, (□) ácido linoleico, (.) ácido araquidónico.

modificaciones en ninguno de los grupos experimentales.

El perfil de los ácidos grasos de los triglicéridos séricos (ver Tabla 15 y Fig. 4). muestra que los ácidos grasos saturados disminuyen significativamente tras la resección intestinal, principalmente, el ácido palmítico ($p < 0.05$, para R-50 y R-75 v.s. control), y se produce un descenso en los monoenoicos (ácido oleico) ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, para ratas R-50 y R-75 v.s. control). El resultado más interesante fué el aumento progresivo de ácido araquidónico observado en ratas reseccionadas ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ para R-50 y R-75 v.s. control) respecto al valor encontrado en controles, que, a su vez, hace incrementar los ácidos grasos poliinsaturados totales.

Por último, la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos del suero se muestra en la Tabla 16 y Fig. 4. Como puede observarse, tras la resección intestinal, no se modifican los niveles de ácidos grasos saturados ni los de monoenos. Los ácidos grasos de la familia (n-6) descienden en ratas reseccionadas, principalmente debido al descenso en el ácido araquidónico ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ para R-50 y R-75 v.s. control). Por el contrario, los ácidos grasos que forman la familia (n-3) aumentan lo que a su vez hace, que los niveles de ácidos grasos poliinsaturados totales no se modifiquen en las ratas intervenidas.

4.5. ABSORCION INTESTINAL.

4.5.1. DETERMINACION DEL FLUIDO ADHERIDO A LA MUCOSA INTESTINAL. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

Para el cálculo del volumen de fluido adherido al tejido se emplean moléculas tales como inulina, manitol, PEG 4000, etc., que debido a su tamaño (alto peso molecular) no penetran en las células o lo hacen muy lentamente. De entre todos estos marcadores, en este trabajo hemos empleado PEG 4000.

Para la determinación se procedió como se explica en el apartado 3.8.3.1. de Material y Métodos.

Este volumen de fluido adherido fué determinado en presencia de sustrato (ácido linoleico o colesterol) en los tres segmentos intestinales (yeyuno, ciego y colon) y en los tres grupos experimentales (ratas controles y ratas con resección del 50% y del 75% de intestino delgado distal). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 17. Como se puede observar, y según el análisis de varianza realizado, el volumen de líquido adherido al tejido varió en los distintos segmentos estudiados, pero por el contrario no se modificó entre los distintos grupos experimentales, independientemente del sustrato añadido. Por todo ello, los resultados obtenidos sobre la acumulación intestinal de ácido linoleico y colesterol que se muestran en este trabajo han sido corregidos por un valor de volumen adherido que representa el valor medio de los obtenidos para cada segmento

**Tabla 17. DETERMINACION DEL VOLUMEN ADHERIDO A LA MUCOSA
INTESTINAL. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.**

| | Controles | R-50 | R-75 |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Yeyuno | 7.74±0.54 (10) | 8.74±0.69 (10) | 7.93±0.68 (10) |
| Ciego | 3.75±0.31 (8) | 2.69±0.69 (8) | 2.87±0.40 (8) |
| Colon | 6.27±0.64 (8) | 4.60±0.33 (6) | 6.57±0.58 (8) |

Los resultados se expresan como $x \pm E.S.M.$ de μ l agua extracelular/100 mg peso húmedo, indicando entre paréntesis el número de animales utilizados. La determinación se hizo en presencia de sustrato y utilizando PEG(3 H) como marcador de volumen, según se describe en Material y Métodos.

intestinal: esto es, 8.14% para yeyuno, 3.1% para ciego y 5.6% en el caso del colon.

4.5.2. ABSORCIÓN INTESTINAL DE ÁCIDO LINOLEICO.

4.5.2.1. Absorción total de ácido linoleico en el yeyuno de ratas en función de su concentración en el medio de incubación. Efecto de la resección intestinal.

Para el estudio de la absorción intestinal de ácido linoleico se utilizaron concentraciones crecientes del mismo, entre 0.1 y 0.8 mM, y se procedió tal como se describe en el apartado 3.8.2 de Material y Métodos.

La absorción total de ácido linoleico en los tres lotes de animales estudiados, muestra una evolución semejante con cinética de saturación (ver Fig. 5 y Tabla 18) Como se puede observar, la absorción es mayor tras la resección intestinal a todas las concentraciones estudiadas, llegando a ser este aumento significativo a concentraciones iguales o mayores de 0.4 mM.

4.5.2.2. Cálculo de los parámetros cinéticos para la absorción yeyunal de ácido linoleico en ratas controles y reseccionadas.

Como inhibidor competitivo de la absorción yeyunal de ácido linoleico se ha utilizado el ácido linolénico (Chow y Hollander, 1979a).

**Tabla 18. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA
 ABSORCION TOTAL DE ACIDO LINOLEICO EN YEUONO**

| Ac. linoleico (mM) | Controles | R-50 | R-75 |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------------|
| 0.10 | 137.3±17.9 (6) | 146.5±34.1 (6) | 159.9±24.1 (6) |
| 0.20 | 250.2±45.1 (6) | 246.6±63.2 (6) | 293.4±41.2 (6) |
| 0.40 | 376.1±38.7 (6) | 442.5±89.2 (6) | 521.7±52.1* (6) |
| 0.80 | 527.8±53.4 (6) | 740.2±46.6* (6) | 847.5±126.5**** (6) |

La absorción intestinal de ácido linoleico se determinó mediante la técnica de sacos evertidos a concentraciones crecientes de 0.10 a 0.80 mM, como se describe en Material y Métodos. El medio de incubación consistió en solución Ringer (pH 6.5) que contenía taurocolato sódico 10 mM y ácido linoleico. Los resultados se expresan como pmoles de ácido linoleico absorbidos/mg tejido húmedo/6 minutos y vienen dados como $\bar{x} \pm E.S.M.$. El nº de animales empleados para cada determinación se muestra entre paréntesis.

* $p < 0.05$, **** $p < 0.001$, ratas reseccionadas v.s. ratas control.

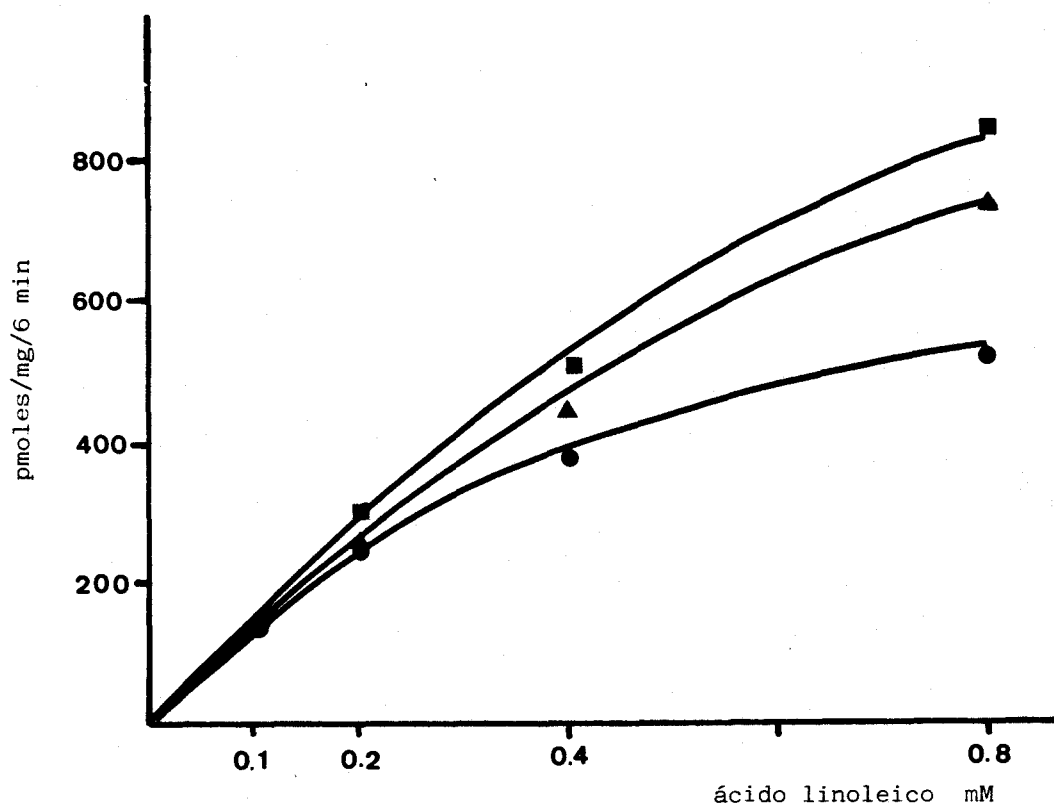


Fig.5. Absorción total de ácido linoleico en yeyuno de ratas en función de su concentración en el medio de incubación. Efecto de la resección intestinal. (●) Ratas controles, (▲) ratas R-50, (■) ratas R-75.

Tabla 19. EFECTO DEL ACIDO LINOLENICO SOBRE LA ABSORCION DE ACIDO LINOLEICO EN YEUENO.

| Ac. linolenico: (mM) | Acido linoleico 0.1 mM | | | |
|-------------------------|------------------------|---------------|----------------|---------------|
| | 0 | 0.8 | 1.5 | 3 |
| Controles | 116±16 (3) | 85±2 (3) | 52±5 (3) | 31±9 (3) |
| R-50 | 137±19 (3) | 76±14 (3) | 45±5 (3) | 30±6 (3) |
| R-75 | 138±14 (3) | 62±13 (3) | 40±7 (3) | 19±5 (3) |
| | Acido linoleico 0.8 mM | | | |
| Controles | 641±5 (3) | 477±42 (3) | 304±1 (3) | 220±36 (3) |
| R-50 | 745±15 (3) | 477±64 (3) | 271±39 (3) | 199±37 (3) |
| R-75 | 901±128 (3) | 558±50 (3) | 273±141 (3) | 196±5 (3) |

La absorción se determinó en presencia o ausencia de ácido linolénico a las concentraciones que se indican y como se describe en Material y Métodos. El número de experimentos realizados aparece entre paréntesis. En cada experimento se utilizó el intestino delgado procedente de dos ratas. Otros detalles como en Tabla 18.

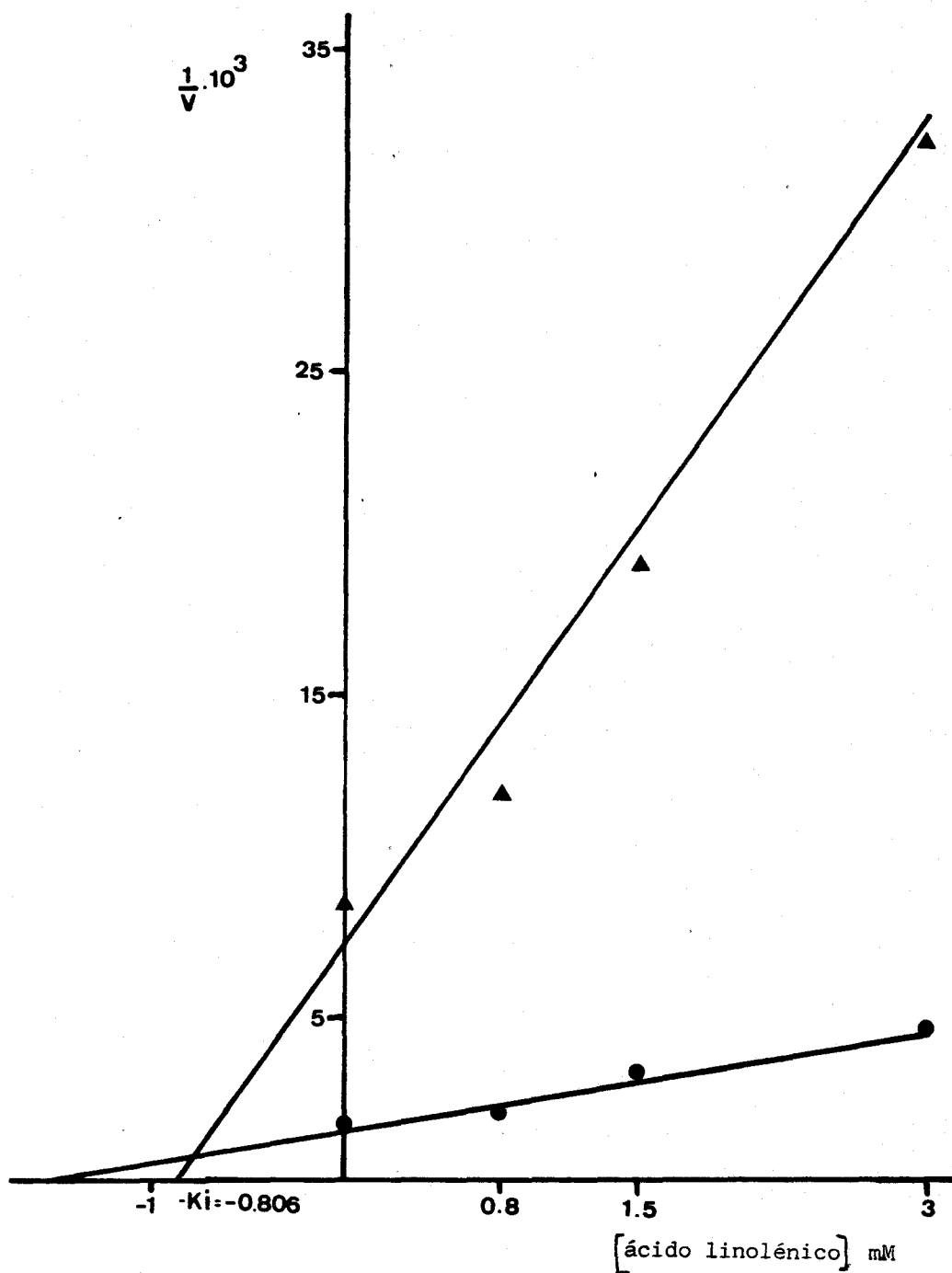


Fig.6. Inhibición del transporte de ácido linoleico en yeyuno de ratas controles por distintas concentraciones de ácido linolénico. La velocidad de transporte se expresa en pmoles/mg/6 min. Los datos son representados según el método de Dixon. (▲) Ácido linoleico 0.1 mM. (●) ácido linoleico 0.8 mM.

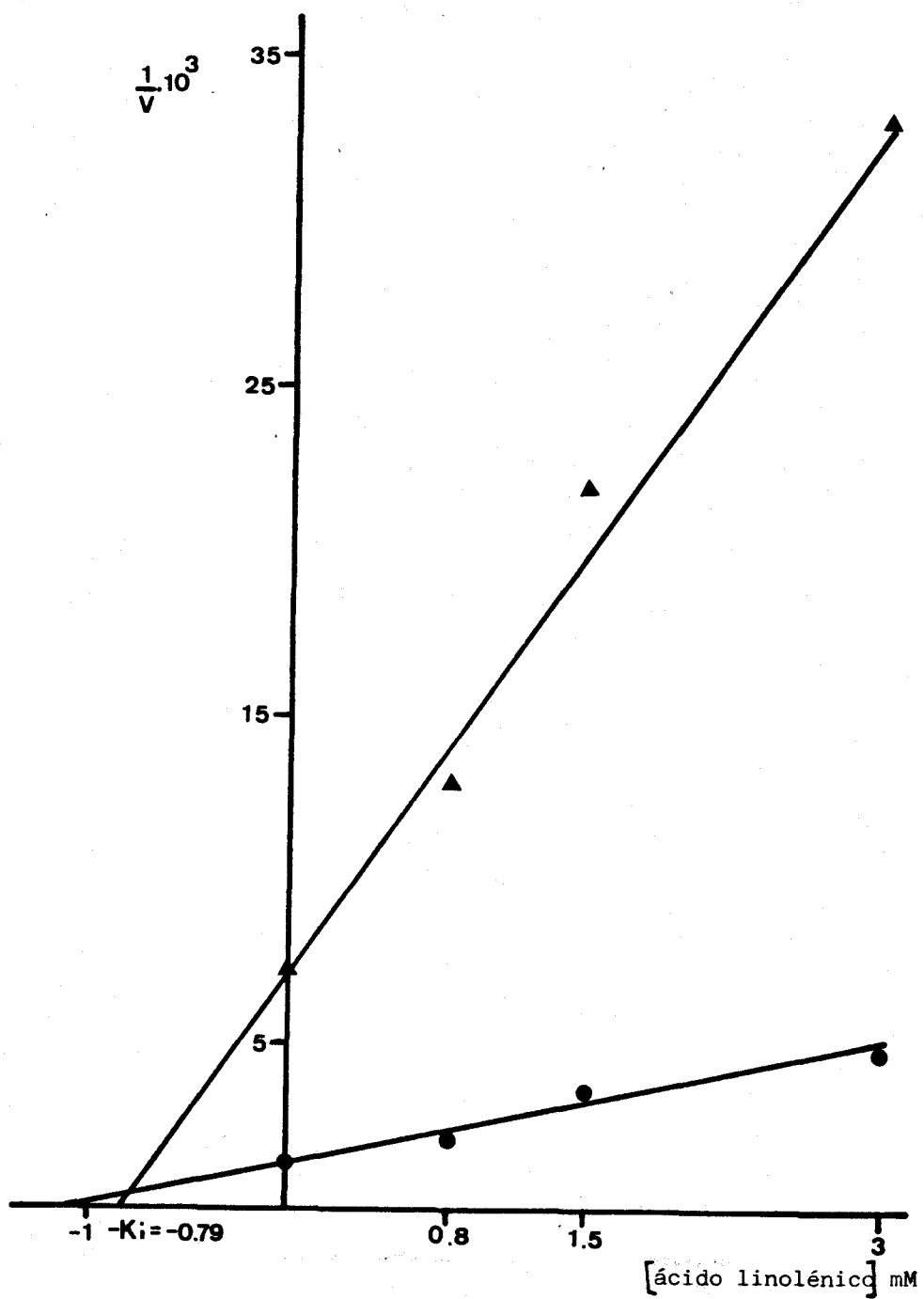


Fig.7. Inhibición del transporte de ácido linoleico en yeyuno de ratas con resección del 50% por distintas concentraciones de ácido linoléico. Otros detalles como en Fig. 6.

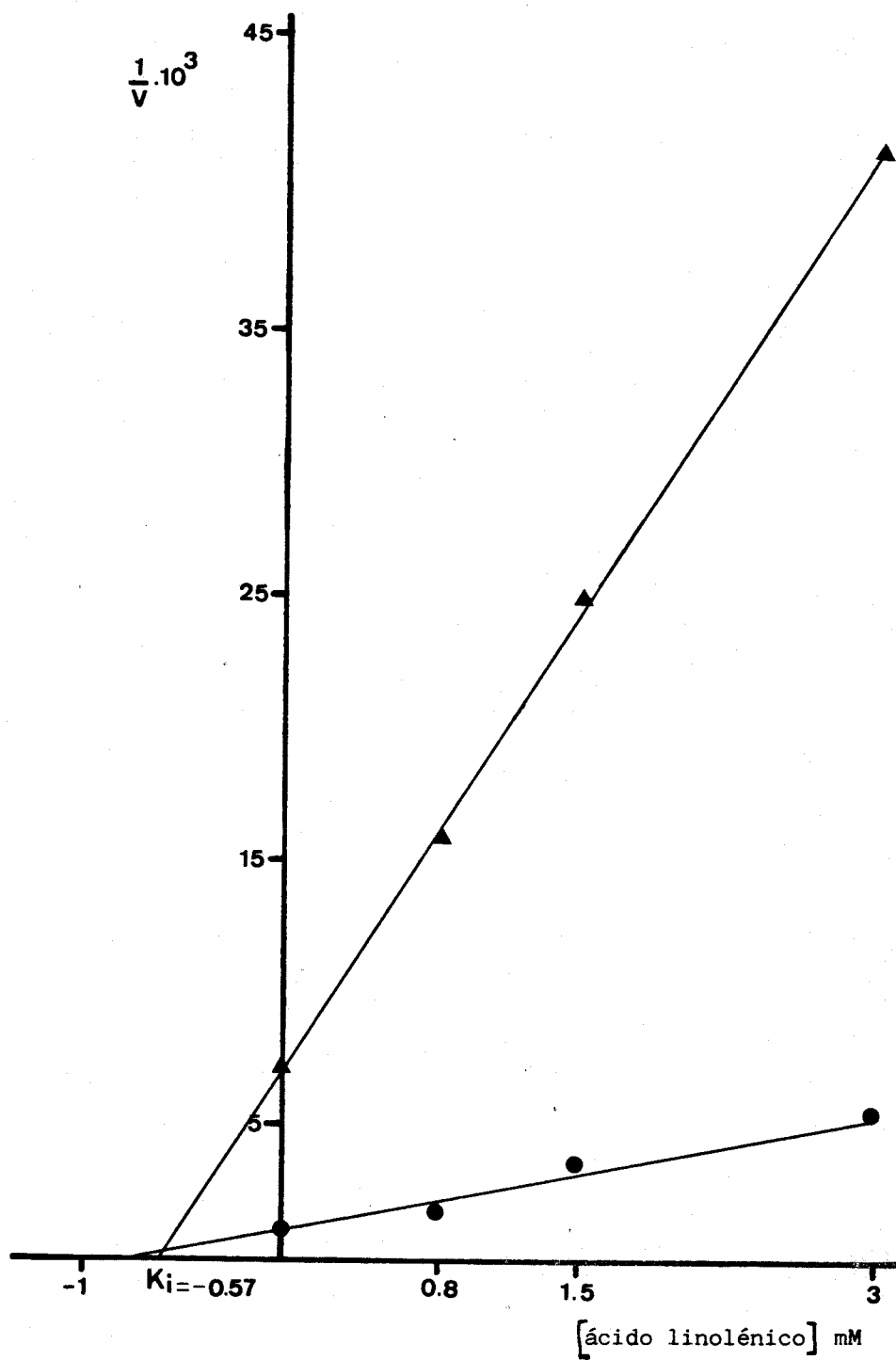


Fig. 8. Inhibición del transporte de ácido linoleico en yeyuno de ratas con resección del 75% por distintas concentraciones de ácido linolénico. Otros detalles como en Fig. 6.

**Tabla 20. PARAMETROS CINETICOS DE LA ABSORCION DE ACIDO
LINOLEICO EN YEUENO.
EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.**

| | Controles | R-50 | R-75 |
|------------------|-----------|-------|-------|
| V _{max} | 1470 | 2857 | 3679 |
| K _t | 0.968 | 2.345 | 2.440 |
| K _i | 0.806 | 0.790 | 0.570 |

Los datos de V_{max}, K_t y K_i se obtuvieron al aplicar la ecuación de Dixon a los datos de absorción de ácido linoleico en presencia de ácido linolénico que se muestran en la Tabla 3. Las representaciones gráficas correspondientes se muestran en las Fig. 2, 3 y 4.

V_{max} se expresa en pmoles/mg tejido húmedo/6 min.

K_t y K_i se expresan en mM.

Con el fin de determinar las constantes cinéticas, se utilizaron dos concentraciones de sustrato (0.1 y 0.8 mM) frente a tres concentraciones de inhibidor (0.8, 1.5 y 3 mM). A partir de los resultados obtenidos (ver Tabla 19) y mediante su representación gráfica según el método de Dixon (ver Fig. 6, 7, y 8) hemos calculado la constante aparente de transporte (K_t), y la velocidad máxima (V_{max}) y la constante de inhibición (K_i) para los tres grupos experimentales (ver Tabla 20). Como puede observarse, tanto la V_{max} como la K_t , aumentan con la resección intestinal. Por el contrario, la K_i disminuye tras esta operación.

4.5.2.3. Absorción de ácido linoleico en el ciego y colon de ratas controles y reseccionadas. Efecto del ácido linolénico.

La absorción de ácido linoleico se estudió en el ciego y colon de ratas controles y reseccionadas a una sólo concentración de 0.05 mM como se describe en el apartado 3.8.2 de Material y Métodos.

Los resultados muestran que la resección intestinal aumenta la absorción de ácido linoleico en el ciego ($p < 0.05$ para R-50 y R-75) y colon ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, para R-5- y R-75) respecto a los valores encontrados en las ratas controles (ver Tablas 21 y 22 y Fig. 9).

Para comprobar si la absorción de ácido linoleico en el ciego y colon de ratas era inhibida por el ácido linolénico, se adicionó este último al medio de incubación a una concentración de 3 mM.

A partir de los resultados obtenidos (Tabla 21 y 22 y Fig. 9) se observa que tanto en el ciego como en el colon de ratas controles,

Tabla 21. ESTUDIO DE LA ABSORCION DE ACIDO LINOLEICO EN EL CIEGO TRAS LA RESECCION INTESTINAL. EFECTO DEL ACIDO LINOLENICO.

| | Controles | R-50 | R-75 |
|--------------|------------------|---------------------|--------------------|
| I=0 mM | 8.56±1.72 (7) | 20.50±4.32* (5) | 16.40±2.21* (5) |
| I= 3 mM | 4.14±0.64 (4) | 11.07±1.90** (4) | 8.50±1.73* (4) |
| % inhibición | 52 | 46 | 48 |

La absorción se determinó en sacos evertidos según la técnica de Chow y Hollander descrita en Material y Métodos. El medio de incubación utilizado fué solución Ringer (pH 6.5) que contenía taurocolato sódico 10 mM, ácido linoleico 0.05 mM y, en su caso, ácido linolénico (I) 3 mM. Los resultados se expresan como pmoles de ácido linoleico/mg tejido húmedo/6 min, y vienen dados como $x \pm E.S.M.$ El número de experimentos se muestra entre paréntesis. Para cada experimento se utilizaron los ciegos procedentes de dos ratas.

*p<0.05, **p<0.01 ratas reseccionadas v.s. ratas controles.

**Tabla 22. ESTUDIO DE LA ABSORCION DE ACIDO LINOLEICO EN COLON
 TRAS LA RESECCION INTESITINAL.
 EFECTO DEL ACIDO LINOLENICO.**

| | Controles | R-50 | R-75 |
|--------------|-------------------|-----------------------|---------------------|
| I=0 mM | 17.15±0.43 (5) | 26.33±0.45**** (3) | 24.06±3.97** (3) |
| I= 3 mM | 8.88±0.08 (3) | 14.06±2.60 (3) | 12.38±1.59 (3) |
| % inhibicion | 48 | 47 | 48 |

La absorción de ácido linoleico se de terminó mediante la técnica de sacos evertidos descrita en Material y Metodos. Otros detalles como en la tabla 21.

p<0.01, **p<0.001, ratas reseccionadas v.s. a ratas controles

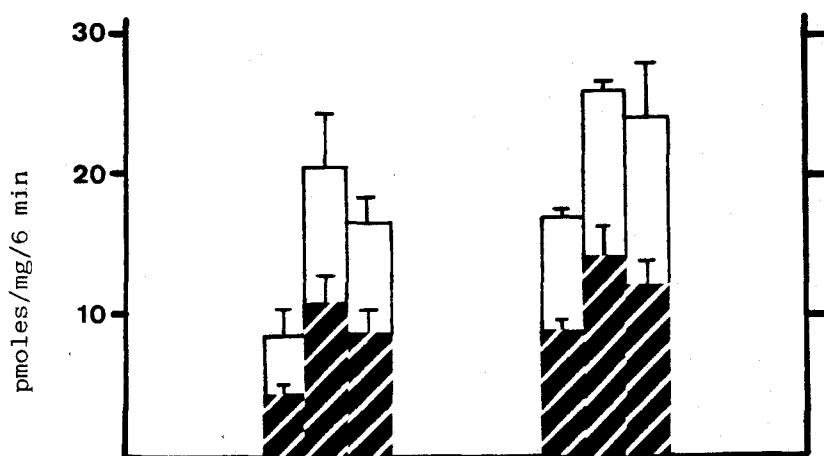


Fig.9. Absorción total de ácido linoleico en ciego (A) y colon (B) de ratas controles y reseccionadas. Efecto del ácido linolénico. Las barras rayadas indican la absorción de ácido linoleico (0.05 mM) en presencia de ácido linolénico (3 mM).

la absorción de ácido linoleico a una concentración de 0.05 mM es inhibida en presencia de ácido linolenico 3 mM. Esta inhibición se observa igualmente en ratas reseccionadas, manteniéndose el mismo porcentaje de inhibición entre los tres grupos experimentales tanto en el ciego como en el colon (ver Tablas 21 y 22).

4.5.3. ABSORCIÓN INTESTINAL DE COLESTEROL.

4.5.3.1. Absorción total de colesterol en el yeyuno, ciego y colon en función de su concentración en el medio de incubación. Efecto de la resección intestinal.

El estudio de la absorción intestinal de colesterol se realizó en los tres segmentos intestinales indicados anteriormente mediante la técnica de Chow y Hollander (1979), utilizando concentraciones de 0.05, 0.10, 0.20 y 0.40 mM en el medio de incubación, y según se describe en el apartado 3.8.2 de Material y Métodos.

Como se puede observar, la absorción de colesterol representada frente a las concentraciones iniciales de sustrato en los tres segmentos estudiados y para los tres grupos de ratas experimentales, muestra una recta que pasa por el eje de coordenadas, indicativo de que el proceso se realiza por una difusión simple (Tabla 23, 24 y 25 y Fig. 10, 11, y 12).

Los resultados muestran, que la resección intestinal provoca un aumento en la absorción total de colesterol en los tres segmentos estudiados, que es significativo para todas las concentraciones

estudiadas, y dependiente de la longitud de intestino delgado excluida en el caso del ciego.

Las pendientes de las distintas rectas de regresión obtenidas nos dan las constantes de difusión aparente (K_d) que aparecen reflejadas en la Tabla 26, junto con los coeficientes de regresión de estas rectas.

Tabla 23. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA ABSORCION DE COLESTEROL EN YEYUNO.

| Colesterol (mM) | Controles | R-50 | R-75 |
|-----------------|----------------|---------------------|---------------------|
| 0.05 | 1.1±0.4 (6) | 6.8±1.7** (6) | 6.4±1.0**** (6) |
| 0.10 | 2.5±0.3 (6) | 9.5±0.1**** (6) | 9.2±2.0** (6) |
| 0.20 | 4.4±1.3 (6) | 20.6±0.1**** (6) | 22.7±1.7**** (6) |
| 0.40 | 7.8±1.9 (6) | 44.0±8.0*** (6) | 45.5±11.0** (6) |

La absorción se determinó en sacos evertidos de yeyuno a concentraciones crecientes de 0.05 a 0.40 mM, según se describe en Material y Métodos. El medio de incubación utilizado fué solución Ringer (pH 7.4) que contenía taurocolato sódico 10 mM y colesterol a las distintas concentraciones ensayadas. Los resultados se expresan como pmoles de colesterol absorbido/mg tejido húmedo/6 min, y vienen dados como $\bar{x} \pm E.S.M.$. El nº de animales utilizados para cada determinación se muestra entre paréntesis.

p<0.01, *p<0.005, ****p<0.001 ratas reseccionadas v.s. ratas controles.

Tabla 24. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA ABSORCION DE COLESTEROL EN CIEGO

| Colesterol (mM) | Controles | R-50 | R-75 |
|-----------------|----------------|-------------------|-----------------------|
| 0.05 | 0.3±0.1 (4) | 0.7±0.2 (4) | 1.5±0.1****.a (4) |
| 0.10 | 0.7±0.2 (4) | 1.5±0.1*** (3) | 3.0±0.4****.a (3) |
| 0.20 | 1.7±0.2 (4) | 3.0±0.1*** (3) | 6.5±1.0****.a (4) |
| 0.40 | 3.0±0.6 (5) | 6.1±0.7* (3) | 12.7±0.3****.d (3) |

La absorción se determinó mediante la técnica de sacos evertidos, como se describe en Material y Métodos. Para cada experimento se utilizaron los ciegos procedentes de dos ratas. Otros detalles como en la Tabla 23. *p<0.05, ***p<0.005, ****p<0.001 ratas reseccionadas v.s. ratas controles.

^ap<0.05, ^dp<0.001, ratas R-75 v.s. ratas R-50.

Tabla 25. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA ABSORCION DE COLESTEROL EN COLON.

| Colesterol (mM) | Controles | R-50 | R-75 |
|-----------------|----------------|--------------------|--------------------|
| 0.05 | 0.4±0.1 (5) | 3.9±0.9** (3) | 3.6±1.0* (4) |
| 0.10 | 0.8±0.1 (3) | 8.6±1.7* (3) | 8.0±1.0** (4) |
| 0.20 | 1.3±0.3 (4) | 14.0±2.7*** (4) | 15.0±5.0*** (4) |
| 0.40 | 4.0±1.0 (4) | 30.0±5.0*** (4) | 30.5±6.2** (4) |

La absorción se determinó en sacos evertidos de colon, como se describe en el apartado de Material y Métodos. Para cada experimento se utilizó el intestino procedente de dos ratas. Otros detalles como en la Tabla 23. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005 ratas reseccionadas v.s. ratas controles.

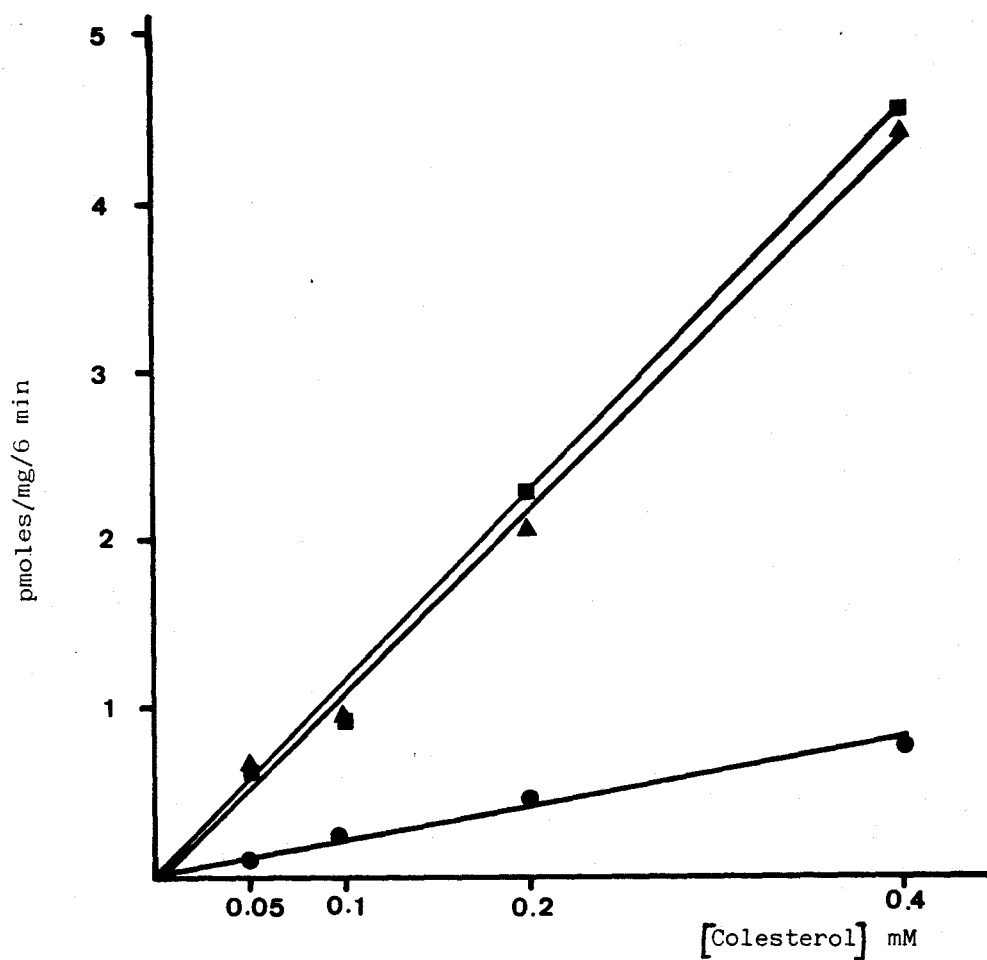


Fig.10. Absorción total de colesterol en yeyuno de ratas controles y reseccionadas en función de la concentración en el medio de incubación. (●) Ratas controles, (▲) ratas R-50, (■) ratas R-75.

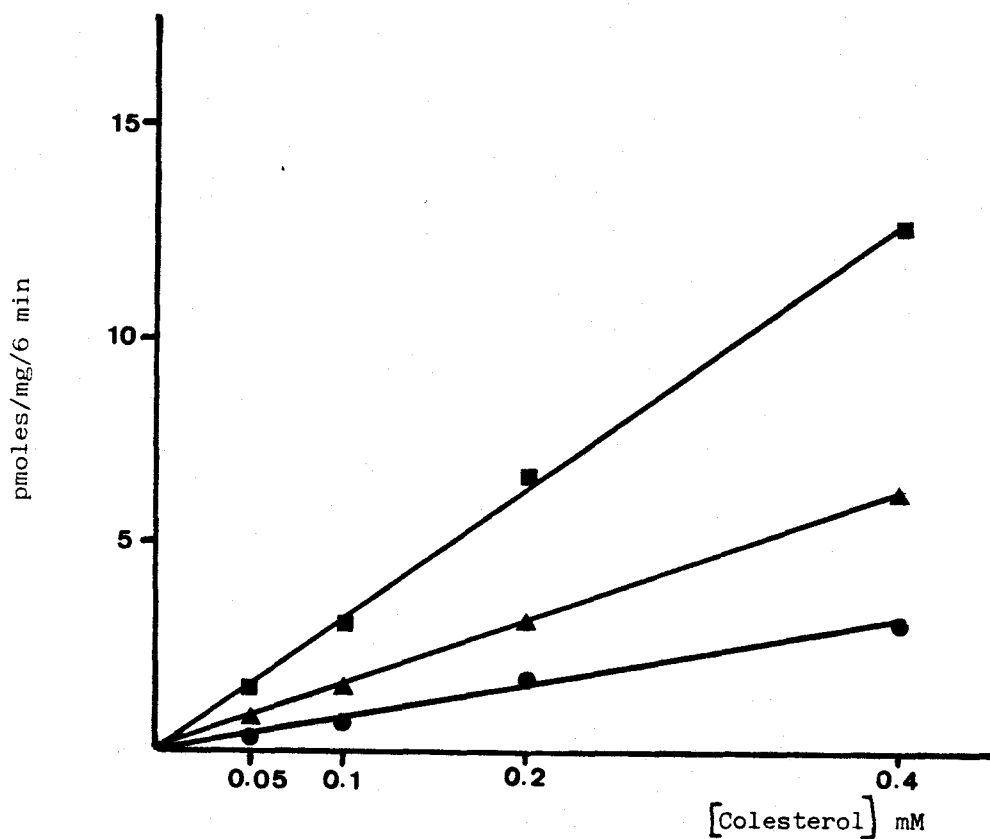


Fig.11. Absorción total de colesterol en ciego de ratas controles y reseccionadas en función de la concentración en el medio de incubación. (●) Ratas controles, (▲) ratas R-50, (■) ratas R-75.

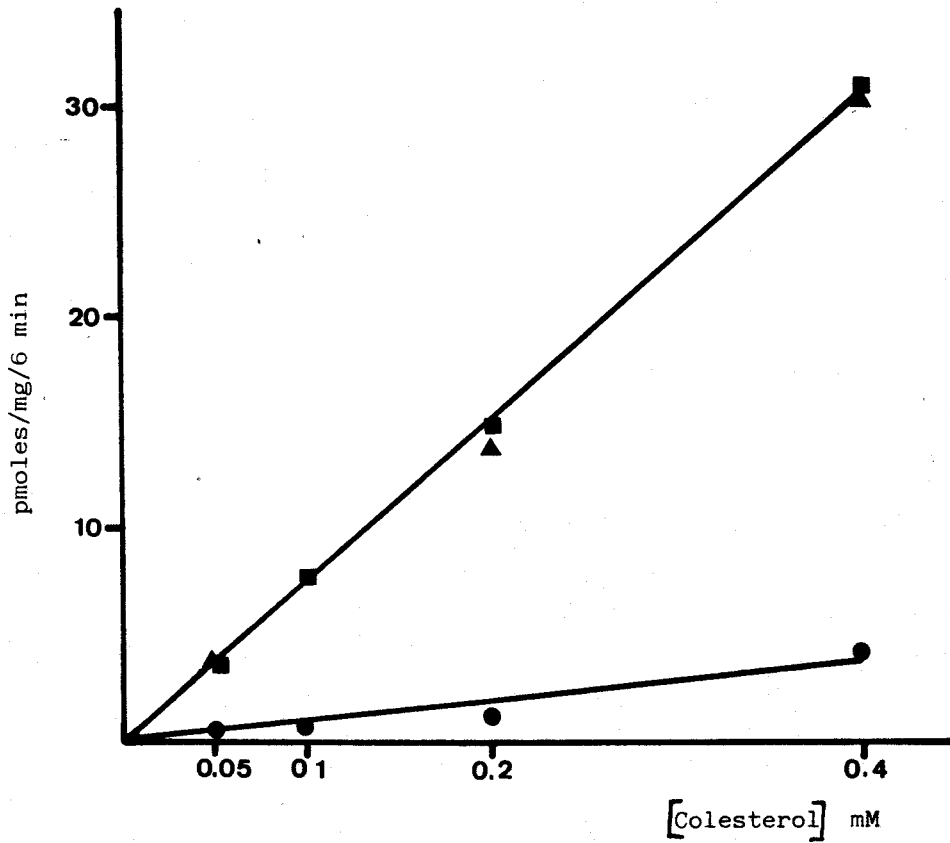


Fig.12. Absorción total de colesterol en colon de ratas controlas y reseccionadas en función de la concentración en el medio de incubación. (●) Ratas controlas, (▲) ratas R-50, (■) ratas R-75.

Tabla 26. CONSTANTES DE TRANSPORTE PARA LA ABSORCION DE COLESTEROL EN YEYUNO, CIEGO Y COLON

| | Controles | R-50 | R-75 |
|---------------|-----------|-------|-------|
| YEUONO | | | |
| r | 0.996 | 0.998 | 0.998 |
| Kd | 19 | 109 | 114 |
| CIEGO | | | |
| r | 0.996 | 0.999 | 0.999 |
| Kd | 8 | 15 | 32 |
| COLON | | | |
| r | 0.983 | 0.997 | 0.999 |
| Kd | 10 | 73 | 76 |

r: Coeficientes de regresión de las rectas representadas en las Fig. 6, 7 y 8, correspondientes al transporte de colesterol.

Kd: Constante de difusión aparente expresada en $\mu\text{moles}/\text{mg peso húmedo}/6 \text{ min}/\text{mm}$.

5. DISCUSSION

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS ANIMALES

Los animales reseccionados presentan una disminución significativa de su peso corporal, tanto mayor cuanto más intestino delgado se ha excluido (Tabla 1). Esta disminución del peso corporal podría deberse al desarrollo de un proceso de malabsorción y/o a una disminución en la ingesta diaria de alimento. El control realizado sobre la dieta ingerida en cada grupo experimental, puso de manifiesto, que no existían diferencias significativas en cuanto al consumo de comida entre los grupos experimentales, lo que nos indica que existe una reducción significativa en la eficacia alimentaria de los animales reseccionados.

Dado que el intestino delgado es el lugar dónde se realiza la mayor absorción de los nutrientes, la disminución de su longitud reducirá la absorción y como consecuencia, se producirá una pérdida de peso. Esta malabsorción afecta principalmente a los lípidos (Akesson y Nilsson, 1988), ya que en ratas reseccionadas disminuye el pool de sales biliares (Vázquez et al., 1986).

Por otro lado, las ratas sometidas a resección no presentaron modificaciones en cuanto al peso del hígado. Sin embargo, cuando el peso de este órgano se expresó por 100 g de peso corporal, se observó un aumento significativo en dicha proporción, debido a la disminución de su peso corporal (Tabla 1).

Al estudiar el efecto de la resección sobre la masa intestinal comprobamos, que la relación g/cm en el yeyuno y colon aumenta cuando aquella es masiva. Por el contrario, la resección de la mitad distal del intestino delgado, sólo da lugar a este aumento en el yeyuno y no

en el colon. Estos resultados se ratifican con estudios previos realizados por microscopia óptica, dónde se observó que tanto el yeyuno como el colon de ratas con resección sufrían una hiperplasia, excepto en el colon de ratas con resección del 50%, en donde no se producían alteraciones morfológicas tras la ilectomía (Vázquez et al., 1987).

A las seis semanas de realizar la operación, el peso del ciego aumenta, observándose por estudios histológicos una hiperplasia mayor cuando la resección es masiva (Vázquez et al., 1987) (Tabla 1).

5.2. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE EL METABOLISMO DEL COLESTEROL.

- DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES HMG-CoA REDUCTASA Y ACAT EN HIGADO E INTESTINO. RELACION CON LA COMPOSICION LIPIDICA MICROSOMAL. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

Nuestros resultados mostraron que la actividad total de la HMG-CoA reductasa hepática aumenta a las seis semanas de la resección intestinal, independientemente de la longitud de intestino excluida (Tabla 2). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por otros autores al disminuir el "pool" de sales biliares (Erickson et al., 1980; Kuipers et al., 1985; Innis, 1986).

Nordstrom et al. (1977) y Brown et al. (1979) pusieron de manifiesto que esta enzima estaba modulada por un mecanismo de fosforilación-defosforilación, presentando una forma defosforilada

(activa) y una forma fosforilada (inactiva). De acuerdo con este concepto, podríamos pensar que la resección intestinal no sólo modificara la actividad total (Rt) de la enzima, sino que además afectara a la relación Ra/Rt. Para comprobarlo, se determinó la actividad reductasa en microsomas aislados en presencia de NaF (inhibidor de las defosforilasas citosólicas) determinando de esta forma la actividad reductasa en el tejido en el momento del sacrificio (Ra). En efecto, observamos que la relación Ra/Rt aumentaba tras la operación, con un ligero incremento adicional en las ratas con resección masiva (Fig. 1) Este aumento en la relación Ra/Rt tras la resección, contrasta con estudios anteriores realizados por Brown et al. (1979) en ratas tras administrar colestiramina. Estos autores postularon que la reductasa inactiva serviría como reservorio, permitiendo cambios rápidos en la actividad de la misma en caso de que la célula necesitase una mayor cantidad de colesterol. Por el contrario, Bossio et al (1984) al estudiar la actividad reductasa en el hígado humano, observaron que la adición de colestiramina a la dieta producía un incremento en la actividad total de la enzima, además de un aumento en la relación Ra/Rt.

Nuestros datos sugieren que la interrupción de la circulación entero-hepática por resección intestinal, hace que las células necesiten continuamente gran cantidad de colesterol, lo que induciría un estímulo continuo que impediría que las células ajustasen definitivamente la cantidad total de la enzima. Como consecuencia estarían estimulados ambos mecanismos de regulación (corto y largo plazo), alterándose los niveles de producción de HMG-CoA reductasa junto con los de todos los enzimas involucrados en el mecanismo de

fosforilación-defosforilación.

La mucosa intestinal ocupa el segundo lugar, en orden de importancia, para la síntesis endógena del colesterol (Turley et al., 1981; Spady y Dietschy, 1983). Por ello, se ha sugerido que cuando las necesidades de colesterol aumentan (como en el caso de la resección intestinal), la síntesis extrahepática del mismo puede ser de gran importancia para su metabolismo. Nuestros resultados muestran que la resección intestinal no modifica la actividad total de la HMG-CoA reductasa en ninguno de los tres segmentos estudiados (yeyuno, ciego y colon) (Tabla 3). El aumento en actividad HMG-Co A reductasa observado al expresar los resultados por unidad de longitud o por órgano (Fig. 2), era debido a la hiperplasia que sufren estos segmentos tras la operación (Tabla 1), ya que la actividad específica no se vió alterada (Tabla 3). La relación Ra/Rt tampoco se modificó tras la resección intestinal en ninguno de los tres segmentos estudiados, aunque un dato significativo fué el hecho de que esta relación era mayor en el ciego y colon que en el yeyuno de ratas controles y reseccionadas (Tabla 3).

En estudios previos en los que se interrumpió la CEH en ratas mediante la administración de colestiramina (Panini et al., 1979; Stange y Dietschy, 1985), o por derivación de la bilis del conducto colédoco (Andersen y Dietschy, 1977), se observó un aumento en la actividad total de la reductasa en el yeyuno, lo que contrasta con nuestros resultados. Esta discrepancia podría deberse a los distintos procedimientos experimentales utilizados.

El hecho de que la actividad reductasa aumente en el hígado y no en el intestino tras la resección, parece indicar, que este incremento hepático es suficiente para cubrir las necesidades celulares de

colesterol en el organismo.

En cuanto a la determinación de la actividad reductasa en ciego y colon tras la interrupción de la CEH, no existen datos en la bibliografía, aunque cabe esperar que, si esta enzima no se ve afectada en el intestino delgado, tampoco lo hará en el grueso.

La otra enzima implicada en el metabolismo del colesterol es la ACAT, responsable de la esterificación del mismo.

Al estudiar esta enzima en el hígado, comprobamos que su actividad disminuía tras la operación quirúrgica, disminución que era proporcional a la longitud de intestino excluido (Tabla 2). Contrastando con estos resultados, Innis (1986) no encontró cambios en la actividad ACAT tras la administración de colestiramina, mientras que Erickson y col. (1980) observaron una ligera disminución de la actividad de esta enzima.

La actividad ACAT intestinal, tras la operación quirúrgica, no varía en ninguno de los tres segmentos intestinales estudiados (yeyuno, ciego y colon) (Tabla 4), aunque al igual que ocurrió con la reductasa intestinal, esta actividad se vería aumentada al expresar los resultados por unidad de longitud para el caso del yeyuno y colon ó por órgano en el caso del ciego (valores no mostrados). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Stange y Dietschy (1985) en rata, y contrastan con los obtenidos en conejo por Field y Salome (1982) tras la administración de colestiramina. Por otra parte, la eliminación de la bilis en el duodeno tampoco altera la actividad ACAT en el intestino de rata (Gallo et al., 1984b).

Todos estos resultados parecen indicar que el hígado y el intestino, responden de distinta forma para mantener la homeostasia

del colesterol en el organismo tras la resección intestinal.

El distinto comportamiento de estas dos enzimas en el hígado e intestino podría explicarse analizando la composición lipídica de las membranas microsomales, ya que distintos autores (Erickson et al., 1980; Ramirez et al., 1981; Field y Salome, 1982; Field et al., 1987) han indicado una relación entre la actividad de estas enzimas y el ambiente lipídico que las rodea.

En condiciones fisiológicas normales, tanto en el hígado como en el intestino, parece haber una relación inversa entre los niveles de colesterol libre microsomales y la actividad reductasa, mientras que la relación entre el colesterol libre microsomal y la actividad ACAT es directa, es decir, la actividad ACAT depende de la biodisponibilidad de sustrato (Field y Salome, 1982; Innis, 1986). Según esto, los resultados obtenidos en el hígado, eran de esperar, ya que el aumento en la síntesis hepática de sales biliares que provocaría la resección, podría producir una disminución en los niveles de colesterol, que estimularía la actividad reductasa e inhibiría la actividad ACAT. Sin embargo, al estudiar la composición lipídica de los microsomas hepáticos, observamos que los niveles de colesterol libre aumentan tras la resección intestinal, siendo este incremento mayor a mayor longitud de intestino delgado excluido. Por el contrario, los ésteres de colesterol disminuyen, principalmente tras la resección masiva, lo que podría reflejar, en parte, la disminución de actividad ACAT. Los niveles de fosfolípidos no se modifican con la resección intestinal, por lo que aumenta la relación CL/FL (Tabla 5).

Innis (1986) observó que tras la administración de colestiramina,

los cambios producidos en la actividad ACAT y HMG-Co A reductasa hepática no guardaban relación con los niveles de colesterol microsomales. Resultados similares fueron observados por Erickson et al. (1980) y Stange y Dietschy (1985) en ratas. Según esto, no siempre un aumento en los niveles de colesterol microsomales va acompañado por un aumento en la actividad ACAT y una disminución en la reductasa, indicando que otros factores pueden regular la actividad de estas enzimas.

Distintos autores han puesto de manifiesto que, independientemente del colesterol libre microsomal, la actividad de estas enzimas está regulada por la naturaleza de los ácidos grasos que componen los fosfolípidos de las membranas microsomales. Así, se ha comprobado que un aumento en los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de las familias (n-3) y (n-6) va acompañado por un aumento de la esterificación de colesterol en el hígado (Spector et al., 1980). El estudio de la composición en ácidos grasos de los microsomas hepáticos indica, que la resección intestinal produce una disminución en los niveles de poliinsaturados, principalmente tras la resección masiva (Tabla 6) que podría estar relacionada con la inhibición en la actividad ACAT.

Al examinar más detalladamente la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos microsomales hepáticos, se observa mayor número de cambios tras la resección masiva que tras la resección del 50%; así, se ven aumentados los niveles de monoeno, representados por los ácidos palmitoleico (16:1, n-7) y oleico (18:1, n-9), y disminuyen los niveles de linoleico (18:2, n-6) y araquidónico (20:4, n-6) en las ratas con resección del 75%. Este tipo de variaciones se observa en

animales que tienen tendencia a ser deficientes en ácidos grasos esenciales (Keim y Mares-Perlan, 1984). Esta tendencia viene indicada, además, por la aparición del ácido 20:3 (n-9) en estos animales, considerado como un marcador de la deficiencia en ácidos grasos esenciales (Martins et al., 1984) (Tabla 6). Sin embargo, la relación trieno (20:3, n-9)/tetraeno (20:4, n-6) no apoyó esta hipótesis, ya que su valor fué inferior a 0.4 (0.032), que según algunos autores (Martins et al., 1984) debe superarse para considerar instaurado totalmente este síndrome.

Por otra parte, al ser los ácidos linoleico y araquidónico los constituyentes fundamentales de los fosfolípidos que forman la cubierta de las lipoproteínas, la resección podría hacer disminuir la secreción de colesterol como lipoproteínas, aumentando así el colesterol intracelular.

Se ha podido comprobar, que la interrupción de la CEH mediante la administración de colestiramina, produce un aumento en el número de receptores hepáticos para las LDL, aumentando la captación de colesterol por esta vía (Packard y Shepherd, 1982). Normalmente esta circunstancia se da en situaciones bajo las cuales la célula está necesitada de colesterol, y normalmente va acompañada por un aumento en la actividad HMG-Co A reductasa y una disminución de la ACAT en el hígado. En base a este hecho, podría ocurrir que la resección intestinal aumentara el número de receptores para las LDL, que junto con el aumento de HMG-CoA reductasa y la disminución de actividad ACAT observados en el hígado de animales reseccionados, y otros factores, fueran suficientes para satisfacer las necesidades de colesterol. El aumento en el aporte de colesterol se canalizaría preferentemente

hacia la síntesis continua de sales biliares, compensando la pérdida de éstas y disminuyendo la cantidad de colesterol disponible para la actuación de la ACAT.

En cuanto a los resultados obtenidos en el intestino (yeyuno), la ausencia de variación en la actividad HMG-CoA reductasa y ACAT nos indica que, en principio, los pools de colesterol que regulan estas enzimas se mantienen intactos. Sin embargo, se observó un aumento en los niveles de colesterol libre en los microsomas de intestino (yeyuno) de ratas reseccionadas, mientras que los niveles de ésteres de colesterol no se modificaron significativamente, reflejando, en parte, el efecto de la actividad ACAT (Tabla 7). Estos resultados son difíciles de comprender, ya que la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa debería estimularse, puesto que al realizar la interrupción de la circulación entero-hepática, disminuye la superficie funcional del intestino, y como consecuencia, la absorción de grasas (Åkesson y Nilsson, 1988). Una posible explicación podría ser el aumento en el aporte de colesterol vía lipoproteínas plasmáticas a través de la membrana basolateral, aunque Stange y Dietschy (1985) demostraron que la administración de colestiramina a ratas, no aumentaba la captación intestinal de LDL.

Por otro lado, hay que tener en cuenta, que parte del colesterol libre de la célula se destina a la formación de quilomicrones, que posteriormente, pasarán a la linfa (Gaugl y Ockner, 1975; Stange y Dietschy, 1985). La disminución de la absorción de grasas podría hacer disminuir las necesidades de colesterol para esta función, lo que podría compensar la falta de absorción del mismo, manteniéndose constantes los pools de colesterol y no modificándose las actividades

de las enzimas implicadas en su metabolismo.

Field et al (1987) comprobaron en intestino de conejo, que la actividad ACAT intestinal, al igual que la hepática, podría estar modulada por la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos microsomales. Nuestros resultados muestran, que a diferencia del hígado, no se observaron cambios en los ácidos grasos poliinsaturados de las familias (n-6) y (n-3) tras la resección intestinal (Tabla 8).

Al realizar un estudio más detallado sobre la composición en ácidos grasos de los microsomas intestinales (yeyuno) de ratas reseccionadas, observamos un aumento en los niveles de ácidos grasos saturados, representados por el ácido palmítico (16:0) y esteárico (18:0). La proporción de monoenos permanece constante, mientras que, los resultados más interesantes vienen reflejados por el aumento progresivo que sufren los dienos, principalmente ácido linoleico (18:2, n-6), y la disminución de los tetraenos (araquidónico) tras la resección intestinal (ver Tabla 8), que a su vez hace que la relación 20:4/18:2 disminuya (0.42 y 0.39, para ratas R-50 y R-75 v.s. 0.78 para ratas controles).

Los fosfolípidos de la mucosa intestinal son utilizados continuamente para formar las cubiertas de los quilomicrones (Glickman, 1984), así como para la construcción de las membranas de los enterocitos (Lipkin, 1984). Hasta ahora se pensaba que estos ácidos grasos poliinsaturados provenían de la degradación de los fosfolípidos de la bilis en el lumen intestinal. Sin embargo, estudios recientes sugieren que una cantidad significativa de ácido araquidónico puede originarse por síntesis *de novo* en el enterocito, a través de la desaturación y elongación de la cadena de ácido linoleico

(Garg et al., 1988). Con lo cual, el hecho de haber encontrado una disminución en la proporción araquidónico/linoleico nos sugiere, que podría existir una inhibición de la Δ_6 desaturasa del enterocito tras la resección intestinal.

Sería importante indicar que el estudio de la composición lipídica microsomal se ha realizado sobre microsomas enteros y que, por tanto, no se limita al ambiente lipídico específico que rodearía a cada enzima, aunque sería reflejo de éstos.

El estudio de la composición lipídica de los fosfolípidos de microsomas del ciego y colon queda aún por determinar y serán objeto de futuros trabajos.

- ESTUDIO DE LAS FRACCIONES LIPIDICAS Y SU COMPOSICION EN ACIDOS GRASOS EN EL TEJIDO HEPATICO Y SUERO. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

Cuando se estudió la composición lipídica del tejido hepático, se comprobó que el aumento de colesterol libre en microsomas de hígado (Tabla 5) no se acompañaba de un incremento en el colesterol libre hepático (Tabla 9). Estos resultados podrían indicar, que la resección altera algún proceso intracelular responsable del transporte de colesterol desde las membranas microsomales al resto de las membranas celulares (mitocondrias fundamentalmente), dónde reside gran parte del colesterol celular. Por otra parte, los niveles de triglicéridos y fosfolípidos del hígado tampoco se modificaban como consecuencia de la ilectomía, sin embargo, encontramos un descenso en los niveles de

ésteres de colesterol, respecto a los valores encontrados en ratas controles, mayor en la resección del 50% que en la del 75% (Tabla 9). Estos resultados, podrían ser, en parte, reflejo de la disminución observada en la actividad ACAT (ver Tabla 2).

Los valores de ésteres de colesterol en el hígado tras la resección intestinal, no son paralelos a los encontrados en los microsomas hepáticos, y además, el incremento en la actividad ACAT en los animales con resección del 50%, respecto a la resección del 75% (Tabla 2), se corresponde con una mayor disminución en los niveles de ésteres de colesterol hepáticos. Esto podría explicarse por un incremento en la descarga de VLDL ricas en ésteres de colesterol, producida por un aumento en la actividad ACAT (Devron et al., 1980). Si esto ocurriera tras la resección intestinal, al tener las ratas con resección del 50% una actividad ACAT mayor respecto a las reseccionadas del 75%, se promovería la descarga de VLDL ricas en ésteres de colesterol en estos animales, disminuyendo los niveles de éstos en hígado con respecto a la resección masiva.

Cuando se estudió la composición lipídica del suero se observó un aumento significativo en los niveles de colesterol libre después de la operación, junto con una disminución, aunque no significativa, en el contenido de ésteres de colesterol, reflejando ligeramente la actividad ACAT hepática. No se observaron modificaciones ni en los niveles de lípidos totales ni en los fosfolípidos, al igual que ocurrió en el hígado. Por el contrario, los triglicéridos aumentaron significativamente después de la resección intestinal (Tabla 10).

Parece ser que el colesterol absorbido por el intestino se transporta principalmente en linfa como ésteres de colesterol (Thomson

y Dietschy, 1981), siendo la ACAT la enzima responsable, en parte, de esta esterificación (Gallo et al., 1984a, 1984b; Bennet Clarck y Tercyack, 1984). Según nuestros resultados la actividad de esta enzima no se modifica en el intestino, pero está inhibida en el hígado como consecuencia de la resección intestinal (ver Tabla 2), lo cual podría ser una causa de la ligera disminución en los niveles circulantes de colesterol esterificado.

Por otro lado, la composición lipídica del suero depende principalmente del balance existente entre la secreción hepática de lípidos y la captación de éstos por los tejidos periféricos, con lo que el aumento observado en los niveles de triglicéridos podría deberse a un desajuste en este balance.

Al estudiar la composición en ácidos grasos de las distintas fracciones de lípidos en el hígado y suero sanguíneo, comprobamos que existía una falta de similitud entre ellas, observándose las mayores diferencias en los ésteres de colesterol del tejido hepático.

El estudio de los triglicéridos del tejido hepático (ver Tabla 11 y Fig. 3) puso de manifiesto que la resección intestinal producía una subida de los niveles de ácidos grasos saturados, principalmente de esteárico, acompañada por una elevación de los niveles de monoeno (ácido oleico). Los niveles de linoleico disminuyen significativamente, mientras que el ácido araquidónico, encontrado a bajas concentraciones en esta fracción, no se modifica. Un dato significativo es la ausencia de metabolitos de ácidos grasos poliinsaturados de la familia (n-6) tras la resección intestinal, quizá por una inhibición de la Δ_5 -desaturasa hepática. La disminución de ácido linoleico en los animales reseccionados, nos apunta también a

una deficiencia en ácidos grasos esenciales, aunque esta deficiencia no es apreciable, o al menos no se puede decir que es decisiva al estudiar los triglicéridos, fundamentalmente en el tejido hepático, dónde su mecanismo de "turnover" es extremadamente rápido.

En cuanto a los fosfolípidos (ver Tabla 12 y Fig. 3), se observa una ligera disminución en los ácidos grasos saturados determinada principalmente por el ácido esteárico, y ligeros cambios en el ácido palmítico como consecuencia de la operación. Esta disminución va acompañada por un claro aumento de la proporción de ácido palmitoleico y oleico, indicando que hay un movimiento en favor de la activación de la Δ_9 -desaturasa (ver esquema 5). Por otro lado, los niveles de araquidónico y linoleico no se modifican, pero se observa que tras la resección aumentan significativamente la proporción de ácidos grasos poliinsaturados, indicando que en los fosfolípidos de estos animales predomina la esterificación con ácidos grasos poliinsaturados (n-3) y (n-6), ya que prácticamente no se detectaron valores en las ratas controles.

La última fracción de los lípidos hepáticos estudiada es la de los ésteres de colesterol (ver Tabla 13 y Fig. 3). En este caso, la mayor esterificación se realiza por el ácido linoleico (45%), que aumenta bastante tras la resección masiva (70%), acompañado por una disminución en el ácido araquidónico, que llega, incluso a no detectarse en ratas con resección del 75%. La relación 20:4/18:2 disminuye en gran medida (0.08 y 0 para R-50 y R-75 v.s. 0.16 para ratas controles). Estos resultados nos indican que a este nivel, la vía de desaturación y elongación de la cadena de ácidos grasos queda interrumpida en los animales reseccionados, por una inhibición clara

de la Δ_6 -desaturasa, que provocaría un gran acúmulo de ácido linoleico, con una desaparición progresiva del ácido araquidónico. Igualmente, puede haber un aumento de actividad de la Δ_9 -desaturasa en los animales con resección, ya que la relación monoeno/saturados está aumentada (1.5 y 3 para R-50 y R-75 v.s. 0.78 para ratas controles).

Los resultados obtenidos sobre la composición en ácidos grasos de las fracciones lipídicas del tejido hepático tras la resección intestinal, principalmente ésteres de colesterol, nos hizo reflexionar sobre los posibles cambios a nivel sanguíneo, ya que además, según distintos autores, la presencia de determinadas patologías crónicas pueden hacer variar su composición (Huang et al. 1984).

En principio, observamos que el ácido graso principal que esterificaba los ésteres de colesterol en el suero era el ácido araquidónico (ver Tabla 14 y Fig. 4), a diferencia del hígado, donde el principal ácido graso que esterificaba al colesterol era el linoleico. Garg et al. (1985) y Ciccoli y Comporti (1983) observaron las mismas características en ratas controles. Esta esterificación con ácido araquidónico aumenta tras la resección intestinal. Igualmente, los triglicéridos de ratas reseccionadas también exhibían altas proporciones de ácido araquidónico (ver Tabla 15 y Fig. 4), que se compensaba con la disminución del mismo en los fosfolípidos del suero (ver Tabla 16 y Fig. 4). Pudiera ser que este exceso de ácido araquidónico encontrado en el suero de ratas reseccionadas, se transfiera a las plaquetas para la formación de tromboxanos (TXA_1), explicando, en parte, el agotamiento en ácido araquidónico de los ésteres de colesterol del tejido hepático (ver Tabla 13).

Por tanto, las distintas fracciones lipídicas así como el perfil en ácidos grasos de cada una de ellas, en el hígado y suero, mostraron diferencias tras la resección intestinal, que en parte podrían explicarse por los distintos mecanismos de incorporación de los ácidos grasos a las fracciones lipídicas y por cambios de actividad en las enzimas de elongación y desaturación, cuyo estudio será objeto de futuros trabajos.

5.3. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL SOBRE LA ABSORCION DE ACIDO LINOLEICO Y COLESTEROL.

- ABSORCION DE ACIDO LINOLEICO EN YEYUNO, CIEGO Y COLON. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

La absorción total de ácido linoleico, representada frente a las concentraciones iniciales de sustrato en el líquido de incubación, muestra, tanto para las ratas controles como reseccionadas, una evolución semejante con una cinética de saturación (ver Fig 5). Esto nos indica que la absorción de ácido linoleico en el yeyuno está realizada por un proceso mediado, bien sea a través de un transporte activo o por una difusión facilitada. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Chow y Hollander (1979a) en las mismas condiciones experimentales *in vitro* e incluso determinando la absorción *in vivo* (1979b).

Igualmente, se observa como la resección intestinal produce un aumento en la absorción de ácido linoleico a todas las concentraciones estudiadas, llegando a ser significativo a concentraciones iguales o

mayores a 0.4 mM (Tabla 18).

Para estudiar la posibilidad de un transporte activo, se realizaron experimentos en yeyuno de ratas controles en presencia de una mezcla de ouabaína/rotenona (200 μ M/80 μ M) que hace disminuir la actividad de la bomba Na-K-ATPasa y produce deplección celular de ATP (Carter-Su y Kimmich, 1979), a una concentración baja de ácido linoleico, 0.1 mM. Los resultados mostraron que la adición de estos depresores no modificó la absorción total de ácido linoleico (93.6 \pm 17 frente a 96.4 \pm 5.8 pmoles/mg de tejido húmido/6 min, en ausencia y presencia de la mezcla ouabaína/rotenona, respectivamente), lo cual indicaba que la absorción intestinal de ácido linoleico no requiere energía y está mediada por un proceso de difusión facilitada con transportador.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Chow y Hollander (1979a) utilizando inhibidores metabólicos, indicando que a bajas concentraciones de sustrato (0.04-1.2 mM) la absorción de ácido linoleico tiene lugar por una difusión facilitada, pero que a mayores concentraciones (2-5 mM), la absorción se realizaba principalmente por una difusión simple, que a su vez enmascara la difusión facilitada que existiría en una menor cuantía. Este doble mecanismo de transporte se comprobó que también existía para otros nutrientes tales como el retinol (Hollander y Muralidhara, 1977), vitamina-B12 (Herbert, 1960) y tiamina (Sklan y Trestler, 1977), además de para otros ácidos grasos de cadena larga (Chow y Hollander, 1979b).

Se ha podido comprobar que el transporte de ácido linoleico se inhibe competitivamente por otros ácidos grasos insaturados, de forma que esta inhibición es mayor al aumentar el número de dobles enlaces;

así, el ácido oleico (18:1, n-9) lo inhibe menos que el linolénico (18:2, n-6) y este menos que el araquidónico (20:4, n-6). Nosotros utilizamos el ácido linolénico como posible inhibidor competitivo de la absorción de ácido linoleico (ver Tabla 19 y Fig. 6, 7 y 8), determinando las constantes cinéticas para ratas controles y reseccionadas una vez aplicada la ecuación de Dixon (ver Tabla 20).

La K_t o constante de transporte aparente obtenida por nosotros en yeyuno de ratas controles, según este sistema, fué de 0.968 mM, muy similar a la obtenida por Chow y Hollander (1979a) (0.967 mM) en las mismas condiciones experimentales. La V_{max} fué de 1470 pmoles/mg de tejido húmedo/6 min, también muy similar a la obtenida por Chow y Hollander (1979a) (1500 pmoles/mg de tejido húmedo /6 min).

Aunque hemos observado una disminución en la absorción de ácido linoleico en presencia de ácido linolénico, no podemos excluir la posibilidad, de que esta disminución en la absorción sea causada por un aumento en el tamaño de la micela al añadir el ácido linolénico al medio, ya que un aumento en el tamaño micelar haría disminuir la difusión de la misma a través de la capa de agua no agitada hasta la superficie del enterocito. En este sentido, se ha podido comprobar que la adición de lecitina al medio hace disminuir también la absorción de ácido linoleico por aumento del tamaño micelar (Reyner et al., 1985). Sin embargo, Chow y Hollander (1979a) comprobaron que a altas concentraciones de 1-3 mM la absorción de ácido linoleico era proporcional a la concentración. Debido a que tanto el ácido linoleico como el linolénico tienen igual nº de carbonos, la sustitución de uno por otro no debe introducir diferencias en el tamaño de la micela. De cualquier forma, si esta disminución en la absorción de ácido

linoleico al añadir ácido linolénico es debida a un factor u otro es difícil de dilucidar con nuestros experimentos.

La resección intestinal produjo un aumento tanto en los valores de V_{max} aparente, como en los valores de K_t , siendo los de V_{max} 2857 y 3679 pmoles/mg peso húmedo/6 min para ratas con un 50% y un 75% de resección respectivamente, y los de K_t de 2.3 y 2.4 mM respectivamente. Por otro lado, se produce una disminución en la constante de inhibición (K_i) tras la resección intestinal, disminución que es proporcional a la longitud de intestino excluido (0.806 mM para ratas controles, frente a 0.790 y 0.570 mM para ratas con resección del 50% y del 75%, respectivamente).

El hecho de que aumente la V_{max} tras la resección intestinal indica, que esta operación independientemente del efecto que produce sobre la morfología intestinal (Tabla 1), induce un aumento en el transporte de ácido linoleico por las células epiteliales. No se conoce con exactitud cual es el transportador encargado de realizar la absorción de ácido linoleico, pero varios trabajos apuntan a la existencia de una proteína captadora de ácidos grasos, que es a la vez la responsable de llevar estos ácidos grasos desde la membrana celular a los órganos intracelulares. Este ácido linoleico es un ácido graso esencial importante en el organismo, y pudiera ser que tras la resección aumentara el nº de transportadores por célula, sin excluir la posibilidad de cambios inherentes en la membrana de borde en cepillo (Keelan et al., 1985).

Otra posibilidad sería que la esterificación intracelular de los ácidos grasos fuera un paso limitante para la absorción de los mismos

(Chow y Hollander, 1979b), aunque según resultados obtenidos por nosotros, esta esterificación no aumenta tras la resección intestinal.

Distintos autores han apuntado la evidencia de que la presencia de la capa de agua no agitada conduce a una sobreestimación de la constante de afinidad junto con una subestimación de los coeficientes de permeabilidad pasiva (Thomson, 1979). Según esto, el aumento encontrado en la K_t tras la resección intestinal podría explicarse en parte por un aumento en la resistencia de la capa de agua no agitada, tan importante para la absorción de sustancias liposolubles, más que por una disminución real de la constante de afinidad, lo cual no tendría mucho sentido en una situación en la que el animal necesita absorber los sustratos nutritivos con la mayor eficiencia posible.

La absorción de ácido linoleico en ciego y colon de ratas controles y reseccionadas se estudió a una sola concentración de 0.05 mM, en las mismas condiciones experimentales citadas anteriormente, (Material y Métodos, apartado 3.8.2). Los resultados mostraron que tanto en el ciego como en el colon, se producía un aumento significativo de la absorción de ácido linoleico tras la resección intestinal, independientemente de la longitud de intestino delgado excluida (ver Tablas 21 y 22 y Fig. 9). No existen estudios previos sobre la absorción de ácido linoleico o ácidos grasos insaturados en el ciego y colon de ratas. Para comprobar que tipo de transporte tenía lugar en estos órganos y ver si era similar al que existe en el yeyuno, se realizaron estudios donde se añadió como posible inhibidor competitivo el ácido linolénico a concentración de 3 mM. Los resultados mostraron que tanto en ratas patrones como en reseccionadas, y tanto en ciego como en colon, la absorción de ácido linoleico se encontraba

inhibida, con unos % de inhibición muy similares en los tres grupos experimentales, en ciego (46-52%) y colon (47-48%) (ver Tablas 21 y 22 y Fig. 9). Estas observaciones sugieren que al igual que ocurre en el yeyuno, el transporte de ácido linoleico en el ciego y colon se realiza a través de un proceso mediado, bien con requerimiento (transporte activo) o sin requerimiento de energía (difusión facilitada). Para establecer esta diferencia, nuevamente realizamos estudios en ciego y colon de ratas controles, donde añadimos la mezcla ouabaina/rotenona (200 μM /80 μM), para depleccionar las células de ATP. Observamos que la absorción de ácido linoleico no se modificaba por la adición de esta mezcla, ni en el ciego (5.6 \pm 1.12 y 4.85 \pm 0.96 pmoles/mg de tejido húmedo/6 min. en ausencia y presencia de ouabaina/rotenona) ni en el colon (16.84 \pm 0.7 y 14.7 \pm 0.8 pmoles/mg de tejido húmedo/6 min., en ausencia y presencia de ouabaina/rotenona, respectivamente). Estos resultados podrían indicar, que el proceso de absorción de ácido linoleico en el ciego y colon se realiza a bajas concentraciones por un transporte mediado, aunque nuevamente no podemos excluir la posibilidad de que la disminución en la absorción de ácido linoleico sea debida al aumento de tamaño que adquiere la micela al añadir el ácido linolénico, que haría disminuir la difusión de la micela hasta la membrana del enterocito.

Distintos autores han comprobado que el ciego y colon sufren adaptaciones morfológicas y funcionales tras la resección intestinal, principalmente el ciego. De tal forma, que se observa un aumento de la absorción de otros sustratos tales como, ácidos biliares (Molina et al., 1986), electrolitos (Vázquez et al., 1988a) y azúcares (Delgado, 1983). Sin embargo, aunque la hiperplasia observada en el ciego y

colon tras la resección intestinal (Vázquez et al., 1987) podría ser la causante del aumento de absorción de ácido linoleico después de la operación, la forma de expresar nuestros resultados por unidad de masa intestinal indica que otros factores son también responsables de este aumento. Además, mediante estudios histológicos se ha observado que el colon de las ratas con resección intestinal del 50% del intestino delgado distal no sufría cambios respecto a ratas intactas (Vázquez et al., 1987), lo que nos confirma lo indicado anteriormente.

El aumento significativo de absorción de ácido linoleico, observado en el ciego y colon tras la resección intestinal a esta baja concentración (0.05 mM), no se observó en el yeyuno. Esto podría indicar que quizás, tras la resección intestinal, la membrana intestinal del intestino grueso se hace más lipofílica, aumentando la permeabilidad a las sustancias liposolubles. En este sentido, estudios realizados previamente indican que la permeabilidad del intestino grueso aumenta tras la resección intestinal (Vázquez et al., 1988b), pudiendo quedar aumentada la absorción de ácido linoleico tras la resección.

Por último, tampoco podemos excluir otros factores como la esterificación intracelular del ácido graso en el interior de la célula intestinal, que podría ser limitante para su absorción, así como cambios en las propiedades fisico-químicas de la membrana del intestino grueso, que hicieran aumentar su fluidez y por consiguiente aumentar la absorción de este ácido graso. Este último aspecto queda aún por determinar.

Por consiguiente, y a la vista de los resultados obtenidos, podemos concluir que la absorción de ácido linoleico en el yeyuno,

ciego y colon se realiza a bajas concentraciones por un proceso de difusión facilitada, y que la resección intestinal produce un aumento en la absorción de éste ácido en el yeyuno remanente, ciego y colon, independiente de la longitud de intestino delgado excluido, que no puede ser atribuido únicamente a la hiperplasia que sufren estos órganos tras este tipo de operación.

Al ser el ácido linoleico un ácido graso esencial, esta compensación de la pérdida de superficie absorptiva por parte del intestino remanente es, desde un punto de vista fisiológico, muy importante, pues una malabsorción intestinal de este ácido o deficiencias del mismo en la dieta, da por resultado una alteración en el crecimiento, aumento de infecciones, así como disminución en la síntesis de prostaglandinas, ya que este ácido graso es limitante para la formación del ácido araquidónico, precursora su vez de éstas. Además este ácido graso es importante como componente estructural de las membranas celulares al formar parte de los fosfolípidos, y a la vez es de utilidad para formar los quilomicrones que saldrán de la célula intestinal.

- ABSORCION DE COLESTEROL EN YEYUNO, CIEGO Y COLON. EFECTO DE LA RESECCION INTESTINAL.

La absorción intestinal de colesterol se estudió en el yeyuno, ciego y colon de ratas controles y ratas sometidas a una resección del 50% y 75% del intestino delgado distal, utilizando concentraciones de 0.05, 0.10, 0.20 y 0.40 mM.

La representación de la absorción total del colesterol frente a

las concentraciones de sustrato en el medio de incubación, presenta, la misma característica en los tres segmentos estudiados y para los tres grupos experimentales. Es una recta que pasa por el origen de coordenadas, siendo los valores de absorción directamente proporcionales a las concentraciones de sustrato en el medio de incubación (ver Fig. 10, 11 y 12). Esto nos indica que la absorción intestinal de colesterol se realiza por un proceso de difusión simple. Previos trabajos han indicado que en el yeyuno, el colesterol se absorbe por un proceso pasivo (Thomson y Dietschy, 1981), aunque otros autores han defendido la teoría de una absorción de colesterol yeyunal realizado por un proceso mediado (Smith y col., 1958), que ya parece quedar descartada.

Nuestros resultados muestran que en el caso del yeyuno y colon, la resección intestinal produce un aumento de absorción que es significativo para todas las concentraciones estudiadas, e independiente de la longitud de intestino delgado excluida (ver Tablas 23 y 25). Igualmente, en el ciego, la resección intestinal produjo un aumento de absorción de colesterol que es significativo para todas las concentraciones estudiadas y proporcional a la extensión de la resección (ver Tabla 24).

El aumento de absorción de colesterol observado en el yeyuno tras la resección, concuerda con los valores observados por Thomson (1986b) en conejo. Sin embargo, este mismo autor comprobó que la resección intestinal producía un aumento en la absorción de colesterol en el colon que no llegaba a ser significativo, lo que contrasta con nuestros resultados (Thomson, 1986).

Las constantes de difusión (K_d) obtenidas de las rectas de

regresión resultantes fueron, en el yeyuno de 19 para ratas controles y de 109 y 114 pmoles/mg de tejido húmedo/6 min/mM para ratas con resección del 50% y 75% respectivamente (ver Tabla 26). El valor encontrado en el yeyuno de ratas controles es muy similar al encontrado por Reynier y col (1987) utilizando la misma técnica de sacos evertidos vacíos, pero en este caso con una mezcla de taurocolato sódico 10 mM y oleato sódico 3.9 mM, como agentes formadores de micelas. Sin embargo nuestros valores son inferiores a los encontrados por Thomson y O'Brien (1981) en biopsias de intestino, probablemente debido a la distinta técnica utilizada.

En el caso del ciego, las K_d fueron menores que en el yeyuno: 8 en ratas controles frente a 15 y 32 pmoles/mg de tejido húmedo/6 min/mM para ratas con resección del 50% y 75% respectivamente. El colon presentó mayores K_d : 10 para controles frente a 73 y 76 pmoles/mg de tejido húmedo/6 min/mM para ratas reseccionadas (ver Tabla 26).

Como ya explicamos anteriormente, la resección intestinal produce hiperplasia en el intestino remanente, pero esta hiperplasia no puede justificar únicamente el aumento de absorción observado tras la resección, pues los resultados en los tres segmentos intestinales vienen expresados por unidad de masa. Al tratarse de una sustancia liposoluble, la absorción de colesterol, al igual que la de ácidos grasos, viene limitada por la resistencia efectiva de la capa de agua no agitada y por la permeabilidad de la membrana a la molécula. Hay trabajos que sugieren que tras la resección intestinal aumenta la resistencia de la capa de agua no agitada en yeyuno, lo cual dificultaría la absorción de colesterol. Por el contrario en el colon,

parece ser que la resección no modifica la resistencia efectiva de la capa de agua no agitada (Thomson, 1986b). El hecho de que tras la resección intestinal aumente la absorción de colesterol tanto en yeyuno como en colon, independientemente de que existan cambios o no en la resistencia efectiva de la capa de agua no agitada, indica que este factor no es el único responsable de los cambios producidos tras esta operación. Por lo que el aumento en la absorción total de colesterol encontrado tras la resección, debe reflejar más bien un cambio inherente en la capacidad de absorción del epitelio intestinal. Así, se ha podido comprobar que en situaciones diversas tales como envejecimiento, diabetes, irradiación (Thomson y Dietschy, 1981), suplementación de la dieta con ácidos grasos insaturados o saturados (Thomson et al., 1987) etc., cambios en el transporte intestinal de distintos nutrientes van asociados con modificaciones en la composición lipídica de la membrana. En este sentido, Gray et al. (1984) determinaron la microviscosidad y composición lipídica de la membrana de borde en cepillo en el yeyuno de ratas sometidas a resección intestinal, comprobando que existía una disminución en la microviscosidad de la membrana tras la resección, asociada a cambios en la proporción colesterol/fosfolípidos e índice de saturación de ácidos grasos de fosfolípidos de membrana.

Otros autores apuntaron que la absorción de colesterol viene limitada por su esterificación intracelular (Thomson et al., 1983), pero según resultados que mostramos en otra sección de este trabajo, la actividad ACAT no se ve modificada en ninguno de los tres segmentos estudiados, con lo cual estos resultados no apoyarían dicha hipótesis.

Para finalizar, habría que indicar que el estudio de la absorción

de ácido linoleico y colesterol, se ha realizado mediante técnicas *in vitro*, donde se ha facilitado la formación de micelas añadiendo taurocolato sódico 10 mM. Pero hay que tener en cuenta, que las ratas reseccionadas al tener interrumpida la circulación entero-hepática de sales biliares, el "pool" luminal de sales biliares puede quedar disminuido, y por tanto afectada la capacidad de formar micelas, lo que alteraría la solubilidad de las grasas procedentes de la dieta. Esta situación nos indica que los resultados obtenidos *in vitro*, no pueden extrapolarse en igual magnitud para la situación *in vivo*, aunque estudios realizados previamente determinando la concentración de sales biliares tras la resección (Vázquez et al., 1985), muestran que, aunque esta concentración está disminuida, supera la cantidad utilizada para este estudio.

6. CONCLUSIONES

1ª.- La resección del intestino delgado distal induce en las ratas una disminución de la eficacia alimentaria.

2ª.- La resección de intestino delgado distal produce en el hígado un incremento significativo de la actividad total de la HMG-CoA reductasa, acompañado de un aumento en la relación Ra/Rt. Por el contrario, la actividad total de la ACAT desciende significativamente, siendo este descenso proporcional a la resección practicada.

3ª.- En el intestino delgado remanente, ciego y colon no se observaron diferencias significativas en las actividades de la HMG-CoA reductasa y ACAT entre las ratas controles y reseccionadas.

4ª.- Tras la resección intestinal se observa en los microsomas del hígado, un aumento significativo en los niveles de colesterol libre, acompañado por una disminución significativa en los ésteres de colesterol, estando estos cambios relacionados con la extensión de la resección realizada. El contenido de fosfolípidos no se modificó en los distintos grupos experimentales.

5ª.- La resección del 75% del intestino delgado distal, produce en los microsomas hepáticos cambios en la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos, observándose un aumento en la proporción de ácido palmitoleico y oleico, y una disminución en la de ácidos grasos poliinsaturados de la familia (n-6) y (n-3), principalmente debida al descenso en el contenido de ácido linoleico y araquidónico.

6ª.- El contenido de colesterol libre de los microsomas de intestino delgado se eleva significativamente tras la resección intestinal, no existiendo variaciones en los niveles de ésteres de colesterol y fosfolípidos.

7ª.- En los animales reseccionados, se observaron variaciones en el perfil de ácidos grasos de los fosfolípidos microsomales del intestino delgado, encontrándose un aumento significativo en los niveles de ácidos grasos saturados y ácido linoleico, junto con una disminución del ácido araquidónico.

8ª.- En el tejido hepático, la resección intestinal produce un descenso en el contenido de ésteres de colesterol, no modificándose los niveles de colesterol libre, fosfolípidos y triglicéridos.

9ª.- El estudio de las fracciones lipídicas del suero de los animales ilectomizados, muestra un aumento significativo en los niveles de colesterol libre y triglicéridos, junto con una disminución que no llega a ser significativa de ésteres de colesterol. El contenido de fosfolípidos no se modifica en ninguno de los grupos experimentales.

10ª.- La resección intestinal modifica la composición en ácidos grasos de las fracciones lipídicas del tejido hepático. En los triglicéridos se observa un aumento de los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y del ácido linoleico. En las fracciones de fosfolípidos y ésteres de colesterol, disminuyen los ácidos grasos saturados y aumentan los monoinsaturados. Además, los ésteres de

colesterol muestran un aumento de ácido linoleico junto con un descenso progresivo de ácido araquidónico.

11ª.- El perfil en ácidos grasos de las fracciones lipídicas del suero indica, que la ilectomía produce un incremento significativo del ácido araquidónico en los triglicéridos y ésteres de colesterol, compensado por una disminución del mismo en los fosfolípidos.

12ª.- La absorción total de ácido linoleico en el yeyuno, muestra una cinética de saturación tipo Michaelis-Menten, tanto en animales controles como reseccionadas, produciendo la resección intestinal un aumento significativo en su absorción a concentraciones iguales o mayores a 0.4 mM.

13ª.- Mediante el método de Dixon y utilizando el ácido linolénico como inhibidor competitivo del transporte del ácido linoleico, se han calculado las constantes aparentes de transporte K_t y de velocidad máxima. La V_{max} del ácido linoleico fué de 1470 pmoles/mg/6 min, en ratas controles, y de 2857 y 3679 pmoles/mg/6 min para ratas con resección del 50 y 75%, respectivamente. Los valores de K_t fueron 0.968 mM para ratas intactas, frente a 2.345 y 2.444 mM para ratas reseçadas.

14ª.- La absorción de ácido linoleico (0.05 mM) en el ciego y colon aumentó tras la resección intestinal. El ácido linolénico inhibió la absorción de ácido linoleico por el ciego y colon, siendo el grado de inhibición de igual magnitud en ratas controles y reseccionadas.

15^a. - La absorción de colesterol en el yeyuno, ciego y colon, aumentó significativamente como consecuencia de la operación practicada, siendo este aumento mayor a medida que se incrementaba la concentración de colesterol en el medio de incubación.

16^a. - La constante de difusión (Kd) para el colesterol, medidas en pmoles/mg/6 min/mM, fueron: en el yeyuno, 19 para ratas controles y 109 y 114 para ratas reseccionadas; en el ciego, 8 para controles y 15 y 32, para ratas operadas; y en colon, 10 en ratas controles frente a 73 y 76 en animales reseccionados.

7. BIBLIOGRAFIA

AKESSON, B.; NILSSON, A. (1988) Intestinal absorption of phosphatidylcholine and tryglycerides after ileal resection *Scand. J. Gastroenterol.* 23:251-256.

ANDERSON, J.M.; DIETSCHY, J.M. (1977) Regulation of sterol synthesis in 15 tissues of rat. II. Role of rat and human high and low density plasma lipoproteins and of rat chylomicron remnants. *J. Biol. Chem.* 252: 3652- 3659.

AREBALO, R.E.; HARDGRAVE, J.E.; SCALLEN, T.J. (1981) The in vivo regulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Phosphorylation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 256(2): 571-574, 1981.

BALASUBRAMANIAM, S.; VENKATESEN, S.; MITROPOULOS, K.; PETERS, T.J. (1978) The submicrosomal localization of acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferase and its substrate, and of cholesteryl esters in rat liver. *Biochem. J.* 174:863-872.

BENNET-CLARCK, S.B.; TERCYAK, (1984) Reduced cholesterol transmucosal transport in rats inhibited mucosal acyl CoA-cholesterol acyltransferase and normal pancreatic function. *J. Lipid Res.* 25: 148-159.

BOLUFER, J.; DELGADO, M.J.; MURILLO, F.; MURILLO, M.L. (1986) Galactose transport across rat small intestine *in vivo* following distal resection of varying extents. *Quart. J. Exper. Physiol.* 71:423-431.

BOSISIO, E; CIGHETTI, G.; KIENLE, M.E.; TRITAPEPE, R.; GALLI, G. (1984) HMG-CoA reductase and cholesterol-7 α -hydroxylase in human liver. *Life Sci.* 34:2075, 2081.

BRENNER, R.R. (1974) The oxidative desaturation of unsaturated fatty acids in animals. *Mol. Cell. Biochem.* 3: 41-52.

BRENNER, R.R. (1977) Regulatory function of Δ^6 -desaturase. Key enzyme of polyunsaturated fatty acid synthesis. En: Bazan, N.G., Brenner, R.R. y Giusto, N.M. Function and biosynthesis of lipids. *Adv. in Exp. Med. and Biol.*, vol. 83, 85-99. Plenum Press. New York.

BRENNER, R.R. (1981) Nutritional and hormonal factors influencing desaturation of essential fatty acids. En Holman, R.T. (ed): Essential fatty acids and prostaglandins. *Progress in Lipid Res.*, vol XX, 41-47. Pergamon Press. Nueva York.

BRENNER, R.R.; PELUFFO, R.O. (1966) Effect of saturated and unsaturated fatty acids on the desaturation *in vitro* of palmitic, stearic, oleic, linoleic and linolenic acids. *J. Biol. Chem.* 241: 5213-5219.

BROWN M.S.; GOLDSTEIN, (1978) General scheme for regulation of cholesterol metabolism in mammalian cells. In: Disturbances in Lipid and Lipoproteins Metabolism. J.M. Dietschy, A.M. Gotto y J.A. Ontko, ed. American Physiological Society. Bethesda MD, 173-180.

BROWN, M.S.; GOLDSTEIN, J.L.; DIETSCHY, J.M. (1979) Active and inactive forms of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in the liver of the rat. Comparison with the rate of cholesterol synthesis in different physiological states. *J. Biol. Chem.* 254(12): 5144-5149, 1979.

CARTER-SU, C.; KIMMICH, G.A. (1979) Membrane potentials and sugar transport by ATP-depleted intestinal cells: effect of anion gradients. *Am. J. Physiol.* 237:C67-C74.

CHAPMAN, D.; KRAMERS, M.T.C.; RESTALL, C.J. (1985) Cholesterol and biomembranes structures. En: Sterols and Bile Acids. H. Danielsson and Sojvall J. (eds.) Elsevier Publishers B.V.

- CHOW, S.; HOLLANDER, D. (1978) Arachidonic acid intestinal transport. Mechanism of transport and influence of luminal factors on absorption in vitro. *Lipids* 13(11): 768-776.
- CHOW, S.; HOLLANDER, D. (1979a) A dual, concentration-dependent absorption mechanism of linoleic acid by rat jejunum in vivo. *J. Lipid. Res.* 20: 349-356.
- CHOW, S.; HOLLANDER, R.D. (1979b) Linoleic acid absorption in the unanesthetized rat: mechanism of transport and influence of luminal factors on absorption. *Lipids* 14:378-385.
- CICCOLI, L.; COMPORTI, M. (1983) Variations of fatty acid composition of erythrocyte and plasma lipids in the rat during the first period of life. *Lipids* 18:363-370.
- CORRAZE, G.; LACOMBE, C.; NIBLELINK, M. (1984) Influence of cholesterol feeding and dietary restriction on cholesterol absorption in rabbits. *Lipids* 19(10): 812-814.
- DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. (1986) Molecular Cell Biology. Capítulos 5 y 14. Scientific American Books (eds).
- DAVIS, P.J.; POZNANSKY, M.J. (1987) Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase by changes in microsomal cholesterol content or phospholipid composition. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 84:118-121.
- DELGADO, M.J. (1983) Variaciones histofisiológicas en el intestino de rata tras enterectomía distal. Tesis Doctoral. Sevilla.
- DIETSCHY, J.; WILSON, J.D. (1970) Regulation of cholesterol metabolism. *N. Engl. J. Med.* 282:1128-1138.

DOWLING, R.M.; BOOTH, C.C. (1966) Functional compensation after small-bowel resection in man. Demonstration by direct measurement. *Lancet* (16), 146.

DREYON, C.A.; ENGELHORN, S.C.; STEINBERG, D. (1980) Secretion of very low density proteins enriched in cholesterol esters by cultured rat hepatocytes during stimulation of intracellular cholesterol esterification. *J. Lipid Res.* 21: 1065-1071.

ERICKSSON, L.C.; DEPIERRE, J.W.; DALLNER, G. (1978) Preparations and properties of microsomal fractions. En: Hepatic cytochrome P-450 monooxygenase system. J.B. Shenkman y D. Kupfer (ed). Pergamon Press.

ERICKSON, S.; SHREWSBURY, M.A.; BROOKS, C. et al (1980) Rat liver acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase: its regulation in vivo and some of its properties in vitro. *J. Lipid Res.* 21: 930-941.

FIELD, F.J.; ALBRIGHT, E.J.; MATHUR, S.N. (1987) Effect of dietary n-3 fatty acids on HMG-CoA reductase and ACAT activities in liver and intestine of the rabbit. *J. Lipid Res.* 28: 58-58.

FIELD, F.J.; ERICKSON, S.K.; COOPER, A.D. (1982a) Intestinal acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT). Regulation in vivo and in vitro. *Gastroenterology* 83: 873-880.

FIELD, F.J.; ERICKSON, S.K.; SHREWSBURY, M.A.; COOPER, A.D. (1982b) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat intestine: subcellular localization and in vitro regulation. *J. Lipid Res.* 23: 105-113.

FIELD, F.J.; SALOME, R.G. (1982) Effect of dietary fat saturation, cholesterol and cholestiramine on acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in rabbit intestinal microsomes. *Biochim. Biophys. Acta* 712:557-570.

- FOLCH, J.; LESS, M.; SLOAN-STANLEY, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from the animal tissues. *J. Biol. Chem.* 33: 497-509.
- GALLO, L.L.; BENNET-CLARK, S.; MYERS, S.; VAHOUNY, G.V. (1984a) ColestErol absorption in rat intestine: role of cholesterol esterase and acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase *J. Lipid Res.* 25: 604-612.
- GALLO, L.L.; MYERS, S.; VAHOUNY, G.V. (1984b) Rat intestinal Acyl Coenzyme A: cholesterol Acyl Transferase properties and localization. *Proc. Soc. Ex. Biol. Med.* 177: 188-196.
- GALLO, L.L.; WADSWORTH, J.A.; VAHOUNY, G.V. (1987) Normal cholesterol absorption in rats deficient in intestinal acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.* 28: 381-387.
- GALLO-TORRES, H.E.; MILLER, O.N.; HAMILTON, J.G. (1971) Fhurther studies in the role of bile salts in cholesterol esterification and absorption from the gut. *Arch. Biochem. Biophys.* 143: 22-36.
- GARG, M.L.; KEELAN, M.; THOMSON, A.B.R.; CLANDININ, M.T. (1988) Fatty acid desaturation in intestinal mucosa. *Biochim. Biophys. Acta* 958: 139-141.
- GARG, M.L.; SNOSWELL, A.M.; SABINE, J.R. (1985) Effect of dietary cholesterol on cholesterol content and fatty acids profiles on rat liver and plasma. *Nutr. Rep. Intern.* 23(1): 117-127.
- GAUGL, A.; OCKNER, R.K. (1975) Intestinal metabolism of lipids and lipoproteins. *Gastroenterology* 68: 167-189.
- GAVEY, K.L.; NOLAND, B.J.; SCALLEN, T.J. (1981) The participation of sterol carrier protein in conversion of cholesterol to cholesterol ester by rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 256: 2993-2999.

- GILL, J.F. Jr; KENELLY, P.J. RODWELL, W. (1985) Control mechanisms in sterol uptake and biosynthesis. En: Sterols and Bile Acids. 1985. H. Danielsson and J. Sjovall (eds) Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division).
- GLICKMAN, R.M. (1984) The role of the gastrointestinal tract in nutrient delivery. Vol. 3, pp: 145-156. Acad. Press. Inc. London.
- GRAY, J.P.; TREVINO, H.; NICHOLS, S.; MICHEL, A.; URBAN, E.; HOYUMPA, V.A. (1984) Effects of intestinal resection on microviscosity and lipid composition of rat enterocyte brush border membrane. *Gastroenterology* 86(5): 1096.
- HAUGEN, R.; NORUM, K.R. (1976) Coenzyme A-dependent esterification of cholesterol by rat intestinal mucosa. *Scand. J. Gastroenterol.* 11: 615-621.
- HELGERUD, P.; HAUGEN, R.; NORUM, K.R. (1982) The effect of feeding and fasting on the activity of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in rat small intestine. *Eur. J. Clin. Invest.* 12: 493-500.
- HERBERT, V. (1960) Mechanism of absorption of vitamin B-12. *Federation Proc.* 19: 884-886.
- HOLLANDER, D.; MORGAN, D. (1979) Increase in cholesterol intestinal absorption with aging in the rat. *Exp. Geront.* 14: 201-204.
- HOLLANDER, D.; MURALIDHARA, K.S. (1977) Vitamin A₁ intestinal absorption *in vivo*: influence of luminal factors on transport. *Am. J. Physiol.* 232: E471-E477.
- HUANG, T.C.; CHEM, C.P.; WELFER, W.; RAFTERY, A. (1961) A stable reagent for the Lieberman-Buchard reaction. Application to rapid serum cholesterol determination. *Anal. Chem.* 33: 1405-1407.

- HUANG, Y.S.; HORROBIN, D.F.; MANKU, M.S.; MITCHELL, J.; RYAN, M.A. (1984) Tissue phospholipid fatty acid composition in the diabetic rat. *Lipids* 19: 367-370.
- INNIS, S. (1986) The activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co A reductase and acyl-Co A:cholesterol acyltransferase in hepatic microsomes from males, females and pregnant rats. The effect of cholestyramine treatment and the relationship of the enzyme activity to microsomal lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta* 875: 355-361.
- JENKE, H-S; LOWEL, M.; BERNDT, J. (1981) *In vivo* effect of cholesterol feeding on short term regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl- Co A reductase during diurnal cycle. *J. Biol. Chem.* 256(18): 9622-9625.
- JONES, A; GLOMSET, J. (1985) Biosynthesis, function and metabolism of sterol esters. En: Sterols and Bile Acids. 1985. H. Danielsson and J. Sjovall (eds) Elsevier Science Publishers B.V. (biomedical Division).
- KEELAN, M; WALKER, K.; THOMSON, A.B.R. (1985) Resection of rabbit ileon: effect on brush border membrane enzyme markers and lipids. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63: 1528-1532.
- KEIM, N.L.; MARE-PERLMAN, J.A. (1984) Development of hepatic steatosis and essential fatty acid deficiency in rats with hypercaloric fat-free parenteral nutrition. *J. Nutr.* 114: 18007-1815.
- KENELLY, P.J.; RODWELL, J.W. (1985) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by reversible phosphorylation-dephosphorylation. *J. Lipid Res.* 26: 903-914.
- KUIPERS, F.; HAVING, R.; BOSSCHIETER, H.; TOOROP, G.P.; HINDRIKS, F.R.; VARK, R.J. (1985) Enterohepatic circulation in the rat. *Gastroenterology* 88: 403-411.

LIPKIN, M. (1984) The role of the gastrointestinal tract in nutrient delivery. Vol 3, pp:17-37. Acad. Press. Inc. London.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

MARTINS, F.M.; WENBERG, A.; MEORLING, S.; KIHBERG, R. (1984) Serum lipids and fatty acid composition of tissues in rats on total parenteral nutrition (TPN). *Lipids* 19: 728-737.

MATHUR, S.N.; ARMSTRONG, M.L.; ALBER, C.A.; SPECTOR, A.A. (1981) Hepatic acylcoenzyme A:cholesterol acyltransferase activity during diet-induced hypercholesterolemia in cynomolgus monkeys. *J. Lipid Res.* 22: 659-667.

MIETTINEN, T.A.; PETOKALLIO, P. (1971) Bile salt, fat water and vitamine B₁₂ excretion after ilectomy. *Scand. J. Gastroenterol.* 6: 543.

MITROPOULOS, K.A.; BALASUBRAMANIAN, S.; VENKATESAN, S.; REEVES, B.E.A. (1978) On the mechanisms for the regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, of cholesterol 7 α -hydroxylase and of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase by free cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta.* 530: 99-110.

MOLINA, M.T.; ILUNDAIN, A.; MURILLO, M.L.; BOLUFER, J.; VAZQUEZ, C.M. (1986) Bile salt absorption in the small and large intestine after distal resection in the rat. *IRCS Med Sci* 14:539-540.

MURILLO, M.L.; CAMPOS, M.S.; MURILLO, A.; VARELA, G. (1978) Influencia de las resecciones intestinales en la rata sobre algunos aspectos de las secreciones digestivas. *Rev. esp. Fisiol.* 34: 365-370.

- MYANT, N.B.; MITROPOULOS, K.A. (1977) Cholesterol 7 α -hydroxylase. *J. Lipid Res.* 18: 135-153.
- NORDSTROM, J.L.; RODWELL, V.W.; MITSCHELEN, J.J. (1977) Interconversion of active and inactive forms of rat liver hydroxymethylglutaryl CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 252: 8924-8934.
- OGURA, M.; SHIGA, J.; YAMASAKI, K. (1971) Studies on the cholesterol pool as the precursor of bile acids in the rats. *J. Biochem.* 70, 967.
- PACKARD, C.J.; SHEPPERD, J. (1982) The hepatobiliary axis and lipoprotein metabolism: effects of bile acid sequestrants and ileal bypass surgery. *J. Lipid Res.* 23: 1081-1098.
- PANINI, S.R.; LEHRER, G.; ROGERS, H.; RUDNEY, H. (1979) Distribution of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and alkaline phosphatase activities in isolated ileal epithelial cells of fed, fasted, cholestyramine-fed, and 4-aminopyrazolo[3, 4, d]-pyrimidine-treated rats. *J. Lipid Res.* 20: 879-889.
- PANINI, S.R.; RUDNEY, H. (1980) Short term reversible modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in isolated epithelial cells from rat ileum. *J. Biol. Chem.* 255: 11633-11636.
- PURDY, B.H.; FIELD, F.J. (1984) Regulation of acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity by lipoproteins in the intestine of parabionts rats. *J. Clin. Invest.* 74: 351-357, 1984.
- RAMIREZ, H.; ALEJANDRE, M.J.; SEGOVIA, J.L.; GARCIA-PEREGRIN, E. (1982) Development of the diurnal rythm of chick 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reductase. *Lipids* 17: 434-436.

- RAMIREZ, H.; ALEJANDRE, M.J.; SEGOVIA, J.L.; GARCIA-PEREGRIN, E. (1981) Different thermal behavior of neonatal hepatic and cerebral 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reductase *Lipids* 16: 552-554.
- REYNER, M.O.; LAFORT, H.; CROTTE, C.; SAUVE, P.; GEROLAMI, A. (1985) Intestinal cholesterol uptake: comparison between mixed micelles containing lecithin or lysolecithin. *Lipids* 20(3): 145-150.
- RODWELL, V.W.; MC NAMARA, D.J.; SHAPIRO, D.J. (1973) Regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Adv. Enzymol.* 38: 373-412.
- SABINE, J.R.; JAMES, M.J. (1976) The intracellular mechanism responsible for dietary back control of cholesterol synthesis. *Life Sci.* 18: 1185-1192.
- SCALEN, T.J.; SANCHVI, A. (1983) Regulation of three enzymes in cholesterol metabolism by phosphorylation/dephosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2477-2480.
- SHAPIRO, D.J.; NORDSTROM, J.L.; MITSCHELEN, J.J.; RODWELL, V.W.; SCHIMKE, R.T. (1974) Microassay for HMG-CoA reductase in rat liver and in L-cell fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 370: 369-377.
- SHAPIRO, D.J.; RODWELL, V.W. (1971) Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol synthesis. *J. Biol. Chem.* 246: 3210-3216.
- SHEFER, S.; CHENG, F.W.; HANSER, S.; BATTA, A.T.; SALEN, G. (1981) Regulation of bile acid synthesis. Measurement of cholesterol 7 α -hydroxylase activity in rat liver microsomal preparations in the absence of endogenous cholesterol. *J. Lipid Res.* 22: 532.

SHEFER, S.; HAUSER, S.; LAPAR, V.; MOSBACH, E.H. (1973) Regulatory effects of sterols and bile acids on hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and cholesterol-7 α -hydroxylase in the rat. *J. Lipid Res.* 14:

SIPERSTEIN, M.D. (1960) The homeostatic control of cholesterol synthesis in liver. *Am. J. Clin. Nutr.* 8: 645-650.

SKLAN, D.; TROSTLER, N. (1977) Site and extent of thiamine absorption in the rat. *J. Nutr.* 107: 353-356.

SMITH, A.L.; HANK, R.; TREADWELL, C.R. (1958) Uptake of cholesterol and cholesterol esters by inverted sacs of rat intestine. *Am. J. Physiol.* 193: 34-40.

SPADY, D.K.; DIETSCHY, J.M. (1983) Sterol synthesis *in vivo* in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster and rat. *J. Lipid Res.* 24: 303-315.

SPECTOR, A.A.; KADUCE, T.L.; DANE, R.W. (1980) Effect of dietary fat saturation on acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase activity of rat liver microsomes. *J. Lipid Res.* 21: 169-179.

SPARRY, W.M.; BLAND, M.N. (1975) Analysis of lipid and lipoproteins. A.O.C.S. (ed).

SPECTOR, A.A.; YOREK, M.A. (1985) Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* 26: 1015-1035.

STANGE, E.F.; ALAVI, M.; SCHEIDER, A.; DITSCHUNEIT, H.; POLEY, J.R. (1981) Influence of dietary cholesterol, saturated and unsaturated lipid on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in rabbit intestine and liver. *J. Lipid Res.* 22: 47-56.

STANGE, E.F.; DIETSCHY, J.M. (1985) Cholesterol absorption and metabolism by the intestinal epithelium. En: Sterols and Bile Acids. Elsevier Science Publishers B.V. (biomedical Division).

STANGE, E.F.; SUCKLING, K.E.; DIETSCHY, J.M. (1983) Synthesis and coenzyme A-dependent estrification of cholesterol in rat intestinal epithelium, differences in cellular localization and mechanisms of regulation. *J. Bio. Chem.* 258: 12868-12875.

STRANDBERG, T.E.; TILVIS, R.S.; MIETTINEN, T.A. (1983) Regulation of cholesterol synthesis in jejunal absorptive cells of the rat. *Scand. J. Gastroenterol.* 18: 1017-1023.

THOMSON A.B.R. (1979) Limitations of Michaelis-Menten kinetics in presence of intestinal unstirred layers *Am. J. Physiol.* 236(6): E701-E709.

THOMSON, A.B.R. (1980) Influence of sites and unstirred layers on the unidirectional flux of cholesterol and fatty acids into the rabbit intestine. *J. Lipid Res.* 21: 1097-1107.

THOMSON, A.B.R. (1981) Aging and cholesterol uptake in the rabbit jejunum. Role of the bile salt micelle and the unstirred water layer. *Dig. Dis. Science* 26(10): 890-896.

THOMSON A.B.R. (1986a) Defined formula diets alter jejunal and colonic uptake of lipids in rabbits with intact intestinal tract and following ileal resection. *Res. Exp. Med.* 186: 413-426.

THOMSON A.B.R. (1986b) Uptake of lipids into rabbit jejunum and colon following ileal resection. Effect of variations in dietary content of carbohydrate. *Dig. Dis. Sci.* 31(2): 193-201.

THOMSON, A.B.R.; DIETSCHY, J.M. (1981) Intestinal lipid absorption: major extracellular and intracellular events. En: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, L.R. Johnson (ed.) Raven Press, New York.

THOMSON, A.B.R.; KEELAN, M.; CLANDININ, M.T.; WALKER, K. Dietary fat selectivity alters transport properties of rat jejunum. (1986) *J. Clin. Invest.* 77: 279-298.

THOMSON, A.B.R.; KEELAN, M.; CLANDININ, M.T. (1987) Onset and persistence of changes in intestinal transport following dietary fat manipulation. *Lipids* 22: 22-27.

THOMSON, A.B.R.; HOTKE, C.A.; O'BRIEN, B.D.; WEINSTEIN, W.M. (1983) Intestinal uptake of fatty acids and cholesterol in four animals species and man: role of unstirred water layer and bile salt micelle. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A(2): 221-232.

THOMSON, A.B.R.; O'BRIEN, B.D. (1981) Uptake of cholesterol into rabbit jejunum using three in vitro techniques: importance of the bile acid micelles and unstirred water layer. *Am. J. Physiol.* 241: G270-G274.

TURLEY, S.D.; ANDERSEN, J.M.; DIETSCHY, M. (1981) Rates of sterol synthesis and uptake in the major organs of the rat *in vivo*. *J. Lipid Res.* 22: 551-569.

YAZQUEZ, C.M.; ILUNDAIN, A.; MURILLO, M.L.; BOLUFER, J. (1985) Effect of distal small bowel resection on bile salt absorption in caecum. *Rev. esp. Fisiol.* 41: 359-362.

YAZQUEZ, C.M.; BOLUFER, J.; MURILLO, M.L. (1986) Effect of distal enterectomy on cholesterol and bile salt levels in the rat. *Rev. esp. Fisiol.* 42: 289-294.

- TURLEY, S.D.; ANDERSEN, J.M.; DIETSCHY, M. (1981) Rates of strol synthesis and uptake in the major organs of the rat *in vivo*. *J. Lipid Res.* 22: 551-569.
- VAZQUEZ, C.M.; ILUNDAIN, A.; MURILLO, M.L.; BOLUFER, J. (1985) Effect of distal small bowel resection on bile salt absorption in caecum. *Rev. esp. Fisiol.* 41: 359-362.
- VAZQUEZ, C.M.; BOLUFER, J.; MURILLO, M.L. (1986) Effect of distal enterectomy on cholesterol and bile salt levels in the rat. *Rev. esp. Fisiol.* 42: 289-294.
- VAZQUEZ, C.M.; MOLINA, M.T.; ILUNDAIN, A. (1987) Structural and ultrastructural adaptive changes in the caecum and colon of rats after distal small bowel resection *Acta Microscópica* 10(1): 57-65.
- VAZQUEZ, C.M.; MOLINA, M.T.; ILUNDAIN, A. (1988a) Adaptation of electrolytes and fluid transport in rat small bowel resection. *Rev. esp. Fisiol.* 44(2): 141-146.
- VAZQUEZ, C.M.; MOLINA, M.T.; ILUNDAIN, A. (1988b) Distal small bowel resection increases mucosal permeability in the large intestine. *Digestion*
- VIOQUE, E.; HOLMAN, R.T. (1962) Quantitative stimation of esters by thin layer chromatografy *J. Amer. Chem. Soc.* 30: 63-66.
- WATT, S.M.; SIMMOND, W.J. (1976) The specificity of bile salts in the intestinal absorption of micellar cholesterol in the rat. *Clin. Exp. Pharm. Phys.* 3: 305-322.
- WESTERGAARD, H.; DIETSCHY, J.M. (1976) Delineation of dimesions and permeability characteristics of the two major difussion barriers to passive mucosal uptake in rabbit intestine. *J. Clin. Invest.* 54: 718-732.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D.^a M.^a TERESA MOLINA LOPEZ

titulada "Efecto de la resección intestinal sobre algunos aspectos del metabolismo lipídico en ratas"

acordó otorgarle la calificación de APTO CUM LAUDE

Sevilla, 19 de Diciembre 1988

El Vocál,

Enioz

El Presidente

[Signature]

El Vocál,

[Signature]

El Secretario,

[Signature]

El Vocál,

[Signature]

El Doctorado,

[Signature]

